UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
JENNYFER ANDREA ALDANA MEJÍA

**Avaliação dos efeitos citoprotetores de compostos isolados de
Copaifera langsdorffii Desf. contra citotoxicidade induzida pela
exposição ao metilmercúrio e ao chumbo**

Ribeirão Preto
2017

JENNYFER ANDREA ALDANA MEJÍA

**Avaliação dos efeitos citoprotetores de compostos isolados de
Copaifera langsdorffii Desf. contra citotoxicidade induzida pela
exposição ao metilmercúrio e ao chumbo**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Produtos
Naturais e Sintéticos

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 15/09/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Aldana Mejía, Jennyfer Andrea

Avaliação dos efeitos citoprotetores de compostos isolados de *Copaifera langsdorffii* Desf. contra citotoxicidade induzida pela exposição ao metilmercúrio e ao chumbo. Ribeirão Preto, 2017. 124 p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Bastos, Jairo Kenupp.

1. *Copaifera langsdorffii*.
2. Citotoxicidade.
3. Citoproteção.
4. Metais pesados.
5. Flavonoides.
6. Galoilquínicos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Jennyfer Andrea Aldana Mejía

Avaliação dos efeitos citoprotetores de compostos isolados de *Copaifera langsdorffii* Desf. contra citotoxicidade induzida pela exposição ao metilmercúrio e ao chumbo.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabajo a mis padres Pedro y Elena, y
a mis hermanos Sonia y Jorge. Son ellos los
cómplices de mis sueños y es por su amor, cariño
y esfuerzo que me atrevo a soñar y a cumplir esos
sueños.

Este trabajo también va dedicado a Sofía; porque
no hay mejor método de educar que el ejemplo,
es la lucha constante por ser la mejor versión de
lo que se quiere ser, la más grande enseñanza que
te puedo dejar.

A ustedes siempre irán dedicados todos mis
logros...

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de mestrado concedida através do processo 2015/05954-8.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela bolsa inicial concedida.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP e seu programa de pós-graduação pela disponibilidade dos seus funcionários e das suas instalações, que facilitaram o desenvolvimento deste projeto.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos, pela aceitação, oportunidades e ensinamentos, assim como pelos auxílios diante dos imprevistos.

Ao Prof. Dr. Gustavo Rafael Mazzaron Barcelos pela co-orientação neste trabalho. À Prof. Dra. Lusânia Maria Greggi Antunes e pela concessão de uso instalações do Laboratório de Nutrigenômica da FCFRP - USP para a realização dos ensaios biológicos.

A todo o pessoal do Laboratório de Farmacognosia da FCFRP - USP, entre estudantes e funcionários por criar o melhor ambiente para trabalhar, compartilhar experiências e conhecimentos. Agradeço especialmente a Angélica pelo recebimento e ajuda facilitando a consecução de muitos materiais via empréstimo de outros laboratórios, assim como por sua motivação constante no decorrer do projeto.

Aos meus colegas Victor Ribeiro (VR), Mohamed Abdelsalam (MA) e Carol Arruda (CA), por terem contribuído enriquecedoramente no projeto e na minha formação acadêmica e pessoal. Muitas horas de estudo e discussões acadêmicas (VR, MA, CA), ajuda nos protocolos de fracionamento (MA), análises cromatográficas (CA; MA), colaboração nos isolamentos (CA), e estudo dos espectros de RMN (CA; MA) facilitaram o entendimento, aprendizagem e conclusão do projeto.

Aos doutores Juliana Costa, Mariza Miranda e Erick Motta pelo fornecimento dos flavonoides e galoilquínicos que serviram como padrões de comparação. Agradeço também a Juliana e Mariza pela disposição de ensinar, além dos conselhos e auxílio na parte inicial dos experimentos fitoquímicos e do protocolo de uso do equipamento de cromatografia contracorrente.

Ao pessoal do Laboratório de Nutrigenômica da FCFRP - USP pelo auxílio na cultura de células, especialmente ao Diego Ribeiro pelo ensino dos protocolos e a ajuda na etapa inicial do projeto, e ao Rone de Grandis pela sua disposição de acolhimento e ajuda no processo experimental e nas discussões dos resultados obtidos.

A Heloiza Diniz Nicolella, Ana Paula Guissoni e Iara Squarisi do Laboratório de Citogenética e Mutagênese da Unifran, dirigido pela Prof. Dra. Denise Crispim Tavares, pela colaboração com os ensaios de eficiência clonogênica.

Aos laboratórios de Toxicologia Funcional e de Biossensores e sistema nanoestruturados, ambos da FCFRP – USP pelo fornecimento dos reagentes metilmercúrio, acetato de chumbo e nitrato de chumbo usados nos experimentos.

Ao David Casilimas pelo auxílio e ajuda na análise estatística dos dados na primeira fase do projeto.

Ao meu grande amigo Federico Padilla por ser o motivador da minha viagem ao Brasil, pela ajuda inicial nas análises cromatográficas e por ser criador de oportunidades de parceria; sem seu conselho, hoje não seria realidade um dos meus grandes sonhos em uma das melhores universidades deste lado do mundo; muitíssimo obrigada.

RESUMO

ALDANA MEJÍA, J. A. **Avaliação dos efeitos citoprotetores de compostos isolados de *Copaifera langsdorffii* Desf. contra citotoxicidade induzida pela exposição ao metilmercúrio e ao chumbo.** 2017. 122f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

As plantas do gênero *Copaifera* mais bem conhecidas como “copaibeira” são árvores tropicais, reconhecidas pela produção de uma oleorresina extraída do tronco, a qual vem sendo empregada por mais de 500 anos na medicina tradicional popular. Entre as espécies mais abundantes no Brasil destaca-se *Copaifera langsdorffii* L., que nas suas folhas têm um grande número de compostos fenólicos com potencial atividade biológica como antioxidante. Este estudo teve como finalidade isolar compostos das classes de flavonoides e galoilquínicos presentes nas folhas de *C. langsdorffii* e investigar seus possíveis efeitos citoprotetores frente à intoxicação com metais pesados. Foi obtido o extrato hidroalcoólico das folhas, e foi submetido a partições líquido-líquido. A fração em acetato de etila foi fracionada através de cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC), e a fração em *n*-butanol por cromatografia de exclusão em gel *Sephadex*. Foram isolados e identificados por RMN, dois flavonoides (quercitrina e afzelina) da fração em acetato de etila e dez derivados galoilquínicos da fração *n*-butanólica. Os flavonoides e dois derivados galoilquínicos (AGQ3 e AGQ4), foram avaliados em ensaios de citotoxicidade com o protocolo de alamar blue nas linhagens celulares de hepatocarcinoma humano (HepG2) e feocromocitoma da medula suprarrenal de rato (PC12), em três diferentes concentrações (1, 10 e 100 μ M) por 24 h. A segurança do composto AGQ4 também foi avaliada através do ensaio de eficiência clonogênica contra a linhagem de pulmão de hamster chinês (V79). Após foram feitos ensaios de associação realizando pré-tratamentos de 1 hora com os compostos, para posterior exposição a doses tóxicas dos metais. Os ensaios de citotoxicidade demonstraram que nenhuma das concentrações avaliadas dos quatro compostos afetou a viabilidade das linhagens celulares. O ensaio de eficiência clonogênica mostrou que apenas uma concentração de 3,8 mM consegue reduzir significativamente a viabilidade na linhagem V79, mostrando o AGQ4 como um composto seguro para o uso *in vitro*. Os ensaios de associação mostraram que os quatro compostos têm efeito citoprotetor significativo na linhagem HepG2, contra mercúrio e chumbo a exceção do AGQ3 que em concentração de 100 μ M não mostrou proteger contra o chumbo. Por outro lado, os compostos não foram ativos contra o mercúrio na linhagem PC12, mostrando efeito contrário, pois os tratamentos metal-composto diminuíram a viabilidade em comparação com os tratamentos só com o metal. Apenas nas concentrações de 1 e 10 μ M se evidenciou efeito protetor dos compostos contra o chumbo. Em geral também foi observado um efeito de menor atividade na maior concentração do composto, que pode estar relacionado ao efeito pró-tóxico que alguns polifenóis apresentam em concentrações maiores. Tanto os flavonoides quanto os derivados galoilquínicos isolados de *C. langsdorffii* se mostraram com potencial na citoproteção contra a exposição ao chumbo e ao mercúrio.

Palavras-chave: *Copaifera langsdorffii*; citotoxicidade; citoproteção; metais pesados; flavonoides; galoilquínicos.

ABSTRACT

ALDANA MEJÍA, J. A. **Evaluation of cytoprotective effects of compounds isolated from *Copaifera langsdorffii* Desf. against induced cytotoxicity by exposure to methylmercury and lead.** 2017. 122f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

The *Copaifera* plants, better known as "copaibeira", are tropical trees recognized by the production of an oleoresin extracted from the tree trunk, which has been used for more than 500 years in traditional folk medicine. Among the most abundant species in Brazil is *Copaifera langsdorffii* L., which in its leaves have a large number of phenolic compounds with potential biological activity as antioxidant. Then, this study aimed to isolate compounds of the classes of flavonoids and galloylquinic derivatives present in the leaves of *C. langsdorffii* and to investigate their possible cytoprotective effects against heavy metal poisoning. The hydroalcoholic extract of the leaves was obtained and submitted to liquid-liquid partitions. The ethyl acetate fraction was subjected to high-speed countercurrent chromatography (HSCCC), and the fraction in *n*-butanol was subjected to *Sephadex* gel exclusion chromatography. Two flavonoids (quercitrin and afzelin) from the ethyl acetate fraction and ten galloylquinic derivatives of *n*-butanolic fraction were isolated and identified by NMR, using semi-preparative high performance liquid chromatography (CLAE-UV). Flavonoids and two galloylquinic acids (AGQ3 and AGQ4) were evaluated in alamar blue cytotoxicity assays in HepG2 cell lines (human hepatocarcinoma cells) and PC12 (rat adrenal pheochromocytoma cells), in three different concentrations (1, 10 and 100 μ M) for 24 h. The safety of compound AGQ4 was also assessed by the clonogenic efficiency assay against V79 (Chinese hamster lung) cell line. Once was proved that compound concentrations did not affect cell viability, association assays were performed by one hour pre-treatments of the compounds for further exposure to toxic doses of the metals. Cytotoxicity assays demonstrated that none of the evaluated concentrations of the four compounds affected the viability of the cell lines. The clonogenic efficiency assay showed that only a concentration of 3.8 mM of AGQ4 can significantly reduce viability in the normal cell line, showing the galloylquinic derivative as a highly safe compound for *in vitro* use. The association assays showed that the four compounds have a significant cytoprotective effect for the HepG2 cell line against Hg and Pb, except for AGQ3 which at 100 μ M concentration did not show protection against lead. Also the compounds did not show activity against Hg in the cell line PC12 and, in addition, they gave the opposite effect by decreasing cell viability in comparison with the treatments with only the metal. Only the concentrations of 1 and 10 μ M showed a protective effect of the compounds against lead. In general, a lower activity effect was also observed at the higher concentrations of the compounds, which may be related to the protoxic effect of some phenolic compounds. Both flavonoids and galloylquinic acid derivative compounds showed potential on the cytoprotection for exposure to lead and methylmercury.

Keywords: *Copaifera langsdorffii*; cytotoxicity; cytoprotection; heavy metals, flavonoids, galloylquinic compounds.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Estruturas químicas dos flavonoides majoritários nas folhas de *C. langsdorffii*.** Quercitrina e afzelina.....4
- Figura 2 - Estrutura química de derivados galoilquínicos isolados das folhas de *C. langsdorffii*.** Unidades de ácido quínico esterificadas com unidades galoil ou metoxigaloil....8
- Figura 3 - Estudo fitoquímico.** Processo de partição do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. langsdorffii*..... 13
- Figura 4 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. langsdorffii*.** Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min. 22
- Figura 5 - Perfil cromatográfico da fração em acetato de etila.** A) Perfis obtidos por CLAE-DAD; fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: ácido fórmico-água 0,1:99,9 (a) e metanol (b). Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min. Comprimentos de onda: 254, 280 e 360 nm. B) espectro de absorção dos picos de interesse do extrato correspondentes aos compostos quercitrina e afzelina..... 23
- Figura 6 - Perfil cromatográfico da fração em *n*-butanol.** A) Perfis obtidos por CLAE-DAD; fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: ácido fórmico-água 0,1:99,9 (a) e metanol (b). Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min. Comprimentos de onda: 254, 280 e 360 nm. B) espectro de absorção dos picos de interesse do extrato correspondentes aos compostos galoilquínicos. 24
- Figura 7 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD das subfrações com presença dos flavonoides quercitrina e afzelina, obtidas da: A) CCC 1, B) CCC 2.** Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) água e (B) acetonitrila. Eluição em gradiente: 20-75% de B em 5 min., 25-28% de B em 13 min., incrementando-se de 28-60% em 17 min., voltando de 60-20% de B até 21 min. mantendo-se nesta proporção até 23 min. Vazão: 1 mL/min. Comprimento de onda: 254 nm..... 27
- Figura 8 - Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD dos flavonoides A) quercitrina e B) afzelina.** Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) água e (B) acetonitrila. Eluição em gradiente: 20-75% de B em 5 min., 25-28% de B em 13 min., incrementando-se de 28-60% em 17 min., voltando de 60-20% de B até 21 min. mantendo-se nesta proporção até 23 min. Vazão: 1 mL/min. Comprimento de onda: 254 nm. 28
- Figura 9 - Perfis obtidos por CLAE-DAD das subfrações 2-5 obtidas por cromatografia de filtração em gel de *Sephadex* LH-20 a partir da fração *n*-butanólica.** Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de

90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min. Comprimento de onda: 280 nm. 30

Figura 10 - Perfis obtidos por CLAE-DAD das subfrações 6-11 obtidas por cromatografia de exclusão em gel de *Sephadex* LH-20 a partir da fração *n*-butanólica. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min. Comprimento de onda: 280 nm. 31

Figura 11 - Perfis obtidos por CLAE-DAD das subfrações 12-18 obtidas por cromatografia de exclusão em gel de *Sephadex* LH-20 a partir da fração *n*-butanólica. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min. Comprimento de onda: 280 nm. 32

Figura 12 - Perfis obtidos por CLAE-DAD das subfrações 19-21 obtidas por cromatografia de exclusão em gel de *Sephadex* LH-20 a partir da fração *n*-butanólica. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min. Comprimento de onda: 280 nm. 33

Figura 13 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD dos compostos AGQ1 e AGQ2 isolados por cromatografia de exclusão em gel de *Sephadex* LH-20 a partir da fração *n*-butanólica. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min. Comprimento de onda: 280 nm. 35

Figura 14 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD dos compostos AGQ3 e AGQ4 isolados por cromatografia de exclusão em gel de *Sephadex* LH-20 a partir da fração *n*-butanólica. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min. Comprimento de onda: 280 nm. 36

Figura 15 - Perfis obtidos por CLAE-DAD dos compostos AGQ5 e AGQ6 isolados por cromatografia de exclusão em gel de *Sephadex* LH-20 a partir da fração *n*-butanólica. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min. Comprimento de onda: 280 nm. 37

Figura 16 - Perfis obtidos por CLAE-DAD dos compostos AGQ7 e AGQ8 isolados por cromatografia de exclusão em gel de *Sephadex* LH-20 a partir da fração *n*-butanólica. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min. Comprimento de onda: 280 nm. 38

Figura 17 - Perfis obtidos por CLAE-DAD dos compostos AGQ9 e AGQ10 obtidos por cromatografia de exclusão em gel de <i>Sephadex</i> LH-20 a partir da fração <i>n</i>-butanólica. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min. Comprimento de onda: 280 nm.	39
Figura 18 - Estrutura química da quercitrina.	40
Figura 19 - Estrutura química da afzelina.	42
Figura 20 - Via do ácido chiquímico.	59
Figura 21 - Efeito dos compostos isolados de <i>C. langsdorffii</i> na viabilidade de células HepG2. Viabilidade celular (%) de células HepG2 após 24 h de tratamento com os flavonoides e derivados galoilquínicos. CN: controle negativo (meio de cultura); CS: DMSO (0,1%); CP: controle positivo (MMS-300 µM). Média ± desvio padrão (n=3), $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).	62
Figura 22 - Efeito dos compostos isolados de <i>C. langsdorffii</i> na viabilidade de células PC12. Viabilidade celular (%) de células PC12 após 24 h de tratamento com os flavonoides e derivados galoilquínicos. CN: controle negativo (meio de cultura); CS: DMSO (0,1%); CP: controle positivo (MMS-200 µM). Média ± desvio padrão (n=3), $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).	63
Figura 23 - Efeito do composto AGQ4 na sobrevivência celular da linhagem V79. Sobrevivência celular (%) de células V79 após os tratamentos com diferentes concentrações de AGQ4. CN: controle negativo (meio de cultura); CS: DMSO (0,04%); CP: controle positivo (MMS-1 mM). Média ± desvio padrão (n=3), $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).	65
Figura 24 - Efeito dos metais pesados metilmercúrio e nitrato de chumbo na viabilidade de células HepG2. Viabilidade celular (%) de células HepG2 após 24 h de tratamento com mercúrio e chumbo. CN: controle negativo (meio de cultura); CS: MeOH:H ₂ O (1:9). Média ± desvio padrão (n=3), * valores estatisticamente diferentes do controle negativo $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey.	66
Figura 25 - Efeito dos metais pesados metilmercúrio e nitrato de chumbo na viabilidade de células PC12. Viabilidade celular (%) de células PC12 após 24 h de tratamento com mercúrio e chumbo. CN: controle negativo (meio de cultura); CS: MeOH:H ₂ O (1:9). Média ± desvio padrão (n=3), * valores estatisticamente diferentes do controle negativo $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey.	67
Figura 26 - Efeito dos compostos isolados de <i>C. langsdorffii</i> na toxicidade celular da linhagem HepG2 induzida por 15 µM de MeHg. Viabilidade celular (%) de células HepG2 após 24 h de tratamento de associação mercúrio-compostos. CN: controle negativo (meio de cultura). Média ± desvio padrão (n=3), * valores estatisticamente diferentes do grupo Hg (15 µM) $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Dunnett.	69
Figura 27 - Efeito dos compostos isolados de <i>C. langsdorffii</i> na toxicidade celular da linhagem HepG2 induzida por 40 µM de Pb(NO₃)₂. Viabilidade celular (%) de células HepG2 após 24 h de tratamento de associação chumbo-compostos. CN: controle negativo (meio	

de cultura). Média $\pm$ desvio padrão (n=3), * valores estatisticamente diferentes do grupo Pb (40 μ M) $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Dunnett. 70

Figura 28 - Efeito dos compostos isolados de *C. langsdorffii* na toxicidade celular da linhagem PC12 induzida por 10 μ M de MeHg. Viabilidade celular (%) de células PC12 após 24 h de tratamento de associação mercúrio-compostos. CN: controle negativo (meio de cultura). Média $\pm$ desvio padrão (n=3), * valores estatisticamente diferentes do grupo Hg (10 μ M) $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Dunnett. 72

Figura 29 - Efeito dos compostos isolados de *C. langsdorffii* na toxicidade celular da linhagem PC12 induzida por 350 μ M de Pb(NO₃)₂. Viabilidade celular (%) de células PC12 após 24 h de tratamento de associação chumbo-compostos. CN: controle negativo (meio de cultura). Média $\pm$ desvio padrão (n=3), * valores estatisticamente diferentes do grupo Pb (350 μ M) $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Dunnett. 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Gradiente de polaridade MeOH:H ₂ O empregado no decorrer do fracionamento da fração aquosa por cromatografia de exclusão em gel.....	15
Tabela 2 - Rendimento do extrato bruto das folhas de <i>C. langsdorffii</i> e de suas subfrações. .	21
Tabela 3 - Rendimento das subfrações obtidas a partir da fração em AcOEt (2 g) por cromatografia contracorrente.....	26
Tabela 4 - Rendimento das subfrações obtidas a partir da fração em <i>n</i> -butanol (4,5 g) por cromatografia de exclusão em gel de <i>Sephadex</i> LH-20.	30
Tabela 5 - Métodos cromatográficos empregados para o isolamento dos derivados galoilquínicos a partir das subfrações obtidas por cromatografia de exclusão em gel.....	34
Tabela 6 - Procedência e quantidade obtida dos derivados galoilquínicos.	34
Tabela 7 - Dados dos espectros de RMN de ¹³ C (125 MHz), ¹ H (500 MHz) e HMBC obtidos para quercitrina em DMSO-d ₆ , comparados com a literatura.	41
Tabela 8 - Dados dos espectros de RMN de ¹³ C (125 MHz), ¹ H (500 MHz) e HMBC obtidos para afzelina em DMSO d ₆ , comparados com a literatura.	43
Tabela 9 - Dados dos espectros de RMN de ¹³ C (125 MHz), ¹ H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ1 em CD ₃ OD, comparados com a literatura.....	45
Tabela 10 - Dados dos espectros de RMN de ¹³ C (125 MHz), ¹ H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ2 em CD ₃ OD, comparados com a literatura.....	46
Tabela 11 - Dados dos espectros de RMN de ¹³ C (125 MHz), ¹ H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ3 em CD ₃ OD, comparados com a literatura.....	48
Tabela 12 - Dados dos espectros de RMN de ¹³ C (125 MHz), ¹ H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ4 em CD ₃ OD, comparados com a literatura.....	49
Tabela 13 - Dados dos espectros de RMN de ¹³ C (125 MHz), ¹ H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ5 em CD ₃ OD, comparados com a literatura.....	50
Tabela 14 - Dados dos espectros de RMN de ¹³ C (125 MHz), ¹ H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ6 em CD ₃ OD, comparados com a literatura.....	52
Tabela 15 - Dados dos espectros de RMN de ¹³ C (125 MHz), ¹ H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ7 em CD ₃ OD, comparados com a literatura.....	53
Tabela 16 - Dados dos espectros de RMN de ¹³ C (125 MHz), ¹ H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ8 em CD ₃ OD, comparados com a literatura.....	54
Tabela 17 - Dados dos espectros de RMN de ¹³ C (125 MHz), ¹ H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ9 em CD ₃ OD, comparados com a literatura.....	55

Tabela 18 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ10 em CD_3OD , comparados com a literatura.....	57

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1. Perfil cromatográfico da fração em diclorometano obtida a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>C. langsdorffii</i>. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min.	86
Apêndice 2. Perfil cromatográfico da fração <i>n</i>-BuOH-H₂O obtida a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>C. langsdorffii</i>. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min.	87
Apêndice 3. Perfil cromatográfico do resíduo aquoso obtido a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>C. langsdorffii</i>. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min.	88
Apêndice 4. Estrutura química, espectro de massas (modo negativo) e de RMN de ¹ H (DMSO d ₆ ; 500 MHz) da quercitrina (quercetina-3- <i>O</i> -α-L-raminopiranosídeo); C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ ; 448,10 g/mol.	89
Apêndice 5. Espectros de RMN de ¹³ C e DEPT-135 da quercitrina (quercetina-3- <i>O</i> -α-L-raminopiranosídeo) em DMSO d ₆ (500 MHz).	90
Apêndice 6. Mapas de contorno de HSQC e HMBC da quercitrina (quercetina-3- <i>O</i> -α-L-raminopiranosídeo) em DMSO d ₆ (500 MHz).	91
Apêndice 7. Estrutura química, espectro de massas (modo negativo) e de RMN de ¹ H (DMSO d ₆ ; 500 MHz) da afzelina (canferol-3- <i>O</i> -α-L-ramnpiranosídeo); C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ ; 432,1 g/mol.	92
Apêndice 8. Espectros de RMN de ¹³ C e DEPT-135 da afzelina (canferol-3- <i>O</i> -α-L-ramnpiranosídeo) em DMSO d ₆ (500 MHz).	93
Apêndice 9. Mapas de contorno de HSQC e HMBC da afzelina (canferol-3- <i>O</i> -α-L-ramnpiranosídeo) em DMSO d ₆ (500 MHz).	94
Apêndice 10. Estrutura química, espectro de massas (modo negativo) e de RMN de ¹ H (CD ₃ OD; 500 MHz) do composto AGQ1 (ácido 3''- <i>O</i> -metil-3,4-di- <i>O</i> -galoilquínico); C ₂₂ H ₂₂ O ₁₄ ; 510 g/mol.	95
Apêndice 11. Espectros de RMN de ¹³ C e DEPT-135 do composto AGQ1 (ácido 3''- <i>O</i> -metil-3,4-di- <i>O</i> -galoilquínico); C ₂₂ H ₂₂ O ₁₄ ; 510 g/mol.	96
Apêndice 12. Mapas de contorno de HSQC e HMBC do composto AGQ1 (ácido 3''- <i>O</i> -metil-3,4-di- <i>O</i> -galoilquínico) em CD ₃ OD (500 MHz).	97

Apêndice 13. Estrutura química, espectro de massas (modo negativo) e de RMN de ^1H (CD_3OD ; 500 MHz) do composto AGQ2 (ácido 3',3''-di- <i>O</i> -metil-3,4-di- <i>O</i> -galoilquínico); $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{14}$; 524 g/mol.	98
Apêndice 14. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 do composto AGQ2 (ácido 3',3''-di- <i>O</i> -metil-3,4-di- <i>O</i> -galoilquínico); $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{14}$; 524 g/mol.	99
Apêndice 15. Mapas de contorno de HSQC e HMBC do composto AGQ2 (ácido 3',3''-di- <i>O</i> -metil-3,4-di- <i>O</i> -galoilquínico); $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{14}$; 524 g/mol.	100
Apêndice 16. Estrutura química, espectro de massas (modo negativo) e de RMN de ^1H (CD_3OD ; 500 MHz) do composto AGQ3 (ácido 3',3''-di- <i>O</i> -metil-3,5-di- <i>O</i> -galoilquínico); $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{14}$; 524 g/mol.	101
Apêndice 17. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 do composto AGQ3 (ácido 3',3''-di- <i>O</i> -metil-3,5-di- <i>O</i> -galoilquínico); $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{14}$; 524 g/mol.	102
Apêndice 18. Mapas de contorno de HSQC e HMBC do composto AGQ3 (ácido 3',3''-di- <i>O</i> -metil-3,5-di- <i>O</i> -galoilquínico); $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{14}$; 524 g/mol.	103
Apêndice 19. Estrutura química, espectro de massas (modo negativo) e de RMN de ^1H (CD_3OD ; 500 MHz) do composto AGQ4 (ácido 3',3''-di- <i>O</i> -metil-4,5-di- <i>O</i> -galoilquínico); $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{14}$; 524 g/mol.	104
Apêndice 20. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 do composto AGQ4 (ácido 3',3''-di- <i>O</i> -metil-4,5-di- <i>O</i> -galoilquínico); $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{14}$; 524 g/mol.	105
Apêndice 21. Mapas de contorno de HSQC e HMBC do composto AGQ4 (ácido 3',3''-di- <i>O</i> -metil-4,5-di- <i>O</i> -galoilquínico); $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{14}$; 524 g/mol.	106
Apêndice 22. Estrutura química, espectro de massas (modo negativo) e de RMN de ^1H (CD_3OD ; 500 MHz) do composto AGQ5 (ácido 3'- <i>O</i> -metil-3,4-di- <i>O</i> -galoilquínico); $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$; 510 g/mol.	107
Apêndice 23. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 do composto AGQ5 (ácido 3'- <i>O</i> -metil-3,4-di- <i>O</i> -galoilquínico); $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{14}$; 524 g/mol.	108
Apêndice 24. Mapas de contorno de HSQC e HMBC do composto AGQ5 (ácido 3'- <i>O</i> -metil-3,4-di- <i>O</i> -galoilquínico); $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{14}$; 524 g/mol.	109
Apêndice 25. Estrutura química, espectro de massas (modo negativo) e de RMN de ^1H (CD_3OD ; 500 MHz) do composto AGQ6 (ácido 3,5-di- <i>O</i> -galoilquínico); $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{14}$; 496 g/mol.	110
Apêndice 26. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 do composto AGQ6 (ácido 3,5-di- <i>O</i> -galoilquínico); $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{14}$; 496 g/mol.	111
Apêndice 27. Mapas de contorno de HSQC e HMBC do composto AGQ6 (ácido 3,5-di- <i>O</i> -galoilquínico); $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{14}$; 496 g/mol.	112

