



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RICARDO LUÍS NASCIMENTO DE MATOS

**PERFIL FITOQUÍMICO E SOLIDAGENONA ISOLADA DE
RAÍZES DE *SOLIDAGO CHILENSIS* MEYEN:
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS EM MODELOS BIOLÓGICOS
EXPLANTES DE PELE DE SUÍNO**

RICARDO LUÍS NASCIMENTO DE MATOS

**PERFIL FITOQUÍMICO E SOLIDAGENONA ISOLADA DE
RAÍZES DE *SOLIDAGO CHILENSIS* MEYEN:
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS EM MODELOS BIOLÓGICOS
EXPLANTES DE PELE DE SUÍNO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial a obtenção do Título de MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense

Londrina
2019

RICARDO LUÍS NASCIMENTO DE MATOS

**PERFIL FITOQUÍMICO E SOLIDAGENONA ISOLADA DE RAÍZES
DE *SOLIDAGO CHILENSIS* MEYEN:
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS EM MODELOS BIOLÓGICOS EXPLANTES
DE PELE DE SUÍNO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial a obtenção do Título de MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Marcelle de Lima Ferreira Bispo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 08 de fevereiro de 2019.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Matos, Ricardo Luís Nascimento de.

Perfil fitoquímico e Solidagenona isolada de raízes de *Solidago chilensis* Meyen: avaliação dos efeitos em modelos biológicos explantes de pele de suíno. / Ricardo Luís Nascimento de Matos. - Londrina, 2019.
115 f. : il.

Orientador: Nilton Syogo Arakawa.

Coorientador: Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Fitoquímica - Tese. 2. *ex vivo* - Tese. 3. Arnica-Brasileira - Tese. I. Arakawa, Nilton Syogo . II. Bracarense, Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. IV. Título.

Dedico este trabalho a todos os leitores, principalmente aos curiosos.

AGRADECIMENTOS

São muitas as pessoas que participaram deste trabalho direta e indiretamente. Primeiramente gostaria de agradecer à minha esposa, a qual me trouxe para Londrina e me introduziu ao meio científico sem imaginar o quanto me faria apaixonar pela pesquisa. Aos meus pais, irmãos, e toda minha família que me apoiam e me incentivam de longe, os quais senti muita falta, mas sei que sempre estão junto de mim em todos os momentos, principalmente naquele em que vi a formação do meu primeiro cristal dentro do balão. Ao meu sogro e sogra, que na verdade também são meus pais, por todo o apoio e carinho que me receberam e confiança por me entregar a joia mais preciosa deles, minha esposa! Meu pai científico, Prof. Dr. Nilton Arakawa, que me recebeu de braços abertos mesmo sem eu ter nenhuma experiência prévia com tantos reagentes tóxicos, além de me apoiar e permitir minha evolução ao longo desses dois anos, orientando em todos os momentos em que precisei.

Minha mãe científica, Profa. Dra. Ana Paula Bracarense, nem tenho palavras para expressar os meus agradecimentos, além da admiração imensa, inclusive por lembrar a minha mãe.

Sou grato por ter chegado até aqui e ter criado laços familiares por onde passei e tenho passado ao longo de todos esses anos vida, que me prepararam para sempre ser uma pessoa melhor.

Agradeço à UEL e a todos que fazem essa máquina se mover rumo ao futuro com inovações, junto dela os residentes, funcionários, técnicos, professores, alunos de iniciação Científica e estagiários.

Agradeço em especial aos professores e funcionários dos Laboratórios da Universidade Estadual de Londrina que participaram do desenvolvimento dessa dissertação: Laboratório de Espectroscopia (LABSPEC), Laboratório de Desenvolvimento de Instrumentação e Automação Analítica (LABDIA), Laboratório de Reprodução Animal (REPROA), Laboratório de Medicina Aviária (LMA), Laboratório de Difração de Raio-X (LDRX), Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA), Laboratório de Virologia Animal, Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise (LMEM), Cepos, Laboratório de Pós-Graduação (LPG), Laboratório de Análises de Materiais e Moléculas (LAMM), Laboratório de Protozoologia, Laboratório de Química Orgânica e principalmente aos dois que passei a maior parte do meu tempo em experimentos Laboratório de Patologia Animal (LAP) e Laboratório de BioTransformação e Fitoquímica (LabBioTransFito) e o Laboratório Fenn de Espectrometria de Massas na UFPR - Campus Jandaia do Sul.

Agradeço aos órgãos de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Bom, não me estenderei, afinal, se for agradecer a todos terei que escrever uma tese.

Muito obrigado, por sua atenção, realmente sou muito grato.

Aproveite a vida tanto quanto EU.

MATOS, Ricardo Luís Nascimento. **Perfil fitoquímico e solidagenona isolada de raízes de *Solidago chilensis* Meyen**: avaliação dos efeitos em modelos biológicos explantes de pele de suíno. 2019. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

Solidago chilensis Meyen (Asteraceae) é uma planta utilizada na medicina popular em diferentes tipos de traumas, contusões, analgésica e anti-inflamatória. No entanto, poucos estudos caracterizaram os compostos isolados e avaliaram a atividade terapêutica. O objetivo deste estudo foi identificar as principais classes de metabólitos secundários de raízes de *S. chilensis* M., isolar e identificar a solidagenona e verificar seu efeito biológico em modelo explante de pele de suíno. As raízes foram coletadas 22/03/2017 durante a floração e secas em estufa (50 °C). O perfil fitoquímico na identificação das classes de metabólitos secundários procedeu com ensaios gerais de complexação, turvação, precipitação, colorimétricos, afrogênico e cromatografia em camada delgada comparativa. O extrato bruto de raízes diclorometânico foi obtido por maceração exaustiva, seco por rotaevaporação e fracionado em cromatografia líquida a vácuo em gradiente crescente de polaridade. A solidagenona foi isolada, após sucessivas lavagens com metanol gelado e recristalizada para a determinação estrutural realizada por espectrometria de massa de ionização por *eletrospray* (MS-ESI), ressonância magnética nuclear (RMN) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Utilizou-se microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de raio-X para avaliação morfológica dos cristais, além de análise térmica do ponto de fusão (PF). A avaliação dos efeitos biológicos *ex vivo* com pele de suíno foi realizada durante oito dias de incubação e seis tratamentos - controle, DMSO 0,5%, extrato bruto (0,1 mg mL⁻¹) e solidagenona (0,06, 0,03 e 0,01 mg mL⁻¹), usando DMSO como veículo. A integridade tecidual foi realizada por escore morfológico histológico e por resposta oxidativa a cada dois dias de incubação. Para análises estatísticas aplicou-se ANOVA e teste de Tukey (p < 0,05). As classes de metabólitos secundários identificadas foram flavonoides, taninos hidrolisáveis, saponinas e terpenos. Da fração 8:2 isolou-se 1,3 g de solidagenona (correspondendo a 3,3% do extrato bruto – m/m), de peso molecular de 316 m z⁻¹, verificada por MS-ESI e os resultados espectroscópicos de deslocamento químico de carbono e hidrogênio de RMN corroboram a literatura. Observou-se pureza relativa de 98% de solidagenona identificada por CLAE. Os cristais apresentaram formato hexagonal observado pela MEV, sugerindo a formação de redes cristalográficas hexagonais em duas fases avaliadas por difração de raios X e PF 131 °C. As principais alterações morfológicas na pele – apoptose, degeneração e fenda derme-epiderme – foram observadas em todos os tratamentos. No entanto, o escore morfológico do tratamento utilizando a maior dose de solidagenona (0,06 mg mL⁻¹) diferiu estatisticamente do DMSO no quarto, sexto e oitavo dias, mantendo a melhor integridade tecidual e aumentou a capacidade antioxidante no sexto dia, em relação ao DMSO e ao controle. Conclui-se que as raízes de *S. chilensis* contêm flavonoides, taninos hidrolisáveis, saponinas e terpenos como classes de metabólitos secundários, identifica a solidagenona como composto principal, indicando um possível efeito protetor tecidual aos explantes de pele com este metabólito.

Palavras-chave: Perfil fitoquímico. Terpenos. Integridade tecidual. *Ex vivo*. Resposta oxidativa.

MATOS, Ricardo Luís Nascimento. **Phytochemical analysis and solidagenone isolated from roots of *Solidago chilensis* Meyen**: evaluation of effects in biological models explants of pig skin. 2019. 115 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Solidago chilensis Meyen (Asteraceae) is used in folk medicine for several types of traumas, contusions, analgesic and anti-inflammatory activities. However, few studies have characterized the main compounds and evaluated their therapeutic activity. The aim of this study was to identify the main compound from roots of *S. chilensis* M., isolate and elucidate the solidagenone and to verify its effects on pig skin explant. The roots were collected at 03/22/2017 during flowering and dried in oven (50°C). The phytochemical profiles of the secondary metabolites proceeded with general tests of complexation, turbidity, precipitation, colorimetric, afrogenic and comparative thin layer chromatography. The crude extract of dichloromethane roots was obtained by exhaustive maceration, dried under vacuum and fractionated by vacuum liquid chromatography under increasing polarity gradient. The solidagenone washed with cold methanol and recrystallized for structural determination by electrospray ionization mass spectrometry (MS-ESI), nuclear magnetic resonance (NMR) and high performance liquid chromatography (HPLC). Scanning electron microscopy (SEM) and X-ray diffraction were used for morphological evaluation of the crystals, as well as thermal analysis by melting point determination. The evaluation of the *ex vivo* biological effects with porcine skin was performed during eight days of incubation and six treatments – control, DMSO 0.5%, crude extract (0.1 mg mL⁻¹) and solidagenone (0.06, 0.03 and 0.01 mg mL⁻¹), using DMSO as vehicle. Tissue integrity was performed by histological morphological score and by oxidative response every two days of incubation. Statistical analyzes were conducted with ANOVA and Tukey test (p < 0.05). The classes of secondary metabolites identified were flavonoids, hydrolysable tannins, saponins and terpenes. It was isolated 1.3 g of solidagenone (3.3% of the crude extract – w/w) from the fraction 8:2, with molecular weight of 316 m z⁻¹ verified by MS-ESI, and the spectroscopic results of chemical carbon displacement and NMR hydrogen reinforce the literature. Relative purity of 98% solidagenone identified by HPLC was observed. The crystals showed a hexagonal shape observed by SEM, suggesting the formation of hexagonal crystallographic networks with two phases evaluated by X-ray diffraction and PF 131°C. The main morphological skin alterations - apoptosis, degeneration and dermis-epidermal cleft - were observed in all treatments. However, the morphological treatment score using the highest dose of solidagenone (0.06 mg mL⁻¹) differed statistically from DMSO on the fourth, sixth and eighth days, maintaining the tissue integrity and increased antioxidant capacity on the sixth day, in relation to DMSO and control. It is concluded that the roots of *S. chilensis* contain flavonoids, hydrolysable tannins, saponins and terpenes as classes of secondary metabolites, identifying the solidagenone as main compound, indicating a possible protective effect for skin explants with this metabolite.

Key-words: Phytochemical. Terpene. Tecdial integrity. *Ex vivo*. Oxidative response.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	<i>Solidago chilensis</i> antes (A) e durante a floração (B) e planta inteira (C).....	20
Figura 2	Núcleos isopentenil difosfato (A) e isopreno (B) para a síntese dos terpenóides.....	25
Figura 3	Modelos de condensações entre duas moléculas de isopreno.....	25
Figura 4	Estrutura química de óleos voláteis cíclicas e acíclicas de monoterpenos.....	26
Figura 5	Estrutura química do taxol (núcleo taxano em vermelho).....	26
Figura 6	Estrutura molecular do triterpeno (ácido oleanólico).....	27
Figura 7	Estrutura molecular de tetraterpeno (β -Caroteno).....	27
Figura 8	Esqueleto básico do núcleo bicíclico de diterpenos do tipo labdano.....	28
Figura 9	Estrutura química do diterpeno solidagenona.....	29
Figura 10	Reação química da atividade antioxidante de captura do radical $ABTS\cdot^+$	33
Figura 11	Reação química da atividade antioxidante por redução de íons Ferro (FRAP).....	33
Figura 12	Reação química da redução do reagente azul de nitrotetrazólio (NBT) por ânion superóxido.....	34
Figura 13	Cálculo para determinação do índice afrosimétrico.....	39
Figura 14	Núcleos flavonoídicos identificado em <i>Solidago chilensis</i>	53
Figura 15	Classes de metabólitos secundários taninos hidrolisáveis e condensados.....	54
Figura 16	Classes de metabólitos secundários núcleo antraquinônico.....	55
Figura 17	Classes de metabólitos secundários núcleo cumárico.....	55
Figura 18	Classes de metabólitos secundários com núcleos alcaloídicos.....	55
Figura 19	Classes de metabólitos secundários núcleo saponina triterpênica.....	56
Figura 20	Precipitado branco obtido do fracionamento do extrato bruto das raízes de <i>Solidago chilensis</i> na fração 8:2.....	58
Figura 21	Solidagenona isolada das raízes de <i>Solidago chilensis</i>	59

Figura 22	Fragmentação da solidagenona isolada das raízes de <i>Solidago chilensis</i> , em modo negativo por MS-ESI.....	59
Figura 23	Identificação numérica sequencial de identificação dos átomos de carbonos da solidagenona isolada das raízes de <i>Solidago chilensis</i>	60
Figura 24	Ampliação do espectro 1D de RMN de ¹ H de solidagenona em dos H15, H16 e H14 em CDCl ₃	62
Figura 25	Ampliação do espectro 2D HMBC para formação do anel furano presente na solidagenona em CDCl ₃	63
Figura 26	Ampliação do COSY para confirmar do anel furano a partir do acoplamento dos Hidrogênios de solidagenona em CDCl ₃	63
Figura 27	Ampliação do espectro 2D HMBC destacando o acoplamento do H17 aos C7 e C8 de solidagenona em CDCl ₃	64
Figura 28	Ampliação do espectro 2D HMBC do H7 demonstrando o acoplamento ao C9 de solidagenona em CDCl ₃	64
Figura 29	Ampliação do espectro 2D HMBC do H7 demonstrando o acoplamento ao C5 e C17 de solidagenona em CDCl ₃	65
Figura 30	Ampliação do espectro 2D HMBC do H5 demonstrando o acoplamento de C1, C2, C3, C4, C10, C11, C12, C17, C18, C19 e C20 de solidagenona em CDCl ₃	66
Figura 31	Ampliação do espectro 2D HMBC destacando o acoplamento dos H11a e H11b aos C10, C9, C13 e C8 de solidagenona em CDCl ₃	66
Figura 32	Ampliação do espectro de RMN 2D demonstrando o acoplamento de H3a (δ 1,17 ppm) observado no HSQC de solidagenona em CDCl ₃	67
Figura 33	Ampliação do espectro de RMN 2D demonstrando o acoplamento de H12 (δ 2,66 ppm) observado no HMBC de solidagenona em CDCl ₃ ...	68
Figura 34	Foto macroscópica do composto isolado de raízes de <i>Solidago chilensis</i> : A - cristal sem recristalização; B - cristal recristalizado.....	72
Figura 35	Microscopia eletrônica de varredura dos cristais isolados de <i>Solidago chilensis</i> : A1 vista lateral (sem recristalização); A2 vista transversal (sem recristalização); B1 vista lateral (recristalizado); B2 vista transversal (recristalizado).....	73
Figura 36	Orientação espacial das redes bravais cristalográficas de diterpenos ortorrômbica (A) e monocíclica (B).....	74

Figura 37	Orientação espacial das redes bravais cristalográficas hexagonal e formação de hexágono a partir do agrupamento de losango.....	75
Figura 38	Solidagenona em três conformações diferenciadas devido a ligação do anel A (formato cadeira) ao anel B (formato barco).....	75
Figura 39	Ensaio <i>in vitro</i> de hemólise por solidagenona em eritrócitos de ovinos.....	78
Figura 40	Alterações morfológicas evidenciadas em todos os tratamentos ao longo de 8 dias de incubação dos fragmentos de explantes de pele de orelha de suíno.....	80
Figura 41	Comparação entre os explantes de pele de orelha de suíno entre os tratamentos em dois dias e zero hora para o escore morfológico e a resposta oxidativa NBT.....	82
Figura 42	Escore morfológico, NBT e FRAP de explantes de pele de orelha de suíno comparando os tratamentos em quatro dias de incubação.....	83
Figura 43	Escore morfológico e resposta antioxidante FRAP de explantes de pele de orelha de suíno comparando os tratamentos em seis dias de incubação.....	84
Figura 44	Escore morfológico de explantes de pele de orelha de suíno comparando os tratamentos em oito dias de incubação.....	85
Figura 45	Resposta oxidativa NBT de explantes de pele de orelha de suíno ao longo do tempo de incubação de todos os tratamentos comparados aos explantes zero horas.....	87
Figura 46	Resposta antioxidante FRAP de explantes de pele de orelha de suíno ao longo do tempo de incubação de todos os tratamentos comparados aos explantes zero horas.....	87
Figura 47	Escore morfológico de explantes de pele de orelha de suíno ao longo do tempo de incubação de todos os tratamentos.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Uso popular terapêutico de espécies do gênero <i>Solidago</i> em outros países....	21
Tabela 2	Ensaio colorimétrico para identificação de subclasses de flavonoides em raízes de <i>Solidago chilensis</i> a partir da reação de Shinoda ou Cianidina.....	37
Tabela 3	Metodologia para determinação do índice afrosimétrico de raízes de <i>Solidago chilensis</i>	39
Tabela 4	Fracionamento do extrato bruto por Cromatografia Líquida à Vácuo em gradiente crescente de polaridade	42
Tabela 5	Exemplo de escore morfológico de explantes de pele de orelha suíno, as alterações e os diferentes graus de severidade.....	49
Tabela 6	Perfil fitoquímico qualitativo de metabólitos secundários presentes em raízes de <i>Solidago chilensis</i>	52
Tabela 7	Rendimento do fracionamento de CLV do extrato bruto de raízes de <i>Solidago chilensis</i>	58
Tabela 8	Dados dos espectros de massa ESI da fragmentação em modo negativo da solidagenona isolada de raízes de <i>S. chilensis</i>	59
Tabela 9	Dados dos espectros 1D de RMN de ¹³ C (100 MHz; δ em ppm), Dept 135 (+, - e ausente) e Dept 90 (+ e ausente) da solidagenona isolada de raízes de <i>Solidago chilensis</i> em CDCl ₃	60
Tabela 10	Dados dos espectros 1D de RMN de ¹ H (400 MHz; δ em ppm; <i>mult.</i> ; <i>J</i> em Hz) de solidagenona isolada de raízes de <i>Solidago chilensis</i> em CDCl ₃	61
Tabela 11	Dados dos espectros 2D de RMN de HSQC, HMBC e COSY de solidagenona isolada de raízes de <i>Solidago chilensis</i> em CDCl ₃	69
Tabela 12	Dados dos espectros 1D de RMN de ¹ H e ¹³ C de solidagenona isolada de <i>Solidago chilensis</i> em CDCl ₃ descritas por Schmeda-Hirschmann, Astudillo e Palenzuela (2004).....	70
Tabela 13	Dados do espectro de Infravermelho Transformada de Fourier de solidagenona isolada de raízes de <i>Solidago chilensis</i>	70
Tabela 14	Propriedades cristalográficas do composto C ₂₀ H ₂₈ O ₃ solidagenona isolado de raízes de <i>Solidago chilensis</i>	74
Tabela 15	Valores percentuais de integridade tecidual do escore morfológico de explantes de pele de orelha de suíno para todos os tratamentos durante oito dias de incubação.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina- 6-sulfônico
AcOEt	Acetato de Etila
ANVISA	Agência de vigilância sanitária
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
CLAE	Cromatografia de Líquida de Alta Eficiência
CLV	Cromatografia Líquida a Vácuo
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
<i>d</i>	Dupleto
DCM	Diclorometano
<i>dd</i>	Duplo dupleto
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencia
DTG	Termogravimetria Derivada
EB	Extrato Bruto
EDS	Espectroscopia de Dispersão Energética
FRAP	<i>Ferric-Reducing Ability of Plasma</i>
H&E	Hematoxilina e Eosina
Hex	Hexano
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
ITS	Insulina, Transferrina e Selênio
IV-TF	Infravermelho Transformada de Fourier
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
MeCN	Acetonitrila
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NBT	Azul de nitrotetrazólio
RF	Fator de retenção

RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<i>s</i>	Simpleto
<i>sl</i>	Simpleto largo
TGA	Análise Termogravimétrica
trr	Tempo de retenção relativo
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1	<i>SOLIDAGO CHILENSIS</i>	19
2.2	USO POPULAR DE <i>SOLIDAGO CHILENSIS</i>	20
2.3	EFEITO BIOLÓGICO DE <i>SOLIDAGO CHILENSIS</i>	22
2.4	COMPOSTOS QUÍMICOS ISOLADOS DE <i>SOLIDAGO CHILENSIS</i>	23
2.5	TERPENOS.....	24
2.5.1	DITERPENO: NÚCLEO LABDANO (SOLIDAGENONA).....	28
2.6	MODELO BIOLÓGICO <i>EX VIVO</i>	29
2.6.1	MODELO <i>EX VIVO</i> DE PELE.....	30
2.7	RESPOSTA OXIDATIVA.....	32
3	OBJETIVOS.....	35
3.1	OBJETIVO GERAL.....	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4	METODOLOGIA.....	36
4.1	COLETA DO VEGETAL E PREPARO DE EXSICATA.....	36
4.2	SECAGEM DE RAÍZES DE <i>SOLIDAGO CHILENSIS</i>	36
4.3	PERFIL FITOQUÍMICO QUALITATIVO.....	36
4.3.1	REAÇÕES DE IDENTIFICAÇÃO DE NÚCLEO FLAVONOÍDICOS.....	36
4.3.2	REAÇÃO DE STIASNY PARA DETERMINAÇÃO DE CLASSES DE TANINOS.....	37
4.3.3	REAÇÃO DE BORTRÄNGER INDIRETA PARA IDENTIFICAÇÃO DE ANTRAQUINONAS.....	37
4.3.4	REAÇÕES GERAIS PARA IDENTIFICAÇÃO DE ALCALÓIDES.....	38
4.3.5	ÍNDICE AFROSIMÉTRICO PARA IDENTIFICAÇÃO DE SAPONINAS.....	38
4.3.6	REAÇÕES PARA IDENTIFICAÇÃO DE CUMARINAS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COMPARATIVA (CCDC).....	39
4.3.7	REAÇÕES PARA IDENTIFICAÇÃO DE TERPENOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COMPARATIVA (CCDC).....	40

4.4	OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DICLOROMETÂNICO.....	40
4.5	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA O ISOLAMENTO DE SOLIDAGENONA.....	40
4.5.1	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC).....	40
4.5.2	Cromatografia Líquida à Vácuo (CLV).....	41
4.5.3	ISOLAMENTO E RECRISTALIZAÇÃO.....	41
4.6	ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL.....	43
4.6.1	Espectro de Massa <i>Electrospray ionization</i> (MS-ESI).....	43
4.6.2	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	43
4.6.3	Infravermelho por Transformada de Fourier (IV-TR).....	43
4.6.4	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	44
4.6.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	44
4.6.6	Espectro de Dispersão Energética (EDS).....	44
4.6.7	Difração de Raios – X.....	45
4.7	ANÁLISE TÉRMICA.....	45
4.7.1	Ponto de Fusão (PF).....	45
4.7.2	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	46
4.7.3	Análise Termogravimétrica (TGA).....	46
4.8	ATIVIDADE HEMOLÍTICA <i>IN VITRO</i>	46
4.9	ENSAIO BIOLÓGICO: MODELO <i>EX VIVO</i>	47
4.9.1	Escore Morfológico de explantes de pele.....	48
4.9.2	Estresse Oxidativo.....	49
4.9.2.1	Ensaio oxidante de redução tetrazólio nitroazul (NBT).....	49
4.9.2.2	Ensaio de atividade antioxidante ABTS e FRAP.....	50
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1	PERFIL FITOQUÍMICO QUALITATIVO.....	52
5.2	ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL.....	57
5.3	ANÁLISES TÉRMICAS.....	77
5.4	ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>IN VITRO</i> E <i>EX VIVO</i>	78
6	CONCLUSÃO.....	90

7	PERSPECTIVAS.....	91
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
	APÊNDICES.....	106

1 INTRODUÇÃO

A terapia com plantas medicinais geralmente é determinada pela presença dos compostos fitoquímicos e o sinergismo entre eles, que se apresentam em quantidades diferentes influenciados por diversos fatores tais como o órgão vegetal, do estágio de maturação e da região geográfica de coleta (DHAMI; MISHRA, 2015).

O desenvolvimento de produtos derivados de plantas medicinais para fins preventivos ou terapêuticos necessita de uma série de estudos prévios aos testes em seres humanos, iniciando-se desde a coleta, identificação botânica, análise química e testes de eficácia e de toxicidade (CHAVEERACH; SUDMOON; TANEE, 2017). Ressalta-se que alguns importantes estudos relacionados com o desenvolvimento de substâncias obtidas de recursos naturais ocorreram a partir do conhecimento ancestral etnofarmacológico de algumas comunidades (RATES, 2001).

A química de produtos naturais no Brasil está em ascensão devido à multidisciplinariedade das diversas áreas de conhecimento e colaborações científicas (BERLINCK et al., 2017). Estudos com medicamentos de origem vegetal insipidamente cresceram após o aumento de incentivos públicos (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009), auxiliando na compreensão entre o composto e seu efeito terapêutico (SAHOO; MANCHIKANTI; DEY, 2010).

Com relação ao estudo dos efeitos de tais medicamentos, uma alternativa experimental se apresenta no modelo de explante, por exemplo de tecido animal. O modelo de cultivo explante é caracterizado pela manutenção de pequenos fragmentos de vários tipos de tecidos, o que possibilita a redução nas quantidades de substâncias químicas a serem testadas, a avaliação dos efeitos terapêuticos e tóxicos diretos no tecido, além de favorecer a redução do número de animais em estudos experimentais (BASSO; BRACARENSE, 2013).

O objetivo deste estudo foi isolar a Solidagenona de *Solidago chilensis* Meyen (Arnica brasileira) e avaliar o efeito da substância isolada e do extrato bruto em modelo de explante de pele de suíno.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

No Brasil, o uso de plantas medicinais é muito praticado tanto por indígenas quanto por moradores da zona rural ou outras comunidades em diversos biomas brasileiros (DI STASI, 2007). Centenas destas espécies vegetais são empregadas na medicina tradicional brasileira (MACIEL *et al.*, 2002; DAMASCENO; BARBOSA, 2009; LIPORACCI; SIMÃO, 2013). As plantas da família Asteraceae possuem característica cosmopolita, sendo que, no Brasil ocorrem aproximadamente 250 gêneros e 2000 espécies e muitas delas são cultivadas como ornamentais ou para finalidades terapêuticas (SOUZA; LORENZI, 2008).

2.1 *SOLIDAGO CHILENSIS*

A planta *Solidago chilensis* Meyen, Asteraceae conhecida popularmente como arnica, arnica-brasileira, arnica-do-campo (LORENZI, 2000), arnica do Brasil, pronto-alívio, arnica silvestre, erva lanceta, sape-macho, lanceta (BRASILEIRO *et al.*, 2006), arnica-da-montanha, arnica-da-serra (RIBEIRO *et al.*, 2017), arnica da horta (LEITÃO *et al.*, 2013), é encontrada na região meridional da América do Sul (LORENZI; MATOS, 2002), e no território brasileiro está distribuída nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste, Sul e nos mais diversos biomas como caatinga, cerrado, pampa, mata Atlântica; principalmente no estado do Paraná (FORZZA *et al.*, 2010). Em solos agrícolas, é considerada invasora (LORENZI, 2000).

Solidago microglossa DC, sinonímia atual de *Solidago chilensis* (LORENZI; MATOS, 2008), possui folhas superiores lineares e quase sésseis, enquanto que as inferiores são lanceoladas, agudas e estreitas, variando de 5 a 9 cm de comprimento e 8 a 15 mm de largura (FARMACOPEIA-BRASILEIRA, 1929). As inflorescências são formadas por inúmeros capítulos florais amarelos (LORENZI, 2000) que medem de 2,5 a 5 mm de comprimento e estão distribuídas em ramos simples de 15 a 20 cm, possuindo cheiro aromático agradável e de sabor amargo (FARMACOPEIA-BRASILEIRA, 1929). São espécies herbáceas perenes, eretas, rizomatosas, variando de 0,8 a 1,5 metros de altura, com hastes finas e enfolhadas (Figura 1) e multiplicam-se por sementes e touceira (LORENZI, 2000). A classificação taxonômica da *Solidago chilensis*:

- Reino – Plantae
- Ordem Asterales
- Família – Asteraceae
- Subfamília – Asteroideae

Tribo – Astereae

Gênero *Solidago*

Espécie *Solidago chilensis* (JUDD et al., 2009).

Figura 1: *Solidago chilensis* antes (A), durante a floração (B) e planta inteira (C).



Fonte: Autor.

A *Solidago chilensis* possui finalidade terapêutica similar à *Arnica montana* (LORENZI; MATOS, 2008). Contudo, *Solidago microglossa* DC foi descrita somente na primeira Farmacopeia Brasileira com suas características morfológicas macro e microscópica e o emprego terapêutico na forma de tintura mãe e extrato fluido (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1929).

O Governo Federal, por meio da Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006, ampliou na rede pública a oferta de tratamentos ditos alternativos, como a fitoterapia, a homeopatia e a acupuntura (BRASIL, 2006). Posteriormente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) sob a portaria nº 2.960 regulamentou 71 espécies vegetais que são de interesse do Sistema Único de Saúde (SUS) e que constam na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) (BRASIL 2009), dentre elas constam a arnica-brasileira *Solidago microglossa* DC em consonância às Políticas Nacionais de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) (BRASIL 2009).

2.2 USO POPULAR DE *SOLIDAGO CHILENSIS*

Em levantamento etnofarmacológico de plantas com propriedades medicinais remanescentes da Floresta Ombrófila Mista Altomontana, Urupema, consta a *Solidago chilensis* (MARTINS-RAMOS; BORTOLUZZI; MANTOVANI, 2010), para tratamento de feridas, escoriações, traumatismos e contusões conforme descrito por Lorenzi e Matos (2008).

Em outros países, o uso popular de espécies do gênero *Solidago* relatado em estudos etnobotânicos ou etnofarmacológicos, sugerem uma maior incidência de relatos com atividade biológica em afecções e problemas de vias urinárias (IVANCHEVA; STANTCHEVA, 2000; MENKOVIĆ et al., 2011; ŠARIĆ-KUNDALIĆ et al., 2011; GRAS et al., 2017), enquanto, outras finalidades terapêuticas são semelhantes às relatadas na medicina popular brasileira. As indicações no uso tradicional em outros países estão descritas na Tabela 1.

TABELA 1: Uso popular terapêutico de espécies do gênero *Solidago* em outros países.

Espécie	Local	Uso popular	Referência
<i>S. chilensis</i> Meyen var. <i>chilensis</i>	Argentina	Sedativo e dor de cabeça	GOLENIOWSKI et al., 2006
<i>S. virgaurea</i> L.	Montenegro	Cicatrizante e gota	MENKOVIĆ et al., 2011
<i>S. virgaurea</i> L.	Franças	Anti-úlceras e cicatrizante	GRAS et al., 2017
<i>S. virgaurea</i> L.	Grecia	Doenças de pele, artrites e reumatismo	VOKOU; KATRADI; KOKKINI, 1993
<i>S. virgaurea</i> L. e <i>S. gigantea</i>	Bosnia	Detoxificação sanguínea e diarreia	ŠARIĆ-KUNDALIĆ et al., 2010
<i>S. virgaurea</i> L. e <i>S. gigantea</i>	Bosnia	Diarreia, reumatismo, artrites, detoxificação sanguínea e cicatrizante	ŠARIĆ-KUNDALIĆ et al., 2011
<i>S. decurrens</i>	China	Eczema e úlceras de pele	AU et al., 2008
<i>S. ulmifolia</i> Muhl	EUA	Estimulante	MOHAGHEGHZADEH et al., 2006
<i>S. virga-aurea</i> Act. var. <i>asiatica</i>	Coreia	Dores de cabeça, irritação na garganta, tonsilite, icterícia e hematomas	KIM; SONG; POTTER, 2006

No Brasil, estudos etnobotânicos ou etnofarmacológicos foram realizados em diversas regiões e evidenciaram a *Solidago chilensis* em São Paulo (DI STASI et al., 2002), Distrito de Governador Valadares (BRASILEIRO et al., 2006), Rio de Janeiro (PEREIRA; OLIVEIRA; LEMOS, 2005; LEITÃO et al., 2013), Serra Catarinense (MAIA, et al. 2011) e no Mato Grosso (BIESKI et al., 2012; BIESKI et al., 2015; RIBEIRO et al., 2017).

Baseado em estudos populares com a *S. chilensis*, a obtenção de extratos diferem entre as regiões que foram estudadas, podendo ser realizada a partir de processos de macerações (DI STASI et al., 2002; BOLSON et al., 2015; RIBEIRO et al., 2017), infusão (BIESKI et al., 2012; BOLSON et al., 2015; RIBEIRO et al., 2017), tinturas (BOLSON et al., 2015), decoctos (DI STASI et al., 2002), banhos (PEREIRA; OLIVEIRA; LEMOS, 2005), e suco (LEITÃO et al., 2013). O preparo dos extratos difere de acordo com a região que o estudo foi realizado, sendo indicado usar em alguns destes estudos o vegetal como um todo (DI STASI et al., 2002; RIBEIRO et al., 2017), as folhas (PEREIRA; OLIVEIRA; LEMOS, 2005; BOLSON et al., 2015) ou somente as inflorescências (BOLSON et al., 2015).

A partir do uso popular de *S. chilensis* no Brasil, destacam-se as indicações terapêuticas para problemas no sistema respiratório (tosse, gripe, pneumonia, bronquite, tuberculose e antibiótico para as vias aéreas) (BIESKI et al., 2012; LEITÃO et al., 2013; BIESKI et al., 2015; BOLSON et al., 2015), sistema locomotor (dores musculares, reumatismo, fraturas ósseas, contusões, traumas, relaxante muscular e inflamação articular) (DI STASI et al., 2002; BRASILEIRO et al., 2006; BIESKI et al., 2012; BIESKI et al., 2015; RIBEIRO et al., 2017), sistema reprodutor (problemas de próstata, infecções e inflamações uterina) (BIESKI et al., 2015), infecções (DI STASI et al., 2002), sedativo (DI STASI et al., 2002), analgésico (BRASILEIRO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2017), dermatológicos (BIESKI et al., 2015; BOLSON et al., 2015), detoxificante, hipertensão, anti-helmínticos e problemas renais (BIESKI et al., 2012), anemia (BIESKI et al., 2015), transtornos digestórios (DI STASI et al., 2002) acidez estomacal (TRIBESS et al., 2015), conjuntivites (BOLSON et al., 2015) dor de ouvido e auxílio na cicatrização (BRASILEIRO et al., 2006).

O uso tradicional de uma planta medicinal com a indicação segura é uma grande dificuldade (SAHOO; MANCHIKANTI; DEY, 2010), devido as diferenças entre os fatores intrínsecos (ontogenéticos) e externos (cultivo, região geográfica, solo, irrigação) de cada planta (EMBRAPA, 2010), que diretamente influenciam na composição da(s) classe(s) de metabólito(s) secundário(s) e, conseqüentemente, nas finalidades terapêuticas. Ademais, outros fatores que influenciam são o tecido vegetal utilizado, a metodologia de obtenção do extrato e o líquido extrator (SONAGLIO et al., 2010). A compreensão de todos esses fatores garante a qualidade, segurança e eficácia no uso de uma planta medicinal (FARIAS, 2010).

2.3 EFEITO BIOLÓGICO DE *SOLIDAGO CHILENSIS*

O extrato bruto aquoso das partes aéreas de *S. microglossa* apresentou tanto efeito hemolítico, quanto anti-hemolítico em eritrócitos humanos. Este efeito antagônico pode ser devido à grande variedade de compostos presentes no extrato, sendo necessário o isolamento para determinar qual o composto refere-se a cada um dos efeitos (DE FREITAS et al., 2008).

Óleos essenciais extraídos com metanol das folhas de *S. microglossa* apresentaram atividade biológica contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella setubal*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* (MOREL et al., 2006), enquanto que, o extrato etanólico das partes aéreas de *S. microglossa* apresentou atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus* e promoveu efeito citotóxico (BRASILEIRO

et al., 2006). Contudo, a tintura mãe de folhas de *Solidago chilensis* não apresentou efeito inibidor sob *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (CRUZ et al., 2013).

No teste de citotoxicidade MTT (brometo de 3-(dimetiltiazol-2-yl)2,5-difenilte-trazólio) em fibroblastos obtidos da cavidade oral não foi demonstrada a citotoxicidade do extrato de arnica-brasileira (MARTINS et al., 2009). A parte da planta, o tipo de extrato e o líquido extrator não foram descritos no estudo.

Em teste de inflamação aguda induzida em orelha de camundongos, foi observado redução de edema após aplicação tópica do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *S. chilensis*. Além disso, a aplicação do mesmo extrato por via intraperitoneal também reduziu o edema de orelha e promoveu a diminuição da migração de leucócitos (TAMURA et al., 2009).

O extrato hidrometanólico obtido das partes aéreas de *S. chilensis*, apresentaram efeito hipoglicemiante, hipolipêmico em aumentar a produção e liberação de insulina em ratos (SCHNEIDER et al., 2015).

O efeito anti-inflamatório e a inibição da migração leucocitária em modelo de inflamação induzida por carragenina foi atribuído aos extratos aquosos de rizomas, folhas e inflorescências de *Solidago chilensis* (GOULART et al., 2007). O mesmo efeito foi observado do infuso de rizomas e da partição realizada com butanol, além da redução de exsudato inflamatório (LIZ et al., 2008). O extrato aquoso obtido após infusão das partes aéreas de *S. microglossa*, promoveu a cicatrização de feridas abertas em ratos sem alterar as enzimas hepáticas (FACURY NETO et al., 2004). O infuso de raízes de *S. chilensis* em teste de formalina 2% demonstrou atividade hipolocomotora, antinociceptora e antinflamatória (ASSINI; FABRÍCIO; LANG, 2013).

O gel de extrato fluido glicólico das partes aéreas de *S. chilensis* apresentou uma melhor significativa em pacientes com lombalgia (DA SILVA et al., 2010) e a percepção de dor em pacientes humanos com tendinite (DA SILVA et al., 2015).

