



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**  
**Centro de Ciências Exatas e Tecnologia**  
**Curso de Mestrado em Química**



**ESTUDOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DE *CROTON URUCURANA* E  
*MICROGRAMMA VACCINIIFOLIA***

**VANDERLÉA FRANCISCA LIBERATO BONANI**

**CAMPO GRANDE-MS**  
**2007**



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**  
**Centro de Ciências Exatas e Tecnologia**  
**Curso de Mestrado em Química**



**ESTUDOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DE *CROTON URUCURANA* E  
*MICROGRAMMA VACCINIIFOLIA***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Química, na área de concentração em Química Orgânica, junto ao curso de Mestrado em Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob orientação da Professora Dr<sup>a</sup> Sônia Corina Hess e Co-orientação do Dr. Euclésio Simionatto.

**Campo Grande-MS**  
**2007**

"Há duas formas para viver sua vida. Uma é acreditar que não existe milagre. A outra é acreditar que todas as coisas são um milagre".

*(Albert Einstein)*

Este trabalho é dedicado especialmente a meu amado esposo **Rogério Tozato Bonani**, com quem tenho o privilégio de conviver e compartilhar os sucessos alcançados.

## AGRADECIMENTOS

À Professora **Dr<sup>a</sup> Sônia Corina Hess**, pela enorme paciência e generosidade, por ter se colocado inteiramente à disposição e ter oferecido além da orientação segura todos os recursos para a execução desse trabalho.

Ao **Dr. Euclésio Simionatto**, meu co-orientador, pelas infindáveis lições no laboratório, pela ajuda inestimável e humildade em compartilhar todos os seus conhecimentos.

Ao meu esposo **Rogério Tozato Bonani**, pela dedicação, compreensão, estímulo e acima de tudo pelo companheirismo e amor a mim oferecidos generosamente.

A Professora **Dr<sup>a</sup> Cláudia Cardoso** (UEMS), pelo apoio sempre oportuno e pelos experimentos de CLAE.

Aos meus pais **Vanderlei Liberato** e **Iraci Francisca Liberato**, pelos seus exemplos de dignidade que permeiam minha existência.

À minha querida amiga **Deizeluci Zanella** pela acolhida, estímulo constante e lições simples da vida, que na verdade são a essência da sabedoria.

Ao Professor **Dr Ademir Farias Morel** coordenador do NPPN-UFMS-Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais e Caroline Z. Stuker pelos testes de atividade antimicrobiana.

À Professora **Dr<sup>a</sup> Marize Terezinha Lopes Pereira Peres** e sua equipe de pesquisadores pelos testes de atividade alelopática.

À Professora **Dr<sup>a</sup> Nilva Ré Poppi** e ao seu orientando Jorge pelos experimentos de Cromatografia gasosa.

À Professora **Maria de Fátima Cepa Matos** (DFB/UFMS) e sua equipe pelos experimentos de atividade antineoplásica.

Aos meus amigos do curso de Mestrado em Química da UFMS.

À servidora civil e amiga **Margarida**, técnica do LPN pelo apoio.

Aos alunos de Iniciação Científica e estagiários do Laboratório de Pesticidas Naturais: **Lis, Natasha, Letícia, Marina, Mariana, Denize, Reginaldo, Samuel e Cristielly** pelo apoio.

À pesquisadora **Ms. Ana Lúcia Batista**, pela amizade e apoio.

Ao Técnico **Luiz Leonardo** pelos espectros de Infravermelho.

Ao Prof. **Dr. Joaquim**, a técnica **Edilene** e à **Dra. Lucinéia** pelos espectros de RMN.

Às pessoas que de alguma forma contribuíram para execução desse trabalho.

Aos professores do mestrado: **Dênis Pires Lima, Adilson Beatriz, Fernanda Rodrigues Garcez e Walmir Silva Garcez** pelos ensinamentos.

Aos secretários da pós-graduação, **Maria Otávia e Celestino**.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

À Fundação de Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul, pelo suporte financeiro ao projeto.

A Capes pela bolsa concedida.

# ÍNDICE GERAL

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>A Família Euphorbiaceae</b>	<b>2</b>
1.1.1	<i>O Gênero Croton</i>	3
1.1.2	<i>Principais Metabólitos de Ocorrência em Algumas Espécies de Croton e Usos Tradicionais na América do Sul</i>	3
1.1.2.1	<i>Croton cajucara</i> BENTH	4
1.1.2.2	<i>Croton eluteria</i> BENNETT	4
1.1.2.3	<i>Croton lechleri</i> L.	5
1.1.2.4	<i>Croton celtidifolius</i> BAILL	5
1.1.2.5	<i>Croton malambo</i> KARST	6
1.1.2.6	<i>Croton nepetaefolius</i> BAILL	6
1.1.2.7	<i>Croton palanostigma</i> KLOTZCH	6
1.1.2.8	<i>Croton schiedeanus</i> SCHLECHT	7
1.1.2.9	<i>Croton zehntneri</i> PAX et. HOFFM	7
1.1.2.10	<i>Croton urucurana</i> BAILL.	7
<b>1.2</b>	<b>Pteridófitas</b>	<b>8</b>
1.2.1	<i>Alguns Metabólitos de Ocorrência Genérica em Pteridófitas</i>	9
1.2.2	<i>A Família Polypodiaceae</i>	10
1.2.3	<i>O Gênero Microgramma</i>	10
1.2.4	<i>Alguns Compostos Isolados de Espécies do Gênero Polypodium/Microgramma</i>	11
1.2.5	<i>Propriedades Medicinais de Algumas Espécies do Gênero Polypodium/Microgramma</i>	13
<b>1.3</b>	<b>Atividade Biológica</b>	<b>14</b>
1.3.1	<i>Considerações sobre Atividade Antioxidante</i>	14
1.3.1.1	<i>Oxidações Radicalares em Sistemas Biológicos</i>	15
1.3.1.2	<i>Agentes Antioxidantes de Origem Vegetal</i>	19
1.3.1.3	<i>Avaliação da Atividade Antioxidante Frente ao Radical Livre DPPH</i>	23
1.3.1.4	<i>Análise em CLAE para a descoberta de agentes antioxidantes</i>	23
1.3.2	<i>Considerações sobre Atividade Antimicrobiana</i>	24
1.3.3	<i>Considerações sobre Atividade Citotóxica</i>	25
1.3.4	<i>Considerações sobre Atividade Alelopática</i>	27
<b>1.4</b>	<b>Teor de Fenóis Totais e Flavonóides</b>	<b>28</b>
1.4.1	<i>Avaliação do Teor de Fenóis Totais</i>	28
1.4.2	<i>Avaliação do teor de flavonóides</i>	29
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
2.1	<b>Objetivo Geral</b>	<b>31</b>
2.2	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>32</b>
3.1	<b>Procedimentos experimentais</b>	<b>32</b>
3.1.1	<i>Cromatografia em camada delgada</i>	32

3.1.2	<i>Cromatografia em coluna (Fase Estacionária)</i> .....	33
3.1.3	<i>Cromatografia Gasosa</i> .....	33
<b>3.2</b>	<b>Materiais e equipamentos</b> .....	<b>33</b>
<b>3.3</b>	<b>Coleta e identificação das espécies vegetais investigadas</b> .....	<b>35</b>
3.3.1	<i>Croton urucurana</i> BAILL / <i>Euphorbiaceae</i> .....	35
3.3.2	<i>Microgramma vacciniifolia</i> / <i>Polypodiaceae</i> .....	35
<b>3.4</b>	<b>Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) de <i>Microgramma vacciniifolia</i></b> .....	<b>35</b>
<b>3.5</b>	<b>Fracionamento do Extrato Etanólico Bruto (EEB) e Frações (FS) de <i>Microgramma vacciniifolia</i></b> .....	<b>36</b>
<b>3.6</b>	<b>Determinação da atividade antimicrobiana do EEB e FS de <i>Microgramma vacciniifolia</i></b> .....	<b>38</b>
<b>3.7</b>	<b>Ensaio qualitativo da atividade antioxidante do EEB e FS de <i>M. vacciniifolia</i></b> ...	<b>39</b>
<b>3.8</b>	<b>Quantificação da atividade antioxidante em extratos brutos e frações semipurificadas de <i>Microgramma vacciniifolia</i> frente ao DPPH</b> .....	<b>39</b>
<b>3.9</b>	<b>Ensaio quantitativo para determinação do teor de fenóis totais e flavonóides no extrato bruto e nas frações semipurificadas de <i>Microgramma vacciniifolia</i></b> .....	<b>40</b>
3.9.1	<i>Teor de flavonóides</i> .....	40
3.9.2	<i>Teor de fenóis totais</i> .....	41
<b>3.10</b>	<b>Análise em CLAE analítica da fração AcOEt do extrato etanólico bruto de <i>M. vacciniifolia</i></b> .....	<b>42</b>
<b>3.11</b>	<b>Atividade alopática</b> .....	<b>42</b>
<b>3.12</b>	<b>Isolamento e identificação dos constituintes do óleo essencial de <i>Croton urucurana</i></b> .....	<b>44</b>
<b>3.13</b>	<b>Ensaio espectrofotométrico quantitativo da atividade antioxidante do óleo essencial de <i>Croton urucurana</i></b> .....	<b>45</b>
<b>3.14</b>	<b>Ensaio em CCD do óleo essencial da casca do caule de <i>Croton urucurana</i>, para determinação qualitativa da atividade antioxidante frente ao DPPH</b> .....	<b>45</b>
3.14.1	<i>Isolamento da fração antioxidante</i> .....	46
3.14.2	<i>Isolamento do 1-Isopropil-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8-hexahidro-2H-naftalen-4-<math>\alpha</math>-ol</i> .....	46
<b>3.15</b>	<b>Atividade antimicrobiana do óleo essencial bruto das cascas do caule de <i>C. urucurana</i></b> .....	<b>46</b>
<b>3.16</b>	<b>Atividade antineoplásica do óleo essencial bruto e das frações isoladas do óleo essencial bruto das cascas do caule de <i>C. urucurana</i></b> .....	<b>47</b>

3.17	Análise estatística .....	48
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
4.1	Ensaio qualitativo em CCD da atividade antioxidante de <i>M. vacciniifolia</i> e <i>C. urucurana</i> .....	50
4.2	<i>Croton urucurana</i> .....	50
4.3	Identificação dos componentes do óleo essencial da casca do caule de <i>Croton urucurana</i> .....	51
4.4	Purificação da substância majoritária presente no óleo essencial de <i>Croton urucurana</i> .....	54
4.5	Ensaio Quantitativo de Avaliação da Atividade Antioxidante do Óleo e das Substâncias Isoladas do Óleo das Cascas do Caule de <i>Croton Urucurana</i> frente ao DPPH .....	63
4.6	Atividades Antibacteriana e Antifúngica do Óleo da Cascas do Caule de <i>Croton urucurana</i> .....	65
4.7	Avaliação da Atividade Citotóxica de Materiais Obtidos do Óleo da Casca de <i>C. urucurana</i> .....	66
4.8	Atividade Antioxidante de <i>M. vacciniifolia</i> .....	66
4.9	Determinação do Teor de Fenóis Totais e Flavonóides .....	68
4.10	Relação entre o teor de fenóis e flavonóides e valores de $CI_{50}$ obtidos no teste frente ao DPPH .....	69
4.11	Relação entre o Teor de Fenóis e Flavonóides .....	70
4.12	Substâncias Isoladas da Fração Hexânica de <i>Microgramma vacciniifolia</i> .....	71
4.12.1	Identificação do hopan-22-ol .....	72
4.12.2	Identificação do $\beta$ - sitosterol .....	78
4.13	Estudo químico com a fração acetato de etila de <i>M. vacciniifolia</i> .....	87
4.13.1	CLAE analítica .....	87
4.14	Análise Microbiológica do extrato etanólico bruto, fração hexânica e fração AcOEt de <i>M. vacciniifolia</i> .....	89
4.15	Atividade Alelopática do Extrato Etanólico Bruto (EEB) , Fração Hexânica (FH) , Fração Acetato de Etila (FAE) e Fração Etanol Água (FEA) de <i>Microgramma vacciniifolia</i> .....	91
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>96</b>

<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>98</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>110</b>

## ÍNDICE ILUSTRAÇÕES

### ESQUEMAS

<b>Esquema 01</b> – Mecanismo da oxidação de lipídeos (X é um radical iniciador; R <sup>1</sup> H e R <sup>2</sup> H são moléculas de lipídeos).....	16
<b>Esquema 02</b> – Decomposição de hidroperóxidos a traços do íon férrico.....	17
<b>Esquema 03</b> – Reação de Fenton.....	18
<b>Esquema 04</b> – Reação de redução do íon Fe <sup>+3</sup> na presença de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....	18
<b>Esquema 05</b> – Reação de Folin-Ciocalteu.....	29

### GRÁFICOS

<b>Gráfico 01</b> - Curva analítica da quercetina, obtida por espectrofotometria.....	41
<b>Gráfico 02</b> - Curva analítica do ácido gálico, obtida por espectrofotometria.....	42
<b>Gráfico 03</b> - Relação entre teor de fenóis totais e CI <sub>50</sub> no teste DPPH frente ao DPPH do extrato etanólico bruto e frações AcOEt e H <sub>2</sub> O/EtOH de <i>M. vacciniifolia</i> .....	69
<b>Gráfico 04</b> - Relação entre o teor de flavonóides e a CI <sub>50</sub> no teste DPPH do extrato etanólico bruto e frações AcOEt e H <sub>2</sub> O/EtOH de <i>M. vacciniifolia</i> .....	70
<b>Gráfico 05</b> - Relação entre teor de fenóis totais e flavonóides do extrato etanólico bruto e frações semi-purificadas de <i>M. vacciniifolia</i> .....	71

### FIGURAS

<b>Figura 01</b> - Cromatograma do óleo essencial bruto das cascas do caule de <i>C. urucurana</i> . ....	56
<b>Figura 02</b> - Espectro de <sup>1</sup> H- RMN (300 MHz) do 1-isopropil-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8a-hexahidro-2H-naftalen-4α-ol em CDCl <sub>3</sub> , TMS como padrão interno de referência.....	58
<b>Figura 03</b> - Espectro de <sup>13</sup> C- RMN (75 MHz) do 1-isopropil-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8a-hexahidro-2H-naftalen-4α-ol em CDCl <sub>3</sub> , TMS como padrão interno de referência.....	59
<b>Figura 04</b> - Espectro de <sup>13</sup> C-RMN/ DEPT-135 (75 MHz) do 1-isopropil-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8a-hexahidro-2H-naftalen-4α-ol .....	60
em CDCl <sub>3</sub> TMS como padrão interno de referência.....	60
<b>Figura 05</b> - Espectro de massa (70 eV) do 1-isopropil-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8a-hexahidro-2H-naftalen-4α-ol .....	61

<b>Figura 06-</b> Cromatograma obtido para o 1-isopropil-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8a-hexahidro-2H-naftalen-4 $\alpha$ -ol .....	612
<b>Figura 07-</b> Estrutura do 1-isopropil-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8a-hexahidro-2H-naftalen-4 $\alpha$ -ol .....	63
<b>Figura 09-</b> Estrutura do sesquiterpenóide $\alpha$ -bisabolol .....	65
<b>Figura 10-</b> Estrutura do Hopan-22-ol .....	73
<b>Figura 11-</b> Espectro de $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz) do hopan-22-ol em $\text{CDCl}_3$ , TMS como padrão interno de referência .....	74
<b>Figura 12-</b> Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz) do hopan-22-ol em $\text{CDCl}_3$ , TMS como padrão interno de referência .....	75
<b>Figura 13-</b> Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN/DEPT-135 (75 MHz) do hopan-22-ol em $\text{CDCl}_3$ , TMS como padrão interno de referência .....	76
<b>Figura 14-</b> Espectro de infravermelho do hopan-22-ol (pastilha de KBr; $\text{T\% X cm}^{-1}$ ).....	77
<b>Figura 15-</b> Estrutura do $\beta$ - Sitosterol.....	78
<b>Figura 16-</b> Espectro de $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz) do $\beta$ -sitosterol em $\text{CDCl}_3$ , TMS como padrão interno de referência .....	81
<b>Figura 17-</b> Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz) do $\beta$ -sitosterol em $\text{CDCl}_3$ , TMS como padrão interno de referência. ....	82
<b>Figura 18-</b> Espectro $^{13}\text{C}$ -RMN/ DEPT-135 (75 MHz) do $\beta$ -sitosterol em $\text{CDCl}_3$ , TMS como padrão interno de referência. ....	83
<b>Figura 19-</b> Espectro de Infravermelho do $\beta$ -sitosterol (pastilha de KBr; $\text{T\% X cm}^{-1}$ ).....	84
<b>Figura 20-</b> Cromatograma da fração 158-176 obtida a partir da coluna cromatográfica em que foi processada a fração hexânica de <i>M. vacciniifolia</i> .....	85
<b>Figura 21-</b> Estrutura do ácido octadecanóico .....	85
<b>Figura 22-</b> Espectro de massas (70 eV) do ácido octadecanóico .....	86
<b>Figura 23-</b> Estrutura do oleato de etila .....	86
<b>Figura 24-</b> Espectro de massas (70 eV) do oleato de etila .....	86
<b>Figura 25-</b> Estrutura do 15-Metil-Heptadecanoato de Etila .....	86
<b>Figura 26-</b> Espectro de massas (70 eV) do 15-metil-heptadecanoato de etila .....	87
<b>Figura 27-</b> Cromatograma da fração AcOEt de <i>M. vacciniifolia</i> em CLAE-DRD a 255nm ..	87
<b>Figura 28-</b> Espectros obtidos do cromatograma da fração AcOEt de <i>M. vacciniifolia</i> .....	88
<b>Figura 29-</b> Cromatograma obtido após adição de DPPH à fração AcOEt de <i>M. vacciniifolia</i>	89

**Figura 30-** Efeito do extrato etanólico bruto (EEB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE) e fração etanol-agua (FEA) de *M. vacciniifolia* no crescimento da raiz Primária (A) e hipocótilo (B) de alface. Dados expressos em percentual em relação ao controle. .... 94

**Figura 31-** Efeito do extrato etanólico bruto (EEB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE) e fração etanol-água (FEA) de *M. vacciniifolia* no crescimento da raiz primária (A) e coleóptilo (B) de cebola. Dados expressos em percentual em relação ao controle..... 95

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 01-</b> Frações obtidas a partir da coluna cromatográfica 1 (fração hexânica) .....	36
<b>Tabela 02-</b> Frações obtidas a partir da coluna cromatográfica 1 (fração hexânica), reunidas de acordo com semelhanças em CCDA .....	37
<b>Tabela 03-</b> Resultados do ensaio qualitativo da atividade antioxidante de <i>C. urucurana</i> e <i>M. vacciniifolia</i> .....	50
<b>Tabela 04-</b> Composição do óleo essencial bruto da casca do caule de <i>C. urucurana</i> e da fração antioxidante. ....	52
<b>Tabela 05-</b> Atividade antimicrobiana do óleo essencial bruto das cascas do caule de <i>C. urucurana</i> .....	65
<b>Tabela 06-</b> Atividade citotóxica das substâncias obtidas de <i>C. urucurana</i> frente células de MCF7 (carcinoma de mama).....	66
<b>Tabela 07-</b> Atividade antioxidante do extrato etanólico bruto e frações de <i>M. vacciniifolia</i> em testes em CCD, frente ao DPPH.....	67
<b>Tabela 08-</b> Atividade antioxidante representada pelo CI <sub>50</sub> , do extrato etanólico bruto e frações de <i>M. vacciniifolia</i> , frente ao DPPH.....	67
<b>Tabela 09-</b> Teor de fenóis totais e flavonóides para o extrato o etanólico bruto e frações de <i>M. vacciniifolia</i> .....	68
<b>Tabela 10-</b> Dados de deslocamentos químicos de RMN de <sup>13</sup> C (75mHz) e <sup>1</sup> H (300 mHz) obtidos para o triterpenóide hopan-22-ol (em CDCl <sub>3</sub> ), comparados com a literatura (AGETA <i>et al.</i> , 1993).....	73
<b>Tabela 11-</b> Dados de Deslocamentos Químicos de Rmn <sup>13</sup> C (75 Mhz) obtidos para o β-sitosterol (em CDCl <sub>3</sub> ), comparados com a Literatura (WRIGHT <i>et al.</i> , 1978).....	79
<b>Tabela 12-</b> Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima letal (CML) frente a 10 microorganismos, da fração hexânica de <i>M. vacciniifolia</i> . ....	90
<b>Tabela 13-</b> Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima letal (CML) frente a 10 microorganismos, da fração AcOEt De <i>M. vacciniifolia</i> .....	90
<b>Tabela 14-</b> Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima letal (CML), frente a 10 microorganismos do extrato etanólico bruto de <i>M. vacciniifolia</i> .....	91
<b>Tabela 15-</b> Efeito do extrato etanólico bruto e frações semipurificadas de <i>M. vacciniifolia</i> no índice de velocidade de germinação (IVG) de alface e cebola.....	93
<b>Tabela 16-</b> Efeito do extrato etanólico bruto e frações semipurificadas de <i>M. vacciniifolia</i> na porcentagem de germinação de alface e cebola.....	93

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt - Acetato de etila

BHA-2-terbutil-4-metóxi-fenol

BHT 2,6-bis (1,1-dimetil-etil)-4-metil fenol

CC- Coluna Cromatográfica

CCDA- Cromatografia em camada delgada analítica

CCDP- Cromatografia em camada delgada preparativa

CG/EM- Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

CLAE- Cromatografia líquida de alta eficiência

CPBIO- Centro de Pesquisa em Biodiversidade

$\delta$ - deslocamento químico

d- dubleto

dd- duplo dubleto

DEPT- distortionless enhancement by polarization transfer

DNA- Ácido desoxirribonucléico

DPPH- 1,1-difenil-2-picril-hidrazil

DQI- Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

EEB- Extrato Etanólico Bruto

ERN- Espécies reativas de nitrogênio

ERO- Espécies reativas de oxigênio

EtOH- etanol

EtOH/H<sub>2</sub>O- Hidroalcoólica

eV- elétrons volts

FS- Frações

Hz- hertz

IV- infravermelho

J- constante de acoplamento

LPN- Laboratório de Pesticidas Naturais

LTB4- Leucotrieno B4

m- multipeto

mg- miligrama

Me- metila

MeOH- metanol

MHz- mega hertz

q- quarteto

nm- nanômetro

PL- *Polypodium leucotomus*

RMN <sup>13</sup>C- Ressonância magnética nuclear de carbono-13

RMN <sup>1</sup>H- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

s- singleto

t- tripleto

T%- percentual de transmitância

UV- Ultravioleta

UFMS- Universidade Federal de Mato Gross do Sul

UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais

UEMS- Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

UFSM- Universidade Federal de Santa Maria

## RESUMO

Este trabalho descreve a identificação e quantificação de compostos do óleo essencial da casca do caule de *Croton urucurana*, e compostos isolados nas frações do extrato etanólico de *M. vacciniifolia*, bem como a quantificação do teor de fenóis totais e flavonóides deste extrato. Descreve atividades biológicas apresentadas pelas duas espécies, como, antimicrobiana, antioxidante, citotóxica e alelopática. No óleo essencial de *C. urucurana*, borneol, acetato de bornila, o-cimeno, terpineol e 1,8-cineol foram os monoterpenóides majoritários identificados. A análise também mostrou que a mistura é constituída por uma alta proporção de sesquiterpenóides, dominada pelo sesquicineol, 1-isopropil-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8-hexahidro-2H-naftalen-4a-ol, epóxido de  $\gamma$ -gurjuneno,  $\alpha$ -bisabolol, elemenona e  $\alpha$ -eudesmol. O sesquiterpenóide majoritário purificado por procedimentos de CCDP em silicagel, e identificado através de análises espectrais de IV e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , foi o 1-isopropil-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8-hexahidro-2H-naftalen-4a-ol. O óleo essencial das cascas do caule *C. urucurana* exibiu atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH e foi submetido à CCDP. Após o isolamento, a fração ativa foi analisada por CG-EM para identificação e quantificação de um total de 21 componentes, sendo o  $\alpha$ -bisabolol, o  $\alpha$ -eudesmol e o guaiol as substâncias majoritárias presentes. A atividade antimicrobiana do óleo essencial bruto de *C. urucurana* foi determinada frente a 10 microorganismos, sendo que observou-se a inibição do crescimento de todos os microorganismos avaliados. O mesmo óleo essencial, bem como o sesquiterpenóide isolado a partir deste, apresentaram forte atividade citotóxica frente a células de carcinoma de mama MCF-7, tendo potencial para uso terapêutico. Estudos realizados com o extrato etanólico bruto de *Microgramma vacciniifolia* conduziram ao isolamento e à identificação de cinco componentes da fração hexânica: o esteróide  $\beta$ -sitosterol, o triterpenóide hopan-22-ol e uma mistura de substâncias graxas: ácido octadecanóico, oleato de etila e 15-metil-heptadecanoato de etila. A fração AcOEt foi submetida a análise em CLAE-DRD a fim de determinar-se o perfil cromatográfico. Ensaios espectrofotométricos revelaram que a fração AcOEt do extrato etanólico bruto de *M. vacciniifolia* é rica em substâncias fenólicas e flavonóides. Nos testes de avaliação da

atividade antioxidante frente ao radical DPPH, foi possível verificar-se que esta fração é uma fonte promissora de materiais com atividade antioxidante. Em testes de avaliação da atividade antifúngica, a fração hexânica de *M. vacciniifolia* foi a mais ativa, tendo inibido o crescimento de *C. albicans* e *S. cerevisiae*. Em testes de avaliação da atividade alelopática, pôde se verificar que a fração hexânica possui compostos químicos que reduzem a germinação de cebola e a fração AcOEt, de alface e cebola. Nos testes de avaliação do crescimento, a fração AcOEt inibiu a raiz primária de alface e cebola e o hipocótilo de cebola, enquanto que a fração hexânica inibiu a raiz primária e o coleótilo de cebola.

## ABSTRACT

This work describes the identification and quantification of compounds of the essential oil of the *Croton urucurana*'s stem bark, and compounds isolated in the fractions of the crude extract of *M. vacciniifolia*, as well the quantification amount of total phenols and flavonoids of this extract. Describes biological activities presented by the two species, as, antimicrobial, antioxidant, cytotoxic and allelopathic. In *Croton urucurana*'s stem barks essential oil, borneol, bornyl acetate, o-cymene, terpineol and 1,8-cineole were the main monoterpenoids identified. The analysis also showed that the essential oil is constituted by a high proportion of sesquiterpenoids, mainly sesquicineole, 1-isopropyl-7-methyl-4-methylene-1,3,4,5,6,8-hexahydro-2H-naphthalen-4a-ol,  $\gamma$ -gurjunene epoxide,  $\alpha$ -bisabolol, elemenone and  $\alpha$ -eudesmol. The majoritary sesquiterpenoid 1-isopropyl-7-methyl-4-methylene-1,3,4,5,6,8-hexahydro-2H-naphthalen-4a-ol was purified by preparative thin layer chromatography procedures on silicagel and its structure was established on the basis of the  $^1\text{H}$  –and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra. The essential oil of *C. urucurana*'s stem bark exhibited antioxidant activity in the free-radical DPPH test. It was submitted to preparative TLC, affording the fraction that is responsible for the antioxidant activity in the oil. After isolation, this fraction was analyzed by GC-MS for identification and quantification of a total of the 21 major components, being  $\alpha$ -bisabolol,  $\alpha$ -eudesmol and guaicol the main compounds identified in that antioxidant material. *Croton urucurana*'s stem barks essential oil has also inhibited the growth of 10 microorganisms evaluated in biological tests. The same essential oil, as well as the sesquiterpenoid isolated from this, presented strong cytotoxic activity on the cells of breast carcinoma MCF-7, having potential for therapeutical use. Studies carried through with the crude etanolic extract of *Microgramma vacciniifolia* lead to the isolation and the identification of 5 components of the hexane fraction:  $\beta$ - sitosterol, hopan-22-ol and a mixture

of long-chain acids and esters: octadecanoic acid, ethyl oleate and ethyl 15-methylheptadecanoate. The AcOEt fraction was submitted to analyse by HPLC-DRD in order to determine its chromatographic profile. Spectrophotometric assays revealed that the AcOEt fraction of the crude ethanolic extract of *M. vacciniifolia* is rich in phenolic substances and flavonoids. In the tests for the evaluation of the antioxidant activity against the free-radical DPPH, it was possible to verify that this fraction is a promising source of materials with antioxidant activity. In tests for the evaluation of the antifungal activity, *M. vacciniifolia*'s hexane fraction was the most active, having inhibited the growth of *C. albicans* and *S. cerevisiae*. In tests for the evaluation of the allelopathical potentials, it could be verified that the hexane fraction contains chemical components that inhibit the germination of onion and the AcOEt fraction, inhibited lettuce and onion. In the growth evaluation tests, *M. vacciniifolia*'s AcOEt fraction inhibited the primary root of lettuce and onion, and onion's shoot growth. The hexane fraction inhibited onion's primary root and its shoot growth.