Apêndice 28. Estrutura química, espectro de massas (modo negativo) e de RMN de ^1H (CD_3OD ; 500 MHz) do composto AGQ7 (ácido 3'- <i>O</i> -metil-3,5-di- <i>O</i> -galoilquínico); $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$; 510,1 g/mol.	113
Apêndice 29. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 do composto AGQ7 (ácido 3'- <i>O</i> -metil-3,5-di- <i>O</i> -galoilquínico); $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$; 510,1 g/mol.....	114
Apêndice 30. Mapas de contorno de HSQC e HMBC do composto AGQ7 (ácido 3'- <i>O</i> -metil-3,5-di- <i>O</i> -galoilquínico); $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$; 510,1 g/mol.....	115
Apêndice 31. Estrutura química, espectro de massas (modo negativo) e de RMN de ^1H (CD_3OD ; 500 MHz) do composto AGQ8 (ácido 3''- <i>O</i> -metil-4,5-di- <i>O</i> -galoilquínico); $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$; 510,1 g/mol.	116
Apêndice 32. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 do composto AGQ8 (ácido 3''- <i>O</i> -metil-4,5-di- <i>O</i> -galoilquínico); $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$; 510,1 g/mol.....	117
Apêndice 33. Mapas de contorno de HSQC e HMBC do composto AGQ8 (ácido 3''- <i>O</i> -metil-4,5-di- <i>O</i> -galoilquínico); $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$; 510,1 g/mol.....	118
Apêndice 34. Estrutura química, espectro de massas (modo negativo) e de RMN de ^1H (CD_3OD ; 500 MHz) do composto AGQ9 (ácido 3',3'',3'''-tri- <i>O</i> -metil-3,4,5-tri- <i>O</i> -galoilquínico); $\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{O}_{18}$; 690,1 g/mol.....	119
Apêndice 35. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 do composto AGQ9 (ácido 3',3'',3'''-tri- <i>O</i> -metil-3,4,5-tri- <i>O</i> -galoilquínico); $\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{O}_{18}$; 690,1 g/mol.....	120
Apêndice 36. Mapas de contorno de HSQC e HMBC do composto AGQ9 (ácido 3',3'',3'''-tri- <i>O</i> -metil-3,4,5-tri- <i>O</i> -galoilquínico); $\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{O}_{18}$; 690,1 g/mol.....	121
Apêndice 37. Estrutura química, espectro de massas (modo negativo) e de RMN de ^1H (CD_3OD ; 500 MHz) do composto AGQ10 (ácido 3''- <i>O</i> -metil-3,4,5-tri- <i>O</i> -galoilquínico); $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{O}_{18}$; 662,1 g/mol.	122
Apêndice 38. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 do composto AGQ10 (ácido 3''- <i>O</i> -metil-3,4,5-tri- <i>O</i> -galoilquínico); $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{O}_{18}$; 662,1 g/mol.	123
Apêndice 39. Mapas de contorno de HSQC e HMBC do composto AGQ10 (ácido 3''- <i>O</i> -metil-3,4,5-tri- <i>O</i> -galoilquínico); $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{O}_{18}$; 662,1 g/mol.	124

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etila
AGQ	Ácido galoilquínico
<i>ax</i>	Axial
CCC	Cromatografia Contracorrente
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CH ₃ HgCl	Cloreto de metilmercúrio
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-PREP	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa
<i>d</i>	Dupleto
d.i.	Diâmetro interno
DAD	Detector de Arranjo de Diodos / Diode Array Detector
<i>dd</i>	Duplo dupleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dupleto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EM	Espectrometria de Massas
<i>eq</i>	Equatorial
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FCFRP - USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP
FFCLRP - USP	Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP
FMRP - USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP
Fr.	Fração
<i>gem</i>	Geminal
HepG2	Células de hepatoma humano
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HSCCC	High-Speed Counter-Current Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
<i>J</i>	Constante de acoplamento
K	Coeficiente de partição
<i>m</i>	Multipleto
<i>m/z</i>	Razão massa carga
MeHg	Metilmercúrio
MMS	Metil metasulfonato
Pb(NO ₃) ₂	Nitrato de chumbo
PBS	Tampão fosfato-salino / Phosphate Buffered Saline
PC12	Células de feocromocitoma da medula suprarrenal de rato
PTFE	Politetrafluoretileno (Teflon)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotações por minuto
<i>s</i>	Singleto
SFB	Soro Fetal Bovino
SFE	Soro Fetal Equino
Sf.	Subfração
<i>sl</i>	Singleto largo
TQ-S	Triple Quadrupole Spectrometry

tr	Tempo de retenção
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE APÊNDICES	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	i
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Plantas medicinais no Brasil, fonte de novas alternativas de tratamento.	1
1.2 O gênero <i>Copaifera</i>	1
1.3 <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	2
1.4 <i>C. langsdorffii</i> : compostos identificados e atividade biológica das folhas.....	3
1.5 O problema dos metais pesados: chumbo e mercúrio.	5
1.6 Efeito citoprotetor de compostos isolados de plantas.....	7
1.7 Ensaios de citotoxicidade e modelos celulares.	8
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral	11
2.2 Objetivos específicos	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Coleta do material vegetal, secagem e moagem.	12
3.2 Estudo fitoquímico.....	12
3.2.1 Obtenção do extrato bruto de <i>C. langsdorffii</i>	12
3.2.2 Partição líquido-líquido do extrato hidroalcoólico.	12
3.2.3 Cromatografia contracorrente (CCC) da fração em acetato de etila para o isolamento dos flavonoides majoritários.....	13
3.2.4 Cromatografia de exclusão em gel da fração <i>n</i> -butanólica para o isolamento dos compostos galoilquínicos.....	14
3.2.5 Análise cromatográfica das frações e subfrações obtidas.....	15
3.2.6 Isolamento dos compostos por CLAE semipreparativa.....	16
3.2.7 Identificação e elucidação das estruturas químicas dos compostos isolados.	16
3.3 Ensaios <i>in vitro</i>	17

3.3.1	Linhagens celulares e condições de cultivo para os ensaios com metais pesados...	17
3.3.2	Ensaio de citotoxicidade de alamar blue: compostos isolados e metais pesados.	18
3.3.3	Linhagem celular e condições de cultivo para o ensaio de eficiência clonogênica.	19
3.3.4	Ensaio de eficiência clonogênica.	19
3.3.5	Ensaios de citotoxicidade de alamar blue: associações metais-compostos.	20
3.4	Análise estatística	20
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1	Estudo fitoquímico.....	21
4.1.1.	Perfis cromatográficos do extrato bruto das folhas de <i>C. langsdorffii</i> e frações.	21
4.1.2	Fracionamento por cromatografia contracorrente da fração em acetato de etila: isolamento dos flavonoides majoritários.	25
4.1.3	Cromatografia de exclusão em gel da fração <i>n</i> -butanólica: isolamento de compostos galoilquínicos.....	29
4.1.4	Determinação das estruturas químicas dos flavonoides isolados por HSCCC.....	40
4.1.4.1	Composto HSCCC1: Quercitrina.	40
4.1.4.2	Composto HSCCC2: Afzelina.	42
4.1.5	Determinação das estruturas químicas dos derivados galoilquínicos isolados.....	43
4.1.5.1	AGQ1: Ácido 3''- <i>O</i> -metil-3,4-di- <i>O</i> -galoilquínico; C ₂₂ H ₂₂ O ₁₄ ; 510 g/mol.	45
4.1.5.2	AGQ2: Ácido 3',3''-di- <i>O</i> -metil-3,4-di- <i>O</i> -galoilquínico; C ₂₃ H ₂₄ O ₁₄ ; 524 g/mol.	46
4.1.5.3	AGQ3: Ácido 3',3''-di- <i>O</i> -metil-3,5-di- <i>O</i> -galoilquínico; C ₂₃ H ₂₄ O ₁₄ ; 524 g/mol.	47
4.1.5.4	AGQ4: Ácido 3',3''-di- <i>O</i> -metil-4,5-di- <i>O</i> -galoilquínico; C ₂₃ H ₂₄ O ₁₄ ; 524 g/mol.	49
4.1.5.5	AGQ5: Ácido 3'- <i>O</i> -metil-3,4-di- <i>O</i> -galoilquínico; C ₂₂ H ₂₂ O ₁₄ ; 510 g/mol.	50
4.1.5.6	AGQ6: Ácido 3,5-di- <i>O</i> -galoilquínico; C ₂₁ H ₂₀ O ₁₄ ; 496 g/mol.....	51
4.1.5.7	AGQ7: Ácido 3'- <i>O</i> -metil-3,5-di- <i>O</i> -galoilquínico; C ₂₂ H ₂₂ O ₁₄ ; 510,1 g/mol.	53
4.1.5.8	AGQ8: Ácido 3''- <i>O</i> -metil-4,5-di- <i>O</i> -galoilquínico; C ₂₂ H ₂₂ O ₁₄ ; 510,1 g/mol.....	54
4.1.5.9	AGQ9: Ácido 3',3'',3'''-tri- <i>O</i> -metil-3,4,5-tri- <i>O</i> -galoilquínico; C ₃₁ H ₃₀ O ₁₈ ; 690,1 g/mol.	55
4.1.5.10	AGQ10: Ácido 3''- <i>O</i> -metil-3,4,5-tri- <i>O</i> -galoilquínico; C ₂₉ H ₂₆ O ₁₈ ; 662,1 g/mol... ..	57
4.2	Ensaios <i>in vitro</i>	59
4.2.1	Ensaio de citotoxicidade: compostos isolados selecionados.	59
4.2.2	Ensaios de eficiência clonogênica.	64
4.2.3	Citotoxicidade de mercúrio e chumbo em HepG2.	65
4.2.4	Citotoxicidade de mercúrio e chumbo em PC12.	67

4.2.5	Ensaio associação metais-compostos em HepG2.	68
4.2.6	Ensaio associação metais-compostos em PC12.	72
5.	CONCLUSÕES.....	75
6.	REFERÊNCIAS	77
	APÊNDICES	86

1. INTRODUÇÃO

1.1 Plantas medicinais no Brasil, fonte de novas alternativas de tratamento.

O Brasil tem uma grande diversidade biológica, com sua floresta tropical amazônica atingindo 40% do território, na qual se encontram presentes aproximadamente 20.000 espécies de plantas e fungos endêmicos (Santos et al. 2014). A influência do conhecimento tradicional indígena e africano permitiu identificar muitas destas plantas como medicinais, construindo a base da medicina popular das espécies vegetais, sendo que muitas delas hoje são usadas no tratamento, cura e prevenção de doenças (Veiga Junior et al. 2005; Santos et al. 2014).

Nos últimos anos o aumento do uso de plantas medicinais ou de produtos à base destas, tem propiciado a utilização desta alternativa terapêutica por instituições governamentais como forma de minimização de gastos para a demanda das populações que não tem acesso aos medicamentos tradicionais, mas que podem obter facilmente plantas com propriedades curativas reconhecidas (Ribeiro et al. 2014; Santos et al. 2014).

Desta forma o estudo da medicina tradicional brasileira se torna uma das principais fontes de informação científica para o descobrimento de novos compostos ou de substâncias produzidas por plantas e de difícil obtenção mediante síntese química, que possam ser usadas na indústria por suas atividades farmacológicas (Souza et al. 2014; Sponchiado et al. 2016).

Entre as diversas espécies vegetais de importância medicinal que despertam o interesse para a produção de fitomedicamentos, encontram-se as do gênero *Copaifera*, popularmente conhecidas como copaíbas (Veiga Junior e Pinto 2002).

1.2 O gênero *Copaifera*

As plantas do gênero *Copaifera* mais bem conhecidas como “copaibeira” ou “pau d’óleo”, são um gênero de árvores da família Caesalpiniaceae, nativas da África Ocidental e da região tropical da América Latina; aproximadamente 16 espécies são encontradas na Amazônia e no Centro-Oeste brasileiro, onde *C. officinalis*, *C. reticulata*, *C. multijuga* e *C. langsdorffii* sobressaem por seu uso popular (Veiga Junior e Pinto 2002).

As copaíferas são árvores ou arbustos de tronco áspero, coloração escura e crescimento lento, atingindo até 40 metros de altura; botanicamente o gênero se caracteriza pela presença de folhas alternadas, pecioladas e pinuladas, flores pequenas, apétalas, hermafroditas, organizadas em inflorescências axilares, e frutos de semente ovoide envolvida por um arilo colorido (Veiga Junior e Pinto 2002; Martins-da-Silva et al. 2008).

A madeira destas espécies é valorizada por ser durável e altamente resistente para construção de peças de marcenaria e, fabricação de carvão; porém as copaíferas são mais bem conhecidas pela produção de oleorresina que vem sendo empregada por mais de 500 anos na medicina tradicional como cicatrizante, anti-hemorroidal, laxativa, vermífuga, expectorante, hipotensiva e para tratar doenças de pele, assim como combustível para a iluminação doméstica em áreas rurais (Plowden 1988; Veiga Junior e Pinto 2002; Tappin et al. 2004; Martins-da-Silva et al. 2008).

1.3 *Copaifera langsdorffii* Desf.

Esta árvore pode atingir até 35 m de altura, e está distribuída desde o nordeste da Argentina até a Venezuela; e possui alta popularidade no Brasil por sua extensa distribuição nos estados do Amazonas, Pará e Ceará, assim como por suas propriedades medicinais (Paiva et al. 1998; Freitas e Oliveira 2002). Esta copaíba é indicada para o tratamento de bronquite, catarro, colite, doenças da pele, diarreia, febre, gonorreia, hemorroidas, inflamação, urolitíase, reumatismo, tumores e feridas (Ham et al. 2008).

O conhecimento etnobotânico do uso da oleorresina, tem sido comprovado por diferentes estudos científicos. Hoje, suas atividades cicatrizante (Paiva et al. 2002a; Estevão et al. 2013; Masson-Meyers et al. 2013), anti-inflamatória e contra dermatite (de Lima Silva et al. 2009; Viriato et al. 2009), anticolite (Paiva et al. 2002b, 2004a), gastroprotetora (Paiva et al. 1998, 2004b), de diminuição dos sinais da psoríase, e seu efeito antioxidante (Gelmini et al. 2013), já foram corroboradas.

Outra das propriedades biológicas demonstradas é a atividade antimicrobiana contra diferentes espécies como: *Bacillus subtilis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Streptococcus flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* (Oliveira et al. 2007; Santos et al. 2008a; Pieri et al. 2010, 2011, 2012; Masson et al. 2013). Também tem sido provado seu efeito larvicida contra *Aedes aegypti*, vetor do dengue (de Mendonça et al. 2005), promastigotocida de *Leishmania amazonensis* (Santos et al. 2008b), e inseticida contra *Diabrotica speciosa*, praga de plantas produtoras de frutos e grãos (Barbosa et al. 2013).

São muitos os estudos destinados ao conhecimento químico desta oleorresina. A fração volátil da oleorresina de *C. langsdorffii* é constituída majoritariamente por sesquiterpenos entre os quais se destacam: α -bergamoteno, β -selineno, β -elemeno, e β -cariofileno, enquanto que a fração fixa contém sesquiterpenos ácidos, tais como os ácidos copálico, caruenólico, e hardwíckiico (Gelmini et al. 2013). Porém, a oleorresina também se destaca pela presença de

sesquiterpenos como o óxido de cariofileno, α -copaeno, α -humuleno, e de diterpenos dos tipos clerodano e labdano, como kolavenol, cis-kolavenol, ácido *ent*-kaurenoico, kolavenol, *ent*-neo-4(18),13-clerodadien-15-ol e 8(17),13-labdadien-15-ol (Ohsaki et al. 1994; Veiga Jr. et al. 1997; Santos et al. 2008b; Souza et al. 2010).

Compostos isolados da oleorresina já foram biologicamente testados, fornecendo resultados interessantes. Os ácidos *ent*-caurenóico e *ent*-copálico foram avaliados contra bactérias causadoras da mastite bovina, sendo que o primeiro apresentou atividade contra *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae*, enquanto o segundo foi ativo contra *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (Fonseca et al. 2013; Abrão et al. 2015). O ácido copálico também inibiu o crescimento de *Streptococcus salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis* e *Lactobacillus casei* com valores de concentração inibitória mínima (CIM) de 2 a 6 $\mu\text{g/mL}$ (Souza et al. 2010).

Atividades citotóxicas do ácido caurenóico contra linhagens tumorais também foram comprovadas, pois este composto inibiu a viabilidade das linhagens AGP01 (gástrica) e SF295 (glioblastoma), sem apresentar citotoxicidade em células normais (fibroblastos murinos 3T3-L1, linfócitos humanos e macrófagos murinos J774) (Vargas et al. 2015). O ácido copálico também foi citotóxico contra as células tumorais HeLa (Abrão et al. 2015).

Estudos *in vivo* biomonitorados com a oleorresina permitiram reconhecer o (-)-kolavenol como o composto potente contra o carcinoma invasivo da mama em camundongos, incrementando a sobrevida dos animais em doses de 41 mg/Kg/dia, quando comparado com o quimioterápico 5-fluorouracil (Ohsaki et al. 1994).

1.4 *C. langsdorffii*: compostos identificados e atividade biológica das folhas.

Há poucos os estudos destinados ao conhecimento da composição química das partes aéreas de *C. langsdorffii*, uma vez que os esforços científicos e tecnológicos estão mais focados nas propriedades e no aproveitamento de sua oleorresina (Costa-Machado et al. 2013).

Entre os compostos voláteis identificados no óleo essencial das folhas, o γ -muurolene se destaca por ser o majoritário (25,2%), seguido pelo β -cariofileno (16,6%) (Gramosa e Silveira 2005). Outras substâncias como o α -copaeno, germacreno D, espatulenol, óxido de cariofileno, δ -elemeno, α -cubebeno, β -elemeno, α -humuleno e β -selineno, também têm sido identificados (Gramosa e Silveira 2005; do Nascimento et al. 2012).

Extração com fluidos supercríticos (CO_2 e etanol), também permitiu a identificação de ácido caurenóico e quercitrina nas partes aéreas da espécie (Costa et al. 2015). Outras técnicas como extração por maceração hidroetanólica das folhas e isolamento com diferentes

modalidades cromatográficas (coluna clássica, contracorrente, de exclusão em gel com *Sephadex* LH-20 e semi-preparativa), levou à identificação e isolamento dos flavonoides glicosilados quercetina-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (quercitrina) e canferol-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (afzelina) (Figura 1), assim como mais de dezesseis derivados galoilquínicos (Sousa et al. 2012; Nogueira et al. 2015; Motta et al. 2017).

Figura 1 - Estruturas químicas dos flavonoides majoritários nas folhas de *C. langsdorffii*. Quercitrina e afzelina.

Fonte: produção do autor.

Estudos prévios confirmaram que o extrato hidroalcoólico das folhas de *C. langsdorffii* apresentou atividade antilitiásica em ensaios *in vivo* e *in vitro* tendo como componentes majoritários quercitrina e afzelina (Sousa et al. 2012; Oliveira et al. 2013).

Em outros estudos *in vivo*, foi demonstrado que este extrato exerce efeito protetor na indução de dano genotóxico da doxorubicina, assim como contra a carcinogênese de cólon (Alves et al. 2013; Senedese et al. 2013). Igualmente, a atividade gastroprotetora do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *C. langsdorffii* foi avaliada por Lemos et al. (2015), onde observou-se redução da secreção gástrica e incremento na produção de muco. Compostos galoilquínicos isolados da fração aquosa também têm sido testados em ensaios de ulceração gástrica, demonstrando que eles promovem diminuição do tamanho da lesão, com efeito curativo melhor do que o pantoprazol, medicamento padrão para essa comorbidade (Motta et al. 2017).

O extrato hidroalcoólico das folhas também reduziu a formação de edema em dois modelos de estudo, cujo efeito anti-inflamatório foi associado à regulação de mediadores como a serotonina, e à liberação de óxido nítrico (Furtado et al. 2015).

Outra atividade biológica atribuída às partes aéreas desta espécie é a inseticida. O tratamento de cultivos com extrato aquoso das folhas, reduziu o número de adultos de *Bemisia*

tabaci (Barbosa et al. 2011). Além disso, tanto o extrato metanólico quanto o aquoso têm efeitos negativos sobre *Spodoptera frugiperda*, como diminuição de viabilidade e do crescimento em larvas no segundo estágio, prolongação do período pupal, diminuição do período de oviposição e da viabilidade dos ovos (Alves et al. 2012; Sâmia et al. 2016).

1.5 O problema dos metais pesados: chumbo e mercúrio.

Os metais são compostos naturais presentes nos sistemas biológicos e não biológicos, sendo de grande utilidade no desenvolvimento da tecnologia humana; a presença deles nos nossos ecossistemas, levou às suas escavações e extrações fazendo com que se convertessem em processos fundamentais na elaboração de ferramentas do uso diário (Beyersmann e Hartwig 2008; Flora 2009).

No entanto, os resíduos dos metais são cada vez maiores nos solos e águas, sendo que alguns deles estão sendo acumulados em níveis que podem interagir com macromoléculas celulares, e intervir nos processos metabólicos e genéticos, resultando-se nocivos para os organismos vivos (Beyersmann e Hartwig 2008).

Quimicamente os metais pesados são definidos como elementos com propriedades características deste tipo de elementos, que exibem uma densidade relativamente alta comparada com a água (Singh et al. 2011). Porém, biologicamente são considerados como metais pesados todos aqueles que sejam tóxicos independentemente da massa atômica ou densidade; assim, outros elementos com características metálicas podem ser incluídos dentro do grupo como lantanídeos, actinídeos, metais de transição e alguns metaloides como o arsênico (Singh et al. 2011; Tchounwou et al. 2012).

Apesar de todos os metais poderem-se tornar nocivos em altas concentrações, aqueles que não têm algum papel vital no funcionamento dos organismos ou que não oferecem benefícios para eles, mas pelo contrário causam doenças ou prejuízo para a saúde, podem ser considerados dentro do grupo dos tóxicos, caso do mercúrio, plutônio e chumbo (Singh et al. 2011). Os metais pesados podem invadir subitamente o metabolismo afetando as funções vitais dos órgãos e glândulas, e também deslocando os minerais nutritivos vitais dos seus lugares originais impedindo assim a sua função biológica (Singh et al. 2011).

Recentemente os estudos indicam que metais como ferro, cádmio, cromo, mercúrio, arsênico e chumbo são capazes de produzir radicais livres que interagem com lipídeos, proteínas e com os ácidos nucleicos (DNA e RNA), originando oxidação das macromoléculas e consecutivo dano (Flora 2009). Dentro dos metais considerados como principais ameaças para a saúde humana se destacam o chumbo e o mercúrio, considerados altamente tóxicos e com

bastante risco de exposição para trabalhadores em uma variedade de indústrias, assim como para a população em geral (Nersesyan et al. 2016).

A poluição de mercúrio nos ecossistemas tem diversas fontes, uma é a natural através de emissões vulcânicas e evaporação da água, a outra, é a partir de atividades industriais como extração de ouro, fabricação de baterias, na indústria cloro-álcali, em amálgamas dentárias, produtos desinfetantes e alguns eletrodomésticos (Ercal et al. 2001). Os seres vivos estão expostos a várias formas do mercúrio, cada uma com reatividade e toxicidade específica; o metal pode estar presente na sua forma elementar, como compostos orgânicos mono e bivalentes, e também como derivados orgânicos (metil, etil e fenilmercúrio), sendo que a forma elementar (Hg^0) e o metilmercúrio (MeHg) são as duas mais absorvidas (Ercal et al. 2001; Nersesyan et al. 2016).

Um dos meios de intoxicação mais destacados junto com as amálgamas dentais, é o consumo de peixe contaminado; bactérias presentes em solos águas e sedimentos são capazes de transformar o metal na sua forma orgânica, altamente tóxica, atingindo animais que ocupam níveis tróficos superiores da cadeia alimentar (Jarup 2003; Nersesyan et al. 2016). Uma vez absorvido a taxa de excreção é baixa, o qual favorece sua acumulação em rins, tecidos neurológicos e fígado, exercendo efeitos tóxicos que são expressos em sintomas como aborto espontâneo, tremores, gengivite, alterações psicológicas menores e danos ao sistema nervoso (Ercal et al. 2001; Singh et al. 2011).

Como outros metais, o mercúrio origina danos ao DNA mediante a formação de espécies reativas de oxigênio ou ERO; as ERO podem oxidar os ácidos graxos da membrana celular ou diretamente as bases do DNA, além de ter a capacidade de destruir enzimas responsáveis pelos processos de reparo do material genético, replicação e diminuir a motilidade dos microtúbulos (Ercal et al. 2001; Nersesyan et al. 2016). Estes efeitos celulares do mercúrio encontram-se altamente relacionados com o aumento de casos de diferentes tipos de câncer nas populações, como leucemia, pulmão e fígado (Nersesyan et al. 2016).

Outro dos elementos metálicos com forte influência negativa na saúde humana é o chumbo. Nas décadas prévias aos noventa, os aditivos de gasolina tetrametil e tetraetilchumbo foram uma das principais fontes tanto de contaminação ambiental como de exposição da população ao metal; atualmente, tintas, pesticidas, fundições, extração mineral e queima de carvão são as fontes mais destacadas (Singh et al. 2011; Nersesyan et al. 2016).

O chumbo interfere com várias funções fisiológicas, afetando principalmente o sistema nervoso central, hematopoiético, hepático e renal, sendo o sistema nervoso o mais sensível à intoxicação com este elemento (Flora et al. 2012). As formas inorgânicas do chumbo são

consideradas pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC em inglês) dentro do grupo 2^A, ou seja “provavelmente carcinogênicos para humanos”, baseados em dados epidemiológicos e em estudos com animais das formas acetato, subacetato, cromato e fosfato de chumbo (Nersesyan et al. 2016).

A forma nitrato também tem sido identificada como prejudicial para o DNA, sendo responsável pelo aumento da atividade mitogênica em tecidos hepáticos de ratos e de mutações, aberrações cromossômicas em camundongos expostos (Nersesyan et al. 2016).

O dano por oxidação das bases do DNA por radicais livres, é o mecanismo genotóxico mais comum do chumbo, mas o metal também pode interferir nos mecanismos de síntese e reparação do DNA, interagir com proteínas responsáveis pelos processos de supressão tumoral, e simular o papel do cálcio na ligação à proteínas regulatórias; além disso, tecidos tratados com o metal tendem a se proliferar, aumentando a chance de lesões e instabilidade genômica (Aykin-Burns et al. 2005; Xu et al. 2006; Yedjou et al. 2010; Nersesyan et al. 2016).

1.6 Efeito citoprotetor de compostos isolados de plantas.

Os metais não podem ser degradados por alguns organismos vivos e sua taxa de eliminação em humanos é baixa, enquanto sua acumulação nos ecossistemas é cada vez maior, deixando como resultados efeitos adversos irreversíveis, portanto é muito importante encontrar alternativas de proteção contra esses elementos (Ercal et al. 2001; Aykin-Burns et al. 2005; Beyersmann e Hartwig 2008).

A defesa principal contra a intoxicação por metais pesados como o mercúrio é o aumento na atividade de enzimas antioxidantes e na produção de glutathione (GSH), tripeptídeo potente eliminador de radicais e quelante de metais; porém os níveis de GSH são seriamente comprometidos em populações expostas (Nersesyan et al. 2016). O consumo de vitamina C e alimentos ricos em antioxidantes como flavonoides e compostos fenólicos é uma das opções comprovadas contra a toxicidade de metais pesados (Flora 2009; Barcelos et al. 2011b; Nersesyan et al. 2016).