2.4 COMPOSTOS QUÍMICOS ISOLADOS DE *SOLIDAGO CHILENSIS*

O gênero *Solidago*, possui 42 espécies descritas e aceitas como oficiais na literatura científica e depositadas no banco de dados *species link* (2018), porém no Tropicos®, *Missouri Botanical Garden* atualmente estão catalogadas 651 espécies do gênero *Solidago*, além de suas sinônimas, subespécies e variedades.

Os metabólitos secundários que estão presentes em maior quantidade no gênero *Solidago* são sesquiterpenos e diterpenos (BOHLMANN et al., 1980). Outras classes

de metabólitos secundários de *S. chilensis* são: flavonoides, taninos, saponinas, terpenos (resinas e óleos essenciais) (GRANDI, 2014; CATARINO et al., 2015), alcaloides (CATARINO et al., 2015), fenólicos, triterpenos e esteroides (SOUZA et al., 2018).

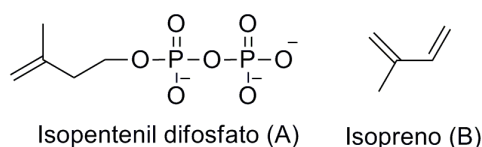
Os compostos isolados e identificados de *Solidago chilensis* foram: acetofenona, carotenóides, quercetina (GRANDI, 2014) e solidagenona, nas inflorescências (VALVERDE-SOARES; AZEVEDO-SILVA; TOMASSINI, 2009). Enquanto nas folhas foram identificados α -pineno, β -pineno, mirceno, α -felandreno, δ -3-careno, limoneno, β -ocimeno, α -campholenal, isolongifoleno, cariofileno, α -humuleno, β -cubebeno, biciclogermacreno, α -farneseno, espatulenol, δ -cadineno (MOREL et al., 2006), ácido gálico, quercetina, quercitrina e rutina (SABIR et al., 2012) e nas raízes, inulina, rutina, os ácidos quínico, caféico, clorogênico, hidroxicinâmico (GRANDI, 2014), ramnosídeos (LORENZI; MATOS, 2008) e solidagenona (RODRÍGUEZ et al., 2005).

2.5 TERPENOS

Os terpenos são hidrocarbonetos distribuídos amplamente no reino vegetal e algumas subclasses de terpenos são encontradas em fungos, bactérias, corais e anfíbios, sendo compostos que apresentam uma grande variedade estrutural e são classificados em hemiterpeno, monoterpenos, sequiterpenos, diterpenos, sesteterpenos, triterpenos e esteroides (precursores do colesterol, vitaminas e hormônios) (HEINRICH et al., 2012), tetraterpenos e politerpenos (DEWICK, 2002). Desta forma, estas subclasses de compostos são de grande interesse farmacológico (HEINRICH et al., 2012).

A via metabólica para formação dos terpenóides se origina a partir da condensação de três moléculas de acetato formando o mevalotato ou ácido mevalônico, que perde um carbono e recebe dois grupamentos fosfato através de reações enzimáticas que resultaram na formação da unidade básica isopentenil difosfato (Figura 2A). Esta molécula apresenta o núcleo estrutural isopreno (Figura 2B) após a perda dos grupamentos fosfato. Os diversos esqueletos terpenóides são originários de um isopreno ou da condensação de duas ou mais moléculas de isopentenil pirofosfato (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000).

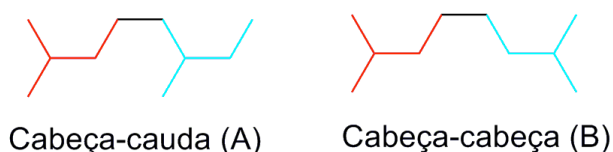
Figura 2: Núcleos isopentenil difosfato (A) e isopreno (B) para a síntese dos terpenóides.



Fonte: Autor.

Os hemiterpenos, moléculas mais simples dentre os terpenos, são formados por uma unidade de isopreno, contendo cinco átomos de carbono, enquanto que todos os outros núcleos fundamentais dos terpenoides são múltiplos de isopreno. A condensação de duas moléculas de isopreno varia de acordo com a subclasse de terpenos a ser formada, sendo condensadas moléculas de isopreno por cabeça - cauda (Figura 3A) até a formação de diterpenos e a partir desta subclasse a condensação ocorre por cabeça - cabeça (Figura 3B). As moléculas intermediárias para as formações das diversas subclasses são: geranyl difosfato (10 átomos de carbono), farnesil difosfato (15 átomos de carbono), geranylgeranyl difosfato (20 átomos de carbono), esqualeno (30 átomos de carbono) e fitoeno (40 átomos de carbono), sendo o difosfato o grupo abandonador (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000, DEWICK, 2002).

Figura 3: Modelos de condensações entre duas moléculas de isopreno.



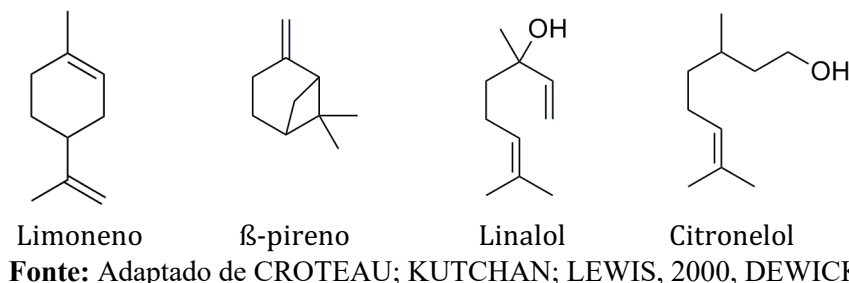
Fonte: Autor.

Os óleos voláteis são constituídos por fenilpropanoides e, principalmente, monoterpenos e sesquiterpenos e, em sua maioria, possuem baixa estabilidade na presença de umidade, calor, luz e íons metálicos (SIMÕES; SPITZER, 2010). São produzidos por plantas aromáticas em diversos órgãos vegetais atuando para o vegetal como substância antimicrobiana, inibidora de germinação, além de possibilitar a atração de insetos polinizadores. Para os seres humanos os óleos voláteis apresentam grande interesse nas indústrias de cosméticos, alimentícia e para outros produtos de utilização domésticas e ou terapêuticas (MELO; CROTTI, 2017).

As estruturas químicas dos óleos voláteis, de origem terpenoídicas, são as

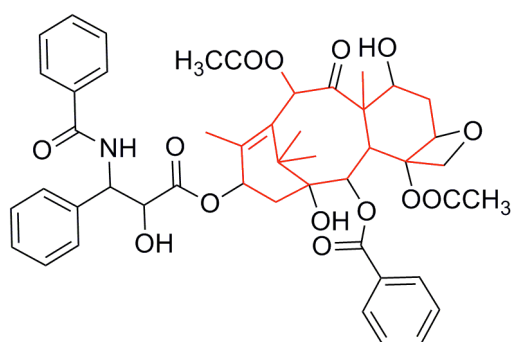
mais variadas possíveis e podem ser cíclicas e acíclicas, dependendo da espécie vegetal que produz esse composto (Figura 4) (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000, DEWICK, 2002).

Figura 4: Estrutura química de óleos voláteis cíclicas e acíclicas de monoterpenos.



Os diterpenos são encontrados predominantemente em plantas superiores, embora já foram isolados em insetos, fungos e organismos marinhos. Possuem uma grande variedade de esqueletos estruturais, sendo acíclicos, mono, bi, tri, tetra e pentacíclicos (VENEZIANI et al., 2017). Dentre os diversos tipos de esqueletos cíclicos, o núcleo tricíclico taxano (VENEZIANI et al., 2017) é o precursor para o medicamento taxol (Figura 5), fármaco utilizado para o tratamento de câncer (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). Entretanto, essa substância é extraída das cascas da espécie *Taxus brevifolia*, que necessita estar madura, ou seja, para a produção de 2 gramas de taxol é necessário a coleta da casca de três árvores centenárias desta espécie, sendo que a demanda da droga para uso terapêutico é em torno de 100 a 200 kg por ano (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). No entanto, a 10-deacetilbaccatina III, extraída de folhas e galhos de *Taxus baccata*, serve como material de partida para a síntese do taxol com rendimentos superiores ao encontrado em *T. brevifolia* (DEWICK, 2002).

Figura 5: Estrutura química do taxol (núcleo Taxano em vermelho).

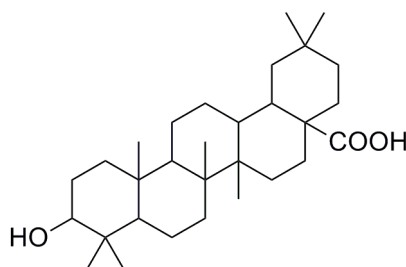


Fonte: Adaptado de CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000.

O núcleo triciclo caurano reduz a resistência vascular mediante a inibição do influxo de cálcio, aumentando a diurese e natriurese, atuando como um hipotensor (VENEZIANI et al., 2017) e também, foi observado o efeito analgésico devido a inibição de diversas citocinas conforme relata MIZOKAMI et al., 2012.

Os triterpenos (Figura 6) são moléculas precursoras de fito-esteroides, esteroides, colesterol, saponinas triterpênicas e esteroidais (CUNHA; JANUÁRIO; PAULETTI, 2017). O uso de fito-esteróis na indústria alimentícia é uma alternativa ao controle do colesterol LDL. No entanto, outros estudos sugerem risco a saúde humana, necessitando dessa forma de mais estudos para avaliar os riscos e benefícios (CHOUDHARY; TRAN, 2011).

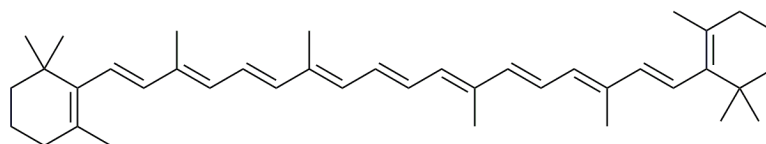
Figura 6: Estrutura molecular do triterpeno (ácido oleanólico).



Fonte: Autor.

Os carotenos (Figura 7) formam o único grupo de compostos que representam os tetraterpenos, sendo o núcleo precursor dos diferentes tipos de vitamina A. Algumas espécies de animais que possuem a coloração rosa/vermelho, como salmão e crustáceos, a coloração alaranjada da cenoura e a coloração avermelhada do tomate deve-se a presença deste grupo de composto, o qual é obtido a partir da alimentação, sendo posteriormente metabolizados. Da mesma forma que os mamíferos, incluindo os humanos, não conseguem sintetizá-lo, a obtenção é feita somente através da ingestão (DEWICK, 2002).

Figura 7: Estrutura molecular de tetraterpeno (β -Caroteno).



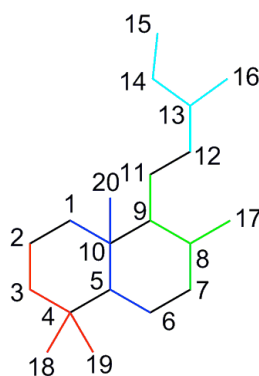
Fonte: Autor.

Estudos realizados em modelo *ex vivo* com pele de suíno utilizando retinoides, produto formado após a clivagem do betacaroteno ou tetraterpeno (DEWICK, 2002), observou inibição da produção de queratina (AOYAGI et al., 1981b), porém favoreceram o crescimento da epiderme (AOYAGI et al., 1981a).

2.5.1 DITERPENOS: NÚCLEO LABDANO (SOLIDAGENONA)

O diterpeno bicíclico de núcleo labdano (Figura 8) é formado a partir do processo de ciclizações e/ou reações de rearranjos intramoleculares, que estão relacionados à ciclização para formação da conformação do anel decalino, promovendo variações de sua estereoquímica conforme as relações enzimáticas e funções estruturais (PETERS, 2010). Sendo isolados de fungos, insetos (Hemiptera), própolis produzido por *Apis mellifera*, organismos marinhos (algas e poríferos) e em tecidos vegetais (CHINO, 2005).

Figura 8: Esqueleto básico do núcleo bicíclico de diterpenos do tipo labdano.



Fonte: Adaptado de TRAN; WONG; CHAI, 2017.

A subclasse dos lábdanos apresentam de modo geral efeito anti-inflamatório, a partir da inibição do NF- κ B (complexo de proteínas que controla a transcrição do fator de transcrição nuclear kappa β) influenciando na liberação do ácido araquidônico e a diminuição do óxido nítrico, obtendo assim um efeito anti-inflamatório (TRAN; WONG; CHAI, 2017). Embora sejam descritas outras finalidades terapêuticas aos diterpenos labdanos, como indução de apoptose e efeito antiproliferativo em linhagem de células tumorais (LI et al., 2005), antiespasmódico intestinal (RIGANO et al., 2009) e antimicrobiano (CHAKRABORTY et al., 2010).

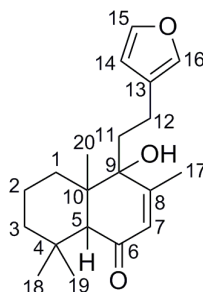
O diterpeno solidagenona (Figura 9) isolado de raízes de *Solidago canadensis* e identificada a primeira vez na década de 60 por Anthonsen e colaboradores

(1969). Ademais foi isolada em partes subterrâneas de *Solidago chilensis* (RODRÍGUEZ et al., 2005; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2005) de inflorescências de *S. chilensis* (VALVERDE-SOARES; AZEVEDO-SILVA; TOMASSINI, 2009), de partes aéreas (GOMES et al., 2018) e em outra espécie *Psychotria spectabilis* (BENEVIDES; YOUNG; BOLZANI, 2004).

A solidagenona apresentou efeito gastroprotetor em úlceras gástricas induzidas (RODRÍGUEZ et al., 2002; SCHMEDA-HIRSCHMANN; RODRIGUEZ; ASTUDILLO, 2002), capacidade antiproliferativa em células tumorais (GOMES et al., 2018) e citotoxicidade em cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (BENEVIDES; YOUNG; BOLZANI, 2004).

A solidagenona (diterpenóide) pode ser considerada a substância farmacologicamente ativa presente na espécie *S. chilensis* (VALVERDE-SOARES; AZEVEDO-SILVA; TOMASSINI, 2009).

Figura 9: Estrutura química do diterpeno solidagenona.



Fonte: Autor.

2.6 MODELO BIOLÓGICO *EX VIVO*

O cultivo de tecidos iniciou na década de 1930 com embriões de aves (FELL; ROBINSON, 1930), com adaptações, afim de melhorar a viabilidade dos órgãos incubados a partir de características específicas conforme a finalidade da análise tecidual (PRUNIÉRAS; DELESCLUSE, 1976), tais como: meio de cultura, adição ou não de suplementos, utilização de diferentes antibióticos e as espécies animais utilizadas na experimentação (ratos, camundongos, suínos e humanos) (RANDALL; TURTON; FOSTER, 2011) e vegetais (THOKCHOM; MAITRA, 2016). No entanto, diversos órgãos já foram utilizados neste tipo de modelo, tais como: intestinos (BASSO; BRACARENSE, 2013), fígado (DA SILVA; LEITE, 2005), cartilagem (VAN BUUL et al., 2012), sistema nervoso central (MARINS et al., 2009) e pele (DAME et al., 2008).

O modelo explante de animais é complementada com partes de plásticos para superar as limitações do uso de animais vivos na experimentação (KIM; BANG; HWANG, 2015), como a capacidade de mimetizar perfusão extracorpórea para avaliação do tecido epitelial (BAYNES, 2001). O modelo *ex vivo* possui inúmeras vantagens, sendo considerado realista, de baixo custo (KIM; BANG; HWANG, 2015), a partir de um doador é possível produzir inúmeros fragmentos (RANDALL; TURTON; FOSTER, 2011), reduzindo o número de animais (BASSO; BRACERENSE, 2013), avaliar a produção de substâncias produzidas por tecido específico (VAN BUUL et al., 2012), além do uso de explantes para proliferar tipos celulares proveniente do tecido (DAME et al 2008). A limitação da técnica está relacionada ao tempo de viabilidade celular (BASSO; BRACARENSE, 2013), sendo uma desvantagem em análises específicas, como a ultrassonografia endoscópica realizada em explante, os quais necessitam um longo período de preparação e perdem as características teciduais originais (KIM; BANG; HWANG, 2015).

2.6.1 MODELO *EX VIVO* DE PELE

O primeiro cultivo de diversos órgãos de ratos pós-termo foi realizado na década de 60, dentre eles a pele que estava queratinizada com os folículos ainda em desenvolvimento (TROWELL, 1959). No terceiro dia de cultivo, o tecido não apresentou alterações significativas, enquanto que no sexto dia foi observado diminuição da espessura tecidual e ausência de elementos mitóticos (TROWELL, 1959).

A técnica de cultivo de tecidos consiste na remoção de fragmentos representativos, submetidos a estudos em condições artificiais, mantendo alguns critérios, por exemplo, no cultivo de pele, os fragmentos devem ser pequenos, para uma melhor difusão dos nutrientes e de oxigênio (PRUNIÉRAS; DELESCLUSE, 1976), além do controle da temperatura e a renovação do meio de cultura (HALPRIN; LUEDER; FUSENIG, 1979). Dessa forma, a manutenção dos tecidos é favorecida por algumas horas ou dias, podendo ser testadas substância das mais diversas aplicações farmacológicas e terapêuticas (PRUNIÉRAS; DELESCLUSE, 1976).

Em cultivo de explante de pele humana saudável, observou-se a preservação de desmossomos após três dias de cultivo (BARNETT, 1978). A técnica *ex vivo* permite que o tecido cultivado possa ser separado, em derme e epiderme, afim de verificar a proliferação e diferenciação celular (HALPRIN; LUEDER; FUSENIG, 1979). Além de ensaios de eliminação transdérmica de xenobióticos (BAYOUMI; MARKS, 1980) e testes com substâncias que alterem o metabolismo celular do tecido (AOYAGI et al., 1983).

Os explantes de pele cultivados em placas podem permanecer submersos em meio de cultura (HOLBROOK; HENNINGS, 1983), suplementados com soro fetal bovino e fator de crescimento epitelial, que favorece o aumento do número de elementos mitóticos na epiderme (AOYAGI et al., 1984). Além disso, o DMSO pode induzir a diferenciação celular na epiderme (HOLBROOK; HENNINGS, 1983).

Com o modelo de explante foi possível avaliar a resposta imune de dispositivos médicos comerciais (DELUSTRO et al., 1986), fatores que podem influenciar na cicatrização da pele, tais como o fator de agregação plaquetária (HEBDA et al., 1986), além de substâncias que possam induzir a hipersensibilidade (MOORE; DANNENBERG, 1992) e enzimas específicas proteolíticas (EKHOLM; EGELRUD, 2000).

Tanto o modelo *ex vivo* de orelha de suíno quanto o modelo *in vivo* em camundongos *hairless*, apresentaram resultados positivos frente à permeação cutânea de diferentes formulações com clindamicina. Após estes ensaios preliminares, a mesma formulação foi utilizada no tratamento de comedões em humanos, obtendo bons resultados (HONZAK; ŠENTJURC, 2000).

Observam-se variados tipos de estudos com explantes de pele como: fototoxicidade induzida por agentes exógenos (SARABIA et al., 2000), radiação ultravioleta (RIJNKELS; WHITELEY; HENEGOUWEN, 2001), uso substâncias fotoprotetoras (MOISON; DOERGA; HENEGOUWEN, 2002; MOISON; HENEGOUWEN, 2002; RIJNKELS et al., 2003; FOČO; GAŠPERLIN; KRISTL, 2005), absorção e eliminação de metabólitos secundários (CAL; KUPIEC; SZNITOWSKA, 2006), terapias gênicas (PFÜTZNER et al., 2006), dermatofarmacocinética (HERKENNE et al., 2006) e atividade antimicrobiana após colonização tecidual (RUBINCHIK et al., 2009).

O modelo mais complexo e completo de explante de pele consiste na remoção cirúrgica do tecido de suíno mantendo a vascularização intacta. Este por sua vez é acoplado a um sistema que mimetiza a perfusão corpórea, desta forma pode-se avaliar vários tipos de funções dermatológicas (BAYNES, 2001).

Os ensaios biológicos utilizando animais devem ser avaliados e estar de acordo com a Resolução Normativa N°12, de 25 de setembro de 2013, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), que estabelece diretrizes para a real justificativa do uso experimental e do bem-estar animal (CONCEA, 2013). Ao serem comparados o uso experimental com suínos e ratos, ambas espécies apresentam vantagens e desvantagens dependendo da resposta e hipóteses formuladas, sendo que os suínos respondem de maneira semelhante às alterações biológicas humanas em diferentes tecidos (FAIRBAIRN et al., 2011). Contudo os resultados experimentais obtidos de explantes com fragmentos

teciduais de suínos também podem ser comparados diretamente com as mudanças observadas em humanos (RANDALL; TURTON; FOSTER, 2011).

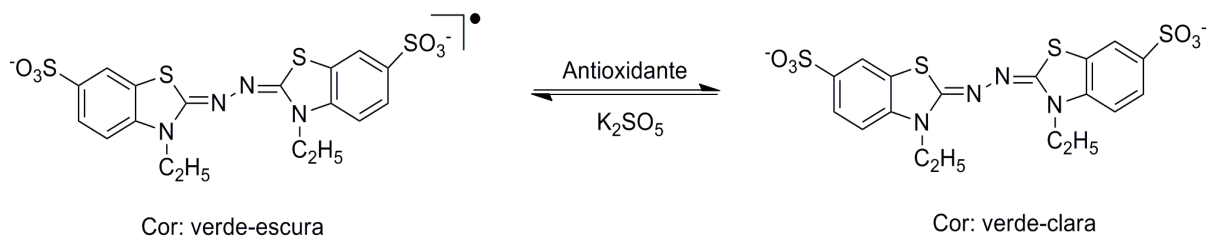
2.7 RESPOSTA OXIDATIVA

O processo fisiopatológico relaciona-se ao estresse oxidativo em animais e humanos, e o uso de plantas medicinais com ação antioxidante, seja por suplementação dietética ou compostos terapêuticos, são promissoras afim de evitar a formação de radicais livres (HASANI-RANJBAR; LARIJANI; ABDOLLAHI, 2009). As espécies reativas de oxigênio (ERO's) são geradas a partir do estresse oxidativo que induzem respostas inflamatórias agudas e crônicas (PAGLIUSO et al., 2006) e doenças metabólicas (WAFULA et al., 2017).

As ERO's podem ser classificadas como radicalares (ânion superóxido e radical hidroxila) e não radicalares (peróxido de hidrogênio e ozônio), ambas as espécies reativas podem oxidar proteínas alterando o seu metabolismo (CELI; GABAI, 2015). Sendo assim, o equilíbrio entre a atividade oxidante e antioxidante caracterizam o bem-estar e longevidade celular do sistema imune (ASLANI; GHOBADI, 2016). Portanto, atividade antioxidante e oxidante pode ser uma forma de avaliar o metabolismo celular.

A atividade antioxidante pode ser medida em extratos e compostos de origem vegetal (RUFINO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009; KLAJN et al., 2012) e fluidos biológicos (KLAJN et al., 2012). Dentre as técnicas utilizadas, as reações químicas de sequestro do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) ABTS^{•+} (Figura 10) e o poder antioxidante de redução do Ferro (FRAP – *Ferric Reduction Antioxidant Power*) (Figura 11) são mensuradas por absorvância em comprimentos de ondas específicos na faixa de ultravioleta visível (UV/VIS) em espectrofotômetro (RUFINO et al., 2007; KLAJN et al., 2012). No entanto, ambos os ensaios necessitam de uma curva analítica para a obter a equação da reta e converter a absorvância da amostra e expressar o resultado observado (RUFINO et al., 2007; MARTINEZ et al., 2016).

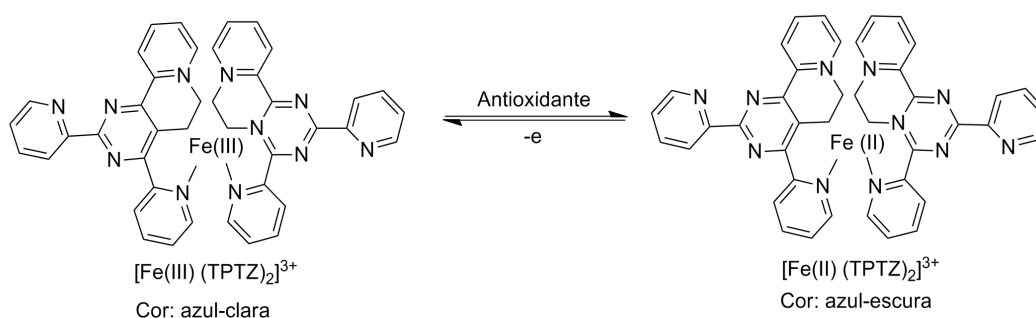
Figura 10: Reação química da atividade antioxidante de captura do radical ABTS \cdot^+



Fonte: RUFINO et al., 2007.

Na placa de leitura, o radical ABTS $^+$ apresenta uma coloração verde escura e caso haja a captura do radical ABTS a intensidade de cor diminui (verde claro) proporcionalmente a quantidade de antioxidantes presente na amostra, podendo ficar incolor, ou seja, quanto maior a atividade antioxidante menor será o valor de absorbância (RUFINO et al., 2007). Em contrapartida, a coloração inicial da solução com o reagente Fe $^{3+}$ /tripiridiltriazina - TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) é azul clara e quanto maior a atividade antioxidante, redução para Fe $^{2+}$, mais escuro se torna a amostra, resultando em uma alta absorvidade (KLAJN et al., 2012).

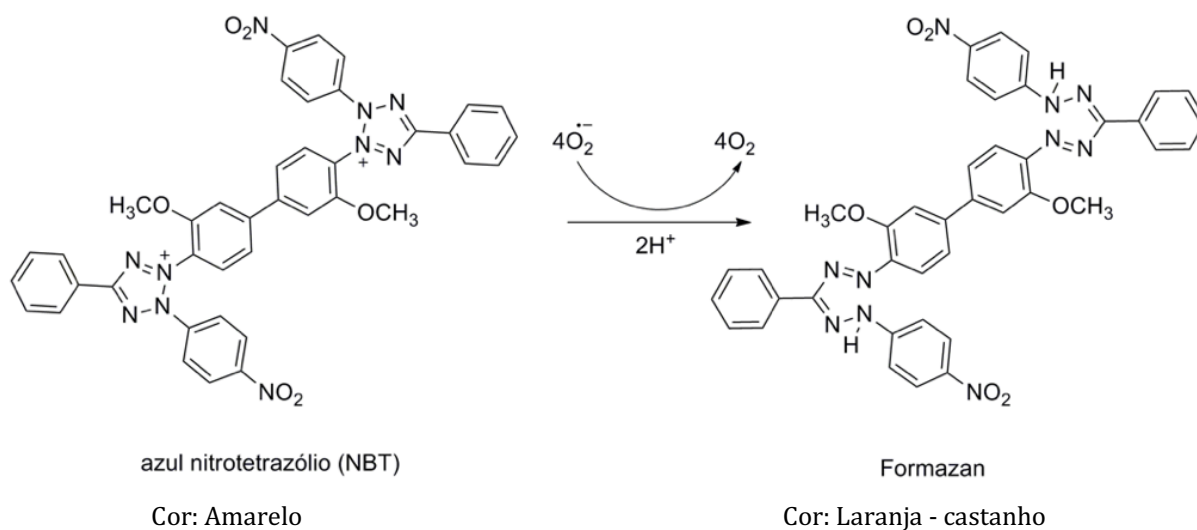
Figura 11: Reação química da atividade antioxidante por redução de íons Ferro (FRAP).



Fonte: KLAJN et al., 2012.

A capacidade oxidante pode ser avaliada pela redução do reagente azul de nitrotetrazólio (NBT), que ao reagir com o ânion superóxido se converte em formazam (Figura 12) (WATANUKI et al., 2006). Estes compostos são mensurados em um comprimento de onda específico na faixa do UV/VIS em espectrofotômetro e quanto maior a absorvidade mais ânions superóxidos contém na amostra (WATANUKI et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009).

Figura 12: Reação química da redução do reagente azul de nitrotetrazólio (NBT) por ânion superóxido.



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA et al., 2009.

Conforme descrito anteriormente, a classe dos terpenos apresenta ampla variedade de núcleos estruturais, e após isolamento e identificação de seus compostos a partir de plantas utilizadas na medicina popular, podem ser avaliados seus efeitos tóxicos e terapêuticos em modelos *ex vivo* associado a resposta oxidativa.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o perfil fitoquímico das raízes de *Solidago chilensis* M., isolar e caracterizar a solidagenona afim de avaliar o seu efeito biológico em explante de pele de suíno.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar as principais classes de metabólitos secundários presentes em raízes de *S. chilensis*, por ensaios: colorimétricos (flavonoides, antraquinonas, taninos hidrolisáveis e condensados), de precipitação e turvação (alcaloides), determinação do índice afrosimétrico (saponinas) e cromatográficos (cumarinas e terpenos).

Isolar a solidagenona por métodos cromatográficos do extrato bruto obtido das raízes de *S. chilensis*.

Identificar a estrutura molecular da solidagenona.

Determinar as características físico-químicas da solidagenona (forma cristalina da solidagenona, o ponto de fusão e temperatura de degradação).

Definir a citotoxicidade da solidagenona sobre as hemácias.

Avaliar o efeito biológico do extrato bruto comparado às diferentes concentrações de solidagenona em modelo *ex vivo* a partir de análise histológica e resposta oxidativa.

4 METODOLOGIA

4.1 COLETA DO VEGETAL E PREPARO DE EXSICATA

A coleta de material vegetal foi efetuada por Ricardo Luís Nascimento de Matos na zona urbana {*lat*: -23.328908, *long*: -51.211961}, Jardim Columbia, Londrina – PR. A exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Londrina (UEL), sob o registro FUEL 54685, identificada por Matos, R. L. N. As partes subterrâneas da planta foram colhidas durante a floração plena em 22/03/2017.

4.2 SECAGEM DE RAÍZES DE *SOLIDAGO CHILENSIS*

As raízes foram estabilizadas por meio de secagem em estufa (Lucadema® São José do Rio Preto, BR) à $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010). Posteriormente, a droga vegetal foi pulverizada em moinho de facas (M-Vithory® Curitiba, BR), pesada em balança analítica (Marte – modelo AW220) e acondicionado em frascos âmbar sendo utilizada para análise fitoquímica e obtenção do extrato bruto.

4.3 PERFIL FITOQUÍMICO QUALITATIVO

4.3.1 REAÇÕES DE IDENTIFICAÇÃO DE NÚCLEO FLAVONOÍDICOS

Pesou-se 2 g da droga vegetal e adicionou-se 40 mL de etanol 75%. A solução foi aquecida até a fervura em chapa aquecedora (208D- Ethik® Vargem Grande Paulista, BR), resfriada e filtrada, distribuindo-se 2 mL de extrato em 3 cápsulas e, novamente, aquecido até a evaporação do solvente. Ainda em aquecimento, adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio, sendo posteriormente eliminado da solução por evaporação. O conteúdo foi ressuspensionado com 2 mL de etanol 75% e dividido em dois tubos de ensaios, para determinação de flavonoides. 1 – branco e 2 – 200 mg de magnésio metálico, adição do ressuspensionado e inserção gradativa de 1 mL de ácido clorídrico concentrado. O resultado colorimétrico da reação de Shinoda ou Cianidina foi comparado as subclasses de flavonoides presentes na tabela 2 (adaptado de BIAVATTI; LEITE, 2007; COSTA, 2000).

Tabela 2: Ensaio colorimétrico para identificação de subclasses de flavonoides em raízes de *Solidago chilensis* a partir da reação de Shinoda ou Cianidina.

Reação\Subclasses	Flavonas	Flavonois	Flavanonas
Shinoda ou Cianidina	Laranja	Vermelha	Violeta

Fonte: COSTA, 2000.

4.3.2 REAÇÃO DE STIASNY PARA DETERMINAÇÃO DE CLASSES DE TANINOS

O Reativo de Stiasny foi preparado no momento do uso com 10 mL de formol e 5 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado em refluxo por 20 minutos.

Pesou-se 1 g da droga vegetal pulverizada e em um béquer adicionou 20 mL de água destilada e aquecido por 2 minutos em chapa-aquecedora (208D- Ethik® Vargem Grande Paulista, BR). Após a fervura, o extrato foi resfriado, filtrado e completou-se o volume para 20 mL com água destilada. Desta solução, verteu-se 20 mL do extrato em um balão de fundo redondo de 100 mL e, posteriormente, adicionou-se 6 mL do Reativo de Stiasny e refluxo por 30 minutos.

Após o período de refluxo, observou-se a formação de precipitados avermelhados (flobafenos), indicando a presença de taninos condensados e, para a detecção de taninos hidrolisáveis, realizou-se a filtração para a separação dos taninos condensados e uma alíquota de 10 mL da solução foi transferida para um tubo de ensaio e, posteriormente, adicionou-se 2 g de acetato de sódio e quatro gotas de solução de cloreto de ferro a 1% em metanol, sendo observado a cor azul marinho (adaptado de COSTA, 2000; ROJAS et al., 2012).

4.3.3 REAÇÃO DE BORTRÄNGER INDIRETA PARA IDENTIFICAÇÃO DE ANTRAQUINONAS

Pesou-se 1 g da droga vegetal e adicionou-se 20 mL de etanol 25%, sendo a solução mantida em aquecimento por um minuto em chapa aquecedora (208D- Ethik® Vargem Grande Paulista, BR). Após a fervura, a mistura foi filtrada e transferida para o funil de separação, onde adicionou-se 20 mL de ácido sulfúrico 5%. A solução foi agitada e após resfriada em temperatura ambiente, adicionou-se 20 mL de hexano, agitando-se vagarosamente por inversão. Após descanso da solução, descartou-se a fase ácida e a fase orgânica foi dividida em dois tubos de ensaio com 5 mL em cada, onde foram adicionados 3

mL de hidróxido de amônio 40%. A reação positiva para antraquinonas é quando uma coloração rósea está presente na solução orgânica (MATOS, 1988).

4.3.4 REAÇÕES GERAIS PARA IDENTIFICAÇÃO DE ALCALÓIDES

Pesou-se 5 g da droga vegetal pulverizada, adicionando-se 100 mL de HCl 2% e aqueceu-se até a fervura em chapa aquecedora (208D- Ethik® Vargem Grande Paulista, BR). O extrato foi resfriado a temperatura ambiente e filtrado diretamente ao funil de separação e, posteriormente, alcalinizado com solução de hidróxido de amônia (NH₄OH) 40% até se estabelecer pH entre 9 e 10 com papel indicador. Foram acrescentados 20 mL de clorofórmio, agitando-se vagarosamente, retirando-se a fase alcalina para outro funil de separação. Repetiu-se a partição por mais duas vezes. Após a completa transferência da fase orgânica em um único funil de separação, foram adicionados 40 mL de HCl 2% e agitou-se vagarosamente. Posteriormente, a fase orgânica foi descartada e a fase aquosa acidificada foi distribuída em quantidades equivalentes em cinco tubos de ensaio, sendo: 1 – Branco; 2 – Reagente de Dragendorff; 3 – Reagente de Mayer; 4 – Reagente de Bertrand; 5 – Ácido Tânico 5%. Em seguida, adicionou-se três gotas de cada reagente observando a formação de precipitado e/ou turvação, indicando a presença de alcaloides (adaptado COSTA 2000, BIAVATTI; LEITE, 2007).

4.3.5 ÍNDICE AFROSIMÉTRICO PARA IDENTIFICAÇÃO DE SAPONINAS

Pesou-se 5 g de droga vegetal pulverizada em béquer, adicionando-se 100 mL de água destilada e preparou-se um decocto por 5 minutos em chapa-aquecedora (208D- Ethik® Vargem Grande Paulista, BR). O extrato foi resfriado e filtrado para uma proveta e o volume completado até 100 mL. O filtrado foi distribuído em 10 tubos de ensaios com as mesmas dimensões, conforme a Tabela 3 e agitado energeticamente no sentido vertical por 15 segundos.

Tabela 3: Metodologia para determinação do índice afrosimétrico de raízes de *Solidago chilensis*.

Identificação dos Tubos	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Solução Extrativa (mL)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Água destilada (mL)	9	8	7	6	5	4	3	2	1	---
Volume Total (mL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Fonte: COSTA, 2000.

Após 15 segundos de agitação e 15 minutos de descanso, foi observado a altura de espuma persistente superior ou igual a 1 cm da menor concentração do extrato, a partir deste tubo de ensaio foi determinado do índice afrosimétrico de raízes de *S. chilensis* e determinada conforme o exemplo demonstrado na figura 13 (adaptado de COSTA, 2000).

Figura 13: Cálculo para determinação do índice afrosimétrico.

$$\begin{array}{ll} 5 \text{ g} & 100 \text{ mL} \\ x & 3 \text{ mL (Tubo de ensaio III)} \\ \text{Logo, } x = (3 \cdot 5) / 100, & \text{sendo } x = 0,15 \text{ g} \end{array}$$

$$\begin{array}{ll} \text{Relação de diluição para 1 g de droga vegetal} & \\ x (0,15) & 10 \text{ mL} \\ 1 \text{ g} & y \text{ mL} \\ \text{Logo, } y = (1 \cdot 10) / 0,15, & \text{portanto } y = 66,6 \text{ mL} \end{array}$$

Fonte: adaptado de COSTA, 2000.

4.3.6 REAÇÕES PARA IDENTIFICAÇÃO DE CUMARINAS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COMPARATIVA (CCDC)

Pesou-se 1 g da droga vegetal, adicionou-se 20 mL de etanol 30% e manteve-se a solução em aquecimento por dois minutos após a fervura em chapa aquecedora (208D-Ethik® Vargem Grande Paulista, BR), sendo filtrado e resfriado em temperatura ambiente.

A CCDC foi realizada utilizando-se como fase móvel Tolueno:Acetona:Diclorometano (9:6:5), fase estacionária sílica gel GF254 e revelação com KOH 10% e a cromatoplaça mantida sob luz UV 360 nm por 2 minutos (BIAVATTI; LEITE, 2007), utilizou-se como controle positivo as folhas do guaco (*Mikania glomerata*) para cumarinas, sob luz UV observa a fluorescência verde (COSTA, 2000).