# 1 INTRODUÇÃO

Os Estados de Mato Grosso do Sul e Mato Grosso compreendem parte do Pantanal mato-grossense, que constitui uma planície de baixa altitude englobando uma área de aproximadamente 140.000 km<sup>2</sup> no território brasileiro, e mais cerca de 300.000 km<sup>2</sup> no vizinho Chaco (Bolívia) (PARANHOS F<sup>o</sup>, 2000; PCBAP, 1997). A região do Pantanal é caracterizada por uma dinâmica ambiental particular. O regime das cheias faz com que o solo seja fertilizado a cada ano por sedimentos aluviais que contêm substâncias orgânicas e sais solúveis. A área se constitui em um ecossistema altamente especializado, em que vegetais animais e microorganismos se adaptaram a condições ambientais únicas, por meio de mecanismos que incluem a produção de metabólitos secundários, alvo do presente projeto de pesquisa (PARANHOS F<sup>o</sup>, 2000; POTT & POTT, 1994).

O reconhecimento das propriedades biológicas de ampla variedade de produtos naturais tem alimentado uma busca intensa por novos fármacos, antibióticos, inseticidas e herbicidas. A atividade de aleloquímicos, por exemplo, tem um grande potencial na produção de herbicidas naturais (DUKE *et al.*, 2000 *apud* KATO –NOGUCHI, 2002).

Plantas medicinais contêm princípios ativos que durante anos foram explorados na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças (ADEBANJO *et al.*, 1983) algumas delas possuem propriedades antimicrobianas (SOKMEN *et al.*, 1999; KELMANSON *et al.*, 2000; SRINIVASAN *et al.*, 2001). Estas ervas medicinais constituem-se por compostos indispensáveis na medicina tradicional praticada pelo mundo todo devido ao acesso fácil e a experiência ancestral (MARTIN-BETTOLO, 1980).

Produtos naturais derivados de vegetais, como os flavonóides, (PIETTA *et al.*, 2000), terpenos (GIULIA *et al.*, 1999), alcalóides (KEITH *et al.*, 1990) etc. têm recebido considerável atenção em anos recentes devidos suas diversas propriedades farmacológicas, incluindo efeitos citotóxicos e preventivos ao câncer (ROJA & HEBLE, 1994).

O estudo das propriedades antioxidantes de produtos obtidos a partir de vegetais é relativamente recente, sendo que todos os grandes grupos taxonômicos vegetais avaliados (algas, briófitas, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas) têm rendido a

obtenção de materiais com atividades antioxidantes. Os flavonóides constituem o grupo mais significativo de agentes antioxidantes de origem vegetal. Dentre estes, a quercetina e a catequina têm sido as moléculas mais estudadas (HARBONE *et al.*, 1986 *apud* PIETTA, 2000).

O Pantanal, o Cerrado e outras formações vegetais que ocorrem em Mato Grosso do Sul representam um grande potencial de exploração para a obtenção de produtos vegetais úteis, como tem sido destacado na literatura (ALMEIDA *et al.*, 1998; AVIDOS & FERREIRA, 2000; POTT & POTT, 1994). Neste contexto, estes biomas podem ser considerados possíveis fontes para a obtenção de compostos com atividades biológicas a partir de vegetais que aqui florescem.

### **1.1 A Família Euphorbiaceae**

A família Euphorbiaceae compreende aproximadamente 290 gêneros e 7.500 espécies distribuídas em todas regiões tropicais e subtropicais do globo, principalmente na América e na África. No Brasil, ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies difundidas em todos os tipos de vegetação (BARROSO, 1984).

São plantas de hábito bastante variado, desde ervas, subarbustos, árvores até trepadeiras, com folhas inteiras ou partidas, em geral com estípulas, latescentes ou não. Esta família possui espécies com grande interesse comercial como, por exemplo, a mamona e o tungue, que produzem óleo de baixo ponto de congelamento, usados em certos tipos de lubrificações. São desta família, ainda, a seringueira e a mandioca (JOLY, 1993). Atualmente, algumas plantas desta família têm despertado interesse pelo seu potencial moluscicida (agentes que exterminam moluscos vetores da esquistossomose). Outro interesse que leva ao estudo desta família é a presença de compostos químicos chamados diterpenóides, os quais mostram atividades promotoras de tumor. Vários outros terpenóides também são encontrados no látex das Euphorbiaceae, bem como em diferentes partes das plantas (EVANS, 1996).

### 1.1.1 O Gênero *Croton*

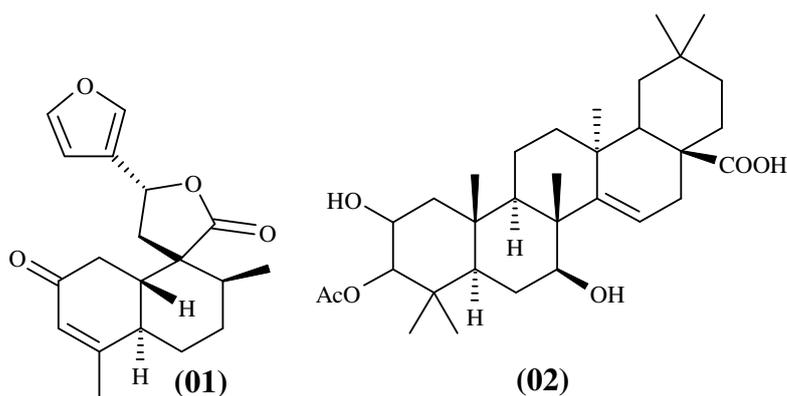
*Croton* é um dos maiores gêneros de plantas, com aproximadamente 1.300 espécies de ervas, arbustos e árvores ecologicamente proeminentes da vegetação secundária nos trópicos e subtropicais do mundo (WEBSTER, 1993). O gênero *Croton* é rico em constituintes com atividades biológicas, principalmente diterpenóides tais como ésteres de forbol, clerodanos, labdanos, cauranos, traquilobanos, pimaranos, etc. (BLOCK *et al.*, 2004). O gênero *Croton* também é rico em alcalóides biologicamente ativos (AMARAL *et al.*, 1998; MILANOWSKI *et al.*, 2002). Diversas espécies do gênero são aromáticas, indicando a presença de constituintes voláteis no óleo essencial (OLIVEIRA *et al.*, 2001; LOPES *et al.*, 2000). Como a maioria das Euphorbiaceae, as espécies do gênero *Croton* podem conter o látex, que é de coloração vermelha em algumas espécies, uma característica geralmente associada a propriedades medicinais (SANDOVAL *et al.*, 2002; RISCO *et al.*, 2003).

### 1.1.2 Principais Metabólitos de Ocorrência em Algumas Espécies de *Croton* e Usos Tradicionais na América do Sul

A química do gênero *Croton* é consideravelmente diversificada. Terpenóides são os metabólitos secundários predominantes, principalmente diterpenóides pertencentes aos esqueletos do tipo cembrano, clerodano, neoclerodano, halimano, isopimarano, caurano, secocaurano, labdano, forbol e traquilobano. Os triterpenóides pentacíclicos ou esteroidais são frequentemente relatados para as espécies de *Croton*. Óleos voláteis contendo mono-e sesquiterpenóides e, às vezes, também os compostos derivados do chiquimato, não são raros no gênero. Diversas espécies foram relatadas como fontes de classes diferentes de alcalóides, um fato que realçou consideravelmente a importância do gênero sob o ponto de vista medicinal. As substâncias fenólicas são frequentemente relatadas, dentre as quais os flavonóides, os lignóides e as proantocianidinas predominam (SALATINO, SALATINO & NEGRI, 2007).

### 1.1.2.1 *Croton cajucara* BENTH

*Croton cajucara*, comumente conhecida como “sacacá”, na região Amazônica do Brasil, é uma tradicional planta medicinal, suas folhas e a casca do caule são usadas na formulação de chás ou pílulas para o tratamento da diabetes, do colesterol alto e dos distúrbios hepáticos e gastrintestinais (CAMPOS *et al.*, 2002). A análise fitoquímica dos extratos brutos revelou a presença de diversos terpenóides tais como t-crotonina, t-dehidrocrotonina **(01)**, cajucarina A, cajucarina B, cajucarina- $\beta$ , cajucarinolídeo (diterpenóides nor-clerodânicos), a sacarina (diterpenóide furânico) e o ácido acetil aleuritólico **(02)** (triterpenóide) (MACIEL, 1998; MACIEL *et al.*, 2000). *C. cajucara*, é conhecida por conter sesquiterpenóides (HIRUMA-LIMA *et al.*, 1999), embora se saiba que é rico no monoterpene linalool (LOPES *et al.*, 2000; ROSA *et al.*, 2003; ALVIANO *et al.*, 2005).



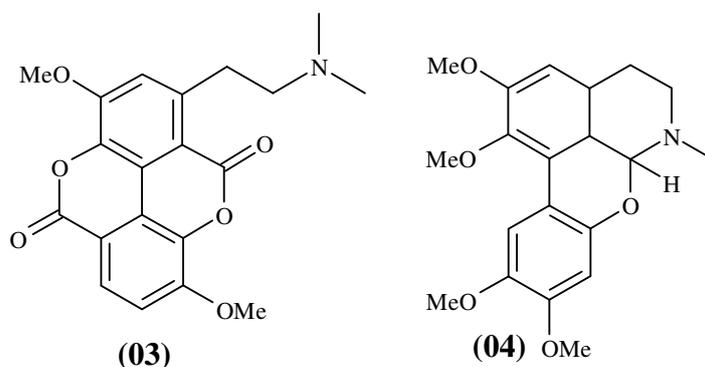
### 1.1.2.2 *Croton eluteria* BENNETT

O casca amarga da árvore sul-americana *C. eluteria*, conhecida como “Cascarilla”, foi muito utilizada na medicina popular tradicional para substituir a casca medicinal conhecida como Cinchona ou Cáscara. Atualmente seu uso principal é como aromatizante, sendo que a fragrância e o gosto amargo lhe tornaram atraente como flavorizante para licores. A investigação química da “Cascarilla” começou ainda em 1845, quando seu metabólito secundário principal, o diterpenóide clerodânico cascarilina, foi isolado (APPENDINO *et al.*, 2003). Da casca do caule de *C. eluteria* foram isolados a cascarilina obtida anteriormente, cascarilona, as cascarilinas A-D (VIGOR *et al.*, 2001) cascarilinas E-I, cascariladiona, eluterina K e pseudoeluterina B (VIGOR *et al.*, 2002).

FATTORUSSO *et al.*, (2002) isolaram dez clerodanos novos (eluterinas A-J) de *C. eluteria*.

### 1.1.2.3 *Croton lechleri* L.

*C. lechleri* está entre as diversas espécies de *Croton* usada como purgativo, tônico e possui uma longa história de uso medicinal entre povos das florestas tropicais sul-americanas. É uma árvore pequena de crescimento rápido, extensamente distribuída na Amazônia superior e nos vales do Equador e do Peru. Sua casca, quando lascada, libera uma seiva vermelha altamente adstringente, usada para tratar feridas acelerando a cicatrização e protegendo as lesões de infecções (CAI *et al.*, 1991; CAI *et al.*, 1993a; CAI *et al.*, 1993b). Dentre os clerodanos que foram obtidos a partir das cascas de *C. Lechleri* estão: crolequinol e ácido crolequínico (CAI *et al.*, 1991) e as lactonas Korberina A e Korberina B (CAI *et al.*, 1993a). O alcalóide taspina (**03**) foi encontrado no látex vermelho de *C. Lechleri* (VAISBERG *et al.*, 1989). Das folhas de *C. lecheri* outros alcalóides foram obtidos, como a glaucina (**04**), isoboldina, magnoflorina, norisoboldina, taliporfina (MILANOWSKI *et al.*, 2002) e sinoacutina (CARLIN *et al.*, 1996).



### 1.1.2.4 *Croton celtidifolius* BAILL

Conhecido como “sangue-de-adave”, *C. celtidifolius* é uma árvore encontrada na floresta atlântica do sul do Brasil, principalmente em Santa Catarina. Sua casca e a infusão de suas folhas têm sido popularmente usadas para o tratamento de doenças inflamatórias, leucemia, úlceras e reumatismo (NARDI, *et al.*, 2003). Os alcalóides isoboldina e laudanina foram encontrados no extrato etanólico das folhas e dos galhos de *C. celtidifolius* (AMARAL, BARNES, & RODERICK, 1997). A partir do extrato bruto foram obtidas:

catequina-(4- $\alpha$ →8)-catequina e galocatequina-(4- $\alpha$ →8)-catequina (DALBO *et al.*, 2005). Também foram isolados da espécie: 1L-1-O-metil-mio-inositol, neo-inositol, e sitosterol (MUKHERJEE & AXT, 1984).

#### 1.1.2.5 *Croton malambo* KARST

*C. malambo*, uma árvore pequena que cresce na Venezuela ocidental e no norte da Colômbia, é conhecida como “palomatias” e “torco”. A infusão da casca é usada na medicina tradicional para o tratamento do diabetes, diarreia, reumatismo, úlcera gástrica e como agente anti-inflamatório e analgésico (SUÁREZ *et al.*, 2003). O óleo volátil de *C. malambo* é composto majoritariamente por metileugenol, metiliseugenol, elemicina, isoelemicina e  $\delta$ -cadinol (SUÁREZ *et al.*, 2005).

#### 1.1.2.6 *Croton nepetaefolius* BAILL

*Croton nepetaefolius*, conhecido popularmente como “marmeleiro-vermelho”, é uma planta aromática nativa do nordeste Brasil, é usada como calmante estomacal e para o tratamento de cólicas intestinais (MOURA *et al.*, 1990). Infusões ou decocções da casca ou folhas são comumente usadas por suas propriedades antiespasmódicas, para aliviar a flatulência e aumentar o apetite (LAHLOU, LEAL-CARDOSO & MAGALHÃES, 2000). O óleo essencial das cascas do caule contém monoterpenos (1,8-cineol e terpineol), fenilpropanóides (como o metileugenol) e a xantoxilina acetofenona. (MAGALHÃES *et al.*, 1998).

#### 1.1.2.7 *Croton palanostigma* KLOTZCH

É uma das plantas medicinais mais extensamente utilizadas nos trópicos da América do Sul. O látex vermelho da casca é usado como um cicatrizante de feridas, no tratamento de úlceras gástricas e inflamação intestinal (MILLER *et al.*, 2000). Foi encontrada em *C. palanostigma*, a lignana dihidrobenzenofurânica 3',4-O-dimetilcedrusina (PIETERS, *et al.*, 1993).

#### 1.1.2.8 *Croton schiedeanus* SCHLECHT

*C. schiedeanus*, é uma árvore nativa da Colômbia, sendo particularmente difundida nas regiões Amazônicas e da Cundinamarca, onde é conhecida como “Almizclillo”. Esta é uma espécie usada na medicina tradicional colombiana para o tratamento de hipertensão (GUERRERO *et al.*, 2001; GUERRERO *et al.*, 2002). Das raízes desta espécie PUEBLA *et al.* (2003), e GUERRERO *et al.* (2004), isolaram cis- e transdehidrocrotonina e os novos neo-clerodanos 5 $\beta$ -hidroxi-cis-dehidrocrotonina e (12R) - 12-hidroxicascarillona. Da fração ácida do extrato das raízes de *C. schiedeanus* dois cis-clerodanos novos: (-)-metil-16-hidroxi-19-nor-2-oxo-cis-cleroda-3,13-dien-15,16-olido-20-oate e (+)-15-metoxifloridolideo foram encontrados.

#### 1.1.2.9 *Croton zehntneri* PAX et. HOFFM

*C. zehntneri* é uma planta aromática nativa do nordeste do Brasil onde é popularmente chamada de “canela-de-cunhã” e usada na medicina tradicional principalmente como sedativo, estimulador de apetite, anti-anorexígeno e para o alívio de distúrbios gastrintestinais; suas cascas e folhas são usadas como adoçantes em alimentos e bebidas (COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 1997; COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 1998). O óleo essencial das sementes de *C. zehntneri* é composto principalmente por fenilpropanóides, tais como o anetol, o metileugenol e o estragol (OLIVEIRA *et al.*, 2001; BATATINHA, SOUZA-SPINOSA & BERNARDI, 1995).

#### 1.1.2.10 *Croton urucurana* BAILL.

*C. urucurana* é considerada uma espécie típica na regeneração da mata ciliar, destacando-se como espécie pioneira, que contribui melhorando as condições do solo para que outras espécies possam colonizar esse ambiente (PIRES *et al.*, 2004). Essa espécie, conhecida popularmente por “urucurana”, “sangra-d’água”, “sangue-de-drago” e “capixingui”, tem hábito arbóreo e é característica do domínio da floresta estacional semidecidual das bacias dos rios Paraná e Uruguai, onde apresenta larga, porém com descontínua distribuição (ASSAD-LUDEWIGS, 1989). Ocorre na Bahia, Rio de Janeiro,

Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, em matas ciliares de várias formações florestais (PIRES *et al.*, 2004).

Além dessas características, *C. urucurana* é uma planta que desperta interesse farmacológico por apresentar atividade antibacteriana e interesse industrial, por ser apícola, rica em substâncias tanóides. A sua madeira, por ser muito leve, é utilizada na confecção de bóias para redes de pesca (PIRES *et al.*, 2004). Estudos químicos realizados com as cascas do caule *C. urucurana* permitiram o isolamento de sonderianina, 15,16-epóxi-3,13(16)-clerodatrien-2-ona, 12-epi-metil-barbascoato, ácido acetil aleuritólico, estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, campesterol e  $\beta$ -sitosterol-*O*-glucosídeo, catequina e galocatequina (PERES *et al.*, 1997; PERES *et al.*, 1998). *C. urucurana* também contém proantocianidinas e catequinas em seu látex vermelho (GURGEL *et al.*, 2001). Furanoarabinogalactana, um polissacarídeo foi o composto majoritário encontrado no látex de *C. urucurana* (MILO *et al.*, 2002).

## 1.2 Pteridófitas

A classificação das pteridófitas inclui cerca de 9000 espécies, 240 gêneros e 33 famílias. Pteridófitas são mais comuns em lugares úmidos e nas montanhas tropicais e subtropicais de clima moderado. No sudeste do Brasil, de Minas Gerais e sul do Espírito Santo ao Rio Grande do Sul, há cerca de 600 espécies destes vegetais. Muitas destas ocorrem na úmida Serra do Mar, onde há muitas *Trichipteris*, *Lindsaea*, *Elaphoglossum*, *Asplenium*, e *Polypodiaceae* (TRYON & TRYON, 1982).

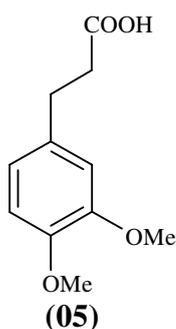
As pteridófitas são vegetais pertencentes à divisão das traqueófitas, pois foram os primeiros vegetais a apresentarem vasos condutores, do tipo xilema e floema, para condução de seiva bruta e elaborada, respectivamente, além de serem os primeiros vegetais a conquistarem o ambiente terrestre, pelo fato de terem um mecanismo mais eficiente de condução de seiva bruta e elaborada. Apresentam o corpo na forma de gomo, com raiz, caule e folhas verdadeiros, e podem ser classificadas como plantas criptógamas, por não produzirem flores. São encontradas normalmente em locais sombrios, úmidos e em ambientes de florestas, vivendo como plantas epífitas (RAVEN *et al.*, 2001).

Exibem um forte mecanismo de dominância nas áreas onde crescem, formando associações quase puras, onde poucas espécies coexistem. Esse mecanismo de dominância estende-se desde os trópicos até as margens de florestas boreais (QUEIROZ, 1994).

### 1.2.1 Alguns Metabólitos de Ocorrência Genérica em Pteridófitas

Segundo OGURA (1972), a presença de compostos fenólicos, fenilpropanóides, como o ácido ferúlico **(05)**, é uma característica marcante nas pteridófitas.

Estes compostos conferem uma coloração marrom, principalmente aos tecidos de sustentação e ao parênquima próximo aos feixes.



Evolutivamente, a presença de compostos fenólicos em pteridófitas, se justifica pela adaptação a fatores climáticos a que esses vegetais inferiores tiveram que se submeter. A adaptação ao ambiente terrestre, rico em oxigênio, se comparado ao ambiente aquático, levou à formação de estruturas capazes de resistirem a maiores pressões parciais de oxigênio. A passagem do ambiente aquático para o terrestre acarretou, também, na superação da gravidade, já que, na água, o empuxo faz com que o vegetal não necessite de estruturas de sustentação mais elaboradas, o que não acontece no ambiente terrestre.

Portanto, no momento da migração para o ambiente terrestre surgiu nas pteridófitas a associação de compostos fenólicos formando ligninas, que compõem basicamente, os sistemas de sustentação dos vegetais. A mudança de ambiente também fez com que esses vegetais fossem mais expostos às radiações ultravioleta, e assim tiveram que comprometer recursos energéticos na elaboração de estruturas capazes de absorver a radiação

ultravioleta, o que não acontecia no meio aquático, onde a água atuava na blindagem a tal radiação. Neste contexto, compostos com estruturas altamente conjugadas foram biossintetizados, tal como flavonóides e carotenóides (GOTTLIEB, 1982; HARBONE, 1988).

### 1.2.2 A Família Polypodiaceae

De acordo com TRYON & TRYON (1982), Polypodiaceae, a maior família de samambaias, é composta de cerca de 170 gêneros e 7000 espécies, de larga distribuição, sobre a maioria das áreas da Terra, especialmente abundante em florestas e áreas úmidas, mas ocorrendo também em quase todas as áreas florísticas, de zonas do deserto a florestas chuvosas e dos trópicos ao ártico ou antártico. A família Polypodiaceae, segundo MORAN (1995), compreende principalmente espécies epífitas, ocasionalmente terrícolas ou rupícolas, é cosmopolita, grande e diversificada.

### 1.2.3 O Gênero *Microgramma*

*Microgramma* é um gênero americano de cerca de 13 espécies, com um deles na África (TRYON & TRYON, 1982). Pertence à família Polypodiaceae e à tribo Polypodieae. É uma epífita em florestas pantanosas, chuvosas e fechadas (frequentemente ao longo de rios e riachos). Também ocorre em florestas secundárias e em moitas, bem como em plantações de café e em cercas vivas. Este gênero é amplamente distribuído nos trópicos americanos, onde ocorre das Tamaulipas no México e no sul da Flórida, até o sul da Catamarca e Buenos Aires, na Argentina. O gênero está centralizado nas cordilheiras dos Andes e em áreas adjacentes na Bacia amazônica, onde ocorrem cerca de 10 espécies. Como uma epífita, *Microgramma* dispõe de raízes superficiais que se espalham pelas cascas das árvores e arbustos e absorvem a matéria orgânica em decomposição disponível (TRYON & TRYON, 1982).

Segundo TRYON & TRYON (1982) esta espécie é sinonímia de *Polypodium vacciniifolium* e *Craspedaria vacciniifolia*.

Possui rizoma longo, ramando sobre galhos de árvores densamente

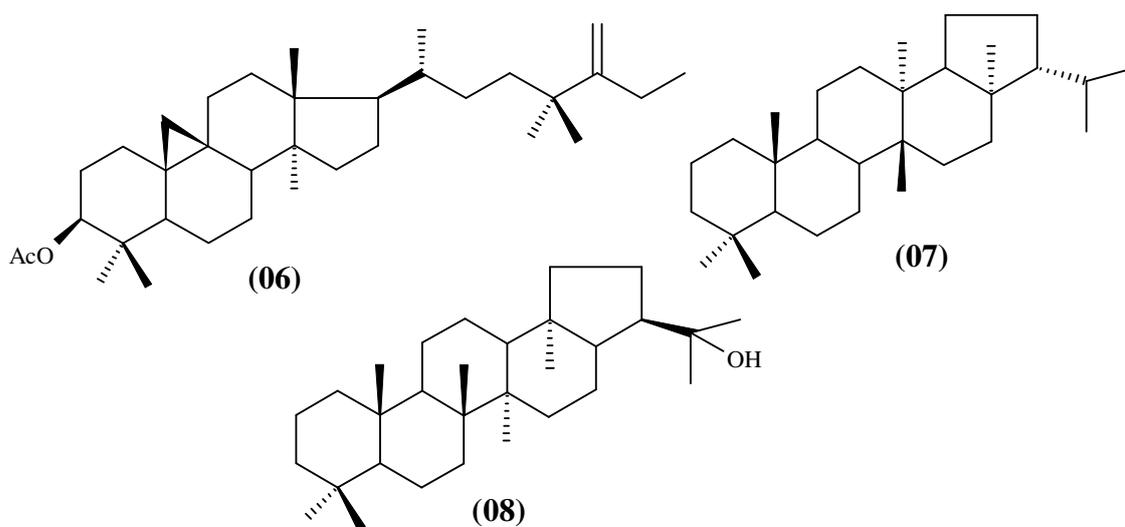
recobertas de escamas rúfulas, com diâmetro variando de 0,2 a 0,3 cm. Apresenta dimorfismo laminar, sendo, contudo sempre inteiras e simples; as estéreis são sésseis, oblongas, ovais ou elípticas, com 1,5 a 3,0 cm de comprimento e 0,8 a 2,0 cm de largura, com a base um pouco cuneiforme, o ápice muito obtuso e apresentando quando jovens, na face interior e no raque, algumas escamas; as férteis são longas e sésseis ou sub-pecioladas, com a base cuneiforme estreita, linear, medindo de 3,0 a 8,0 cm de comprimento, e de 0,4 a 0,6 cm de largura com vênulas anastomosadas. Os soros distribuem-se sobre o ápice de uma vênula livre, incluso na única série de malhas, relativamente grandes, dispostos em uma só fileira; esporos clorofilados, reniformes, granuloso-postulosos (FARIAS, 1994).

SANTOS & SYLVESTRE (2006), descrevem *M. vacciniifolia* como uma epífita reptante e/ou hemicriptófita reptante de distribuição neotropical. Pode ser encontrada como corticícola e/ou rupícola e é facilmente reconhecida por seu caule longo, intensamente revestido por escamas e folhas dimorfas (as estéreis são ovadas e as férteis lanceoladas). Conhecida popularmente como erva-silvina, erva-silveira, erva-tereza, erva-de-lagarto, cipó-cabeludo, cipó-peludo, estanca-sangue ou erva-da-mamãe-oxum, é utilizada como ritualística, cosmética e medicinal. Indicada como poderoso adstringente; recomendada nas hemorragias, expectorações sanguinolentas de tuberculosos, diarréias, disenterias, hematúrias e derramamento de sangue pelo nariz. Utilizada também para o tratamento de cólicas intestinais e hidropsia, também há relatos sobre a atividade cianogênica desta espécie.