Os compostos polifenólicos entre os quais se incluem diferentes tipos de flavonoides, entre outros grupos de metabólitos secundários, são atualmente reconhecidos por seu poder antioxidante. Devido a sua conformação estrutural ortodihidroxi (unidades catecol), que favorece a capacidade doadora de hidrogênios eliminadora de radicais reativos, estas substâncias funcionam como eliminadores de radicais livres e como quelantes de íons metálicos redox ativos que são capazes de catalisar a peroxidação lipídica celular (Flora 2009; Ines et al. 2012).

Destaca-se que os derivados galoilquínicos formados por unidades de ácido gálico ligadas a unidades de ácido quínico, possuem grupos metoxílicos na posição 3 da porção galoil (Figura 2), expondo a conformação catecol (ortodihidroxi), que pode agir na quelação de metais tóxicos.

Figura 2 - Estrutura química de derivados galoilquínicos isolados das folhas de *C. langsdorffii*. Unidades de ácido quínico esterificadas com unidades galoil ou metoxigaloil.

Fonte: Adaptado de Nogueira et al. (2015).

Alguns estudos têm comprovado o efeito protetor de alguns compostos fenólicos. *In vitro*, a exposição de células hepáticas (HepG2) à quercetina, reduziu os efeitos de estresse oxidativo e dano ao DNA (Barcelos et al. 2011b). *In vivo* também foi demonstrado que este flavonoide protegeu hepatócitos e leucócitos periféricos contra os efeitos adversos originados pela exposição ao metilmercúrio (MeHg), diminuindo o dano no DNA e mantendo os níveis de glutathione e glutathione peroxidase mais altos comparados com o tratamento com o mercúrio (Barcelos et al. 2011a). Entre os derivados galoilquínicos, o ácido 3,5-*O*-di-galoilquínico também apresentou efeito antioxidante em células tumorais de leucemia (K526), aumentando a atividade de enzimas antioxidantes e de reparo do DNA (Ines et al. 2012).

1.7 Ensaios de citotoxicidade e modelos celulares.

Para avaliar o possível risco toxicológico de um composto é indispensável a obtenção de informações sobre sua toxicidade; para tanto, um modelo de cultura de células *in vitro* pode

ser utilizado inicialmente para este rastreio antes da avaliação em estudos com animais (Rothen-Rutishauser et al. 2008).

Atualmente, existem diferentes técnicas de detecção de toxicidade *in vitro*, como por exemplo a diferenciação de células viáveis/não viáveis por métodos colorimétricos que detectam a alteração de funcionamento de enzimas ou organelas (Scherließ 2011). O ensaio de alamar blue é um dos testes mais empregados devido às suas vantagens como sensibilidade, custo-benefício e rapidez (Munshi et al. 2014).

O ensaio de alamar blue tem como ativo a resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido), composto oxidado não fluorescente que ao entrar nas células, é reduzido pelo ambiente intracelular criado pelo recebimento de elétrons dos processos metabólicos da célula; quando reduzida, a resazurina forma o composto rosa fluorescente chamado resorufina, servindo como medida da viabilidade celular por alteração da cor e fluorescência (Hamid et al. 2004; Munshi et al. 2014).

Outro ensaio reconhecido para determinar a capacidade de uma substância exercer efeito citotóxico em células de mamíferos é o de Eficiência Clonogênica. Inicialmente pensado para determinar a capacidade das células de reproduzir-se após o tratamento com radiação iônica, este ensaio testa o potencial mitótico das células e sua capacidade de formar uma colônia após o tratamento com possíveis agentes que podem produzir danos nos cromossomos e apoptose entre outros processos que levam à morte reprodutiva celular (Franken et al. 2006)

A utilização de linhagens celulares em ensaios de “screening” toxicológico fornece informações importantes sobre a segurança de um composto; assim, a escolha da linhagem celular é muito relevante e deve considerar a expressão da atividade enzimática, a fim de simular os processos de metabolização *in vivo* (Hamid et al. 2004; Donato et al. 2008).

O descobrimento da possível hepatotoxicidade de novos medicamentos em estágios tardios de estudos clínicos, pode ser evitado por meio de estudos *in vitro*; no entanto, o uso de hepatócitos humanos primários têm procedimentos de isolamento complicados, vida útil limitada, variabilidade interindividual e alto custo, assim as células imortalizadas são propostas como boa alternativa para os estudos por sua disponibilidade e estabilidade fenotípica (Gerets et al. 2012).

Uma destas alternativas é o uso de células de hepatocarcinoma humano (HepG2), que têm características fenotípicas de hepatócitos humanos, demonstrando capacidades metabólicas como a expressão de enzimas mono-oxigenases dependentes de citocromo P450 e níveis normais de enzimas da fase II, entre outras características que demonstram sua habilidade para

realizar reações de biotransformação e detoxificação, mostrando-se como um bom modelo de estudos de toxicidade de moléculas (Dehn et al. 2004; Gerets et al. 2012; Gonzales et al. 2015).

As células de feocromocitoma da medula de rato (PC12), derivadas de tumor adrenal são consideradas como uma linhagem bem caracterizada que possui características de células neuronais devido a sua capacidade de diferenciar-se em células semelhantes a neurônios (Aykin-Burns et al. 2005; da Silva Machado et al. 2013). Esta capacidade de responder ao fator de crescimento nervoso faz dela uma linhagem útil no estudo da sinalização de fatores neurotróficos que são importantes na regulação da proliferação e diferenciação, o qual permite utilizá-la como um modelo para estudar os efeitos neurotóxicos de agentes quimioterapêuticos, além de serem proficientes no gene *TP53*, um fator recomendado em estudos genotóxicos (Crumpton et al. 2001; Sharifi et al. 2005; da Silva Machado et al. 2013).

Testes com modelos de linhagens celulares não tumorais, também são requeridos na avaliação toxicológica de substâncias. A linhagem celular V79 (fibroblastos de pulmão de hamster chinês) é amplamente utilizada, devido a sua estabilidade na expressão dos genes P450, cuja atividade pode ser comparada com a de hepatócitos humanos; além disso, a linhagem expressa o gene NAT2 (N-acetiltransferase 2), importante na metabolização de fármacos e carcinógenos o qual faz dela um modelo efetivo para avaliar a toxicidade metabolismo-dependente de compostos químicos (Donato et al. 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os possíveis efeitos citoprotetores de flavonoides e derivados galoilquínicos isolados das folhas de *C. langsdorffii* frente à citotoxicidade induzida pela exposição ao mercúrio e ao chumbo.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar reisolamento dos metabólitos majoritários das classes dos flavonoides e de derivados galoilquínicos das folhas de *C. langsdorffii* Desf., por meio de diferentes modalidades cromatográficas;
- Avaliar a citotoxicidade de derivados galoilquínicos e flavonoides isolados das folhas de *C. langsdorffii* Desf., nas células HepG2, PC12 e V79.
- Identificar os possíveis efeitos citoprotetores de compostos isolados frente à exposição a metais pesados utilizando como modelos as linhagens HepG2 e PC12.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do material vegetal, secagem e moagem.

Folhas e ramos de *C. langsdorffii* foram coletados de uma árvore localizada na Faculdade de Farmácia do campus da USP de Ribeirão Preto (21°10'15,64''S; 47°50'52,83''O), com prévia autorização de coleta do SISBIO-ICMBio e autorização de acesso ao patrimônio genético para fins de pesquisa científica solicitada ao CNPQ com o aval da Pró-Reitoria de pesquisa da USP em janeiro de 2014 (processo n° 010783/2013-0), no 24 de abril de 2015.

A espécie foi previamente identificada pelo botânico Milton Groppo do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, em cujo herbário encontra-se depositada uma exsiccata sob o número SPFR 10120. As folhas foram separadas dos galhos e levadas a secagem em estufa de ar quente e circulante (FABBE, modelo 170) a 40°C por 24 h. Após secagem, o material foi submetido à moagem em moinho de facas (SOLAB, modelo SL-32) previamente higienizado.

3.2 Estudo fitoquímico.

3.2.1 Obtenção do extrato bruto de *C. langsdorffii*.

Quinhentas gramas do material vegetal pulverizado foram macerados com 3 litros de etanol-água (7:3); o solvente foi filtração e renovado a cada 48 h, quatro vezes consecutivas. Os extratos obtidos foram concentrados em rotaevaporador a vácuo, reunidos e liofilizados até secagem completa.

3.2.2 Partição líquido-líquido do extrato hidroalcoólico.

O extrato hidroalcoólico bruto (50 g) foi dissolvido em 500 mL de solução metanol e água 1:1 e particionado segundo o esquema apresentado na Figura 3. A primeira partição foi feita por agitação em embudo de decantação com 150 mL de diclorometano, separando as fases e renovando o solvente quatro vezes consecutivas; logo a separação da fração em diclorometano, o extrato remanescente foi particionado seguindo a mesma metodologia com acetato de etila; finalmente foi realizada uma partição com *n*-butanol. As frações em solventes orgânicos e aquosa foram concentradas em rotaevaporador a vácuo e liofilizadas (Liotop, K105).

A fração butanólica ao momento de ser congelada para liofilização, apresentou duas fases; a primeira, foi uma fase aquosa que congelou facilmente, a segunda uma com prevalência de solvente. Essas fases foram separadas e as frações analisadas como independentes.

Figura 3 - Estudo fitoquímico. Processo de partição do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. langsdorffii*.

Fonte: produção do autor.

3.2.3 Cromatografia contracorrente (CCC) da fração em acetato de etila para o isolamento dos flavonoides majoritários.

Estudos prévios realizados por Nogueira et al. (2015), descreveram que a fração AcOEt do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. langsdorffii* caracteriza-se por ser rica em flavonoides. Seguindo a metodologia proposta por estes autores as separações por cromatografia contracorrente foram realizadas no Laboratório de Farmacognosia da FCFRP-USP em aparelho de cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC – “High-speed counter-current chromatography”) modelo Quatro CCCTM MK 5 & MK 6 (AECS-QuikPrep™ Ltd., Reino Unido), acoplado a uma bomba de vazão contínua (SSI Series II HPLC Pump); o instrumento contém duas bobinas, cada uma com duas colunas em PTFE (Bobina 1: coluna A: 208 mL, d.i. 3,2 mm e coluna B: 29 mL, d.i. 1,0 mm; Bobina 2: coluna C: 102 mL, d.i. 2,0 mm

e coluna D: 105 mL, d.i. 2,0 mm). As separações foram realizadas utilizando as colunas C (102 mL) e D (105 mL), d.i. 2 mm, em modo de eluição normal (conectadas entre si no sentido cauda-cabeça-cauda-cabeça).

O sistema de solventes utilizado foi (hexano:butanol):(metanol:água) acidificada nas proporções (1:1):(0,4:1) (1360 mL). A fase inferior/aquosa foi utilizada como fase estacionária e a fase superior/orgânica como fase móvel. Os sistemas de solventes selecionados foram preparados nas proporções definidas e equilibrados em funil de separação a temperatura ambiente por 12 h. Em seguida, as fases superior e inferior foram separadas e desgaseificadas em aparelho de ultrassom por 10 min.

A rotação utilizada foi de 850 rpm e temperatura ajustada em 37°C com variação máxima até 40°C. As colunas foram preenchidas com a fase estacionária para depois bombear a 2 mL/min a fase móvel até não haver mais saída de fase inferior/aquosa das colunas, como indicador da estabilização do sistema, possibilitando o cálculo de retenção da fase estacionária. A alça do injetor de 10 mL foi utilizada para introdução das amostras no sistema cromatográfico e 2 g da fração AcOEt foram solubilizados em 8 mL da mistura 1:1 da fase móvel e estacionária do sistema de solventes.

Foram coletados 55 subfrações de 5 mL com o aparelho em rotação, as quais foram reunidas de acordo com semelhança cromatográfica por CCD. As subfrações foram concentradas, pesadas e analisadas por CLAE-DAD.

3.2.4 Cromatografia de exclusão em gel da fração *n*-butanólica para o isolamento dos compostos galoilquínicos.

Estudos já realizados no laboratório de Farmacognosia da FCFRP-USP, comprovaram que tanto a fração *n*-butanólica das partes aéreas da espécie vegetal em estudo, quanto a aquosa contêm derivados galoilquínicos (Nogueira 2011; Motta 2014). Realizou-se uma cromatografia de exclusão em gel com a fração *n*-butanólica, em coluna de vidro de 70 cm × 4 cm d.i., utilizando gel de *Sephadex* LH 20 (25-100 µm, Sigma-Aldrich®) (25 g) como fase estacionária e MeOH:H₂O em gradiente como fase móvel (Tabela 1), como foi estabelecido por Motta et al. (2014).

A fração *n*-butanólica (4,5 g) foi ressuspensa em 10 mL da fase móvel inicial e, em seguida, centrifugada a 5000 rpm por 10 min. O precipitado foi descartado e o sobrenadante filtrado em algodão e aplicado no topo da coluna cromatográfica, previamente estabilizada com a fase móvel inicial. Frações de 20 mL foram coletadas em tubos de ensaio, para depois serem

concentradas e analisadas por CCD e assim reunir aquelas com perfil cromatográfico semelhante.

Tabela 1 - Gradiente de polaridade MeOH:H₂O empregado no decorrer do fracionamento da fração aquosa por cromatografia de exclusão em gel.

	Fase móvel	Volume (mL)		Fase móvel	Volume (mL)
1	MeOH:H ₂ O (1:9)	350	7	MeOH:H ₂ O (5:5)	700
2	MeOH:H ₂ O (1,5:8,5)	250	8	MeOH:H ₂ O (6:4)	700
3	MeOH:H ₂ O (2:8)	500	9	MeOH:H ₂ O (7:3)	750
4	MeOH:H ₂ O (2,5:7,5)	250	10	MeOH:H ₂ O (8:2)	600
5	MeOH:H ₂ O (3:7)	150	11	MeOH	Limpeza
6	MeOH:H ₂ O (4:6)	500			

3.2.5 Análise cromatográfica das frações e subfrações obtidas.

As subfrações obtidas de cada um dos procedimentos cromatográficos feitos foram analisadas por CCD para reunir aquelas com perfil químico semelhante. Usando capilares de vidro, foram aplicadas alíquotas em placas de alumínio de Sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck Millipore) para serem eluídas com fase móvel composta de acetato de etila: água: ácido fórmico: ácido acético (100:27:11:11), fase móvel recomendada por Wagner e Bladt (1996) para a análise de flavonoides glicosilados e outros polifenóis; as cromatoplasmas foram observadas em luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm e reveladas com anisaldeído com aquecimento.

Para a obtenção dos perfis cromatográficos do extrato, frações e subfrações, estes foram analisados em cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência (CLAE) da marca Waters®, com sistema de bombas binário modelo 1525, injetor automático modelo 2707, detector de arranjo de diodos modelo 2998 e sistema controlador computadorizado com o software *Empower 3*.

As análises foram feitas utilizando coluna analítica de fase reversa Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm) e pré-coluna analítica Synergi Polar-RP (4,0 × 3,0 mm, 4 µm), ambas da marca Phenomenex®. Para o extrato, frações e subfrações ricas em compostos galoilquínicos (derivadas da fração *n*-butanólica), a fase móvel foi composta por água e 0,1% de ácido fórmico na bomba A e metanol na bomba B. O gradiente de polaridade da fase móvel foi 15-50% de B em 45 min., elevando-se de 50-90% de B até 65 min., passando de 90-15% de B até 70 min., seguido por mais 5 min. de 15% de B, numa vazão de 1 mL/min.

Para as subfrações obtidas por CCC (derivadas da fração acetato de etila), a análise cromatográfica foi realizada utilizando a mesma coluna e pré-coluna, e uma fase móvel composta por A: água e B: acetonitrila; o gradiente de polaridade foi 20-75% de B em 5 min.,

25-28% de B em 13 min., incrementando-se de 28-60% em 17 min., voltando de 60-20% de B até 21 min. mantendo-se nesta proporção até 23 min.

As amostras foram solubilizadas na fase móvel inicial da análise cromatográfica na concentração de 1 mg/mL. Previamente à injeção as amostras foram filtradas em membranas com poros de 0,45 µm, sendo que 20 µL de cada solução foram injetados no cromatógrafo. A detecção em CLAE-DAD foi programada de 210-600 nm e os cromatogramas foram registrados nos comprimentos de onda 254, 280 e 360 nm.

3.2.6 Isolamento dos compostos por CLAE semipreparativa.

As subfrações com os compostos de interesse foram submetidas à CLAE semipreparativa para isolamento utilizando cromatógrafo Shimadzu no modo preparativo, modelo Proeminence, com controlador do modelo CBM-20A, detector UV/Visível do modelo SPD-20A, duas bombas do modelo LC-6AD, degaseificador modelo DGU-20A5 e coletor automático do modelo FCR-10A. O estabelecimento das condições cromatográficas e o seguimento da eluição foram realizados utilizando-se o software *LC-Solution Single*.

A CLAE semipreparativa foi realizada em coluna Synergi Polar-RP (250 × 10 mm, 4 µm) da marca Phenomenex®. No caso das frações com compostos galoilquínicos, para compor a fase móvel foram utilizados (A) ácido-fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol, com vazão de 4,6 mL/min.; para o isolamento dos flavonoides a fase móvel foi de água (A) e acetonitrila (B), numa vazão de 5,5 mL/min.

No caso do isolamento de derivados galoilquínicos o gradiente de polaridade da fase móvel variou conforme a fração purificada; enquanto para os flavonoides a fase foi a mesma empregada no análise CLAE-DAD. Quantidades de 10-12 mg das amostras foram solubilizadas em 1 mL da fase móvel inicial, filtradas em membranas com poros de 0,45 µm e, em seguida, injetadas no cromatógrafo num volume de 100 µL por vez.

O solvente das amostras contendo as substâncias isoladas foi evaporado com auxílio do aparelho *Speed Vac* (Savant SPD 2010, Thermo). As substâncias isoladas por CLAE semipreparativa foram analisadas por CLAE-DAD em coluna analítica Polar-RP, como descrito no item anterior. Os cromatogramas foram registrados em 254 e 280 nm para os galoilquínicos e 250 e 360 nm para os flavonoides.

3.2.7 Identificação e elucidação das estruturas químicas dos compostos isolados.

As estruturas químicas dos derivados galoilquínicos isolados foram determinadas por análise de RMN Unidimensional de ¹H e de ¹³C e Bidimensional (HSQC e HMBC) realizadas

no Departamento de Química da FFCLRP-USP. Os espectros obtidos foram registrados em espectrômetro Brucker–Avance DRX500, operando em 500 MHz (RMN de ^1H e HMBC), 400 MHz (HSQC) e 125 MHz (RMN de ^{13}C e DEPT-135). As amostras foram preparadas nos solventes deuterados CD_3OD (derivados galoilquínicos) ou $\text{DMSO } d_6$ (flavonoides) da Sigma Aldrich®.

Também foram realizadas análises por espectrometria de massas dos compostos isolados para confirmação das massas moleculares dos mesmos. As análises foram feitas no sistema H-Class UPLC ACQUITY Waters acoplado ao espectrômetro de massas quadrupolo tandem Xevo® TQ-S com uma fonte Z-spray operando no modo negativo, sob os seguintes parâmetros: -2.5 kV de voltagem do capilar; -40 V voltagem do cone; 150°C de temperatura da fonte Z-spray; 350°C de temperatura de dessolvatação (N_2); 600 L/h de vazão do gás de dessolvatação (N_2); rango de massa de 100 até 1000 m/z; gás de colisão argônio nos íons precursores selecionados; os dados foram processados com o software *Mass Lynx* V4.1.

3.3 Ensaios *in vitro*.

3.3.1 Linhagens celulares e condições de cultivo para os ensaios com metais pesados.

As linhagens celulares utilizadas neste estudo (células HepG2 e PC12) estão conservadas em nitrogênio líquido no Laboratório de Nutrigenômica da FCFRP-USP e permanecem armazenadas em alíquotas de 2,0 mL com aproximadamente 1×10^6 células viáveis.

A linhagem HepG2 (ATCC® HB-8065™) que é uma linhagem derivada de hepatocarcinoma humano e a linhagem PC12 (ATCC® CRL-1721™), um feocromocitoma da medula de rato, foram gentilmente cedidas pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

Para realização de todos os experimentos as células HepG2 e PC12 foram manipuladas em capela de fluxo laminar classe II tipo A1 (Veco, Campinas, Brasil) e mantidas em estufa Forma Series II, Water Jacket CO_2 Incubator (ThermoFisher Scientific - Waltham, Massachusetts, EUA) com 5% de CO_2 a 37°C e 95% de umidade, em meio de cultura DMEM (Gibco) com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco) para HepG2 e RPMI (Gibco) com 10% de SBF e 5% de soro fetal equino (SEF; Gibco) para PC12. Todas as células receberam aminoácidos essenciais para seu crescimento e 1% de antibióticos (estreptomicina, gentamicina e neomicina) de acordo com os procedimentos para manutenção de linhagens celulares propostos por de Bal-Price e Coecke (2011).

A cada dois ou três dias as células foram sub-cultivadas usando-se tampão fosfato salino (PBS) para lavá-las e 500 µL de solução de tripsina-PBS (proporção 1:1; Gibco) para desprender as células da superfície interna do frasco de cultura; 1,5 mL de meio de cultura completo era adicionado ao frasco para inativação da protease. Após centrifugação uma pequena alíquota do pellet celular ressuscitado, foi colocada em novos frascos de cultivo com 10 mL de meio completo, sendo incubadas nas condições anteriormente mencionadas. Para a realização dos ensaios, as células foram usadas entre a terceira e oitava passagem após o descongelamento.

Estes ensaios foram realizados em colaboração com a equipe da Prof. Dra. Lusânia Maria Greggi Antunes da FCFRP-USP.

3.3.2 Ensaio de citotoxicidade de alamar blue: compostos isolados e metais pesados.

Para determinar a toxicidade dos compostos isolados de copaífera nas linhagens em estudo, começou-se por testar a possível citotoxicidade deles selecionando quatro compostos em virtude da sua massa e pureza (os dois flavonoides e dois derivados galoilquínicos o AGQ3 e AGQ4). Células das linhagens HepG2 e PC12 foram semeadas em placas de cultura de 96 poços (Kasvi) com uma concentração de $1,5 \times 10^4$ células/poço. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa de CO₂ (5%) a 37°C e 95% de umidade relativa para estabilização e aderência.

Posteriormente, as placas foram tratadas por um período de 24 h, com três níveis de concentração de cada composto (1 µM, 10 µM e 100 µM), considerando uma faixa de concentrações similares àquelas que podem atingir alguns fármacos no nível tecidual, realizando três repetições por tratamento. Como controle do solvente foi utilizado DMSO na máxima concentração utilizada na solubilização das amostras (0,1%) (Sigma-Aldrich®), e como controle positivo, metil metanosulfonato (MMS; Sigma-Aldrich®) a 300 µM.

Após 24 h de incubação, as células tratadas foram expostas a 50 µL/poço de uma solução aquosa de resazurina a uma concentração de 0,1 mg/mL (Ahmed et al. 1994). Depois de 40 min de incubação, a leitura foi feita com espectrofotômetro de fluorescência (Cary Eclipse – Agilent Technology), com um comprimento de onda de excitação de 560 nm e 590 de emissão configurados no software *Cary Eclipse Scan Application*. Os dados foram normalizados em relação ao controle negativo e transformados em porcentagem de viabilidade celular. Foram realizadas três repetições experimentais para cada linhagem celular.

A toxicidade dos metais nitrato de chumbo (Pb(NO₃)₂; Mallinckrodt Inc.) e cloreto de metilmercúrio (CH₃HgCl; Aldrich), também foi testada através do protocolo de alamar blue. Concentrações variáveis de cada metal foram testadas de acordo com dados experimentais e da

literatura. Os dados de fluorescência foram normalizados em relação ao controle negativo e transformados em porcentagem de viabilidade celular; uma concentração próxima à dose letal 50 (IC₅₀) de cada metal foi selecionada para realizar os ensaios posteriores.

3.3.3 Linhagem celular e condições de cultivo para o ensaio de eficiência clonogênica.

A linhagem celular utilizada no presente estudo foi derivada de fibroblasto de pulmão de hamster chinês V79, cedida gentilmente pelo Laboratório de Citogenética e Mutagenese da FMRP-USP. As células foram cultivadas em meio de cultura (HAM F10 + DMEM, na proporção 1:1, Sigma-Aldrich®), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Nutricell), 1,2 g/mL de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich®), 0,1 g/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®) e 0,06 g/mL penicilina (Sigma-Aldrich®).

Como as outras linhagens, estas células foram cultivadas em monocamada em 10 mL de meio de cultura. Cerca de 1×10^6 células foram semeadas em cada frasco de cultura para serem tratadas. Para a realização dos experimentos, as células foram utilizadas entre a quarta e décima passagem, e a contagem das mesmas foi feita em câmara de Neubauer.

Estes ensaios foram realizados em colaboração com a equipe da Prof. Dra. Denise Crispim Tavares da Universidade de Franca (UNIFRAN).

3.3.4 Ensaio de eficiência clonogênica.

O protocolo para a realização do ensaio foi adaptado de Franken et al. (2006), sendo semeadas 300.000 células em placas de cultivo de seis poços, contendo 5 mL de meio de cultura (HAMF10 + DMEM 1:1; Sigma-Aldrich®), suplementado com 10% de SFB. As células foram tratadas por 3 h com diferentes concentrações de um dos derivados galoilquínicos, que variaram de 29,8 a $3,8 \times 10^3$ µM. O AGQ4 foi o composto selecionado, considerando dar continuidade aos ensaios de citotoxicidade feitos com os derivados galoilquínicos, e a alta quantidade de massa requerida para a elaboração do ensaio.

Foram inclusos os grupos controles negativo (sem tratamento), solvente (DMSO 0,04%) e positivo (MMS 998 µM). Ao término do período de tratamento, as células foram lavadas com PBS e tripsinizadas. Foram semeadas 300 células em novas placas de cultivo. Após sete dias de incubação a 37°C, em estufa B.O.D (Fanem), as células foram novamente lavadas com PBS, para serem fixadas com metanol: ácido acético: água destilada (1:1:8) durante 30 min. Em seguida, foram coradas por 25 min com Giemsa diluído em tampão fosfato 1:20 (pH 7,0).

As colônias celulares formadas foram contabilizadas e foi realizado o cálculo para a definição das frações de sobrevivência (FS), em porcentagem, obtidas nos tratamentos. Para tanto, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$FS(\%) = A \div B \times 100$$

Onde *A* corresponde ao número de colônias encontradas nos diferentes tratamentos e *B*, ao número de colônias encontradas no controle negativo. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3.5 Ensaios de citotoxicidade de alamar blue: associações metais-compostos.

Para a realização dos ensaios de associação, o mesmo protocolo descrito foi realizado. Porém, após estabilização e aderência, as células foram tratadas com as três concentrações selecionadas de cada composto (1, 10 e 100 µM), e uma hora após incubação os tratamentos foram submetidos à dose citotóxica do metal previamente selecionada. Vinte e quatro horas após da solução do metal, as placas foram reveladas para sua leitura em espectrofotômetro de fluorescência. Os dados obtidos foram normalizados em relação ao controle negativo e transformados em porcentagem de viabilidade celular.

3.4 Análise estatística

As médias dos dados de porcentagem de viabilidade em cada uma das repetições dos ensaios de viabilidade celular e eficiência clonogênica foram submetidas à Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey (significância de $p \leq 0,05$). Para a análise dos dados obtidos nos ensaios de associação, as médias de cada um dos tratamentos foram comparadas contra o controle negativo através do teste de comparação múltipla de Dunnett.

As análises estatísticas foram feitas no software GraphPad Prism 5 (La Jolla - CA - EUA). Todos os dados estão apresentados como média ± desvio padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo fitoquímico

4.1.1. Perfis cromatográficos do extrato bruto das folhas de *C. langsdorffii* e frações.

O processo de extração utilizado para a obtenção do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. langsdorffii* resultou em 140 g do mesmo, o que representa 28% de rendimento (Tabela 2). A partir do processo de partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, foram obtidas cinco frações, sendo que a fração butanólica foi separada em duas. A fração em acetato de etila apresentou o maior rendimento de extração, seguida pela fração *n*-butanólica.