4.3.7 REAÇÕES PARA IDENTIFICAÇÃO DE TERPENOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA

DELGADA COMPARATIVA (CCDC)

Pesou-se 1 g da droga vegetal pulverizada grosseiramente. Dividiu-se em dois béqueres. No primeiro béquer, adicionou-se 20 mL de diclorometano e, no outro béquer, 20 mL de hexano, sendo ambos mantidos por 30 minutos no banho de ultrassom (Eco-sonics – Ultronique® Indaiatuba, BR). Ao término do período, os extratos foram filtrados e o mesmo procedimento foi repetido duas vezes. Os extratos foram evaporados e ressuspensos com 15 mL dos respectivos solventes extratores (adaptado de JEFFREYS; NUNEZ, 2016).

A CCDC foi realizada utilizando-se como fase móvel Hexano:Acetato de etila (93:07), fase estacionária silicagel GF254 e revelação com anisaldeído sulfúrico com posterior aquecimento. Foram aplicadas 30 µL, com pipeta automática, de cada extrato concentrado. Quando positivo, verifica-se a coloração roxa no centro da cromatoplaça (adaptado de WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1984).

4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DICLOROMETÂNICO

O extrato bruto das raízes de *S. chilensis* M. foi obtido por extrações exaustivas com diclorometano, que procedeu com a adição do solvente extrator até cobrir a droga vegetal em frascos âmbar, que foram submetidos a dois ciclos de 60' em ultrassom (Eco-sonics –Ultronique® Indaiatuba, BR). Após 24h, os extratos foram filtrados e concentrados por rotaevaporação (à 45 °C) (RE-301-BM-500 Yamato®). O extrato foi ressuspensado no mesmo solvente e transferido em um único frasco previamente tarado e armazenado em dessecador (adaptado de ARAKAWA et al., 2008).

4.5 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA O ISOLAMENTO DE SOLIDAGENONA

4.5.1 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

As amostras analisadas através de CCDC foram solubilizadas em diclorometano ou clorofórmio e foram aplicadas com um capilar de vidro a 1,5 cm da base em cromatoplaças de vidro (5x20, 10x20 ou 20x20 cm, conforme a necessidade) com sílica gel GF₂₅₄ (Merck, código 7730) de espessura 0,25 mm como fase estacionária. Para a fase móvel, foram utilizados solventes puros e misturados em diferentes proporções, conforme cada análise, dentro de cubas de vidro que foram saturadas com a fase móvel e compatível ao tamanho da cromatoplaça (NYIREDY, 2000). Após a corrida, as placas foram reveladas com

luz UV em 254 e 366 nm e, posteriormente, com o revelador químico (anisaldeído sulfúrico) e submetidas ao aquecimento a 110 °C em chapa-aquecedora (208D- Ethik® Vargem Grande Paulista, BR) (VALVERDE-SOARES; AZEVEDO-SILVA; TOMASSINI, 2009) no LabBioTransfite da UEL, Dep. de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, responsável Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa.

4.5.2 Cromatografia Líquida à Vácuo (CLV)

Para a realização da CLV, utilizou-se coluna de vidro com placa sintetizada e como fase estacionária mistura de sílica gel 60 H (Merck, código 7736) e sílica gel 60 (Merck, 230 - 400 mesh, código 9385). A coluna cromatográfica foi previamente preenchida com a fase estacionária e saturada com a fase móvel inicial. Posteriormente, a amostra foi incorporada à sílica gel 60 H e colocada dentro da coluna para a realização do fracionamento em gradiente crescente de polaridade. No bocal lateral, uma mangueira foi acoplada à bomba de vácuo (TE - 58 Tecnal® Piracicaba, BR) e as frações foram recolhidas em um balão volumétrico de 1000 mL. Cada fase móvel utilizada (em média 500 mL) foi armazenada em frasco âmbar para posterior secagem por rotaevaporação.

4.5.3 ISOLAMENTO E RECRISTALIZAÇÃO

O extrato bruto foi submetido a Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) em diferentes polaridades de fase móvel para verificar a quantidade de manchas presentes no extrato. Após as análises de CCDC, o extrato bruto foi fracionado através de CLV (Tabela 4), utilizando-se com fase estacionária sílica gel 60 (Merck, 230 - 400 mesh, código 9385) na proporção 1:30 (extrato:sílica (m/m)), em gradiente crescente de polaridade. As frações obtidas foram concentradas por rotaevaporação e ressuspensas na mesma fase móvel, sendo transferidas para recipientes previamente pesados e monitoradas por CCDC em diferentes polaridades de fase móvel.

Tabela 4: Fracionamento do extrato bruto por Cromatografia Líquida à Vácuo em gradiente crescente de polaridade.

Frações	Solventes	Proporção	Volume (mL)
1	Hexano	100	800
2	Hexano: Acetato de Etila	9:1	800
3	Hexano: Acetato de Etila	8:2	800
4	Hexano: Acetato de Etila	7:3	800
5	Hexano: Acetato de Etila	6:4	800
6	Hexano: Acetato de Etila	5:5	800
7	Hexano: Acetato de Etila	3:7	800
8	Acetato de Etila	100	800
9	Metanol	100	800

A fração 8:2 mostrou a formação de precipitado e este foi lavado com metanol gelado e mantido por 24h sob refrigeração. Então, o sobrenadante foi retirado e transferido a um frasco previamente pesado e o mesmo processo repetido até a total limpeza do precipitado.

O precipitado foi dividido em duas partes iguais, uma das partes foi solubilizada em banho-maria com acetona PA e, posteriormente, foi adicionado hexano até observar a turvação. O frasco fechado foi mantido sob refrigeração (- 20 °C) por dois dias para a recristalização. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e o frasco com os cristais colocado em dessecador. A outra parte do precipitado foi dissolvida em hexano e acetato de etila na proporção 4:1 a temperatura ambiente, após a diluição completa do precipitado o solvente foi evaporado em temperatura ambiente e houve a formação de cristais.

Obteve-se em ambos os processos, cristais brancos que foram monitorados por análise em CCDC e revelada em anisaldeído sulfúrico com posterior aquecimento a 110 °C. Ao se observar apenas uma única mancha roxa na cromatoplaça determinou-se o fator de retenção, sendo o composto recristalizado submetido às análises de Espectrometria de Massas (MS-ESI), Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , (uni e bidimensionais), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Espectroscopia de Energia Dispersa, Infravermelho com Transformada de Fourier, Microscopia Eletrônica de Varredura, Difração de Raio - X, Ponto de Fusão, Calorimetria Exploratória Diferencial, Análise Termogravimétrica e Termogravimetria Derivada. Depois de devidamente caracterizado, a solidagenona foi submetida ao ensaio biológico sob o modelo de explante.

4.6 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

4.6.1 Espectrometria de Massas por *Electrospray ionization* (MS-ESI)

A identificação da massa do composto isolado foi realizada em modo de ionização negativa em espectrômetro de massas triplo-quadropolo (QqQ) com ionização por eletrospray (ESI em modo sequencial (ESI-tandem-MS) - Waters® e2795 Separations Modules no laboratório Fenn de Espectrometria de massas na UFPR - Campus Jandaia do Sul - Prof. Dr. Eduardo César Meurer.

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Dilui-se dois mg da amostra em 1 mL de álcool metílico (Vetec, 99,9% a nível UV/HPLC), de acordo com a fase móvel com o modificador orgânico hidróxido de amônio (NH₄OH). A solução final foi injetada no equipamento com vazão de gás, Argônio, 0,140 mL min⁻¹, temperatura de desolvatação 250 °C; capilar 2500 V; cone 40 V; energia de colisão 20 V, vazão de seringa 50 µL min⁻¹, tempo total de ciclo, 2,7 seg. número de canais 27.

4.6.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro Bruker Modelo Avance II, operando a 400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C, equipado com sondas multinucleares de 5 mm. Esses espectros foram registrados utilizando clorofórmio deuterado (CDCl₃) como solvente e padrão interno para calibração dos espectros de RMN de ¹H foram adotados 7,26 ppm e para ¹³C o *triplete* em 77,35, 77,03, 76,71 ppm, sendo ambos para CDCl₃. As áreas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades foram descritas como: *simpleto* (*s*), *sinpleto largo* (*sl*), *duplete* (*d*), *duplo duplete* (*dd*), *quarteto* (*q*) e *multiplete* (*m*). Portanto, os cristais isolados foram solubilizados em CDCl₃ para a obtenção dos espectros de RMN 1D (hidrogênio, carbono, DEPT 135 e DEPT 90) e 2D (COSY, HMBC e HSQC). LABSPEC da UEL Departamento de Ciências Exatas - Prof. Dr. Fernando César de Macedo Junior.

4.6.3 Infravermelho por Transformada de Fourieir (IV-TR)

O cristal foi comprimido com Brometo de potássio (KBr), formando a pastilha, que foi analisada na faixa de 4000 – 500 cm⁻¹. Os espectros de absorção na região de infravermelho foram obtidos em equipamento IRPrestige-21 Shimadzu®, no LABSPEC da

UEL, Depto de Ciências Exatas - Prof. Dr. Henrique de Santana.

4.6.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os cristais isolados foram analisados por CLAE sob seguintes condições: foi preparada uma solução de 2 mg mL⁻¹ em álcool metílico (Vetec, 99,9% a nível UV/HPLC) e injetada 20 µL no equipamento CLAE Shimadzu® modelo 20A, coluna C18 (5 µm, 100 Å de 25 x 4,6 mm) com detector PDA no comprimentos de onda 190 a 600 nm, com fase móvel em gradiente decrescente de polaridade (Acetonitrila: ácido fórmico 0,1%- 5:95% à 95:5%) em 20 minutos, mantendo-se a mesma proporção até 30 min, retornando à condição inicial com um tempo total de corrida de 40 minutos. Foi preparada uma solução de 2 mg mL⁻¹ em álcool metílico (Vetec, 99,9% a nível UV/HPLC) do extrato bruto e, posteriormente, filtrado, sendo analisado nas mesmas condições e parâmetros que o composto isolado. Ambos o cromatogramas foram comparados a fim de avaliar a presença do isolado no extrato bruto. As análises foram realizadas no LABDIA da UEL do Centro de Ciências Exatas do Depto de Química - Docente responsável Prof. Dra. Suzana Lucy Nixdorf.

4.6.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As duas formas de cristais obtidas por evaporação e recristalização foram submetidas ao ponto de secagem crítica (Critical Point Dryer CPD 030, Bal-Tec Union Ltd., Liechtenstein). Após esse processo, os cristais foram colocados em *stubs* e recobertos com ouro (Sputter Coater SDC 050, Bal-Tec Union Ltd., Liechtenstein). Posteriormente, analisados por Microscópio Eletrônico de Varredura (FEI Quanta 200, Netherlands) (ARAGÃO et al., 2013). As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da UEL, Centro de Ciências Biológicas, Depto de Biologia Geral - Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior

4.6.6 Espectro de Dispersão Energética (EDS)

Os cristais foram previamente preparados para a MEV. Selecionou-se uma superfície sem deformações e foi aplicado um feixe de elétrons acelerados 20 kV, obtendo-se o Espectro de Dispersão Energética (EDS), para avaliar a porcentagem dos tipos de átomos que compõe o cristal e comparar estes resultados a análise centesimal do composto isolado obtido pelo software ACD labs após a elucidação estrutural. As microanálises foram

realizadas no Microscópio Eletrônico de Varredura (FEI Quanta 200, Netherlands) (adaptado ARAGÃO et al., 2013). As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da UEL, Centro de Ciências Biológicas, Depto de Biologia Geral - Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior.

4.6.7 Difração de Raios – X

Os ensaios de difração de raios X, analisou ambos os cristais obtidos, que foram realizados em um difratômetro marca Panalytical e modelo X'Pert Pro MPD. Foi utilizada geometria Bragg-Brentano (teta-2teta), fonte de radiação Cobre $K_{\alpha-1,2}$, detector de ionização de Xe, fendas fixas, sollar de 0,4 rad e monocromador de grafite. A amostra foi montada por sistema *back load* e rotacionada durante a medida, como forma de subtrair deformações no difratograma que não sejam unicamente devido à amostra. As análises foram realizadas com auxílio do software High Score Plus v3 e as bases de dados consultadas foram *Inorganic Crystal Structure Database* (ICSD), *Crystallography Open Database* (COD), CRYSTMET e *International Centre for Diffraction Data* (ICDD). As análises foram realizadas no Laboratório LDRX da UEL, Pró Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, responsável prof. Jair Scarminio.

As informações cristalográficas (cif - “*crystallographic information file*”) encontrados nas bases de dados para a fórmula molecular do composto isolado foram obtidas e buscou-se ajustar os difratogramas com o resultado obtido. Desta forma, avaliou-se os parâmetros cristalográficos simulados de acordo com o tipo de rede cristalina e o grupo de simetria considerando unicamente a posição angular dos picos de difração, utilizando-se uma função de indexação tipo Treor.

4.7 ANÁLISE TÉRMICA

4.7.1 Ponto de Fusão (PF)

Os cristais foram depositados entre lâminas de vidro no aparelho digital de ponto de fusão (MQAPF - 302 Microquímica Equipamentos LTDA) submetidos a rampa de aquecimento de $5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até a fusão completa dos cristais, no Laboratório de Química Orgânica da UEL do Depto de Ciências Exatas - Prof. Dr. Fernando César de Macedo Junior

4.7.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Foram pesados 5 mg de amostra em cadinho de alumínio, com taxa de aquecimento $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ de 23 a $262\text{ }^{\circ}\text{C}$, com vazão de 50 mL min^{-1} de nitrogênio para a obtenção da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC - 60 Shimadzu[®]), no LABSPEC da UEL, do Depto de Ciências Exatas - Prof. Dr. Henrique de Santana.

4.7.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

Foram pesados 5 mg de amostra em cadinho de alumínio, com taxa de aquecimento $15\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ de 25 a $600\text{ }^{\circ}\text{C}$, com vazão de 50 mL min^{-1} de nitrogênio para a obtenção da TGA e a Termogravimetria Derivada (DTG) no equipamento Thermogravimetric TGA-50 Shimadzu[®], no LABSPEC da UEL, Depto de Ciências Exatas - Prof. Dr. Henrique de Santana - e os resultados do TGA foram expressos em % de massa e o DTG em mg seg^{-1} .

4.8 ATIVIDADE HEMOLÍTICA *IN VITRO*

A atividade hemolítica foi realizada em eritrócitos de ovinos saudáveis, colhidos utilizando tubo à vácuo heparinizado. Os eritrócitos foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS 0,1 M, pH 7,2), associado de centrifugação a 1000 rpm por 10 minutos (Universal 320 R – Ttettich Zentrifugen) e o sobrenadante foi descartado, o processo foi repetido três vezes. Posteriormente, preparou-se a suspensão de hemácias a 2% em PBS. Em placas de 96 poços na proporção 1:1 com volume final $200\text{ }\mu\text{L}$, foi adicionado em cada poço a suspensão de hemácias e os tratamentos: controle negativo (PBS), controle positivo (Triton X-100 a 1%), Dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração final de 0,5%, e a solidagenona utilizada em quatro concentrações diferentes (0,1 0,06, 0,03 e $0,01\text{ mg mL}^{-1}$). O DMSO foi utilizado para diluição da solidagenona mantendo a concentração final de 0,5%, e para preencher o volume total foi adicionado PBS. As placas foram incubadas por 3 horas a $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ à 5% de CO_2 . Posteriormente, as placas foram centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos, e os sobrenadantes foram coletados e analisados pela leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm (Thermo Scientific, Multiskan GO) (BORTOLETI et al., 2018). As análises foram realizadas em três repetições e em duplicata, aprovado pelo comitê de ética para experimentação animal pela UEL sob o registro nº 82862016.60, no Laboratório de Imunoparasitologia de Doenças Negligenciadas e Câncer, Dep. De Patologia Experimental, Resp Wander Rogério Pavanelli.

As concentrações que não causaram toxicidade eritrocitária foram utilizadas no ensaio biológico *ex vivo*.

4.9 ENSAIO BIOLÓGICO: MODELO *EX VIVO*

Cinco pares de orelhas de cinco suínos com cinco meses de vida foram colhidas no abatedouro Frigorífico Prosperidade (CNPJ: 16.992.533/0001-37, localizado na rodovia PR 90, Km 382), pós-morte, foi refrigerado e transportado ao Laboratório de Patologia Animal da UEL do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias - Prof. Dra. Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense.

O meio de cultura *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM) enriquecido com glicose, foi preparado com água ultrapura estéril e adicionado 3,7 g de bicarbonato de sódio e homogeneizado. As peles foram submetidas a tricotomia e higienizadas com clorexidina à 2% e solução fisiológica 0,9% estéril. Posterior a higienização, foram retirados 75 fragmentos, por par de orelha de cada suíno, com *punch* de biópsia de 6 mm e transferidos para 200 mL de meio de cultura recém preparado com 0,250 µL de gentamicina. Aleatoriamente, foram retirados três fragmentos de explantes zero horas, sendo um fixado em solução de formalina tamponada a 10% para avaliação histológica, e dois pesados e mantidos a - 80 °C até a avaliação da resposta oxidativa.

Os outros 72 fragmentos foram distribuídos em 4 placas de cultivo de 6 poços, sendo 3 explantes por poço, em 6 mL de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma F0804), 1% de aminoácidos (MEM Vitamin Solution 100x - Sigma M6895), 1% de insulina, transferrina e selênio (ITS Liquid Media supplement 100x - Sigma I3146) e 1% solução de antibiótico (100 U mL⁻¹ de penicilina, 100 µg de estreptomicina e 250 ng mL⁻¹ de anfotericina B; Antibiotic Antimycotic Solution 100× Stabilized - Sigma A5955) e distribuídos em seis tratamentos: controle (meio de cultura), Dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração final de 0,5%, extrato bruto (0,1 mg mL⁻¹) (adaptado de ZUBAIR et al., 2016) e a solidagenona utilizada em três concentrações diferentes (0,06, 0,03 e 0,01 mg mL⁻¹) (adaptado de MARCONDES-ALVES et al., 2017; TSAI et al., 2018) e de acordo com o teste de hemólise. O DMSO foi utilizado para diluição do extrato bruto e o composto isolado mantendo a concentração final de 0,5%. As placas foram incubadas por 8 dias em estufa à 37,5 °C em 5% de CO₂, com renovação do meio a cada dois dias. Uma placa com seus respectivos tratamentos foi retida e processada conforme o explante zero horas (adaptado de DAME et al., 2008; YEUNG et al., 2016).

4.9.1 Escore morfológico de explantes de pele

Os explantes de pele fixados em solução de formalina tamponada a 10% por 24h, foram processados e submetidos a cortes histológicos em micrótomo (SLEE® - CUT 6062) com 4 µm de espessura em lâminas de vidro para avaliação morfológica.

A avaliação morfológica procedeu-se em microscópio óptico com as lâminas coradas em Hematoxilina e Eosina (H&E), baseado nas principais alterações do tecido epitelial (apoptose de células basais da epiderme, fenda sub-epitelial, edema de derme superficial, degeneração vacuolar da epiderme, infiltrado inflamatório, degeneração vacuolar do epitélio glandular, edema periglandular e/ou glândulas anexas), avaliados em ocular de 20 mm. Para avaliação de apoptose de células da camada basal da epiderme foram considerados células em estágio de picnose e corpúsculo apoptótico, em 12 campos por fragmento no aumento de 400x e para os demais parâmetros, as avaliações foram realizadas ao longo de toda derme e epiderme de cada fragmento (excluindo-se um campo de 400x em cada extremidade).

Para o escore morfológico multiplicou-se os valores definidos para cada alteração avaliada pelo grau de severidade, como observado no exemplo dado da tabela 5. Os valores mínimo e máximo do escore morfológico foram respectivamente 10 e 40 e os valores foram convertidos em porcentagem, sendo o controle zero horas considerado 100 % para a integridade tecidual.

Tabela 5: Exemplo de escore morfológico de explante de pele de suíno analisando as alterações morfológicas e multiplicando pelo grau de severidade.

Alterações (Fator de severidade)	Grau de Severidade				Total
	Ausência (4)	Discreta (3)	Moderada (2)	Acentuada (1)	
Apoptose de célula basais da epiderme (2)	2 x 4				8
Fenda sub-epitelial (1)		1 x 3			3
Edema de derme (1)		1 x 3			3
Deg. vacuolar epiderme (1)			1 x 2		2
Infiltrado inflamatório (2)	2 x 4				8
Deg. vacuolar epitélio glandular (2)		2 x 3			6
Edema periglandular (1)	1 x 4				4
Escore Morfológico (TOTAL)					34

4.9.2 Estresse oxidativo

4.9.2.1 Ensaio oxidante de redução do azul de nitrotetrazólio (NBT)

Os explantes foram triturados com *Tissue Tearor* (Biospec Products® Bartlesville, USA) em solução de EDTA a 0,02 M (1:50 mg μL^{-1}) e centrifugados a 4 °C por 30 s a 3000 rpm. Então, 50 μL do sobrenadante de cada amostra foram transferidos para a placa de 96 poços, que foi incubada por 1 h a temperatura ambiente. O sobrenadante foi cuidadosamente removido da placa e adicionou-se 100 μL do reagente de azul de nitrotetrazólio (NBT) em cada poço que permaneceu por 15 min; Após este período, o NBT foi retirado, e o precipitado formazan foi solubilizado em 20 μL de metanol, 120 μL de hidróxido de potássio (KOH) 2 M e 140 μL de DMSO em cada poço e as absorbâncias dos poços foram medidas em espectrofotômetro (Multi-skan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Vantaa, Finland) a 620 nm. O resultado da leitura foi subtraído do branco que continha somente a solução de metanol, KOH e DMSO.

Todas as amostras foram analisadas em triplicata e os valores obtidos foram expressos em μg de tecido para avaliar a capacidade de redução do ânion superóxido do corante NBT (WATANUKI et al., 2006). As análises foram realizadas no Laboratório de Análises de Materiais e Moléculas, resp. profa. Dra. Elisete Pains Rodrigues.

4.9.2.2 Ensaio da atividade antioxidante ABTS e FRAP

Os explantes foram triturados com *Tissue Tearor* (Biospec Products® Bartlesville, USA) em cloreto de potássio (KCl) 1,15% na proporção (1:10 mg tecido μL^{-1}) e centrifugados (10 min, 3200 rpm, 4 °C). O potencial antioxidante dos explantes foi determinado por duas técnicas, sendo a capacidade de eliminação de radicais livres ABTS (Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina- 6-sulfônico - Sigma ChemicalCo., St. Louis, MO, USA) e a redução de íons ferro FRAP (*Ferric-Reducing Ability of Plasma* -Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Para ambos os ensaios, foi determinada uma curva padrão de Trolox (Sigma ChemicalCo, St. Louis, MO, USA) nas concentrações de 20 - 0,039 nmol L^{-1} e a construção da equação da reta (MARTINEZ et al., 2016).

A solução de ABTS foi diluída em tampão fosfato até que obtive-se absorvância de 0,7 (\pm 0,02) a 730 nm. Após serem triturados, foram transferidos 7 μL do sobrenadante em placa de 96 poços e adicionado 200 μL da solução de ABTS. Após 6 min, as placas foram lidas a 730 nm em espectrofotômetro (Multi-skan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Vantaa, Finland). Para o ensaio FRAP, 30 μL do sobrenadante foram adicionado a placa de 96 poços e, posteriormente, foram adicionado 150 μL do reagente de FRAP e incubada a 37 °C por 20 min, e a absorvância mensurada em 595 nm em espectrofotômetro (Multi-skan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Vantaa, Finland) (MARTINEZ et al 2016).

Todas as análises foram realizadas em triplicatas para cada explante e os resultados das absorvâncias referente a atividade antioxidante foram convertidos a partir das equações da reta e expressos em nmol de Trolox equivalente a μg de tecido. As análises foram realizadas no Laboratório de Análises de Materiais e Moléculas, resp. profa. Dra. Elisete Pains Rodrigues.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística da atividade hemolítica, dos escores morfológicos e as respostas oxidativas (NBT, ABTS e FRAP) dos explantes, os resultados foram apresentados como média e desvio padrão e foram analisados quanto à normalidade dos resíduos (teste de Shapiro) e homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett). Quando ambas as hipóteses foram atendidas e validadas, a análise de variância (ANOVA) foi aplicada, seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas, avaliando o efeito entre todos os tratamentos no teste de hemólise, enquanto os escores morfológicos e as respostas

oxidativas foram subdivididas em 4 blocos (zero horas e dois dias; quatro dias; seis dias; oito dias) e o efeito do tempo de incubação em cada tratamento com os explantes zero horas e ao longo de oito dias de cultivo. Os resultados analisados foram avaliados com significância de 5% utilizando o software estatístico R *studio* versão 3.4.1 - 2017.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PERFIL FITOQUÍMICO QUALITATIVO

De acordo com o perfil fitoquímico qualitativo das principais classes de metabólitos secundários, identificou-se a presença de flavonoides, subclasse flavona, taninos hidrolisáveis, saponinas e terpenos (Tabela 6)

Tabela 6: Perfil fitoquímico qualitativo de metabólitos secundários presentes em raízes de *Solidago chilensis*.

Classe de metabólitos secundários	Reação de identificação	Resultados
Flavonoides	Shinoda	Flavonas
Taninos Hidrolisáveis	Stiasny FeCl ₃	+
Taninos Condensados	Stiasny - flobafeno	-
Antraquinonas	Bornträger Indireta	-
Alcaloide	Bertrand	-
	Dragendorff	-
	Mayer	-
	Ácido Tânico 5%	+
Saponinas	Índice Afrosimétrico	+
Cumarinas	CCDC	-
Terpenos	CCDC (extrato hexânico)	+
	CCDC (extrato diclorometânico)	+

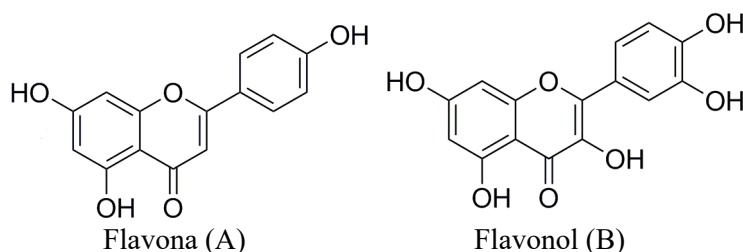
Leg: (+) positivo; (-) negativo; FeCl₃ cloreto de ferro; CCDC – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

Os estudos descrevem as subclasses de metabólitos secundários em *Solidago chilensis* principalmente das partes aéreas, que pode englobar partes vegetativas: caule, folhas e partes reprodutivas: flores (SOUZA; MELLO; LOPES, 2012), sendo relatado até o momento somente um estudo em rizomas indicando a produção de flavonoides, fenólicos e terpenos (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2005).

A triagem fitoquímica, dependendo do ensaio colorimétrico, indica a presença de subclasses de flavonoides, sendo mais de 4200 substâncias flavonoídicas, que são diversificadas e encontradas principalmente em produtos naturais de origem vegetal (ZUANAZZI; MONTANHA, 2010). O ensaio realizado neste estudo indicou a presença da subclasse das flavonas (Figura 14A), no entanto Schmeda-Hirschmann e colaboradores (2005) identificaram a presença de quercetina e expressaram a quantidade total de flavonoides em rizomas. Contudo, o ensaio por mudança de pH, pode mascarar a presença de outra subclasse (MATOS, 1988).

Nas partes aéreas de *S. chilensis* em três épocas do ano, sendo inflorescências e folhas coletadas no verão e folhas na primavera, verão e inverno, foi identificada a presença de flavonoides por ensaio cromático nas folhas em todas as épocas de análise (CHICOUREL et al., 1998). Entretanto, outros estudos identificaram a presença de flavonoides por ensaios cromáticos das partes aéreas de *S. chilensis* (PEDROSO; SILVA; FURLAN, 2009; BAGGIO et al., 2012; CRUZ et al., 2013; CATARINO et al., 2015; SOUZA et al., 2018). Sendo os principais flavonoides isolados de *Solidago chilensis* encontrado nas partes aéreas foram quercetina (Figura 14B) (TAMURA et al., 2009; SABIR et al., 2012), quercitrina (SCHNEIDER et al., 2015; VECHIA et al., 2016) e rutina (SABIR et al., 2012), identificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (ZUANAZZI; MONTANHA, 2010). Como os estudos ocorram em diferentes épocas do ano e com matérias vegetais secos ou frescas, fatores que exercem grande influência na produção e no acúmulo de metabólitos secundários, cuidados especiais devem ser realizados para que a degradação dos compostos seja interrompida após a coleta da matéria vegetal (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010).

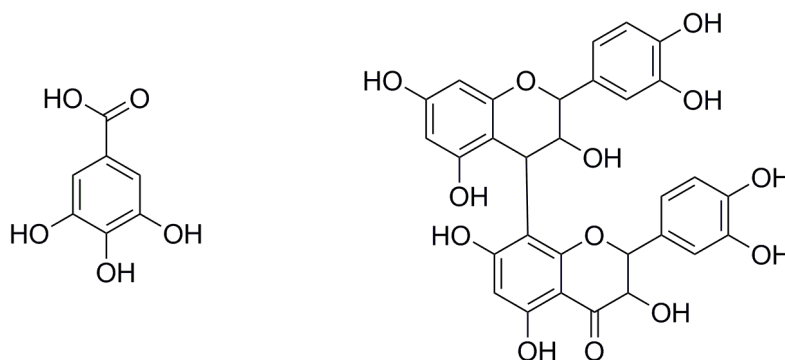
Figura 14: Núcleos flavonoídicos identificado em *Solidago chilensis*.



Fonte: adaptado de ZUANAZZI; MONTANHA, 2010).

Os taninos hidrolisáveis (Figura 15A) estão ligados à molécula de glicose, por outro lado taninos condensados (catequinas) (Figura 15B) são ligados a duas ou mais unidades de derivados flavanoídicos e ambos podem ser identificados por reações químicas de turvação e precipitam com proteínas e metais após se complexarem (SANTOS; MELLO, 2010). Desta forma a reação de Stiasny diferencia a classe de taninos (COSTA, 2000). A partir deste ensaio identificou-se a presença de taninos hidrolisados e a ausência de taninos condensados nas raízes de *S. chilensis*.

Figura 15: Classes de metabólitos secundários taninos hidrolisáveis e condensados.



Taninos hidrolisáveis (ácido gálico - A) Taninos condensados (Catequinas B)

Fonte: adaptado de SANTOS; MELLO, 2010).

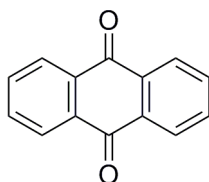
A presença de taninos foi identificada em raízes com a reação de Stiasny somente no presente estudo. Entretanto, foi identificado a presença de taninos em inflorescências no verão e em três épocas do ano nas folhas (CHICOUREL et al. 1998). O mesmo observado por Baggio et al., (2012) nas folhas. O ensaio de complexação com cloreto férrico (FeCl_3) produz uma forte coloração azul em meio alcalino para a presença de taninos hidrolisáveis, já em soluções aquosas, uma coloração verde é menos intensa e observada na presença de catequinas. Embora haja a mistura de ambos os grupos, a coloração verde não é perceptível (SANTOS; MELLO, 2010). Contudo, por meio deste ensaio foi determinada a presença de taninos condensados (PEDROSO; SILVA; FURLAN, 2009). Em contrapartida, Souza e colaboradores (2018) não identificaram nenhuma das classes de taninos nas folhas por cromatografia em camada delgada.

Outra forma de identificação seria a formação de precipitado branco após a reação com acetato de chumbo capaz de determinar taninos hidrolisáveis, o que foi observado por Pedroso, Silva e Furlan (2009) e Cruz et al., (2013) em partes aéreas de *Solidago chilensis*. A espécie em estudo pode produzir ambas as classes de taninos, visto que, os flavonoides são observados em praticamente todos os estudos anteriores e os taninos hidrolisáveis são considerados fenólicos simples e originam-se a partir da via metabólica do ácido chiquímico, em contrapartida, os flavonoides são originados por duas vias metabólicas (chiquimato e acetato) (SANTOS; MELLO, 2010; ZUANAZZI; MONTANHA, 2010).

Duas classes de compostos que não foram identificadas nesse estudo nas raízes de *S. chilensis* foram núcleo quinônico (Figura 16), utilizando a reação de Bortränger indireta, corroborando outros estudos (BAGGIO et al., 2012; CRUZ et al., 2013; SOUZA et al., 2018) pesquisado nas partes aéreas e o núcleo cumárico (Figura 17), utilizando a CCDC, assim

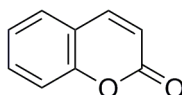
como, Chicourel et al., (1998) em três épocas do ano e nas folhas por Souza e colaboradores (2018) indicando que estas classes de compostos não são produzidas por *S. chilensis*.

Figura 16: Classes de metabólitos secundários núcleo antraquinônico.



Fonte: adaptado de (FALKENBERG, 2010).

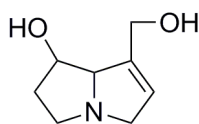
Figura 17: Classes de metabólitos secundários núcleo cumárico.



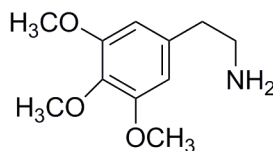
Fonte: adaptado de (KUSTER; ROCHA, 2010).

Os alcaloides são compostos nitrogenados presentes principalmente em angiospermas, sendo considerados verdadeiros (Figura 18A) quando a origem metabólica seja a partir de um aminoácido em que o nitrogênio esteja num sistema heterocíclico, protoalcaloides (Figura 18B) tem a mesma origem, porém o nitrogênio se encontra fora da cadeia cíclica e os pseudoalcaloides (Figura 18C) que não são originados de aminoácidos, mas incorporam o nitrogênio a estrutura química, através do processo de trans-aminação (HENRIQUES et al., 2010).

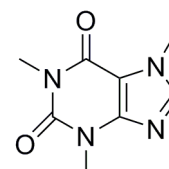
Figura 18: Classes de metabólitos secundários núcleo alcaloídico.



Alcaloide verdadeiro (A)



Protoalcaloide (B)



Pseudoalcaloide (C)

Fonte: adaptado de (HENRIQUES et al., 2010).

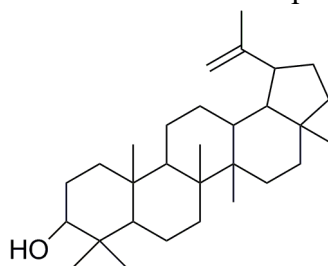
Devido a grande variedade de estruturas dos alcalóides, esses não podem ser identificados em extratos vegetais com apenas um único critério necessitando de reações com reagentes específicos (HENRIQUES et al., 2010). De acordo com Costa (2000), o ácido tânico se complexa com compostos nitrogenados, e no presente estudo, somente esta reação foi positiva não sendo identificado a presença de alcaloides nas raízes de *S. chilensis*.

No entanto, estudos em partes aéreas de *S. chilensis* identificaram a presença de alcalóides em diferentes estações do ano verão (CHICOUREL et al., 1998), inverno (CHICOUREL et al., 1998; CATARINO et al., 2015) e outono (BAGGIO et al., 2012). Contudo, não foi identificada a presença de alcalóides nas folhas colhidas na primavera (CHICOUREL et al., 1998), por Pedroso, Silva e Furlan (2009), que foram adquiridas da empresa Santosflora sem descrição do local e também não foram identificados em folhas de *S. chilensis* (SOUZA et al., 2018), sendo que ambos os estudos não descreveram o período de coleta. De acordo com os estudos descritos anteriormente, a sazonalidade influencia na detecção de alcalóides, sugerindo uma maior concentração nas folhas *S. chilensis*. Porém, as classes de compostos podem estar distribuídas em um ou mais órgãos da planta (HENRIQUES et al. 2010).

Em contrapartida, a formação de precipitados pode ocorrer entre alguns outros metabólitos, tais como: taninos e glicosídeos, os quais devem ser excluídos para evitar interpretações errôneas (COSTA, 2000), sendo que alguns flavonoides podem apresentar reações positivas com o reagente Dragendorff (SAKER; LATIF; GRAY, 2006), que foi utilizado em todas as metodologias descritas anteriormente e, cerca de 47 a 50% de espécies de bactérias, produzem alcalóides (SHAH; SETH, 2010). Mesmo que o ácido tânico tenha indicado resposta positiva, a complexação pode ter ocorrido por aminoácidos, não alcalóidicos, presentes nas raízes e/ou na terra, além da presença de metais no solo e/ou nas próprias raízes.

As saponinas (Figura 19) são heterosídeos contendo em sua estrutura uma porção lipofílica (terpenos ou esteroides) e hidrofílico (sacarídeos). O equilíbrio entre ambas as partes, determina sua propriedade emulsificante, reduzindo a tensão superficial da água e, em solução aquosa, formam espuma persistente e abundante (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2010). Na avaliação realizada para determinar o índice afrosimétrico foi positivo, sendo necessário 1 g de raiz seca de *Solidago chilensis* em 28,57 mL para produzir 1 cm de espuma persistente em 10 mL.

Figura 19: Classes de metabólitos secundários núcleo saponina triterpênica.



Fonte: adaptado de (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2010).

A presença de saponinas nas partes aéreas de *S. chilensis* não foi identificada em outros estudos (CHICOUREL et al., 1998; PEDROSO; SILVA; FURLAN, 2009). Em contrapartida, houve a manutenção de espuma persistente nas folhas de *S. chilensis* (BAGGIO et al., 2012; CRUZ et al., 2013; CATARINO et al., 2015; SOUZA et al., 2018). Embora, nenhum dos estudos avaliou o índice afrogênico, não foi possível comparar o resultado obtido, porém foi possível confirmar a presença de saponinas em todas as partes da espécie em estudo. Por outro lado, a técnica empregada é relativamente simples e não necessita de vidrarias e reagentes específicos, mas depende da agitação manual vigorosa vertical para produção de espuma, o que pode haver uma variação de precisão ou replicabilidade (MATOS, 1988).

Ao avaliarmos a presença de terpenos (secção 25, p. 19) ambos os extratos obtidos de raízes de *S. chilensis* por hexano e diclorometano, foi observado manchas roxas em diferentes alturas da cromatoplaça, sem diferença visuais significativas, indicando a presença de compostos terpênicos. De acordo com Bohlmann e colaboradores (1980), o gênero *Solidago*, produz compostos terpenoídicos, sendo o diterpeno solidagenona isolado de partes subterrâneas (RODRÍGUEZ et al., 2005) e de inflorescências (VALVERDE-SOARES, AZEVEDO-SILVA; TOMASSINI, 2009). Contudo, a presença de triterpenos não foi identificado nas inflorescências e nem nas folhas independente da época de coleta (CHICOUREL et al., 1998), porém foram identificados em extratos de folhas de *S. chilensis* e em cortes histológicos das mesmas (SOUZA et al., 2018).