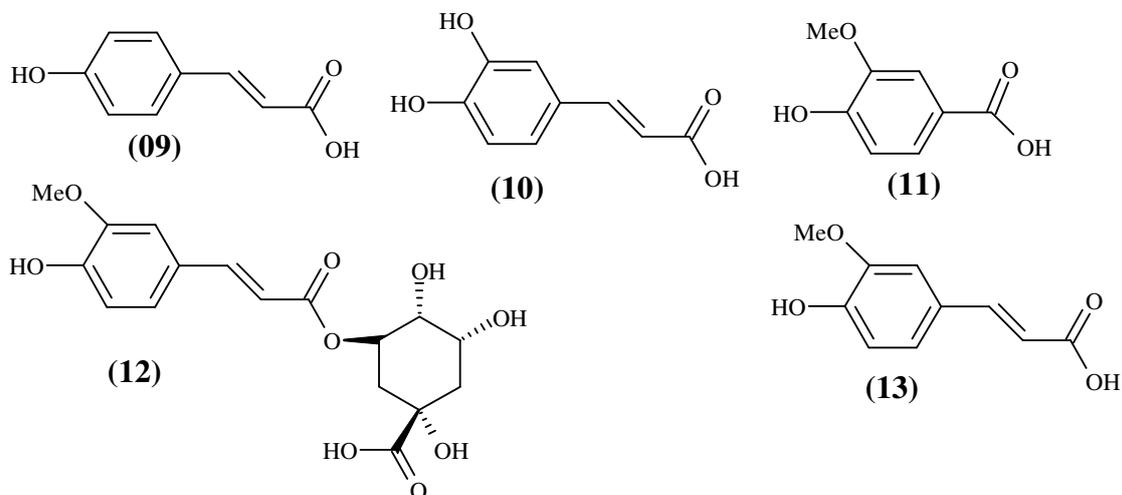
#### 1.2.4 Alguns Compostos Isolados de Espécies do Gênero *Polypodium/Microgramma*

ARAI *et al.* (1991), estudando a composição química de *Polypodium vulgare*, *P. faurei* e *P. virginianum* coletadas no Japão, relatou a presença dos triterpenóides hop-22(29)-eno, isohop-22(29)-eno, hop-17(21)-eno, neohop-13(18)-eno, fern-7-eno, fern-8-eno, fern-9(11)-eno, serrato-14-eno, dammara-18(28),21-dieno, dammara-13(17),21-dieno, eupha-7,21-dieno, dammara-17,21-dieno, polyodatetraeno, onoceranoxídeo, 31-norcicloartanol, cicloartanol, ciclolaudenol, cicloartenol, ciclomargenol, 31-noreucloartanol

acetato, cicloartanil acetato, ciclolaudenil acetato, cicloartenil acetato, ciclomargemil acetato, driocassil acetato, ciclopodomenil acetato, cicloartanona, ciclolaudenona, cicloartenona, ciclomargenona, 21 $\alpha$ H-22-hidroxihoano. Destes, 30 são compostos conhecidos e três são substâncias novas, sendo que o Damara-13(17)-21-dieno **(06)** foi isolado de *Polypodium faurei*, o acetato de ciclopodmenila **(07)** foi isolado de *P. vulgare*, e o composto 21 $\alpha$ H-hopan-22-ol **(08)** foi isolado de *P. virginianum*.



Estudos para determinar a composição química de *Polypodium leucotomus* identificaram como componentes majoritários os compostos ácido p-cumárico **(09)**, ácido caféico **(10)**, ácido vanílico **(11)**, ácido clorogênico **(12)** e ácido ferúlico **(13)** (GOMBAU *et al.*, 2006).



### 1.2.5 Propriedades Medicinais de Algumas Espécies do Gênero *Polypodium/Microgramma*

Um trabalho realizado por SUFFREDINI *et al.* (1999) com *Microgramma squamulosa* (Kaulf.) Sota descreve o estudo da ação antiúlcera deste vegetal, sendo que os testes realizados apresentaram resultados significativos, sugerindo a cura da úlcera pela ação adstringente de taninos presentes no extrato e nas frações, ou a ação sistêmica de flavonóides glicosilados. As amostras foram testadas quanto à presença de alcalóides, antraquinonas, flavonóides, taninos, saponinas e óleo essencial, porém reagiram positivamente somente quanto a presença de taninos e flavonóides.

MIDDELKAMP-HUP *et al.* (2004), investigaram o efeito fotoprotetor contra dano agudo sobre a pele humana induzido pela radiação UV usando um protetor solar de *P. leucotomos* oralmente administrado. Foi demonstrado que *P. leucotomos* atua como um efetivo antioxidante, reduzindo o ânion superóxido, oxigênio, peróxidos de lipídio, e o radical hidroxila e o uso tópico e oral de *P. leucotomos* diminui a queimadura do sol.

ALONSO-LEBRERO *et al.* (2003), relatam o efeito de um extrato hidrofílico de *P. leucotomos* em termos de fotoproteção contra danos celulares induzidos por UV. *P. leucotomos* preservou eficientemente os fibroblastos humanos sobreviventes e restabeleceu a capacidade de proliferação dos mesmos quando as células foram expostas a luz UVA. O tratamento das células com *P. leucotomos* também evitou mudanças morfológicas induzidas por exposição à radiação UV nos fibroblastos humanos. Enfim, os resultados *in vitro* demonstraram um efeito fotoprotetor efetivo de *P. leucotomos* em células humanas e apóiam seu uso no tratamento preventivo de queimaduras solares e patologias da pele associadas com o dano mediado pela radiação UV.

SEMPERE-ORTELLS *et al.* (2002), estudaram o “Anapsos”, que é uma prescrição médica registrada no Ministério de Saúde da Espanha obtida dos rizomas de *P. leucotomus*. O estudo demonstrou o efeito de Anapsos como promotor da proliferação e ativação de linfócitos T e atuação como imuno-modulador. RAYWARD *et al.*, (1997), também relataram o uso empírico do extrato alcoólico de *P. leucotomos* como

imunossupressor para o tratamento de várias doenças auto-imunes.

VASTINGE-TUOMINEN *et al.* (1994), investigaram o efeito de *P. decumanum*, localmente conhecido como “Calaguala”, que tem um uso clinicamente documentado na América do Sul e Espanha no tratamento de psoríase. Um dos mediadores inflamatórios isolado em quantidades altas na pele psoriática é o leucotrieno B4 (LTB4). Calaguala foi testado em um modelo *in vitro* usando leucócitos humanos quanto a sua habilidade em inibir a formação de LTB4. A inibição observada nos experimentos foi atribuída à presença dos ácidos graxos poliinsaturados linoleico, linolênico e ácido aracdônico.

### **1.3 Atividade Biológica**

#### *1.3.1 Considerações sobre Atividade Antioxidante*

Na medida em que avançam os estudos quanto ao papel de agentes oxidantes reativos de oxigênio e de nitrogênio, em processos biológicos, mais efeitos são associados a estas espécies químicas. Um excesso de stress oxidativo pode ocasionar a oxidação de lipídeos e proteínas, que estão associados com mudanças em suas estruturas e funções. As espécies oxidantes também causam danos ao DNA, que podem levar ao desenvolvimento de câncer, doenças cardiovasculares, catarata, desordens neurológicas e problemas pulmonares. Além disso, o envelhecimento precoce também resulta da constante exposição do organismo a espécies químicas oxidantes, com danos cumulativos, durante toda a vida, ao mesmo tempo em que diminui gradativamente a capacidade de reparo e amplia-se a degeneração, causada pela oxidação. Agentes antioxidantes fornecidos ao organismo na forma de aditivos alimentares ou fármacos, incluindo cosméticos, poderiam auxiliar na manutenção do equilíbrio entre oxidação e redução, uma vez que estas substâncias são capazes de remover ou evitar a formação de radicais livres e de espécies reativas, prevenindo a deterioração oxidativa. Por isso, um grande número de estudos tem se dedicado à busca por agentes antioxidantes, a partir de fontes naturais. Tais agentes antioxidantes tornam-se cada vez mais

necessários na prevenção de doenças, uma vez que têm se ampliado as condições ambientais que ocasionam maior exposição das pessoas aos efeitos deletérios dos agentes oxidantes, tais como: intensificação da incidência de radiação ultravioleta devido à destruição da camada de ozônio; poluição da atmosfera com agentes oxidantes como óxidos de nitrogênio e ozônio troposférico, entre outros (HALLIWELL, 1987; YUTING *et al*, 1990; SELLES *et al*, 2002; HANASAKI, OGAWA & FUKUI, 1994; GORDON, 1996; DURAK *et al*, 2004; PAIVA *et al*, 2004; VAYA & AVIRAM, 2004; WONG *et al.*, 2006).

Um outro dado relevante é que estudos científicos têm revelado que os produtos sintéticos BHA (2-terbutil-4-metóxi fenol), e BHT (2,6-bis (1,1-dimetil-etil)-4-metil fenol), tradicionalmente empregados como antioxidantes em produtos contendo óleos, apresentam propriedades tóxicas e inclusive, carcinogênicas, o que tem aumentado a demanda por agentes antioxidantes que não apresentem efeitos tóxicos (LEDERER, 1990; ASSIMOPOULOU, BOSKOU & PAPAGEORGIOU, 2004; DANILENKO & STUDZINSKI, 2004).

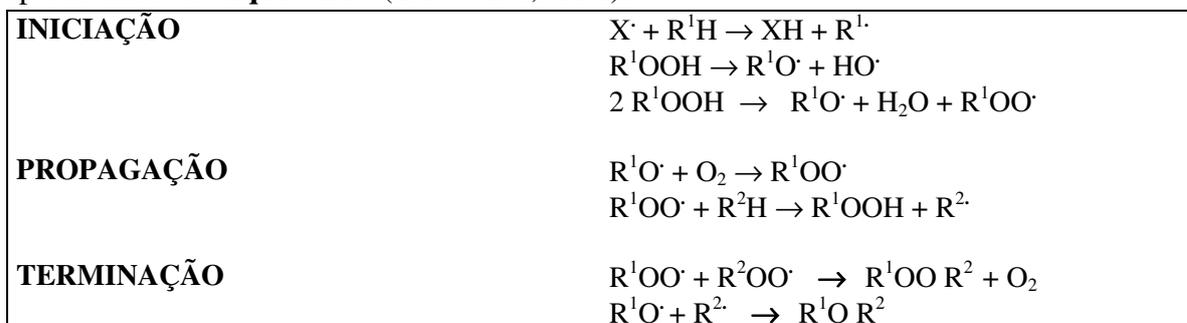
#### *1.3.1.1 Oxidações Radicalares em Sistemas Biológicos*

O oxigênio molecular constitui, atualmente, cerca de 21% do ar atmosférico, sendo que as oxidações biológicas realizadas através do oxigênio molecular representam a principal fonte de energia utilizada pela grande maioria das plantas e animais. Tanto através da produção biológica de oxigênio pelo processo fotossintético, como através da utilização do oxigênio pela respiração mitocondrial em plantas e animais, as reações bioquímicas se desenvolvem de tal maneira que geram produtos secundários, na ordem de 2% com relação aos produtos finais, H<sub>2</sub>O e CO<sub>2</sub>. Estes intermediários da redução parcial do oxigênio são conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO), e possuem atividades oxidantes mais acentuadas do que o oxigênio molecular. Mais recentemente ficou evidenciada a contribuição deletéria de espécies reativas de nitrogênio (ERN) nos sistemas biológicos, pela ação do monóxido de nitrogênio ou óxido nítrico (NO), mas principalmente a partir da sua combinação com o íon superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) formando o peroxinitrito (ONOO<sup>•</sup>), um agente

oxidante bastante reativo (WILHELM FILHO, SILVA & BOVERIS, 2001).

Embora a geração de espécies reativas de oxigênio seja um mecanismo de defesa importante em alguns casos, em concentrações excessivas ou em localização incorreta, esta pode causar degeneração dos tecidos e outros efeitos danosos. Exemplos dos efeitos benéficos de espécies reativas de oxigênio incluem a produção de  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , bem como ácido hipocloroso por células fagocíticas ativadas (que incluem monócitos, neutrófilos, eosinófilos e a maioria dos macrófagos), com o objetivo de matar algumas linhagens de bactérias. Além disso, a produção de pequenas quantidades de  $O_2^-$ , pelo endotélio vascular, pode resultar na regulação do tônus vascular (GORDON, 1996).

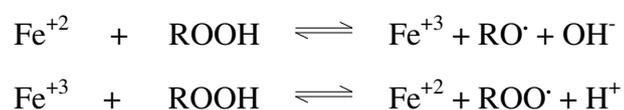
Os lipídeos presentes em sistemas biológicos compreendem triacilgliceróis, fosfolipídeos, diacilgliceróis, esteróis, ésteres esterfílicos, colesterol, tocoferóis entre outros. Enquanto os triacilgliceróis são predominantes em tecidos de reserva de energia, nas membranas predominam os fosfolipídeos. Durante a oxidação de lipídeos ocorre um período de indução, durante o qual a oxidação é lenta. Este período de indução é afetado pela presença de agentes antioxidantes, como os tocoferóis, pró-oxidantes como os íons de metais de transição e, ainda, pela estrutura dos componentes do ácido graxo, sendo que os ácidos graxos poliinsaturados são oxidados muito mais rapidamente do que os monoinsaturados. Os hidroperóxidos (ROOH) se acumulam durante o período de indução, sendo que os produtos da decomposição dos hidroperóxidos, como aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos são formados rapidamente depois do término desta etapa. As características desta reação têm sido extensivamente estudadas e o mecanismo proposto para a deterioração dos lipídeos é apresentado no **Esquema 01** (GORDON, 1996).



**Esquema 01** – Mecanismo da oxidação de lipídeos (X é um radical iniciador;  $R^1H$  e  $R^2H$  são moléculas de lipídeos).

As Espécies Reativas de Oxigênio-EROs incluem o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) os radicais alcoxila ( $ROO^{\cdot}$ ); os radicais peroxila ( $ROO^{\cdot}$ ); e o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ). O radical hidroxila é o mais reativo sobre os tecidos biológicos, e acredita-se que o mesmo seja importante como iniciador da peroxidação de lipídeos. As constantes de velocidade para as reações do radical hidroxila com ácidos graxos,  $\alpha$ -tocoferol e ascorbato são da ordem de  $10^9 - 10^{10} M^{-1}.s^{-1}$ . A alta reatividade do radical hidroxila faz com que o mesmo não seja seletivo, reagindo rapidamente, a pequenas distâncias a partir do local de sua formação. Os radicais alcoxila são de duas a três ordens de magnitude menos reativos do que a radical hidroxila sendo, por isso, mais seletivos. Por outro lado, estes radicais decaem rapidamente por cisão  $\beta$ , com uma constante de velocidade da ordem de  $10^6 - 10^7.s^{-1}$ , o que limita o seu potencial para danificar membranas e tecidos biológicos. Os radicais peroxila são muito menos reativos do que os anteriores, portanto, agem mais seletivamente. A reação de radicais peroxila com  $\alpha$ -tocoferol e ascorbato, têm constantes de velocidade de  $5,7 \times 10^6$  e  $2,2 \times 10^6 M^{-1}$  respectivamente. Já os radicais superóxido não reagem com ácidos graxos, mas sim, com  $\alpha$ -tocoferol e ascorbato, com constantes de velocidade de  $1,0 \times 10^4$  e  $5,0 \times 10^4 M^{-1}.s^{-1}$ , respectivamente. É importante enfatizar que o radical  $HO^{\cdot}$  é capaz de oxidar todos os componentes do DNA, o  $O_2^{\cdot -}$  ataca preferencialmente a guanina, enquanto o  $H_2O_2$  e o  $O_2^{\cdot}$  não atacam o DNA (GORDON, 1996; WILHELM FILHO, SILVA & BOVERIS, 2001).

A decomposição de hidroperóxidos é sensível a traços de íons metálicos, tendo esta reação de iniciação uma baixa energia de ativação (**Esquema 02**).



**Esquema 02** – Decomposição de hidroperóxidos a traços do íon férrico

Agentes quelantes, como o ácido cítrico, aumentam intensamente o período de indução descrito no **Esquema 1**, ao formarem complexos com íons metálicos pró-oxidantes (GORDON, 1996).

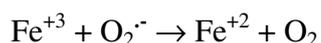
Embora o íon superóxido seja relativamente inerte, este atua como precursor

de espécies oxigenadas mais reativas. Por exemplo, a enzima superóxido desmutase (SOD) catalisa a conversão de  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$ . O  $H_2O_2$  formado não reage diretamente com um lipídeo insaturado, mas na presença de íon  $Fe^{+2}$  pode ser convertido no radical hidroxila, extremamente reativo, sendo esta reação conhecida como Reação de Fenton:



### Esquema 03 – Reação de Fenton

O íon  $Fe^{+2}$ , por sua vez, pode ser originado a partir da redução de  $Fe^{+3}$  na presença de  $O_2^{\cdot-}$  (GORDON, 1996):



### Esquema 04 – Reação de redução do íon $Fe^{+3}$ na presença de $O_2^{\cdot-}$

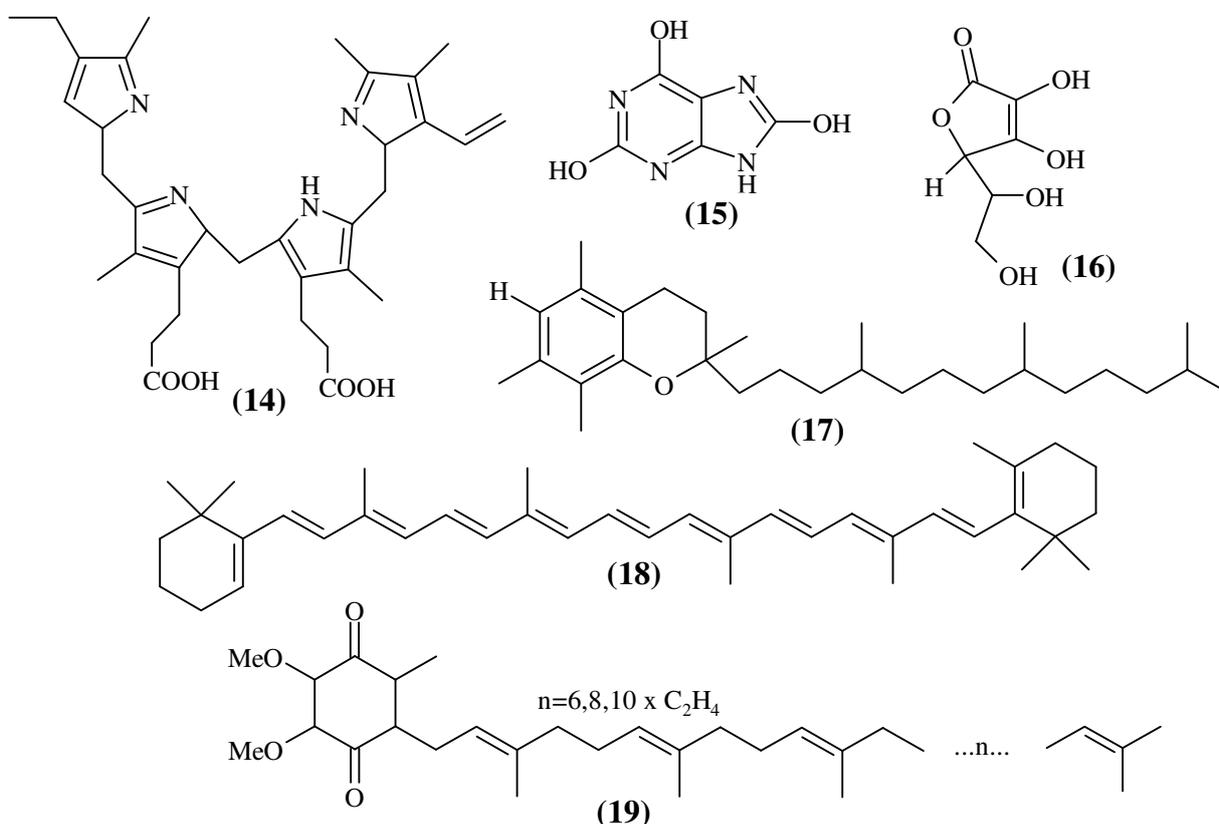
As células dispõem de diversos mecanismos de defesa frente ao dano oxidativo, que podem atuar via:

- Prevenção à formação de radicais livres;
- Remoção de radicais livres antes de ocorrer dano a lipídeos, proteínas ou ácidos nucleicos;
- Reparo do dano oxidativo;
- Eliminação de moléculas danificadas;
- Prevenção a mutações devidas a moléculas danificadas.

No interior das células, as enzimas superóxido desmutase promovem ativamente a conversão do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio. O peróxido de hidrogênio formado é removido pelas enzimas catalase e glutathione peroxidase. Uma pequena quantidade de íon férrico está presente nas células, onde atua na síntese do DNA e das proteínas contendo ferro. Portanto, a remoção eficiente do peróxido de hidrogênio é essencial para evitar-se que ocorra a Reação de Fenton. Já nos fluidos extracelulares, a complexação de íons ferro e cobre com proteínas, como a transferrina e a lactoferrina, é a

principal estratégia de proteção frente à geração de radicais livres (GORDON, 1996; VOULDOUKIS *et al*, 2004).

A atividade extracelular da superóxido desmutase é baixa. Pequenas moléculas que capturam radicais livres, sendo facilmente oxidáveis, como bilirubina (**14**), ácido úrico (**15**), glicose e ácido ascórbico (**16**) também são importantes para estabilizar o plasma. Agentes antioxidantes lipofílicos, como o  $\alpha$ -tocoferol (**17**), os carotenóides como o  $\beta$ -caroteno (**18**), o estearato de retinila e a coenzima Q ou ubiquinona (**19**) são os principais agentes antioxidantes na proteção de membranas e lipoproteínas (GORDON, 1996).



### 1.3.1.2 Agentes Antioxidantes de Origem Vegetal

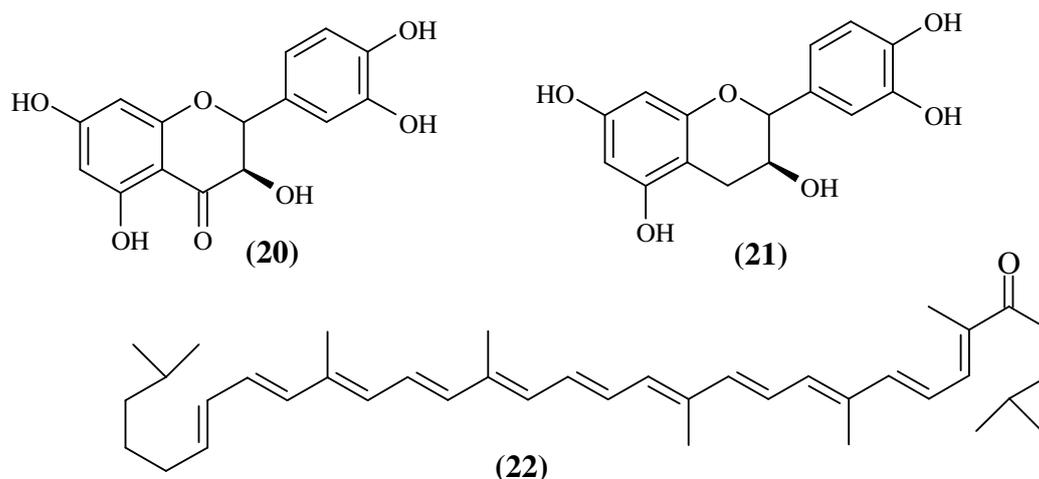
O conhecimento das propriedades antioxidantes de produtos obtidos a partir de vegetais é relativamente recente, tendo-se observado um grande crescimento no número de estudos científicos tratando deste assunto nas últimas décadas, sendo que todos os grandes grupos taxonômicos vegetais avaliados (algas, briófitas, pteridófitas, gimnospermas e

angiospermas) têm rendido a obtenção de materiais com atividades antioxidantes (YOKOZAWA *et al*, 1998; ZUANAZZI, 2000, WILHELM FILHO, SILVA & BOVERIS, 2001; CANELA *et al*, 2002; BALARAMAN, BAFNA & KOLHAPURE, 2004; POUILLAIN, GIRARD-VALENCIENNES & SMADJA, 2004).

No final dos anos 70, a atividade antioxidante de produtos vegetais recebeu grande destaque na imprensa internacional, devido à elucidação do fenômeno conhecido como “paradoxo francês”. Estudos epidemiológicos revelaram que, apesar de consumirem grandes quantidades de gorduras saturadas em sua dieta, os moradores de diversas cidades francesas apresentavam baixa incidência de doenças coronárias. As pesquisas revelaram, então, que os franceses não adoeciam porque consumiam vinhos ricos em flavonóides com propriedades antioxidantes (GORDON, 1996; WILHELM FILHO, SILVA & BOVERIS, 2001).

Os materiais antioxidantes de origem vegetal são de natureza muito variada e os flavonóides constituem o grupo mais significativo, sendo encontrados em formas estruturais muito diversificadas. Dentre estes, a quercetina (**20**) e seus derivados (presente em cebolas, maçãs, vinho tinto, etc) e a catequina (**21**) (encontrada nos chás verde e preto) e seus derivados (como o galato de epigallocatequina), têm sido as moléculas mais estudadas. Flavonóides são formados em plantas a partir dos amino ácidos aromáticos fenilalanina e tirosina, e malonato (HARBONE *et al.*, 1986 *apud* PIETTA, 2000). A estrutura básica de um flavonóide é o núcleo flavana, que consiste de 15 átomos arranjados em três anéis (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), que são nomeados A, B e C. Flavonóides geralmente ocorrem em plantas como derivados glicosilados e contribuem aos tons brilhantes em azul, escarlate e laranja em flores, folhas e frutos (BROULILLARD, 1988 *apud* PIETTA, 2000). Flavonóides atuam como catalisadores da fase luminosa da fotossíntese e/ou como reguladores dos condutores de ferro envolvidos na fosforilação. Também atuam como protetores do stress em células vegetais pela redução de EROs produzidas pelo sistema fotossintético de transporte de elétrons. Além disso, por causa de sua favorável propriedade de absorção de radiação UV, protegem as plantas da radiação do sol e reduzem EROs gerados por exposição à radiação UV (PIETTA *et al*, 2000, HARBONE, 1988, SHIRLEY, 1996, *apud* PIETTA, 2000).

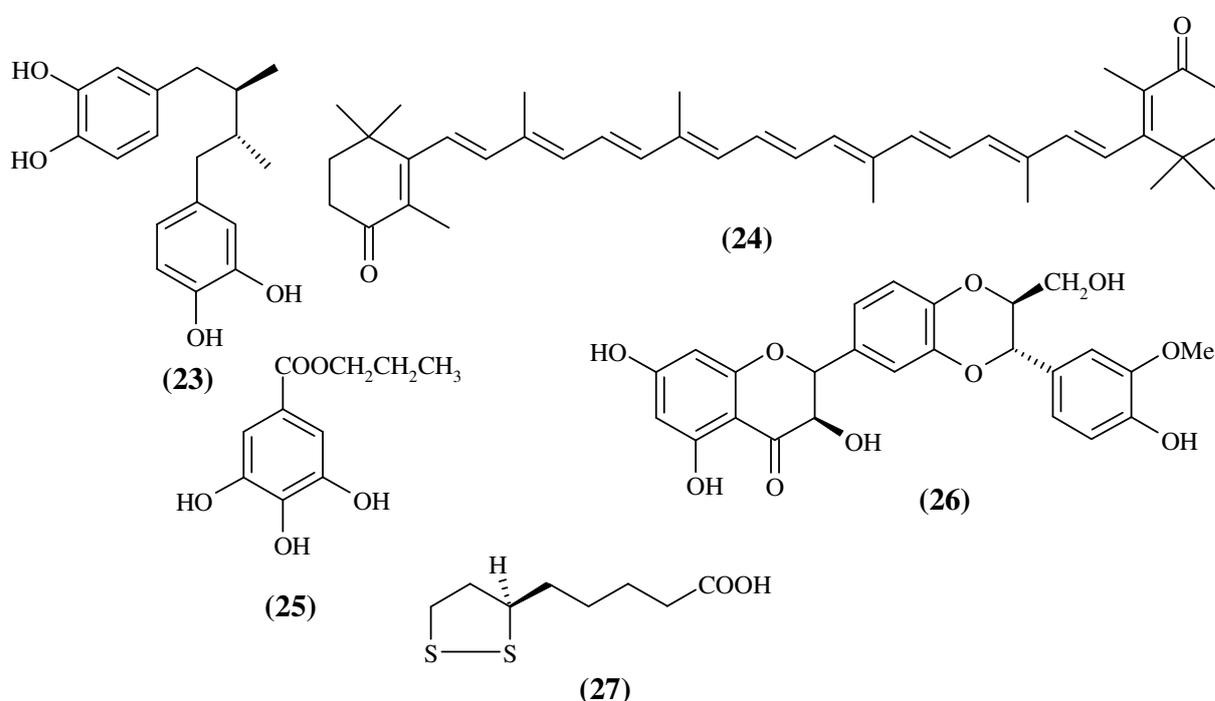
Os carotenóides constituem outro grupo numeroso de metabólitos secundários com atividades antioxidantes relevantes. Terpenóides, cumarinas, saponinas, curcuminas, ácido cafeico e ácido cinâmico também são citados na literatura por apresentarem atividades antioxidantes. Entre os agentes antioxidantes mais empregados comercialmente estão: ácido ascórbico (**16**),  $\alpha$ -tocoferol (**17**) e o licopeno (**22**). É importante destacar, entretanto, que alguns extratos de plantas, bem como certos flavonóides, quando na presença de metais de transição ou de monóxido de nitrogênio, apresentam propriedades pró-oxidantes (RATTY & DAS, 1988; MORA *et al*, 1990; TERAO, PISKULA & YAO, 1994; VINSON *et al*, 1995; WILHELM FILHO, SILVA & BOVERIS, 2001; LEITÃO, LEITÃO & VILEGAS, 2002; RIBEIRO, SILVA & BOLZANI, 2002; ERDOGAN *et al*, 2004; KIOKIAS & GORDON, 2004; FOTI & INGOLD, 2003; PIAO *et al*, 2004; SINGH, CHANDER & CHOPRA, 2004; TROUILLAS *et al*, 2004; SKERGET *et al*, 2005).