Tabela 2 - Rendimento do extrato bruto das folhas de *C. langsdorffii* e de suas subfrações.

Fração	Quantidade obtida (g)	Rendimento
Extrato hidroalcoólico	140	28%
- Diclorometano	3,18	6,36%
- Acetato de etila	23,85	47,7%
- <i>n</i> -BuOH	9,81	19,62%
- <i>n</i> -BuOH-H ₂ O	2,45	4,9%
- Resíduo aquoso	8,43	16,86%

A análise por CLAE-DAD para o extrato bruto (Figura 4) e as frações de interesse (Figuras 5 e 6) permitiu observar a complexidade do perfil metabólico das folhas da espécie *C. langsdorffii*. Os cromatogramas são apresentados na absorção de ultravioleta de 254, 280 e 360 nm, considerando que o ácido gálico e compostos derivados apresentam absorção significativa no ultravioleta em 254 nm e 280 nm (Tian et al. 2000; Lu et al. 2007; Yang et al. 2008; Motta et al. 2017); enquanto os flavonoides absorvem também em 360 nm (Nogueira et al. 2015).

Os cromatogramas das frações diclorometano, *n*-BuOH-H₂O e do resíduo aquoso, são apresentadas nos Apêndices 1-3, nas absorções UV de monitoramentos já mencionadas.

Figura 4 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. langsdorffii*. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min.

Fonte: produção do autor.

O perfil cromatográfico da fração em acetato de etila (Figura 5), ainda sugere complexidade e similitude com o extrato bruto, sendo possível visualizar a presença de derivados galoilquínicos eluindo nos primeiros 40 min do método. Porém, no espectro a 360 nm destaca-se a absorção de duas bandas que presumivelmente correspondem aos flavonoides quercitrina e afzelina com tempos de retenção de 40,7 e 46,6 min respectivamente. Os espectros de absorção UV são apresentados, confirmando que os picos destacados apresentam perfil similar ao reportado na literatura. Segundo Nugroho et al. (2009), a quercitrina apresenta uma absorção no UV λ (nm) em MeOH de 257 e 360 nm, enquanto para a afzelina a absorção é de 266 e 345 nm.

No caso da fração em *n*-butanol (Figura 6), os cromatogramas evidenciam a presença majoritária de derivados galoilquínicos comprovado pelos espectros de absorção obtidos no ultravioleta. Este tipo de compostos apresenta absorção UV λ (nm) entre 217-226 e 274-278 numa fase móvel de MeOH:H₂O (0,01% TFA) (Nogueira et al. 2015; Motta et al. 2017).

Figura 5 - Perfil cromatográfico da fração em acetato de etila. A) Perfis obtidos por CLAE-DAD; fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: ácido fórmico-água 0,1:99,9 (a) e metanol (b). Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min. Comprimentos de onda: 254, 280 e 360 nm. B) espectro de absorção dos picos de interesse do extrato correspondentes aos compostos quercitrina e afzelina.

Fonte: produção do autor.

Figura 6 - Perfil cromatográfico da fração em *n*-butanol. A) Perfis obtidos por CLAE-DAD; fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: ácido fórmico-água 0,1:99,9 (a) e metanol (b). Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min. Comprimentos de onda: 254, 280 e 360 nm. B) espectro de absorção dos picos de interesse do extrato correspondentes aos compostos galoilquínicos.

Fonte: produção do autor.

4.1.2 Fracionamento por cromatografia contracorrente da fração em acetato de etila: isolamento dos flavonoides majoritários.

A cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC) é uma técnica de partição líquido-líquido que não usa suporte ou fase estacionária sólida. A metodologia é baseada na partição do composto alvo entre duas fases líquidas que são imiscíveis (Sun et al. 2016).

O sistema de solventes para separação dos compostos da fração em acetato de etila foi desenvolvido por Nogueira (2011), pelo cumprimento de condições como: não formação de emulsão, baixo tempo de decantação (25 seg.) e valor do coeficiente de partição (K) adequado (próximo de 1) para separação em HSCCC em modo normal e isocrático, que nos casos dos compostos quercitrina e afzelina, corresponderam a 0,6 e 0,95 respectivamente. Esses valores foram calculados a partir dos dados da área dos picos obtidos nos cromatogramas das fases superior e inferior do sistema de solventes.

O coeficiente de partição é sugerido para predizer em quais volumes de fase móvel os compostos eluem da coluna. Assim um composto cujo valor de $K = X$, deve eluir com cerca de X vezes o volume da coluna do HSCCC, desde que a fase estacionária seja retida no interior da coluna (Nogueira 2011).

Para a obtenção de maior quantidade de subfrações, o processo foi repetido duas vezes (HSCCC 1 e HSCCC 2). A retenção da fase estacionária no interior da coluna prévio à injeção da amostra foi de 91% com 50 mL de extrusão da fase, nas duas ocasiões. Porém, ao longo do processo houve extrusão de 140 e 142 mL (HSCCC 1 e HSCCC 2, respectivamente) de fase estacionária, sendo que ao final do processo a retenção correspondeu a 66,08% e 65,22% nas duas eluições.

Foram coletadas 54 amostras do primeiro fracionamento, após reunião conseguiu-se obter cinco subfrações. Durante o segundo processo houve separação de um precipitado formado no momento da dissolução da amostra na mistura 1:1 da fase estacionária, portanto ele foi considerado como subfração, junto com as outras quatro que foram obtidas a partir da reunião das 57 frações coletadas. Na Tabela 3 apresentam-se os rendimentos das subfrações obtidas em cada processo cromatográfico; o alto rendimento do precipitado no HSCCC 2 evidencia perda de amostra durante a preparação da mesma, que não foi considerada na primeira repetição.

Nos espectros obtidos a partir da análise por CLAE-DAD, observa-se a presença dos compostos de interesse nas subfrações Sf. 2, 3, 4, e 5 do primeiro teste de HSCCC 1 (Figura 7). Por outro lado, no segundo procedimento no HSCCC, tanto o precipitado quanto a subfração

SF3, continham bandas cromatográficas coincidentes com os compostos alvo, a quercitrina com um tempo de retenção de 9,0 min e a afzelina aparecendo por volta de 11,4 min (Figura 7).

Tabela 3 - Rendimento das subfrações obtidas a partir da fração em AcOEt (2 g) por cromatografia contracorrente.

Nº Subfração	HSCCC 1			Nº Subfração	HSCCC 2		
	Volumes reunidos	Peso (mg)	Rendimento (%)		Volumes reunidos	Peso (mg)	Rendimento (%)
1	1-29	59,6	2,98	1	1-15	11,4	0,57
2	30-37	54,8	2,74	2	16-32	23,3	1,16
3	38-42	38,7	1,93	3	33-42	38,1	1,40
4	43-48	25,1	1,25	4	43-57	58	2,9
5	49-54	49,5	2,47	-	Precipitado	451,6	22,58

O processamento cromatográfico revela que o método de separação de flavonoides por cromatografia contracorrente não apresentou alto rendimento como esperado. Porém, mostra ser seletivo para a separação dos compostos majoritários deste tipo presentes na fração acetato de etila. O processamento anterior está de acordo com o trabalho de Nogueira et al. (2015), no qual foram obtidas subfrações com mais do 90% de concentração de quercitrina e afzelina.

A cromatografia contracorrente para a separação de polifenóis é uma técnica altamente apreciada, devido às vantagens em superar os problemas que se apresentam com outro tipo de modalidades, como a adsorção na sílica gel (por sua alta polaridade), e complicações na análise como assimetria nos picos em CLAE usando fase estacionária reversa (Berthod et al. 2009).

O emprego da HSCCC na separação destes compostos amostra-se vantajoso em comparação com as técnicas de coluna cromatográfica clássicas, pois além de evitar os problemas mencionados é um procedimento que consegue separar compostos de tamanhos moleculares similares com alta pureza, tem grande capacidade de carga, e resulta mais econômico por utilizar menor quantidade de solvente (Hostettmann et al. 1984; Berthod et al. 2009; Sun et al. 2016). Além disso é importante considerar que o grau do solvente usado pode ser analítico, o que faz dele uma opção muito mais econômica e ecológica, considerando que pode ser recuperado uma vez que a eluição cromatográfica é feita.

Após purificação das subfrações por CLAE-PREP, foram isolados os flavonoides que correspondiam aos compostos quercitrina (38,8 mg) a partir das subfrações 2, 3 e 4 do HSCCC1 além da subfração 4 e do precipitado do HSCCC2; por sua parte a afzelina (40,5 mg) foi isolada das subfrações 5 do HSCCC1 e precipitado do HSCCC2 (Figura 8). A porcentagem da área sob

a curva referente às bandas cromatográficas dos compostos isolados, e os espectros no ultravioleta foram os parâmetros utilizados para estimar a porcentagem de pureza destes.

Figura 7 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD das subfrações com presença dos flavonoides quercitrina e afzelina, obtidas da: A) CCC 1, B) CCC 2. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) água e (B) acetonitrila. Eluição em gradiente: 20-75% de B em 5 min., 25-28% de B em 13 min., incrementando-se de 28-60% em 17 min., voltando de 60-20% de B até 21 min. mantendo-se nesta proporção até 23 min. Vazão: 1 mL/min. Comprimento de onda: 254 nm.

Figura 8 - Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD dos flavonoides A) quercitrina e B) afzelina. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) água e (B) acetonitrila. Eluição em gradiente: 20-75% de B em 5 min., 25-28% de B em 13 min., incrementando-se de 28-60% em 17 min., voltando de 60-20% de B até 21 min. mantendo-se nesta proporção até 23 min. Vazão: 1 mL/min. Comprimento de onda: 254 nm.

Fonte: produção do autor.

4.1.3 Cromatografia de exclusão em gel da fração *n*-butanólica: isolamento de compostos galoilquínicos.

A cromatografia de exclusão em gel se diferencia de outras técnicas pela constituição da coluna por moléculas com poros de tamanho determinado, que permitem a exclusão estérica seletiva e dinâmica das partículas do soluto entre duas fases líquidas (Rothschild 2006).

Sephadex LH-20 é um derivado hidroxipropil da dextrana (polissacarídeo com unidades de glicose), com ligações cruzadas que pode ser usado com solventes orgânicos polares ou misturas aquosas contendo estes (Rothschild 2006). Devido a sua característica dual lipofílica (por sua hidroxipropilação) e hidrofílica (dada pelas unidades sacarídicas), este gel apresenta seletividade e reprodutibilidade altas, até o ponto de ter sido usado para separar moléculas com propriedades similares e massas moleculares idênticas (Křenek et al. 2014; Motta 2014).

Dependendo da polaridade do solvente de eluição, a esfera polimérica pode sofrer expansão ou contração tridimensional, alterando o tamanho dos poros. Em solventes polares as esferas expandirão estreitando os canais, por outro lado em solventes apolares ocorre contração tridimensional e assim, o alargamento dos mesmos (Motta 2014). Por estas características do gel, e considerando a alta polaridade dos derivados galoilquínicos que em outro tipo de fases estacionárias como sílica gel podem ser adsorvidos de maneira irreversível, o uso de *Sephadex* LH-20 foi selecionada para a separação.

Do fracionamento foram coletados 325 volumes, que após análise por CCD foram reunidos em 22 subfrações resultantes. Os rendimentos calculados estão na Tabela 4 e os perfis obtidos por CLAE-DAD nas Figuras 9-12. As subfrações 1, 17 e 22 não apresentaram absorção no comprimento de onda de 280 nm. Por meio da análise dos perfis cromatográficos, verificou-se que o sistema de eluição no modo gradiente foi satisfatório, uma vez que as subfrações em geral apresentam perfil cromatográfico simples comparado com o perfil da fração total.

Foi observado que compostos com tempos de retenção próximos foram eluídos em subfrações diferentes. Por exemplo, os compostos que eluem nos primeiros 10 min foram prevalentes nas subfrações 2 e 3 com tempos de retenção muito próximos, enquanto, aqueles com tempos de retenção entre 14 e 25 min foram majoritários nas subfrações 4-12, sendo que ainda nas subfrações 5, 6, 7, 8, e 9, alguns compostos que eluíram antes de 10 min estão presentes nos perfis cromatográficos. A partir da subfração 13, observam-se nos cromatogramas picos de compostos com tempos de retenção entre os 23 e os 45 min.

Tabela 4 - Rendimento das subfrações obtidas a partir da fração em *n*-butanol (4,5 g) por cromatografia de exclusão em gel de *Sephadex* LH-20.

Nº Subfração	Volumes reunidos	Peso (mg)	Rendimento (%)	Nº Subfração	Volumes reunidos	Peso (mg)	Rendimento (%)
1	1-35	1420,4	31,56	12	151-164	66,1	1,47
2	36-43	196,5	4,37	13	165-185	143,3	3,18
3	44-70	435,7	9,68	14	186-189	27,3	0,61
4	71-79	59,9	1,33	15	190-220	424,4	9,43
5	80-89	179,2	3,98	16	221-230	80,6	1,79
6	90-105	292,1	6,49	17	231-265	195,6	4,35
7	106-109	48,6	1,08	18	266-274	61,6	1,37
8	110-116	157,6	3,50	19	275-280	47,9	1,06
9	117-129	38,6	0,86	20	281-284	22	0,49
10	130-145	152,1	3,38	21	285-300	159,8	3,55
11	146-150	27,2	0,60	22	302-325	334	7,42

Figura 9 - Perfis obtidos por CLAE-DAD das subfrações 2-5 obtidas por cromatografia de filtração em gel de *Sephadex* LH-20 a partir da fração *n*-butanólica. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min. Comprimento de onda: 280 nm.

Fonte: produção do autor.

Figura 10 - Perfis obtidos por CLAE-DAD das subfrações 6-11 obtidas por cromatografia de exclusão em gel de *Sephadex LH-20* a partir da fração *n*-butanólica. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min. Comprimento de onda: 280 nm.

Fonte: produção do autor.

Figura 11 - Perfis obtidos por CLAE-DAD das subfrações 12-18 obtidas por cromatografia de exclusão em gel de *Sephadex* LH-20 a partir da fração *n*-butanólica. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min. Comprimento de onda: 280 nm.

Fonte: produção do autor.

Figura 12 - Perfis obtidos por CLAE-DAD das subfrações 19-21 obtidas por cromatografia de exclusão em gel de *Sephadex* LH-20 a partir da fração *n*-butanólica. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min. Comprimento de onda: 280 nm.

Fonte: produção do autor.

As subfrações foram submetidas à CLAE semipreparativa para o isolamento dos compostos alvo como já foi descrito na seção dos métodos, utilizando diferentes tempos de eluição em gradiente dependendo do comportamento da fração, mas mantendo como fase móvel MeOH e H₂O acidificada (Tabela 5). Os compostos isolados foram analisados por CLAE analítica, para reunir aqueles compostos iguais que estavam presentes em mais de uma subfração.

A quantidade total obtida de cada composto e as subfrações a partir das quais os mesmos foram isolados encontram-se na Tabela 6, considerando que só foram incluídos os compostos isolados dos quais se obtiveram quantidades e pureza suficientes para realizar a identificação. Os compostos foram identificados pela sigla AGQ de ácido galoilquínico, seguida pelo número correspondente à ordem do isolamento e identificação.

Tabela 5 - Métodos cromatográficos empregados para o isolamento dos derivados galoilquínicos a partir das subfrações obtidas por cromatografia de exclusão em gel.

Subfração	Método cromatográfico	Subfração	Método cromatográfico
Sf. 5 (80-89)	20-47% de B - 17 min.; 47-100% de B - 19 min.; 100-20% de B - 23 min.; 20% de B até 25 min.	Sf. 10 (130-145)	30-40,3% de B - 13 min.; 40,3-80% de B - 15 min.; 80% de B - 16 min.; 80-30% de B - 19 min.; 30% de B até 20 min.
Sf. 6 (90-105) Sf. 7 (106-109)	25-55% de B - 17 min.; 55-80% de B - 18 min.; 80% de B - 18,5 min.; 80-25% de B - 21 min.; 25% de B até 23 min.	Sf. 12 (151-164)	30-38,5% de B - 10 min.; 38,5-80% de B - 12 min.; 80% de B - 13 min.; 80-30% de B - 18 min.; 30% de B até 19 min.
Sf. 8 (110-116)	27-50% de B - 20 min.; 50-80% de B - 22 min.; 80% de B - 23 min.; 80-27% de B - 26 min.; 27% de B até 27 min.	Sf. 13 (165-185) Sf. 14 (186-189) Sf. 18 (266-274) Sf. 19 (275-280) Sf. 20 (281-284)	40-70% de B - 13 min.; 70-80% de B - 14 min.; 80% de B - 15 min.; 80-40% de B - 16 min.; 40% de B até 18 min.
Sf. 9 (117-129) Sf. 11 (146-150)	27-47,6% de B - 18 min.; 47,6-80% de B - 19 min.; 80% de B - 20 min.; 80-27% de B - 23 min.; 27% de B até 25 min.		

Os perfis cromatográficos mostrando os tempos de retenção, assim como os espectros de absorção no UV dos isolados encontram-se nas figuras 13-17. A porcentagem da área sob a curva referente às bandas cromatográficas dos compostos isolados, os espectros de varredura no ultravioleta (210 a 400 nm), foram os parâmetros para estimar a pureza dos compostos.

Tabela 6 - Procedência e quantidade obtida dos derivados galoilquínicos.

Compostos	Subfração de procedência	Massa (mg)
AGQ1	5 e 6	56,6
AGQ2	5	72,3
AGQ3	6 e 7	42,6
AGQ4	6, 8 e 9	64,3
AGQ5	7, 8 e 9	22
AGQ6	9, 10, 11 e 12	22,4
AGQ7	10	19,6
AGQ8	10	16,6
AGQ9	13 e 14	48,9
AGQ10	18, 19 e 20	13,1

Figura 13 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD dos compostos AGQ1 e AGQ2 isolados por cromatografia de exclusão em gel de *Sephadex* LH-20 a partir da fração *n*-butanólica. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min. Comprimento de onda: 280 nm.

Fonte: produção do autor.

Figura 14 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD dos compostos AGQ3 e AGQ4 isolados por cromatografia de exclusão em gel de *Sephadex LH-20* a partir da fração *n*-butanólica. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min. Comprimento de onda: 280 nm.

Fonte: produção do autor.

Figura 15 - Perfis obtidos por CLAE-DAD dos compostos AGQ5 e AGQ6 isolados por cromatografia de exclusão em gel de *Sephadex* LH-20 a partir da fração *n*-butanólica. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min. Comprimento de onda: 280 nm.

Fonte: produção do autor.

Figura 16 - Perfis obtidos por CLAE-DAD dos compostos AGQ7 e AGQ8 isolados por cromatografia de exclusão em gel de *Sephadex* LH-20 a partir da fração *n*-butanólica. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min. Comprimento de onda: 280 nm.

Fonte: produção do autor.

Figura 17 - Perfis obtidos por CLAE-DAD dos compostos AGQ9 e AGQ10 obtidos por cromatografia de exclusão em gel de *Sephadex* LH-20 a partir da fração *n*-butanólica. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min. Comprimento de onda: 280 nm.

Fonte: produção do autor.

4.1.4 Determinação das estruturas químicas dos flavonoides isolados por HSCCC.

4.1.4.1 Composto HSCCC1: Quercitrina.

Por meio da análise dos dados obtidos nos espectros de RMN (Apêndices 4-6) e da comparação com dados da literatura (Tabela 7) foi confirmado que o composto isolado com tempo de retenção de 8,9 min no método desenvolvido para a análise dos flavonoides, corresponde à quercitrina (quercetina-3-*O*- α -L-raminopiranosídeo), Figura 18.

Figura 18 - Estrutura química da quercitrina.

Fonte: produção do autor.

O espectro de massas (Apêndice 4), apresentou um íon molecular M^H com valor de 447,1 m/z , sugerindo um peso molecular de 448 g/mol para a molécula, que corresponde à fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_{11}$. No espectro de RMN ^1H (Apêndice 4), pode-se observar a presença de sinais relativos a hidrogênios aromáticos com deslocamentos químicos (δ) 6,20 (d ; $J = 1,8$; 1 H) e 6,39 (d ; $J = 1,8$; 1 H), correspondentes aos hidrogênios aromáticos (H-6 e H-8) do anel A, o acoplamento reflete o acoplamento *meta* entre eles. Os sinais δ 6,86 (H-5': d ; $J = 8,3$ Hz; 1H), δ 7,25 (H-6': dd ; $J = 1,9$ e 8,3 Hz; 1H) e δ 7,29 (H-2': d ; 1,9 Hz; 1H) pertencem aos hidrogênios *orto* e *meta* do anel B.

Deslocamentos similares têm sido encontrados na quercetina, flavonol não glicosilado precursor da quercitrina, com δ 6,91 (1H, d , $J = 8,3$ Hz, H-5'), 7,29 (1H, dd , $J = 2,2$, 8,3 Hz, H-6'), 7,30 (1H, d , $J = 2,2$ Hz, H-2') (Suárez et al. 2013). Os sinais de hidrogênio no anel B junto com os do espectro de ^{13}C confirmam a substituição hidroxílica em C-3' (δ 145,2) e C-4' (δ 148,4) (Apêndice 5).

Uma substituição no anel C do composto foi observada na posição C-3 que apresentou um deslocamento químico δ 134,2 no espectro de RMN de ^{13}C . A presença do ramnose foi confirmada com o sinal de δ 5,25 (H-1''), que neste caso se apresentou como um singlete largo.

A análise do mapa de contornos HMBC mostrou correlação entre o hidrogênio 1'' e o C-3, confirmando a substituição.

Tabela 7 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para quercitrina em DMSO- d_6 , comparados com a literatura.

Número do Carbono	$^1\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	$^{*1}\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	^{13}C $\delta(\text{ppm})$	$^{*13}\text{C}$ $\delta(\text{ppm})$	HMBC (H $\rightarrow$ C)
2	-	-	157,4	159,4	C-2'; C-6'
3	-	-	134,2	136,4	C-1''
4	-	-	177,7	179,8	-
5	-	-	161,3	163,4	C-6
6	6,20 (d ; $J = 1,8$ Hz; 1H)	6,20 (d ; $J = 2,1$ Hz; 1- H)	98,7	100,0	-
7	-	-	164,2	166,0	C-6; C-8
8	6,39 (d ; $J = 1,8$ Hz; 1H)	6,37 (d ; $J = 2,1$ Hz; 1- H)	93,6	94,9	C-6
9	-	-	157,3	158,7	C-8
10	-	-	104,1	106,0	C-8
1'	-	-	120,7	123,1	-
2'	7,29 (d ; $J = 1,9$ Hz; 1H)	7,34 (d ; $J = 2,1$ Hz; 1- H)	115,6	117,1	-
3'	-	-	145,2	146,5	C-2'; C-5'
4'	-	-	148,4	150,0	C-5'
5'	6,86 (d ; $J = 8,3$ Hz; 1H)	6,91 (d ; $J = 8,3$ Hz; 1- H)	115,4	116,5	C-6'
6'	7,25 (dd ; $J = 1,9$; 8,3 Hz; 1H)	7,31 (dd ; $J = 2,1$; 8,3 Hz; 1-H)	121,1	123,0	C-2'; C-5'
1''	5,25 (sl ; $J = 1,6$ Hz; 1H)	5,35 (d ; $J = 1,5$ Hz; 1- H)	101,8	103,7	-
2''	3,97 (sl ; 1H)	4,23 (dd ; $J = 1,5$; 3,4 Hz; 1-H)	70,6	72,0	C-1''
3''	3,5 (dl ; $J = 8,3$ Hz; 1H)	4,76 (dd ; $J = 3,4$; 9,4 Hz; 1-H)	70,3	72,2	C4''
4''	3,15 (m ; Hz; 1H)	3,35 (dd ; $J = 3,4$; 9,4 Hz; 1-H)	71,2	72,2	C-5''; C-6''
5''	3,21 (m ; 1H)	3,43 (dq ; $J = 6,1$; 9,4 Hz; 1-H)	70,5	73,4	C-6''
6''	0,81 (d ; $J = 6$ Hz; 3H)	0,94 (d ; $J = 6,1$ Hz; 3- H)	17,5	17,8	C-4''
OH (C-3')	9,37 (s , 1H)	-	-	-	-
OH (C-4')	9,74 (s , 1H)	-	-	-	-
OH (C-2'')	4,74 (s , 1H)	-	-	-	-
OH (C-3'')	4,97 (s , 1H)	-	-	-	-
OH (C-4'')	4,63 (s , 1H)	-	-	-	-

* Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (400 MHz; CD_3OD) e RMN de ^{13}C (100 MHz; CD_3OD) (Vechia et al. 2016).

Pelos dados experimentais e a sua comparação com a literatura foi confirmado que o açúcar corresponde à ramnose pela presença do grupo metílico com δ 0,81 (C-6''). A configuração da ligação heterosídica neste caso, é do tipo α e o açúcar ocorre na forma piranosídica.

4.1.4.2 Composto HSCCC2: Afzelina.

O segundo composto isolado através desta metodologia apresentou um íon molecular com valor de 431,1 (m/z) em modo negativo (Apêndice 7). A afzelina apresenta um peso molecular de 432,11 g/mol com fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_{10}$, assim o espectro de massas foi indicativo de que o composto se tratava desta substância (canferol-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo) (Figura 19). Sua identidade foi confirmada por meio da análise dos dados obtidos nos espectros de RMN (Apêndices 7-9) e da comparação com dados da literatura (Tabela 8).

Figura 19 - Estrutura química da afzelina.

Fonte: produção do autor.

Substituições hidroxílicas no anel A foram determinadas pela presença dos sinais em δ 6,21 (*d*; $J = 2,0$ Hz; 1H) e δ 6,41 (*d*; $J = 2$ Hz; 1H) relativas aos hidrogênios C-6 e C-8, que acoplam em posições *meta* como pode ser visto pela constante J (Tabela 8). A estrutura química da afzelina é caracterizada por não conter o grupamento -OH ligado ao C-3' do anel B, sendo que a monosubstituição *para* presente na posição 4' confere simetria aos hidrogênios das posições C-2' – C-4' e C-3' – C-5', evidente pela presença de dois dupletos com δ de 6,91 (*d*; 8,7 Hz) e 7,75 (*d*; 8,7 Hz), integrando cada um, para dois hidrogênios. Considerando o efeito protetor da hidroxila à posição *orto*, o sinal de deslocamento químico δ 6,91 é atribuído aos hidrogênios simétricos das posições 3' e 5', enquanto que o sinal em δ 7,75 é atribuído aos hidrogênios simétricos das posições 2' e 6'.

Tabela 8 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para afzelina em DMSO d_6 , comparados com a literatura.

Número do Carbono	$^1\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	$^{13}\text{C}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	^{13}C $\delta(\text{ppm})$	^{13}C $\delta(\text{ppm})$	HMBC (H $\rightarrow$ C)
2	-	-	156,9	158,6	-
3	-	-	134,2	136,1	C-1''
4	-	-	177,7	179,35	-
5	-	-	161,2	163,2	C-6
6	6,21 ($d; J = 2,0$ Hz; 1H)	6,19 ($d; J = 2,4$ Hz; 1H)	98,7	100,6	C-7
7	-	-	164,2	166,6	C-6; C-8
8	6,41 ($d; J = 2,0$ Hz; 1H)	6,36 ($d; J = 2,2$ Hz; 1H)	93,7	94,9	C-6
9	-	-	159,9	159,2	-
10	-	-	104,1	105,7	C-6; C-8
1'	-	-	122,9	122,6	C-2'
2' e 6'	7,75 ($d; J = 8,7$ Hz; 1H)	7,76 ($d; J = 8,7$ Hz; 2H)	130,5	131,9	C-3'
3' e 5'	6,91 ($d; J = 8,7$ Hz; 1H)	6,93 ($d; J = 8,8$ Hz; 2H)	115,3	116,5	-
4'	-	-	157,2	161,6	C-3'
1''	5,28 ($dl; J = 1,1$ Hz; 1H)	5,36 ($d; J = 2,2$ Hz 1H)	101,7	103,5	-
2''	3,98 ($dl; J = 1,2$ Hz; 1H)	4,21 ($dd, J = 1,7; 3,42$ Hz 1H)	70,0	72,09	C-1''
3''	3,46 ($dd; J = 9,1; 3,1$ 1H)	3,71 ($m, 1\text{H}$)	70,3	72,04	C-2''
4''	3,06 ($m, 1\text{H}$)	3,60 ($m, 1\text{H}$)	70,6	73,1	C-3''; C-6''
5''	3,13 ($m, 1\text{H}$)	3,47 ($m, 1\text{H}$)	71,1	71,9	C-4''; C-6''
6''	0,79 ($d; J = 6$ Hz; 3H)	0,91 ($d; J = 5,6$ Hz; 3H)	17,4	17,6	C-5''
OH (C-2'')	4,75 ($s, 1\text{H}$)	-	-	-	-
OH (C-3'')	3,46 ($s, 1\text{H}$)	-	-	-	-
OH (C-4'')	4,98 ($s, 1\text{H}$)	-	-	-	-

* Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (400 MHz; CD_3OD) e RMN de ^{13}C (100 MHz; CD_3OD) (Lee et al. 2014).