Apesar de apresentarem desvantagens, como subjetividade do analista e interferências nas colorações observadas, os ensaios colorimétricos para avaliação do perfil fitoquímico qualitativo, pode indicar classes de compostos de interesse auxiliando na triagem de plantas medicinais com finalidades terapêuticas e/ou nutricionais, servindo de base para futuros estudos. Entretanto, técnicas mais específicas são de suma importância para identificação dos compostos.

5.2 ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

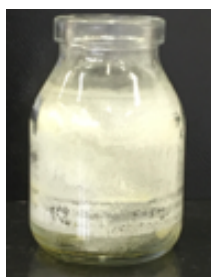
As raízes de *Solidago chilensis* coletadas foram secas em estufa e realizou-se a extração com 2566,36 g da droga vegetal. Após o processo de extração, foram obtidos 39,37 g de extrato diclorometânico seco, ao qual foram submetidas à Cromatografia Líquida a Vácuo em gradiente crescente de polaridade e os rendimentos das frações estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7: Rendimento do fracionamento de Cromatografia Líquida a Vácuo do extrato bruto de raízes de *Solidago chilensis*.

Solventes	Proporção (%)	Massa (g)	Rendimento (%)
Hexano	100	0,70	1,79
Hexano: Acetato de Etila	9:1	12,69	32,23
Hexano: Acetato de Etila	8:2	12,47	31,69
Hexano: Acetato de Etila	7:3	1,86	4,72
Hexano: Acetato de Etila	6:4	4,08	10,36
Hexano: Acetato de Etila	5:5	2,67	6,78
Hexano: Acetato de Etila	3:7	1,96	4,97
Acetato de Etila	100	1,22	3,10
Metanol	100	1,12	2,84

As duas frações que apresentaram o maior rendimento foram 9:1 e 8:2 essa última apresentou a formação de precipitado (Figura 20) na fração 8:2, que após sucessivas lavagens com metanol gelado, o sobrenadante foi separado com rendimento de 10,94 g e os precipitados separados apresentaram rendimento de 1,30 g, equivalente à 3,30 % do extrato bruto. Após a realização da Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC), observou-se o fator de retenção dos precipitados separados de 0,45 cm.

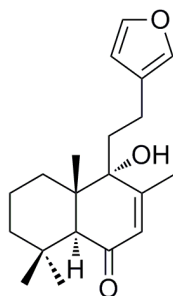
Figura 20: Precipitado branco obtido do fracionamento do extrato bruto das raízes de *Solidago chilensis* na fração 8:2.



Fonte: Autor

A solidagenona é um diterpeno de núcleo labdano, que apresenta a massa molecular de 316,43 (Figura 21), de fórmula molecular de $C_{20}H_{28}O_3$ e a análise elementar centesimal obtida por software *ACD labs* foi de 75,91 % C; 8,92 % H; 15,17% O. A espectrometria de massa de Ionização por Electrospray (MS-ESI) do íon molecular no modo negativo, confirmou com a perda de um hidrogênio com massa final de 315,43 $m.z^{-1}$ (Apêndice 1 p. 106) a solidagenona, sendo o pico base do íon molecular de massa 301,45 $m.z^{-1}$. Todos os picos da fragmentação da solidagenona estão descritos na tabela 8 e os respectivos íons moleculares estão apresentados na figura 22.

Figura 21: Solidagenona isolada das raízes de *Solidago chilensis*,

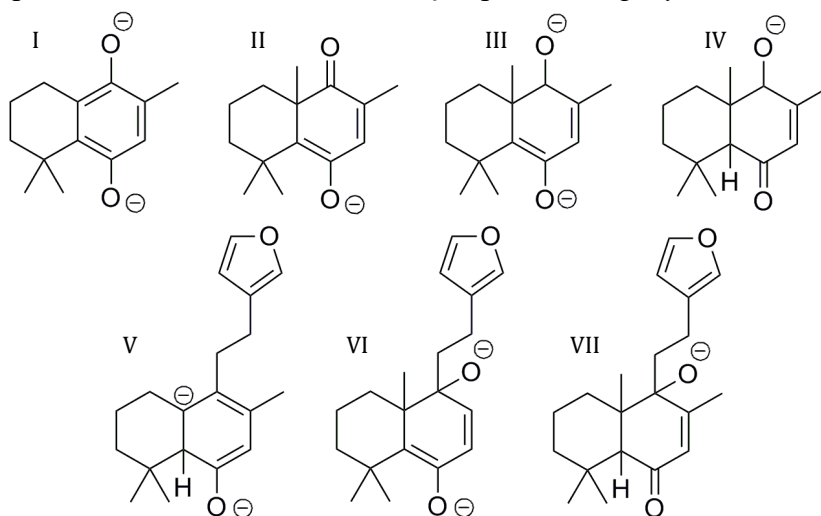


Fonte: BOHLMANN et al., 1980

Tabela 8: Dados dos espectros de massa de Ionização por Electrospray da fragmentação em modo negativo da solidagenona isolada de raízes de *S. chilensis*.

Picos	m z ⁻¹
1	191,4
2	204,4
3	219,4
4	220,4
5	221,5
6	284,4
7	300,5
8	315,5

Figura 22: Fragmentação da solidagenona isolada das raízes de *Solidago chilensis*, em modo negativo por Espectrometria de Massa de Ionização por *Electrospray*.



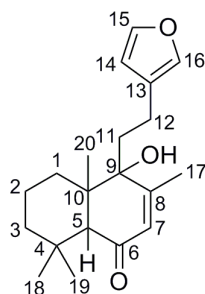
Leg: Fragmentações de solidagenona com as respectivas massas - (I) 204,4 m z⁻¹, (II) 219,4 m z⁻¹, (III) 220,4 m z⁻¹, (IV) 221,4 m z⁻¹, (V) 284,4 m z⁻¹, (VI) 300,5 m z⁻¹, (VII) 315,5 m z⁻¹.

Fonte: Autor

A análise do espectro 1D de RMN de carbono (¹³C) (Apêndices 2-4 p. 106-107) identificou a presença de 20 átomos (Figura 23), os quais após análises dos espectros de

Dept 135 e 90, foram atribuídos a presença de 4 metilas (-CH₃), 5 Carbonos metilênicos (-CH₂), 5 Carbonos metínicos (-CH) e 6 carbonos quartenários que estão apresentados na Tabela 9 e seus respectivos deslocamentos químicos (δ).

Figura 23: Identificação numérica sequencial de identificação dos átomos de carbonos da solidagenona isolada das raízes de *Solidago chilensis*.



Fonte: Autor

Tabela 9: Dados dos espectros 1D de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C (100 MHz; δ em ppm), Dept 135 (+, - e ausente) e Dept 90 (+ e ausente) da solidagenona isolada de raízes de *Solidago chilensis* em CDCl₃.

Carbono 1D			
¹³ C	δ	Dept 135	Dept 90
C-1	31,6	-	ausente
C-2	17,8	-	ausente
C-3	42,6	-	ausente
C-4	32,2	Ausente	ausente
C-5	55,8	+	+
C-6	200,1	Ausente	ausente
C-7	129,2	+	+
C-8	155,6	Ausente	ausente
C-9	76,6	Ausente	ausente
C-10	46,4	Ausente	ausente
C-11	33,2	-	ausente
C-12	21,2	-	ausente
C-13	125,1	Ausente	ausente
C-14	110,7	+	+
C-15	143,1	+	+
C-16	138,6	+	+
C-17	20,0	+	ausente
C-18	33,8	+	ausente
C-19	21,7	+	ausente
C-20	18,2	+	ausente

Leg: (+) o sinal no espectro está para cima; (-) o sinal no espectro está para baixo

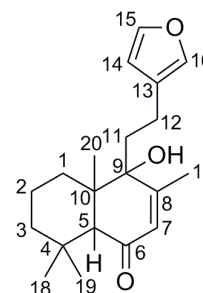
O espectro de 1D de RMN de hidrogênio (¹H) (Apêndice 5 p. 108), foram

determinados os δ para cada ^1H , com as respectivas multiplicidades, sendo nove *multipletos* (*m*), um *quarteto* (*q*), um *tripletto* (*t*), um *dupletto* (*d*), dois *duplo dupletto* (*dd*), três *singletos* (*s*) e um *singleto largo* (*sl*) e três constantes de acoplamento (*J*) (Tabela 10).

As metilas foram identificadas a partir dos resultados de Dept 135 e 90 que estão acopladas aos carbonos 17, 18, 19 e 20. Pode-se atribuir que cada um dos três *singletos* são destas metilas, no entanto, só foi possível determinar a metila do C17 pela constante de acoplamento (*J*) por ser igual ao H7, sendo um *d* e um *q* respectivamente, demonstrando que ambos os ^1H estão próximos. A partir do *J* foi possível determinar que o H15 (*t*) acopla ao H14 (*dd*), este por sua vez, também acopla ao H16 (*m*) havendo assim uma proximidade entre os três (Figura 24).

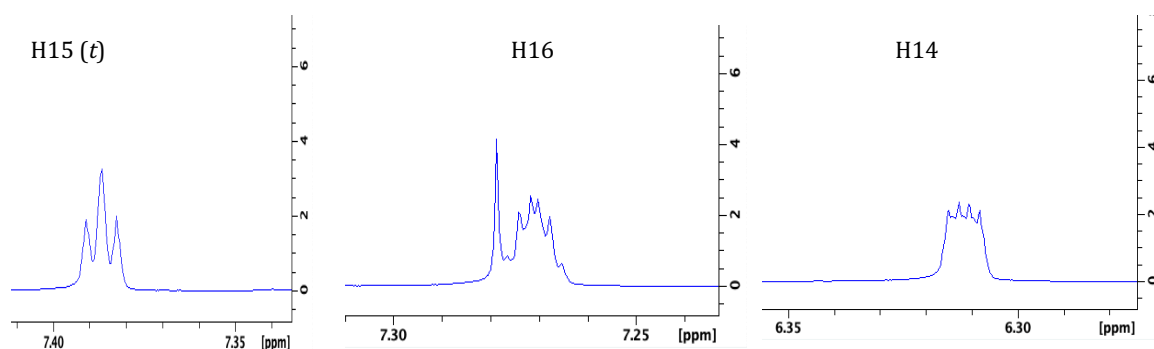
Tabela 10: Dados dos espectros 1D de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (400 MHz; δ em ppm; *mult.*; *J* em Hz) de solidagenona isolada de raízes de *Solidago chilensis* em CDCl_3 .

Hidrogênio 1D	
^1H	δ ; <i>mult.</i> ; <i>J</i>
H-1a	1,59; <i>m</i>
H-1b	1,78; <i>m</i>
H-2	1,55; <i>m</i>
H-3a	1,17; <i>m</i>
H-3b	1,37; <i>m</i>
H-5	2,7; <i>sl</i>
H-7	5,71; <i>q</i> ; 1,15
H-11a	1,91; <i>m</i>
H-11b	2,07; <i>m</i>
H-12	2,66; <i>m</i>
H-14	6,30; <i>dd</i> ; 0,93; 1,61
H-15	7,37; <i>t</i> ; 1,61
H-16	7,26; <i>m</i> ; 0,93
H-17	2,02; <i>d</i> ; 1,15
H-18	1,15; <i>s</i>
H-19	1,19; <i>s</i>
H-20	1,00; <i>s</i>



Leg: (δ) deslocamento químico em ppm; (*mult.*) multiplicidade; (*J*) constante de acoplamento em Hz, (*m*) *multipletto*, (*sl*) *singleto largo*, (*q*) *quarteto*, (*dd*) *duplo dupletto*, (*t*) *tripletto*, (*d*) *dupletto* e (*s*) *singleto*.

Figura 24: Ampliação do espectro 1D de RMN de ^1H de solidagenona em dos H15, H16 e H14 em CDCl_3 .

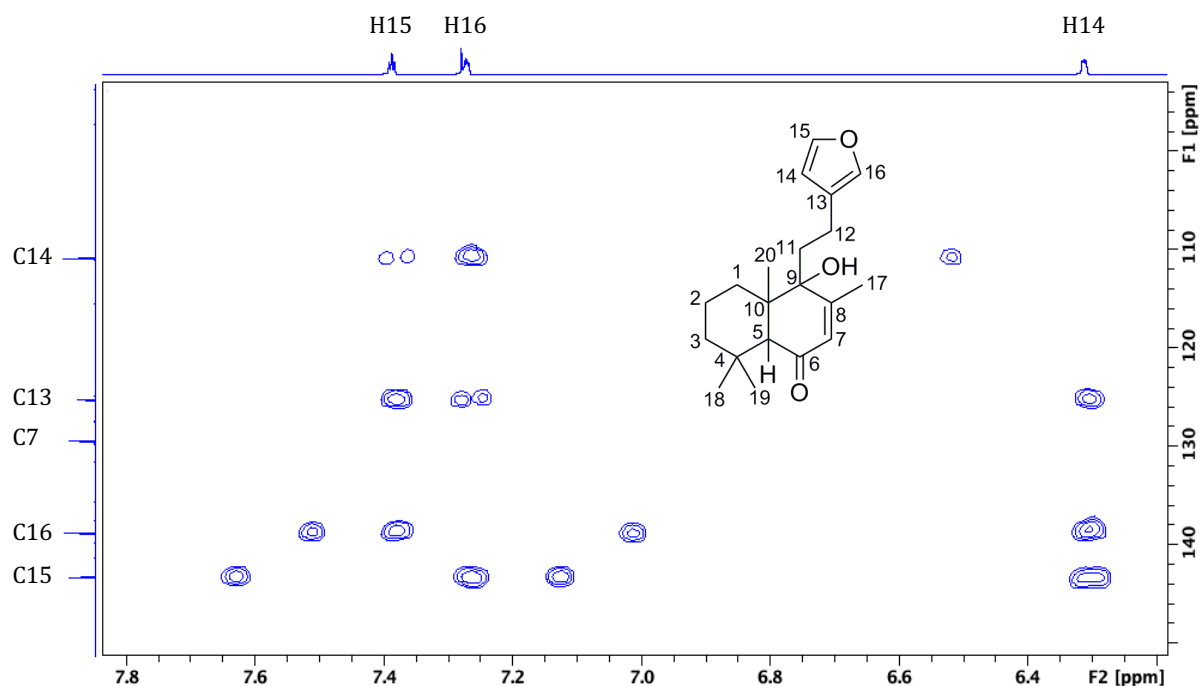


Leg: Multiplicidade de ^1H – H15 (*t*) *triplete*, H16 (*m*), H14 (*dd*) *duplo duplete*

A elucidação molecular procedeu com os espectro 2D de RMN (Apêndices 6-8, p. 108-109) , iniciando com o HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) para determinar os ^1H que estão acoplados aos seus respectivos ^{13}C , HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*) que determina o acoplamento do ^1H a outros ^{13}C e COSY (*Correlation Spectroscopy*) que correlaciona o acoplamento entre os diferentes hidrogênios.

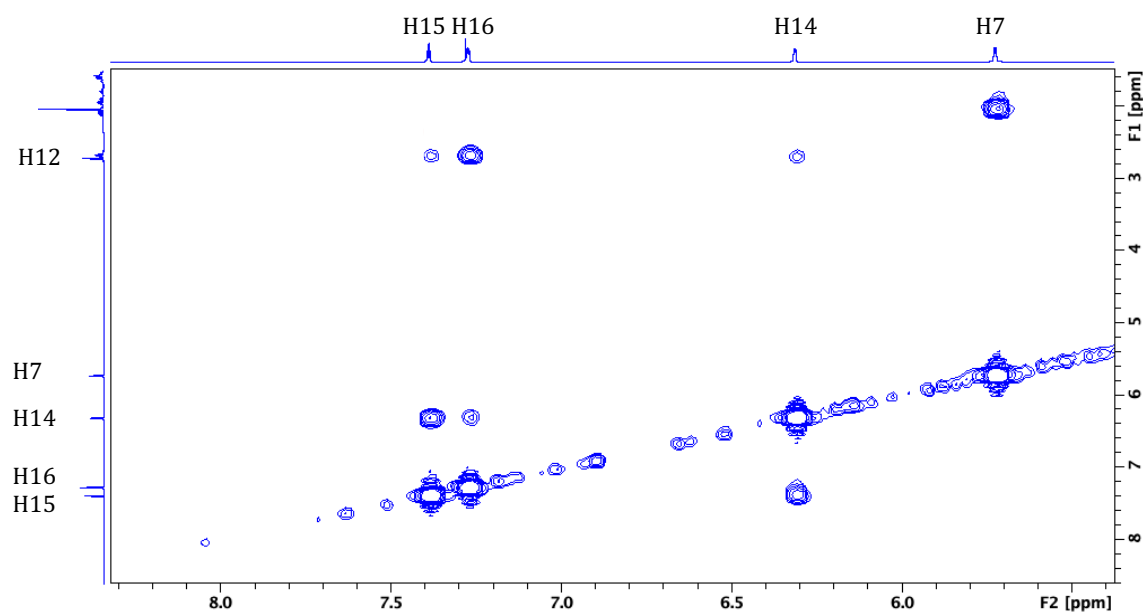
Sabendo que a solidagenona possui um anel furano e de acordo com os dados anteriores da proximidade e interação entre três ^1H , observou pelo HSQC que os sinais de δ 7,38, 6,30 e 7,26 ppm, atribuídos a H15, H14 e H16 respectivamente (metilínicos) acoplam aos C15, C14 e C16 de δ 143, 110 e 138 ppm. Estes δ são característicos de duplas, sendo confirmado a presença de C13 de δ 125 ppm, característico de ^{13}C quartenário, por acoplar aos H15, H14 e H16 observado HMBC (Figura 25), indicativo da presença do anel heterocíclico.

Figura 25: Ampliação do espectro 2D HMBC para formação do anel furano presente na solidagenona em CDCl_3 em CDCl_3 .



O conjunto de sinais obtidos do COSY permite confirmar que os H15 e H14 presentes no anel furano acoplam com o hidrogênio metilênico do C12, vale ressaltar que o H12a acopla com o H16 com J de 0,93 Hz, não sendo observado para o H12b (Figura 26).

Figura 26: Ampliação do COSY para confirmar do anel furano a partir do acoplamento dos Hidrogênios de solidagenona em CDCl_3 .



O espectro de HMBC da metila em δ 2,02 (*d*) com $J = 1,44$ Hz foi atribuído

ao C17, estes hidrogênios, correlaciona-se aos C8, C7 (Figura 27), com δ 155 e 129 ppm respectivamente, característicos de carbono sp^2 , e também está correlacionado ao C9 de δ 76 ppm, este sinal característico de carbono hidroxilado (Figura 28). O Carbono metínico de δ 5,7 ppm ($\{q\}$ com $J = 1,44$ Hz) presente no C7, além da correlação com os átomos de carbonos descritos anteriormente, também se correlaciona com C5 de δ 55 ppm (Figura 29).

Figura 27: Ampliação do espectro 2D HMBC destacando o acoplamento do H17 aos C7 e C8 de solidagenona em $CDCl_3$.

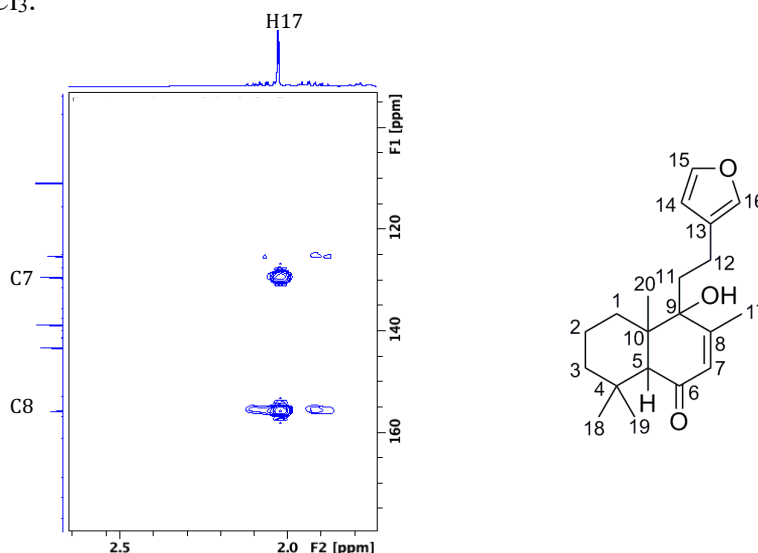


Figura 28: Ampliação do espectro 2D HMBC do H7 demonstrando o acoplamento ao C9 de solidagenona em $CDCl_3$.

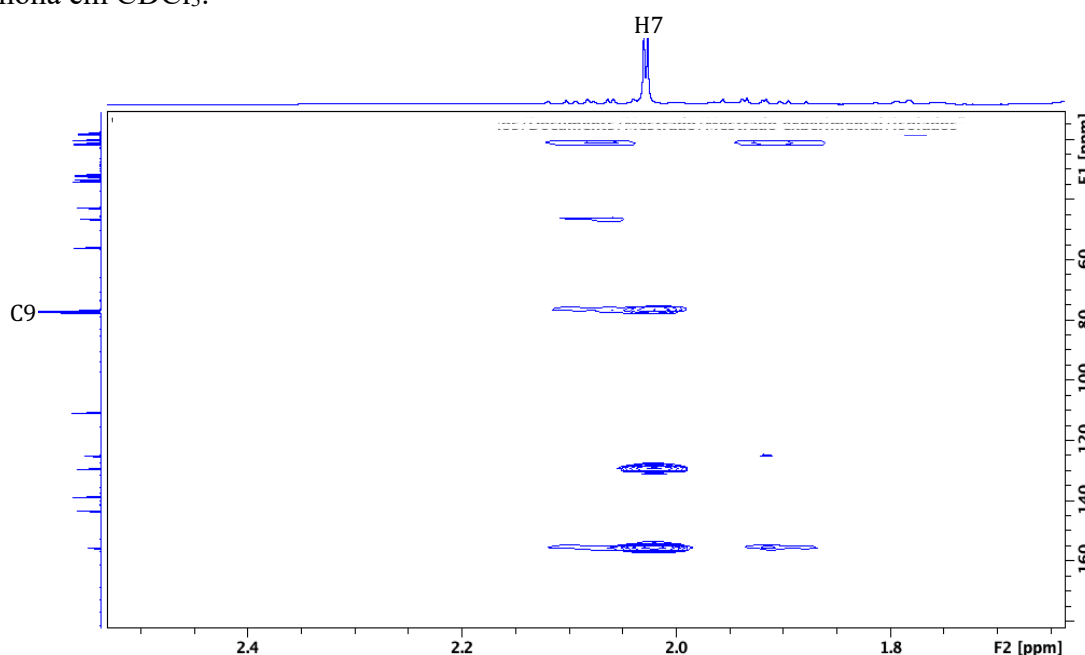
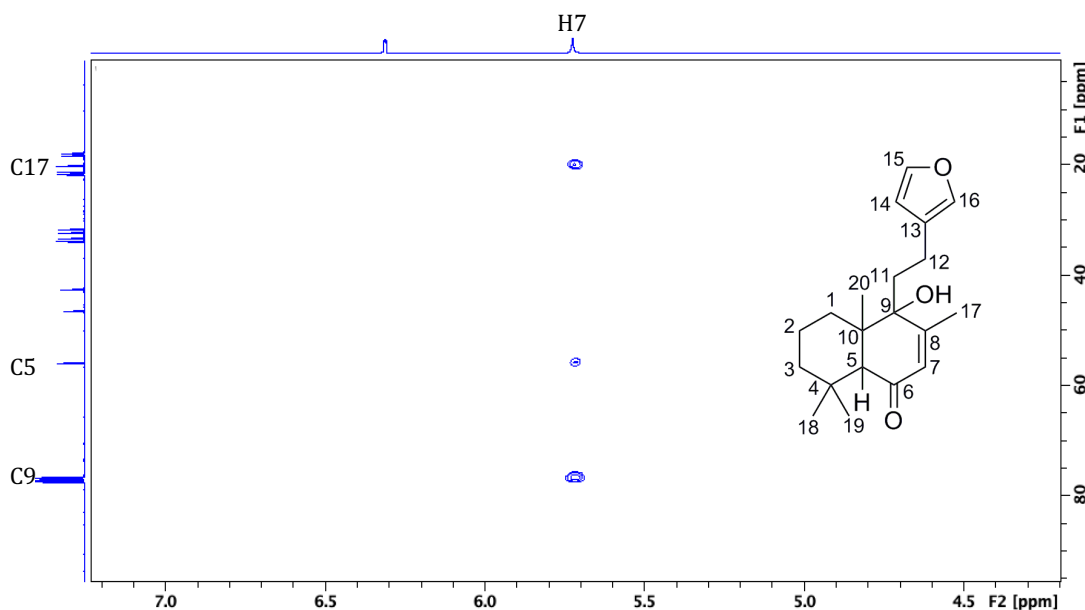
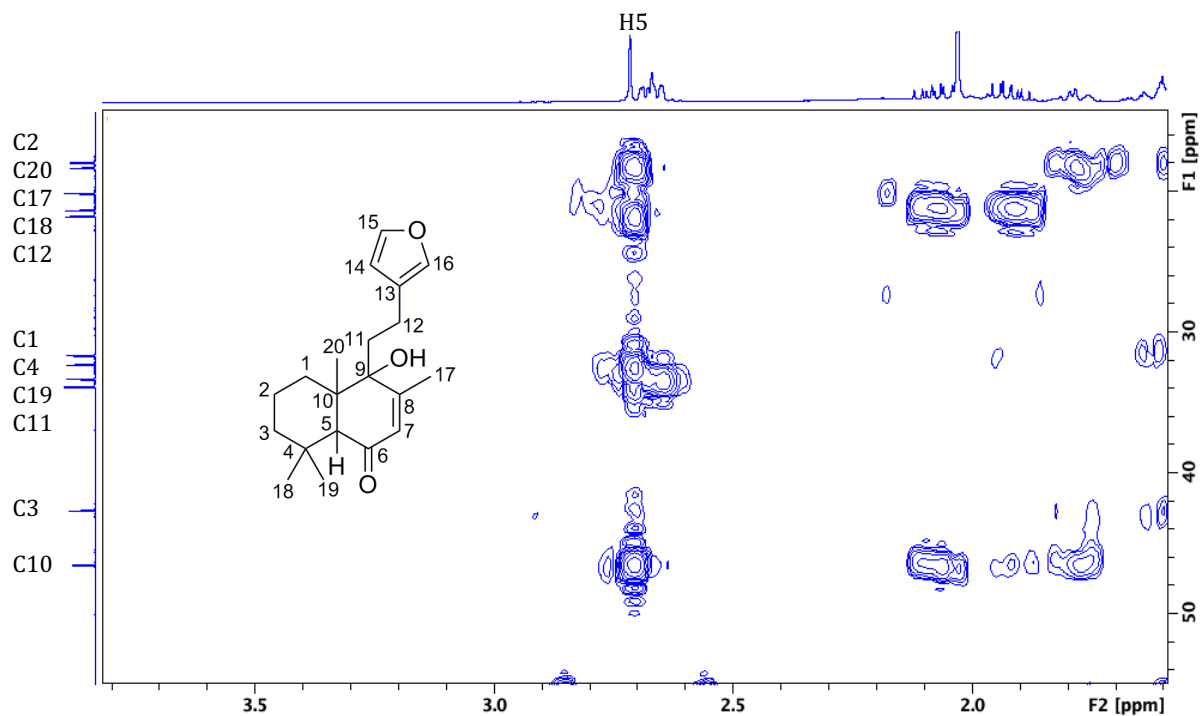


Figura 29: Ampliação do espectro 2D HMBC do H7 demonstrando o acoplamento ao C5 e C17 de solidagenona em CDCl_3 .



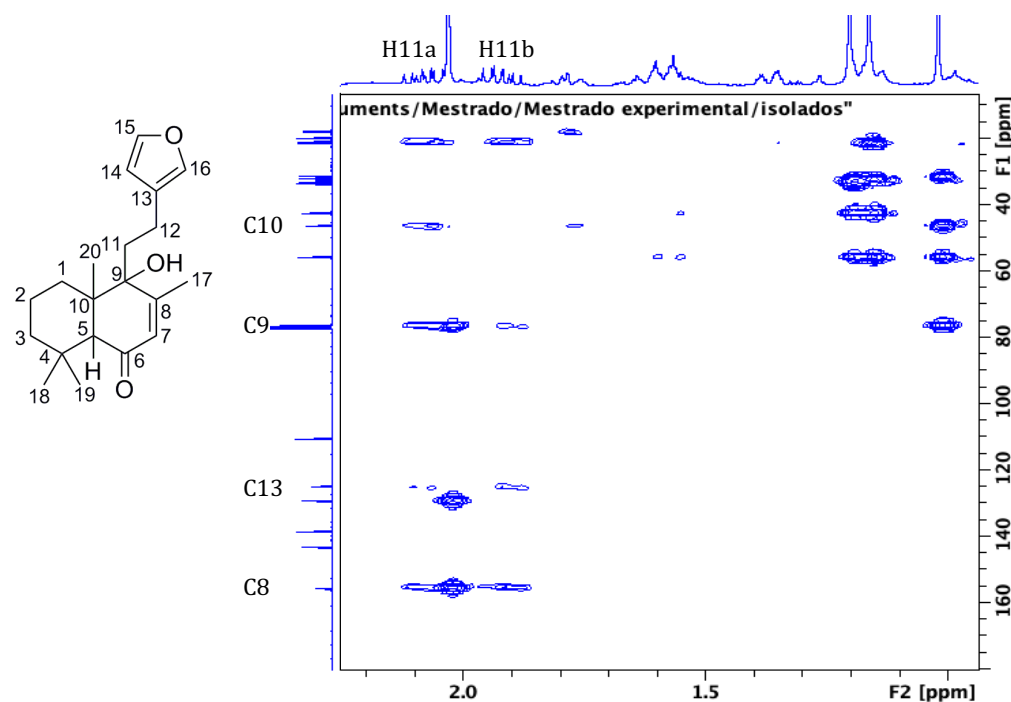
O sinal de H em δ 2,7 (*s*) relativo ao C5, conforme observado através do espectro de HMBC, está correlacionado a uma sequência de carbonos característicos de anel biciclo, sendo o C4 (δ 32,2 ppm), C18 (δ 21,7 ppm), C19 (δ 33,8 ppm), C3 (δ 42,6 ppm), C2 (δ 17,8 ppm), C1 (δ 31,6 ppm), C10 (δ 46,6 ppm), C20 (δ 18,2 ppm), C9 (δ 76 ppm), C17 (δ 20,0 ppm), C11 (δ 33,2 ppm), C12 (δ 21,2 ppm) (Figura 30) e o C6 de δ 200,1 ppm, característico de carbonila ou cetona. Contudo, cada um dos C18, C19 e C20 são metilas em δ 1,15 ppm, δ 1,18 ppm e δ 1,01 ppm, os H18 e H19 correlacionando-se com o C4, C3 e C5, entretanto o H18 acopla ao C11 (δ 33,2) que está ligado à um grupamento metileno.

Figura 30: Ampliação do espectro 2D HMBC do H5 demonstrando o acoplamento de C1, C2, C3, C4, C10, C11, C12, C17, C18, C19 e C20 de solidagenona em CDCl_3 .



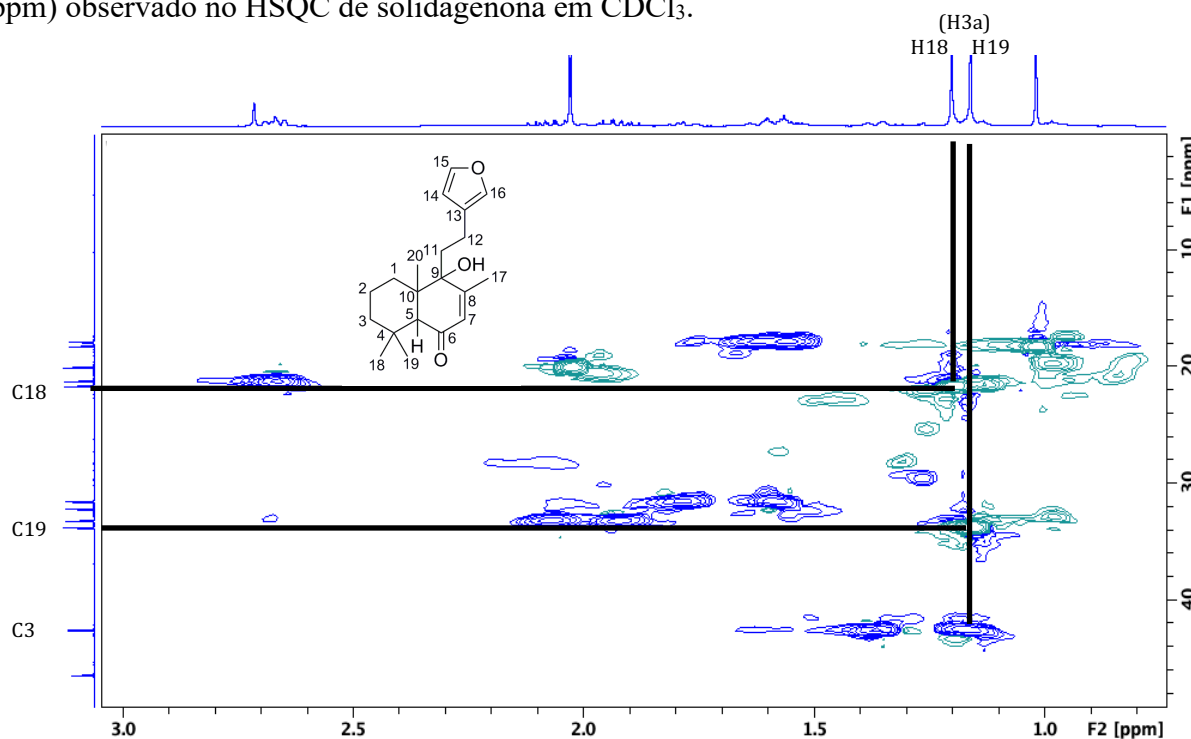
Os H11a e H11b acoplam aos C12, C9 e C8, entretanto o C10 está correlacionado ao H11a e o C13 se correlaciona com ao H11b, indicando que estas correlações entre os Hs descritos acima se apresentam no mesmo plano (Figura 31).

Figura 31: Ampliação do espectro 2D HMBC destacando o acoplamento dos H11a e H11b aos C10, C9, C13 e C8 de solidagenona em CDCl_3 .



O H3a também não aparece no espectro de RMN 1D de hidrogênio, entretanto observa-se a correlação deste ^1H com o C3, pelo espectro de HSQC (Figura 32), sugere uma sobreposição dos sinais e devido a intensidade dos sinais das metilas (C18 e C19), não sendo possível realizar a integração do mesmo. No entanto, os sinais de RMN ^1H e ^{13}C no espectro 1D corroboram com os dados Schmeda-Hirschmann, Astudillo e Palenzuela (2004).

Figura 32: Ampliação do espectro de RMN 2D demonstrando o acoplamento de H3a (δ 1,17 ppm) observado no HSQC de solidagenona em CDCl_3 .



Em relação aos espectros de RMN 2D (Tabela 11), as três técnicas foram essenciais para definir as correlações e os acoplamentos. Entretanto, a orientação espacial será confirmada pelo espectro 2D de RMN NOESY, devido as diferentes estereoquímica de núcleos labdanos que depende da ciclização dos anéis e/ou dos rearranjos moleculares, alterando a orientação espacial do composto (PETERS, 2010; TRAN; WONG; CHAI, 2017).

Conforme o HMBC o H12 acopla aos C14, C13, C16 e C11 (Figura 33), sendo que, o C12 está ligado ao anel furano e o C11 que se liga ao anel biciclo e ambos estão conectados entre eles.

Figura 33: Ampliação do espectro de RMN 2D demonstrando o acoplamento de H12 (δ 2,66 ppm) observado no HMBC de solidagenona em CDCl_3 .

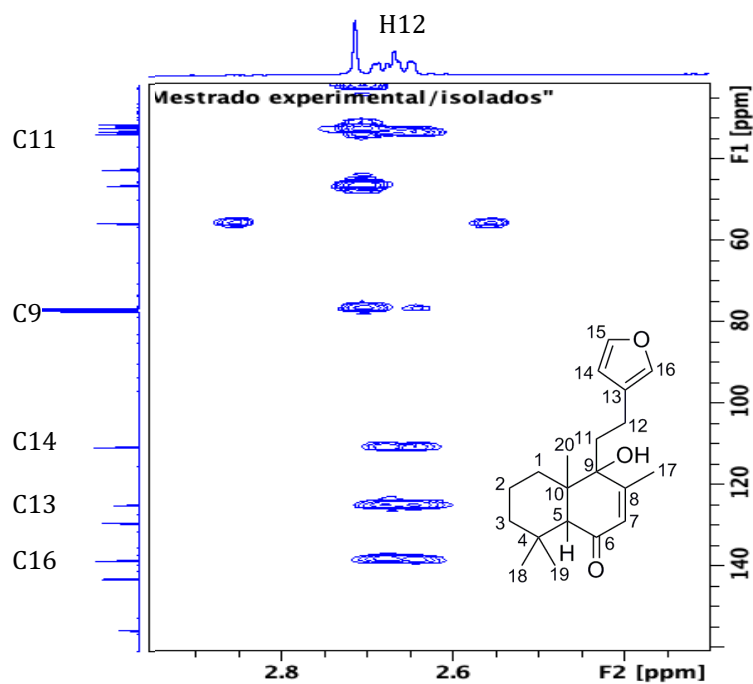


Tabela 11: Dados dos espectros 2D de RMN de HSQC, HMBC e COSY de solidagenona isolada de raízes de *Solidago chilensis* em clorofórmio deuterado (CDCl₃).