Outros exemplos de produtos de origem vegetal que têm sido empregados comercialmente como agentes antioxidantes são: ácido nor-dihidroguaiarético (**23**), uma neolignana obtida a partir de *Larrea Cuneifolia* Cav. (Zygophyllaceae), utilizada em alimentos contendo óleos; cantaxantina (**24**), um carotenóide que atua como agente colorizante de alimentos e medicamentos; galato de propila (**25**), empregado como agente antioxidante em alimentos, óleos, gorduras, emulsões, ceras e até em óleos para transformadores; a mistura de flavonolignanas conhecida como silimarina (constituída, principalmente, pelos isômeros silibina (**26**), silicristina e silidianina) obtida a partir das

sementes de *Silybum maranum*, empregada como fármaco antihepatotóxico, apresentando atividades antioxidante e estabilizante da membrana celular; e ácido tiótico (27) (BUDAVARI, 1989; EVANS, 1996; BARBOSA FILHO, 2000).

Pesquisadores franceses realizaram testes quanto a atividades antioxidantes com extratos polares e apolares de 250 vegetais. Destes, somente os extratos metanólicos de três vegetais (*Hypericum lanceolatum*, *Monarrhenus salicifolius* e *Ocotea obtusata*) exibiram atividades antioxidantes significativas, com relação a antioxidantes-padrão (BHT e ácido ascórbico).

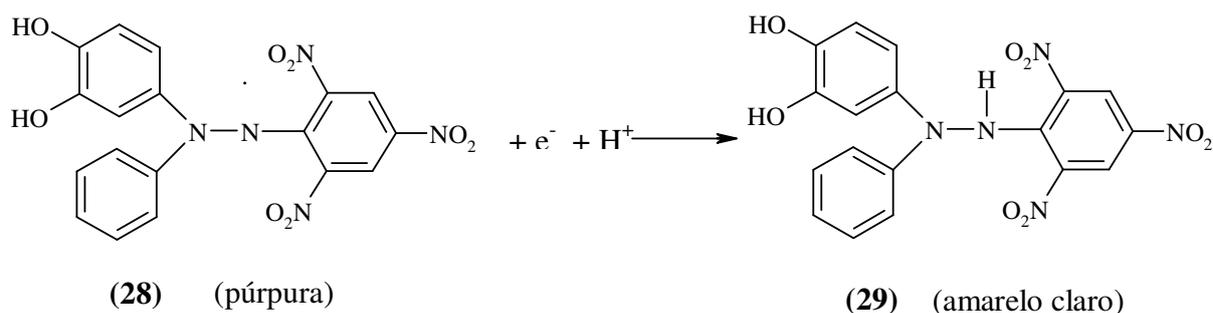


As atividades detectadas foram associadas a substâncias polares encontradas naqueles vegetais, sendo que a partir de *M. salicifolius* foram isolados compostos fenólicos simples, a partir de *O. obtusata*, compostos fenólicos simples e taninos, e a partir de *H. lanceolatu*, flavonóides e taninos (POULLAIN, GIRARD-VALENCIENNES & SMADJA, 2004). No Brasil, há alguns grupos de pesquisa realizando trabalhos visando a avaliação de materiais vegetais quanto a atividades antioxidantes, sendo que a equipe coordenada pela professora Vanderlan S. Bolzani (Instituto de Química de Araraquara/UNESP), tem se destacado, conforme demonstra a produção científica do grupo de pesquisa, relativa ao tema (BOLZANI *et al.*, 2001; BOLZANI *et al.*, 2002; CORSINO *et al.*, 2003; GAMBOA *et al.*,

2003; PAULETTI *et al.*, 2003; JELLER *et al.*, 2004; CARDOSO *et al.*, 2004; CARVALHO *et al.*, 2005).

### 1.3.1.3 Avaliação da Atividade Antioxidante Frente ao Radical Livre DPPH

Na presença de um antioxidante que possa doar um elétron, a cor púrpura, que é típica do radical livre estável 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) (**28**), diminui, e a mudança na cor pode ser visualizada tanto em placas cromatográficas contendo os materiais em análise, quanto por medidas da absorbância a 517 nm, em espectrofotômetro. A forma reduzida do DPPH (**29**) é indicada, em placas cromatográficas, pela formação de halos de cor amarelo claro nas posições onde há substâncias antioxidantes, ao mesmo tempo em que a cor púrpura permanece, no restante da placa.

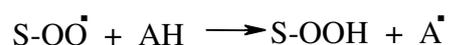


Este teste simples pode fornecer informações quanto à capacidade de um composto em doar um átomo de hidrogênio, quanto ao número de elétrons que uma certa molécula pode doar e quanto ao mecanismo de ação antioxidante. Quando a estrutura química do doador de elétrons não é conhecida (por exemplo, tratando-se de um extrato vegetal), este método pode fornecer dados relativos ao poder redutor da amostra sob análise (ZHUANG, SCHOLZ & PRAGST, 1999; POUILLAIN, GIRARD-VALENCIENNES, SMADJA, 2004; VAYA & AVIRAM, 2004).

### 1.3.1.4 Análise em CLAE para a descoberta de agentes antioxidantes

De acordo com MASUDA *et al.* (2003), não é fácil encontrar o antioxidante mais ativo presente no extrato bruto de plantas, porque extratos vegetais consistem em uma mistura de muitos tipos de compostos fenólicos que possuem capacidades antioxidantes mais

altas ou mais baixas. Recentemente, foi desenvolvido um método de CLAE on-line para a verificação de atividade antioxidante usando o radical púrpura 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Este método tem muitas vantagens sobre o método de guia de fracionamento clássico, pois possibilita a separação e a identificação de um agente antioxidante, simultaneamente. Nas equações 1 e 2, S é o substrato de oxidação, AH o antioxidante, e A<sup>•</sup> o radical gerado a partir de AH:



Os extratos vegetais possuem vários compostos, porém, só os compostos ativos (AH) serão convertidos a A<sup>•</sup> quando espécies radicais como S-OO<sup>•</sup> são acrescentadas aos extratos. Os A<sup>•</sup> produzidos serão convertidos então a combinações com estruturas não radiculares de substâncias químicas diferentes do AH original. Uma recente técnica de CLAE pode render a separação da maioria dos componentes vegetais em sinais individuais. Nesta técnica somente os sinais correspondentes aos antioxidantes fortes (AH) desaparecem ou mudam devido à reação com as espécies radicais adicionadas. Então, o composto antioxidante poderoso é identificado como sendo aquele correspondente ao sinal que diminuiu ou desapareceu no cromatograma de CLAE. Sob condições de reação apropriadas, o composto mais ativo será descoberto como associado ao sinal que diminuiu mais rápido, de acordo com sua reatividade. Portanto, a partir desta técnica de CLAE, pode-se descobrir qual a fração mais ativa como antioxidante, presente no extrato bruto (MASUDA *et al*, 2003).

### 1.3.2 Considerações sobre Atividade Antimicrobiana

O uso de extratos vegetais e fitoquímicos com fins medicinais é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Graças à sua atividade metabólica secundária, os vegetais superiores são capazes de produzir substâncias antibióticas, utilizadas como mecanismo de defesa contra predação por microorganismos, insetos e herbívoros (GOTTLIEB, 1981). Os principais grupos de compostos com propriedades antimicrobianas,

extraídos de plantas incluem: terpenóides e óleos essenciais (TORSSEL, 1989); alcalóides (FESSENDEN, 1982); lecitinas e polipeptídios (TERRAS *et al.*, 1993; ZHANG & LEWIS, 1997) e substâncias fenólicas e polifenóis, que são: fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas (STERN *et al.*, 1996), flavonas, flavonóis e flavonóides (FESSENDEN, 1982), taninos (SCALBERT, 1991) e cumarinas (O'KENNEDY & THORNES, 1997).

Estes agentes antimicrobianos isolados de plantas superiores podem agir como reguladores do metabolismo intermediário, ativando ou bloqueando reações enzimáticas, afetando diretamente uma síntese enzimática seja em nível nuclear ou ribossomal, ou mesmo alterando estruturas de membranas (SINGH & SHUKLA, 1984).

### *1.3.3 Considerações sobre Atividade Citotóxica*

O câncer, na maioria dos países desenvolvidos, se constitui na segunda causa de morte da população, superado somente pelas doenças do sistema cardiovascular. Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) surgem a cada ano nove milhões de novos casos e cinco milhões de pessoas vão a óbito em decorrência do câncer. O aumento da incidência deste mal é, principalmente, atribuído ao aumento da expectativa de vida da população, pois o aparecimento dessa patologia é favorecido pelo envelhecimento do organismo (CAIRNS, 1981).

A célula cancerígena caracteriza-se pela perda de função em consequência da ausência de diferenciação, proliferação incontrolada, invasividade dos tecidos adjacentes e metástase. A origem dessa célula é consequência de alterações genéticas que podem ser produzidas por diversos mecanismos como a inativação de genes supressores de tumor, ativação de oncogenes, inativação de genes responsáveis pela apoptose e mutações produzidas por agentes químicos, físicos e biológicos (BRENTANI, CHAMMAS & COELHO, 1998; SIMPSON CABALLERO & DANI, 1998).

Com o aprimoramento da metodologia de cultura de células foi possível a cultura de diversas linhagens celulares oriundas de tumores humanos, que possibilitaram o desenvolvimento da metodologia para triagem *in vitro*. Dessa maneira, essa metodologia

permite a avaliação em diversos tipos de células neoplásicas, possibilitando a descoberta de drogas com maior especificidade. Atualmente, os métodos de triagem *in vitro*, utilizando-se da cultura de células tumorais humanas, são os mais utilizados para a descoberta e desenvolvimento de novas drogas (QUEIROZ *et al.*, 1999; ITHARAT *et al.*, 2004).

Os agentes hoje conhecidos com ação sobre o câncer podem ser classificados em dois grupos. O primeiro é constituído por drogas que inibem a iniciação do processo carcinogênico e o segundo, por drogas que inibem a proliferação celular durante as fases de promoção e progressão do câncer. Muitos agentes do primeiro grupo são encontrados em alimentos, como os diterpenos do café e os ácidos sulfídicos do alho (DUVOIX *et al.*, 2005). Outro exemplo clássico de quimioprevenção (como é denominada a ação desses agentes) é o elevado consumo do chá verde no oriente, cujos polifenóis possuem atividade comprovada em diversos sistemas fisiológicos (LAMBERT *et al.*, 2005). Os agentes supressores são os mais procurados para o desenvolvimento de novos fármacos, pois atuam após a instalação da doença (DUVOIX *et al.*, 2005). Atualmente, o tratamento tem baixa eficácia em virtude do mecanismo de ação que as drogas supressoras possuem, inibindo o crescimento ou matando as células malignas. A maior parte desses quimioterápicos são genotóxicos, produzindo dano ao DNA e mutações, que podem induzir a formação outras células neoplásicas. Como já foi salientado, as descobertas de novas drogas anticâncer de origem vegetal têm incentivado as pesquisas nessa área. Um dos exemplos mais importantes é o da *Catharanthus roseus*, conhecida também como *Vinca rosea*, utilizada pela população de Madagascar no tratamento do diabetes. Durante os testes de atividade hipoglicemiante, os extratos dessa espécie produziram granulocitopenia em consequência da supressão da medula óssea dos animais, sugerindo a sua avaliação em modelos de leucemias e linfomas. A confirmação da atividade nesses modelos levou ao isolamento dos alcalóides vimblastina e vincristina que, atualmente, são de grande utilidade no tratamento de leucemias, linfomas e câncer testicular (MANN, 2002; CRAGG & NEWMAN 1999; FELLOWS, 1995).

Outra descoberta importante na área de câncer foi o paclitaxel (Taxol), isolado da casca do teixo (*Taxus baccata* e *Taxus brevifolia*), em 1971 (WANI *et al.*, 1971). Estudos clínicos revelaram que essa substância era capaz de regredir o câncer de mama e de ovário,

resistentes à terapia tradicional (ROWINSKY *et al.*, 1995). Como essa substância teria que ser extraída de espécies que levam décadas para o seu crescimento, a introdução dessa droga na terapêutica teve que esperar pelo desenvolvimento da síntese química, de extrema complexidade, e pela descoberta de precursores obtidos de fontes renováveis. Essas dificuldades adiaram a introdução do paclitaxel e do docetaxel na terapêutica para a década de 90 (MANN, 2002).

Atualmente 50% dos quimioterápicos utilizados para o tratamento do câncer são provenientes, direta ou indiretamente, de fontes naturais, como plantas, microorganismos e organismos marinhos (MANN, 2002).

#### *1.3.4 Considerações sobre Atividade Alelopática*

O termo alelopátia deriva das palavras gregas *allelon* (mútuo) e *pathos* (prejuízo), referindo-se a capacidade que as plantas têm de interferir na germinação de sementes e no desenvolvimento de outras por meio de substâncias que estas liberam na atmosfera ou, quase sempre no solo (MEDEIROS, 1990). Existem várias definições para alelopátia. Segundo RICE (1974) o termo pode ser empregado para caracterizar as interações bioquímicas entre todos os tipos de plantas, inclusive entre microorganismos.

As substâncias alelopáticas são produtos intermediários ou finais do metabolismo secundário (PUTNAM, 1985). Constitui-se também uma forma de comunicação, pois permite às plantas distinções entre os organismos que lhes são prejudiciais, benéficos ou até mesmo, indiferentes (ALMEIDA & DURIGAN, 1993). Estas substâncias podem ser exsudadas por várias partes do vegetal, como caules e, na sua maioria, folhas e raízes. No solo, podem combinar-se de várias maneiras e, embora não se conheçam todas as suas funções e substâncias, as que se conhecem podem interferir fortemente no metabolismo de outros organismos (MEDEIROS, 1993).

Há mais de 10 mil produtos químicos conhecidos como alelopáticos, pertencentes aos mais variados grupos de substâncias. A interferência alelopática dificilmente é provocada por um fator isolado, mas a união e ação sinérgica conjunta de várias destas substâncias

somadas às condições ambientais (ALMEIDA, 1988).

Os metabólitos secundários mais comuns causadores de efeitos alelopáticos pertencem ao grupo dos ácidos fenólicos, cumarinas, terpenóides, flavanóides, alcalóides, glicosídeos cianogênicos, derivados do ácido benzóico, taninos e quinonas complexas (MEDEIROS, 1990).

Os metabólitos secundários podem atuar em diversos processos do organismo vegetal, desempenhando deste modo uma infinidade de funções. Essas substâncias podem, por exemplo, atrair agentes polinizadores por intermédio de diversos mecanismos, assim como: cor (flavonóides) e odor (monoterpenóides); prevenir a decomposição das sementes e interferir na sua dormência (ácidos fenólicos). Assim, os metabólitos secundários apresentam muitas e variadas funções sobre os comportamentos de organismos associados, isto é, outras plantas, microorganismos, insetos e até mesmo sobre animais superiores (HARBONE, 1988).

Os metabólitos secundários podem interferir na germinação e crescimento das plantas, de modo que a avaliação desses efeitos é o ponto de partida para a identificação de espécies alelopáticas (RICE, 1984).

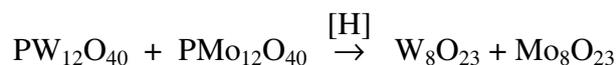
Exemplo comum da determinação do potencial alelopático de uma planta sobre outra é o estudo dos efeitos dos extratos de resíduos de plantas infestantes sobre sementes ou plântulas de espécies cultivadas, geralmente de ciclo anual, devido à interferência das plantas infestantes na produção e rentabilidade dessas culturas (SANTOS, 2002).

## **1.4 Teor de Fenóis Totais e Flavonóides**

### *1.4.1 Avaliação do Teor de Fenóis Totais*

O teor de fenóis totais pode ser determinado de acordo como o método de Folin-Ciocalteu. O procedimento baseia-se em uma reação de óxido-redução, na qual o íon fenolato é oxidado em meio alcalino, enquanto reduz o complexo fosfotúngstico-fosfomolibdico do reagente, para uma solução azul (o cromóforo), que absorve fortemente em 760 nm (FUNARI & FERRO, 2006). Este método, segundo KATALINIC *et al.*, (2004) não

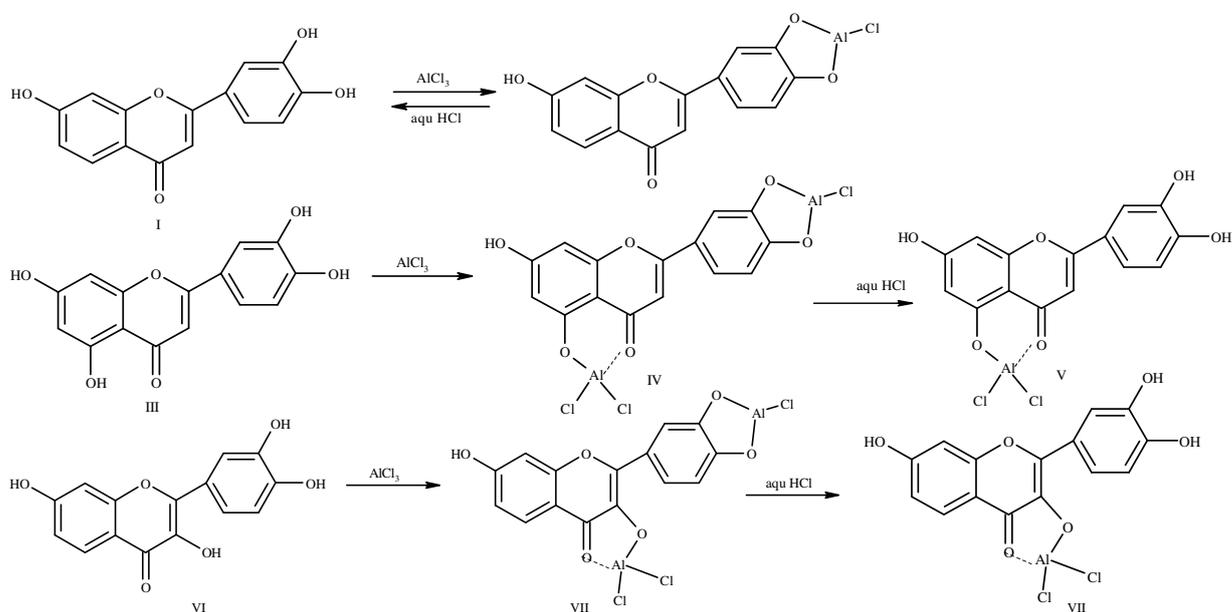
faz medidas da quantidade de materiais fenólicos, mas é, na realidade, baseado na capacidade química de redução destes em relação a uma capacidade de redução equivalente do ácido gálico. Dessa forma, vários compostos fenólicos possuem diferentes respostas neste ensaio. A resposta molar deste método é aproximadamente proporcional ao número de hidroxilas fenólicas em um dado substrato, mas a capacidade de redução é melhorada quando duas hidroxilas fenólicas estão orientadas em *orto* ou *para* (KATALINIC *et al.*, 2004).



### Esquema 05 – Reação de Folin-Ciocalteu

#### 1.4.2 Avaliação do teor de flavonóides

O conteúdo de flavonóides nos extratos pode ser determinado espectrofotometricamente, em método baseado na formação de um complexo flavonóide-alumínio, tendo o máximo de absorvância a 430 nm.



### Esquema 06- Representação das possíveis estruturas formadas entre flavonóides e AlCl<sub>3</sub>

Segundo FUNARI & FERRO (2006), este método utilizado para a quantificação de flavonóides totais baseia-se na propriedade do cátion alumínio de formar complexos estáveis com flavonóides, ocorrendo, na análise espectrofotométrica, um

deslocamento para maiores comprimentos de onda e uma intensificação de suas absorções. Desta forma, é possível determinar a quantidade de flavonóides na amostra, evitando-se a interferência de outras classes de substâncias fenólicas, principalmente, a dos ácidos fenólicos. O método de quantificação espectrofotométrica de flavonóides pela reação com cloreto de alumínio é preciso e reprodutível, ainda que pouco exato (geralmente fornece valores inferiores ao real), apresentando desvios muito pequenos ou nulos entre um ensaio e outros, se realizados com a mesma amostra (WOISKY & SALATINO, 1998). Com cloreto de alumínio, flavonas e flavonols que contém grupos hidroxilas em C-3 ou C-5 formam complexos ácidos estáveis, além disso, cloreto de alumínio forma complexos ácidos com flavonóides que contém sistemas orto-dihidroxilados. Uma representação diagramática é apresentada no **Esquema 06** juntamente com as possíveis estruturas formadas (I a VIII) para os complexos formados.

Os complexos formados entre  $\text{AlCl}_3$  e os grupos orto-dihidroxilas do anel A e B, com poucas exceções, decompõem-se na presença do ácido. Em contraste, o complexo  $\text{AlCl}_3$  entre a função cetona C-4 e/ou o grupo hidroxila em 3 ou 5 é estável na presença do ácido (MABRY, MARKHAM & THOMAS, 1970).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Realizar estudos químicos com *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel. (Polypodiaceae), e com o óleo essencial das cascas do caule de *Croton urucurana* BAILL. (Euphorbiaceae), visando o isolamento, a identificação ou a elucidação das substâncias biologicamente ativas presentes.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Isolar e purificar, através de procedimentos cromatográficos, os componentes químicos presentes nas frações hexânica e acetato de etila de *M. vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel. e do óleo essencial das cascas do caule de *C. urucurana* BAILL. (Euphorbiaceae).

Identificar as substâncias puras e/ou em misturas através de métodos analíticos tais quais: cromatografia em camada delgada analítica, cromatografia a gás, infravermelho e ressonância magnética nuclear de H<sup>1</sup> e C<sup>13</sup>.

Identificar as frações e/ou substâncias biologicamente ativas quanto à atividade antioxidante, antimicrobiana, citotóxica e alelopática.

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

No desenvolvimento das atividades experimentais foram respeitadas normas de segurança e foram estabelecidos procedimentos visando o uso racional de água nos processos de refrigeração; assim como medidas foram tomadas, objetivando a recuperação de solventes.

#### 3.1 Procedimentos experimentais

##### *3.1.1 Cromatografia em camada delgada*

Utilizou-se cromatoplasmas de alumínio (CCDA) com sílica gel 60 F<sub>254</sub> como fase estacionária, de procedência MERCK, para o ensaio qualitativo da atividade antioxidante. Para o isolamento das substâncias foi empregada cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), utilizando-se sílica gel 60 GF<sub>254</sub> como fase estacionária, de procedência MERCK, sobre placas de vidro.

Foram utilizados os seguintes métodos para revelação das cromatoplasmas:

- **DPPH:** o radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) (2mg/mL em EtOH) foi usado como revelador para avaliação da atividade antioxidante. As placas cromatográficas foram examinadas 30 min após a imersão.
- **Anisaldeído sulfúrico:** As cromatoplasmas foram vaporizadas com solução de anisaldeído sulfúrico e a seguir aquecidas por cinco minutos à 110° C, ou até que as manchas pudessem ser visualizadas (WAGNER, BLADT, ZGAINSKI, 1984).
- **Ultravioleta:** as cromatoplasmas foram expostas à radiação ultravioleta de comprimentos de onda de 254 e 366 nm onde, se possível, era observada a ocorrência de manchas referentes aos compostos antioxidantes.
- **Vanilina sulfúrica:** a solução (10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 2% de vanilina em EtOH) foi aplicada na extremidade das placas de CCDP e, após aquecimento a

110°C os sinais correspondentes às substâncias presentes puderam ser visualizados.

### *3.1.2 Cromatografia em coluna (Fase Estacionária)*

Como fase estacionária, para as colunas cromatográficas, foi utilizada sílica gel 60, com diâmetro de partículas entre 0,063 e 0,200 mm e especificação ASTM classificação em peneiras entre 70 e 230 mesh de procedência VETEC. A eluição das colunas foi realizada com solventes puros e misturas de solventes com polaridades crescentes. Os solventes utilizados foram hexano, acetato de etila, etanol e água.

### *3.1.3 Cromatografia Gasosa*

As análises dos óleos foram realizadas utilizando-se um sistema Varian GC-MS-MS que inclui um cromatógrafo a gás CP-3900 (Walnut Creek, CA, USA) com um injetor 1077, autoamostrador CP-8410 e um espectrômetro de massa do tipo captura de íons (Varian Saturn 2100). Para as separações foi utilizada coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0.25 mm d.i., 0.25 mm de espessura do filme ) ZB-5 (5%-fenil-95%-dimetilpolisiloxano) da Phenomenex (Torrance, CA, USA). A temperatura do sistema, da interface CG-EM e da captura dos íons foi de 70, 240 e 200°C, respectivamente. A temperatura do forno foi programada de 50 a 250° C, aquecendo 3° C/min. Hélio (99.999%) foi utilizado como gás de arraste a um fluxo constante de 1.0 mL.min<sup>-1</sup> e um volume de injeção de 1 µL foi empregado (proporção de arraste 1:20). Os parâmetros do MS incluíram a voltagem de ionização por impacto de elétrons de 70 eV, abrangência das massas de 41-380 m/z e intervalo de varredura de 0,5 s.

## **3.2 Materiais e equipamentos**

Os espectros de absorção do infravermelho foram obtidos no DQI da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul em espectrofotômetro FT-IR-BOMEM- Modelo

M-100. Para a obtenção dos espectros de infravermelho, utilizou-se pastilhas de KBr. Os comprimentos de onda foram medidos em centímetros recíprocos ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (uni- e bidimensionais) foram registrados em espectrômetro Bruker DPX-300 (300 MHz e 75MHz, respectivamente) do DQI da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Os deslocamentos químicos foram medidos em valores adimensionais (ppm), tendo como padrão interno de referência o tetrametilsilano (TMS).

As análises cromatográficas a gás foram realizadas em equipamento VARIAN modelo CP 3800 do laboratório de análises de combustíveis do DQI da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

As revelações por luz ultravioleta foram feitas em cuba reveladora UVGL-58, em curto e longo comprimento de ondas 254/366 nm.

As massas dos extratos e frações foram medidas em uma balança analítica OHAUS modelo Advanced.

Nos experimentos para avaliação qualitativa da atividade antioxidante frente ao DPPH foi utilizado Espectrofotômetro Modelo DR/2010 – HACH, com possibilidade de leitura na faixa de 400 a 900 nm. Também foi utilizado o espectrofotômetro 700 S da marca Femto, o qual possui leitura de 190-1100 nm.

O Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência empregado foi o modelo Varian 210, detector de arranjo de diodos (DAD), com varredura entre 200-800 nm. Coluna de fase reversa C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5  $\mu\text{m}$ ) e pré-coluna (2,5 cm x 3 mm) da mesma fase da coluna. O equipamento pertence ao CPBIO da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS) Campus de Dourados.

Os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico P.A., das marcas VETEC, SYNTH, CHENCO e MERCK.

Nos fracionamentos e separações cromatográficas foi utilizada sílica gel-60 de granulometria 70-230 mesh (0,063-0,20mm), da marca VETEC.