O deslocamento químico acentuado em C-2 (156,4) confirmou *O*-hidroxilação em C-3; no espectro de HMBC o C-3 (134,2) se encontra correlacionado com o hidrogênio em δ 5,28 do carbono 1''. Do mesmo modo, os sinais com deslocamento químico na região de 3 no espectro de RMN ^1H e os carbonos por volta dos 70 ppm detectados no espectro de ^{13}C , permitiram identificar a unidade de açúcar, confirmada como ramnose pela presença de um grupamento metílico em δ 0,79 ($d, 6$ Hz; 3H), com um deslocamento do carbono C-6'' de 17,4

4.1.5 Determinação das estruturas químicas dos derivados galoilquínicos isolados.

Os derivados galoliquínicos isolados a partir do fracionamento por exclusão em gel, são compostos caracterizados pela presença de um núcleo de ácido quínico com grupamentos

hidroxílicos nas posições C-1, C-3, C-4 e C-5, que podem ser esterificados por uma ou mais unidades galoil. Esta estrutura confere uma absorção em UV com λ_{max} de 220 e 275 nm típica em compostos desta classe (Nogueira et al. 2015). Na espécie *C. langsdorffii* de maneira particular, as unidades galoil podem-se apresentar metiladas na posição 3.

Diversidade de derivados galoilquínicos podem ser encontrados, todos eles com grande similaridade estrutural. Porém, os compostos galoilquínicos presentes na *C. langsdorffii*, têm sido discutidos por primeira vez nos trabalhos de Nogueira et al. (2015) e Motta et al. (2017), autores que apesar da dificuldade na elucidação estrutural pela grande similaridade entre eles, conseguiram apresentar dados completos de 16 compostos isolados desta espécie.

A seguir, são apresentadas as estruturas químicas dos compostos isolados. Os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos mostrados nas Tabelas 8-17 foram atribuídos em comparação com os dados da literatura, cujas tabelas também apresentam as correlações observadas nos mapas de contornos de HMBC. Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT-135, bem como os mapas de contorno de HSQC e HMBC dos derivados galoilquínicos isolados encontram-se nos Apêndices 10-39.

O ácido quínico (Figura 1) com presença de um carbono não hidrogenado (C-1), dois carbonos metilênicos similares (C-2 e C-6), três carbonos oximetínicos (C-3, C-4 e C-5) e um carbono carboxílico desblindado (C-7) foi observado na maioria de espectros de RMN de ^{13}C . Nos casos dos denominados AGQ1, AGQ3, AGQ5, AGQ9 e AGQ10, o carbono C-7 não foi observado no espectro de ^{13}C . Porém, com o deslocamento do C-1, correlações observadas entre os hidrogênios dos C-2 e C-6 no mapa de contornos do HMBC e a determinação da massa molecular dos compostos, foi possível determinar que estas estruturas correspondiam aos compostos encontrados na literatura.

A configuração relativa dos carbonos ligados a hidrogênios metilênicos e metínicos do ácido quínico foi determinada de acordo com a multiplicidade e constantes de acoplamento obtidas pelo espectro de RMN de ^1H e de DEPT. No AGQ1, AGQ3, AGQ9 e AGQ10 apresentou-se a particularidade de não aparecer um ou os dois carbonos metilênicos no DEPT, porém o mapa de contornos HSQC observou-se correlação de hidrogênios nos carbonos faltantes no DEPT.

A presença de unidades de ácido gálico foi determinada pelos sinais dos carbonos com deslocamentos químicos entre 100 e 170 ppm, bem como pelos sinais de hidrogênios com acoplamento *meta* das posições 2' e 6' (ou 2'' e 6'') no caso dos compostos com a metoxilação na posição 3 (3', 3'' ou 3'') das unidades galoil presentes (todos os isolados com exceção do AGQ6). Os grupos metílicos nas unidades galoil, quando presentes, foram confirmados pela

presença de simpletos no espectro de RMN de ^1H com deslocamento aproximado de 3,5 ppm, bem como pelas correlações no mapa de contornos de HMBC entre os hidrogênios e o C-3 da unidade galoil à qual o mesmo estivesse diretamente ligado.

A comparação com a literatura e as correlações observadas no mapa de contornos de HMBC entre os hidrogênios metínicos do ácido quínico e os carbonos carbonílicos das unidades de ácido gálico permitiram determinar a posição e o grau da substituição.

4.1.5.1 AGQ1: Ácido 3''-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico; $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$; 510 g/mol.

Tabela 9 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ1 em CD_3OD , comparados com a literatura.

(Continua)					
Número do Carbono	$^1\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	$^{*1}\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	^{13}C $\delta(\text{ppm})$	$^{*13}\text{C}$ $\delta(\text{ppm})$	HMBC ($\text{H} \rightarrow \text{C}$)
Ácido quínico					
1	-	-	75,3	75,2	C-2; C-6
2	2,19 (m ; 1H_{ax}) 2,41 (dd ; $J = 3,3$; 15,0 Hz; 1H_{eq})	2,20 (dd ; $J = 6,8$; 15,0 Hz; 1H_{ax}) 2,42 (dd ; $J = 3,1$; 15,0 Hz; 1H_{eq})	37,2	37,1	-
3	5,72 (q ; $J = 3,5$ Hz; 1H_{eq})	5,73 (ddd ; $J = 3,1$; 3,3; 6,8 Hz; 1H_{eq})	70,4	70,4	C-2; C-4
4	5,14 (dd ; $J = 3,4$; 9,1 Hz; 1H_{ax})	5,15 (dd ; $J = 3,3$; 9,3 Hz; 1H_{ax})	76,9	76,7	-
5	4,50 (td ; $J = 4,2$; 9,9 Hz; 1H_{ax})	4,52 (ddd ; $J = 4,2$; 9,3; 9,7 Hz; 1H_{ax})	66,0	65,9	C-4; C-6
6	2,11 (dd ; $J = 10,6$; 13,3 Hz; 1H_{ax}) 2,27 (d ; $J = 12,5$ Hz; 1H_{eq})	2,12 (dd ; $J = 9,7$; 11,1 Hz; 1H_{ax}) 2,29 (dd ; $J = 4,2$; 11,1 Hz; 1H_{eq})	42,2	42,1	-
-COOH (7)	-	-	-	178,1	-
Ácido gálico					
1'	-	-	121,7	121,6	C-2'; C-6'
2' e 6'	7,12 (s ; 2H)	7,14 (s ; 2H)	110,4	110,4	C-6'

Tabela 9 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ1 em CD_3OD , comparados com a literatura.

(Conclusão)

Número do Carbono	$^1\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	$^{*1}\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	^{13}C $\delta(\text{ppm})$	$^{*13}\text{C}$ $\delta(\text{ppm})$	HMBC (H $\rightarrow$ C)
3' e 5'	-	-	146,5	146,0	C-2'
4'	-	-	139,8	139,8	C-2'
-COO- (7')	-	-	167,7	167,7	C-3; C-2'
1''	-	-	121,7	121,3	C-2''
2''	6,98 (d ; $J = 1,8$ Hz; 1H)	6,97 (d ; $J = 1,5$ Hz; 1H)	106,1	106,1	C-6''
3''	-	-	148,8	148,8	C-2''
4''	-	-	140,5	140,4	C-2''
5''	-	-	146,1	146,4	C-6''
6''	7,15 (d ; $J = 1,9$ Hz; 1H)	7,15 (d ; $J = 1,5$ Hz; 1H)	112,0	112,0	C-2''
-COO- (7'')	-	-	167,6	167,6	C-4; C-6''
-CH ₃ (8'')	3,53 (s ; 3H)	3,52 (s ; 3H)	56,2	56,1	-

* Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (500 MHz; $\text{DMSO } d_6$) e RMN de ^{13}C (125 MHz; CD_3OD) (Motta et al. 2017).

4.1.5.2 AGQ2. Ácido 3',3''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico; $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{14}$; 524 g/mol.

Tabela 10 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ2 em CD_3OD , comparados com a literatura.

(Continua)

Número do Carbono	$^1\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	$^{*1}\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	^{13}C $\delta(\text{ppm})$	$^{*13}\text{C}$ $\delta(\text{ppm})$	HMBC (H $\rightarrow$ C)
Ácido quínico					
1	-	-	75,2	75,2	C-2; C-6; C-6
2	2,19 (ddd ; $J = 2,4$; 4,1; 14,9 Hz; 1H _{ax})	2,18 (dd ; $J = 7,4$; 14,8 Hz; 1H _{ax})	37,1	37,1	-
3	2,43 (dd ; $J = 3,7$; 14,9 1H _{eq})	2,43 (dd ; $J = 3,7$; 14,8 Hz; 1H _{eq})	70,4	70,4	-
4	5,75 (q ; $J = 3,7$ Hz; 1H _{eq})	5,77 (ddd ; $J = 3,0$; 3,7; 7,4 Hz; 1H _{eq})	76,8	76,7	C-3; C-6
	5,15 (dd ; $J = 3,4$; 9,5; 9,8 Hz; 1H _{ax})	5,16 (dd ; $J = 3,0$; 8,9 Hz; 1H _{ax})			

Tabela 10 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ2 em CD_3OD , comparados com a literatura.

(Conclusão)					
Número do Carbono	$^1\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	$^{13}\text{C}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	^{13}C $\delta(\text{ppm})$	^{13}C $\delta(\text{ppm})$	HMBC (H $\rightarrow$ C)
5	4,48 (ddd; $J = 4,3; 9,7;$ 9,8 Hz; 1H_{ax})	4,48 (ddd; $J = 4,2; 8,9;$ 9,5 Hz; 1H_{ax})	66,0	66,0	C3
6	2,14 (dd; $J = 10,3; 13,5$ Hz; 1H_{ax}) 2,27 (m; 1H_{eq})	2,14 (dd; $J = 9,5; 12,3$ Hz; 1H_{ax}) 2,28 (dd; $J = 4,2; 12,3$ Hz; 1H_{eq})	42,0	42,0	-
-COOH (7)	-	-	178,1	178,2	C-2
Ácido gálico					
1'	-	-	121,7	121,6	C-2'
2'	7,21 (d; $J = 1,8$ Hz; 1H)	7,22 (d; $J = 1,8$ Hz; 1H)	106,5	106,4	C-6'
3'	-	-	149,0	149,0	C-8'
4'	-	-	140,6	140,6	C-2'
5'	-	-	146,3	146,2	C-6'
6'	7,24 (d; $J = 1,8$ Hz; 1H)	7,24 (d; $J = 1,8$ Hz; 1H)	112,2	112,1	C-2'
-COO- (7')	-	-	167,5	167,4	C-3; C-2'; C-6'
-CH ₃ (8')	3,81 (s; 3H)	3,83 (s; 3H)	56,6	56,5	-
1''	-	-	121,4	121,3	C-2'
2''	6,99 (d; $J = 1,8$ Hz; 1H)	6,83 (d; $J = 1,9$ Hz; 1H)	106,3	106,1	C-6'
3''	-	-	148,9	148,8	C-2'; C8'
4''	-	-	140,6	140,5	C-2'; C-6'- C8'
5''	-	-	146,2	146,1	C-6'
6''	7,15 (d; $J = 1,9$ Hz; 1H)	6,99 (d; $J = 1,9$ Hz; 1H)	112,2	112,0	C-2'
-COO- (7'')	-	-	167,6	167,5	C-1'; C-6'; C-4
-CH ₃ (8'')	3,56 (s; 3H)	3,56 (s; 3H)	56,3	56,2	-

* Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (500 MHz; $\text{DMSO } d_6$) e RMN de ^{13}C (125 MHz; CD_3OD) (Motta et al. 2017).

4.1.5.3 AGQ3: Ácido 3',3''-di-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico; $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{14}$; 524 g/mol.

Tabela 11 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ3 em CD_3OD , comparados com a literatura.

Número do Carbono	$^1\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	$^{*1}\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	^{13}C $\delta(\text{ppm})$	$^{*13}\text{C}$ $\delta(\text{ppm})$	HMBC (H $\rightarrow$ C)
Ácido quínico					
1	-	-	74,7	74,6	C-2; C-6
2	2,20 (<i>m</i> ; 1H _{ax}) 2,39 (<i>dd</i> ; $J = 3,6; 13,7$ Hz 1H _{eq})	2,35 (<i>dd</i> ; $J = 6,8; 13,8$ Hz; 1H _{ax}) 2,28 (<i>dd</i> ; $J = 3,0; 13,8$ Hz; 1H _{eq})	37,5	37,3	-
3	5,52 (<i>m</i> ; $J = 3,5$ Hz; 1H _{eq})	5,50 (<i>ddd</i> ; $J = 2,9; 3,0;$ 6,8 Hz; 1H _{eq})	72,5	72,5	C-2
4	4,08 (<i>dd</i> ; $J = 3,1; 7,1$ Hz; 1H _{ax})	4,08 (<i>dd</i> ; $J = 3,0; 7,0$ Hz; 1H _{ax})	70,5	70,3	C-6
5	5,59 (<i>dt</i> ; $J = 3,5; 7,2$ Hz; 1H _{ax})	5,59 (<i>ddd</i> ; $J = 3,2; 7,0;$ 7,8 Hz; 1H _{ax})	72,8	72,6	C-6
6	2,25 (<i>dd</i> ; $J = 4,4; 14,9$ Hz; 1H _{ax}) 2,35 (<i>m</i> ; 1H _{eq})	2,23 (<i>dd</i> ; $J = 7,8; 13,6$ Hz; 1H _{ax}) 2,40 (<i>dd</i> ; $J = 3,2; 13,6$ Hz; 1H _{eq})	35,9	35,8	-
-COOH (7)	-	-	177,4	177,2	C-2
Ácido gálico					
1'	-	-	121,5	121,3	-
2'	7,23 (<i>d</i> ; $J = 1,8$ Hz; 1H)	7,21 (<i>d</i> ; $J = 1,5$ Hz; 1H)	106,4	106,3	-
3'	-	-	149,1	149,1	C-2'
4'	-	-	140,7	140,6	-
5'	-	-	146,2	146,1	C-6'
6'	7,21 (<i>d</i> ; $J = 1,8$ Hz; 1H)	7,20 (<i>d</i> ; $J = 1,5$ Hz; 1H)	112,0	112,0	-
-COO- (7')	-	-	167,4	167,3	C-2'; C-6'
-CH ₃ (8')	3,90 (<i>s</i> ; 6H)	3,90 (<i>s</i> ; 6H)	56,7	56,7	-
1''	-	-	121,9	121,8	-
2''	7,32 (<i>d</i> ; $J = 1,8$ Hz; 1H)	7,31 (<i>d</i> ; $J = 1,6$ Hz; 1H)	106,6	106,4	-
3''	-	-	149,0	149,0	C-2''; C-8''
4''	-	-	140,6	140,5	C-2''
5''	-	-	146,1	146,1	C-6''
6''	7,29 (<i>d</i> ; $J = 1,9$ Hz; 1H)	7,28 (<i>d</i> ; $J = 1,6$ Hz; 1H)	112,2	112,2	-
-COO- (7'')	-	-	167,9	167,8	C-5; C-2''; C-6''
-CH ₃ (8'')	3,92 (<i>s</i> ; 3H)	3,90 (<i>s</i> ; 3H)	56,7	56,6	-

* Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (500 MHz; DMSO d_6) e RMN de ^{13}C (125 MHz; CD_3OD) (Motta et al. 2017).

4.1.5.4 AGQ4: Ácido 3',3''-di-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico; C₂₃H₂₄O₁₄; 524 g/mol.

Tabela 12 - Dados dos espectros de RMN de ¹³C (125 MHz), ¹H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ4 em CD₃OD, comparados com a literatura.

(Continua)

Número do Carbono	¹ Hδ(ppm); multiplicidade <i>J</i> (Hz); integral	¹ Hδ(ppm); multiplicidade <i>J</i> (Hz); integral	¹³ C δ(ppm)	¹³ C δ(ppm)	HMBC (H→C)
Ácido quínico					
1	-	-	76,2	76,2	C-2; C-6
2	2,15 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 4,9; 14,1 Hz 1H _{ax}) 2,35 (<i>m</i> ; 1H _{eq})	2,15 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 5,4; 14,0 Hz; 1H _{ax}) 2,36 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 2,7; 14,0 Hz; 1H _{eq})	38,5	38,5	-
3	4,47 (<i>m</i> ; 1H _{eq})	4,47 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> = 2,7; 3,1; 5,4 Hz; 1H _{eq})	69,4	69,3	C-2
4	5,24 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 3,0; 8,9 Hz; 1H _{ax})	5,24 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 3,1; 8,6 Hz; 1H _{ax})	76,3	76,0	C-2
5	5,76 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 8,7; 14,2 Hz; 1H _{ax})	5,75 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> = 6,1; 8,2; 8,6 Hz; 1H _{ax})	69,5	69,4	C-6
6	2,35 (<i>m</i> ; 2H)	2,30 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 8,2; 14,5 Hz; 1H _{ax}) 2,40 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 6,1; 14,5 Hz; 1H _{eq})	39,4	39,3	-
-COOH (7)	-	-	177,0	176,8	C-2
Ácido gálico					
1'	-	-		121,1	C-6'
2'	7,17 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 1,8 Hz; 1H)	7,17 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 1,9 Hz; 1H)	106,5	106,3	C-6'
3'	-	-		149,0	C-2'; C-8'
4'	-	-		140,7	C-6'
5'	-	-		146,2	C-6'
6'	7,20 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 1,9 Hz; 1H)	7,20 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 1,9 Hz; 1H)	112,1	112,1	-
-COO- (7')	-	-		167,7	C-4; C-2'; C-6'
-CH ₃ (8' e 8'')	3,81 (<i>s</i> ; 6H)	3,81 (<i>s</i> ; 6H)	56,6	56,5	-
1''	-	-		121,1	C-6''
2''	7,08 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 1,8 Hz; 1H)	7,08 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 1,8 Hz; 1H)	106,3	106,1	C-6''

Tabela 12 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ4 em CD_3OD , comparados com a literatura.

(Conclusão)					
Número do Carbono	$^1\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	$^{*1}\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	^{13}C $\delta(\text{ppm})$	$^{*13}\text{C}$ $\delta(\text{ppm})$	HMBC (H $\rightarrow$ C)
3''	-	-		149,0	C-2''; C-8''
4''	-	-		140,7	C-6''
5''	-	-		146,2	C-6''
6''	7,11 (d ; $J = 1,9$ Hz; 1H)	7,11 (d ; $J = 1,8$ Hz; 1H)	111,9	119,9	-
-COO- (7'')	-	-	167,3	167,3	C-5; C-2''; C-6''

* Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (500 MHz; $\text{DMSO } d_6$) e RMN de ^{13}C (125 MHz; CD_3OD) (Motta et al. 2017).

4.1.5.5 AGQ5: Ácido 3'-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico; $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$; 510 g/mol.

Tabela 13 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ5 em CD_3OD , comparados com a literatura.

(Continua)					
Número do Carbono	$^1\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	$^{*1}\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	^{13}C $\delta(\text{ppm})$	$^{*13}\text{C}$ $\delta(\text{ppm})$	HMBC (H $\rightarrow$ C)
Ácido quínico					
1	-	-	75,0	75,0	C-2
2	2,19 (m ; 1H _{ax}) 2,42 (dd ; $J = 2,2$; 13,9 Hz; 1H _{eq})	2,19 (dd ; $J = 5,3$; 14,4 Hz; 1H _{ax}) 2,44 (dd ; $J = 3,5$; 14,4 Hz; 1H _{eq})	37,1	36,9	-
3	5,74 (m ; 1H _{eq})	5,75 (ddd ; $J = 3,2$; 3,5; 5,3 Hz; 1H _{eq})	70,3	70,2	C-2
4	5,16 (dd ; $J = 2,9$; 7,9 Hz; 1H _{ax})	5,15 (dd ; $J = 3,2$; 8,2 Hz; 1H _{ax})	75,9	76,0	-
5	4,39 (dd ; $J = 7,7$; 12,2 Hz; 1H _{ax})	4,41 (ddd ; $J = 5,3$; 7,5; 8,2 Hz; 1H _{ax})	66,5	66,2	C-4; C-6
6	2,19 (m ; 2H)	2,18 (m ; 2H)	41,4	41,6	-
-COOH (7)	-	-	178,2	178,0	C-1

Tabela 13 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ5 em CD_3OD , comparados com a literatura.

(Conclusão)					
Número do Carbono	$^1\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	$^{*1}\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	^{13}C $\delta(\text{ppm})$	$^{*13}\text{C}$ $\delta(\text{ppm})$	HMBC (H $\rightarrow$ C)
Ácido gálico					
1'	-	-	121,7	121,6	C-2'; C-6'
2'	7,15 (<i>d</i> ; $J = 1,2$ Hz; 1H)	7,16 (<i>d</i> ; $J = 1,8$ Hz; 1H)	106,5	106,3	C-6'
3'	-	-	149,0	148,9	C-8'
4'	-	-	140,6	140,5	C-2'; C-6'
5'	-	-	146,1	146,1	C-6'
6'	7,19 (<i>d</i> ; $J = 1,7$ Hz; 1H)	7,19 (<i>d</i> ; $J = 1,8$ Hz; 1H)	112,2	112,1	C-2'
-COO- (7')	-	-	167,4	167,4	C-5; C-2'; C-6'
-CH ₃ (8')	3,76 (<i>s</i> ; 3H)	3,77 (<i>s</i> ; 3H)	56,5	56,4	-
1''	-	-	121,5	121,3	C-2''; C-6''
2'' e 6''	7,04 (<i>s</i> ; 2H)	7,03 (<i>s</i> ; 2H)	110,4	110,3	-
3'' e 5''	-	-	146,4	146,3	-
4''	-	-	139,9	139,8	C-2''; C-6''
-COO- (7'')	-	-	167,8	167,8	C-4; C-2''; C-6''

* Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (500 MHz; $\text{DMSO } d_6$) e RMN de ^{13}C (125 MHz; CD_3OD) (Motta et al. 2017).

4.1.5.6 AGQ6: Ácido 3,5-di-*O*-galoilquínico; $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{14}$; 496 g/mol.

Tabela 14 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ6 em CD_3OD , comparados com a literatura.

Número do Carbono	$^1\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	$^{*1}\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	^{13}C $\delta(\text{ppm})$	$^{*13}\text{C}$ $\delta(\text{ppm})$	HMBC (H $\rightarrow$ C)
Ácido quínico					
1	-	-	74,7	74,6	C-2; C-6
		2,33 (<i>dd</i> ; $J = 7,1; 14,4$ Hz; 1H_{ax})			
2	2,35 (<i>m</i> ; 1H) 2,22 (<i>m</i> ; 1H)	2,25 (<i>dd</i> ; $J = 3,3; 14,4$ Hz; 1H_{eq})	37,6	37,4	-
3	5,47 (<i>ddl</i> ; $J = 6,7; 10,4$ Hz; 1H_{eq})	5,47 (<i>ddd</i> ; $J = 3,1; 3,3; 7,1$ Hz; 1H_{eq})	72,5	72,5	C-2; C-4
4	4,05 (<i>dd</i> ; $J = 3,1; 7,3$ Hz; 1H_{ax})	4,06 (<i>dd</i> ; $J = 3,1; 7,2$ Hz; 1H_{ax})	70,7	70,4	C-6
5	5,53 (<i>dt</i> ; $J = 3,6; 7,2$ Hz; 1H_{ax})	5,54 (<i>ddd</i> ; $J = 3,6; 7,2; 7,6$ Hz; 1H_{ax})	72,8	72,6	C-6
		2,20 (<i>dd</i> ; $J = 7,6; 13,6; 1\text{H}_{\text{ax}}$)			
6	2,35 (<i>m</i> ; 1H) 2,22 (<i>m</i> ; 1H)	2,38 (<i>dd</i> ; $J = 3,6; 13,6$ Hz; 1H_{eq})	36,0	35,8	C-2
-COOH (7)	-	-	177,5	177,4	C-2
Ácido gálico					
1'	-	-	121,6	121,4	C-2'; C-6'
2' e 6'	7,08 (<i>s</i> ; 2H)	7,08 (<i>s</i> ; 2H)	110,4	110,2	C-3'
3' e 5'	-	-	146,4	146,4	C-2'
4'	-	-	139,9	139,9	C-2'
-COO- (7')	-	-	167,6	167,5	C-3; C-2'
1''	-	-	122,0	121,8	C-2''
2'' e 6''	7,16 (<i>s</i> ; 2H)	7,17 (<i>s</i> ; 2H)	110,5	110,3	C-6''
3'' e 5''	-	-	146,4	146,3	-
4''	-	-	139,7	139,7	C-2''
-COO- (7'')	-	-	168,1	168,0	C-2''

* Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (500 MHz; $\text{DMSO } d_6$) e RMN de ^{13}C (125 MHz; CD_3OD) (Motta et al. 2017).

4.1.5.7 AGQ7: Ácido 3'-O-metil-3,5-di-O-galoilquínico; C₂₂H₂₂O₁₄; 510,1 g/mol.

Tabela 15 - Dados dos espectros de RMN de ¹³C (125 MHz), ¹H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ7 em CD₃OD, comparados com a literatura.

Número do Carbono	¹ Hδ(ppm); multiplicidade <i>J</i> (Hz); integral	¹ Hδ(ppm); multiplicidade <i>J</i> (Hz); integral	¹³ C δ(ppm)	* ¹³ C δ(ppm)	HMBC (H→C)
Ácido quínico					
1	-	-	76,1	76,0	C-2
2	2,14 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 5,0; 14,2 Hz; 1H _{ax})	2,14 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 5,5; 14,2 Hz; 1H _{ax})	38,5	38,4	-
3	2,31 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 7,3 Hz; 1H _{eq})	2,36 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 3,1; 14,2 Hz; 1H _{eq})	69,2	69,1	C-2
4	4,48 (<i>m</i> ; 1H _{eq})	4,49 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> = 2,9; 3,1; 5,3 Hz; 1H _{eq})	76,5	76,4	C-3
5	5,18 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 3,0; 8,9 Hz; 1H _{ax})	5,18 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 2,9; 8,9 Hz; 1H _{ax})	69,0	69,0	C-4; C-6
6	5,78 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 7,1; 15,6 Hz; 1H _{ax})	5,78 (<i>m</i> ; 1H _{ax})	39,4	39,3	-
7	2,31 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 7,3 Hz; 1H _{eq})	2,29 – 2,33 (<i>m</i> ; 2H)	176,9	176,9	C-2; C-6
Ácido gálico					
1'	-	-	121,2	121,1	C-6'
2'	7,16 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 1,9 Hz; 1H)	7,16 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 1,9 Hz; 1H)	106,5	106,3	C-6'
3'	-	-	149,0	148,9	C-2'; C-8'
4'	-	-	140,7	140,7	C-2'
5'	-	-	146,1	146,1	C-6'
6'	7,18 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 1,9 Hz; 1H)	7,18 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 1,9 Hz; 1H)	112,1	112,0	C-2'
7'	-	-	167,8	167,7	C-4; C-2'; C-6'
8'	-	-	56,6	56,5	-
1''	3,80 (<i>s</i> ; 3H)	3,80 (<i>s</i> ; 3H)	121,2	121,1	C-2''; C-6''
2'' e 6''	-	-	110,2	110,1	C-6''
3'' e 5''	6,99 (<i>s</i> ; 2H)	6,99 (<i>s</i> ; 2H)	146,4	146,4	C-2''
4''	-	-	139,9	139,3	C-2''
7''	-	-	167,4	167,4	C-2''; C-6''

* Deslocamentos químicos de RMN de ¹H (500 MHz; DMSO d₆) e RMN de ¹³C (125 MHz; CD₃OD) (Motta et al. 2017).