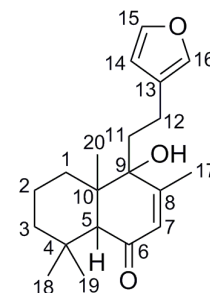
¹³ C	HSQC	HMBC	COSY	
	(C-H)	Acoplamento de ¹ H ao ¹³ C	H	Acoplamento H/H
C-1	H-1a; H-1b	H-2; H-3b; H-5; H-20	H-1a	
C-2	H-2	H-1a; H-2; H-5	H-1b	H-1b/H-20
C-3	H-3a; H-3b	H-1a; H-1b; H-2; H-5	H-2	
C-4		H-2; H-3b; H-5; H-18; H-19	H-3a	
C-5	H-5	H-1b; H-3a; H-3-b; H-7; H-18; H-19; H-20;	H-3b	
C-6		H-1a; H-5; H-17	H-5	H-5/H-7; H-5/H-18; H-5/H-20
C-7	H-7	H-17	H-7	H-7/H-16; H-7/H-17
C-8		H-7; H-11a; H-17; H-20;	H-11 a	
C-9		H-5; H-7; H-11a; H-11b; H-12; H-17; H-20	H-11b	
C-10		H-1a; H-1b; H-2; H-5; H-11a; H-17; H-20	H-12	H-12/H-15; H-12/H-16; H-12/H-17
C-11	H-11a; H-11b	H-12; H-18; H-20	H-14	H-14/H-12; H-14/H-15; H-14/H-16
C-12	H-12	H-11a; H-17	H-15	H-15/H-14
C-13		H-12; H-14; H-15; H-16	H-16	H-16/H-12; H-16/H-14; H-16/H-17
C-14	H-14	H-15; H-16	H-17	H-17/H-7; H-17/12; H-17/H-16
C-15	H-15	H-14; H-16	H-18	H-18/H-5
C-16	H-16	H-12; H-14; H-15	H-19	
C-17	H-17	H-7; H-11 ^a	H-20	H-20/H-1b; H-20/H-5
C-18	H-18	H-5		
C-19	H-19	H-2; H-3a; H-5		
C-20	H-20	H-1b; H-5;		

Leg: RMN, Ressonância Magnética Nuclear; HSQC, *Heteronuclear Single Quantum Coherence*; HMBC, *Heteronuclear Multiple Bond Coherence*; COSY, *Correlation Spectroscopy*

Sendo assim, baseado nos dados da literatura (Tabela 12) e de acordo com as análises de MS-ESI e RMN o diterpeno solidagenona foi isolado de raízes de *S. chilensis*.

Tabela 12: Dados dos espectros 1D de RMN de ^1H e ^{13}C de solidagenona isolada de *Solidago chilensis* em CDCl_3 descritas por Schmeda-Hirschmann, Astudillo e Palenzuela (2004).

Hidrogênio 1D		Carbono 1D	
^1H	δ ; <i>mult</i> ; <i>J</i>	^{13}C	δ
H-1	1,5 – 1,6; <i>m</i>	C-1	31,61
H-2	1,56; <i>m</i>	C-2	17,91
H-3	1,38-1,15; <i>m</i>	C-3	42,63
H-5	2,68; <i>s</i>	C-4	32,24
H-7	5,72; <i>dl</i> ; 1	C-5	55,83
H-11	1,8 – 2,0; <i>m</i>	C-6	200,18
H-12	2,65; <i>m</i>	C-7	129,25
H-14	6,31; <i>dl</i> ; 1.	C-8	155,71
H-15	7,38; <i>dd</i> ; 1,5 e 1	C-9	76,56
H-16	7,26; <i>sl</i>	C-10	46,50
H-17	2,02; <i>d</i> ; 1,5	C-11	33,32
H-18	1,16; <i>s</i>	C-12	21,30
H-19	1,19; <i>s</i>	C-13	125,13
H-20	1,01; <i>s</i>	C-14	110,75
		C-15	143,10
		C-16	138,60
		C-17	20,09
		C-18	33,84
		C-19	21,72
		C-20	18,32



Leg: (δ) deslocamento químico em ppm; (*mult.*) multiplicidade; (*J*) constante de acoplamento em Hz, (*m*) *multipletto*, (*s*) *singleto*, (*dl*) *dupletto largo*, (*dd*) *duplo dupletto*, (*d*) *dupletto* e (*sl*) *singleto largo*.

Os cristais analisados através de espectroscopia na região Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TR), apresentaram hidroxila, metila, metileno e anel furano. As bandas estão descritas e caracterizadas de acordo com o tipo de vibração intramolecular, intensidade dos sinais e o número de onda (PAVIA et al., 2010) na Tabela 13 (Apêndice 9, p. 110).

Tabela 13: Dados do espectro de Infravermelho Transformada de Fourier de solidagenona isolada de raízes de *Solidago chilensis*.

Picos	Vibração	Grupo funcional	Nº de ondas cm^{-1}
1	Estiramento	O-H (hidroxila)	3550 a 3180
2	Estiramento	C-H ₃ (carbono sp^3 - metila)	2860
3	Estiramento	C-H ₂ (carbono sp^2 - metileno)	2930
4	Estiramento	C=O (carbonila - cetona)	1655
5	Estiramento	Anel furano	1565, 1485
6	Dobramento	C-H ₃ (carbono sp^3 - metila)	1415
7	Dobramento	C-H ₂ (carbono sp^2 - metileno)	1378

Não foi possível identificar todos os sinais do cristal analisado por RMN 1D de ^1H . O sinal característico de deslocamento químico para hidroxila de álcoois se localiza entre 4 a 6 ppm (PAVIA et al., 2010). Embora este sinal não tenha sido observado no espectro 1D de hidrogênio, observa-se uma banda larga em 3550 a 3180 cm^{-1} no espectro de infravermelho, característicos de álcoois e fenóis (PAVIA et al., 2010), conforme resultados de Schmeda-Hirschmann, Astudillo e Palenzuela (2004).

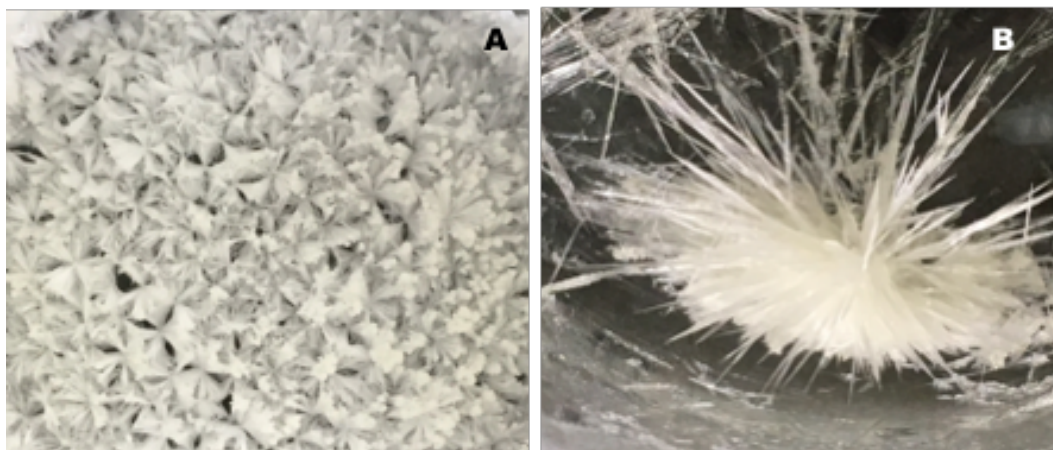
O Espectro de Dispersão Energética (EDS) permite identificação dos elementos químicos presentes nos cristais (ARAGÃO et al., 2013), a partir da ionização em uma área selecionada, gerando um espectro que pode mapear os átomos contidos no analito (ALFONSO et al., 2010). Foi possível identificar a presença de ouro, carbono e oxigênio nos cristais. Ao desconsiderarmos o ouro, impregnado nos cristais, determinou-se o equivalente de 81,34 % de carbono e 18,66 % de oxigênio (Apêndice 10, p. 110). A porcentagem determinada pela microanálise da quantidade dos átomos que compõe o analito permitiu a identificação somente de carbono e oxigênio. O sinal do hidrogênio pode ter sido suprimido devido a dispersão de elétrons para os outros átomos, sendo uma característica da própria técnica (EGERTON, 2011).

A partir da quantidade centesimal dos átomos e a porcentagem dos outros elementos químicos presentes na solidagenona proposto pelo programa *ACD/ChemSketch*, excluindo os átomos de hidrogênio, foram identificados 83,34% Carbono e 16,65% Oxigênio, sendo observado uma diferença de 2% entre as técnicas. Desta forma, a técnica de EDS auxiliou na identificação dos átomos e pode ser ampliada para outras análises. Embora seja possível a detecção de mais de 32 elementos químicos em uma amostra (SOARES; SARON, 2010), não seria possível substituí-la pela análise centesimal que apresenta um erro de 0,5% obtido pela análise centesimal. Contudo, seria necessário avaliar outros compostos a fim de verificar se a diferença proporcional dos átomos se mantem, embora a técnica possa ser aplicada como evidencia forense (ARAGÃO et al., 2013), sendo associada simultaneamente a outras técnicas (Microscopia Eletrônica de Transmissão Espectroscopia de Perda de Energia Eletrônica e Campo Escuro Anular de Alto Ângulo) são capazes de fornecer informações químicas estruturais e funcionais na resolução atômica espacial (ALFONSO et al., 2010).

As análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) mostraram que os cristais apresentaram formato hexagonal. Entretanto com a evaporação da mistura de solventes em temperatura ambiente (Hex:AcOEt), os cristais apresentaram poros nas laterais em formatos similares à losangos em diferentes tamanhos e, no interior, observou-se poros irregulares e de diversos tamanhos. Enquanto, após a recristalização à quente com Acetona: Hexano, os cristais apresentaram fissuras discretas nas laterais sem uniformidade, que não são

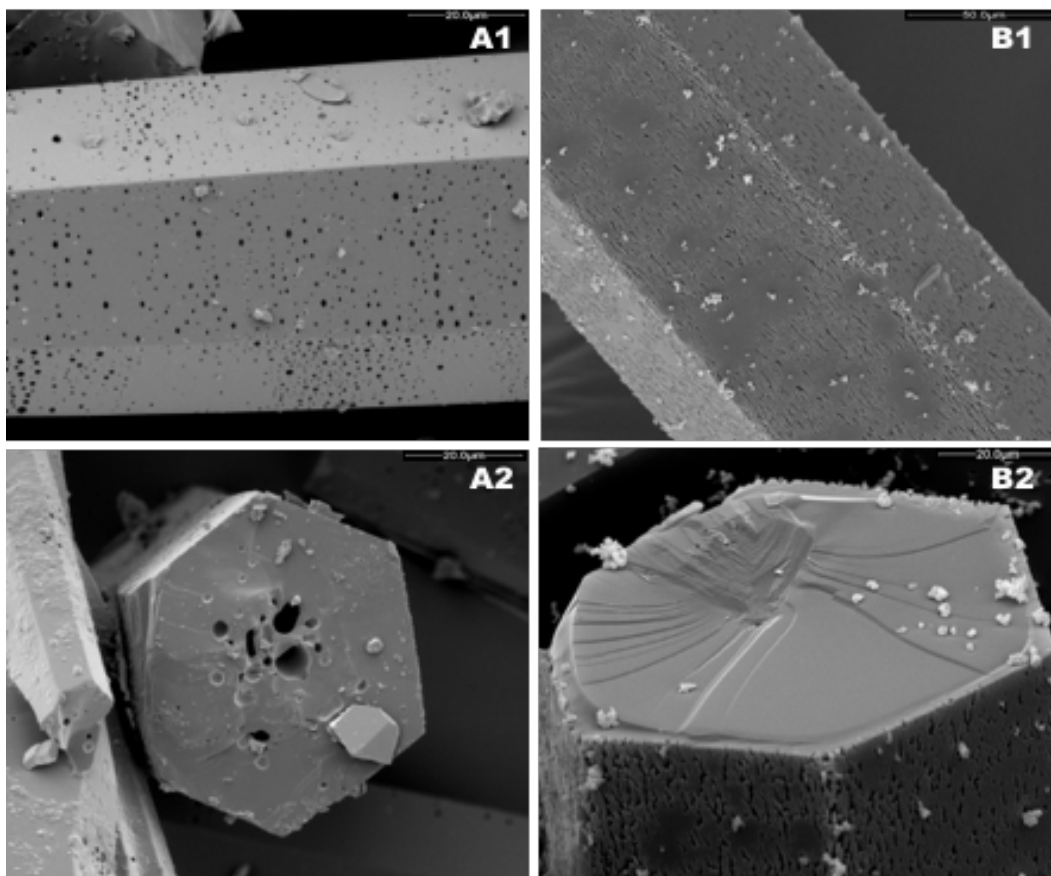
profundas, e sugere que a porção mais próxima da borda foi formada posteriormente, diferenciada por uma linha tênue entre a borda e o centro, sendo possível verificar uma maior uniformidade no centro, com raros poros minúsculos e as saliências internas sugerem terem sido formadas após a quebra da estrutura cristalina (Figuras 34 e 35).

Figura 34: Foto macroscópica do composto isolado de raízes de *Solidago chilensis*: A - cristal sem recristalização; B - cristal recristalizado.



Fonte: Autor

Figura 35: Microscopia eletrônica de varredura dos cristais isolados de *Solidago chilensis*: A1 vista lateral (sem recristalização); A2 vista transversal (sem recristalização); B1 vista lateral (recristalizado); B2 vista transversal (recristalizado).



Fonte: Autor

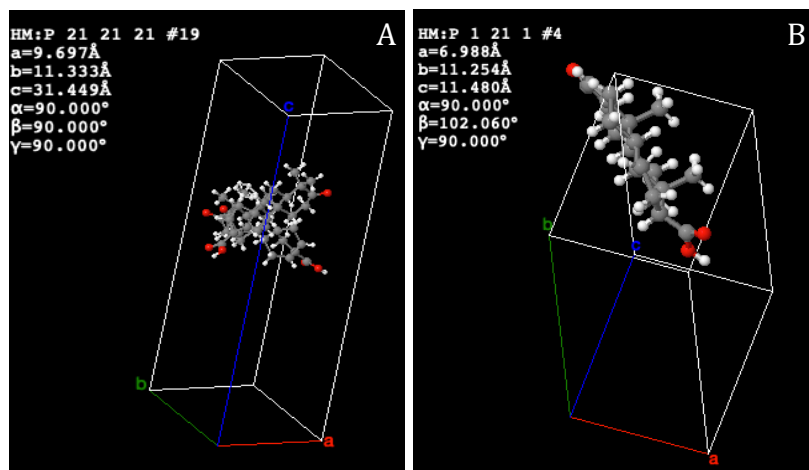
A MEV permite a identificação morfológica dos cristais (ARAGÃO et al., 2013). Baseado no formato hexagonal da solidagenona observado no MEV, buscou-se indexar o sistema cristalino como hexagonal. Dentre os únicos 15 arquivos de informações cristalográficas (cif - “*crystallographic information file*”) encontrados nas bases de dados citadas para a molécula $C_{20}H_{28}O_3$, nenhum ajustou-se adequadamente ao difratograma observado. Desta forma, os modelos de indexação escolhidos foram aqueles cujos parâmetros de rede calculados foram da ordem de uma dezena, e ângulos de 90, 90 e 120°. Os melhores ajustes pressupõem uma mistura de duas fases cristalinas em ambas as amostras (cristal – Figura 35 A1 e A2 e recristalizada – Figura 35 B1 e B2), uma fase com sistema cristalino hexagonal e grupo espacial P63 e outra trigonal de grupo P3. Os valores dos parâmetros são mostrados na Tabela 14.

Tabela 14: Propriedades cristalográficas do composto $C_{20}H_{28}O_3$ solidagenona isolado de raízes de *Solidago chilensis*

Fase	Sistema Cristalino	Grupo de Simetria	Parâmetros de rede a; b; c (Å)	Volume da célula unitária (Å ³)
1	hexagonal	P63	12,2; 12,2; 18,1	2329,01
2	trigonal	P3	9,15; 9,15; 23,04	1670,96

A evaporação do solvente na formação dos cristais a temperatura ambiente mais rápida, pode ter aprisionado as impurezas à matriz cristalográfica ou recobrando os cristais, e com a evaporação acelerada, os cristais tendem a ficar mais deformados (DIAS, COSTA, GUIMARÃES, 2004), em nosso estudo, mais porosos. Contudo, ambos os difratogramas apresentaram praticamente os mesmos picos, entretanto, não foram encontrados compostos com as redes bravais cristalográficas hexagonais de diterpenos na base de dados, somente difratogramas de moléculas diterpênicas com a mesma fórmula molecular $C_{20}H_{28}O_3$, com redes bravais de orientações ortorrômbricas, monoclinicas ou tetraédricas (Figura 36).

Figura 36: Orientação espacial das redes bravais cristalográficas de diterpenos ortorrômbrica (A) e monocíclica (B).

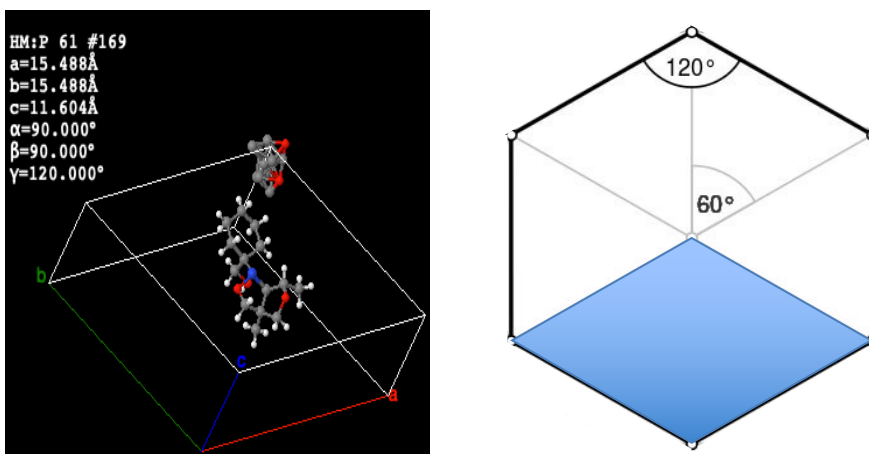


FONTE: CRYSTALOGRAPHY.NET 2018

Os parâmetros de rede são formados por três eixos cristalográficos (a, b e c) e os três eixos angulares (alfa, beta e gama), para a formação da célula unitária e com o agrupamento destas células se obtêm o cristal, estes parâmetros de rede modulam o arranjo espacial cristalino (PRADO; ROCHA, 2015). A estrutura cristalina hexagonal possui um ângulo de 120° (gama) e os outros dois de 90° (alfa e beta) que com o agrupamento de três células, formato de losango, obtêm-se o início do arranjo espacial hexagonal (Figura 37). Os resultados complementares obtidos da solidagenona serão inseridos na base dados para

futuras consultas de outros trabalhos.

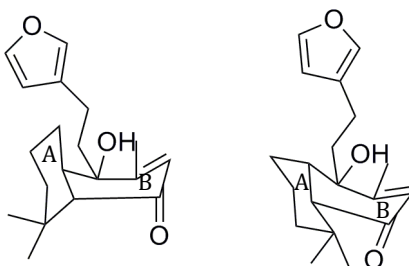
Figura 37: Orientação espacial das redes bravais cristalográficas hexagonal e formação de hexágono a partir do agrupamento de losango.



FONTE: CRYSTALOGRAPHY.NET 2018; AUTOR

Entretanto, o estudo cristalográfico da solidagenona foi descrito e não pode ser comparado devido aos parâmetros (hexagonal - $P6_1$) utilizados para a análise cristalográfica, porém foram caracterizados em cristais hexagonais piramidais, com duas moléculas assimétricas quase idênticas distorcidas por cada célula unitária, sendo o anel A em formato espacial cadeira e o anel B em barco, esta fusão entre os anéis mostram-se uma forma *cis* e o ambos os anéis furanos são observados espacialmente como planares (Figura 38) (MARIEZCURRENA; FORNARO, 1992).

Figura 38: Solidagenona em duas conformações diferenciadas devido a ligação do anel A (formato cadeira) ao anel B (formato barco).



Fonte: Adaptado de MARIEZCURRENA; FORNARO, 1992.

A recristalização tem como finalidade principal, a purificação do composto sólido utilizando um ou mais solventes, de acordo com a solubilidade da substância a ser

recristalizadas (DIAS, COSTA, GUIMARÃES, 2004). Nos trabalhos de Schmeda-Hirschmann, Astudillo e Palenzuela (2004) e de Valverde-Soares, Azevedo-Silva e Tomassini (2009) foram utilizados o hexano e o diclorometano para promover a recristalização, ambos os solventes apolares. No presente estudo, a utilização dos solventes acetona e hexano possibilitou um alinhamento cristalográfico para a compactação do cristal mais eficiente que a evaporação da mistura de acetato de etila e hexano. Embora o acetato de etila (6,2) e o diclorometano (9,1) possuam polaridades semelhantes, a acetona (20,6) é mais polar que ambos, o que pode ter favorecido o processo de recristalização. No entanto, nos estudos experimentais por ambos os autores (SCHMEDA-HIRSCHMANN; ASTUDILLO; PALENZUELA, 2004; VALVERDE-SOARES; AZEVEDO-SILVA; TOMASSINI, 2009), a Difração de Raios-X e a MEV não foram realizados impossibilitando a comparação deste resultado.

Solidago chilensis, planta medicinal incluída no RENISUS, não possui marcador químico definido, porém dados na literatura descrevem alguns compostos isolados e identificados (MOREL et al., 2006; RODRÍGUEZ et al., 2005; SABIR et al., 2012). A solidagenona, isolada neste estudo em quantidades consideráveis (3,30%), pode ser utilizada como um marcador químico da *S. chilensis*. Os marcadores químicos garantem a autenticidade e qualidade de uma planta medicinal, independente de ser avaliado no produto intermediário ou no produto final (LI et al., 2008), que são descritos em monografias (FOLASHADE; OMOREGIE; OCHOGU, 2012), como as técnicas descritas na Farmacopeia Brasileira, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para determinar a autenticidade de *Arnica montana* (ANVISA, 2010).

Os precipitados separados foram analisados por CLAE e apresentaram duas faixas de absorção do comprimento de ondas 225 nm (Apêndices 11 e 12 – p.111) e 254 nm (Apêndices 13 e 14 – p.112), com um tempo de retenção relativa de 23,385 min e pureza relativa de 98,174 e 97,343%, respectivamente. A CLAE é uma das técnicas analíticas utilizada para confirmar e caracterizar uma substância no controle de qualidade (FOLASHADE; OMOREGIE; OCHOGU, 2012). O tempo de retenção da solidagenona na CLAE com fluxo isocrático de sistema eluente obtido por Valverde-Soares, Azevedo-Silva e Tomassini (2009) foi de 71,6 minutos. No presente estudo, este tempo de retenção foi reduzido em 23,3 min, ao se utilizar o sistema eluente de gradiente decrescente. Ambos espectros de absorção UV foram obtidos com o mesmo comprimento de onda (225 nm) e apresentaram mesmo comportamento de absorvidade, que pode ser explicada devido as variações das intensidades de transferência de elétrons, sendo a faixa de 220 a 250 nm característica de enonas simples (PAVIA et al., 2010).

O extrato bruto apresentou 41 picos nas mesmas condições ao composto isolado de raízes de *S. chilensis*. De acordo com Schmeda-Hirschmann e colaboradores (2005), os rizomas secos em espécies selvagens de *Solidago chilensis* apresentam concentração de solidagenona que variam entre 0,5 a 3,5%, com o melhor rendimento no final do verão, entre março e abril, sendo obtido por sothlex utilizando metanol. Em contrapartida, a solidagenona praticamente não foi detectada por CLAE no extrato bruto diclorometânico (Apêndices 15-18, p. 113-114), sugerindo que a detecção de solidagenona sofreu um efeito antagônico com outras moléculas extraídas durante o processo extrativo (JIANG et al., 2010). Sendo necessário o uso de outra metodologia cromatográfica, a fim de separarem os compostos presentes no extrato bruto e determinar a concentração de solidagenona. Além de verificar se este seria o composto majoritário presente nas raízes, utilizando outras técnicas hifenadas que melhoram a resolução e auxiliam na identificação do composto (JIANG et al., 2010). Assim como, no extrato bruto das inflorescências obtidos por maceração dinâmica utilizando éter-etílico:etanol (1:1), foi observado equivalente à 20,8% de solidagenona no comprimento de onda de 220 nm (VALVERDE-SOARES; AZEVEDO-SILVA; TOMASSINI, 2009).

Verificamos em nosso estudo que uma pequena variação de 30 nm influencia na proporção e, conseqüentemente, na concentração de solidagenona no extrato bruto. Ademais, também pode haver um efeito sinérgico supraestimando a concentração da substância analisada em função de outros compostos presentes em extratos brutos (JIANG et al., 2010). Contudo, a parte do vegetal e os métodos de obtenção de extratos, são fatores que influenciam na concentração final de diferentes compostos (SONAGLIO et al., 2010).

5.3 ANÁLISES TÉRMICAS

O ponto de fusão da solidagenona foi 128 a 131° C, corroborando os dados da literatura que apresentaram 130 a 131 °C (VALVERDE-SOARES; AZEVEDO-SILVA; TOMASSINI, 2009) e 132 a 134 °C (GOMES et al., 2018). O resultado do DSC apresentou uma faixa de fusão da solidagenona entre 118,3 a 136,5 °C, sendo que o ponto máximo de depressão foi observado em 131 °C (Apêndice 19 – p. 115), o qual justifica a variação do ponto de fusão (WENDLANDT, 1986) observadas por outros autores (VALVERDE-SOARES; AZEVEDO-SILVA; TOMASSINI, 2009; GOMES et al., 2018). A variação entre os equipamentos e as respectivas sensibilidades para determinar a fusão de um composto pode variar, enquanto o DSC amplia a faixa de transição do estado físico abrangendo as diferenças entre outros estudos e, de acordo com Wendlandt (1986), o DSC avalia a variação de entalpia

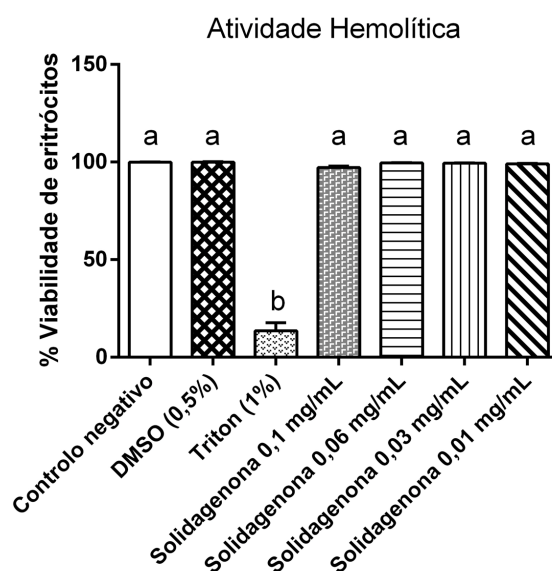
da amostra.

A curva TGA (Apêndice 20, p. 115) apresentou um estágio de decomposição térmica a partir de 232,38 a 350,02 °C com perda de massa, evidenciado pelo DTG a 319,6 °C, característico da degradação da solidagenona. Desta forma, foi possível determinar a temperatura máxima utilizada em um meio reacional afim de evitar a degradação da solidagenona. O TGA avalia a degradação da amostra (WENDLANDT, 1986). Ambas técnicas (DSC e TGA) são simples e necessitam de baixa quantidade de amostra (WENDLANDT, 1986). No entanto, o DSC e o TGA da solidagenona não foram realizados em estudos anteriores e ambas as técnicas, podem ser complementares no controle de qualidade de sólidos em indústrias farmacêuticas, devido as características físico-químicas relacionadas a estrutura cristalina, que afetam a biodisponibilidade, processabilidade e estabilidade de um fármaco (PRADO; ROCHA, 2015).

5.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VITRO* E *EX VIVO*

A solidagenona e o DMSO nas concentrações testadas não apresentaram toxicidade aos eritrócitos significativa, entretanto foi observada na dose de 0,1 mg mL⁻¹ de solidagenona a viabilidade de 97% de eritrócitos, sendo esta dose excluída do ensaio *ex vivo*. (Figura 39).

Figura 39: Ensaio *in vitro* de hemólise por solidagenona em eritrócitos de ovinos



Leg: ^{ab} letras diferentes indicam diferença estatística com significância de 5%

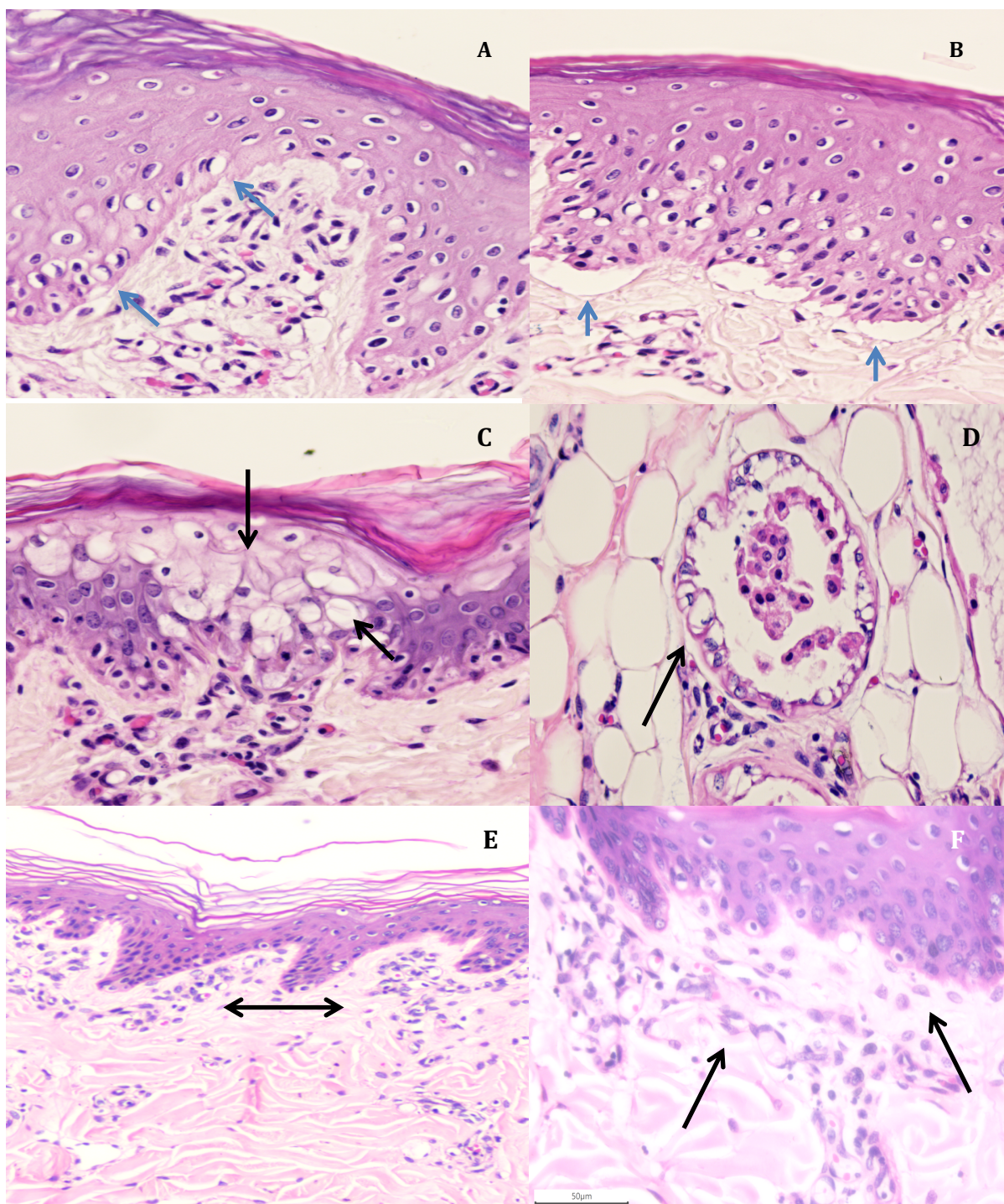
Os escores morfológicos foram reduzindo gradativamente em relação ao tempo de incubação em todos os tratamentos, variando de 94 a 50% em oito dias de incubação comparado ao explante zero horas (Tabela 15). Com relação à capacidade oxidante, para o marcador NBT foi observado diferença estatística somente no segundo e quarto dias de incubação. Para a atividade antioxidante, os resultados com ABTS não apresentaram diferenças significativas em nenhum dos períodos de incubação, enquanto que para o FRAP diferiu estatisticamente entre os tratamentos no quarto e sexto dia de incubação.

Tabela 15: Valores percentuais de integridade tecidual do escore morfológico de explantes de pele de orelha de suíno para todos os tratamentos durante oito dias de incubação.

Incubação	Tratamento	% de escore morfológico
Zero horas	Zero horas	100
2 dias	Controle	87
	DMSO 0,5%	80
	Extrato Bruto 0,1 mg mL ⁻¹	90
	Solidagenona 0,06 mg mL ⁻¹	94
	Solidagenona 0,03 mg mL ⁻¹	90
	Solidagenona 0,01 mg mL ⁻¹	83
4 dias	Controle	73
	DMSO 0,5%	64
	Extrato Bruto 0,1 mg mL ⁻¹	77
	Solidagenona 0,06 mg mL ⁻¹	81
	Solidagenona 0,03 mg mL ⁻¹	76
	Solidagenona 0,01 mg mL ⁻¹	68
6 dias	Controle	65
	DMSO 0,5%	55
	Extrato Bruto 0,1 mg mL ⁻¹	67
	Solidagenona 0,06 mg mL ⁻¹	72
	Solidagenona 0,03 mg mL ⁻¹	68
	Solidagenona 0,01 mg mL ⁻¹	59
8 dias	Controle	56
	DMSO 0,5%	50
	Extrato Bruto 0,1 mg mL ⁻¹	59
	Solidagenona 0,06 mg mL ⁻¹	64
	Solidagenona 0,03 mg mL ⁻¹	53
	Solidagenona 0,01 mg mL ⁻¹	58

As principais alterações que levaram a essa diferenciação no escore morfológico entre os explantes ao longo de oito dias de incubação em ordem decrescente das alterações observadas foram: degeneração vacuolar da epiderme e de glândulas anexas > apoptose das células basais > fenda sub-epitelial > edema periglandular > edema de derme e infiltrado inflamatório (Figura 40).

Figura 40: Fotomicrografia de explante de pele de suíno (Hematoxilina e Eosina) evidenciando as principais alterações morfológicas avaliadas em todos os tratamentos ao longo de 8 dias de incubação.



Leg: (A) células basais epidérmicas em apoptose com núcleos picnóticos (setas); (B) Fenda em junções derme-epidérmica (setas); (C) células epidérmicas em degeneração vacuolar (setas); (D) glândulas apócrinas com células vacuolizadas (setas); (E) infiltrado inflamatório predomínio de histiócitos na região subepidérmica (setas); (F) Predomínio de histiócitos ampliação em 400x (setas).

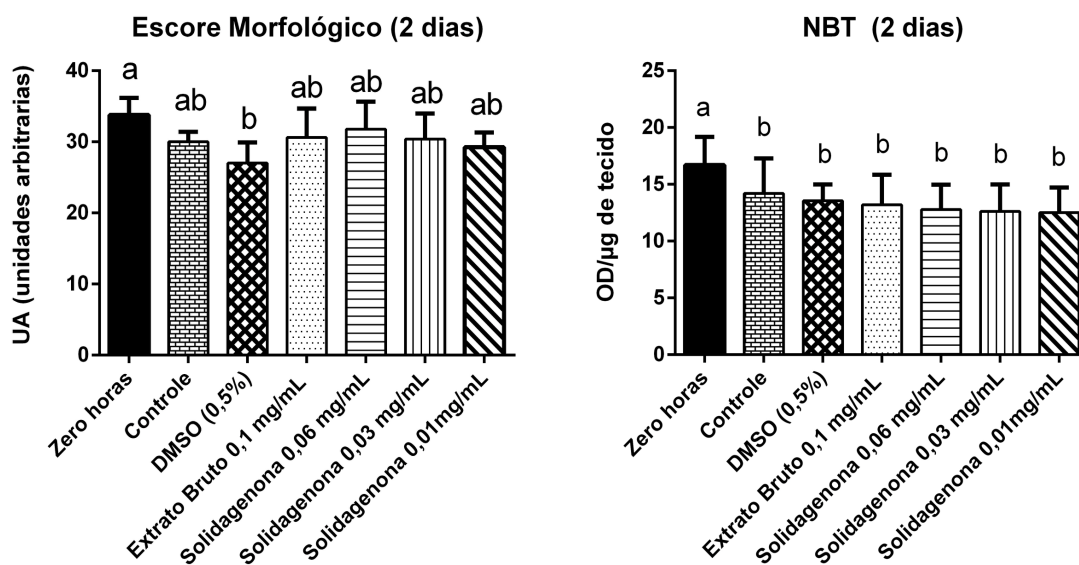
Os explantes zero horas foram considerados com 100% de integridade tecidual, por serem a referência do que deveria ser considerado alteração ou não. Essa característica apresenta-se como uma vantagem ao compararmos ao modelo *in vivo*, devido à todo tecido avaliado prover de um único doador obtendo resultados mais fidedignos (RANDALL; TURTON; FOSTER, 2011). Contudo, foi observada discreta presença de células inflamatórias, raras apoptoses na lâmina basal da epiderme, ausência de degeneração vacuolar na epiderme e periglandulares, ausência de fenda subepitelial da junção derme-epiderme e ausência de edema na derme e periglandular. Quando algum explante de qualquer tratamento, apresentou similaridade ao zero horas foi considerado o mesmo grau de severidade.

Em todos os tratamentos, foram observados processos de degeneração vacuolar da epiderme e de glândulas apócrinas nos explantes. A degeneração é uma alteração celular que pode ocorrer tanto em processos reversíveis quanto irreversíveis em resposta à quebra da homeostase causada por uma agressão (MONTENEGRO; FRANCO, 2004; MCGAVIN; ZACHARY, 2007). A degeneração hidrópica é acúmulo intracelular de água (MONTENEGRO; FRANCO, 2004), que pode ocorrer por substâncias exógenas que lesam o tecido (MOORE; DANNENBERG, 1992), mas, a principal causa é a hipóxia, que diminui o aporte energético para as funções metabólicas alterando o controle osmótico da membrana plasmática (MCGAVIN; ZACHARY, 2007).

Outros tipos de acúmulos intracelulares são classificados de acordo com a substância como lipídica, proteica, mucóide (mucopolissacarídeo) e glicogênica (carboidrato), podendo reduzir o metabolismo celular (MCGAVIN; ZACHARY, 2007). Dessa forma, sugere-se que a degeneração vacuolar seja do tipo hidrópica, que pode ter ocorrido por insuficiente difusão de oxigênio no meio de cultura para suprir as necessidades do tecido, mesmo sendo controlado o nível de oxigênio durante a incubação, pois também foi observado nos grupos controle.