Os solventes deuterados empregados foram  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$  e  $\text{D}_2\text{O}$  da marca Aldrich.

### 3.3 Coleta e identificação das espécies vegetais investigadas

#### 3.3.1 *Croton urucurana* BAILL / Euphorbiaceae

A casca do caule de *Croton urucurana* (Euphorbiaceae) foi coletada em fevereiro e março de 2006 na reserva biológica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, na cidade de Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul. Exsicatas (16859) foram depositadas no Herbário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

#### 3.3.2 *Microgramma vacciniifolia* /Polypodiaceae

Partes aéreas de *M. vacciniifolia* foram coletadas no dia 23 de abril de 2003 no período vespertino, na Rua Onofre Pereira de Matos, nas proximidades do número 1722, região central de Dourados/MS. O material vegetal foi identificado pela Professora Leila Paes Clemente em comparação com exsicata previamente identificada pelo professor Alexandre Salino (UFMG). Uma exsicata da espécie encontra-se depositada no herbário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul de acordo com a identificação: Brasil.MS: Ponta Porã, Faz. Curupi, 19.VIII. 1999 I.A. Carneiro, L.P. Clemente & Sciamarelli 62 (CGMS/BHCB); **idem**, **id.** 10.IX. 2000, I.A.Carneiro16 (CGMS/BHCB).

### 3.4 Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) de *Microgramma vacciniifolia*

O material coletado foi triturado manualmente e transferido para recipiente de vidro de boca larga onde foi adicionado etanol comercial suficiente para realizar a extração exaustiva por dez dias, à temperatura ambiente, na ausência de luz. Os líquidos foram retirados e filtrados periodicamente e novas quantidades de etanol comercial foram acrescentadas até que os metabólitos secundários presentes nos tecidos fossem completamente extraídos. 1,546 kg de material vegetal, frondes verdes de *M. vacciniifolia* foram extraídos exaustivamente em etanol. A evaporação foi realizada em rota-vapor, para fornecer 50,24 g do extrato etanólico bruto com teor de umidade igual a 36,88%.

### 3.5 Fracionamento do Extrato Etanólico Bruto (EEB) e Frações (FS) de *Microgramma vacciniifolia*

16,7624g do extrato etanólico bruto de *M. vacciniifolia* com teor de umidade igual a 36,88% foram dissolvidos com uma mistura de etanol/água a 1/9 (v/v) e submetidos à partição líquido/líquido exaustiva, em funil de separação, com os solventes hexano e acetato de etila, obtendo-se, após reunião das frações e evaporação dos solventes, as seguintes frações semipurificadas: hexânica (2,0407g), em AcOEt (2, 1196g) e em EtOH/H<sub>2</sub>O (10,5580g).

Parte da fração hexânica de *M. vacciniifolia* (1,4666g), foi submetida ao processo de purificação em coluna cromatográfica (50 x 4,0 cm), coletando-se frações de 30 mL. O sistema foi eluído com solventes de polaridade crescente, hexano, hexano/acetato de etila, acetato de etila, acetato de etila/etanol, etanol, etanol/água, água. Foram coletadas as seguintes frações:

**Tabela 01-** Frações obtidas a partir da coluna cromatográfica 1 (fração hexânica)

Frações	Solvente	Frações	Solvente
1-101	Hexano puro	2014-2059	Hexano-AcOEt 15:85
102-201	Hexano-AcOEt 99:1	2060-2132	AcOEt puro
202-882	Hexano-AcOEt 98:2	2133-2172	AcOEt-EtOH 95:5
883-1002	Hexano-AcOEt 97:3	2173-2212	AcOEt-EtOH 90:10
1003-1081	Hexano-AcOEt 96:4	2212-2273	AcOEt-EtOH 85:15
1082-1132	Hexano-AcOEt 95:5	2274-2320	AcOEt-EtOH 80:20
1133-1270	Hexano-AcOEt 92:8	2321-2379	AcOEt-EtOH 70:30
1271-1434	Hexano-AcOEt 88:12	2380-2478	AcOEt-EtOH 60:40
1435-1674	Hexano-AcOEt 80:20	2479-2517	AcOEt-EtOH 50:50
1675-1797	Hexano-AcOEt 75:25	2518-2538	AcOEt-EtOH 40:60
1798-1845	Hexano-AcOEt 70:30	2539-2560	AcOEt-EtOH 30:70
1846-1863	Hexano-AcOEt 65:35	2561-2580	AcOEt-EtOH 20:80
1864-1885	Hexano-AcOEt 60:40	2581-2635	AcOEt-EtOH 10:90
1886-1921	Hexano-AcOEt 50:50	2636-2650	EtOH puro
1922-1954	Hexano-AcOEt 40:60	2651-2680	EtOH: H <sub>2</sub> O 90:10
1955-2013	Hexano-AcOEt 30:70	2681-2701	EtOH: H <sub>2</sub> O 80:20.

As amostras foram analisadas por CCDA, e então reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante, rendendo as frações reunidas na **Tabela 02**.

**Tabela 02** - Frações obtidas a partir da coluna cromatográfica 1 (fração hexânica), reunidas de acordo com semelhanças em CCDA

Frações reunidas	Massa (mg)	Frações reunidas	Massa (mg)
1-2	1,0	661-699	22,7
3	8,2	734-973	7,1
4-5	50,5	974-1068	14,9
6	16,1	1069-1326	10,6
7-11	9,3	1327-1499	64,9
12-38	5,1	1500-1860	80,7
39-92	5,0	1861-2030	27,2
93-176	140,6	2031-2102	20,7
177-247	36,5	2114-2159	36,3
248-284	30,9	2160-2279	69,8
285-301	25,0	2280-2359	14,5
302-385	41,13	2360-2391	21,7
386-427	60,8	2392-2460	14,4
428-529	38,5	2461-2701	15,1
530-660	110,7	TOTAL	994,83

A fração 93-176 (140,6 mg) apresentou um aspecto oleoso de coloração esverdeada e foi encaminhado para análise CG/EM, identificando-se três substâncias presentes na mistura: ácido heptadecanóico, oleato de etila e ácido octadecanóico.

A fração 248-284 (30,9 mg) foi purificada por cromatografia em camada delgada preparativa, eluída em um sistema Hexano/Acetato de Etila (8:2), possibilitando o isolamento de uma substância pura que foi encaminhada para análises espectrais de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13, identificando-se o triterpenóide hopan-22-ol.

A fração 530-660 (110, 7 mg) foi purificada por cromatografia em camada delgada preparativa, eluída em um sistema Hexano/Acetato de Etila (8:2), possibilitando o

isolamento de uma substância pura que foi encaminhada para análises espectrais de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13, possibilitando a identificação do esteróide  $\beta$ -sitosterol.

### **3.6 Determinação da atividade antimicrobiana do EEB e FS de *Microgramma vacciniifolia***

Os ensaios da atividade contra bactérias foram realizados no Laboratório de Microbiologia da UFSM (Universidade Federal de Santa Maria). Foram investigadas as atividades antibacterianas do extrato etanólico bruto e das frações hexânica e em AcOEt de *M. vacciniifolia* frente a dez microorganismos (bactérias e fungos) empregando-se o método de microdiluição. Os microorganismos empregados nos testes incluíram quatro bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus Aureus* (ATCC 6538p), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) e *Bacilo subtilis* (ATCC 6633), 03 bactérias Gram-negativas: *Klebsiella Pneumoniae* (ATCC 10031), *Escherichia coli* (ATCC 11103) e *Salmonella setubal* (ATCC 19796); e três fungos: *Saccharomyces Cerevisiae* (ATCC 2601), *Cryptococcus neoformans* (ATCC 28952) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Foram utilizadas culturas padrões de microorganismos da American Type Culture Collection (ATCC). Os antibióticos comerciais cloranfenicol e nistatina foram usados como padrões comparativos e para controlar a sensibilidade do teste microbiano. A concentração mínima inibitória (CIM) foi determinada em 96 placas de cultura pelo método de microdiluição em que foram empregadas suspensões de microorganismos a uma densidade de  $10^5$  mL<sup>-1</sup> de CFU com caldo de caseína de soja incubado durante 24 horas a 37 °C nos testes contra bactérias, e caldo de sabouraud incubado durante 72 horas a 25 °C nos testes para fungos. Foram usadas culturas que não apresentaram crescimento para inocular placas de meio sólido (Agar Muller Hinton e Agar Sabouraud) para determinar-se a concentração mínima letal (CML). Os brancos foram analisados simultaneamente e as amostras foram testadas em triplicata. Foram adotados os procedimentos previamente descritos por HAMMER, CARSON & RILEY (1999) e NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS,

(2003).

### **3.7 Ensaio qualitativo da atividade antioxidante do EEB e FS de *M. vacciniifolia***

Os materiais vegetais foram aplicados (2  $\mu$ L de uma solução a 5 mg/mL, de cada material), em triplicata, em placas de alumínio impregnadas com silicagel 60 F254 (Merck), e o radical livre DPPH (2 mg/mL em etanol) foi utilizado como reagente revelador da atividade antioxidante, de forma semelhante ao procedimento descrito na literatura (POULLAIN, GIRARD-VALENCIENNES, SMADJA, 2004). No trabalho aqui descrito, foram realizados testes preliminares para avaliação dos sistemas de solventes que oferecessem melhores resultados quanto à eluição. Posteriormente, as placas cromatográficas foram eluídas com os seguintes sistemas de solventes: AcOEt/ EtOH/H<sub>2</sub>O 50/35/15 ou 30/30/40 e examinadas 30 minutos após a aplicação do revelador DPPH. Os compostos ativos apareceram como sinais amarelo-claros sobre o fundo púrpura. A exemplo do que foi relatado na literatura, o grau de atividade foi determinado qualitativamente a partir da observação da intensidade dos sinais amarelos, na escala: (+) para fraco, (++) para moderado e (+++) para forte. A atividade também foi qualificada pela comparação com solução etanólica do antioxidante padrão BHT (2-terbutil-4-metoxifenol), a forte atividade antiradicalar do BHT foi observada a uma concentração de 10  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. (ARGOLO *et al*, 2004; POULLAIN, GIRARD-VALENCIENNES, SMADJA, 2004).

### **3.8 Quantificação da atividade antioxidante em extratos brutos e frações semipurificadas de *Microgramma vacciniifolia* frente ao DPPH**

A concentração inibitória a 50% (CI<sub>50</sub>) e o percentual de inibição (I%) frente ao DPPH, são parâmetros utilizados para a determinação do poder antioxidante de amostras puras e de extratos vegetais. CI<sub>50</sub> é a quantidade de material antioxidante necessário para diminuir em 50% a concentração inicial do radical DPPH, e I% é o percentual do radical DPPH total que reagiu com o agente antioxidante ao alcançar-se o estado estacionário (20 minutos). Cinquenta microlitros de soluções com várias concentrações dos extratos e frações (as concentrações variaram de 0,3 a 10 mg.mL<sup>-1</sup> conforme a atividade do extrato e da fração testada) em metanol foram adicionados a 5 mL de uma solução metanólica de DPPH a

0,004% . Após um período de incubação de 30 minutos a temperatura ambiente a absorbância foi lida frente a um branco a 517 nm. A inibição do radical livre em percentual (I%) foi calculada da seguinte forma:

$$I \% = \frac{(A_{\text{branco}} - A_{\text{amostra}})}{A_{\text{branco}}} \times 100$$

Onde  $A_{\text{branco}}$  é a absorbância da reação controle (contendo todos os reagentes exceto o material testado)  $A_{\text{amostra}}$  é a absorbância da amostra teste. A concentração do extrato que forneceu 50% da inibição ( $CI_{50}$ ) foi calculada a partir do gráfico plotando o percentual de inibição contra concentração do extrato. Os testes foram realizados em triplicada. O antioxidante padrão (BHT) também foi testado frente ao DPPH e usado como referência. (ARGOLO et al, 2004; POUILLAIN, GIRARD-VALENCIENNES, SMADJA, 2004).

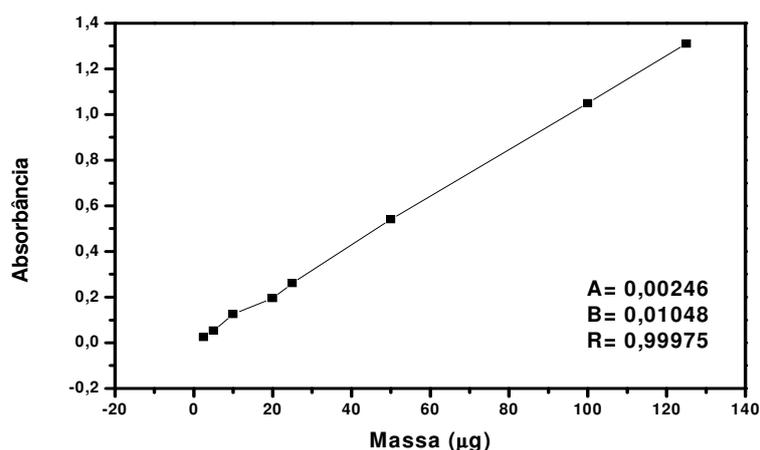
### **3.9 Ensaio quantitativo para determinação do teor de fenóis totais e flavonóides no extrato bruto e nas frações semipurificadas de *Microgramma vacciniifolia***

#### *3.9.1 Teor de flavonóides*

A cada 500  $\mu\text{L}$  das soluções metanólicas do extrato bruto e frações de *M. vacciniifolia* a uma concentração de  $3 \text{ mg.mL}^{-1}$  adicionaram-se 1,5 mL de álcool etílico 95%, 0,1 mL de solução aquosa de cloreto de alumínio 10% ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), 0,1 mL de solução aquosa de acetato de sódio ( $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) a ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e 2,8 mL de água destilada. Deixou-se o sistema reagir à temperatura ambiente por 40 minutos, e então fez-se as leituras no espectrofotômetro no comprimento de onda de 415 nm. O mesmo procedimento foi realizado para o branco, em que foram empregados 500  $\mu\text{L}$  de metanol ao invés da amostra (LIN & TANG, 2007).

Para calcular a concentração de flavonóides nas amostras por comparação, foi preparada uma curva analítica (2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 125,0  $\mu\text{g}$ ) empregando-se a quercetina como padrão e as respectivas absorbâncias foram lidas. Os dados

obtidos para a quercetina foram submetidos a regressão linear rendendo a equação da reta padrão (**Gráfico 01**), que foi utilizada no cálculo da concentração de flavonóides nas amostras reais. O resultado foi expresso em  $\mu\text{g}$  de quercetina por  $\text{mL}^{-1}$  de extrato. Todos os testes foram realizados em triplicata.



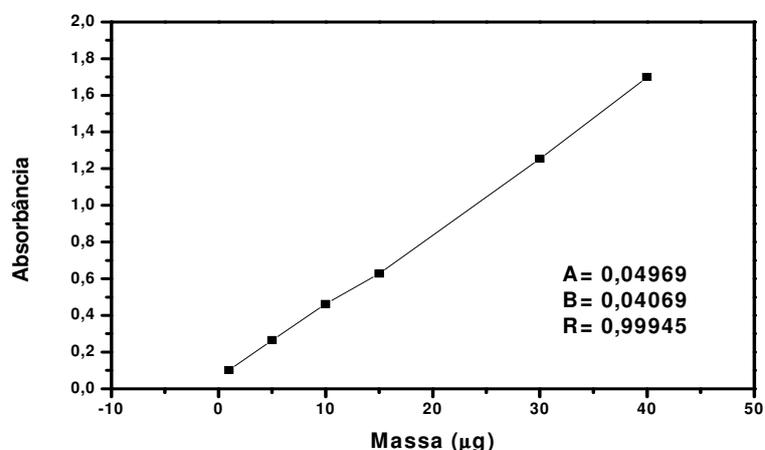
**Gráfico 01-** Curva analítica da quercetina, obtida por espectrofotometria.

### 3.9.2 Teor de fenóis totais

O teste de fenóis foi realizado com as mesmas amostras do teste de flavonóides ( $3 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). A cada  $100 \mu\text{L}$  das amostras adicionou-se  $1,5 \text{ mL}$  de solução aquosa de carbonato de sódio a 20%,  $0,5 \text{ mL}$  de reagente Folin-Ciocalteau (1:10 v/v) e  $1 \text{ mL}$  de água destilada. O sistema foi mantido em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos, então foram feitas as leituras em espectrofotômetro no comprimento de onda de  $760 \text{ nm}$ . O mesmo procedimento foi realizado para o branco, em que foram empregados  $100\mu\text{L}$  de metanol ao invés da amostra (DJERIDANE *et al.*, 2006).

Para calcular a concentração de fenóis nas amostras por comparação foi preparada uma curva analítica (1,0; 5,0; 10,0; 15,0; 30,0; 40,0  $\mu\text{g}$ ) empregando o ácido gálico como padrão e as respectivas absorbâncias foram lidas. O procedimento experimental foi o mesmo utilizado para as amostras. Os dados obtidos com o ácido gálico foram submetidos a regressão linear rendendo a equação da reta (**Gráfico 02**), que foi empregada no cálculo das concentrações de fenóis nas amostras reais. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de ácido

gálico por mL<sup>-1</sup> de extrato. Todos os testes foram realizados em triplicata.



**Gráfico 02-** Curva analítica do ácido gálico, obtida por espectrofotometria.

### 3.10 Análise em CLAE analítica da fração AcOEt do extrato etanólico bruto de *M. vacciniifolia*

20 µL da solução da fração em AcOEt a 0,05mg/mL em MeOH foram injetadas e analisadas por CLAE. A eluição foi realizada em sistema gradiente: com 40% de metanol, 50% de água e 10% de acetonitrila levando 40 minutos para atingir 80% de metanol, 10% de água e 10% de acetonitrila e 10 minutos para voltar à condição inicial. O tempo de análise foi de 60 minutos. Após a varredura de 200 a 800 nm, pode-se observar que os picos apresentaram melhor resposta em 255 nm. A fim de determinar quais substâncias apresentavam capacidade antioxidante, 50 µL de uma solução da fração acetato de etila a 3 mg/mL de metanol foram adicionados a 5mL de uma solução metanólica de DPPH a 0,004%. Após 30 minutos a amostra foi submetida às análises por CLAE nas mesmas condições descritas para as amostras e obtido o cromatograma a 255 nm.

### 3.11 Atividade alopática

Os experimentos para avaliação da atividade alelopática do extrato etanólico bruto (EEB) e frações semipurificadas (FS) de *M. vacciniifolia* foram realizados no

Laboratório de Pesticidas Naturais da UFMS por pesquisadores da equipe coordenada pela Professora Marize T. L. P. Peres (DHT/CCET).

Para o preparo das soluções, o EEB e as FS foram pesados em balança analítica de precisão 0,001 g, levando-se em consideração o teor de água, e dissolvidos em 5,0 mL de etanol absoluto P.A., obtendo-se assim a solução estoque na concentração de 1.000 mg.L<sup>-1</sup>. As concentrações de 500 mg.L<sup>-1</sup> e 250 mg.L<sup>-1</sup> foram preparadas por diluição. Como controle, utilizou-se uma solução contendo apenas etanol absoluto.

As sementes selecionadas como alvo para a verificação de fitotoxinas foram alface, *Lactuca sativa* cv. Grand Rapids (eudicotiledônea) e cebola, *Allium cepa* var. Baia Periforme (monocotiledônea).

Para os bioensaios, cada placa de Petri (6,0 cm de diâmetro) recebeu um disco de papel filtro Whatman número 1 (5,5 cm de diâmetro), que foi umedecido com 1,0 mL das soluções do EEB e FS nas concentrações 250, 500, 1.000 mg.L<sup>-1</sup>. Após a evaporação do solvente foi adicionado 1,5 mL de Tween 80 (100 µg.mL<sup>-1</sup>) e o conjunto deixado em repouso por 12 horas (NISHIMURA & NAKAMURA, 1984). Em seguida, foram semeadas aleatoriamente sobre cada disco de papel filtro, 50 diásporos da espécie-alvo (alface/cebola), distribuídas aleatoriamente, com quatro repetições, conforme BRASIL (1992). Como controle, procedimento similar foi utilizado com soluções sem os materiais vegetais.

As placas de Petri, contendo os diásporos foram levadas a câmara de germinação (BOD), com condição de luz (160 W), umidade relativa ( $\pm$  80%) e temperaturas constantes adequadas a cada espécie-alvo, conforme BRASIL (1992) (alface, 25°C  $\pm$  2°C; cebola 15°C  $\pm$  2°C, com fotoperíodo de 12 h). A leitura para avaliar a germinação foi diária, tendo como critério a protrusão radicular de, no mínimo, 2,0 mm de comprimento.

Para a avaliação do crescimento, 15 sementes germinadas foram deixadas nas placas e, após três dias, foi efetuada a medida do comprimento da raiz primária e do hipocótilo/coleótilo de dez plântulas por placa utilizando papel milimetrado (BARNES *et. al.*, 1987).

Em termos estatísticos o delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, envolvendo quatro ensaios simples, com extrato etanólico bruto,

frações hexânica, AcOEt e EtOH/ H<sub>2</sub>O de *M. vacciniifolia* com quatro concentrações (0, 250, 500 e 1.000 mg.L<sup>-1</sup>), em quatro repetições. Cada parcela constituiu-se de 50 diásporos para germinação e dez para o crescimento da raiz primária e do hipocótilo/coleótilo. A germinabilidade (%G) foi calculada segundo a metodologia descrita por LABOURIAU (1983), onde [%G = (Σn<sub>i</sub>.N<sup>-1</sup>). 100] (n<sub>i</sub> é o número de sementes germinadas no intervalo de tempo t<sub>i-1</sub> ↔ t<sub>i</sub> e N é o número de sementes usadas em cada tratamento) e o índice de velocidade de germinação (IVG) segundo MAGUIRE (1962) citado por FERREIRA & BORGHETTI (2004), onde [IVE = Σ(G<sub>i</sub>/N<sub>i</sub>)] (G<sub>i</sub> é o número de sementes germinadas no intervalo de tempo t<sub>i-1</sub> ↔ t<sub>i</sub> e N<sub>i</sub> é o número de dias após a semeadura). Os dados foram submetidos a análise de variância e quando os efeitos dos tratamentos foram significativos (p < 0,05), em relação à testemunha, as médias foram comparadas pelo teste de Dunnet. Quando uma das pressuposições exigidas pelo modelo paramétrico não foi atendida, utilizaram-se os testes estatísticos não paramétricos, Kruskal-Wallis, como alternativa para a análise de variância, e o Mann-Whitney, como alternativa para o teste de Dunnet. Todos os resultados foram analisados considerando o nível de significância α = 5%.

### **3.12 Isolamento e identificação dos constituintes do óleo essencial de *Croton urucurana***

A casca do caule de *Croton urucurana* foi submetida a hidrodestilação por quatro horas um aparelho do tipo Clevenger modificado, seguido pela extração exaustiva do destilado com hexano. Após a remoção do solvente, o rendimento do óleo bruto foi de 0.05%. As propriedades físicas para o óleo foram: d<sup>25</sup>: 0.91; η<sub>D</sub><sup>25</sup>: 1.56; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup>: -12.1 (em CHCl<sub>3</sub>, c = 0.025). As análises foram realizadas em cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM), a fim de obter-se o perfil cromatográfico e determinar a composição química do óleo. A mistura dos n-alcanos diluída em n-hexano foi preparada para a determinação de índices lineares da retenção, sendo que estas amostras de n-alcanos diluídas em n-hexano foram os padrões internos de análise acrescentadas a cada amostra para ajudar na padronização dos tempos de retenção. Os índices de retenção (IR) para todos os compostos foram determinados de acordo com VAN DEN DOOL E KRATZ (1963). A identificação dos

componentes foi baseada na comparação com seus espectros de massa com aqueles das bibliotecas do NIST 2.0 Saturn, bem como pela comparação de seus índices de retenção e espectros de massa com dados da literatura (ADAMS, 1995).

### **3.13 Ensaio espectrofotométrico quantitativo da atividade antioxidante do óleo essencial de *Croton urucurana***

50 µL de várias concentrações do óleo em metanol foram adicionados a 5 mL de uma solução metanólica de DPPH a 0.004% . Após um período de incubação de 30 minutos a temperatura ambiente a absorbância foi lida frente a um branco a 517 nm. A inibição do radical livre em percentual (I%) foi calculada da seguinte forma:

$$I \% = \frac{(A_{\text{branco}} - A_{\text{amostra}})}{A_{\text{branco}}} \times 100$$

onde  $A_{\text{branco}}$  é a absorbância da reação controle (contendo todos os reagentes exceto o composto testado)  $A_{\text{amostra}}$  é a absorbância da amostra teste. A concentração do óleo que forneceu 50% da inibição ( $CI_{50}$ ) foi calculada a partir do gráfico, plotando-se o percentual de inibição contra a concentração do óleo. Os testes foram realizados em triplicada. O antioxidante padrão (BHT) também foi testado frente ao DPPH e usado como referência.

### **3.14 Ensaio em CCD do óleo essencial da casca do caule de *Croton urucurana*, para determinação qualitativa da atividade antioxidante frente ao DPPH**

Cinco microlitros do óleo diluído em hexano (1:10) foram aplicados em placas de CCD (placas de alumínio impregnadas com sílica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck) e uma mistura de hexano-acetato de etila (9:1) foi empregada como eluente. A placa foi borrifada com o reagente DPPH em metanol a 0,2% e mantida à temperatura ambiente por 30 minutos, onde manchas amarelas formaram-se a partir da descoloração da cor púrpura do DPPH, considerou-se como positiva a atividade antioxidante das substâncias presentes.

#### 3.14.1 *Isolamento da fração antioxidante*

Para o isolamento da fração antioxidante, presente no óleo essencial de *C. urucurana*, 100 mg do óleo bruto foram submetidos à CCDP, tendo-se aplicado 100 mg do óleo em placa preparativa e eluído com hexano/AcOEt 15:85.

A fração antioxidante foi observada por aplicação da solução de DPPH (0.2% em etanol) na lateral da placa, que apresentou coloração amarela onde havia substâncias antioxidantes. Esta fração foi retirada da placa cromatográfica e lavada com hexano/acetato 1:1, sendo posteriormente filtrada sob vácuo para fornecer a fração antioxidante (6 mg). Depois deste procedimento, uma amostra desta fração foi encaminhada para análise em CG-EM, afim de determinar-se a composição química da fração que apresentava atividade antioxidante.

#### 3.14.2 *Isolamento do 1-Isopropil-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8-hexahidro-2H-naftalen-4- $\alpha$ -ol*

100 mg do óleo essencial bruto de *C. urucurana* foi submetido a CCDP (SiO<sub>2</sub>; hexano-EtOAc, 85:15) fornecendo (11 mg) do sesquiterpenóide 1-Isopropil-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8-hexahidro-2H-naftalen-4- $\alpha$ -ol. A detecção das substâncias presentes foi alcançada sob luz UV (254 nm) e por borrifração com solução em EtOH a 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 2% vanilina, seguida por aquecimento a 110 °C.

### **3.15 Atividade antimicrobiana do óleo essencial bruto das cascas do caule de *C. urucurana***

A atividade antimicrobiana do óleo bruto foi analisada segundo o método da microdiluição, de maneira semelhante ao descrito no item 3.6.

### **3.16 Atividade antineoplásica do óleo essencial bruto e das frações isoladas do óleo essencial bruto das cascas do caule de *C. urucurana***

Estes experimentos foram realizados no Departamento de Farmácia da UFMS, sob a coordenação da professora Maria de Fátima Cepa Matos (DFB/UFMS).

Todo o manuseio das células foi feito segundo FRESHNEY (1994). Para a avaliação da atividade antineoplásica foi utilizado o método da SRB (sulforodamina B) descrito por SKEHAN *et al* (1990). Foi utilizado microscópio invertido da marca ZEISS (Modelo Axiovert 25) em aumento de 400 vezes para a observação do crescimento das células. A inibição do crescimento celular, um indicador da citotoxicidade causada pelos compostos avaliados quanto à atividade antineoplásica, foi visualizada em células MCF7. As substâncias (compostos-teste) foram dissolvidas em DMSO puro.