4.1.5.8 AGQ8: Ácido 3'''-O-metil-4,5-di-O-galoilquínico; C₂₂H₂₂O₁₄; 510,1 g/mol.

Tabela 16 - Dados dos espectros de RMN de ¹³C (125 MHz), ¹H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ8 em CD₃OD, comparados com a literatura.

(Continua)

Número do Carbono	¹ Hδ(ppm); multiplicidade <i>J</i> (Hz); integral	¹ Hδ(ppm); multiplicidade <i>J</i> (Hz); integral	¹³ C δ(ppm)	* ¹³ C δ(ppm)	HMBC (H→C)
Ácido quínico					
1	-	-	76,0	75,8	C-2; C-6
2	2,13 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 5,9; 14 Hz; 1H _{ax}) 2,33 (<i>m</i> ; 1H _{eq})	2,13 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 5,7; 14,0 Hz; 1H _{ax}) 2,30 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 2,8; 14,0 Hz; 1H _{eq})	38,6	38,5	-
3	4,44 (<i>dt</i> ; <i>J</i> = 3,2; 6,1 Hz; 1H _{eq})	4,44 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> = 2,8; 3,0; 5,7 Hz; 1H _{eq})	69,3	69,0	C-2
4	5,27 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 3,0; 8,5 Hz; 1H _{ax})	5,27 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 3,0; 7,8 Hz; 1H _{ax})	75,6	75,2	C-3
5	5,66 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 7,9; 13,7 Hz; 1H _{ax})	5,66 (<i>m</i> ; 1H _{ax})	69,7	69,7	C-4; C-6
6	2,37 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 3,2; 14,1 Hz; 1H _{ax}) 2,33 (<i>m</i> ; 1H _{eq})	2,30 – 2,40 (<i>m</i> ; 2H)	39,2	38,9	-
-COOH (7)	-	-	176,8	176,8	C-2; C-4; C-6
Ácido gálico					
1'	-	-	121,2	121,0	C-2'; C-6'
2' e 6'	7,09 (<i>s</i> ; 2H)	7,09 (<i>s</i> ; 2H)	110,4	110,3	-
3' e 5'	-	-	146,4	146,4	C-2'
4'	-	-	140,0	139,9	C-2'
-COO- (7')	-	-	167,8	167,7	C-4; C-2'; C-6'
1''	-	-	121,3	121,1	-
2''	7,07 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 1,9 Hz; 1H)	7,07 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 1,8; 1H)	106,4	106,0	C-6''
3''	-	-	149,1	149,0	C-2''
4''	-	-	140,7	140,6	C-6''
5''	-	-	146,2	146,1	-
6''	7,09 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 1,9; 1H)	7,10 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 1,8; 1H)	112,0	111,8	C-2''

Tabela 16 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ8 em CD_3OD , comparados com a literatura.

(Conclusão)					
Número do Carbono	$^1\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	$^{*1}\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	^{13}C $\delta(\text{ppm})$	$^{*13}\text{C}$ $\delta(\text{ppm})$	HMBC ($\text{H}\rightarrow\text{C}$)
$-\text{COO}-$ ($7''$)	-	-	167,4	167,3	-
$-\text{CH}_3$ ($8''$)	3,81 (s ; 3H)	3,81 (s ; 3H)	56,7	56,5	-

* Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (500 MHz; $\text{DMSO } d_6$) e RMN de ^{13}C (125 MHz; CD_3OD) (Motta et al. 2017).

4.1.5.9 AGQ9: Ácido 3',3'',3'''-tri-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico; $\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{O}_{18}$; 690,1 g/mol.

Tabela 17 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ9 em CD_3OD , comparados com a literatura.

(Continua)					
Número do Carbono	$^1\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	$^{*1}\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	^{13}C $\delta(\text{ppm})$	$^{*13}\text{C}$ $\delta(\text{ppm})$	HMBC ($\text{H}\rightarrow\text{C}$)
Ácido quínico					
1	-	-	74,3	74,9	-
2	2,40 (m , 2H)	2,28 (dd ; $J = 5,0$; 14,5 Hz; 1H_{ax}) 2,56 (dd ; $J = 3,4$; 14,5 Hz; 1H_{eq})	36,2	36,8	-
3	5,83 (sl ; 1H_{eq})	5,85 (dd ; $J = 3,2$; 8,4 Hz; 1H_{eq})	71,2	70,4	-
4	5,50 (d ; $J = 7,2$ Hz; 1H_{ax})	5,52 (dd ; $J = 3,2$; 8,4 Hz; 1H_{ax})	74,3	73,3	-
5	5,95 (d ; $J = 2,8$ Hz; 1H_{ax})	5,88 (m ; 1H_{ax})	70,0	69,7	-
6	2,40 (m ; 2H)	2,42 (m ; 2H)	39,9	38,8	-
$-\text{COOH}$ (7)	-	-	-	177,3	-

Tabela 17 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ9 em CD_3OD , comparados com a literatura.

(Conclusão)

Número do Carbono	$^1\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	$^{*1}\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	^{13}C $\delta(\text{ppm})$	$^{*13}\text{C}$ $\delta(\text{ppm})$	HMBC ($\text{H}\rightarrow\text{C}$)
Ácido gálico					
1'	-	-	121,7	121,4	-
2'	7,31 (<i>sl</i> ; 1H)	7,26 (<i>sl</i> ; 1H)	106,8	106,4	-
3'	-	-	149,1	149,0	C-2'; C-8'
4'	-	-	140,3	140,7	C-2'
5'	-	-	146,3	146,3	-
6'	7,31 (<i>sl</i> ; 1H)	7,27 (<i>sl</i> ; 1H)	112,3	112,1	-
-COO- (7')	-	-	167,6	167,4	C-6'
-CH ₃ (8')	3,56 (<i>s</i> ; 3H)	3,83 (<i>s</i> ; 3H)	56,7	56,5	-
1''	-	-	121,0	120,7	C-2''
2''	6,93 (<i>sl</i> ; 1H)	6,95 (<i>sl</i> ; 1H)	106,4	106,2	-
3''	-	-	148,9	148,9	C-2''; C-8''
4''	-	-	140,7	140,7	C-2''
5''	-	-	146,2	146,2	C-6''
6''	7,08 (<i>sl</i> ; 1H)	7,10 (<i>sl</i> ; 1H)	112,1	112,0	-
-COO- (7'')	-	-	167,2	167,0	C-2''
-CH ₃ (8'')	3,54 (<i>s</i> ; 3H)	3,58 (<i>s</i> ; 3H)	56,3	56,2	-
1'''	-	-	121,2	121,0	C-2'''
2'''	7,08 (<i>sl</i> ; 1H)	7,10 (<i>sl</i> ; 1H)	106,5	106,1	-
3'''	-	-	148,9	149,0	C-2'''; C-8'''
4'''	-	-	140,7	140,7	C-2'''
5'''	-	-	146,2	146,2	C-6'''
6'''	7,11 (<i>sl</i> ; 1H)	7,12 (<i>sl</i> ; 1H)	112,1	111,9	-
-COO- (7''')	-	-	167,5	167,2	C-6'''
-CH ₃ (8''')	3,81 (<i>s</i> ; 3H)	3,84 (<i>s</i> ; 3H)	56,7	56,6	-

* Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (500 MHz; $\text{DMSO}-d_6$) e RMN de ^{13}C (125 MHz; CD_3OD) (Motta et al. 2017).

4.1.5.10 AGQ10: Ácido 3''-O-metil-3,4,5-tri-O-galoilquínico; C₂₉H₂₆O₁₈; 662,1 g/mol.

Tabela 18 - Dados dos espectros de RMN de ¹³C (125 MHz), ¹H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ10 em CD₃OD, comparados com a literatura.

(Continua)

Número do Carbono	¹ Hδ(ppm); multiplicidade <i>J</i> (Hz); integral	¹ Hδ(ppm); multiplicidade <i>J</i> (Hz); integral	¹³ C δ(ppm)	* ¹³ C δ(ppm)	HMBC (H→C)
Ácido quínico					
1	-	-	74,6	74,8	C-2; C-6
2	2,24 (<i>m</i> ; 1H _{ax}) 2,58 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 3,6; 13,9 Hz; 1H _{eq})	2,28 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 4,7; 14,7 Hz; 1H _{ax}) 2,53 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 3,7; 14,7 Hz; 1H _{eq})	36,7	36,8	-
3	5,81 (<i>dt</i> ; <i>J</i> = 3,7; 7,3 Hz; 1H _{eq})	5,81 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> = 3,4; 3,7; 4,7 Hz; 1H _{eq})	70,3	70,2	C-2
4	5,46 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 3,7; 7,3 Hz; 1H _{ax})	5,48 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 3,4; 8,6 Hz; 1H _{ax})	72,3	73,5	C-2
5	5,72 (<i>m</i> ; 1H _{ax})	5,89 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> = 6,4; 8,6; 14,0 Hz; 1H _{ax})	69,6	69,4	C-4; C-6
6	2,31 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 3,0; 13,9 Hz; 1H _{ax}) 2,50 (<i>m</i> ; 1H _{eq})	2,40 (<i>m</i> ; 2H)	38,4	38,9	C-2
-COOH (7)	-	-	177,5	177,4	C-2
Ácido gálico					
1'	-	-	121,1	121,4	-
2' e 6'	7,01 (<i>sl</i> ; 2H)	7,16 (<i>s</i> ; 2H)	110,3	110,4	-
3' e 5'	-	-	146,4	146,4	-
4'	-	-	140,0	139,9	-
-COO- (7')	-	-	167,3	167,7	-
1''	-	-	121,5	120,7	C-2''
2''	7,15 (<i>sl</i> ; 1H)	6,95 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 1,7 Hz; 1H)	106,5	106,1	C-6''
3''	-	-	149,0	148,8	C-2''; C-8''
4''	-	-	140,7	140,6	C-2''; C-6''

Tabela 18 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ10 em CD_3OD , comparados com a literatura.

(Conclusão)					
Número do Carbono	$^1\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	$^1\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade J (Hz); integral	^{13}C $\delta(\text{ppm})$	^{13}C $\delta(\text{ppm})$	HMBC ($\text{H}\rightarrow\text{C}$)
5''	-	-	146,2	146,0	C-6''
6''	7,21 (d ; $J = 1,8$ Hz; 1H)	7,09 (d ; $J = 1,7$ Hz; 1H)	112,2	111,9	C-2''
-COO- (7'')	-	-	167,4	167,1	C-2''; C-6''
-CH ₃ (8'')	3,74 (s ; 3H)	3,57 (s ; 3H)	56,5	56,2	-
1'''	-	-	121,0	120,9	C-2''; C-6''
2''' e 6'''	7,03 (sl ; 2H)	7,01 (s ; 2H)	110,4	110,1	C-6'''
3''' e 5'''	-	-	146,4	146,3	-
4'''	-	-	140,1	139,9	C-6'''
-COO- (7''')	-	-	167,2	167,4	C-6'''

* Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (500 MHz; $\text{DMSO } d_6$) e RMN de ^{13}C (125 MHz; CD_3OD) (Motta et al. 2017).

Os derivados galoilquínicos têm origem na via do chiquimato, a partir da qual são produzidas tanto as moléculas de ácido quínico, quanto as de ácido gálico. Através da condensação aldólica do fosfoenolpiruvato proveniente da via glicolítica, e da D-eritrose-4-fosfato originada na via das pentoses-fosfato, o ácido 3-desoxi-D-arabino-9-heptulosônico-7-fosfato (DAHF) é produzido (Figura 20). Esta molécula é precursora do ácido 3-desidroquínico, o qual reduzido forma o ácido quínico, seguido de desidratação formando o ácido 3-desidrochiquímico, precursor do ácido gálico (Dewick 2009; Pereira et al. 2009).

O ácido gálico e o quínico podem-se esterificar para formar seus derivados, que como tem sido observado nos compostos isolados, podem apresentar grupamentos metílicos nas unidades galoil. O trabalho do Nogueira et al. (2015) foi o primeiro em reportar derivados galoilquínicos metoxilados. Os grupamentos metila podem ser adicionados a partir do aminoácido L-metionina, que sendo transformados a S-adenosilmetionina, faz uma substituição nucleofílica na função hidroxila do galoil (Dewick 2009).

Figura 20 - Via do ácido chiquímico.

Fonte: modificado de Dewick (2009).

4.2 Ensaios *in vitro*

4.2.1 Ensaio de citotoxicidade: compostos isolados selecionados.

O uso dos recursos naturais por parte das comunidades para fins terapêuticos e alimentares, pelo fácil acesso que algumas populações têm aos recursos naturais, favoreceu o uso de produtos naturais e/ou derivados de plantas para o tratamento de doenças ou como suplementos dietéticos, prática que vem aumentando nas últimas décadas no Brasil (Santos et al. 2014; Sponchiado et al. 2016).

Porém, o uso de produtos naturais deve vir acompanhado da segurança na sua utilização, razão pela qual se faz necessária a execução de estudos toxicológicos. Só em 2013, o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas – SINITOX teve registro de 441

casos de intoxicação humana com plantas, o que reflete o possível mal-uso ou desconhecimento do potencial toxicológico de algumas espécies vegetais (Sinitox 2013). Destaca-se por informação do próprio SINOX, que as cifras apresentadas estão desatualizadas por conta da falta de participação dos Centros de Informação de Assistência Toxicológica, indicando que estes números podem ser maiores.

A realização de ensaios de citotoxicidade *in vitro* é necessária como primeiro passo no conhecimento da segurança de um produto e ou substância, sendo vantajosa pela simplicidade, sensibilidade e rapidez. Este tipo de ensaios faz uso de linhagens celulares que podem servir como base para o conhecimento de respostas *in vivo* (Dehn et al. 2004).

Porém, muitas das linhagens de células normais perdem sua habilidade de manter algumas das funções celulares e teciduais específicas, diferente de algumas linhagens tumorais, que mantém algumas das funções celulares perdidas na imortalização tornando-se bons modelos representativos para uso em ensaios toxicológicos (Dehn et al. 2004).

Buscando implementar métodos de investigação *in vitro* de atividades toxicológicas dos compostos isolados, decidiu-se utilizar a linhagem HepG2 (hepatocarcinoma humano). Ela é uma das linhagens celulares mais populares porque como já foi mencionado, mesmo sendo imortalizada ainda expressa funções atribuídas a hepatócitos normais, entre os quais se destacam as reações de biotransformação (enzimas da fase II) de grande importância nos mecanismos de detoxificação celular (Dehn et al. 2004; Gonzales et al. 2015).

Um dos objetivos deste trabalho, foi avaliar as consequências neurotóxicas da exposição a metais pesados e o possível efeito protetivo dos compostos isolados de *C. langsdorffii*, para tanto foi selecionada a linhagem neuronal PC-12, por sua característica de diferenciação após a exposição ao fator de crescimento nervoso (NGF), desenvolvendo projeções axonais, excitabilidade elétrica, e características fenotípicas de neurônios colinérgicos e catecolaminérgicos, permitindo a detecção de ações tóxicas que visam a replicação celular (Slotkin et al. 2006; Sanders et al. 2015).

As linhagens selecionadas foram submetidas a ensaios preliminares de atividade citotóxica com o objetivo de garantir que as concentrações a serem usadas nos ensaios de associação metal-composto não afetassem a viabilidade celular. Uma das técnicas mais utilizadas para avaliar a citotoxicidade de uma amostra é pelo método de alamar blue, que aproveita o ambiente redutor da célula viva para transformar a resazurina (substância azul, não fluorescente) em seu derivado resorufina (composto rosa, fluorescente); a resazurina é vantajosa comparada com outros agentes, por ser solúvel em água, estável, não tóxica e permeável nas membranas celulares (Stoddart 2011; Rampersad 2012).

A resazurina age como aceptor intermediário de elétrons na cadeia de transporte de elétrons sem interferir na sua transferência normal; assim na medida em que o corante aceita elétrons, muda do estado oxidado (não fluorescente) ao estado reduzido (fluorescente) (Rampersad 2012). Tanto enzimas citoplasmáticas (desidrogenases, redutases, oxidoredutases), quanto mitocondriais (redutases) podem reduzir o alamar blue, por tanto o resultado pode ser relacionado com alterações do metabolismo celular (que pode conduzir à morte celular) e não necessariamente como a disfunção mitocondrial (Rampersad 2012).

O protocolo tem como vantagem a leitura dos seus resultados por espectrometria (geralmente a 570 e 600 nm) ou fluorescência (excitação de 530-560 e emissão de 590 nm), sendo esta última muito mais sensível, mesmo com uma densidade celular baixa (Giuseppe et al. 2006; Stoddart 2011).

Os flavonoides quercitrina e afzelina e dois derivados galoilquínicos o AGQ3 e AGQ4, foram testados por serem compostos com maior quantidade de massa para realização dos ensaios, os quais são representativos para a classe dos galoilquínicos. Visava-se também verificar se compostos com similaridades estruturais (caso dos galoilquínicos) podiam apresentar comportamentos biológicos diferentes. Buscando atingir uma ampla faixa de concentrações dos compostos, os ensaios foram realizados utilizando 1, 10 e 100 μ M.

A Figura 21, amostra que os compostos isolados não diminuam a viabilidade celular das células HepG2 em nenhuma das concentrações testadas. Em todos os casos o único grupo que apresentou diferença estatisticamente significativa foi o controle positivo com MMS (300 μ M), que demonstrou efeito na redução da viabilidade celular. É importante destacar que o controle do solvente não teve efeito prejudicial para as células, garantindo o uso do DMSO (0,1%) como dissolvente dos compostos.

Esse comportamento também foi observado nas células neuronais (Figura 22); nenhum dos compostos testados mostrou indícios de citotoxicidade após 24 h de tratamento. No estado natural, muitos flavonoides podem-se encontrar na sua forma *O*-glicosilada, como é o caso da quercitrina e da afzelina, formas glicosiladas da quercetina e do kaempferol que na posição 3 se encontram substituídos com ramnose. Estudos sobre os efeitos dos flavonoides em modelos celulares são mais comuns na forma não glicosilada, sendo que a quercetina tem sido bastante estudada. Por outro lado, os derivados galoilquínicos metoxilados isolados, como já comentado, são compostos recentemente descobertos que ainda foram poucos testados em ensaios biológicos e em ensaios toxicológicos.

Figura 21 - Efeito dos compostos isolados de *C. langsdorffii* na viabilidade de células HepG2. Viabilidade celular (%) de células HepG2 após 24 h de tratamento com os flavonoides e derivados galoilquínicos. CN: controle negativo (meio de cultura); CS: DMSO (0,1%); CP: controle positivo (MMS-300 μ M). Média $\pm$ desvio padrão (n=3), $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Fonte: produção do autor.

Abd-Rabou, Shalby e Ahmed (2016), avaliaram a citotoxicidade da quercetina e do ácido gálico, compostos precursores dos isolados neste estudo, na linhagem HepG2 pelo método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). A quercetina reduziu a atividade mitocondrial de maneira dependente da concentração nas concentrações de 50 e 100 μ M, o ácido gálico por sua parte se mostrou citotóxico a partir da concentração de 25 μ M sem mostrar um efeito dependente da concentração. Os autores consideraram que estes compostos podem ser vistos como potenciais antitumorais.

Outros estudos também confirmam este comportamento da quercitrina em HepG2. Contudo, resultados contraditórios podem ser encontrados. No trabalho realizado por Alía et al. (2006a) foi medida a citotoxicidade da quercetina através do ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH), mostrando redução da atividade enzimática nas concentrações de 50 e 100 μ M após 24 h. Este fato foi confirmado por Ramos et al. (2008), cujos resultados mostraram que a concentração de 100 μ M reduziu a viabilidade de forma estatisticamente significativa;

este estudo também avaliou a proliferação celular com o ensaio de MTT, encontrando que a 25 e 50 μM a proliferação é significativamente reduzida.

Figura 22 - Efeito dos compostos isolados de *C. langsdorffii* na viabilidade de células PC12. Viabilidade celular (%) de células PC12 após 24 h de tratamento com os flavonoides e derivados galoilquínicos. CN: controle negativo (meio de cultura); CS: DMSO (0,1%); CP: controle positivo (MMS-200 μM). Média $\pm$ desvio padrão (n=3), $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Fonte: produção do autor.

Porém, a avaliação feita através do MTT não mostrou citotoxicidade contra HepG2 após 24 h de incubação a 1, 10 e 50 μM , nem de suas formas heterosídicas isoquercitrina e rutina (quercetina-3-*O*-rutenosídeo) segundo o avaliado por Vrba et al. (2012).

Já as substâncias isoladas no presente estudo e os extratos vegetais que contêm quantidades consideráveis delas, apresentaram um comportamento biológico diferente. O extrato metanólico das folhas de *Zanthoxylum bungeanum* contendo predominantemente flavonoides com destaque para quercitrina e afzelina, foi avaliado contra HepG2 no ensaio de MTT em concentrações de 100 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, sem mostrar citotoxicidade após 24 de exposição (Ma et al. 2015). Tanto em PC12 quanto em HepG2, o extrato vegetal de *Pistacia lentiscus* rico

em ácido gálico, não inibiu a respiração mitocondrial medida no ensaio de MTT, mas induziu a liberação de LDH nas concentrações de 0,5 e 1 mg/mL (Ljubuncic et al. 2005).

Quercitrina e afzelina também não foram citotóxicas contra outras linhagens celulares tumorais como A2058 (melanoma humano), MCF7 (adenocarcinoma da mama) e HL-60 (leucemia) (Santana et al. 2012). O mesmo extrato hidroalcoólico da *C. langsdorffii*, também foi seguro em estudos de genotoxicidade em eritrócitos de camundongos e em ensaios *in vivo*, demonstrando redução do número de micronúcleos em células sanguíneas de animais que receberam doses orais do extrato e do agente quimioterápico doxorubicina, (Alves et al. 2013).

4.2.2 Ensaio de eficiência clonogênica.

O ensaio de eficiência clonogênica é considerado um dos ensaios mais confiáveis para medir a viabilidade celular. Esta técnica é útil para rastrear o efeito de um composto na capacidade de proliferação celular, convertendo-se assim em uma boa opção nos estudos de segurança pré-clínica (Pessina et al. 2005; Giuseppe et al. 2006; Vega-Avila e Pugsley 2011). Uma das limitações desta técnica é o tempo que dura a realização do ensaio e a pouca praticidade para avaliar um número grande de amostras (Vega-Avila e Pugsley 2011).

Ante o desconhecimento do potencial toxicológico dos derivados galoilquínicos obtidos da *C. langsdorffii*, optou-se por realizar o ensaio com um dos compostos isolados desta classe, utilizando uma linhagem de células normais. Vega-Avila e Pugsley (2011) afirmaram que o ensaio de eficiência clonogênica é ideal para ser testado em linhagens normais, considerando que muitas células humanas cancerosas têm baixa eficiência de formação de colônias.

O composto AGQ4 foi selecionado pela alta pureza observada nos cromatogramas e espectros de RMN. Na Figura 23 representa-se, graficamente, a porcentagem sobre a atividade mitogênica das células V79 após serem expostas à diferentes concentrações do composto, que variaram de 29,8 μM a $3,8 \times 10^3 \mu\text{M}$, e seus respectivos controles.

Apenas as concentrações mais altas do composto apresentaram efeito significativo na viabilidade celular. Assim, esta substância em concentrações menores pode ser avaliada com segurança em ensaios *in vitro* com esta linhagem celular. É importante ressaltar que neste ensaio as células são expostas diretamente a concentrações da substância testada que, provavelmente não seriam atingidas em estudos *in vivo*. O processo de degradação ácida do composto reduz consideravelmente a quantidade que poderia atingir os alvos teciduais. Todavia é importante conhecerem-se as doses tóxicas de compostos que podem ser utilizados como base no desenvolvimento de novos fármacos.

Figura 23 - Efeito do composto AGQ4 na sobrevivência celular da linhagem V79. Sobrevivência celular (%) de células V79 após os tratamentos com diferentes concentrações de AGQ4. CN: controle negativo (meio de cultura); CS: DMSO (0,04%); CP: controle positivo (MMS-1 mM). Média $\pm$ desvio padrão (n=3), $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Fonte: produção do autor.

Considerando a estrutura química dos compostos avaliados e os ensaios de citotoxicidade realizados com os modelos celulares HepG2 e PC12, pode ser que os compostos isolados AGQ2 e AGQ3 apresentem efeito similar ao observado no AGQ4. Seria interessante considerar a avaliação dos derivados galoilquínicos mono e trissubstituídos em busca de verificar se estas substâncias não possuem efeitos na viabilidade celular de alguns modelos comumente usados na área de toxicologia.

4.2.3 Citotoxicidade de mercúrio e chumbo em HepG2.

Foram realizados ensaios de citotoxicidade com diversas concentrações de metilmercúrio e nitrato de chumbo, em busca de se encontrar as concentrações adequadas para realizar os ensaios de associação. No caso de HepG2, foi visto que o metilmercúrio exerce um forte efeito na viabilidade celular em concentrações baixas (Figura 24); a viabilidade celular foi reduzida a 50% na concentração de 15 μM, razão pela qual essa concentração foi selecionada para os ensaios com os compostos.

Os resultados apresentados sobre o efeito do MeHg em HepG2 foram similares aos de outros estudos. Concentrações de 1,25 a 20 μM de metilmercúrio foram testadas em culturas de HepG2 por Amara et al. (2013); nas concentrações de 10 e 20 μM, a viabilidade celular foi afetada significativamente, sendo que na maior concentração a viabilidade foi reduzida em 90%. Segundo Wang et al. (2017), a concentração letal média (CL₅₀) deste metal nesta linhagem foi de 13 μM.

Figura 24 - Efeito dos metais pesados metilmercúrio e nitrato de chumbo na viabilidade de células HepG2. Viabilidade celular (%) de células HepG2 após 24 h de tratamento com mercúrio e chumbo. CN: controle negativo (meio de cultura); CS: MeOH:H₂O (1:9). Média $\pm$ desvio padrão (n=3), * valores estatisticamente diferentes do controle negativo $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey.

Fonte: produção do autor.

Mesmo que o metilmercúrio aumente a atividade detoxificante das glutathione S-transferases (GST) durante as primeiras horas, a exposição prolongada induz apoptose em HepG2 segundo Cuello et al. (2010); isto ocorre pela ativação da cascata de caspase-9, incremento nos níveis de proteínas pró-apoptóticas (BAX e BAD), dano na membrana e alteração das atividades enzimáticas antioxidantes.

Outro metal avaliado foi o chumbo, cuja toxicidade em HepG2 é amplamente reconhecida. A partir de 1 µM de Pb⁺², a viabilidade de HepG2 foi afetada negativamente após 24 horas de tratamento no ensaio de MTT, sendo que a 500 µM a viabilidade foi reduzida em 40% segundo Chen et al. (2002b). Yang et al. (2013) avaliaram uma concentração de 8 mg/L de chumbo, encontrando que reduziu a viabilidade de HepG2 em aproximadamente 50%.

Experimentos com acetato de chumbo foram feitos com as linhagens celulares, atingindo concentrações de até 500 µM, sem encontrar uma forte influência do metal na viabilidade celular. Pelo contrário, trabalhar com altas concentrações desta forma do chumbo resultou na precipitação do metal no fundo dos poços tratados, razão pela qual foi utilizada a forma nitrada (Pb(NO₃)₂).