O escore morfológico dos explantes incubados com DMSO no segundo dia de incubação tiveram uma perda de 20% na integridade tecidual, sendo diferente estatisticamente com os fragmentos zero horas, mas não diferindo dos outros tratamentos (Figura 41). Por outro lado, todos os tratamentos tiveram menor resposta oxidante (NBT) do que aos explantes zero horas diferindo estatisticamente.

Figura 41: Comparação entre os explantes de pele de orelha de suíno entre os tratamentos em dois dias e zero hora para o escore morfológico e a resposta oxidativa NBT.

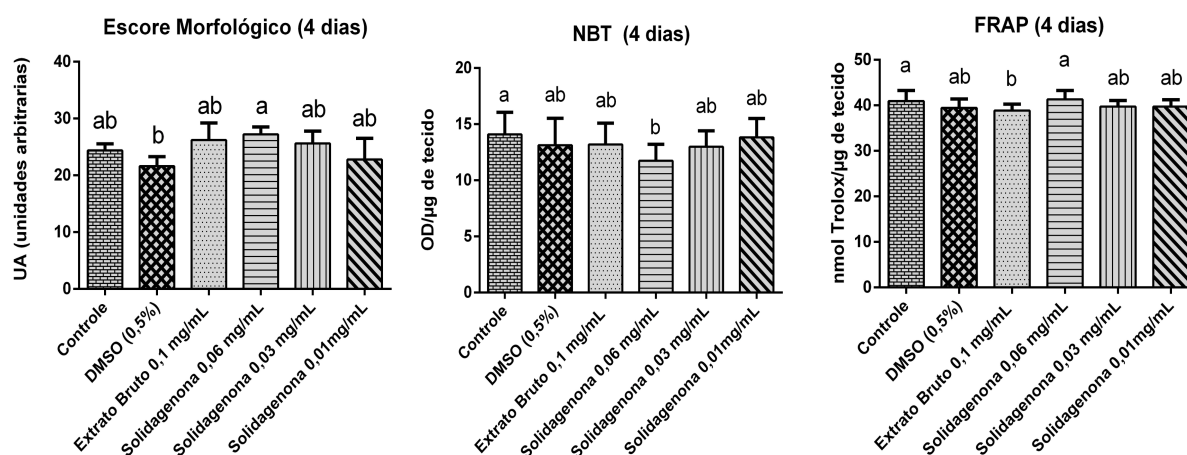


Leg: ^{ab} letras diferentes indicam diferença estatística com significância de 5%

A produção do ânion superóxido foi maior no explante zero horas, o que pode ser sugerido devido lesão tecidual no momento da coleta dos fragmentos de explantes e essas moléculas são instáveis e decompõem-se espontaneamente por ação da enzima superóxido desmutase em oxigênio e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (KUMAR et al., 2010). O que corrobora com estudos anteriores à indução de processos inflamatórios que resultam na diminuição da capacidade oxidativa, como nos estudos em camundongos induzindo o processo inflamatório (BERNARDY et al., 2017) e a indução por raios UV-B (MARTINEZ et al., 2016). Entretanto, foi evidenciado por Microscopia Confocal Raman, a absorvidade de formulações fotoprotetoras e avaliação da formação de radicais livres em modelo de explante expostos a luz UV-A e UV-B (SOUZA et al., 2017), este aumento se deve ao desequilíbrio homeostático do tecido, sendo a diminuição na produção de enzimas antioxidantes e/ou o aumento na produção de EROs.

No quarto dia de incubação, a maior perda da integridade tecidual foi observada nos explantes tratados com DMSO (64%), que diferiram estatisticamente dos explantes tratados com solidagenona na maior dose (81%). Além de aumentar a capacidade oxidante NBT em relação ao controle, em ambos tratamentos indicaram aumento da atividade antioxidante FRAP em relação ao extrato bruto (Figura 42).

Figura 42: Escore morfológico, NBT e FRAP de explantes de pele de orelha de suíno comparando os tratamentos em quatro dias de incubação.



Leg: ^{ab} letras diferentes indicam diferença estatística de 5%

O DMSO é um solvente polar universal utilizado como veículo em diversos experimentos e, mesmo em baixas doses (1, 2, 4 e 8% v/v), pode influenciar no metabolismo mitocondrial, fator observado após 24 h de incubação de astrócitos, elevando a produção do citocromo C, uma das proteínas responsáveis por induzir a apoptose (MCGAVIN; ZACHARY, 2007; KUMAR et al., 2010; GALVAO et al., 2013; YUAN et al., 2014). Mesmo não tendo sido avaliado este marcador mitocondrial, todos os explantes incubados com DMSO 0,5 % apresentaram maior número de apoptose por campo, sendo observado a diferença estatística após 48 h de incubação. Dessa forma, a presença da degeneração hidrópica e de apoptose pode ter ocorrido por uma possível difusão de oxigênio ineficiente associada a alteração no metabolismo mitocondrial gerada pelo contato com o DMSO.

Contudo, nos tratamentos com solidagenona a qual foi diluída com DMSO, verificou-se menor frequência de células apoptóticas, resultado evidenciado principalmente após 72 h de incubação utilizando a maior dose (0,06 mg mL⁻¹). Ademais, em testes *in vitro* a solidagenona demonstrou ser inativa a eliminação do ânion superóxido (RODRÍGUEZ et al., 2005), dessa forma, sugere-se que a solidagenona possa atuar na manutenção metabólica celular, o que corrobora as melhores respostas das atividades metabólicas celulares oxidantes (NBT) e antioxidante (FRAP) quando comparado aos outros tratamentos.

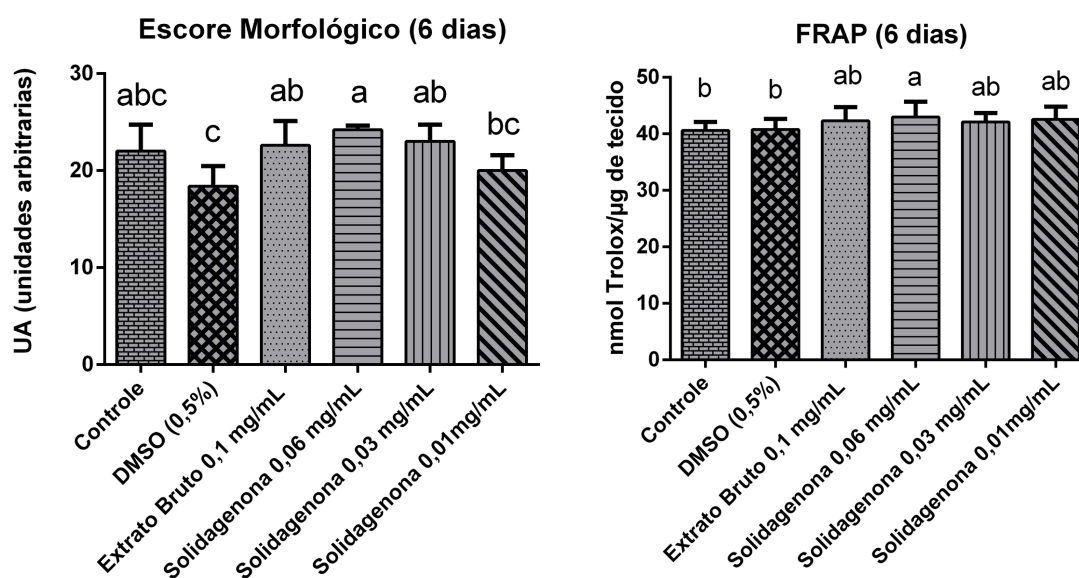
Apoptose é caracterizada pelo encolhimento da célula, a cromatina condensa e se agrega periféricamente com posterior fragmentação do núcleo gerando corpúsculos apoptóticos, a membrana plasmática permanece intacta e não há inflamação adjacente, sendo um processo fisiológico e/ou patológico de morte celular programada (KUMAR et al., 2010). Quanto maior o tempo de incubação de explantes de pele, maior o

número de células em apoptose, e consequentes alterações teciduais (DUONG et al., 2006), corroborando os resultados do presente estudo observados ao longo do tempo de incubação. No entanto, esta alteração celular ocorreu de forma mais sutil nos tratamentos com extrato bruto e na maior dose de solidagenona. O extrato bruto apresenta diversos tipos de compostos, dentre eles a solidagenona, podendo ocorrer um efeito sinérgico entre os mesmos, podendo ou não favorecer a manutenção metabólica tecidual.

Com seis dias de incubação o controle não apresentou diferença estatística com os outros tratamentos para o escore morfológico, e o tratamento com DMSO não diferiu com a menor dose de solidagenona, e ambos são significativamente diferentes do tratamento com a maior dose de solidagenona, o qual manteve a integridade tecidual mais preservada (72%). Os tratamentos com extrato bruto e solidagenona a $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$ também diferem estatisticamente do DMSO que em seis dias teve uma perda de 45% de integridade morfológica (Figura 43).

A solidagenona na maior dose ($0,06 \text{ mg mL}^{-1}$) aumentou a capacidade antioxidante, aos seis dias de incubação, apresentando diferença estatística com os explantes tratados com DMSO e o controle.

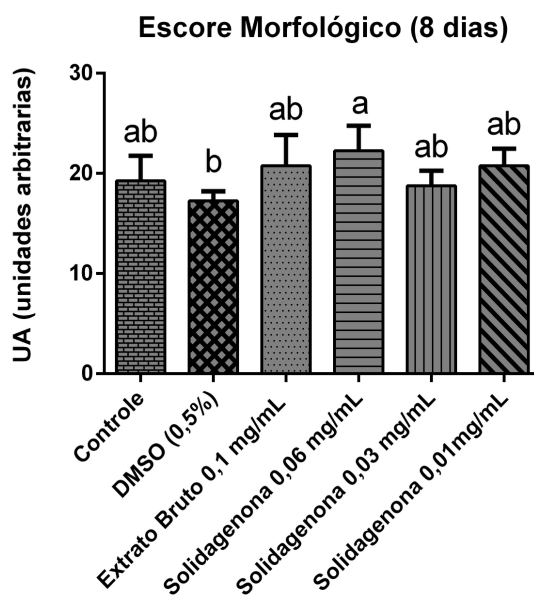
Figura 43: Escore morfológico e resposta antioxidante FRAP de explantes de pele de orelha de suíno comparando os tratamentos em seis dias de incubação.



Leg: ^{abc} letras diferentes indicam diferença estatística com significância de 5%

Após oito dias de incubação (Figura 44), a maior dose de solidagenona preservou 64% da morfologia dos explantes, diferindo estatisticamente do tratamento com DMSO, o qual manteve 50 % da integridade tecidual.

Figura 44: Escore morfológico de explantes de pele de orelha de suíno comparando os tratamentos em oito dias de incubação.



Leg: ^{ab} letras diferentes indicam diferença estatística com significância de 5%

O núcleo labdano de inibir o NF- κ B que desencadeia o processo inflamatório (TRAN; WONG; CHAI, 2017). A inflamação pode ser provocada por agentes físicos (MONTENEGRO; FRANCO, 2004), químicos e biológicos (KUMAR et al., 2010), o qual resulta na adaptação celular por estímulo por fatores externos ou por outras células pela comunicação celular por meio de mediadores químicos, levando a alterações genéticas, bioquímicas e estruturais celulares (KUMAR et al., 2010).

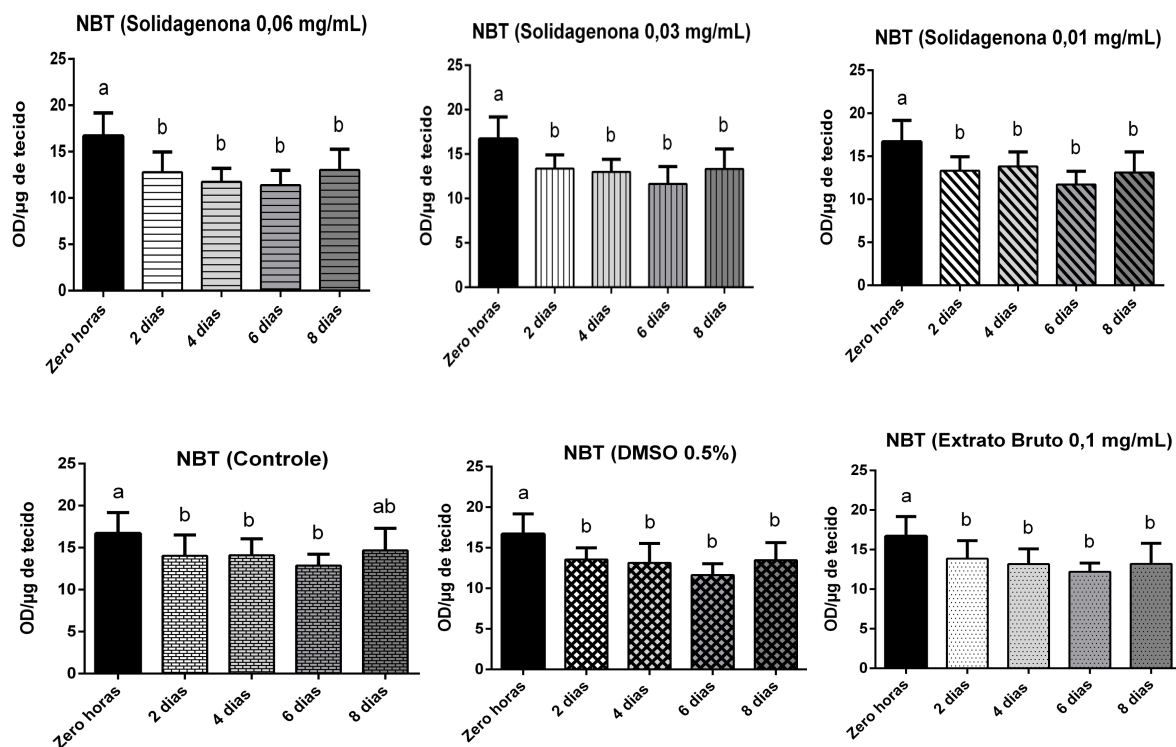
Em todos os explantes, as células inflamatórias que estavam em maior concentração eram os histiócitos (macrófagos), poucos linfócitos e raros eosinófilos. Entretanto, em estudo *in vivo* com camundongos, verificou-se que o extrato hidroalcolico das partes aéreas diminuiu a migração leucocitária de células polimorfonucleares (TAMURA et al., 2009). Embora, o extrato das partes aéreas possa conter a solidagenona (VALVERDE-SOARES; AZEVEDO-SILVA; TOMASSINI, 2009), os compostos identificados por Taruma e colaboradores (2009) foram o ácido cafeico e a rutina. Ademais, no modelo *ex vivo* é difícil avaliar o processo migratório de células especializadas, uma vez que todos os tipos celulares estarão distribuídos e limitados ao fragmento. Em contrapartida, através de marcadores químicos seria possível prever se haveria uma resposta inflamatória, aumentando as interleucinas (IL) 1 e IL-8, por exemplo, ou se predominaria uma resposta anti-inflamatória na produção elevada de IL-10 e IL-1Ra (antagonista do receptor de IL-1) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). Além de fatores de proliferação de células leucocitárias

polimorfonucleares, como o C-SGF (*granulocyte colony-stimulating factor*), sendo os macrófagos os principais produtores destes marcadores (VARELLA; FORTE, 2001; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). Desta forma, ao quantificar estes marcadores e/ou outros seria possível determinar se haveria o aumento ou não de células polimorfonucleares em modelos explantes, uma vez que os macrófagos estão presentes em todos os tipos de tecidos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

Ao longo do tempo de incubação foi observada diferença significativa na capacidade oxidativa NBT entre todos os tratamentos e o explantes zero horas, o qual apresentou menor capacidade oxidativa (Figura 45). A resposta antioxidante ABTS não diferiu estatisticamente em nenhum dos tratamentos, enquanto o FRAP a diferença estatística ocorreu no sexto dia em quase todos os tratamentos, exceto o controle que não teve diferença ao longo do tempo de incubação (Figura 46).

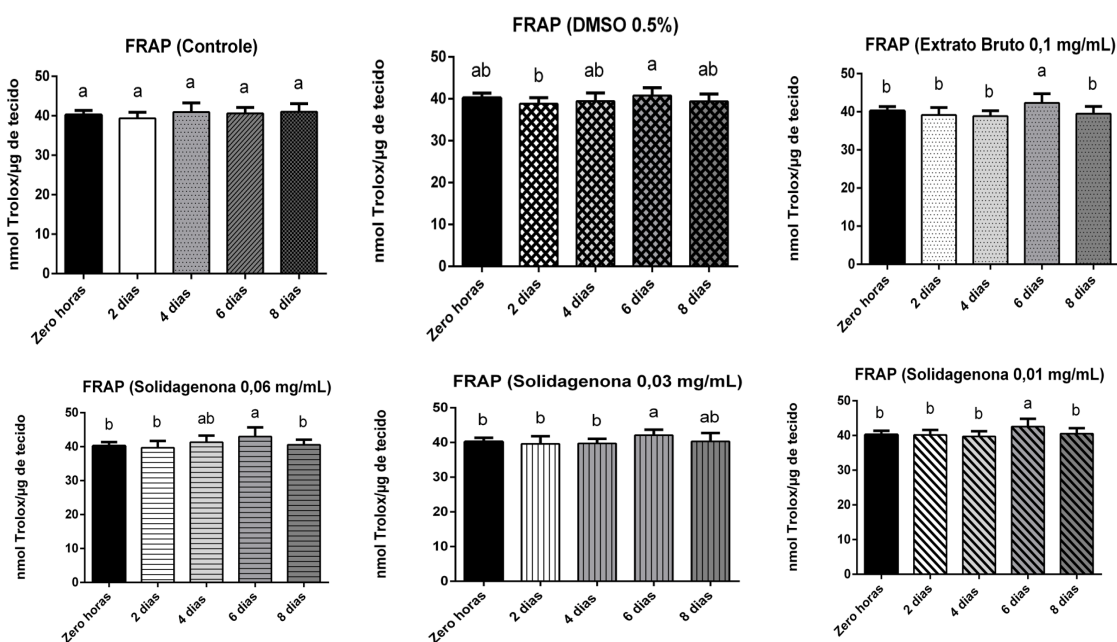
Os aumentos das atividades funcionais aos estresses fisiológicos excessivos são considerados uma resposta adaptativa da célula (KUMAR et al., 2010), evidenciado no sexto dia de incubação, exceto no controle, ao avaliar o efeito do tempo de incubação para cada tratamento demonstrou um aumento na capacidade antioxidante (FRAP) dos explantes. Se fosse avaliado somente a resposta antioxidante e o estresse fisiológico fosse cessado a célula poderia retornar ao seu estado normal (KUMAR et al., 2010). Por outro lado, ao avaliar a capacidade oxidante verifica-se um desequilíbrio entre as respostas no controle de ERO's.

Figura 45: Resposta oxidativa NBT de explantes de pele de orelha de suíno ao longo do tempo de incubação de todos os tratamentos comparados aos explantes zero horas.



Leg: ^{ab} letras diferentes demonstram significância de 5%

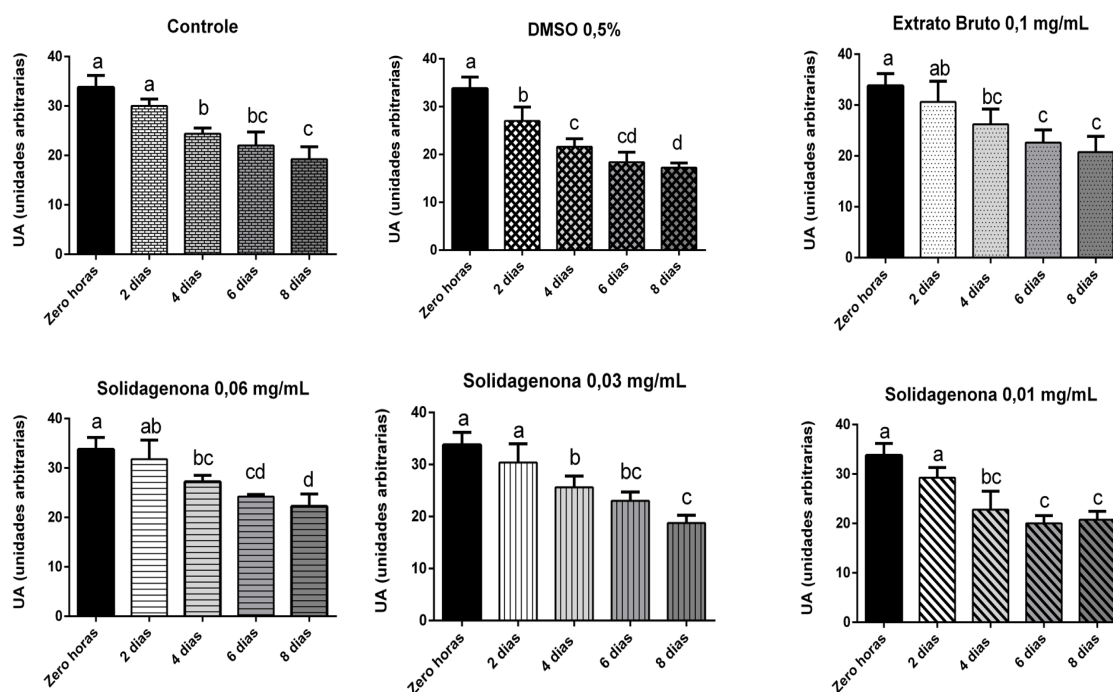
Figura 46: Resposta antioxidante FRAP de explantes de pele de orelha de suíno ao longo do tempo de incubação de todos os tratamentos comparados aos explantes zero horas.



Leg: ^{ab} letras diferentes demonstram significância de 5%

Ao avaliar os resultados de cada tratamento ao longo do tempo comparado aos explantes zero horas, foi observado que a perda da morfologia ocorreu de forma gradativa em todos os tratamentos. Entretanto, a diferença percentual entre as análises dos fragmentos de pele tratados com solidagenona na maior dose e o extrato bruto não diferiram estatisticamente. Nos tratamentos controle e nas outras doses de solidagenona a diferença estatística foi evidente entre o segundo e quarto dia de incubação. Nos explantes tratados com DMSO, o segundo dia de incubação difere significativamente do explante zero horas e do quarto dia de incubação, não havendo mais diferença estatística entre os outros dias (Figura 47).

Figura 47: Escore morfológico de explantes de pele de orelha de suíno ao longo do tempo de incubação de todos os tratamentos.



Leg: ^{abcd} letras diferentes indicam diferença estatística com significância de 5%

O tempo prolongado de incubação altera a integridade dos explantes, porém, verificou-se que o ponto mais crítico para a adaptação do tecido foi entre o segundo e quarto dia na maioria dos tratamentos. Todavia, as análises das EROs evidenciaram uma homogeneidade para todos os resultados quando avaliado o efeito tempo para cada um dos tratamentos, ou seja, há necessidade de avaliar principalmente este período o qual o controle

não manteve a perda mais evidente da integridade tecidual. O extrato bruto e a solidagenona na maior dose ($0,06 \text{ mg mL}^{-1}$), ambos diluídos em DMSO, mantiveram a alteração tecidual de forma discreta em relação ao tempo. E em relação as EROs, observou-se discreta melhora no quarto dia de incubação no tratamento solidagenona na maior dose quando em comparação ao extrato bruto.

A manutenção tecidual pela solidagenona foi observada após efeito gastroprotetor, sem alteração da produção de muco ou de secreção ácida em experimentos com indução de úlceras estomacais por etanol em camundongos (SCHMEDA-HIRSCHMANN; RODRIGUEZ; ASTUDILLO, 2002). Dessa forma, sugere-se que a solidagenona atue como fator protetor em diferentes tipos de epitélio. Contudo, necessita-se de mais estudos com marcadores celulares para elucidar o(s) mecanismo(s) de ação que promoveram a manutenção tecidual epitelial durante dos oito dias de incubação.

6 CONCLUSÃO

Solidago chilensis apresenta em suas raízes as classes de metabólitos secundários flavonoides, saponinas, taninos hidrolisáveis e terpenos.

Os métodos cromatográficos e espectroscópicos empregados para isolar e elucidar a estrutura de solidagenona de raízes de *S. chilensis*, foram eficientes, apresentando um rendimento de 1,3 g e pureza 98,17%, além de otimizar o tempo em CLAE. Há necessidade de desenvolver novas metodologias cromatográficas para determinar a concentração de solidagenona em extratos brutos diclorometânicos.

Foram realizados ensaios para complementar dados cristalográficos hexagonais da solidagenona por Difração de Raio-X e ainda análises que não haviam sido descritas como Espectroscopia de Dispersão Energética, Microscopia Eletrônica de Varredura, Calorimetria Diferencial Exploratória e Análise Termogravimétrica favorecendo o conhecimento científico sobre a solidagenona.

A solidagenona manteve a viabilidade de eritrócitos acima de 97% em todas as doses testadas e o DMSO também não apresentou toxicidade na concentração avaliada.

A solidagenona na maior dose testada (0,06 mg mL⁻¹) manteve a melhor integridade tecidual, confirmada pela avaliação histológica ao longo de oito dias de incubação e o controle das ERO's em quatro e seis dias.

7 PERSPECTIVAS

O modelo de explante de pele de suíno é promissor na avaliação de substâncias com possíveis finalidades terapêuticas, seja de origem vegetal, semi-sintética ou sintética.

Faz-se necessário identificar outros marcadores celulares envolvidos nos mecanismos que preservaram a integridade da pele de suíno ao longo de todo período de incubação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7ed. Rio de Janeiro. Saunders Elsevier 2012.
- D'ALFONSO, A. J.; FREITAG, B.; KLENOV, D.; ALLEN, L. J. Atomic-resolution chemical mapping using energy-dispersive x-ray spectroscopy **Physical Review B**, v. 81, n. 10, p. 100101, 2010.
- ANTHONSEN, T.; MCCABE, P. H.; MCCRINDLE, R.; MURRAY, R. D. Constituents of solidago species: The constitution and stereochemistry of diterpenoids from *Solidago canadensis* L-. **Tetrahedron**, v. 25, p. 2233-2239, 1969.
- ANVISA, A. N. de V. S. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. 2010. v. 2 p. 853.
- AOYAGI, T.; KAMIGAKI, K.; KATO, N.; FUKAYA, T.; IIZUKA, H.; MIURA, Y. Retinoid stimulates epidermal outgrowth of pig skin explants. **Journal of Dermatology**, v. 8, p. 197-205, 1981a.
- AOYAGI, T.; KAMIGAKI, K.; SARUTA, M.; IIZUKA, H.; MIURA, Y. Retinoid inhibits keratin formation of pig skin explants. **Journal of Dermatology**, v. 8, n. 3, p. 207-213, 1981b.
- AOYAGI, T.; UMEDA, K.; KATO, N.; FUKAYA, T.; MIURA, Y. Various cellular activities of the outgrowing epidermis in pig skin explant culture - The effects of metabolic inhibitors. **Journal of Dermatology**, v. 10, n. 2, p. 129-132, 1983.
- AOYAGI, T.; KATO, N.; SUYA, H.; MIURA, Y.; YOSHIDA, T.; OHURA, T. Effects of mouse and human epidermal growth factor on the outgrowing epidermis of pig and human skin explants. **Journal of Dermatology**, v. 11, n. 6, p. 519-522, 1984.
- ARAGÃO, P. H.; BUCHARLES, L. G.; SPADOTTO, J. C.; RODRIGUES, A. R.; MOTTA, V. B.; BIAZIN, B. M.; OLIVEIRA JUNIOR, A. G.; JESUS ANDRADE, C. G. The Importance of Scanning Electron Microscopy (SEM) and X-Ray Microanalysis (EDS) in Determination of Gunshot Residues (GSR) in Human Hands. **Microscopy and Microanalysis**, v. 19, n. S2, p. 1100-1101, 2013.
- ARAKAWA, N. S.; SCHORR, K.; AMBRÓSIO, S. R.; MERFORT, I.; COSTA, F. B. Further Sesquiterpene Lactones from *Viguiera robusta* and the Potential Anti-Inflammatory Activity of a Heliangolide : Inhibition of Human Neutrophil Elastase Release. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v. 63, p. 533-538, 2008.
- ARAMBARRI, A. M.; HERNÁNDEZ, M. P. Variación estacional de saponinas en *Solidago chilensis* var. *chilensis* (Asteraceae). **Boletín de la Sociedad Argentina Botánica**, v. 49, p. 483-490, 2014.
- ASLANI, B.A.; GHOBADI, S. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. **Life Sciences**, v. 146, p. 163-173, 2016.
- ASSINI, F. L.; FABRÍCIO, E. J.; LANG, K. L. Efeitos farmacológicos do extrato aquoso de *Solidago chilensis* Meyen em camundongos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p. 130-134, 2013.

AU, D. T.; WU, J.; JIANG, Z.; CHEN, H.; LU, G.; ZHAO, Z. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Hakka in Guangdong, China. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, n. 1, p. 41-50, 2008.

BAGGIO, A. L.; BUSKIEVICZ, A.; FORNARI, A.; FRANKE, T. A.; LUCCA, P. Pesquisa fitoquímica dos princípios ativos presentes na droga vegetal *Solidago microglossa*, D.C. (Arnica Brasileira). **Revista Thêma et Scientia**, v. 2. n. 1 p. 149–153. 2012.

BIAVATTI, M.W.; LEITE, S.N. **Práticas de Farmacognosia**. Ed. UNIVALI. Itajaí. 2007. p. 145.

BASSO, K. M.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Explantes teciduais: um modelo redescoberto na experimentação animal. **SEMINA: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, p. 3951-3958, 2013.

BARNETT, M. L. Effect of pemphigus antibodies on desmosomal structure in vitro. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 70, n. 3, p. 141-142, 1978.

BAYOUMI, A. M.; MARKS, R. Transepidermal elimination : studies with an animal model. **British Journal of Dermatology**, v. 61, p. 560-566, 1980.

BENEVIDES, P. J. C.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. Biological Activities of Constituents from *Psychotria spectabilis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, n. 8, p. 565-569, 2005.

BERNARDY, C. C. F.; ZARPELON, A. C.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; CALIXTO-CAMPOS, C.; CARVALHO, T. T.; FATTORI, V.; BORGHI, S. M.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A. Tempol, a Superoxide Dismutase Mimetic Agent, Inhibits Superoxide Anion-Induced Inflammatory Pain in Mice. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

BERLINCK, R. G. S.; DE BORGES, W. S.; SCOTTI, M. T.; VIEIRA, P. C. A Química de Produtos Naturais do Brasil do Século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706-710, 2017.

BIAVATTI, M. W.; LEITE, S. N. **Práticas de Farmacognosia**. Ed. UNIVALI. Itajaí. 2007. p. 145.

BIESKI, I. G. C.; SANTOS, F. R.; OLIVEIRA, R. M. De; ESPINOSA, M. M.; MACEDO, M.; ALBUQUERQUE, U. P.; MARTINS, D. T. D. O. Ethnopharmacology of Medicinal Plants of the Pantanal Region (Mato Grosso, Brazil). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

BIESKI, I. G. C.; LEONTI, M.; ARNASON, J. T.; FERRIER, J.; RAPINSKI, M.; VIOLANTE, I. M. P.; BALOGUN, S. O.; PEREIRA, J. F. C. A.; FIGUEIREDO, R. de C. F.; LOPES, C. R. A. S.; DA SILVA, D. R.; PACINI, A.; ALBUQUERQUE, U. P.; MARTINS, D. T. de O. Ethnobotanical study of medicinal plants by population of Valley of Juruena Region, Legal Amazon, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 383-423, 15 sep. 2015.

BOHLMANN, F.; FRITZ, U.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Sesquiterpene and diterpene derivatives from *Solidago* species. **Phytochemistry**, v. 19, n. 12, p. 2655-2661, 1980.

BOLSON, M.; HEFLER, S. M.; CHAVES, E. I. D.; GASPAROTTO JUNIOR, A.; CARDOZO JUNIOR, E. L. Corrigendum to “ Ethno-medicinal study of plants used for treatment of Human ailments , with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná , Brazil ” [J. Ethnopharmacol. 161 (2015) 1 – 10]. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 468, 2015.

BORTOLETI, B. T. S.; GONÇALVES, M. D.; TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; MIRANDA-SAPLA, M. M.; ASSOLINI, J. P.; CARLOTO, A. C. M.; CARVALHO, P. G. C.; CARDOSO, I. L. A.; SIMÃO, A. N. C.; ARAKAWA, N. S.; COSTA, I. N.; CONCHON-COSTA, I.; PAVANELLI, W. R. Grandiflorenic acid promotes death of promastigotes via apoptosis-like mechanism and affects amastigotes by increasing total iron bound capacity. **Phytomedicine**, v. 46, p. 11-20, 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE - Elabora Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, 2009.

BRASIL. Portaria nº 971 de 3 de Maio de 2006. Aprova a política nacional de práticas integrativas e complementares no sistema único de saúde. **Diário Oficial da União**. Brasília, 2006.

BRASILEIRO, B. G.; PIZIOLO, V. R.; RASLAN, D. S.; JAMAL, M.; SILVEIRA, D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 195-202, 15, 2006.

CAL, K.; KUPIEC, K.; SZNITOWSKA, M. Effect of physicochemical properties of cyclic terpenes on their ex vivo skin absorption and elimination kinetics. **Journal of Dermatological Science**, v. 41, n. 2, p. 137-142, 2006.

CATARINO, H. R. C.; DE GODOY, N. P.; SCHARLACK, N. K.; NEVES, L. M. G.; DE GASPI, F. O. de G.; ESQUISATTO, M. A. M.; DO AMARAL, M. E. C.; MENDONÇA, F. A. S.; DOS SANTOS, G. M. T. InGaP 670-nm laser therapy combined with a hydroalcoholic extract of *Solidago chilensis* Meyen in burn injuries. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 3, p. 1069-1079, abr. 2015.

CELI, P.; GABAI, G. Oxidant/Antioxidant Balance in Animal Nutrition and Health: The Role of Protein Oxidation. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 2, n. 4, p. 1004-1053, 2015.

CHAKRABORTY, K.; LIPTON, A. P.; RAJ, R. P.; VIJAYAN, K. K. Antibacterial labdane diterpenoids of *Ulva fasciata* Delile from southwestern coast of the Indian Peninsula. **Food Chemistry**, v. 119, n. 4, p. 1399-1408, 2010.

CHAVEERACH, A.; SUDMOON, R.; TANEE, T. Interdisciplinary researches for potential developments of drugs and natural products. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 4, p. 378-384, 2017.

CHICOUREL, E. L.; PIMENTA, D. S.; JORGE, L. I. F.; FERRO, V. D. O. Contribuição ao conhecimento analítico de três compostas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 7, n. 1, p. 59–66, 1998.

CHINOU, I. Labdanes of natural origin-biological activities (1981-2004). **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 11, p. 1295-1317, 2005.

CHOUDHARY, S. P.; TRAN, L. S. Phytosterols: Perspectives in Human Nutrition and Clinical Therapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 29, p. 4557-4567, 2011.

COSTA, A. F. **Farmacognosia: Farmacognosia Experimental**: v. 3. 3. ed. Editora Fundação Calouste Gulbenkian. 2000, p. 992.

CONCEA. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, Resolução Normativa Nº 12, de 20 de setembro de 2013. En: Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos - DBCA do CONCEA, **Anais...**2013.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoids: Potential therapeutic agents for the inflammatory process. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**,. 1. ed. [s.l.] American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250-1318.

CRUZ, M. F. G.; SOUZA, V. F. de; MORAES, D. C. M. de; RODRIGUES, G. M. C.; DE PAULA, F. DE M. S. F. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro de *Solidago chilensis* e *Porophyllum ruderale* (Arnica brasileira e Arnica paulista). **FOCO: Caderno de Estudos e Pesquisas**, v. 4, n. 4, p. 55-70, 2013.

CRYSTALLOGRAPHY.NET: Disponível em:
<<http://www.crystallography.net/cod/1100441.html>>. Acesso em: 08/12/2018 - hexagonal

CRYSTALLOGRAPHY.NET: Disponível em:
<<http://www.crystallography.net/cod/2006300.html>>. Acesso em: 08/12/2018 – monocíclica

CRYSTALLOGRAPHY.NET: Disponível em:
<<http://www.crystallography.net/cod/1506019.html>>. Acesso em: 08/12/2018 - ortorrômbica

CUNHA, W. R.; JANUÁRIO, A. H.; PAULETTI, P. M. Triterpenos e Esteroides. En: FURTADO, N. A. J. C.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R. (Ed.). **Coleção Farmácia - Farmacognosia**. 1. ed. Rio de Janeiro - RJ: Atheneu, 2017. p. 315-335.

DA SILVA, D.D. R.; LEITE, V. H. R. Cirrhotic liver explants: regenerative nodule, dysplasia and hepatocellular carcinoma occurrence. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 6, p. 437-442, 2005.

DA SILVA, A. G.; SOUSA, C. P. G. de; KOEHLER, J.; FONTANA, J.; CHRISTO, A. G.; GUEDES-BRUNI, R. R. Evaluation of an Extract of Brazilian Arnica (*Solidago chilensis* Meyen, Asteraceae) in Treating Lumbago. **Phytoterapy Research**, v. 24, p. 283-287, 2010.

DA SILVA, A. G.; MACHADO, E. R.; DE ALMEIDA, L. M.; NUNES, R. M. M.; GIESBRECHT, P. C. P.; COSTA, R. M.; COSTA, H. B.; ROMÃO, W.; KUSTER, R. M. A Clinical Trial with Brazilian Arnica (*Solidago chilensis* Meyen) Glycolic Extract in the Treatment of Tendonitis of Flexor and Extensor Tendons of Wrist and Hand. **Phytotherapy Research: PTR**, v. 29, n. 6, p. 864-9, jun. 2015.

DAME, M. K.; SPAHLINGER, D. M.; DASILVA, M.; PERONE, P.; DUNSTAN, R.; VARANI, J. Establishment and characteristics of Gottingen minipig skin in organ culture and monolayer cell culture : Relevance to drug safety testing. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal**, v. 44, n. 7, p. 245-252, 2008.

DE FREITAS, M. V.; NETTO, R. de C. M.; DA COSTA HUSS, J. C.; DE SOUZA, T. M. T.; COSTA, J. O.; FIRMINO, C. B.; PENHA-SILVA, N. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 1, p. 219-224, 2008.