Foi realizado o cultivo de células neoplásicas da linhagem MCF7 (carcinoma de mama), cedida pelo Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho - CPQBA/ UNICAMP (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas em Campinas – SP). As células foram cultivadas em frascos estéreis na presença de meio de cultura, RPMI 1640, contendo 10 % de soro fetal bovino, 100 U.mL<sup>-1</sup> de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina (meio completo) e mantidas a 37 °C em incubadora com atmosfera úmida e contendo CO<sub>2</sub> (5%). Uma vez que estas células são aderentes, é necessário fazer a remoção dessas com a solução de tripsina (0,25% + EDTA 1 mM) em tampão PBS, pH 7,4. Em seguida, foram transferidas para tubos cônicos contendo meio de cultura completo. Após centrifugação a baixa rotação, o meio contendo tripsina foi desprezado e as células ressuspendidas em pequeno volume de meio completo. Foi feitas a contagem com uma alíquota dessas células em uma câmara de Neubauer para que em cada cavidade da placa de 96 poços fosse depositado um volume de 100 µL de meio contendo 10.000 células (100.000/mL).

Após 20 horas em repouso, para permitir a fixação das células semeadas, o meio foi aspirado para a adição dos compostos-teste. Uma alíquota destes compostos, previamente dissolvidos em DMSO, foi diluída em meio de cultura, de tal forma que a

concentração final do solvente (DMSO), não excedesse 0,5%. Foram utilizadas 4 concentrações de cada composto (entre 5 e 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), sendo que cada concentração foi adicionada em 3 cavidades. Na coluna 1, denominada controle negativo, as células foram crescidas na ausência de qualquer composto e contendo somente meio de cultura contendo DMSO a 0,5% (o solvente utilizado para dissolver os compostos-teste). Em todos os testes foi utilizado um controle positivo, Cisplatina [cis-diclorodiamino-platinum (II)] da marca Sigma. Todas as placas foram novamente mantidas na mesma incubadora a 37 °C, até o final do período de exposição das células aos compostos-teste (48 h).

O teste de citotoxicidade adotado baseia-se na coloração das proteínas, pelo corante sulforodamina B (SRB, Sigma). Este corante possui dois grupos sulfônicos, e liga-se às proteínas das células fixadas na placa, cujas proteínas são precipitadas pelo ácido tricloroacético (TCA – Sigma). E deste modo, em 48 horas o meio foi removido e substituído por 100  $\mu\text{L}$  de TCA 20%. As placas foram incubadas por meia hora, a 4 °C em geladeira, e posteriormente, a solução TCA foi removida e as placas lavadas 5 vezes com água corrente. Adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de SRB 0,1% (diluída em ácido acético 1%) e novamente incubada por meia hora em temperatura ambiente. Após a remoção da solução de SRB, as placas foram lavadas 4 vezes com ácido acético 1%, secas, então foi adicionado Tris Base 10 mM (Sigma). Em seguida as placas foram submetidas à agitação por 10 minutos, para a dissolução das proteínas coradas. A absorbância foi medida a 540 nm em leitor de microplacas.

A absorbância encontrada para o controle negativo correspondeu ao valor de 100% de sobrevivência. Como parâmetro para a citotoxicidade, foi utilizado o valor da  $\text{CI}_{50}$ , que representa a atividade antineoplásica das substâncias testadas. A  $\text{CI}_{50}$  – a concentração que inibe 50 % do crescimento celular – e o limite de confiança de 95 % foram determinados em programa PROBITOS (FINNEY, 1971), a partir das diferenças de leituras de absorbância entre o controle negativo (sem tratamento) e o composto-teste (com tratamento).

### **3.17 Análise estatística**

A análise estatística dos dados obtidos nas determinações dos teores de

fenóis totais e flavonóides foi realizada através da determinação do coeficiente de variação (CV). Este indicador expressa a relação percentual da estimativa do desvio padrão com a média dos valores obtidos (SILVA, 2007).

O coeficiente de variação (CV) é calculado a partir da estimativa do desvio padrão (s), de acordo com as seguintes equações:

$$s = \left[ \sum_{i=1} (x_i - x_m)^2 / (N - 1) \right]^{1/2}$$

$$CV = s / X_m \cdot 100$$

$X_i$  = valor individual

$X_m$  = média das análises

$N$  = número de experimentos

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Ensaio qualitativo em CCD da atividade antioxidante de *M. vacciniifolia* e *C. urucurana*

Os resultados obtidos nos testes de avaliação qualitativa da atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH são apresentados na **Tabela 03**.

**Tabela 03-** Resultados do ensaio qualitativo da atividade antioxidante de *C. urucurana* e *M. vacciniifolia*

Extratos Etanólicos	Parte	Ensaio de Redução do Radical DPPH
<i>C. urucurana</i>	Óleo essencial da casca do caule	+++
<i>M. vacciniifolia</i>	Aérea	+++

Nota: O grau de atividade foi determinado qualitativamente a partir da observação da intensidade da cor.

O óleo essencial de *C. urucurana* e o extrato etanólico bruto de *M. vacciniifolia* apresentaram resultados bastante significativos no ensaio qualitativo por CCD para avaliação da atividade antioxidante frente ao DPPH, o que serviu de estímulo para que estes materiais fossem submetidos a estudos químicos e biológicos, uma vez que não haviam dados relacionados com atividade antioxidante e estudos químicos com *M. vacciniifolia* e com o óleo essencial das cascas do caule de *C. urucurana*.

### 4.2 *Croton urucurana*

O óleo essencial obtido a partir das cascas do caule de *C. urucurana* foi analisado por CG e CG-EM. 83 compostos foram identificados. Por CCDP foi possível o isolamento da substância majoritária presente. O óleo essencial também foi submetido ao ensaio para quantificação da atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH. A fração do óleo que apresentou atividade antioxidante foi purificada por CCDP e análises de CG e CG-EM revelaram os principais componentes presentes nesta fração. Foi determinada a atividade antimicrobiana do óleo essencial bruto frente a sete bactérias e três fungos. A atividade

citotóxica do óleo essencial bruto e do sesquiterpenóide isolado foi determinada frente a células de carcinoma de mama, MCF7.

### **4.3 Identificação dos componentes do óleo essencial da casca do caule de *Croton urucurana***

Após a obtenção do óleo essencial bruto das cascas do caule de *C.urucurana*, foram realizadas análises em cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM), a fim de obter-se o perfil cromatográfico do mesmo (**Figura 01**). Observou-se que o óleo apresentou um elevado teor de sesquiterpenóides, seguidos por monoterpenos, em menor teor. Os principais monoterpenos foram o álcool borneol e o seu derivado acetilado, o acetato de bornila. Os sesquiterpenóides apresentaram grande diversidade de componentes e de características estruturais (esqueletos sesquiterpênicos). A tabela a seguir demonstra a composição química do óleo volátil de *Croton urucurana*.

Foram utilizadas, para cada extração, 100g de cascas de *Croton urucurana*, obtendo-se um rendimento médio de 0,05% em massa. A análise de CG-EM deste óleo bruto conduziu à identificação e quantificação de um total de 83 substâncias (**Tabela 04**) respondendo por 94,6% do total de componentes presentes no óleo essencial bruto. Conforme é apresentado na **Tabela 04**, borneol (14,7%), acetato de bornila (5,2%), o-cimeno (3,2%), terpineol (2,8%) e 1,8-cineol (1,8%) são os principais monoterpenos identificados no óleo essencial de *C. urucurana*. A análise também mostrou que o óleo é constituído por uma proporção alta de sesquiterpenóides, sendo sesquicineol (10,5%), 1-isopropil-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8-hexahidro-2H-naftalen-4a-ol (14,7%), epóxido de  $\gamma$ -gurjuneno (5,4%),  $\alpha$ -bisabolol (1,8%), elemenona (1,8%) e  $\alpha$ -eudesmol (1,5%) os sesquiterpenóides majoritários.

**Tabela 04-** Composição do óleo essencial bruto da casca do caule de *C. urucurana* e da fração antioxidante.

	<b>Substâncias<sup>a b</sup></b>	<b>Óleo essencial bruto</b>	<b>Fração antioxidante</b>	<b>IR<sup>c</sup></b>	<b>Dados de espectrometria de massa<sup>d</sup></b>
01	triciclono	0.1	-	926	136 [M] <sup>+</sup> , 93
02	$\alpha$ -tujeno	0.1	-	931	136 [M] <sup>+</sup> , 91
03	$\alpha$ -fenchoeo	0.6	-	951	136 [M] <sup>+</sup> , 93
04	sabineno	0.1	-	976	136 [M] <sup>+</sup> , 93
05	mirreno	0.2	-	991	136 [M] <sup>+</sup> , 41
06	$\alpha$ -terpineno	0.1	-	1018	136 [M] <sup>+</sup> , 121
07	cimeno	3.2	-	1022	134 [M] <sup>+</sup> , 119
08	limoneno	0.2	-	1031	136 [M] <sup>+</sup> , 67
09	1,8-cineol	1.8	-	1033	154 [M] <sup>+</sup> , 43
10	$\gamma$ -terpineno	0.3	-	1062	136 [M] <sup>+</sup> , 93
11	terpinoleno	0.1	-	1087	136 [M] <sup>+</sup> , 93
12	linalool	0.3	-	1099	154 [M] <sup>+</sup> , 43
13	trans-tujona	0.1	-	1115	152 [M] <sup>+</sup> , 67
14	ment-2-en-1-ol	0.1	-	1120	154 [M] <sup>+</sup> , 43
15	cânfora	0.5	-	1142	152 [M] <sup>+</sup> , 95
16	hidrato de canfeno	0.4	-	1146	154 [M] <sup>+</sup> , 43
17	tagetona	0.1	-	1152	152 [M] <sup>+</sup> , 67
18	isoborneol	0.2	-	1155	154 [M] <sup>+</sup> , 95
19	cis-crisnatenol	0.2	-	1161	152 [M] <sup>+</sup> , 81
20	borneol	14.7	0.4	1164	154 [M] <sup>+</sup> , 95
21	terpinen -4-ol	2.8	2.5	1175	154 [M] <sup>+</sup> , 71
22	p-cimen-8-ol	0.1	1.0	1183	150 [M] <sup>+</sup> , 43
23	$\alpha$ -terpineol	1.2	-	1189	154 [M] <sup>+</sup> , 59
24	mirtenol	0.1	-	1195	152 [M] <sup>+</sup> , 79
25	Formato de isobornila	0.4	-	1227	182 [M] <sup>+</sup> , 95
26	timol metil éter	0.2	-	1230	164 [M] <sup>+</sup> , 149
27	<i>E</i> -ocimenona	0.1	-	1234	150 [M] <sup>+</sup> , 135
28	acetato de bornila	5.9	-	1285	196 [M] <sup>+</sup> , 43

**Continuação da Tabela 04.**

29	timol	0.2	2.7	1291	150 [M] <sup>+</sup> , 135
30	carvacrol	0.1	0.8	1300	150 [M] <sup>+</sup> , 135
31	$\delta$ -elemeno	0.6	-	1337	204 [M] <sup>+</sup> , 121
32	ciclosativeno	0.2	-	1367	204 [M] <sup>+</sup> , 105
33	$\alpha$ -copaeno	0.1	-	1375	204 [M] <sup>+</sup> , 105
34	$\beta$ -elemeno	0.3	-	1392	204 [M] <sup>+</sup> , 67
35	cipereno	0.3	-	1399	204 [M] <sup>+</sup>
36	$\alpha$ -cedreno	0.2	-	1408	204 [M] <sup>+</sup> , 119
37	$\delta$ -gurjuneno	0.3	-	1413	204 [M] <sup>+</sup> , 105
38	$\beta$ -cedreno	1.3	-	1420	204 [M] <sup>+</sup> , 161
39	<i>cis</i> -tujopseno	2.4	-	1424	204 [M] <sup>+</sup> , 119
40	$\gamma$ -elemeno	0.5	-	1430	204 [M] <sup>+</sup> , 121
41	geranil acetona	0.4	-	1452	194 [M] <sup>+</sup> , 43
42	9- <i>epi</i> -cariofileno	0.2	-	1465	204 [M] <sup>+</sup> , 41
43	$\gamma$ -gurjuneno	0.5	-	1470	204 [M] <sup>+</sup> , 105
44	$\gamma$ -himachaleno	0.3	-	1474	204 [M] <sup>+</sup> , 105
45	$\gamma$ -muuroleno	0.4	-	1477	204 [M] <sup>+</sup> , 161
46	curcumeno	0.1	-	1483	204 [M] <sup>+</sup> , 119
47	$\beta$ -selineno	0.4	-	1486	204 [M] <sup>+</sup> , 93
48	$\alpha$ -selineno	1.4	-	1493	204 [M] <sup>+</sup> , 93
49	$\beta$ -himalacheno	0.3	-	1500	204 [M] <sup>+</sup> , 119
50	cupareno	0.4	-	1505	202 [M] <sup>+</sup> , 132
51	sesquicineol	10.5	-	1514	222 [M] <sup>+</sup> , 139
52	$\delta$ -cadinene	0.8	-	1524	204 [M] <sup>+</sup> , 119
53	<i>trans</i> -calameneno	1.8	0.1	1534	202 [M] <sup>+</sup> , 159
54	$\alpha$ -calacoreno	0.1	-	1543	200 [M] <sup>+</sup> , 157
55	nerolidol	0.4	2.4	1564	222 [M] <sup>+</sup> , 41
56	álcool cariofílico	1.1	1.5	1573	222 [M] <sup>+</sup> , 111
57	espatulenol	0.3	-	1577	220 [M] <sup>+</sup> , 43
58	hidrato de sesquisabineno	0.3	-	1579	222 [M] <sup>+</sup> , 41
59	óxido de cariofileno	0.4	-	1583	220 [M] <sup>+</sup> , 41
60	kusimona	0.6	-	1592	204 [M] <sup>+</sup> , 119
61	elemenona	1.8	-	1597	219 [M] <sup>+</sup> , 107
62	guaiol	0.4	8.2	1603	222 [M] <sup>+</sup> , 161

**Continuação da Tabela 04.**

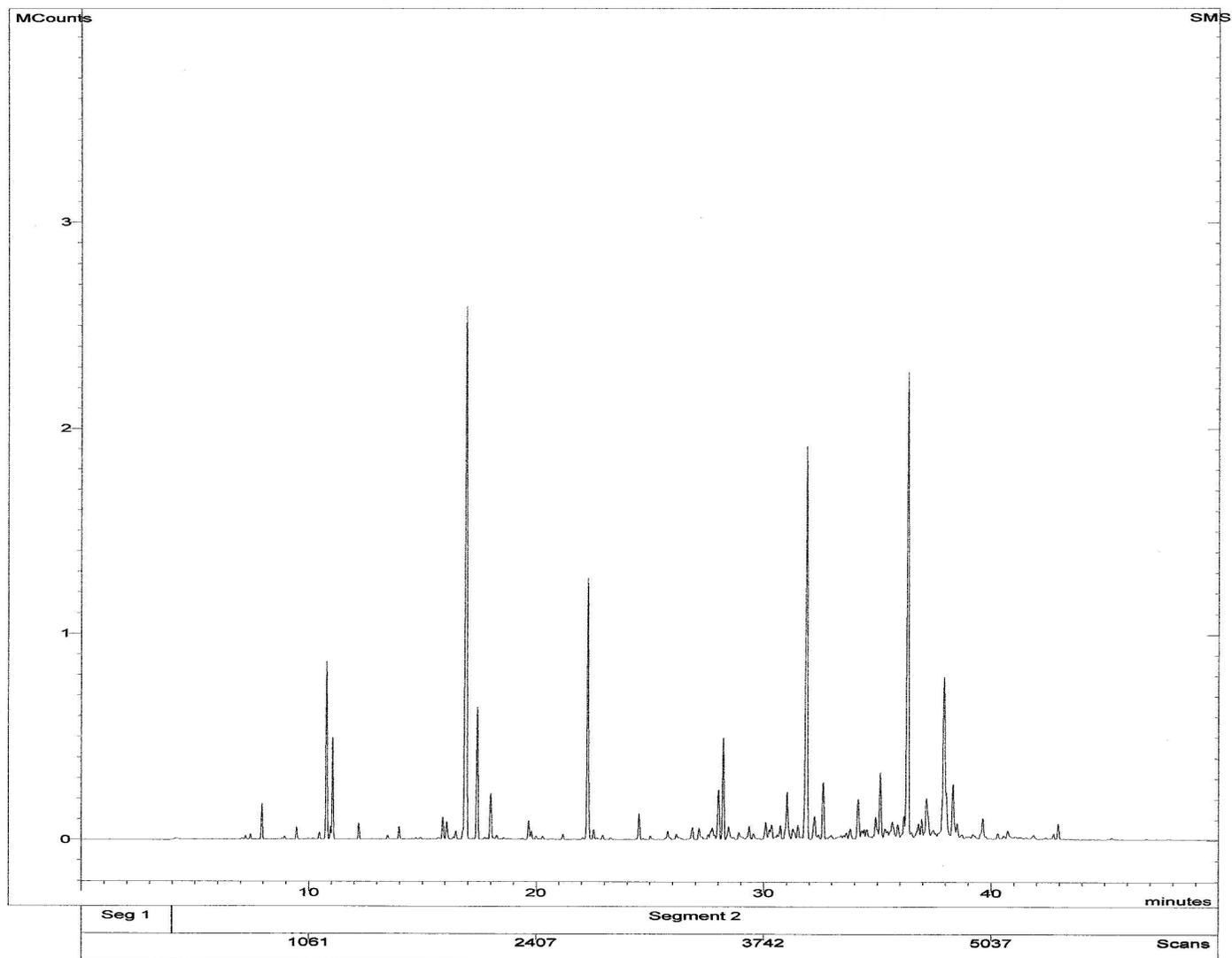
63	humulano-1,6-dien-3-ol	0.3	-	1606	222 [M] <sup>+</sup> , 109
64	Óxido de himachaleno	0.2	-	1609	220 [M] <sup>+</sup> , 95
65	1,10-di- <i>epi</i> -cubenol	0.8	2.3	1612	222 [M] <sup>+</sup> , 161
66	10- <i>epi</i> - $\gamma$ -eudesmol	0.5	-	1618	222 [M] <sup>+</sup> , 161
67	$\gamma$ -eudesmol	0.7	-	1625	222 [M] <sup>+</sup> , 161
68	1-isopropyl-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8-hexahidro-2H-naftalen-4-ol*	14.7	5.8	1629	220 [M] <sup>+</sup> , 119
69	$\beta$ -acoreno	-	0.4	1634	222 [M] <sup>+</sup> , 119
70	cubenol	0.5	1.6	1642	222 [M] <sup>+</sup> , 161
71	vulgarona-B	0.5	4.0	1647	218 [M] <sup>+</sup> , 41
72	$\alpha$ -eudesmol	1.5	9.3	1652	222 [M] <sup>+</sup> , 59
73	óxido de $\alpha$ -bisabolol B	-	0.4	1655	238 [M] <sup>+</sup> , 43
74	7- <i>epi</i> - $\alpha$ -eudesmol	-	0.3	1659	222 [M] <sup>+</sup> , 161
75	$\beta$ -bisabolol	-	1.8	1670	222 [M] <sup>+</sup> , 41
76	$\gamma$ -gurjuneno epoxido	5.4	0.3	1673	220 [M] <sup>+</sup> , 107
77	kusinol	1.4	2.4	1676	220 [M] <sup>+</sup> , 41
78	$\alpha$ -bisabolol	1.8	38.3	1684	222 [M] <sup>+</sup> , 43
79	<i>epi</i> - $\alpha$ -bisabolol	-	0.6	1685	222 [M] <sup>+</sup> , 43
80	acorenona	0.5	-	1689	220 [M] <sup>+</sup> , 41
81	não-identificado	0.2	-	1707	220 [M] <sup>+</sup> , 119
82	8-oxo-neoisolonlongifolena	0.1	-	1808	218 [M] <sup>+</sup> , 175
83	tunbergol	0.1	-	1825	290 [M] <sup>+</sup> , 43
TOTAL		94.6	87.1		

<sup>a</sup> Substâncias listadas em ordem de eluição da coluna zb-5; <sup>b</sup> identificação: IR, índice de retenção, CG-EM, cromatografia gasosa-espectroscopia de massa; \*identificado por IR, CG-EM e RMN; <sup>c</sup> temperatura programada índices de retenção determinados em coluna apolar zb-5 (50-250°C, 3°C min<sup>-1</sup>); <sup>d</sup> íon molecular e fragmento principal obtido da análise CG-EM.

#### 4.4 Purificação da substância majoritária presente no óleo essencial de *Croton urucurana*

O óleo essencial bruto das cascas do caule de *C. urucurana* (100 mg) foi submetido a cromatografia de camada delgada em silicagel fornecendo o derivado de sesquiterpenóide do tipo cadinano (11 mg). Este foi submetido a análises por técnicas

espectroscópicas de análise por RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 02**),  $^{13}\text{C}$  (**Figura 03**), DEPT 135 (**Figura 04**) e EM (**Figura 05**). A fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$  foi atribuída a partir do seu espectro de massas, o qual apresentou um íon molecular em  $m/z = 220$   $[\text{M}]^+$ , em combinação com os dados de RMN de  $\text{C}^{13}$ . Os principais fragmentos obtidos na análise por EM foram:  $m/z = 220$   $[\text{M}]^+$ , 202 ( $[\text{M}^+] - \text{H}_2\text{O}$ ), 187 ( $[\text{M}^+] - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3$ ), 159 ( $[\text{M}^+] - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2$ ), 134 ( $[\text{M}^+] - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{CH}$ ), 119 ( $[\text{M}^+] - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{CH}$ ), 91 ( $[\text{M}^+] - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2$ ).

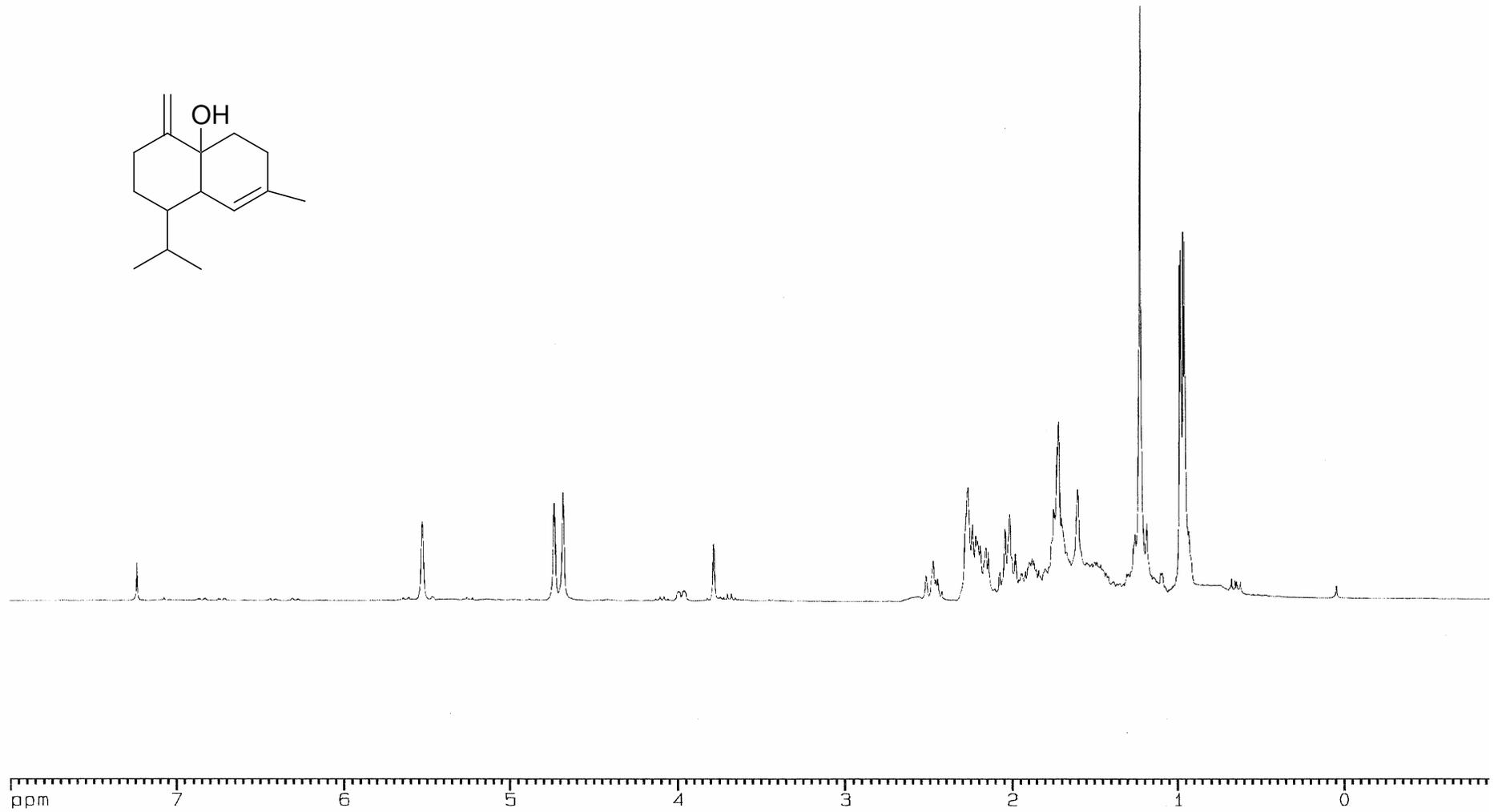
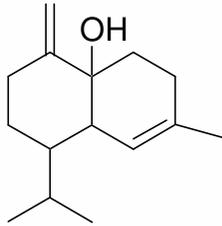


**Figura 01-** Cromatograma do óleo essencial bruto das cascas do caule de *C. urucurana*.

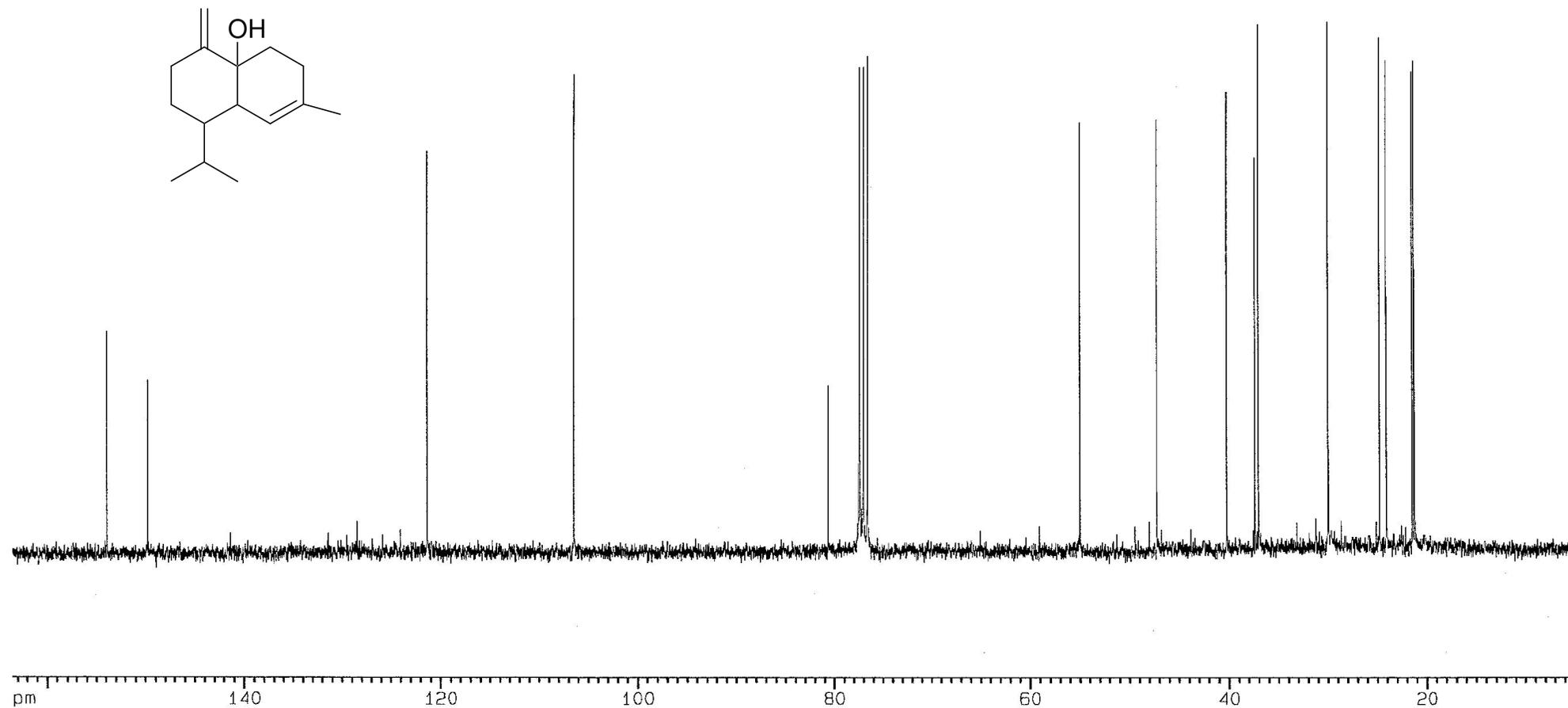
O espectro de RMN de  $H^1$  mostrou sinais em  $\delta$  5.52 (brs, 1H), 4.73 (s, 1H) e 4.68 (s, 1H), característicos de hidrogênios olefínicos, em  $\delta$  2.47-2.51 (m, 2H), 2.22-2.26 (m, 2H), 2.01-2.04 (m, 2H) e 1.80-1.85 (m, 2H) sinais correspondentes a hidrogênios ligados a carbonos metilênicos e os sinais em  $\delta$  1.22 (s, 3H), 0.98 (d,  $J$  2.7 Hz, 3H) e 0.95 (d,  $J$  2.7 Hz, 3H), atribuídos à presença de uma metila ligada a dupla ligação e metilas geminais, respectivamente. O espectro de RMN- $^{13}C$  do sesquiterpenóide apresentou 15 sinais. Através do experimento DEPT 135 foi possível observar a presença de 5 carbonos metilênicos em  $\delta$  24,7, 30,0, 37,0, 40,2 e 106,4, quatro metinos em  $\delta$  37,4, 45,0, 55,0 e 121,3, três metilas em  $\delta$  21,2, 21,4 e 24,0 e três carbonos não hidrogenados em  $\delta$  80,6, 149,7 e 153,9.