O Pb(NO₃)₂ diminuiu a viabilidade celular de HepG2 já em baixas concentrações como a de 5 µM (Figura 23), porém só concentrações mais altas conseguem reduzir a viabilidade em valores próximos de 60%. O experimento de viabilidade celular foi conduzido até o valor de 50 µM do metal, contudo o efeito foi similar àquele obtido para a concentração de 40 µM. Assim,

optou-se pela realização dos experimentos de associação com a concentração de 40 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.

Tchounwou et al. (2004) descreveram que o $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ reduz a viabilidade de HepG2 em aproximadamente 40% na dose de 12,25 $\mu\text{g/mL}$ (36,98 μM), após 24 h de tratamento, mas só a 50 $\mu\text{g/mL}$ (150,96 μM) atinge um IC_{50} . Após 48 h de tratamento, a viabilidade é menor em concentrações mais baixas; por exemplo, a 30 $\mu\text{g/mL}$ (90,5 μM) a viabilidade em HepG2 é de 58% (Yedjou et al. 2010).

4.2.4 Citotoxicidade de mercúrio e chumbo em PC12.

Nesta linhagem foi observada maior sensibilidade frente ao mercúrio (Figura 25), uma vez que já na concentração de 10 μM foi atingida a redução da viabilidade celular próxima a 40%, razão pela qual esta foi a concentração selecionada para a realização dos ensaios posteriores. No caso do chumbo, observou-se que a forma utilizada não apresentou toxicidade para a linhagem neuronal em baixas concentrações, assim foi necessário utilizar concentrações altas para atingir uma redução da viabilidade de aproximadamente 40%.

Os resultados obtidos contrastam com estudos prévios que afirmam que concentrações muito baixas de MeHg podem originar um efeito de diminuição da viabilidade das células PC12. Uma IC_{50} de 0,32 μM no ensaio de alamar blue, após 24 horas de tratamento foi determinada para o MeHg (Kajiwara e Inouye 1986). De forma interessante este estudo definiu que as concentrações tóxicas podem variar segundo a forma do mercúrio avaliada, assim, para o cloreto de mercúrio uma IC_{50} de 8,18 μM foi encontrada.

Figura 25 - Efeito dos metais pesados metilmercúrio e nitrato de chumbo na viabilidade de células PC12. Viabilidade celular (%) de células PC12 após 24 h de tratamento com mercúrio e chumbo. CN: controle negativo (meio de cultura); CS: MeOH:H₂O (1:9). Média $\pm$ desvio padrão (n=3), * valores estatisticamente diferentes do controle negativo $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey.

Fonte: produção do autor.

De acordo com Gatti et al. (2004), a IC_{50} do hidróxido de MeHg é 1,3 μM para células PC12 no ensaio de MTT após 24 h de exposição. Conforme foi avaliado por estes pesquisadores, a exposição desta linhagem ao metal leva a necrose celular, causa de depleção de GSH e interação do metal com grupos tiol criticamente localizados em enzimas e proteínas. Em concentrações baixas do metal, os estudos sugerem que este é capaz de inibir a diferenciação pela interferência no processo de autofosforilação do receptor TrkA, ligante do fator de crescimento neural (Parran et al. 2003).

Nas células PC12 prevalecem os estudos de citotoxicidade avaliando o chumbo na forma orgânica acetato. Estudos demonstram que ensaios de MTT após 24 h de tratamento, o acetato de chumbo afeta a viabilidade celular a partir de 0,5 μM , no entanto a uma dose de 500 μM a viabilidade se mantém em 70% (Chen et al. 2003). Sharifi et al. (2005) e Xu et al. (2006), confirmaram que a partir de 1 μM a viabilidade da linhagem se vê afetada, porém determinaram que em concentrações de 100-180 μM a viabilidade atinge aproximadamente um 60%. Na forma nitrato, o chumbo parece ter efeito menos tóxico nas primeiras 24 h de tratamento. Na concentração de 50 $\mu g/mL$ (151 μM), a porcentagem de citotoxicidade foi só de 17%, pelo ensaio de LDH (Sanders et al. 2015).

São diversos os efeitos da exposição das células PC12 ao chumbo. Foi demonstrado que a célula ativa mecanismos de defesa frente à intoxicação com esta substância, tais como aumento na expressão de p53 e regulação crescente das enzimas Hsp70 ou proteínas de choque térmico, que protegem a células do estresse (Xu et al. 2006; Sanders et al. 2015). Em doses baixas o chumbo interfere na cascata de sinalização do NGF, iniciando de forma prematura a estimulação da diferenciação morfológica (Crumpton et al. 2001).

De maneira dose-dependente o chumbo gera intoxicação com danos celulares entre os quais se podem mencionar: diminuição dos níveis de cálcio intracelular; formação de ERO; aumento das metaloproteinases de matriz (MMP) que promovem a degradação da matriz extracelular; alteração na produção de óxido nítrico, que em excesso se encontra relacionada com citotoxicidade; dano no DNA; apoptose e desequilíbrio da regulação das proteínas Bax/Bcl-2 envolvidas em processos de permeação mitocondrial (Chen et al. 2003; Aykin-Burns et al. 2005; Sharifi et al. 2005; Sanders et al. 2015).

4.2.5 Ensaios associação metais-compostos em HepG2.

Para testar os efeitos protetores dos compostos isolados à exposição dos metais, foi realizado um pré-tratamento de uma hora com as substâncias e após este tempo foram submetidos a concentrações selecionadas dos metais. Os resultados indicaram que os quatro

compostos testados, nas três concentrações avaliadas, aumentam significativamente a viabilidade das células HepG2 expostas a metilmercúrio (15 μ M) (Figura 26). Inicialmente, foi observado que as concentrações de 1 e 10 μ M mostraram efeitos protetores similares, porém na concentração de 100 μ M o efeito diminuiu, sem deixar de ser estatisticamente significativo comparado contra o tratamento com mercúrio.

Figura 26 - Efeito dos compostos isolados de *C. langsdorffii* na toxicidade celular da linhagem HepG2 induzida por 15 μ M de MeHg. Viabilidade celular (%) de células HepG2 após 24 h de tratamento de associação mercúrio-compostos. CN: controle negativo (meio de cultura). Média $\pm$ desvio padrão (n=3), * valores estatisticamente diferentes do grupo Hg (15 μ M) $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Dunnett.

Fonte: produção do autor.

Um desempenho similar, mas moderado, foi observado com o chumbo (Figura 27), na qual concentrações de 1 e 10 μ M de todos os compostos causaram efeito protetor da redução da viabilidade celular, enquanto a 100 μ M o efeito foi significativamente menor, com exceção do AGQ3 que mesmo mostrando um aumento na viabilidade celular, não foi significativo.

Como sugerem os resultados, o efeito citotóxico do chumbo em HepG2 é atribuído ao estresse oxidativo e à peroxidação lipídica estimulada pelos lipídios da membrana celular, interferindo na fluidez da mesma na superfície polar e, conseqüentemente, em sua função; além se produzem radicais lipídicos que levam à formação de uma mistura complexa de produtos de degradação lipídica (MDA e outros aldeídos) que são tóxicos para as células (Chen et al. 2002a). A situação não é diferente para o mercúrio que induz mudanças na homeostase mitocondrial e também aumenta a geração de ERO gerando à peroxidação lipídica e morte celular (Wang et al. 2017).

Figura 27 - Efeito dos compostos isolados de *C. langsdorffii* na toxicidade celular da linhagem HepG2 induzida por 40 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Viabilidade celular (%) de células HepG2 após 24 h de tratamento de associação chumbo-compostos. CN: controle negativo (meio de cultura). Média $\pm$ desvio padrão (n=3), * valores estatisticamente diferentes do grupo Pb (40 μM) $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Dunnett.

Fonte: produção do autor.

Este efeito tóxico se acentua pelo enfraquecimento do sistema de defesa celular antioxidante diante da exposição a estes compostos. Deste modo, a atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, catalase, glutathione-S-transferase, entre outras se mostra diminuída frente a metais tóxicos (Flora 2009). Antioxidantes não endógenos podem ser utilizados na busca de se encontrar solução a este problema.

Neste trabalho, os compostos isolados de *C. langsdorffii* protegeram as células contra a citotoxicidade causada pelos metais pesados. Esta resposta deve-se ao efeito antioxidante dos flavonoides estudados. Os antioxidantes têm a capacidade de prevenir o desacelerar o processo oxidativo gerado por outras moléculas; em estudos com metais pesados foi verificado que compostos fenólicos são capazes de agir como antioxidantes, capturando radicais livres, quelando o íon metálico e impedindo sua reação com espécies reativas de oxigênio ou mantendo-o em um estado redox incompetente para reduzir o oxigênio molecular (Flora 2009).

Exemplo disto são as catequinas, flavonoides isoladas do chá verde, que mostraram proteger células HepG2 expostas ao chumbo em diferentes concentrações (Chen et al. 2002a). Um aspecto interessante do estudo foi que a (-)-epigallocatequina (EGC) numa concentração de 80 μM apresentou efeito sinérgico com a dose de chumbo avaliada, reduzindo altamente a viabilidade celular. Por outro lado, as concentrações não citotóxicas das catequinas isoladas tiveram um efeito inibitório na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), em células HepG2 expostas ao chumbo; como esperado a EGC (80 μM) foi a única exceção mostrando efeito pró-oxidante.

Este efeito tem sido observado em alguns polifenóis vegetais com unidades catecol ou pirogalol sob condições específicas (Flora 2009; Quideau et al. 2011). A unidade catecol pode sofrer oxidação produzindo o radical orto-hidroxifenílico que tem a capacidade de reagir com o radical livre $^3\text{O}_2$, resultando em orto-quinonas oxidantes e $\text{O}_2^{\cdot-}$, radical que pode formar H_2O_2 ; isto traz como consequência que os polifenóis são capazes de induzir quebras no DNA em presença de $^3\text{O}_2$ (Quideau et al. 2011). A quercetina, precursora da quercitrina, já tem sido vista como um composto pró-oxidante em ensaios de associação e *in vivo* com metilmercúrio, demonstrando atividade neurotóxica (Ossola et al. 2009). Segundo o que foi observado nos resultados, esse efeito também se estendeu aos derivados galoilquínicos.

Outro composto fenólico, a glucosilxantona mangiferina encontrada em *Mangifera indica* L., mostrou efeito protetor em HepG2 contra intoxicação induzida por cloreto de mercúrio. Através do ensaio de eficiência clonogênica, foi observado que um pré-tratamento do composto a 50 μM por duas horas protegeu as células contra diferentes concentrações do metal (1-10 μM) (Agarwala et al. 2012). A porcentagem de células apoptóticas e de ERO, assim como da atividade enzimática induzida pelo metal decresceram com o tratamento de mangiferina.

É provável que nas concentrações baixas, no caso dos flavonoides isolados, haja uma proteção frente ao dano oxidativo causado pelos metais. Em ensaios de hepatoproteção contra hidropéroxido de terc-butilo (t-BuOOH) em células HepG2, através do ensaio de alamar blue, os flavonoides kaempferol e quercetina, isolados de *Sophora japonica* L. mostraram concentrações eficazes médias (CE_{50}) de 72 e 35 μM , indicando que a presença dos grupos hidroxílicos adjacentes (unidade catecol) da quercetina no anel B, promovem a hepatoproteção (Kinjo et al. 2006). Segundo Alía et al. (2006b), em concentrações menores a 10 μM , a quercetina diminuiu a glutathiona reduzida (GSH) e aumentou o malondialdeído (MDA), assim como reduziu o aumento enzimático da glutathiona peroxidase, superóxido dismutase, glutathiona redutase e atividades de catalase.

Esta teoria da maior proteção de compostos com grupo catecol toma força analisando os resultados de outros estudos que avaliam extratos vegetais. O extrato aquoso das partes aéreas de *Pistacia lentiscus* ricas em flavonoides e ácido gálico, na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ inibiu em 74% a peroxidação lipídica induzida por ferro em células de rato (Ljubuncic et al. 2005). Extrato de folhas de *Zanthoxylum bungeanum* com presença dos flavonoides quercitrina e afzelina demonstrou que concentrações a partir dos 250 $\mu\text{g/mL}$ inibem o dano oxidativo induzido por radicais livres e peroxidação lipídica (Ma et al. 2015).

Kinjo et al. (2006) testaram também compostos fenólicos isolados de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze entre os quais se encontrava o ácido gálico e alguns derivados, encontrando resultados interessantes. O ácido gálico não apresentou atividade citoprotetora contra t-BuOOH em HepG2, porém seu derivado, o éster metílico do ácido gálico, foi ativo na CE₅₀ de 19,2 µM. Igualmente, flavanonas com esterificação com unidades galoil na posição 7 (anel A) foram mais ativas em concentrações menores. Segundo o estudo, os melhores efeitos foram daqueles compostos com uma base química estrutural éster metílico de ácido gálico, sendo que o grupo carboxílico livre do ácido gálico reduz a atividade hepatoprotetora.

Ensaio de peroxidação também foram realizados testando o ácido gálico e unidades catecol em microsomas de fígado de rato. Estes compostos reduziram a formação de radicais livres induzidos pela presença de ferro, em concentração de 1 mM, diminuindo as concentrações até 39 e 20% respectivamente (Minakata et al. 2011).

4.2.6 Ensaio associação metais-compostos em PC12.

Na linhagem neuronal, os resultados das associações mostraram diferenças com relação ao comportamento observado nas células HepG2. Na associação do mercúrio (10 µM) com os compostos, em nenhum dos tratamentos com os quatro compostos isolados houve efeito de proteção na linhagem (Figura 28). Essa resposta decrescente da viabilidade foi levemente dependente da concentração, de tal modo que na concentração de 1 µM o resultado foi maior comparado com 100 µM, com exceção da concentração de 10 µM para a quercitrina e o AGQ4, os quais apresentaram dados de viabilidade menores do que nas outras concentrações testadas.

Figura 28 - Efeito dos compostos isolados de *C. langsdorffii* na toxicidade celular da linhagem PC12 induzida por 10 µM de MeHg. Viabilidade celular (%) de células PC12 após 24 h de tratamento de associação mercúrio-compostos. CN: controle negativo (meio de cultura). Média ± desvio padrão (n=3), * valores estatisticamente diferentes do grupo Hg (10 µM) $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Dunnett.

Fonte: produção do autor.

A diferença na resposta entre as linhagens pode ser devida à capacidade metabólica que a HepG2 conserva. Experimentos realizados em HepG2 e linhagens recombinantes derivados feito por Sutton et al. (2002), mostram que a exposição da célula ao mercúrio ativa a transcrição de nove genes promotores de enzimas relacionadas com a defesa celular, entre eles: glutational-s-transferase, enzima da fase II; metalotioneína, encarregada do sequestro de metais pesados; c-fos, membro do fator de transcrição AP-1, regulador da expressão gênica; HSP70, proteína de choque térmico chaperona na reabsorção de proteínas danificadas; p53RE, supressor de tumor proteico, local de ligação para o fator de transcrição p53 ativo ante dano do DNA; GADD153 e GADD45, envolvidas na parada de crescimento, dano de DNA e regulação na resposta do ciclo celular a agentes genotóxicos.

Segundo os autores, os resultados são indicativos do potencial do mercúrio de sofrer metabolização na fase II no fígado, além de induzir metalotioneína, proteína envolvida no transporte e/ou desintoxicação de metais tóxicos e essenciais para as células. Embora HepG2 tem como característica possuir enzimas do citocromo P450 (CYP) que são um complexo da fase I, que segundo Amara et al. (2013) se relacionam diretamente ao metabolismo de xenobióticos, representando cerca de 75% das transformações totais destes para metabólitos não tóxicos ou cancerígenos, o estudo de Sutton et al. (2002) encontrou que não houve diferença significativa na expressão de genes relacionados ao mesmo.

Estudos similares feitos com chumbo também demonstraram que a linhagem HepG2 é capaz de biotransformar o nitrato de chumbo. A exposição ao metal induz a expressão do elemento xenobiótico de resposta (XRE), HSP70, c-fos, entre outros promotores (Tchounwou et al. 2004).

Essa metabolização por parte da HepG2 pode explicar o comportamento diferencial observado na proteção contra o chumbo em células PC12. Os compostos nos pré-tratamentos com chumbo a 1 e 10 μM apresentaram atividade estatisticamente significativa (Figura 29). Porém, na concentração de 100 μM os compostos não apresentaram citoproteção. Os valores de viabilidade celular em HepG2, foram moderadamente mais altos em comparação com a linhagem neuronal PC-12.

Alguns compostos fenólicos já mostraram seu efeito protetor contra intoxicação de metais tóxicos em PC12. O ácido clorogênico em pré-tratamentos de 0,05-1,35 μM por 24 h mostrou efeito citoprotetor da viabilidade celular contra exposição a 5 μM de MeHg de forma dependente da concentração. O composto também foi capaz de suprimir a geração de ERO e diminuir a ação enzimática da glutational peroxidase e da GSH, assim como atenuar a ativação da caspase-3, diminuindo a apoptose celular (Li et al. 2008).

Figura 29 - Efeito dos compostos isolados de *C. langsdorffii* na toxicidade celular da linhagem PC12 induzida por 350 μ M de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Viabilidade celular (%) de células PC12 após 24 h de tratamento de associação chumbo-compostos. CN: controle negativo (meio de cultura). Média $\pm$ desvio padrão (n=3), * valores estatisticamente diferentes do grupo Pb (350 μ M) $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Dunnett.

Fonte: produção do autor.

As catequinas também apresentaram atividade protetora da linhagem PC12, desta vez contra a intoxicação com acetato de chumbo. Quatro diferentes catequinas (epicatequina, epigallocatequina, epicatequin galato, e epigallocatequin galato) em concentrações de 50 e 100 μ M, conseguiram incrementar a viabilidade de células tratadas simultaneamente com os compostos e com chumbo 100 μ M; outros efeitos celulares nocivos do chumbo também foram atenuados com o aumento de cálcio intracelular e formação de ERO, com maior efeito nos compostos nas galoil catequinas (Chen et al. 2003).

Outras pesquisas também destacam a atividade protetora de produtos naturais frente à intoxicação com outros agentes oxidativos. Duas frações obtidas a partir do extrato metanólico de folhas de *Zanthoxylum piperitum* (L.) DC, ricas em flavonoides como quercitrina, quercetina e afzelina, conseguiram proteger células PC12 contra a toxicidade gerada pelo dano oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio, testada no ensaio de MTT com 48 h de pré-tratamento com as frações (Jeong et al. 2011). A fração com maior conteúdo de quercitrina teve efeito protetor em concentrações que variaram de 62 a 500 μ g/mL; a apoptose celular devida ao estresse oxidativo também foi diminuída com os pré-tratamentos; porém no teste com 1000 μ g/mL houve diminuição da viabilidade.

5. CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico forneceu resultados semelhantes aos previamente realizados, podendo-se confirmar que entre os compostos majoritários nas folhas de *C. langsdorffii* estão os flavonoides quercitrina e afzelina e derivados galoilquínicos metoxilados.

O método de cromatografia contracorrente é um método seletivo para a separação de flavonoides majoritários presentes na fração em acetato de etila de *C. langsdorffii*, assim como a cromatografia de exclusão em gel é efetiva na separação dos compostos galoilquínicos, como já foi confirmado por outros estudos.

Tanto os flavonoides quanto os compostos galoilquínicos testados, não mostraram citotoxicidade nas linhagens celulares HepG2 e PC12 em concentrações menores ou iguais a 100 μM .

O ensaio de eficiência clonogênica demonstrou que só doses altas (próximas a 4 mM) do composto AGQ4 têm efeito negativo na atividade mitogênica da linhagem V79; possivelmente os derivados galoilquínicos dissubstituídos sejam compostos de uso seguro a doses moderadas em ensaios *in vitro*.

Os flavonoides quercitrina e afzelina e os compostos ácido 3',3''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico (AGQ3) e ácido 3',3''-di-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico (AGQ4), mostraram efeito protetor e contra a toxicidade induzida por metilmercúrio (15 μM) na linhagem HepG2. Resultado oposto ao esperado foi obtido para a linhagem PC12, dos quais nenhum dos pré-tratamentos conseguiu exercer citoproteção contra metilmercúrio (10 μM), pelo contrário, as substâncias exerceram efeito de redução da viabilidade celular. É provável que o efeito protetor esteja condicionado pela sinergia da atividade antioxidante dos polifenóis e da ação enzimática que conserva a linhagem hepática.

Os pré-tratamentos com os flavonoides e o AGQ4 mostraram atividade citoprotetora significativa na linhagem HepG2 contra o nitrato de chumbo (40 μM). Para PC12 os quatro isolados nas concentrações de 1 e 10 μM também protegeram as células contra os efeitos citotóxicos do metal. Provavelmente, esta resposta também esteja relacionada à defesa enzimática da célula HepG2.

De forma geral nos ensaios de associação dos compostos com os metais, foi possível observar um efeito de redução da viabilidade de forma dose-dependente, sendo que as maiores concentrações testadas mostravam porcentagens menores. O efeito foi muito mais significativo no ensaio de associação do chumbo em células PC12. Nesta linhagem, também foi possível observar uma leve sinergia entre o efeito tóxico do mercúrio e dos compostos; estas respostas podem ser consequência do efeito pró-tóxico dos compostos polifenólicos, que já tem sido observada em outros estudos.

6. REFERÊNCIAS

- Abd-Rabou A A, Shalby B A, Ahmed H H. Anti-cancer activity of quercetin, gallic acid, and ellagic acid against HepG2 and Hct 116 cell lines: *in vitro*. Int J Pharma Bio Sci. 2016;7(4):584–92.
- Abrão F, de Araújo Costa LD, Alves JM, Senedese JM, de Castro PT, Ambrósio SR, et al. *Copaifera langsdorffii* oleoresin and its isolated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. BMC Complement Altern Med. 2015;15(1):443.
- Agarwala S, B. NR, Mudholkar K, Bhuwania R, Satish Rao BS. Mangiferin, a dietary xanthone protects against mercury-induced toxicity in HepG2 cells. Environ Toxicol [Internet]. 2012;27(2):117–27. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/tox.20620>
- Ahmed AS, Gogal RM, Walsh JE. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. J Immunol Methods. 1994;170(2):211–24.
- Alía M, Mateos R, Ramos S, Lecumberri E, Bravo L, Goya L. Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). Eur J Nutr. 2006a;45(1):19–28.
- Alía M, Ramos S, Mateos R, Granado-Serrano AB, Bravo L, Goya L. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. Toxicol Appl Pharmacol. 2006b;212(2):110–8.
- Alves JM, Munari CC, de Azevedo Bentes Monteiro Neto M, Furtado RA, Senedese JM, Bastos JK, et al. *In vivo* protective effect of *Copaifera langsdorffii* hydroalcoholic extract on micronuclei induction by doxorubicin. J Appl Toxicol [Internet]. 2013;33(8):854–60. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/jat.2777>
- Alves SD, Carvalho GA, Oliveira DF, Sâmia RR, Villas-Boas AM, Carvalho GA, et al. Toxicity of copaiba extracts to armyworm (*Spodoptera frugiperda*). African J Biotechnol. 2012;11(24):6578–91.
- Amara IEA, Anwar-Mohamed A, El-Kadi AOS. Posttranslational mechanisms modulating the expression of the cytochrome P450 1A1 gene by methylmercury in HepG2 cells: a role of heme oxygenase-1. Toxicol Lett [Internet]. 2013;219(3):239–47. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.03.018>
- Aykin-Burns N, Franklin EA, Ercal N. Effects of N-acetylcysteine on lead-exposed PC-12 cells. Arch Environ Contam Toxicol. 2005;49(1):119–23.
- Bal-Price A, Coecke S. Guidance on Good Cell Culture Practice (GCCP). In: Aschner M, Suñol C, Bal-Price A, organizadores. Cell Culture Techniques. Springer Protocols; 2011. p. 1–25.
- Barbosa FS, Leite GLD, Alves SM, Nascimento AF, D'Ávila VDA, Costa CA Da. Insecticide effects of *Ruta graveolens*, *Copaifera langsdorffii* and *Chenopodium ambrosioides* against pests and natural enemies in commercial tomato plantation. Acta Sci Agron. 2011;33(1):37–43.
- Barbosa FS, Leite GLD, Martins ER, D'avila VA, Cerqueira V. Medicinal plant extracts on the control of *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae). Rev Bras Plantas Med. 2013;15(1):142–9.
- Barcelos GRM, Angeli JPF, Serpeloni JM, Grotto D, Rocha BA, Bastos JK, et al. Quercetin

- protects human-derived liver cells against mercury-induced DNA-damage and alterations of the redox status. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 2011a;726(2):109–15.
- Barcelos GRM, Grotto D, Serpeloni JM, Angeli JPF, Rocha BA, de Oliveira Souza VC, et al. Protective properties of quercetin against DNA damage and oxidative stress induced by methylmercury in rats. *Arch Toxicol*. 2011b;85(9):1151–7.
- Berthod A, Maryutina T, Spivakov B, Shpigun O, Sutherland I a. Countercurrent chromatography in analytical chemistry (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem*. 2009;81(2):355–87.
- Beyersmann D, Hartwig A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol*. 2008;82(8):493–512.
- Chen L, Yang X, Jiao H, Zhao B. Tea catechins protect against lead-induced cytotoxicity, lipid peroxidation, and membrane fluidity in HepG2 cells. *Toxicol Sci*. 2002a;69(1):149–56.
- Chen L, Yang X, Jiao H, Zhao B. Tea catechins protect against lead-induced ROS formation, mitochondrial dysfunction, and calcium dysregulation in PC12 cells. *Chem Res Toxicol*. 2003;16(9):1155–61.
- Chen L, Yang X, Jiao H, Zhao B, Al CET. Tea catechins protect against lead-induced cytotoxicity, lipid peroxidation, and membrane fluidity in HepG2 cells. *Toxicol Sci*. 2002b;156(69):149–56.
- Costa-Machado ARM, Bastos JK, de Freitas LAP. Dynamic maceration of *Copaifera langsdorffii* leaves: a technological study using fractional factorial design. *Brazilian J Pharmacogn*. 2013;23(1):79–85.
- Costa ARM, Freitas LAP, Mendiola J, Ibañez E. *Copaifera langsdorffii* supercritical fluid extraction: Chemical and functional characterization by LC/MS and *in vitro* assays. *J Supercrit Fluids*. 2015;100:86–96.
- Crumpton T, Atkins DS, Zawia NH, Jr SB. Lead exposure in pheochromocytoma (PC12) cells alters neural differentiation and Sp1 DNA-binding. *Neurotoxicology*. 2001;22:49–62.
- Cuello S, Goya L, Madrid Y, Campuzano S, Pedrero M, Bravo L, et al. Molecular mechanisms of methylmercury-induced cell death in human HepG2 cells. *Food Chem Toxicol*. 2010;48(5):1405–11.
- Dehn PF, White CM, Connors DE, Shipkey G, Cumbo TA. Characterization of the human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line as an *in vitro* model for cadmium toxicity studies. *Vitr Cell Dev Biol - Anim*. 2004;40(5):172.
- Dewick PM. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 3rd Editio. Wiley; 2009.
- Donato MT, Lahoz A, Castell J V, Gomez-Lechon MJ. Cell lines: a tool for *in vitro* drug metabolism studies. *Curr Drug Metab*. 2008;9(1):1–11.
- Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem*. 2001;1(6):529–39.
- Estevão LRM, Medeiros JP de, Baratella-Evêncio L, Simões RS, Mendonça FDS, Evêncio-Neto J. Effects of the topical administration of copaiba oil ointment (*Copaifera langsdorffii*) in skin flaps viability of rats. *Acta Cir Bras*. 2013;28(12):863–9.
- Flora G, Gupta D, Tiwari A. Toxicity of lead: a review with recent updates. *Interdiscip Toxicol*. 2012;5(2).
- Flora SJS. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against