DELUSTRO, F.; CONDELL, R. A.; NGUYEN, M. A.; MCPHERSON, J. M. A comparative study of the biologic and immunologic response to medical devices derived from dermal collagen. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 20, n. 1, p. 109-120, 1986.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products - a biosynthetic approach**. John Wiley ed. England: Copyright, 2002. v. 2

DHAMI, N.; MISHRA, A. D. Phytochemical variation: How to resolve the quality controversies of herbal medicinal products?. **Journal of Herbal Medicina**, v. 5, p. 118-127, 2015.

DIAS, A. G.; COSTA, M. A. da; GUIMARÃES, P. I. C. **Guia Prático de Química Orgânica**, Interciência: Rio de Janeiro, v. 1, p. 127, 2004.

DI STASI, L. C.; OLIVEIRA, G. P.; CAVALHAES, M. A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O. S.; KAKINAMI, S. H.; REIS, M. S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, p.69-91, 2002.

DUONG, H. S.; ZHANG, Q.; KOBİ, A.; LE, A.; MESSADI, D. V. Assessment of morphological and immunohistological alterations in long-term keloid skin explants. **Cells Tissues Organs**, v. 181, n. 2, p. 89-102, 2006.

EGERTON, R. F. TEM applications of eels. En: **Electron Energy-Loss Spectroscopy in the Electron Microscope**. Boston, MA: Springer US, 2011. 3p. 292-397.

EKHOLM, E.; EGELRUD, T. Expression of stratum corneum chymotryptic enzyme in relation to other markers of epidermal differentiation in a skin explant model. **Experimental Dermatology**, v. 9, n. 1, p. 65-70, 2000.

EMBRAPA: CARVALHO, L.M.; COSTA, J.A.M.; CARNELOSSI, M.A.G. **Qualidade em Plantas Mediciniais**. 2010. p.56.

FACURY NETO, M. A.; FAGUNDES, D. J.; BELETTI, M. E.; NOVO, N. F.; JULIANO, Y.; PENHA-SILVA, N. SYSTEMIC USE OF *Solidago microglossa* DC IN THE CICATRIZATION OF OPEN CUTANEOUS WOUNDS IN RATS. **Brazilian Journal Morphological Science**, v. 21, n. 4, p. 207-210, 2004.

FAIRBAIRN, L.; KAPETANOVIC, R.; SESTER, D. P.; HUME, D. A. The mononuclear phagocyte system of the pig as a model for understanding human innate immunity and disease. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, n. June, p. 855-871, 2011.

FALKENBERG, M. B. Quinonas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Florianópolis – Santa Catarina. UFRGS/UFSC, 6. ed. 2010. Cap. 25. p. 657-684.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Florianópolis – Santa Catarina. UFRGS/UFSC, 6. ed. 2010. Cap. 10. p. 229-246.

FARIAS, M. R.; Avaliação da Qualidade de Matérias-Primas Vegetais In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICJ, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. ed. 6, Porta Alegre e Florianópolis: Ed.UFRGS/UFSC, 2010. p. 262-288.

FARMACOPEIA-BRASILEIRA, 1ª edição. **Farmacopeia Brasileira** Rio de Janeiro, 1929.

FELL, H. B.; ROBISON, R. The development and phosphatase activity in vivo and in vitro of the mandibular skeletal tissue of the embryonic fowl. **Biochemical Journal**, v. 24, n. 6, p. 1905-1921, 1930.

FOČO, A.; GAŠPERLIN, M.; KRISTL, J. Investigation of liposomes as carriers of sodium ascorbyl phosphate for cutaneous photoprotection. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 291, n. 1-2, p. 21-29, 2005.

FOLASHADE, K. O.; OMOREGIE, E. H.; OCHOGU, A. P. Standardization of herbal medicines - a review. **International Journal of Biodiversity and Conservation**, v. 4, n. 3, p. 101-112, 2012.

FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E. M.; CARVALHO-JUNIOR, A. A.; COSTA, A.; COSTA, D. P.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P. M.; LOHMANN, L. G.; MAIA, L. C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M. P.; COELHO, M. A. N.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L. P.; SOUZA, V. C.; STEHMANN, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; WALTER, B. M. T.; ZAPPI, D. **Catálogo de plantas e fungos do brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.

GALVAO, J.; DAVIS, B.; TILLEY, M.; NORMANDO, E.; DUCHEN, M. R.; CORDEIRO, M. F. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. **FASEB Journal**, v. 28, n. 3, p. 1317-1330, 2013.

GOLENIOWSKI, M. E.; BONGIOVANNI, G. A.; PALACIO, L.; NUÑEZ, C. O.; CANTERO, J. J. Medicinal plants from the «Sierra de Comechingones», Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 3, p. 324-341, 2006.

GOMES, D. B.; ZANCHET, B.; LOCATELI, G.; BENVENUTTI, R. C.; VECHIA, C. A. D.; SCHÖNELL, A. P.; DIEL, K. A. P.; ZILLI, G. A. L.; MIORANDO, D.; ERNETTI, J.; OLIVEIRA, B.; ZANOTELLI, P.; SANTOS, M. F. C.; BARISSON, A.; BANZATO, T. P.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; FILHO, V. C.; GARCÍA, P. A. G.; FELICIANO, A. S.; ROMAN, W. A. Antiproliferative potential of solidagenone isolated of *Solidago chilensis*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 28, n. 6, p. 703-709, 2018.

- GOULART, S.; MORITZ, M. I. G.; LANG, K. L.; LIZ, R.; SCHENKEL, E. P.; FRÖDE, T. S. Anti-inflammatory evaluation of *Solidago chilensis* Meyen in a murine model of pleurisy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 346-53, 5 sep. 2007.
- GRANDI, T. S. M. **Tratado das plantas medicinais mineiras, nativas e cultivadas**. 1. ed. Minas Gerais: Adequatio Estudio, 2014.
- GRAS, A.; GARNATJE, T.; IBÁÑEZ, N.; LÓPEZ-PUJOL, J.; NUALART, N.; VALLÈS, J. Medicinal plant uses and names from the herbarium of Francesc Bolòs (1773–1844). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 204, n. November 2016, p. 142-168, 2017.
- HALPRIN, K. M.; LUEDER, M.; FUSENIG, N. E. Growth and differentiation of postembryonic mouse epidermal cells in explante cultures. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 72, n. 2, p. 88-98, 1979.
- HASANI-RANJBAR, S.; LARIJANI, B.; ABDOLLAHI, M. A Systematic Review of the Potential Herbal Sources of Future Drugs Effective in Oxidant-Related Diseases. **Drug Targets-Inflammation & Allergy**, v. 8, n. 1, p. 2-10, 2009.
- HEBDA, P. A.; ALSTADT, S. P.; HILEMAN, W. T.; EAGLSTEIN, W. H. Support and stimulation of epidermal cell outgrowth from porcine skin explants by platelet factors. **British Journal of Dermatology**, v. 115, n. 5, p. 529-541, 1986.
- HEINRICH, M.; BARNES, J.; GIBBONS, S.; WILLIAMSON, E. M. **Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy**. 2. ed. Ed. Churchill Livingstone Elsevier, 2012. Cap. 6. p. 61-105.
- HENRIQUES, A.T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcalóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Florianópolis – Santa Catarina. UFRGS/UFSC, 6. ed. 2010. Cap. 29. p. 765-792.
- HERKENNE, C.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; HADGRAFT, J.; GUY, R. H. Pig ear skin ex vivo as a model for in vivo dermatopharmacokinetic studies in man. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 8, p. 1850-1856, 2006.
- HOLBROOK, K. A.; HENNINGS, H. Phenotypic expression of epidermal cells in vitro: A review. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 81, n. 1, p. 11-24, 1983.
- HOLMSTEDT, B. O.; BRUHN, J. A. N. G. Ethnopharmacology - A Challenge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 3, n. 5, p. 251-256, 1983.
- HONZAK, L.; ŠENTJURC, M. Development of liposome encapsulated clindamycin for treatment of acne vulgaris. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 440, n. 1, p. 44-45, 2000.
- JEFFREYS, M. F.; NUNEZ, C. V. Triterpenos das folhas de *Piranhea trifoliata* (Picrodendraceae). **ACTA AMAZONICA**, v. 46. n. 2. p. 189–194, 2016.
- JIANG, Y.; DAVID, B.; TU, P.; BARBIN, Y. Recent analytical approaches in quality control of traditional Chinese medicines—A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 657, n. p. 9-18, 2010.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Sistemática Vegetal um enfoque filogenético**, 3 ed. Porto Alegre - RS; Artmed, 2009.

KIM, G. H.; BANG, S. J.; HWANG, J. H. Learning models for endoscopic ultrasonography in gastrointestinal endoscopy. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 17, p. 5176, 2015.

KIM, H.; SONG, M. J.; POTTER, D. Medicinal efficacy of plants utilized as temple food in traditional Korean Buddhism. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 1-2, p. 32-46, 2006.

KRAUJALIENÉ, V.; PUKALSKAS, A.; VENSKUTONIS, P. R. Biorefining of goldenrod (*Solidago virgaurea* L.) leaves by supercritical fluid and pressurized liquid extraction and evaluation of antioxidant properties and main phytochemicals in the fractions and plant material. **Journal of Functional foods**, v. 37, p. 200-208, 2017.

KUMAR, V.; ABBAS, A. k.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. **Robbins & cotran patologia bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro - RJ: Elsevier, 2010.

KUSTER, R.M.; ROCHA, L.M.; Cumarinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Florianópolis – Santa Catarina. UFRGS/UFSC, 6. ed. 2010. Cap. 21. p. 537-576.

LEITÃO, F.; LEITÃO, S. G.; DE ALMEIDA, M. Z.; CANTOS, J.; COELHO, T.; DA SILVA, P. E. A. Medicinal plants from open-air markets in the State of Rio de Janeiro, Brazil as a potential source of new antimycobacterial agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 2, p. 513-521, 2013.

LI, S.; HAN, Q.; QIAO, C.; SONG, J.; CHENG, C. L.; XU, H. Chemical markers for the quality control of herbal medicines: An overview. **Chinese Medicine**, v. 3, p. 1-16, 2008.

LI, W. X.; CUI, C. B.; CAI, B.; UAO, X. S. Labdane-type diterpenes as new cell cycle inhibitors and apoptosis inducers from *Vitex trifolia* L. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 7, n. 2, p. 95-105, 2005.

LIZ, R.; VIGIL, S. V. G.; GOULART, S.; MORITZ, M. I. G.; SCHENKEL, E. P.; FRÖDE, T. S. The anti-inflammatory modulatory role of *Solidago chilensis* Meyen in the murine model of the air pouch. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, n. 4, p. 515-21, abr. 2008.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. 3 ed. São Paulo: Plantarum, 608 p., 2000.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, p. 554, 2008.

LORENZI, H. MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas: *Solidago chilensis* Meyen**. Instituto Plantarum de Estudos de Flora, 450 p., 2002.

MARIEZCURRENA, R.; FORNARO, L. Structure of solidagenone. **Acta Crystallographica Section C**, v. 48, n. 7, p. 1337-1339, 1992.

MARINS, M.; XAVIER, A. L. R.; VIANA, N. B.; FORTES, F. S. A.; FRÓES, M. M.; MENEZES, J. R. L. Gap junctions are involved in cell migration in the early postnatal subventricular zone. **Developmental Neurobiology**, v. 69, n. 11, p. 715-730, 2009.

MARTINEZ, R. M.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; STEFFEN, V. S.; SILVA, T. C. C.; CAVIGLIONE, C. V.; BOTTURA, C.; FONSECA, M. J. V.; VICENTINI, F. T. M. C.; VIGNOLI, J. A.; BARACAT, M. M.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A.; CASAGRANDE, R. Topical formulation containing naringenin: Efficacy against ultraviolet B irradiation-induced skin inflammation and oxidative stress in mice. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1-21, 2016.

MARTINS-RAMOS, D.; BORTOLUZZI, R. L. C.; MANTOVANI, A. Plantas medicinais de um remascente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana, Urupema, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 380-397, 2010.

MARTINS, M. D.; MARQUES, M. M.; BUSSADORI, S. K.; MESQUITA-FERRARI, R. A.; PAVESI, V. C. S.; WADT, N. S.; FERNANDES, K. P. Citotoxicidade in vitro de extratos de arnica brasileira (*Solidago microglossa*) e arnica paulista (*Porophyllum ruderale*). **ConScientiae Saúde**, v. 8, n. 1, p. 99-104, 11 may 2009.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza, EUFC, 1988.

MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 4 ed. USA: Mosby Elsevier 2007.

MELO, N. I.; CROTTI, A. E. M. Óleos Voláteis: Constituintes Químicos e Atividade Biológicas. En: FURTADO, N. A. J. C.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R. (Ed.). **Coleção Farmácia - Farmacognosia**. 1. ed. Rio de Janeiro - RJ: Atheneu, 2017. p. 247-2269.

MENKOVIĆ, N.; ŠAVIKIN, K.; TASIĆ, S.; ZDUNIĆ, G.; STEŠEVIĆ, D.; MILOSAVLJEVIĆ, S.; VINCEK, D. Ethnobotanical study on traditional uses of wild medicinal plants in Prokletije Mountains (Montenegro). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 1, p. 97-107, 2011.

MIZOKAMI, S. S.; ARAKAWA, N. S.; AMBROSIO, S. R.; ZARPELON, A. C.; CASAGRANDE, R.; CUNHA, T. M.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; VERRI, W. A. Kaurenoic acid from *Sphagneticola trilobata* inhibits inflammatory pain: Effect on cytokine production and activation of the NO-cyclic GMP-protein kinase G-ATP-sensitive potassium channel signaling pathway. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 5, p. 896-904, 2012.

MOHAGHEGHZADEH, A.; FARIDI, P.; SHAMS-ARDAKANI, M.; GHASEMI, Y. Medicinal Smoke. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 2, p. 161-184, 2006.

MOISON, R. M. W.; DOERGA, R.; HENEGOUWEN, G. M. J. B. van. Increased antioxidant potential of combined topical vitamin E and C against lipid peroxidation of eicosapentaenoic acid in pig skin induced by simulated solar radiation. **International Journal of Radiation Biology**, v. 78, n. 2, p. 1185-1193, 2002.

MOISON, R. M. W.; HENEGOUWEN, G. M. J. B. van. Topical Antioxidant Vitamins C and E Prevent UVB-Radiation-Induced Peroxidation of Eicosapentaenoic Acid in Pig Skin. **Radiation Research**, v. 157, n. 4, p. 402-409, 2002.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia processos gerais**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

MOORE, K. G.; DANNENBERG, A. M. Antigen-specific IgG1-mediated epidermal cell injury: A component of contact hypersensitivity reactions in guinea pigs, measurable in vitro in full-thickness skin explants. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 98, n. 6, p. 929-935, 1992.

MOREL, A. F.; DIAS, G. O.; PORTO, C.; SIMIONATTO, E.; STUKER, C. Z.; DALCOL, I. I. Antimicrobial activity of extractives of *Solidago microglossa*. **Fitoterapia**, v. 77, p. 453-455, 2006.

NYIREDY, S. **Preparative thin-layer (planar) chromatography**. 2000.

OLIVEIRA, A. C. DE; VALENTIM, M.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Vegetals as natural sources of antioxidants. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

PAGLIUSO, R. G.; GOLONI-BERTOLLO, E. M.; FILHO, M. A.; PAVARINO-BERTELLI, E. C. Estresse oxidativo e Disfunção Crônica do Enxerto Renal. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 13, n. 2, p. 223-7, 2006.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. Bellingha, Washington: Cengage Learning, 2010.

PEDROSO, R.; SILVA, C.P.; FURLAN, C.M. Comparação dos principais constituintes químicos de duas espécies de arnica: Cravorana (*Porophyllum ruderale* Cass) e Varão-de-Ouro (*Solidago sp*). **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 7, n. 22, p. 42-49, 2009.

PEREIRA, R. C.; OLIVEIRA, M. T. R.; LEMOS, G. C. S. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes - RJ. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p. 37-40, 2005.

PETERS, R. J. Two rings in them all: The labdane-related diterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 11, p. 1521-1530, 2010.

PFÜTZNER, W.; JOARI, M. R.; FOSTER, R. A.; VOGEL, J. C. A large preclinical animal model to assess ex vivo skin gene therapy applications. **Archives of Dermatological Research**, v. 298, n. 1, p. 16-22, 2006.

PRADO, L.; ROCHA, H. Estado sólido na indústria farmacêutica: uma breve revisão. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2080-2112, 2015.

PRUNIÉRAS, M.; DELESCLUSE, C. The culture of skin A review of theories and experimental methods. **The Journal of Investigative Dematology**, v. 67, n. 1, p. 58-65, 1976.

- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.
- RANDALL, K. J.; TURTON, J.; FOSTER, J. R. Explant culture of gastrointestinal tissue: a review of methods and applications. **Cell Biology and Toxicology**, v. 27, n. 4, p. 267-284, 2011.
- RIBEIRO, R. V.; BIESKI, I. G. C.; BALOGUN, S. O.; MARTINS, D. T. de O. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 205, n. May, p. 69-102, 2017.
- RIGANO, D.; AVIELLO, G.; BRUNO, M.; FORMISANO, C.; ROSSELLI, S. CAPASSO, R.; SENATORE, F.; IZZO, A. A.; BORRELLI, F.. Antispasmodic effects and structure-activity relationships of labdane diterpenoids from *Marrubium globosum* ssp. *libanoticum*. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 8, p. 1477-1481, 2009.
- RIJNKELS, J. M.; MOISON, R. M.; PODDA, E.; HENEGOUWEN, G. M. J. B. van. Photoprotection by antioxidants against UVB-radiation-induced damage in pig skin organ culture. **Radiation Research**, v. 159, n. 2, p. 210-217, 2003.
- RIJNKELS, J. M.; WHITELEY, L. O.; HENEGOUWEN, G. M. J. B. Van. Time and dose-related UVB damage in viable pig skin explants held in a newly developed organ culture system. **Photochemistry and Photobiology**, v. 73, n. 5, p. 499-504, 2001.
- RODRÍGUEZ, J. A.; BUSTAMANTE, C.; ASTUDILLO, L.; SCHMEDA-HISCHMANN, G. Gastroprotective activity of solidagenone on experimentally-induced gastric lesions in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, n. 3, p. 399-404, 2002.
- RODRÍGUEZ, J. A.; THEODULOZ, C.; SÁNCHEZ, M.; RAZMILIC, I.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Gastroprotective and ulcer-healing effect of new solidagenone derivatives in human cell cultures. **Life Sciences**, v. 77, n. 17, p. 2193-2205, 2005.
- ROJAS, E.G.; SILVA, M. P. O.; MAGENTA, M. A. G.; TOMA, W. Investigação de compostos fenólicos com possível potencial alelopático de folhas de uma árvore invasora de restinga (*Terminalia catappa* L.). **UNISANTA BIOSCIENCE**, v. 1, p. 60-64. 2012.
- RUBINCHIK, E.; DUGOURD, D.; ALGARA, T.; PASETKA, C.; FRIEDLAND, H. D. Antimicrobial and antifungal activities of a novel cationic antimicrobial peptide, omiganan, in experimental skin colonisation models. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, p. 457-461, 2009.
- RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{o+}. **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2007.
- SABIR, S. M.; AHMAD, S. D.; HAMID, A.; KHAN, M. Q.; ATHAYDE, M. L.; SANTOS, D. B.; BOLIGON, A. A.; ROCHA, J. B. T. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidago microglossa* containing polyphenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 131, n. 3, p. 741-747, 2012.

SAHOO, N.; MANCHIKANTI, P.; DEY, S. Herbal drugs: Standards and regulation. **Fitoterapia**, v. 81, p. 462-471, 2010.

SARABIA, Z.; HERNÁNDEZ, D.; CASTELL, J. V.; HENEGOUWEN, G. M. J. B. van. Photoreactivity of tiaprofenic acid and suprofen using pig skin as an ex vivo model. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 58, n. 1, p. 32-36, 2000.

ŠARIĆ-KUNDALIĆ, B.; DOBEŠ, C.; KLATTE-ASSELMEYER, V.; SAUKEL, J. Ethnobotanical study on medicinal use of wild and cultivated plants in middle, south and west Bosnia and Herzegovina. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 1, p. 33-55, 2010.

ŠARIĆ-KUNDALIĆ, B.; DOBEŠ, C.; KLATTE-ASSELMEYER, V.; SAUKEL, J. Ethnobotanical survey of traditionally used plants in human therapy of east, north and north-east Bosnia and Herzegovina. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 3, p. 1051-1076, 2011.

SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. **Method in biotechnology: Natural products Isolation**, ed. 2, ed. Humana Press, Totowa, New Jersey 2006, p. 529.

SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., PETROVICK, P. R. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICJ, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Florianópolis – Santa Catarina. UFRGS/UFSC, 6. ed. 2010. Cap. 15. p. 371-402.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRIGUEZ, J.; ASTUDILLO, L. Gastroprotective activity of the diterpene solidagenone and its derivatives on experimentally induced gastric lesions in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 1, p. 111-115, 2002.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; ASTUDILLO, L.; PALENZUELA, J. A. Biotransformation of solidagenone by *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* and *Curvularia lunata* cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 93-97, 2004.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; JORDAN, M.; GERTH, A.; WILKEN, D. Secondary Metabolite Content in Rhizomes, Callus Cultures and *in vitro* Regenerated Plantlets of *Solidago chilensis*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 60, n. 1-2, p. 5-10, 2005.

SCHNEIDER, M.; SACHETT, A.; SCHÖNELL, A. P.; IBAGY, E.; FANTIN, E.; BEVILAQUA, F.; PICCININ, G.; SANTO, G. D.; GIACHINI, M.; CHITOLINA, R.; WILDNER, S. M.; MOCELIN, R. ZANATTA, L.; ROMAN, W. A. J. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Solidago chilensis* in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25 n. 3. p. 258–263. 2015.

SHAH, B. N.; SETH, A. K. **Textbook of Pharmacognosy and Phytochemistry**, ed. 1, Elsevier, 2010, p. 587.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Florianópolis – Santa Catarina. UFRGS/UFSC, 6. ed. 2010. Cap.18 p. 467-496.

Species link (palavra chave *Solidago*). Disponível em: <<http://www.splink.org.br>>. Acesso em: 20/11/2018.

SOARES, C. M. B.; SARON, E. S. Microanálise Elementar de Materiais: Aplicações Do Sistema Mev-Edx. **Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens**, v. 22, n. 1, p. 1-4, 2010.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L.; Desenvolvimento Tecnológico e Produção de Fitoterápicos In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICJ, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. ed. 6, Porta Alegre e Florianópolis: Ed.UFRGS/UFSC, 2010. p. 289-326.

SOUZA, D. M.F. DE; SÁ, R. D.; ARAÚJO, E. L.; RANDAU, K. P. Anatomical, phytochemical and histochemical study of *Solidago chilensis* Meyen. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 2, p. 2107-2120, 2018.

SOUZA, G.H.B.; MELLO, J.C.P.; LOPES, N.P.; Farmacognosia Coletânea Científica, Editora UFOP. 2012.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. 2. Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 704 p., 2008.

TAMURA, E. K.; JIMENEZ, R. S.; WAISMAM, K.; GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P.; MALPEZZI-MARINHO, E. A. L.; MARINHO, E. A. V.; FARSKY, S. H. P. Inhibitory effects of *Solidago chilensis* Meyen hydroalcoholic extract on acute inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 3, p. 478-485, 2009.

THOKCHOM, R.; MAITRA, S. Standardization of Surface Sterilization Technique for *In-vitro* Propagation of Anthurium (*Anthurium andraeanum* Lind.) cv. Jewel. **International Journal of Current Research and Academic Review**, v. 4, n. 2, p. 335-339, 2016.

TRAN, Q. T. N.; WONG, W. S. F.; CHAI, C. L. L. Labdane diterpenoids as potential anti-inflammatory agents. **Pharmacological Research**, v. 124, p. 43-63, 2017.

TRIBESS, B.; PINTARELLI, G. M.; BINI, L. A.; CAMARGO, A.; FUNEZ, L. A.; DE GASPER, A. L.; ZENI, A. L. B. Ethnobotanical study of plants used for therapeutic purposes in the Atlantic Forest region, Southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 164, p. 136-146, 2015.

Tropico® - *Missouri Botanical Garden*: disponível em: <http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=solidago&commonname=> : acesso em 09/12/2018 as 14:00

TROWELL, O. A. The Culture of Mature Organs in a Synthetic Medium. **Experimental Cell Research**, v. 16, p. 118-147, 1959.

VAN BUUL, G. M.; VILLAFUERTES, E.; BOS, P. K.; WAARSING, J. H.; KOPS, N.; NARCISI, R.; WEINANS, H.; VERHAAR, J. A. N.; BERNSEN, M. R.; VAN OSCH, G. J. V. M. Mesenchymal stem cells secrete factors that inhibit inflammatory processes in short-term osteoarthritic synovium and cartilage explant culture. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.

20, n. 10, p. 1186-1196, 2012.

VANCHEVA, S.; STANTCHEVA, B. Ethnobotanical inventory of medicinal plants in Bulgaria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n. 2, p. 165-172, 2000.

VALVERDE-SOARES, S. S.; AZEVEDO-SILVA, R. C.; TOMASSINI, T. C. B. Utilização de CLAE, como paradigma na obtenção e controle do diterpeno solidagenona a partir de inflorescências de *Solidago chilensis* Meyen (arnica brasileira). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 90, n. 3, p. 196-199, 2009.

VECHIA, C.A.D.; MORAIS, B.; SCHONELL, A.P.; DIEL, K.A.P.; FAUST, C.; MENIN, C.; GOMES, D.B.; ROMAN, JUNIOR W.A. Isolamento químico e validação analítica por cromatografia líquida de alta eficiência de quercitrina em *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). **Revista Brasileira Planta Medicinal**, v. 18, p. 288-296, 2016.

VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R.; MARTINS, C. H. G.; CROTTI, A. E. M.; TIRAPELI, C. R. Diterpenos: Aspectos Químicos e Biológicos. En: FURTADO, R. F.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R. (Ed.). **Coleção Farmácia - Farmacognosia**. 1. ed. Rio de Janeiro - RJ: Atheneu, 2017. p. 293-313.

VOKOU, D.; KATRADI, K.; KOKKINI, S. Ethnobotanical survey of Zagori (Epirus, Greece), a renowned centre of folk medicine in the past. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, n. 3, p. 187-196, 1993.

YEUNG, C. C.; HOLMES, D. F.; THOMASON, H. A.; STEPHENSON, C.; DERBY, B.; HARDMAN, M. J. An ex vivo porcine skin model to evaluate pressure-reducing devices of different mechanical properties used for pressure ulcer prevention. **Wound Repair and Regeneration**, v. 24, n. 6, p. 1089-1096, 2016.

WAFULA, W. G.; ARNOLD, O.; CALVIN, O.; MOSES, M. Reactive oxygen species (ROS) generation, impacts on tissue oxidation and dietary management of non-communicable diseases: A review. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 11, n. 12, p. 79-90, 2017.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**, Edition Springer-Verlag. 1984. p. 320.

WATANUKI, H.; OTA, K.; TASSAKKA, A. C. M.; KATO, T.; SAKAI, M. Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture**, v. 258, n. 1-4, p. 157-163, 2006.

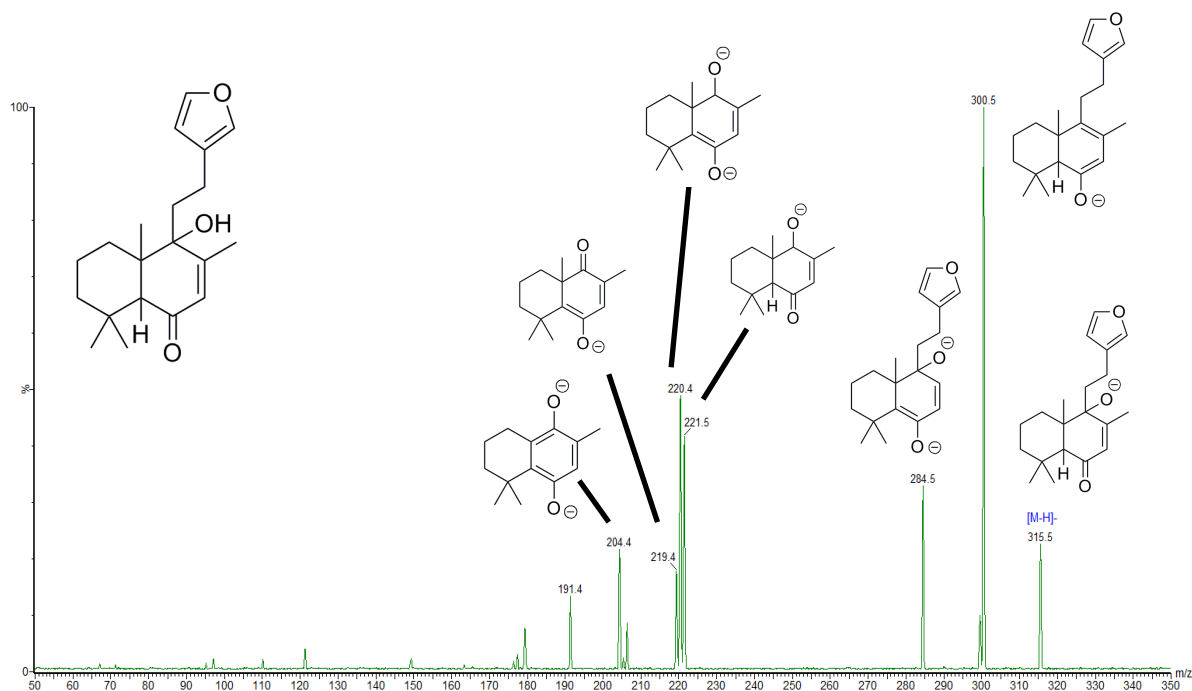
WENDLANDT, W. W. M. **Thermal analysis**. 3. ed. Houston, Texas: A Wiley-interscience publication, 1986.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A.; Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**, Florianópolis – Santa Catarina. UFRGS/UFSC, 6. ed. 2010. Cap. 23 p. 577-614.

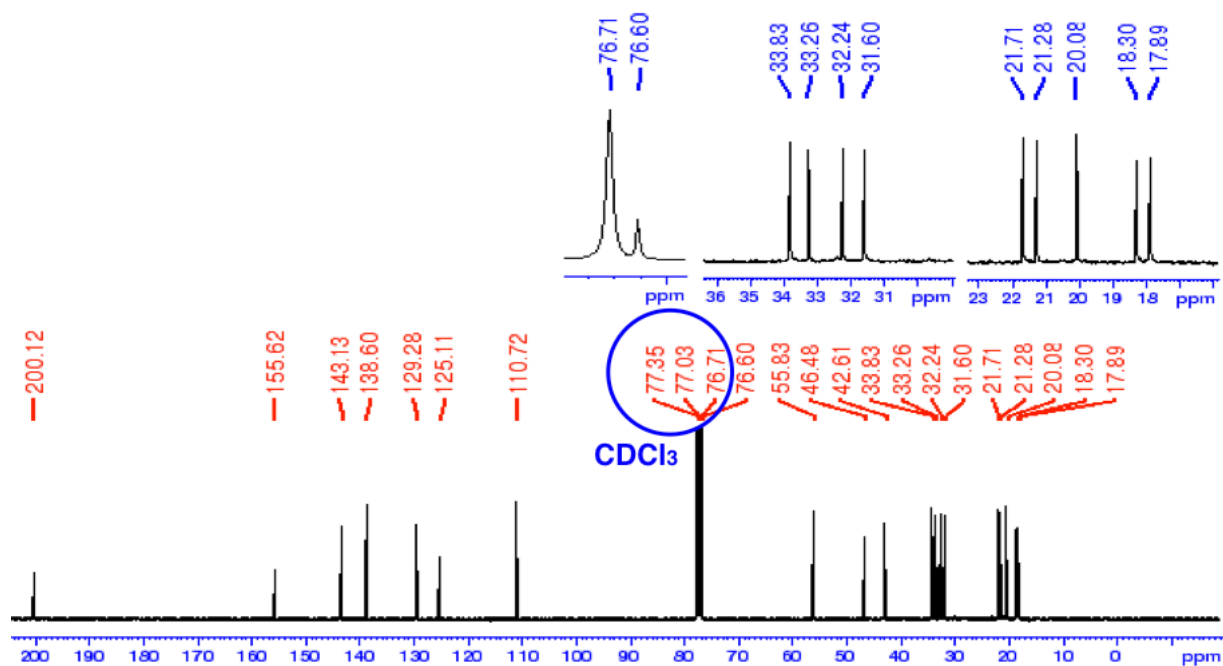
ZUBAIR, M.; NYBOM, H.; LINDHOLM, C.; BRANDNER, J. M.; RUMPUNEN, K. Promotion of wound healing by *Plantago major* L. leaf extracts – ex- vivo experiments confirm experiences from traditional medicine. **Natural Product Research**, v. 30, n. 5, p. 622-624, 2016.