O cromatograma obtido para a substância isolada mostra que a mesma elui em 36 minutos (**Figura 06**). Após análise dos espectros, atribuiu-se à substância a estrutura do sesquiterpenóide 1-isopropil-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8-hexahidro-2h-naftalen-4 $\alpha$ -ol (**Figura 07**) sendo que o mesmo constitui aproximadamente 15% da composição do óleo essencial. Este é o primeiro relato da ocorrência deste sesquiterpenóide em *C. urucurana* e na família Euphorbiaceae, mas esta substância foi previamente isolada do óleo essencial das flores de *Aglaia odorata* Lour (Meliaceae) (WEYERSTAHL *et al.*, 1999).

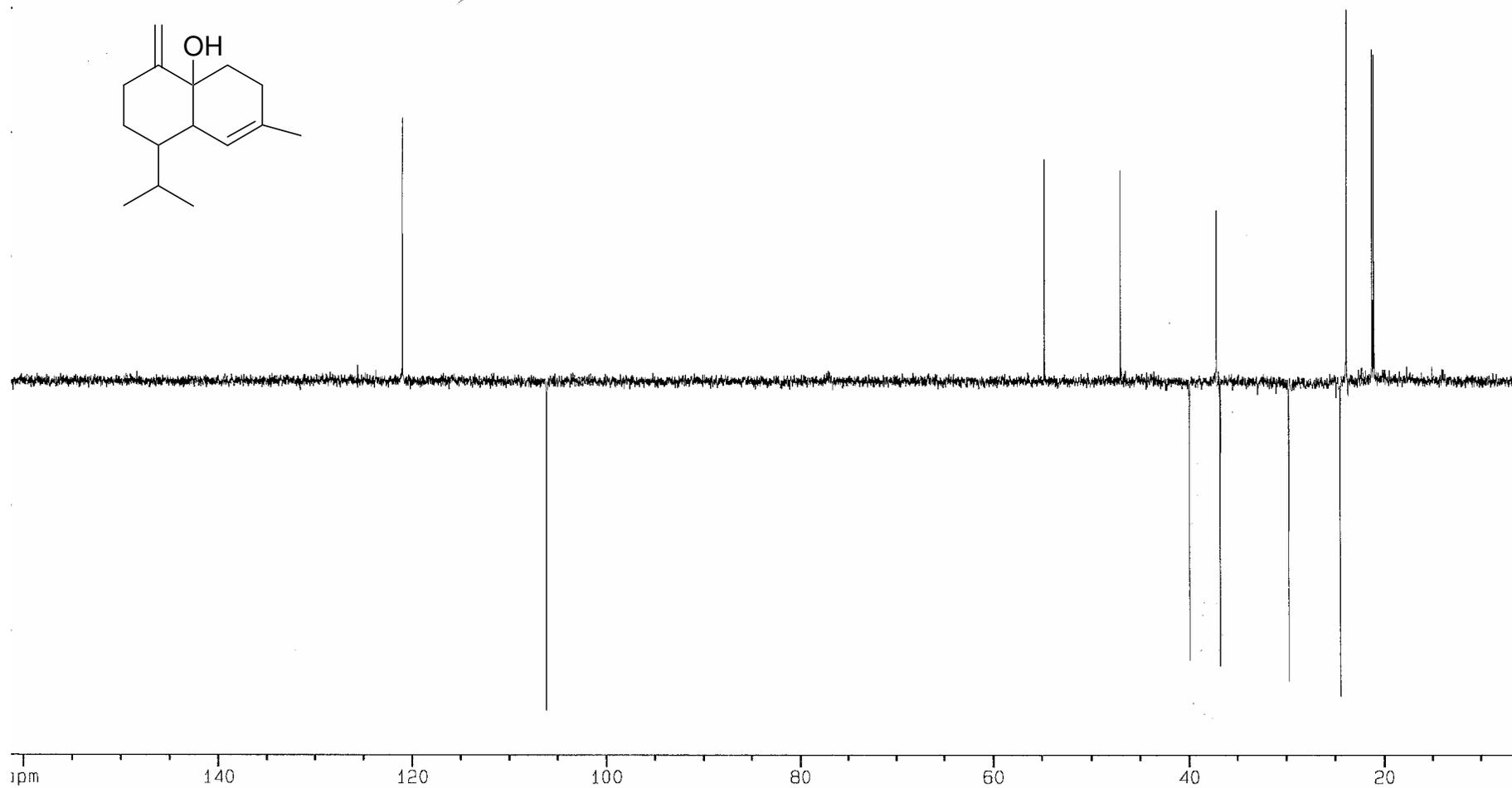
Para o sesquiterpenóide purificado foi medido um  $[\alpha]_D^{25}$ : + 4.9 ( em  $CHCl_3$ ,  $c = 0.0075$ ). Posteriormente, a configuração relativa desta substância foi atribuída por comparação com os dados da literatura e por comparação com os índices de retenção dos isômeros, também descritos na literatura (WEYERSTAHL *et al.*, 1999).



**Figura 02-** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz) do 1-isopropil-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8a-hexahidro-2H-naftalen-4 $\alpha$ -ol em  $\text{CDCl}_3$ , TMS como padrão interno de referênc

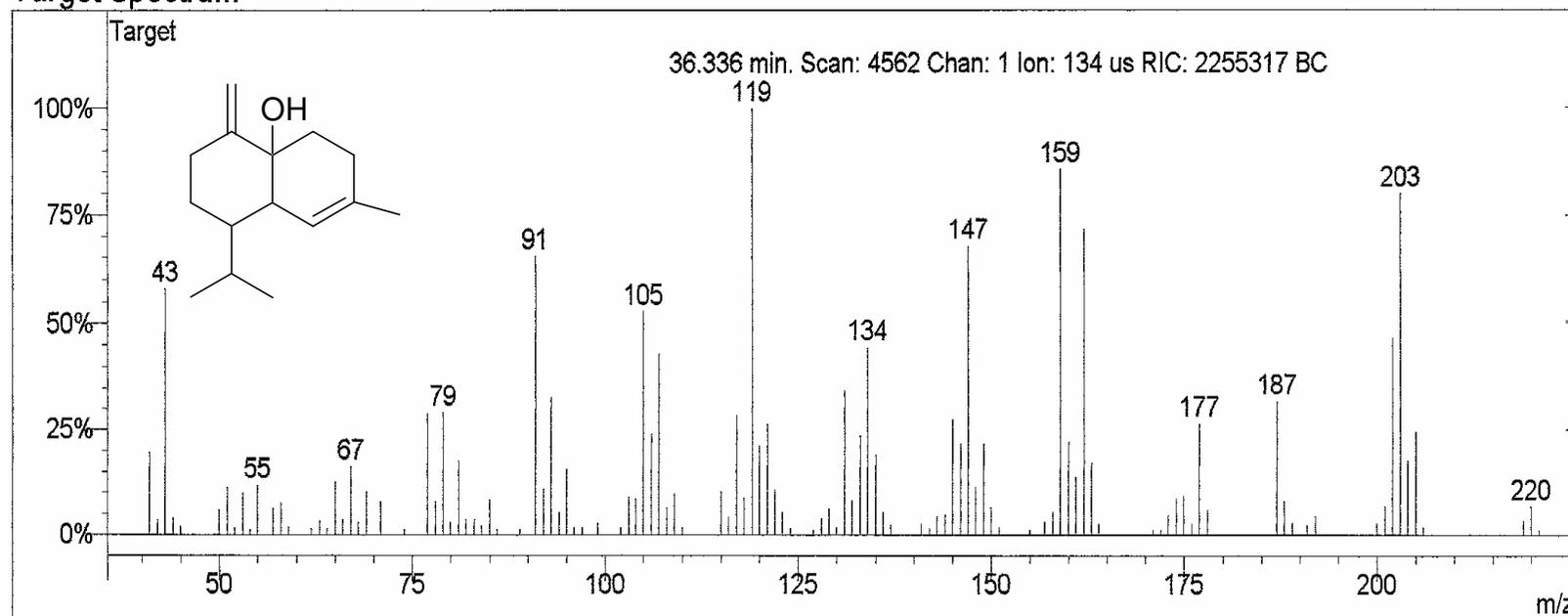


**Figura 03-** Espectro de <sup>13</sup>C- RMN (75 MHz) do 1-isopropil-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8a-hexahidro-2H-naftalen-4 $\alpha$ -ol em CDCl<sub>3</sub>, TMS como padrão interno de referência



**Figura 04-** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN/ DEPT-135 (75 MHz) do 1-isopropil-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8a-hexahidro-2H-naftalen-4 $\alpha$ -ol em  $\text{CDCl}_3$  TMS como padrão interno de referência

### Target Spectrum



**Figura 05-** Espectro de massa (70 eV) do 1-isopropil-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8a-hexahidro-2H-naftalen-4 $\alpha$ -ol

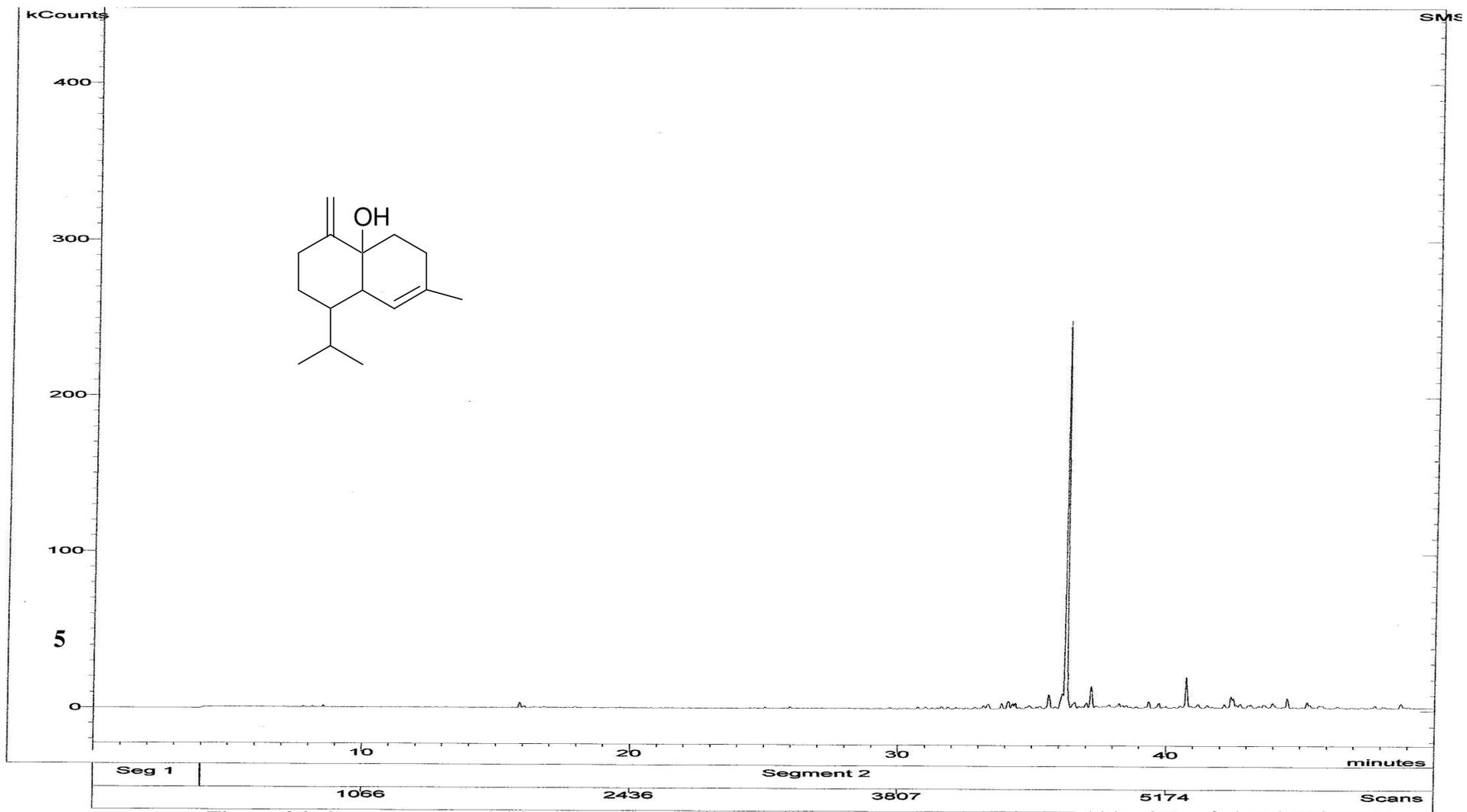
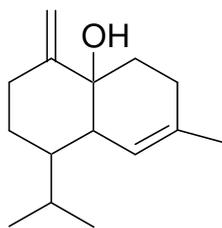


Figura 06- Cromatograma obtido para o 1-isopropil-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8a-hexahidro-2H-naftalen-4 $\alpha$ -ol

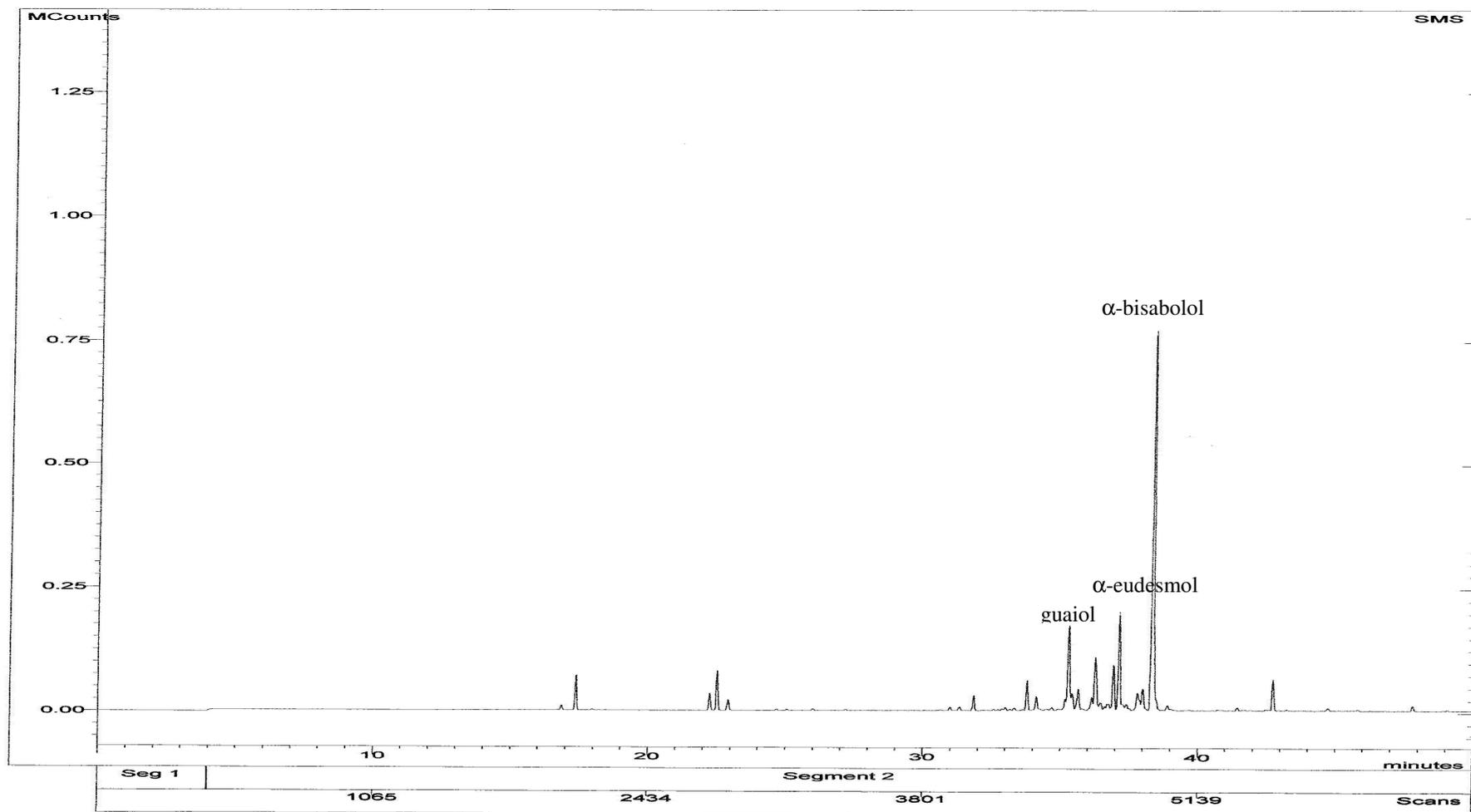


**Figura 07-** Estrutura do 1-isopropil-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8a-hexahidro-2H-naftalen-4 $\alpha$ -ol

#### 4.5 Ensaio Quantitativo de Avaliação da Atividade Antioxidante do Óleo e das Substâncias Isoladas do Óleo das Cascas do Caule de *Croton Urucurana* frente ao DPPH

O óleo das cascas do caule *C. urucurana* apresentou uma  $CI_{50}$  de 3,2 mg mL<sup>-1</sup> no ensaio espectrofotométrico da atividade seqüestradora do radical livre DPPH, o que revela que o óleo essencial testado é um agente antioxidante mais fraco que o padrão comercial BHT, que apresenta  $CI_{50}$  0,18 mg.mL<sup>-1</sup> no mesmo teste. O sesquiterpenóide isolado 1-isopropil-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8-hexahidro-2H-naftalen-4 $\alpha$ -ol (**Figura 07**) não mostrou atividade antioxidante.

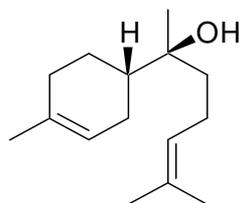
Como o óleo essencial bruto das cascas do caule de *C. urucurana* exibiu atividade antioxidante nos testes com DPPH, o mesmo foi submetido à CCDP, visando o isolamento das frações responsáveis pelas propriedades antioxidantes. Desta forma, foram obtidos 6mg de uma fração ativa frente ao DPPH. Esta fração foi analisada por CG-EM apresentando 21 componentes principais (**Tabela 04**), correspondendo a 87,1% do total de substâncias presentes na mesma. Os principais materiais identificados nesta fração foram o  $\alpha$ -bisabolol (38,3%),  $\alpha$ -eudesmol (9,3%) e guaiol (8,2%) (**Figura 08**), que estavam presentes no óleo essencial bruto das cascas do caule de *C. urucurana* em proporções bem inferiores àquela encontrada na fração antioxidante. A fração antioxidante isolada do óleo essencial bruto exibiu  $CI_{50}$  de 1,05 mg/mL no ensaio quantitativo com DPPH, o que indica que este óleo também é um agente antioxidante mais fraco que o BHT ( $CI_{50}$ = 0,18 mg.mL<sup>-1</sup>).



**Figura 08-** Cromatograma CG-EM da fração com atividade antioxidante do óleo essencial das cascas do caule de *C.*

*urucurana*

Há referências na literatura (VANZYL *et al.*, 2006; HOU *et al.*, 2007) descrevendo atividade antioxidante para o  $\alpha$ -bisabolol, o que possivelmente justifica a atividade antioxidante apresentada pela fração do óleo das cascas de *C. urucurana* que contém este sesquiterpenóide (**Figura 09**) como principal componente.



**Figura 09-** Estrutura do sesquiterpenóide  $\alpha$ -bisabolol

#### 4.6 Atividades Antibacteriana e Antifúngica do Óleo da Cascas do Caule de *Croton urucurana*

A atividade antimicrobiana do óleo essencial da casca do caule de *C. urucurana* foi examinada pelo ensaio de microdiluição frente a dez microorganismos.

**Tabela 05-** Atividade antimicrobiana do óleo essencial bruto das cascas do caule de *C. urucurana*

Microorganismos <sup>a</sup>	Óleo essencial		Padrões <sup>b,c</sup>
	CMI <sup>b</sup>	CML <sup>b</sup>	CMI <sup>b</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2,5	>20	3,12 x10 <sup>-3</sup>
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	1,25	>20	3,12 x10 <sup>-3</sup>
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	10	>20	1,56 x10 <sup>-3</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC27853)	2,5	>20	3,12 x10 <sup>-3</sup>
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11103)	1,25	>20	3,12 x10 <sup>-3</sup>
<i>Salmonella setubal</i> (ATCC 19796)	2,5	>20	3,12 x10 <sup>-3</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 10031)	5	>20	1,56 x10 <sup>-3</sup>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 2601)	5	5	10,3 x10 <sup>-3</sup>
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	10	10	10,3 x10 <sup>-3</sup>
<i>Cryptococcus neoformans</i> (ATCC 28952)	5	5	5,15 x10 <sup>-3</sup>

<sup>a</sup> ATCC (American Type Culture Collection). <sup>b</sup> Média de 3 replicatas em mg.mL<sup>-1</sup>. <sup>c</sup> Agentes antimicrobianos padrões: cloranfenicol frente às bactérias e nistatina frente aos fungos.

Os resultados apresentados na **Tabela 05** revelam que houve inibição do crescimento de todos os microorganismos, e que *S. epidermidis* e *E. coli* (CMI = 1,25 mg.mL<sup>-1</sup>) foram os mais sensíveis, enquanto que *B. subtilis* e *C. albicans* foram os microorganismos mais resistentes (CMI =10 mg.mL<sup>-1</sup>). Os resultados descritos foram publicados na Revista

#### 4.7 Avaliação da Atividade Citotóxica de Materiais Obtidos do Óleo da Casca de *C. urucurana*

Para a avaliação da atividade antineoplásica foi utilizado o método da SRB (sulforodamina B) descrito por SKEHAN *et al.*, (1990). Na **Tabela 06** os resultados são expressos como média e desvio padrão resultantes de dois experimentos independentes.

**Tabela 06-** Atividade citotóxica das substâncias obtidas de *C. urucurana* frente células de MCF7 (carcinoma de mama)

Material	CI <sub>50</sub> (µg/mL)*	Atividade**
<i>Cis</i> -platina (controle positivo)	1,8 ± 0.3	FORTE
Sesquiterpenóide isolado	15,5 ± 6	FORTE
Óleo cascas <i>Croton urucurana</i>	15,4 ± 3.0	FORTE

\*CI<sub>50</sub>: Dose que inibe 50% do crescimento celular (µ /mL), Média ± Desvio Padrão

\*\* Forte atividade citotóxica - valores de CI<sub>50</sub> menores que 25 µg/mL; fraca atividade – CI<sub>50</sub> maior que 25 µg/mL (CALDERON *et al.*, 2003).

O óleo bruto obtido das cascas do caule de *C. urucurana*, bem como o sesquiterpenóide isolado a partir deste, apresentaram forte atividade citotóxica frente a células de carcinoma de mama MCF-7, tendo, portanto, potencial para uso terapêutico (estes resultados estão descritos no artigo submetido para publicação na Revista Planta Médica (ANEXO 2).

#### 4.8 Atividade Antioxidante de *M. vacciniifolia*

O extrato etanólico bruto e as frações EtOH/H<sub>2</sub>O, AcOEt e hexânica foram submetidos a testes qualitativos em CCD, quanto à atividade antioxidante frente ao DPPH. Os resultados expressos na **Tabela 07** indicam que o EEB e a fração AcOET apresentam forte atividade antioxidante.

**Tabela 07-** Atividade antioxidante do extrato etanólico bruto e frações de *M. vacciniifolia* em testes em CCD, frente ao DPPH

Amostra	Ensaio de Redução do Radical DPPH
Extrato Etanólico Bruto	+++
Fração AcOEt	+++
Fração H <sub>2</sub> O/EtOH	++
Fração hexânica	-

Nota: O grau de atividade foi determinado qualitativamente a partir da observação da intensidade da cor, +++ forte, ++ moderado, + fraco, - sem atividade.

A concentração que forneceu 50% da inibição (CI<sub>50</sub>) foi calculada a partir do gráfico em que plota-se o percentual de inibição contra concentração da amostra. A partir da equação da reta obtida, os valores lidos foram aplicados nesta determinando-se assim, a concentração necessária para reduzir o DPPH quando o percentual de inibição é 50% (**Tabela 08**).

**Tabela 08-** Atividade antioxidante representada pelo CI<sub>50</sub>, do extrato etanólico bruto e frações de *M. vacciniifolia*, frente ao DPPH

Amostra	Teste DPPH (CI <sub>50</sub> (mg. mL <sup>-1</sup> ))
Extrato Etanólico Bruto	2,58±0,13
Fração AcOEt	0,99±0,02
Fração H <sub>2</sub> O/EtOH	4,28±0,09
Fração Hexânica	-
BHT	0,18 ±0,02

De acordo com os valores obtidos, apresentados na **Tabela 08** para o teste com DPPH, a fração hexânica não apresentou CI<sub>50</sub> significativo, isto porque até às concentrações avaliadas, a fração hexânica não forneceu 50% de inibição. Os demais extratos apresentam valores de CI<sub>50</sub> na faixa de 0,99 a 4,28 mg.mL<sup>-1</sup>. Portanto, com base no valor de CI<sub>50</sub>, infere-se que a fração AcOEt contém a maior quantidade de compostos antioxidantes, seguida pelo extrato etanólico bruto. A fração AcOEt apresentou um valor de CI<sub>50</sub> 5,9 maior que o do BHT, considerado um antioxidante-padrão altamente potente. Este valor de CI<sub>50</sub> é relevante por se tratar de um extrato, o qual apresenta em sua composição varias substâncias, sendo que algumas podem potencializar o efeito antioxidante e outras terem efeito inverso. Os testes foram realizados em triplicata. Os desvios-padrão obtidos foram bons no teste DPPH,

não ultrapassando o 5,04%.

#### 4.9 Determinação do Teor de Fenóis Totais e Flavonóides

O teor de fenóis totais contidos no extrato etanólico bruto e frações semipurificadas de *M. vacciniifolia* foram determinados pelo ensaio colorimétrico, usando o reagente Folin-Ciocalteu, sendo os resultados expressos como equivalentes ao ácido gálico. O teor de flavonóides foi determinado pelo método que forma o complexo flavonóide-alumínio. Na **Tabela 09** são apresentados os teores de fenóis totais e flavonóides obtidos para o extrato etanólico bruto de *M. vacciniifolia* e as frações oriundas deste. Os desvios padrão obtidos para cada amostra foram bons, e com isso, os coeficientes de variação para o teste dos fenóis variaram de 1,12 % a 4,81% e para o teste de flavonóides, de 0,97 % a 4,07%. De acordo com os dados descritos na **Tabela 09**, a amostra que apresentou maior teor de compostos fenólicos totais e flavonóides foi a fração AcOEt.