- metal and metalloid exposure. *Oxid Med Cell Longev*. 2009;2(4):191–206.
- Fonseca AP, Estrela FT, Moraes TS, Carneiro LJ, Bastos JK, Dos Santos RA, et al. *In vitro* antimicrobial activity of plant-derived diterpenes against bovine mastitis bacteria. *Molecules*. 2013;18(7):7865–72.
- Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nat Protoc*. 2006;1(5):2315–9.
- Freitas C V., Oliveira PE. Biologia reprodutiva de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Rev Bras Botânica*. 2002;25(3):311–21.
- Furtado RA, Bernardes CTV, Silva MN Da, Zoccal KF, Faccioli LH, Bastos JK. Antiedematogenic evaluation of *Copaifera langsdorffii* leaves hydroethanolic extract and its major compounds. *Biomed Res Int*. 2015;2015(M):1–7.
- Gatti R, Belletti S, Uggeri J, Vettori MV, Mutti A, Scandroglio R, et al. Methylmercury cytotoxicity in PC12 cells is mediated by primary glutathione depletion independent of excess reactive oxygen species generation. *Toxicology*. 2004;204(2–3):175–85.
- Gelmini F, Beretta G, Anselmi C, Centini M, Magni P, Ruscica M, et al. GC-MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary *in vivo* evaluation of its antipsoriatic effect. *Int J Pharm*. 2013;440(2):170–8.
- Gerets HHJ, Tilmant K, Gerin B, Chanteux H, Depelchin BO, Dhalluin S, et al. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biol Toxicol*. 2012;28(2):69–87.
- Giuseppe SA, Longo-sorbello G, Saydam G, Banerjee D, Bertino J. Cytotoxicity and cell growth assays. In: Celis JE, organizador. *Cell Biology*. Third Edit. Elsevier; 2006. p. 315–24.
- Gonzales GB, Van Camp J, Vissenaekens H, Raes K, Smagghe G, Grootaert C. Review on the use of cell cultures to study metabolism, transport, and accumulation of flavonoids: from mono-cultures to co-culture systems. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2015;14(6):741–54.
- Gramosa N V, Silveira ER. Volatile constituents of *Copaifera langsdorffii* from the Brazilian Northeast. *J Essent Oil Res*. 2005;17(2):130–2.
- Ham F, Chapa F De, Phuong K. C. In: Duke J, Bongeschütz-Godwin MJ, Ottensen A, organizadores. *Duke's handbook of medicinal plants of Latin America*. CRC Press; 2008. p. 139–251.
- Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, Parikh R, Bullock P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicol Vitro*. 2004;18(5):703–10.
- Hostettmann K, Hostettmann M, Marston A. Isolation of natural products by droplet counter-current chromatography and related methods. *Nat Prod Rep*. 1984;1(5):471.
- Ines S, Ines B, Wissem B, Mohamed BS, Nawel H, Dijoux-Franca MG, et al. *In vitro* antioxidant and antigenotoxic potentials of 3,5-O-di-galloylquinic acid extracted from *Myrtus communis* leaves and modulation of cell gene expression by H₂O₂. *J Appl Toxicol*. 2012;32(5):333–41.
- Jarup L. Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull*. 2003;68(1):167–82.
- Jeong C-H, Kwak JH, Kim JH, Choi GN, Kim D-O, Heo HJ. Neuronal cell protective and antioxidant effects of phenolics obtained from *Zanthoxylum piperitum* leaf using *in vitro*

- model system. *Food Chem.* 2011;125(2):417–22.
- Kajiwarra Y, Inouye M. Effects of methylmercury and mercuric chloride on preimplantation mouse embryos *in vivo*. *Teratology*. 1986;33(2):231–7.
- Kinjo J, Hitoshi M, Tsuchihashi R, Korematsu Y, Miyakoshi M, Murakami T, et al. Hepatoprotective constituents in plants 15: protective effects of natural-occurring flavonoids and miscellaneous phenolic compounds as determined in an HepG2 cell cytotoxicity assay. *J Nat Med.* 2006;60(1):36–41.
- Křenek K, Marhol P, Peikerová Ž, Křen V, Biedermann D. Preparatory separation of the silymarin flavonolignans by Sephadex LH-20 gel. *Food Res Int.* 2014;65(PA):115–20.
- Lee SY, So YJ, Shin MS, Cho JY, Lee J. Antibacterial effects of afzelin isolated from *Cornus macrophylla* on *Pseudomonas aeruginosa*, a leading cause of illness in immunocompromised individuals. *Molecules.* 2014;19(3):3173–80.
- Lemos M, Santin JR, Mizuno CS, Boeing T, De Sousa JPB, Nanayakkara D, et al. *Copaifera langsdorffii*: Evaluation of potential gastroprotective of extract and isolated compounds obtained from leaves. *Brazilian J Pharmacogn.* 2015;25(3):238–45.
- Li Y, Shi W, Li Y, Zhou Y, Hu X, Song C, et al. Neuroprotective effects of chlorogenic acid against apoptosis of PC12 cells induced by methylmercury. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2008;26(1):13–21.
- de Lima Silva JJ, Guimarães SB, da Silveira ER, de Vasconcelos PRL, Lima GG, Torres SM, et al. Effects of *Copaifera langsdorffii* Desf. on Ischemia-Reperfusion of randomized skin flaps in rats. *Aesthetic Plast Surg.* 2009;33(1):104–9.
- Ljubuncic P, Azaizeh H, Portnaya I, Cogan U, Said O, Saleh KA, et al. Antioxidant activity and cytotoxicity of eight plants used in traditional Arab medicine in Israel. *J Ethnopharmacol.* 2005;99(1):43–7.
- Lu JJ, Wei Y, Yuan QP. Preparative separation of gallic acid from Chinese traditional medicine by high-speed counter-current chromatography and followed by preparative liquid chromatography. *Sep Purif Technol.* 2007;55(1):40–3.
- Ma L, Li K, Wei D, Xiao H, Niu H, Huang W. High anti-oxidative and lipid-lowering activities of flavonoid glycosides-rich extract from the leaves of *Zanthoxylum bungeanum* in multi-system. *J Food Nutr Res.* 2015;3(1):62–8.
- Martins-da-Silva RC V, Pereira JF, de Lima HC. O gênero *Copaifera* (Leguminosae - Caesalpinioideae) na Amazônia brasileira. *Rodriguésia.* 2008;59(3):455–76.
- Masson-Meyers D, Andrade T, Leite S, Frade M. Cytotoxicity and wound healing properties of *Copaifera langsdorffii* oleoresin in rabbits. *Int J Nat Prod Sci.* 2013;3(3):10–20.
- Masson DS, Salvador SL, Polizello ACM, Frade MAC. Antimicrobial activity of copaíba (*Copaifera langsdorffii*) oleoresin on bacteria of clinical significance in cutaneous wounds. *Rev Bras Plantas Med.* 2013;15(4):664–9.
- de Mendonça FAC, da Silva KFS, dos Santos KK, Ribeiro Júnior KAL, Sant’Ana AEG. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Fitoterapia.* 2005;76(7–8):629–36.
- Minakata K, Fukushima K, Nakamura M, Iwahashi H. Effect of some naturally occurring iron ion chelators on the formation of radicals in the reaction mixtures of rat liver microsomes with ADP, Fe³⁺ and NADPH. 2011;49(3):207–15.

- Motta EV da S. Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-UV-DAD para quantificação e análise sazonal de derivados galoilquínicos nas folhas de *Copaifera langsdorffii*. Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto; 2014.
- Motta EVS, Lemos M, Costa JC, Banderó-Filho VC, Sasse A, Sheridan H, et al. Galloylquinic acid derivatives from *Copaifera langsdorffii* leaves display gastroprotective activity. *Chem Biol Interact*. 2017;261:145–55.
- Munshi S, Twining RC, Dahl R. Alamar blue reagent interacts with cell-culture media giving different fluorescence over time: Potential for false positives. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2014;70(2):195–8.
- do Nascimento ME, Zoghbi M das GB, Brasil Pereira Pinto JE, Vilela Bertolucci SK. Chemical variability of the volatiles of *Copaifera langsdorffii* growing wild in the Southeastern part of Brazil. *Biochem Syst Ecol*. 2012;43:1–6.
- Nersesyan A, Kundi M, Waldherr M, Setayesh T, Mišík M, Wultsch G, et al. Results of micronucleus assays with individuals who are occupationally and environmentally exposed to mercury, lead and cadmium. *Mutat Res Mutat Res*. 2016;770:119–39.
- Nogueira MS. Desenvolvimento de comprimidos e isolamento de marcadores a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf. Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto; 2011.
- Nogueira MS, Furtado RA, Bastos JK. Flavonoids and methoxy-galloylquinic acid derivatives from the leaf extract of *Copaifera langsdorffii* Desf. *J Agric Food Chem*. 2015;63(31):6939–45.
- Nugroho A, Choi JK, Park JH, Lee KT, Cha BC, Park HJ. Two new flavonol glycosides from *Lamium amplexicaule* L. and their in vitro free radical scavenging and tyrosinase inhibitory activities. *Planta Med*. 2009;75(4):364–6.
- Ohsaki A, Yan LT, Ito S, Edatsugi H, Iwata D, Komoda Y. The isolation and *in vivo* potent antitumor activity of clerodane ditrpenoid from the oleoresin of the brazilian medicinal plant *Copaifera langsdorffii* Desf. *Bioorg Med Chem Lett*. 1994;4(24):2889–92.
- Oliveira DF, Pereira AC, Figueiredo HCP, Carvalho DA, Silva G, Nunes AS, et al. Antibacterial activity of plant extracts from Brazilian southeast region. *Fitoterapia*. 2007;78(2):142–5.
- Oliveira RB De, Coelho EB, Rodrigues MR, Costa-Machado ARDM, Sousa JPB De, Berretta AA, et al. Effect of the *Copaifera langsdorffii* Desf. leaf extract on the ethylene glycol-induced nephrolithiasis in rats. *Evidence-Based Complement Altern Med*. 2013;2013:1–10.
- Ossola B, Kääriäinen TM, Männistö PT. The multiple faces of quercetin in neuroprotection. *Expert Opin Drug Saf*. 2009;8(4):397–409.
- Paiva LA., Gurgel L., Campos A., Silveira E., Rao VS. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Life Sci*. 2004a;75(16):1979–87.
- Paiva LA., Gurgel L., De Sousa E., Silveira E., Silva R., Santos F., et al. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. *J Ethnopharmacol*. 2004b;93(1):51–6.
- Paiva LA., Rao VS., Gramosa N., Silveira E. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. *J Ethnopharmacol*. 1998;62(1):73–

8.

- Paiva LAF, de Alencar Cunha KM, Santos FA, Gramosa N V., Silveira ER, Rao VSN. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Phyther Res.* 2002a;16(8):737–9.
- Paiva LAF, Gurgel LA, Silva RM, Tomé AR, Gramosa NV, Silveira ER, et al. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. *Vascul Pharmacol.* 2002b;39(6):303–7.
- Parran DK, Barone S, Mundy WR. Methylmercury decreases NGF-induced TrkA autophosphorylation and neurite outgrowth in PC12 cells. *Dev Brain Res.* 2003;141(1–2):71–81.
- Pereira DM, Valentão P, Pereira JA, Andrade PB. Phenolics: from chemistry to biology. *Molecules.* 2009;14(6):2202–11.
- Pessina A, Malerba I, Gribaldo L. Hematotoxicity testing by cell clonogenic assay in drug development and preclinical trials. *Curr Pharm Des.* 2005;11(8):1055–65.
- Pieri FA, Mussi MC, Fiorini JE, Schneedorf JM. Efeitos clínicos e microbiológicos do óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) sobre bactérias formadoras de placa dental em cães. *Arq Bras Med Veterinária e Zootec.* 2010;62(3):578–85.
- Pieri FA, Mussi MCM, Fiorini JE, Moreira MAS, Schneedorf JM. Bacteriostatic effect of copaiba oil *Copaifera officinalis* against *Streptococcus mutans*. *Braz Dent J.* 2012;23(1):36–8.
- Pieri FA, Souza CF, Costa JCM, Barrero MAO, Espescht IF, Silva VO, et al. Inhibition of *Escherichia coli* from mastitic milk by copaiba oil. *Semin Ciências Agrárias.* 2011;32(Supl):1929–34.
- Plowden C. Notes on Economic Plants. *Econ Bot.* 1988;42(3):442–51.
- Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chemie Int Ed.* 2011;50(3):586–621.
- Ramos AA, Lima CF, Pereira ML, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: Evaluation by the comet assay. *Toxicol Lett.* 2008;177(1):66–73.
- Rampersad SN. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors.* 2012;12(12):12347–60.
- Ribeiro DA, Oliveira LGS De, Macêdo DG de, Menezes IRA De, Costa JGM Da, Silva MAP Da, et al. Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol.* 2014;155(3):1522–33.
- Rothen-Rutishauser B, Blank F, Mühlfeld C, Gehr P. *In vitro* models of the human epithelial airway barrier to study the toxic potential of particulate matter. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008;4(8):1075–89.
- Rothschild Z. Cromatografia por exclusão. In: Collins CH, Braga GL, Bonato P., organizadores. *Fundamentos de cromatografia.* Campinas: Editora da UNICAMP; 2006. p. 452.
- Sâmia RR, de Oliveira RL, Moscardini VF, Carvalho GA. Effects of aqueous extracts of *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae) on the growth and reproduction of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotrop Entomol.* 2016;45(5):580–7.

- Sanders T, Liu Y-M, Tchounwou PB. Cytotoxic, genotoxic, and neurotoxic effects of Mg, Pb, and Fe on pheochromocytoma (PC-12) cells. *Environ Toxicol*. 2015;30(12):1445–58.
- Santana JS, Sartorelli P, Lago JHG, Matsuo AL. Isolamento e avaliação do potencial citotóxico de derivados fenólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Quim Nova*. 2012;35(11):2245–8.
- Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veiga Junior VF, Pinto AC, Nakamura CV. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008a;103(3):277–81.
- Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veiga Junior VF, Pinto AC, Nakamura CV. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. *J Ethnopharmacol*. 2008b;120(2):204–8.
- Santos MRA, Lima MR, Oliveira CLLG. Medicinal plants used in Rondônia, Western Amazon, Brazil. *Rev Bras Plantas Med*. 2014;16(3):707–20.
- Scherließ R. The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity *in vitro* on respiratory epithelial cells. *Int J Pharm*. 2011;411(1–2):98–105.
- Senedese JM, Alves JM, Lima IM de S, de Andrade EAP, Furtado RA, Bastos JK, et al. Chemopreventive effect of *Copaifera langsdorffii* leaves hydroalcoholic extract on 1,2-dimethylhydrazine-induced DNA damage and preneoplastic lesions in rat colon. *BMC Complement Altern Med*. 2013;13(1):3.
- Sharifi AM, Hadi S, Bakhshayesh M, Khakinegad F, Mahmoudian M, Oryan S. Study of correlation between lead-induced cytotoxicity and nitric oxide production in PC12 cells. 2005;160:43–8.
- da Silva Machado C, Mendonça LM, Venancio V de P, Bianchi MLP, Antunes LMG. Coenzyme Q10 protects PC12 cells from cisplatin-induced DNA damage and neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 2013;36:10–6.
- Singh R, Gautam N, Mishra A, Gupta R. Heavy metals and living systems: An overview. *Indian J Pharmacol* [Internet]. 2011;43(3):246. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21713085>
- Sinitox. Tabela 4. Casos Registrados de Intoxicação Humana, de Intoxicação Animal e de Solicitação de Informação por Agente Tóxico. Brasil, 2013. [Internet]. 2013 [citado 27 de junho de 2017]. Available at: <http://sinitox.iciet.fiocruz.br/dados-nacionais>
- Slotkin TA, MacKillop EA, Ryde IT, Tate CA, Seidler FJ. Screening for developmental neurotoxicity using PC12 cells: comparisons of organophosphates with a carbamate, an organochlorine, and divalent nickel. *Environ Health Perspect*. 2006;115(1):93–101.
- Sousa JP, Brancalion AP, Júnior MG, Bastos JK. A validated chromatographic method for the determination of flavonoids in *Copaifera langsdorffii* by HPLC. *Nat Prod Commun*. 2012;7:25–8.
- Souza AB, Martins CHG, Souza MGM, Furtado NAJC, Heleno VCG, de Sousa JPB, et al. Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. *Phyther Res*. 2010;25(2):215–20.
- Souza RKD, Silva MAP Da, Menezes IRA De, Ribeiro DA, Bezerra LR, Souza MMDA. Ethnopharmacology of medicinal plants of Carrasco, northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2014;157:99–104.
- Sponchiado G, Adam ML, Silva CD, Silva Soley B, De Mello-Sampayo C, Cabrini DA, et al.

- Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: a systematic review. *J Ethnopharmacol.* 2016;178:289–96.
- Stoddart MJ. *Mammalian Cell Viability*. Stoddart MJ, organizador. Totowa, NJ: Humana Press; 2011. (Methods in Molecular Biology; vol. 740).
- Suárez AI, Chavez K, Blanco Z, Compagnone RS, Tillett S, Torrico F. Estudio fitoquímico de la corteza de *Croton gossypifolius* colectada en Venezuela. *Rev Latinoam química.* 2013;41(3):161–70.
- Sun YJ, Pei LX, Wang KB, Sun YS, Wang JM, Zhang YL, et al. Preparative isolation of two prenylated biflavonoids from the roots and rhizomes of *Sinopodophyllum emodi* by Sephadex LH-20 column and High-Speed Counter-Current chromatography. *Molecules.* 2016;21(1):1–13.
- Sutton DJ, Tchounwou PB, Ninashvili N, Shen E. Mercury induces cytotoxicity and transcriptionally activates stress genes in human liver carcinoma (HepG2) Cells. *Int J Mol Sci.* 2002;3(9):965–84.
- Tappin MRR, Pereira JFG, Lima LA, Siani AC, Mazzei JL, Ramos MFS. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. *Quim Nova.* 2004;27(2):236–40.
- Tchounwou PB, Yedjou CG, Foxx DN, Ishaque AB, Shen E. Lead-induced cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Mol Cell Biochem.* 2004;255(1/2):161–70.
- Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. Heavy metal toxicity and the environment. *EXS.* 2012;101:133–64.
- Tian G, Zhang T, Yang F, Ito Y. Separation of gallic acid from *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A.* 2000;886(1–2):309–12.
- Vargas FDS, De Almeida PDO, Aranha ESP, Boleti APDA, Newton P, De Vasconcellos MC, et al. Biological activities and cytotoxicity of diterpenes from *Copaifera* spp. oleoresins. *Molecules.* 2015;20(4):6194–210.
- Vechia CAD, Morais B, Schonell AP, Diel KA., Faust C, Menin C, et al. Isolamento químico e validação analítica por cromatografia líquida de alta eficiência de quercitrina em *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). *Rev Bras Plantas Med.* 2016;18(1 suppl 1):288–96.
- Vega-Avila E, Pugsley MK. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proc West Pharmacol Soc.* 2011;54(January):10–4.
- Veiga Jr. VF, Patitucci ML, Pinto AC. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. *Quim Nova.* 1997;20(6):612–5.
- Veiga Junior VF, Pinto AC. O gênero *Copaifera* L. *Quim Nova.* 2002;25(2):273–86.
- Veiga Junior VF, Pinto AC, Maciel MAM. Plantas medicinais: cura segura? *Quim Nova.* 2005;28(3):519–28.
- Viriato EP, Bianchetti ES, Santos KC, Vaz AF, Campos M V, Pereira AP, et al. Study of high dilutions of copaiba oil on inflammatory process. *Int J High Dilution Res.* 2009;8(26):9–14.
- Vrba J, Kren V, Vacek J, Papouskova B, Ulrichova J. Quercetin, quercetin glycosides and taxifolin differ in their ability to induce AhR activation and cyp1a1 expression in HepG2

- cells. *Phyther Res.* 2012;26(11):1746–52.
- Wagner H, Bladt S. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. 2nd ed. Munich: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1996.
- Wang H, Chen B, He M, Yu X, Hu B. Selenocystine against methyl mercury cytotoxicity in HepG2 cells. *Sci Rep.* 2017;7(1):147.
- Xu J, Ji LD, Xu LH. Lead-induced apoptosis in PC 12 cells: involvement of p53, Bcl-2 family and caspase-3. *Toxicol Lett.* 2006;166(2):160–7.
- Yang C, Tang Q, Liu J, Zhang Z, Liu W. Preparative isolation and purification of phenolic acids from *Smilax china* by high-speed counter-current chromatography. *Sep Purif Technol.* 15 de julho de 2008;61(3):474–8.
- Yang U-J, Park T-S, Shim S-M. Protective effect of chlorophyllin and lycopene from water spinach extract on cytotoxicity and oxidative stress induced by heavy metals in human hepatoma cells. *J Toxicol Environ Heal Part A.* 2013;76(23):1307–15.
- Yedjou CG, Tchounwou CK, Haile S, Edwards F, Tchounwou PB. N-Acetyl-Cysteine protects against DNA damage associated with lead toxicity in HepG2 cells. *Ethn Dis.* 2010;20(1):S1-101–3.

APÊNDICES

Apêndice 1. Perfil cromatográfico da fração em diclorometano obtida a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. langsdorffii*. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min.

254 nm

280 nm

360 nm

Apêndice 2. Perfil cromatográfico da fração *n*-BuOH-H₂O obtida a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. langsdorffii*. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min.

254 nm **280 nm** **360 nm**

Apêndice 3. Perfil cromatográfico do resíduo aquoso obtido a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. langsdorffii*. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 × 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min., 50-90% de B até 65 min., de 90-15% de B até 70 min., seguidos por mais 5 min de 15% de B. Vazão: 1 mL/min.

254 nm **280 nm** **360 nm**

Apêndice 4. Estrutura química, espectro de massas (modo negativo) e de RMN de ^1H (DMSO d_6 ; 500 MHz) da quercitrina (quercetina-3- O - α -L-raminopiranosídeo); $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$; 448,10 g/mol.

Apêndice 5. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 da quercitrina (quercetina-3-*O*- α -L-raminopiranosídeo) em DMSO d_6 (500 MHz).

Apêndice 6. Mapas de contorno de HSQC e HMBC da quercitrina (quercetina-3-*O*- α -L-raminopiranosídeo) em DMSO d_6 (500 MHz).

Apêndice 7. Estrutura química, espectro de massas (modo negativo) e de RMN de ^1H (DMSO d_6 ; 500 MHz) da afzelina (canferol-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo); $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$; 432,1 g/mol.

Apêndice 8. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 da afzelina (canferol-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo) em DMSO d_6 (500 MHz).

Apêndice 9. Mapas de contorno de HSQC e HMBC da afzelina (canferol-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo) em DMSO d_6 (500 MHz).

Apêndice 10. Estrutura química, espectro de massas (modo negativo) e de RMN de ^1H (CD_3OD ; 500 MHz) do composto AGQ1 (ácido 3''-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico); $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$; 510 g/mol.

Apêndice 11. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 do composto AGQ1 (ácido 3''-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico); $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$; 510 g/mol.

Apêndice 12. Mapas de contorno de HSQC e HMBC do composto AGQ1 (ácido 3''-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico) em CD₃OD (500 MHz).

Apêndice 13. Estrutura química, espectro de massas (modo negativo) e de RMN de ^1H (CD_3OD ; 500 MHz) do composto AGQ2 (ácido 3',3''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico); $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{14}$; 524 g/mol.

Apêndice 14. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 do composto AGQ2 (ácido 3',3''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico); $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{14}$; 524 g/mol.

Apêndice 15. Mapas de contorno de HSQC e HMBC do composto AGQ2 (ácido 3',3''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico); C₂₃H₂₄O₁₄; 524 g/mol.

Apêndice 16. Estrutura química, espectro de massas (modo negativo) e de RMN de ^1H (CD_3OD ; 500 MHz) do composto AGQ3 (ácido 3',3''-di-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico); $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{14}$; 524 g/mol.

Apêndice 17. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 do composto AGQ3 (ácido 3',3''-di-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico); $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{14}$; 524 g/mol.

Apêndice 18. Mapas de contorno de HSQC e HMBC do composto AGQ3 (ácido 3',3''-di-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico); C₂₃H₂₄O₁₄; 524 g/mol.

Apêndice 19. Estrutura química, espectro de massas (modo negativo) e de RMN de ^1H (CD_3OD ; 500 MHz) do composto AGQ4 (ácido 3',3''-di-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico); $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{14}$; 524 g/mol.

Apêndice 20. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 do composto AGQ4 (ácido 3',3''-di-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico); $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{14}$; 524 g/mol.

Apêndice 21. Mapas de contorno de HSQC e HMBC do composto AGQ4 (ácido 3',3''-di-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico); C₂₃H₂₄O₁₄; 524 g/mol.

Apêndice 22. Estrutura química, espectro de massas (modo negativo) e de RMN de ^1H (CD_3OD ; 500 MHz) do composto AGQ5 (ácido 3'-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico); $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$; 510 g/mol.

Apêndice 23. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 do composto AGQ5 (ácido 3'-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico); $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{14}$; 524 g/mol.

Apêndice 24. Mapas de contorno de HSQC e HMBC do composto AGQ5 (ácido 3'-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico); C₂₃H₂₄O₁₄; 524 g/mol.

Apêndice 25. Estrutura química, espectro de massas (modo negativo) e de RMN de ^1H (CD_3OD ; 500 MHz) do composto AGQ6 (ácido 3,5-di-*O*-galoilquínico); $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{14}$; 496 g/mol.

Apêndice 26. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 do composto AGQ6 (ácido 3,5-di-*O*-galoilquínico); $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{14}$; 496 g/mol.

Apêndice 27. Mapas de contorno de HSQC e HMBC do composto AGQ6 (ácido 3,5-di-*O*-galoilquínico); C₂₁H₂₀O₁₄; 496 g/mol.

Apêndice 28. Estrutura química, espectro de massas (modo negativo) e de RMN de ^1H (CD_3OD ; 500 MHz) do composto AGQ7 (ácido 3'-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico); $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$; 510,1 g/mol.

Apêndice 29. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 do composto AGQ7 (ácido 3'-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico); $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$; 510,1 g/mol.

Apêndice 30. Mapas de contorno de HSQC e HMBC do composto AGQ7 (ácido 3'-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico); C₂₂H₂₂O₁₄; 510,1 g/mol.

Apêndice 31. Estrutura química, espectro de massas (modo negativo) e de RMN de ^1H (CD_3OD ; 500 MHz) do composto AGQ8 (ácido 3''-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico); $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$; 510,1 g/mol.

Apêndice 32. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 do composto AGQ8 (ácido 3''-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico); $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$; 510,1 g/mol.

Apêndice 33. Mapas de contorno de HSQC e HMBC do composto AGQ8 (ácido 3''-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico); C₂₂H₂₂O₁₄; 510,1 g/mol.

Apêndice 34. Estrutura química, espectro de massas (modo negativo) e de RMN de ^1H (CD_3OD ; 500 MHz) do composto AGQ9 (ácido 3',3'',3'''-tri-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico); $\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{O}_{18}$; 690,1 g/mol.

Apêndice 35. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 do composto AGQ9 (ácido 3',3'',3'''-tri-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico); $\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{O}_{18}$; 690,1 g/mol.

Apêndice 36. Mapas de contorno de HSQC e HMBC do composto AGQ9 (ácido 3',3'',3'''-tri-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico); C₃₁H₃₀O₁₈; 690,1 g/mol.

Apêndice 37. Estrutura química, espectro de massas (modo negativo) e de RMN de ^1H (CD_3OD ; 500 MHz) do composto AGQ10 (ácido 3''-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico); $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{O}_{18}$; 662,1 g/mol.

Apêndice 38. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 do composto AGQ10 (ácido 3''-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico); $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{O}_{18}$; 662,1 g/mol.

Apêndice 39. Mapas de contorno de HSQC e HMBC do composto AGQ10 (ácido 3''-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico); C₂₉H₂₆O₁₈; 662,1 g/mol.