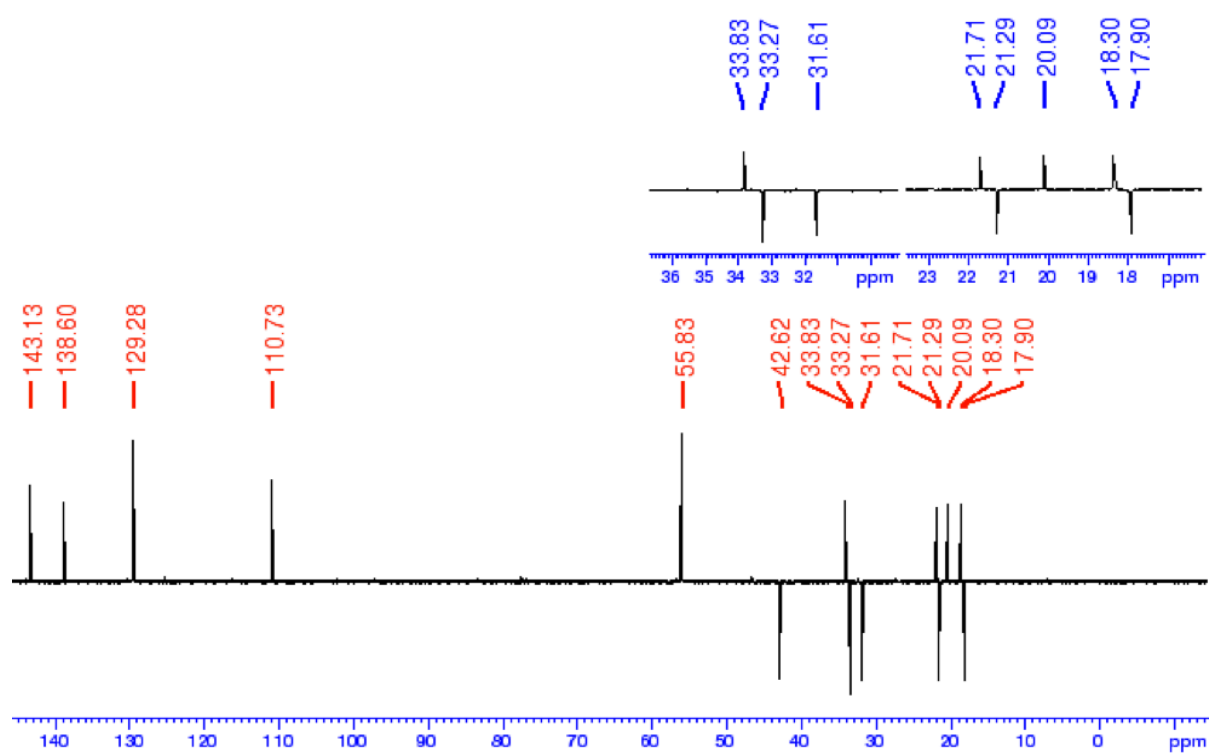
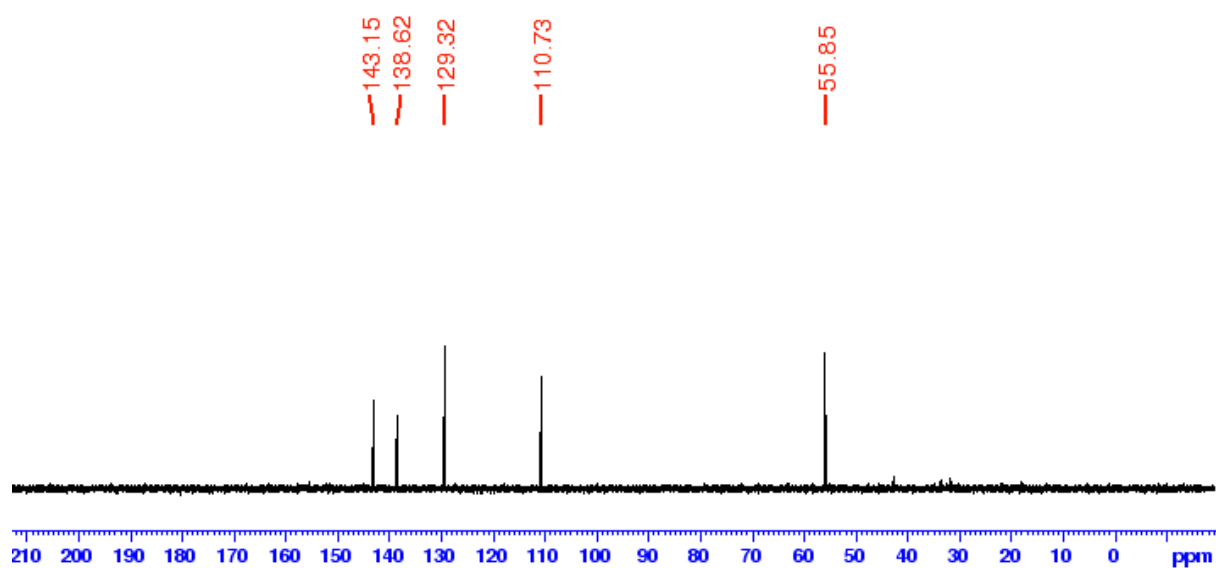
APÊNDICES

Apêndice 1: Espectro de Massas *Electrospray ionization* (MS-ESI) em modo negativo de solidagenona

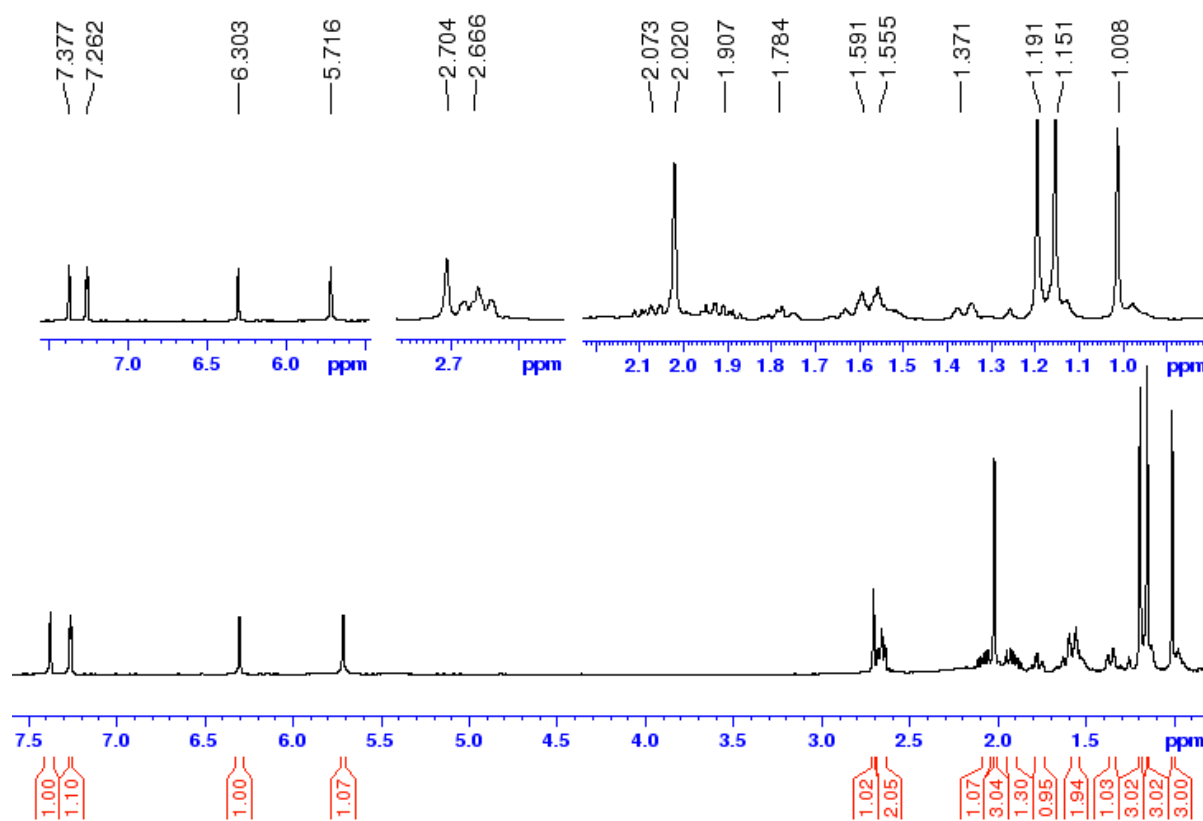


Apêndice 2: Espectro 1D de RMN de ^{13}C de solidagenona de *S. chilensis* CDCl_3

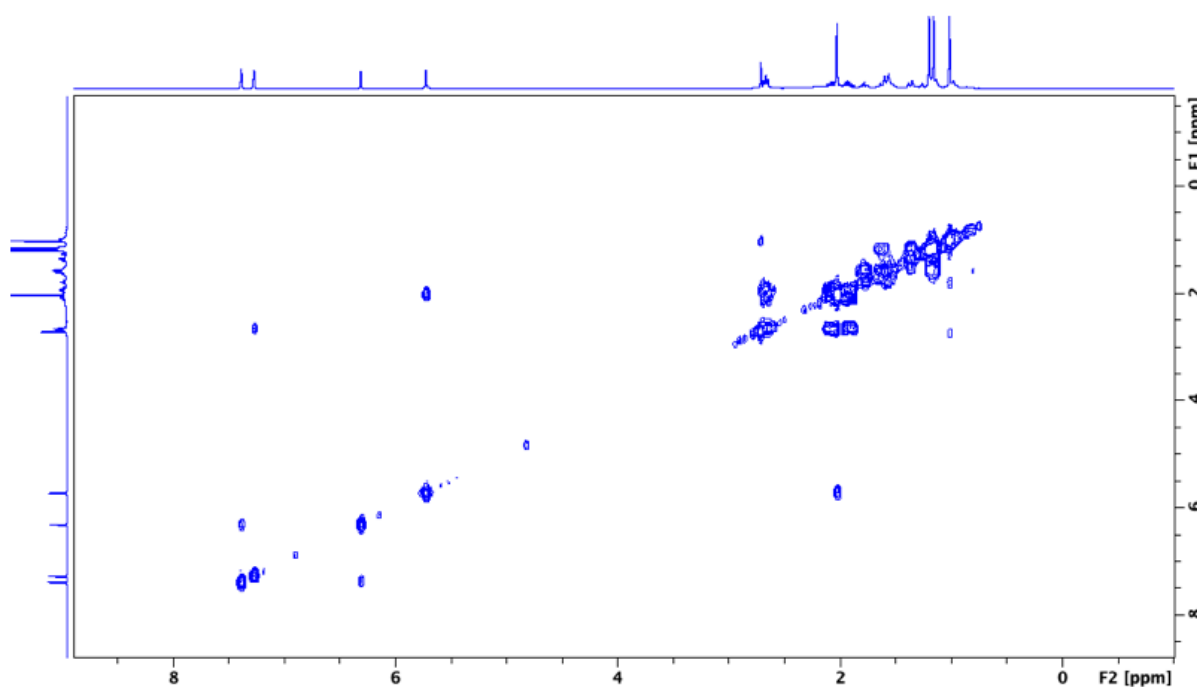


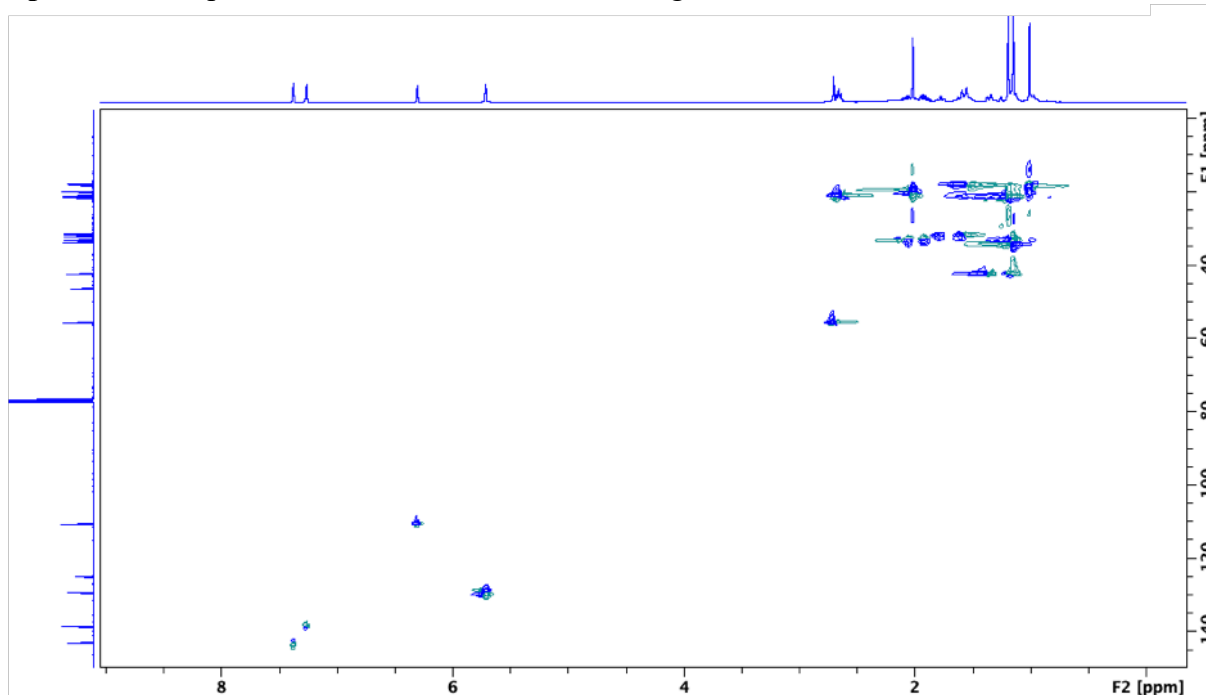
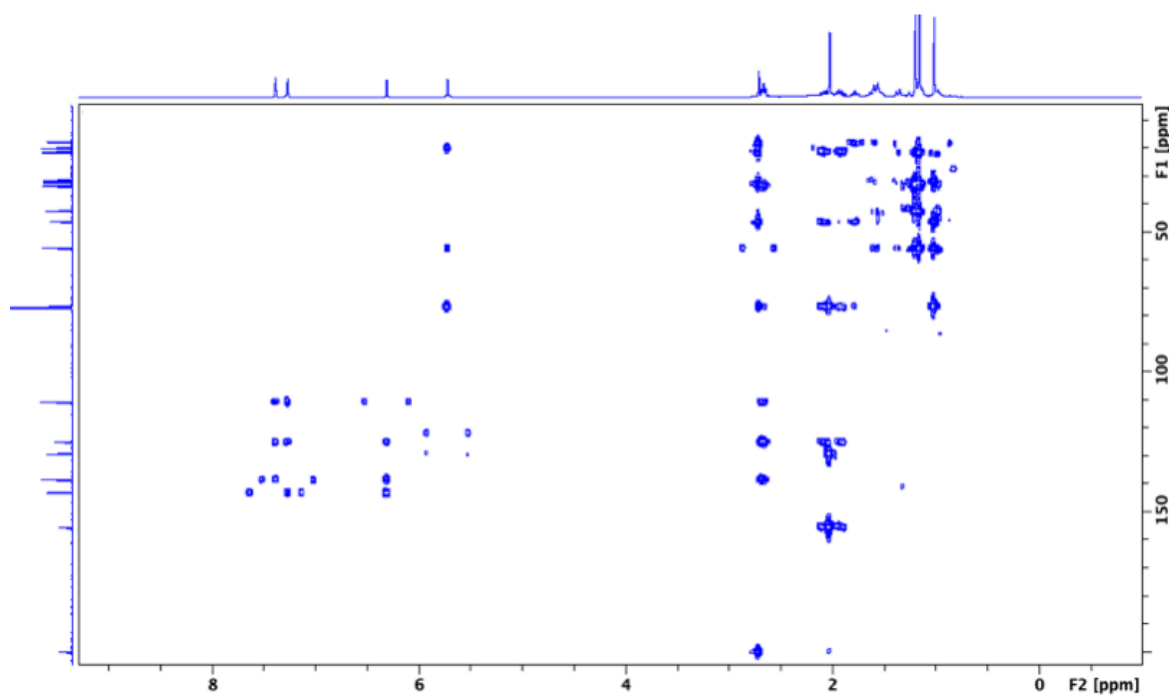
Apêndice 3: Espectro 1D de RMN Dept 135 de solidagenona de *S. chilensis* em CDCl_3 **Apêndice 4:** Espectro 1D de RMN Dept 90 de solidagenona de *S. chilensis* em CDCl_3 

Apêndice 5: Espectro 1D de RMN ^1H de solidagenona de *S. chilensis* em CDCl_3

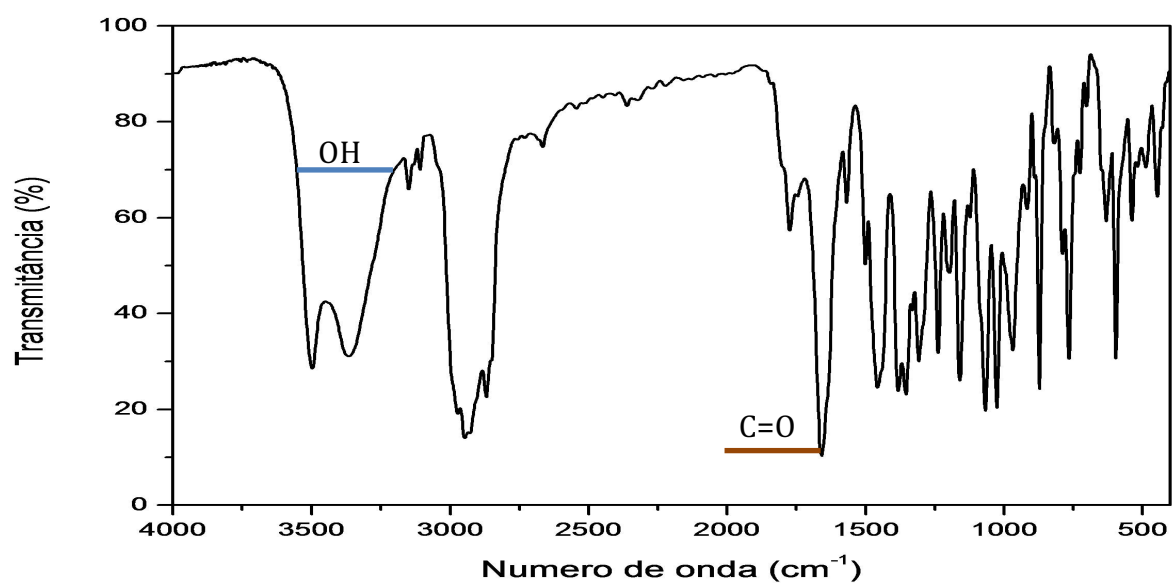


Apêndice 6: Espectro 2D de RMN COSY de solidagenona de *S. chilensis* em CDCl_3

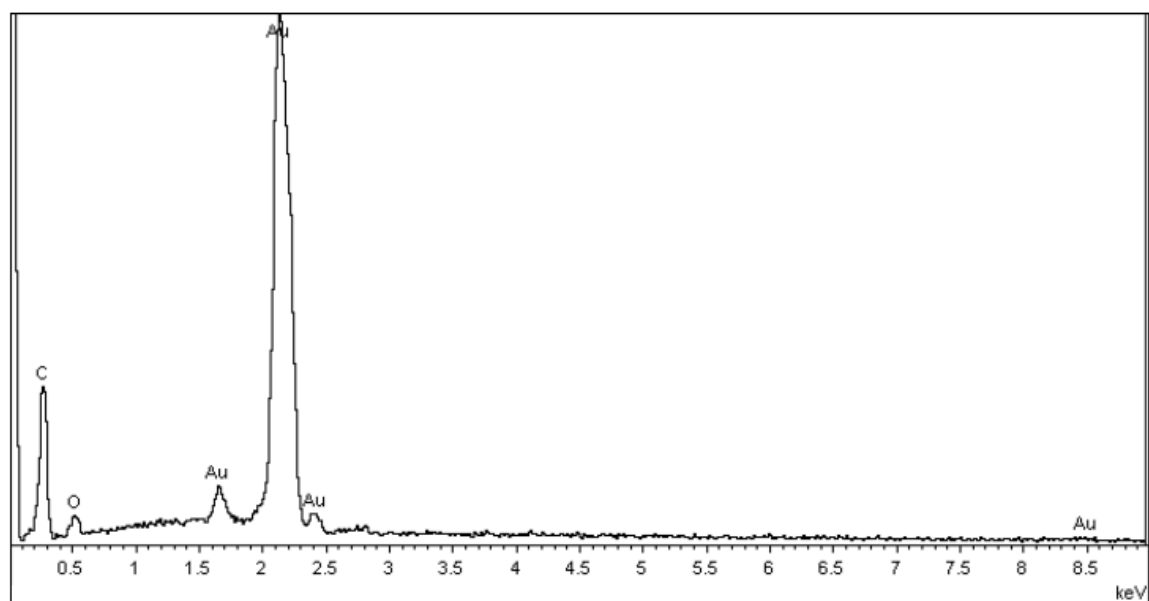


Apêndice 7: Espectro 2D de RMN HSQC de solidagenona de *S. chilensis* em CDCl_3 **Apêndice 8:** Espectro 2D de RMN HMBC de solidagenona de *S. chilensis* em CDCl_3 

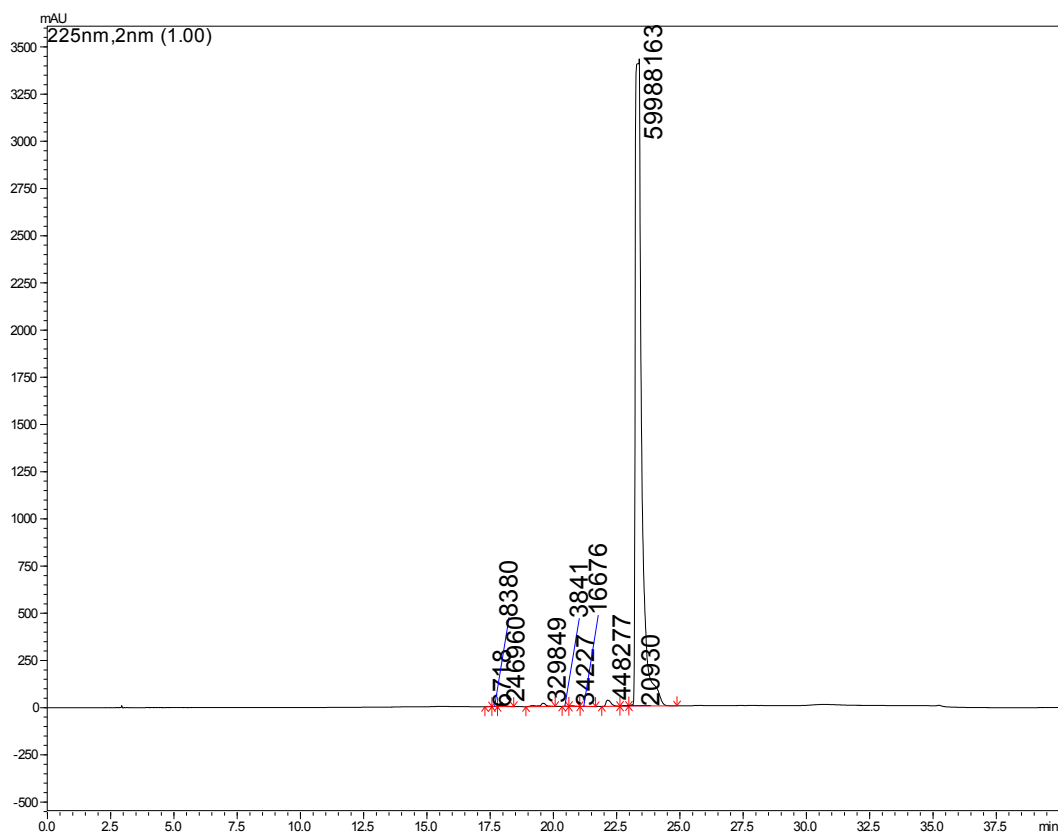
Apêndice 9: Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier de solidagenona de *Solidago chilensis*



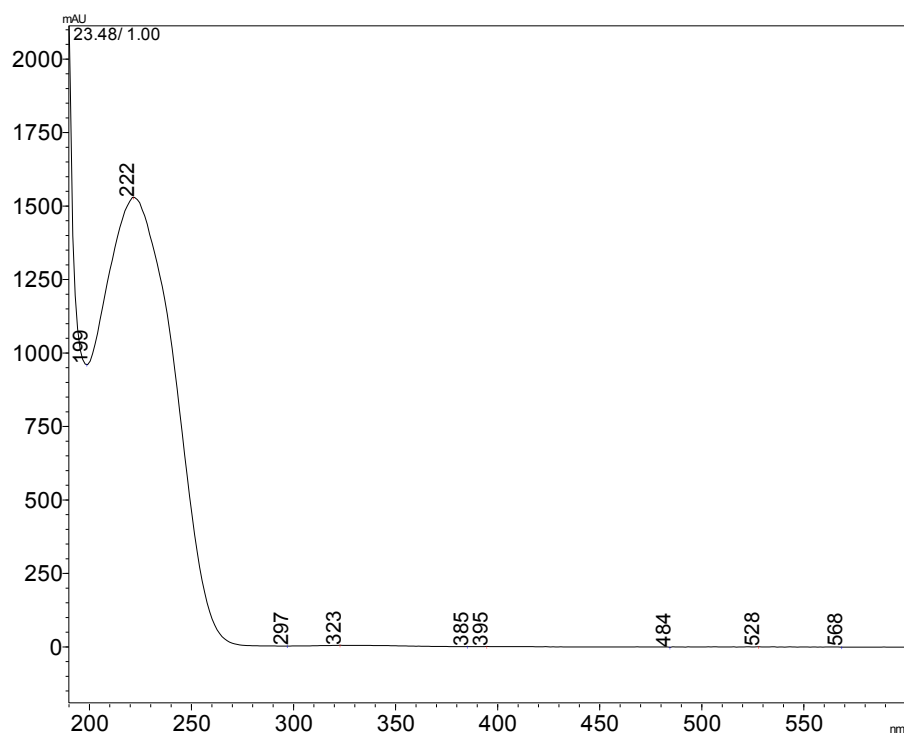
Apêndice 10: Espectro de Dispersão de Energética (EDS) de solidagenona



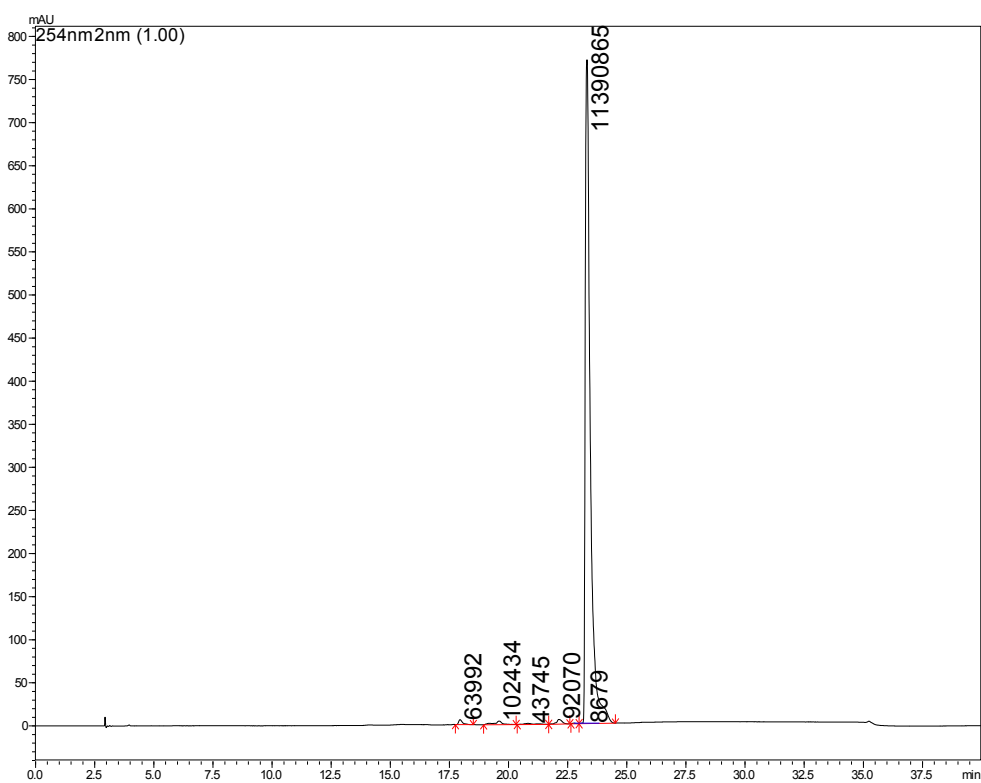
Apêndice 11: Cromatograma integrado de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de solidagenona com comprimento de onda em 225 nm



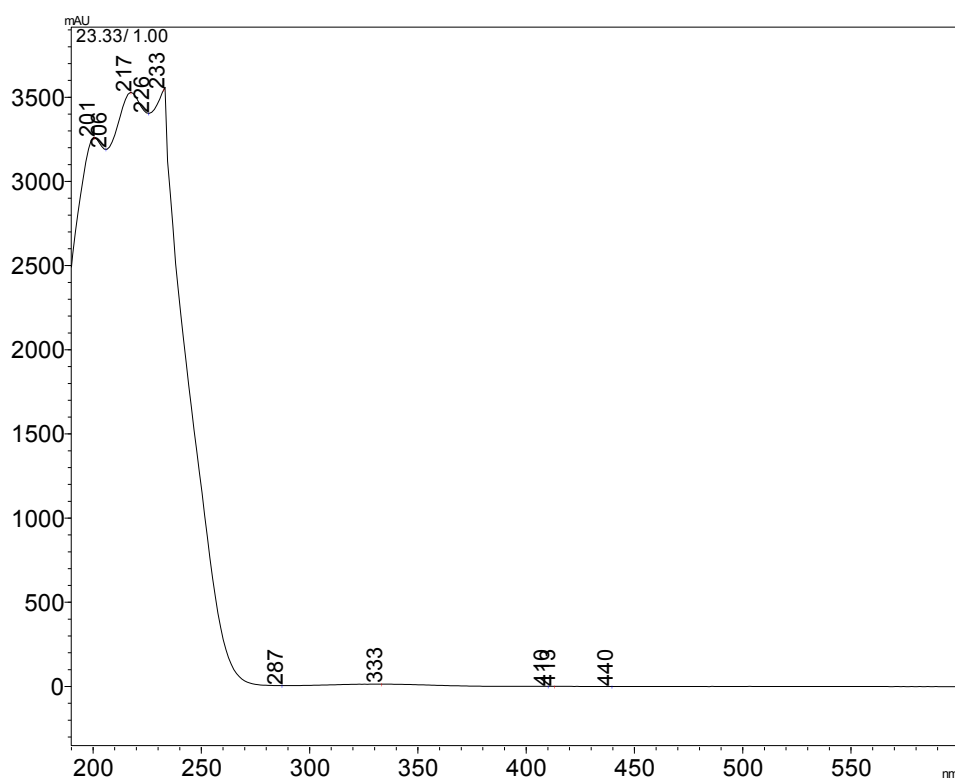
Apêndice 12: Espectro de absorção UV da solidagenona em 225 nm

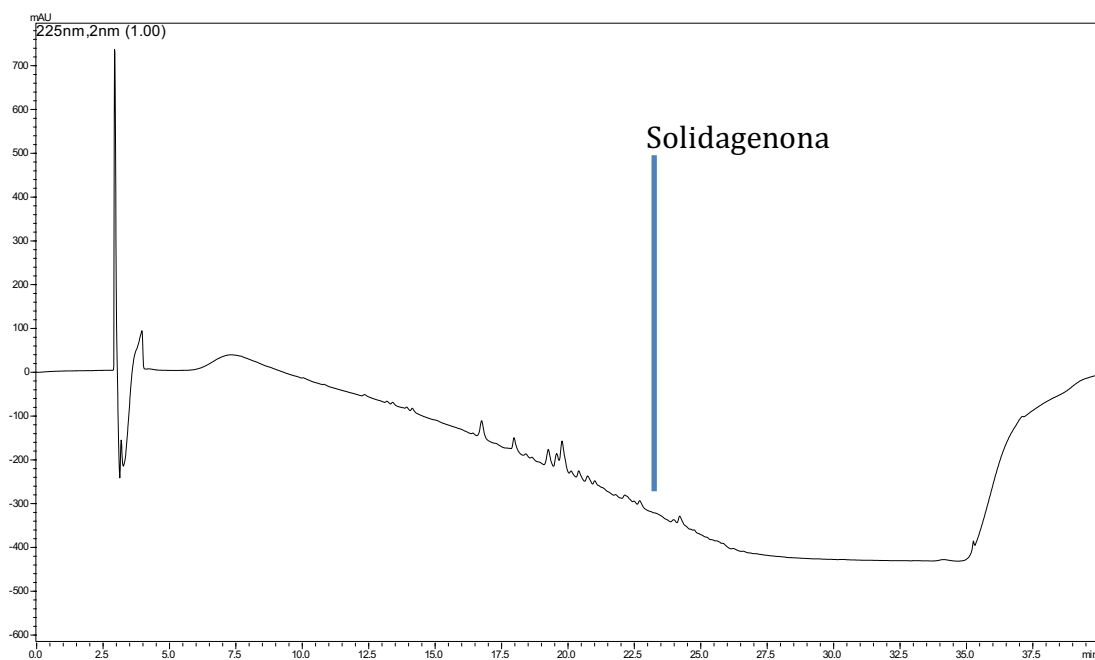
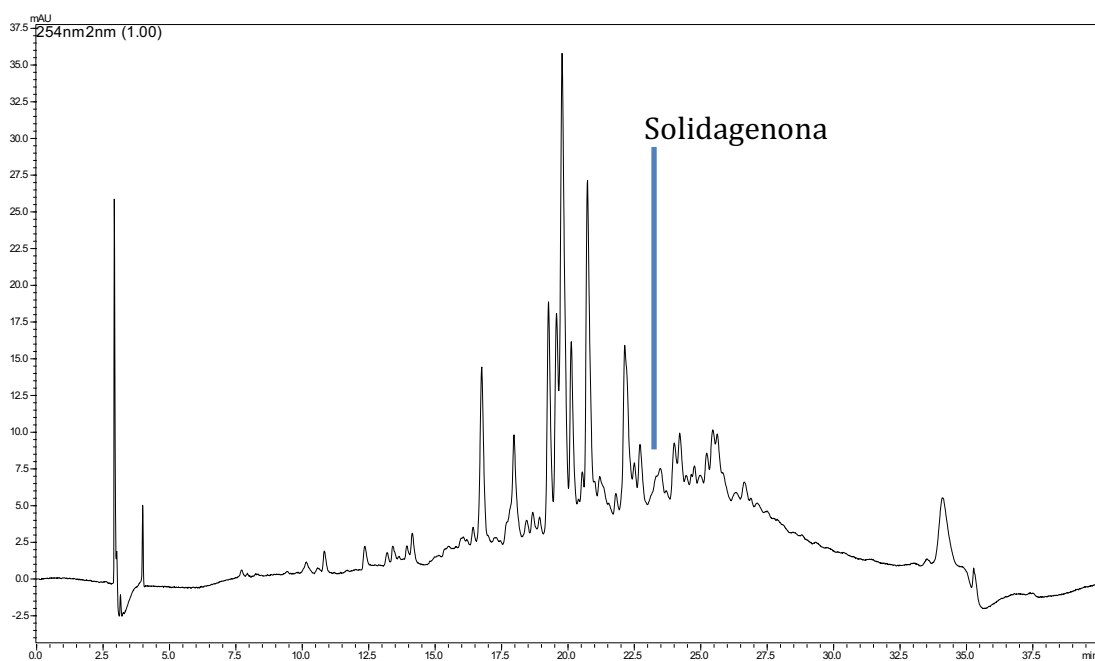


Apêndice 13: Cromatograma integrado por CLAE de solidagenona com comprimento de onda em 254 nm

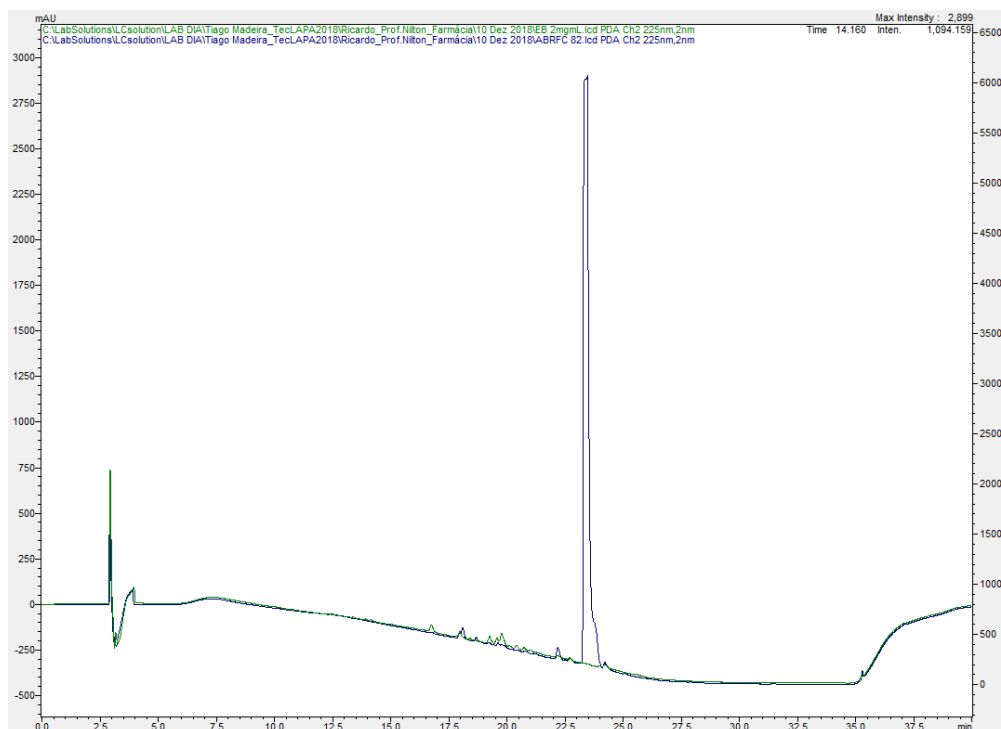


Apêndice 14: Espectro de absorção UV da solidagenona em 254 nm



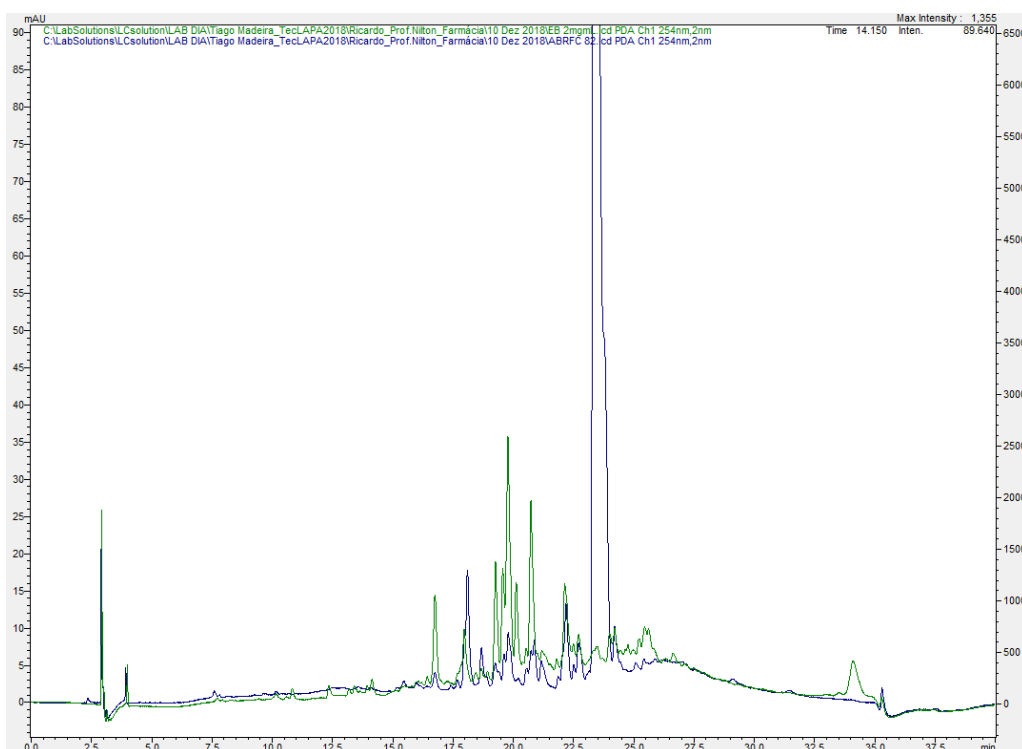
Apêndice 15: Cromatograma do extrato bruto de *Solidago chilensis* em 225 nm**Apêndice 16:** Cromatograma do extrato bruto de raízes de *Solidago chilensis* em 254 nm ampliado.

Apêndice 17: Cromatograma do extrato bruto de raízes de *Solidago chilensis* e a sobreposição de solidagenona em 225 nm por CLAE

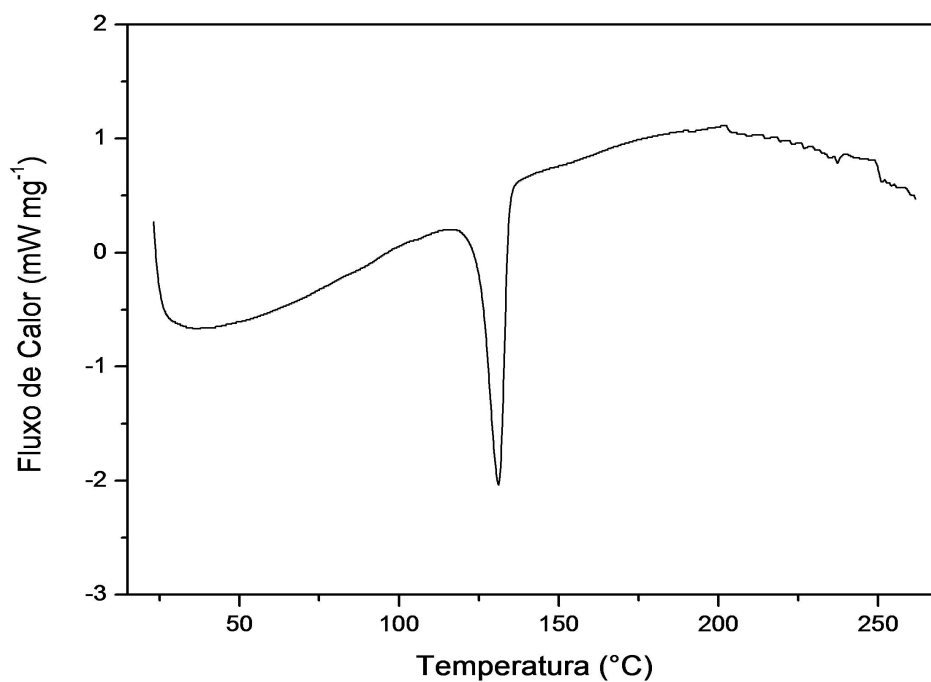


Leg: (verde) cromatograma do extrato bruto de raízes de *S. chilensis*; (roxo) cromatograma de solidagenona

Apêndice 18: Cromatograma do extrato bruto de raízes de *Solidago chilensis* e a sobreposição de solidagenona em 254 nm por CLAE



Leg: (verde) cromatograma do extrato bruto de raízes de *S. chilensis*; (roxo) cromatograma de solidagenona

Apêndice 19: Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) de solidagenona**Apêndice 20:** Análise Termogravimétrica (TGA) e Termogravimetria Derivada (DTG) de solidagenona