**Tabela 09-** Teor de fenóis totais e flavonóides para o extrato o etanólico bruto e frações de *M. vacciniifolia*

Amostra	Teor de Fenóis Totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ do extrato)	Teor de Flavonóides ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ do extrato)
Extrato Bruto	75,42 $\pm$ 2,11	9,58 $\pm$ 0,39
Fração AcOEt	93,60 $\pm$ 1,11	25,39 $\pm$ 0,97
Fração H <sub>2</sub> O/EtOH	45,08 $\pm$ 2,17	6,20 $\pm$ 0,06
Fração Hexânica	6,20 $\pm$ 0,29	51,65 $\pm$ 0,70

O teor de fenóis totais em *M. vacciniifolia* foi determinado de acordo com o método de Folin-Ciocalteu, que não faz medidas da quantidade de materiais fenólicos, mas é, na realidade, baseado na capacidade química de redução destes em relação a uma capacidade de redução equivalente do ácido gálico. De acordo com KATALINIC *et al* (2003), vários compostos fenólicos possuem diferentes respostas neste ensaio.

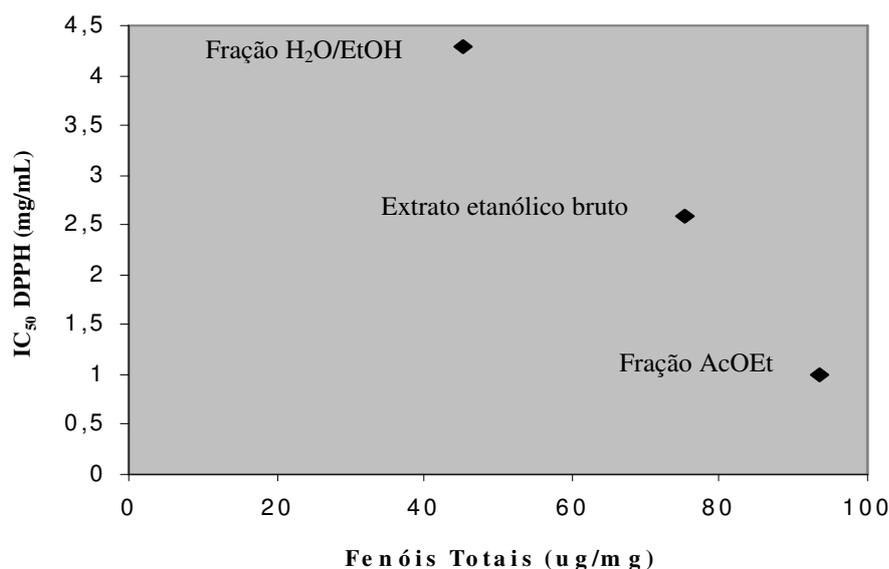
O conteúdo de flavonóides nos extratos foi determinado espectrofotometricamente, em análise baseada na formação de um complexo flavonóide-alumínio. A quercetina foi usada como referencia na obtenção da curva analítica.

A fração AcOEt do extrato etanólico bruto de *M. vacciniifolia* apresentou o

maior teor de flavonóides, o maior teor de fenóis totais e a maior atividade antioxidante frente ao teste DPPH. Entre as amostras analisadas o extrato bruto apresentou uma correlação entre o teor de fenóis e a atividade antioxidante, mas o teor de flavonóides obtido foi menor do que o da fração hexânica. Nesta fração a atividade antioxidante e o teor de fenóis obtidos foram os menores entre as amostra analisadas, mas o teor de flavonóides foi muito superior ao teor de fenóis. Este fato pode ser explicado, porque alguns compostos que reagem formando o complexo alumínio-flavonóide não reagem com o complexo Folin Ciocalteau (ORTURK *et al.*, 2007).

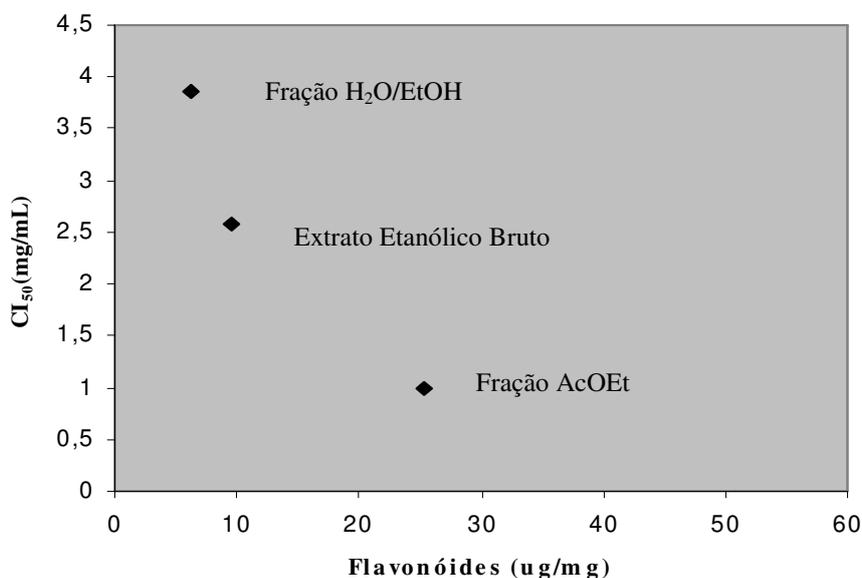
#### 4.10 Relação entre o teor de fenóis e flavonóides e valores de $CI_{50}$ obtidos no teste frente ao DPPH

No **Gráfico 03** verifica-se que os valores de  $CI_{50}$  obtidos para o extrato etanólico bruto e as frações AcOEt e EtOH / H<sub>2</sub>O são coerentes, pois quanto menor o valor de  $CI_{50}$ , maior foi a concentração de compostos fenólicos medida. A fração hexânica não apresentou  $CI_{50}$  para as concentrações testadas, o que se mostra bastante aceitável, uma vez que o teor de fenóis totais para esta fração foi muito pequeno.



**Gráfico 03-** Relação entre teor de fenóis totais e  $CI_{50}$  no teste DPPH frente ao DPPH do extrato etanólico bruto e frações AcOEt e H<sub>2</sub>O/EtOH de *M. vacciniifolia*

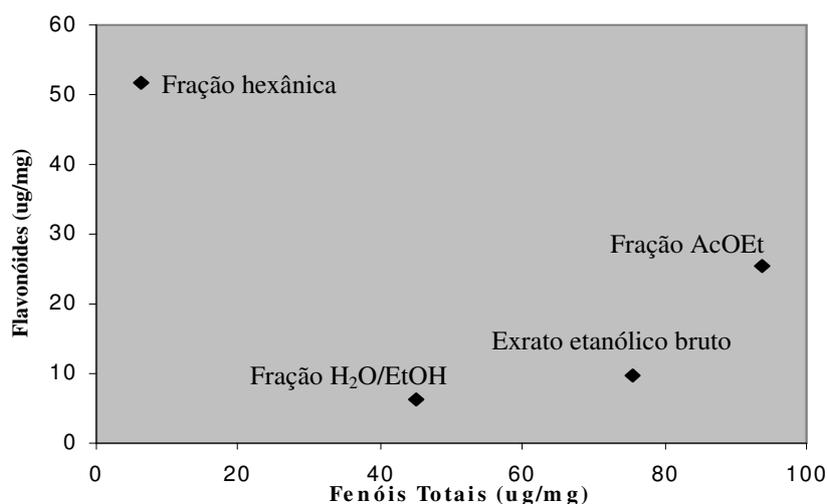
De acordo com os dados do **Gráfico 04**, os valores de  $CI_{50}$  obtidos para o extrato etanólico bruto e as frações AcOEt e  $H_2O/EtOH$  são coerentes, pois quanto menor o valor de  $CI_{50}$ , maior a concentração de flavonóides determinada. A fração hexânica, por sua vez, não apresentou  $CI_{50}$  para as concentrações avaliadas, porém apresentou um teor de flavonóides superior ao teor das demais frações (**Tabela 09**). Este fato pode ser explicado, porque outras substâncias podem interferir no complexo formado neste teste, conduzindo a resultados falso-positivos (ORTURK *et al.*, 2007).



**Gráfico 04-** Relação entre o teor de flavonóides e a  $CI_{50}$  no teste DPPH do extrato etanólico bruto e frações AcOEt e  $H_2O/EtOH$  de *M. vacciniifolia*

#### 4.11 Relação entre o Teor de Fenóis e Flavonóides

A relação entre os teor de fenóis totais e o teor de flavonóides é bastante coerente com relação ao extrato bruto e as frações AcOEt e hidroetanólica (**Tabela 09**). De acordo com o **Gráfico 05**, quanto maior a concentração de fenóis totais, maior é a concentração de flavonóides, a única fração em que diverge essa relação é a fração hexânica.

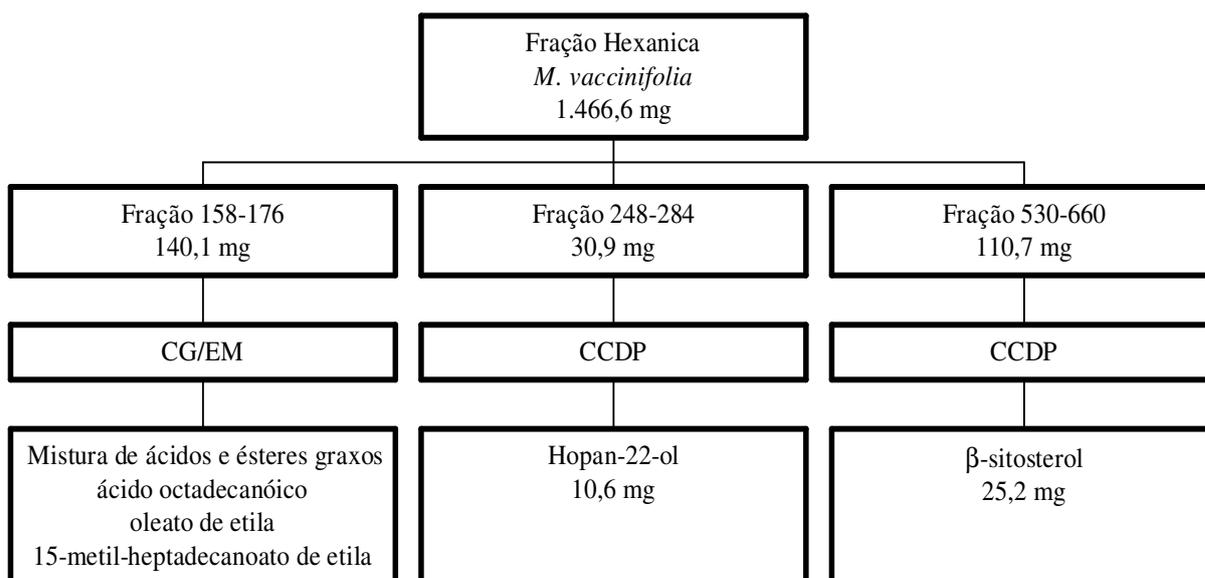


**Gráfico 05-** Relação entre teor de fenóis totais e flavonóides do extrato etanólico bruto e frações semi-purificadas de *M. vacciniifolia*

#### 4.12 Substâncias Isoladas da Fração Hexânica de *Microgramma vacciniifolia*

A fração hexânica do extrato etanólico bruto de *M. vacciniifolia* foi submetida a cromatografia em coluna sobre sílica gel e eluída com misturas de hexano, AcOEt, EtOH e água com polaridades crescentes, tendo-se isolado as substância descritas no

#### Esquema 06.



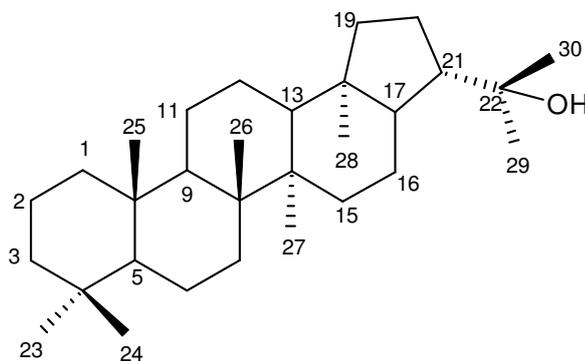
**Esquema 06 -** Substâncias isoladas da fração hexânica de *M. vacciniifolia*.

#### 4.12.1 Identificação do hopan-22-ol

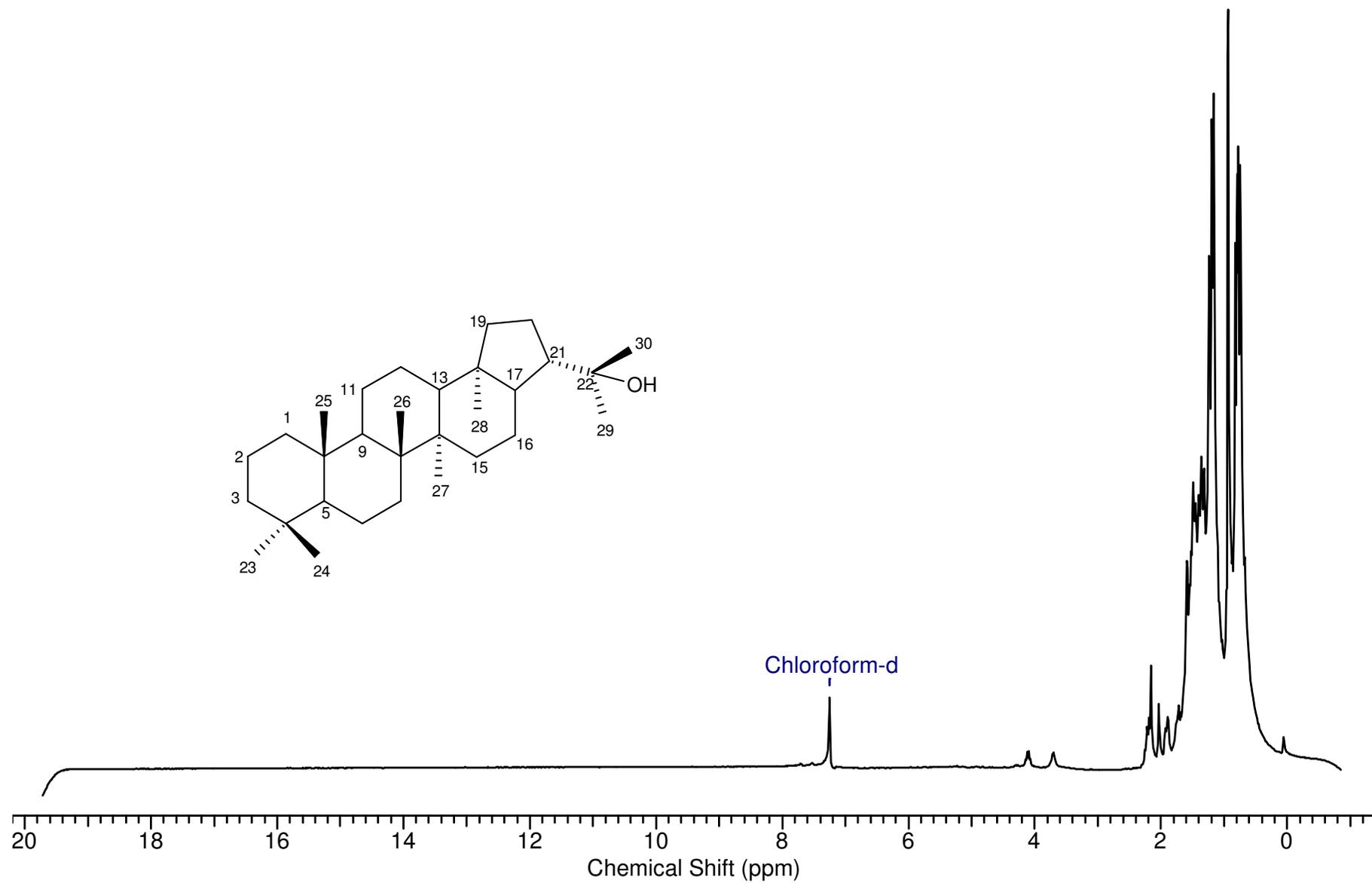
A fração 248-284, eluída com uma mistura de hexano/AcOEt 98:2, apresentou-se como um sólido amarelo pálido. O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (**Figura 11**), apresentou um conjunto de sinais (singletes) com valores de deslocamentos químicos entre 0,7 e 1,2 ppm, característicos de hidrogênios metílicos. A comparação com dados de deslocamentos químicos da literatura (SHIOJIMA, ARAI & AGETA, 1990), foram coerentes para o Hopan-22-ol, em particular, para os hidrogênios metílicos sobrepostos com deslocamento químico de 0,960 ppm, que na amostra foi atribuído ao sinal em  $\delta$  0,931 ppm com integração equivalente a seis hidrogênios. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Figura 12**) mostrou a presença de vinte e nove, sinais sendo um sinal duplo com  $\delta$  de 18,7 ppm. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  -DEPT 135 (**Figura 13**) revelou a presença de cinco carbonos metínicos com deslocamentos entre 49,8 e 56,0 ppm. O conjunto de informações indicou que a substância era um triterpenóide pentacíclico. O sinal com deslocamento químico de 73,9 ppm corresponde a um carbono carbinólico metínico; os demais sinais com deslocamentos químicos entre 15,8 e 42,1 ppm foram atribuídos a carbonos metílicos, metilênicos e quaternários, que foram determinados pela análise do DEPT 135°. No espectro do hopan-22-ol no infravermelho (**Figura 14**) (pastilha de KBr), há as bandas características a  $3490\text{ cm}^{-1}$  (deformação axial de O-H intermolecular),  $2943\text{ cm}^{-1}$  (deformação axial assimétrica de C-H de grupos metilênicos  $\text{CH}_2$ ),  $2864\text{ cm}^{-1}$  (deformação axial simétrica de C-H de grupos metilênicos  $\text{CH}_2$ ). Na literatura (SHIOJIMA, ARAI & AGETA, 1990) foram relatadas bandas principais para o hopan-22-ol :  $3340$ ,  $2926$  e  $2861\text{ cm}^{-1}$ . A identificação da substância como sendo hopan-22-ol (**Figura 10**), foi possível pela comparação dos dados (**Tabela 10**) com dados da literatura (AGETA *et al.*, 1993). A estereoquímica do hopan-22-ol foi definida por AGETA *et al.*, (1993) usando o programa Chem3D Plus na MM2, que forneceu a energia conformacional mínima.

**Tabela 10** - Dados de deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75MHz) e  $^1\text{H}$  (300 MHz) obtidos para o triterpenóide hopan-22-ol (em  $\text{CDCl}_3$ ), comparados com a literatura (AGETA *et al.*, 1993).

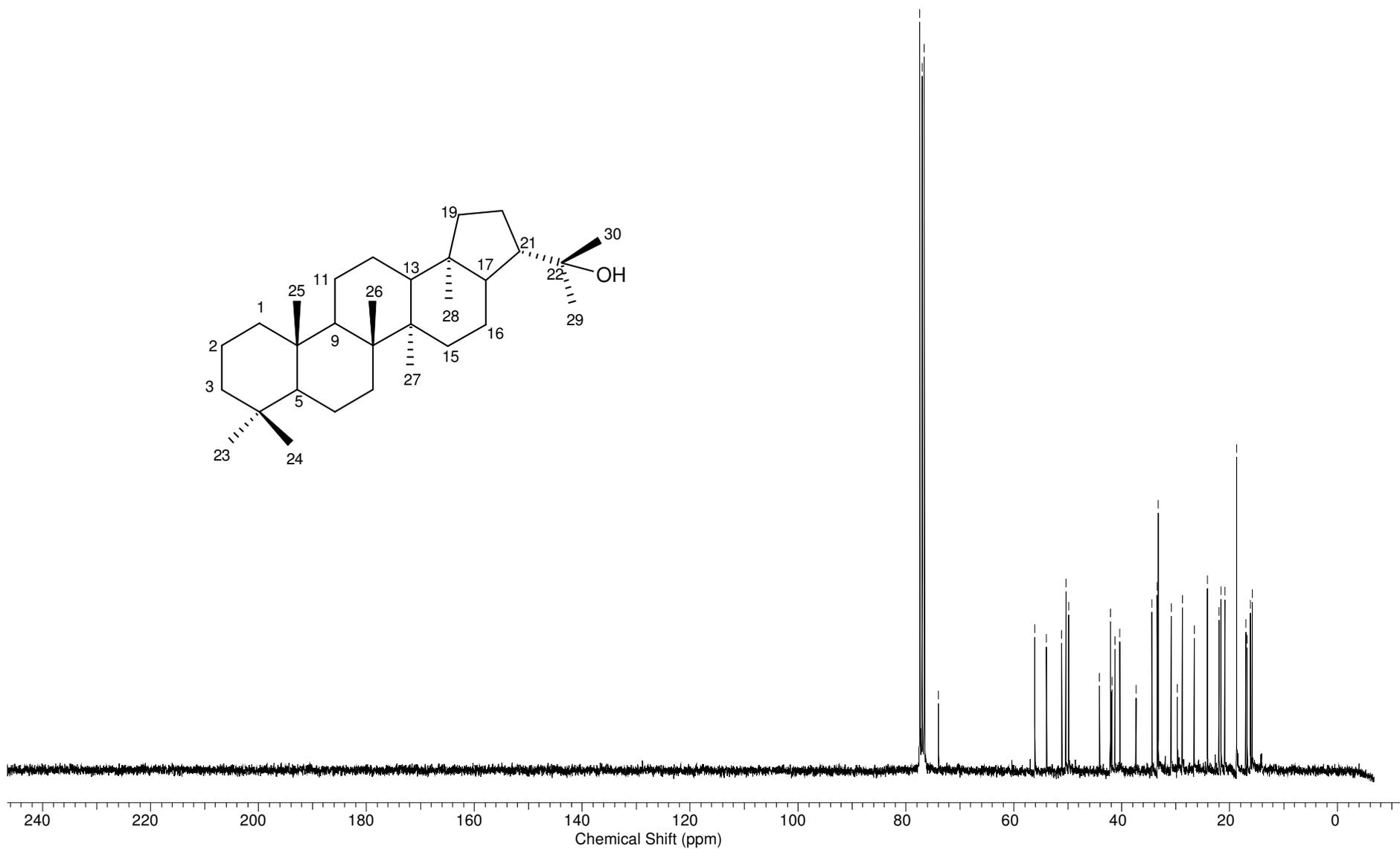
C	$\delta$ de C (ppm)	$\delta$ de C (ppm)	$\delta$ de H (ppm)	C	$\delta$ de C (ppm)	$\delta$ de C (ppm)	$\delta$ de H (ppm)
	248-284	Literat			248-284	Literat.	
<b>1</b>	40,3	40,2		<b>16</b>	21,9	21,9	
<b>2</b>	18,7	18,6		<b>17</b>	53,9	53,9	1,445; m
<b>3</b>	42,1	42,1		<b>18</b>	44,1	44,0	
<b>4</b>	33,3	33,2		<b>19</b>	41,2	41,2	
<b>5</b>	56,1	56,0	0,703; dd	<b>20</b>	26,6	26,6	
<b>6</b>	18,7	18,6		<b>21</b>	51,1	51,1	2,151; m
<b>7</b>	33,4	33,2		<b>22</b>	73,9	73,9	1,586; OH
<b>8</b>	41,9	41,9		<b>23</b>	33,3	33,4	0,853, s
<b>9</b>	50,4	50,3	1,230; dd	<b>24</b>	21,6	21,6	0,788, s
<b>10</b>	37,4	37,3		<b>25</b>	15,8	15,8	0,820, s
<b>11</b>	20,9	20,8		<b>26</b>	16,7	16,7	0,931, s
<b>12</b>	24,2	24,1	1,392; m	<b>27</b>	17,0	17,0	0,931, s
<b>13</b>	49,8	49,8		<b>28</b>	16,1	16,1	0,766, s
<b>14</b>	41,8	41,8		<b>29</b>	28,8	28,7	1,184, s
<b>15</b>	34,4	34,3		<b>30</b>	30,9	30,8	1,200, s



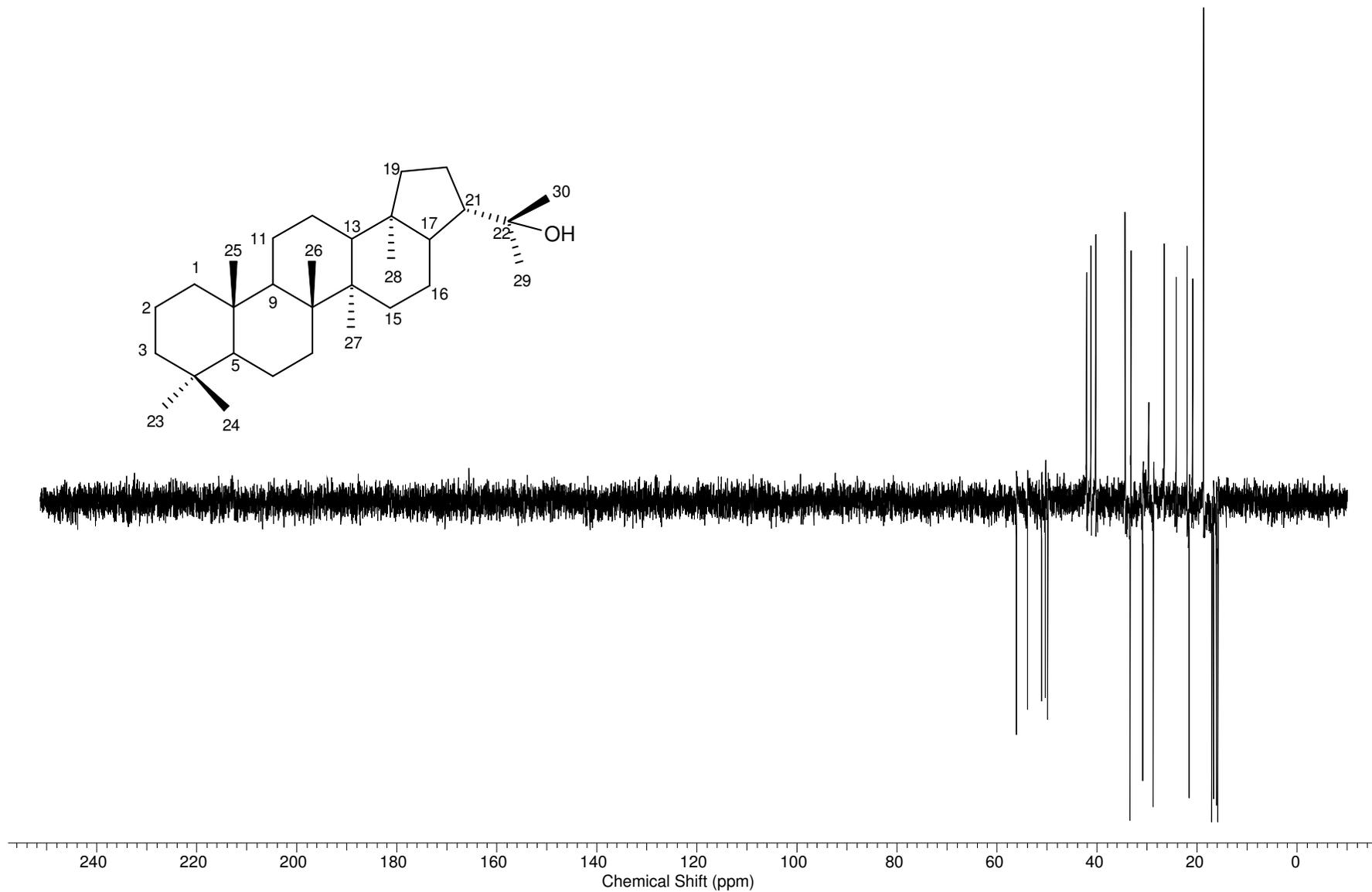
**Figura 10-** Estrutura do Hopan-22-ol



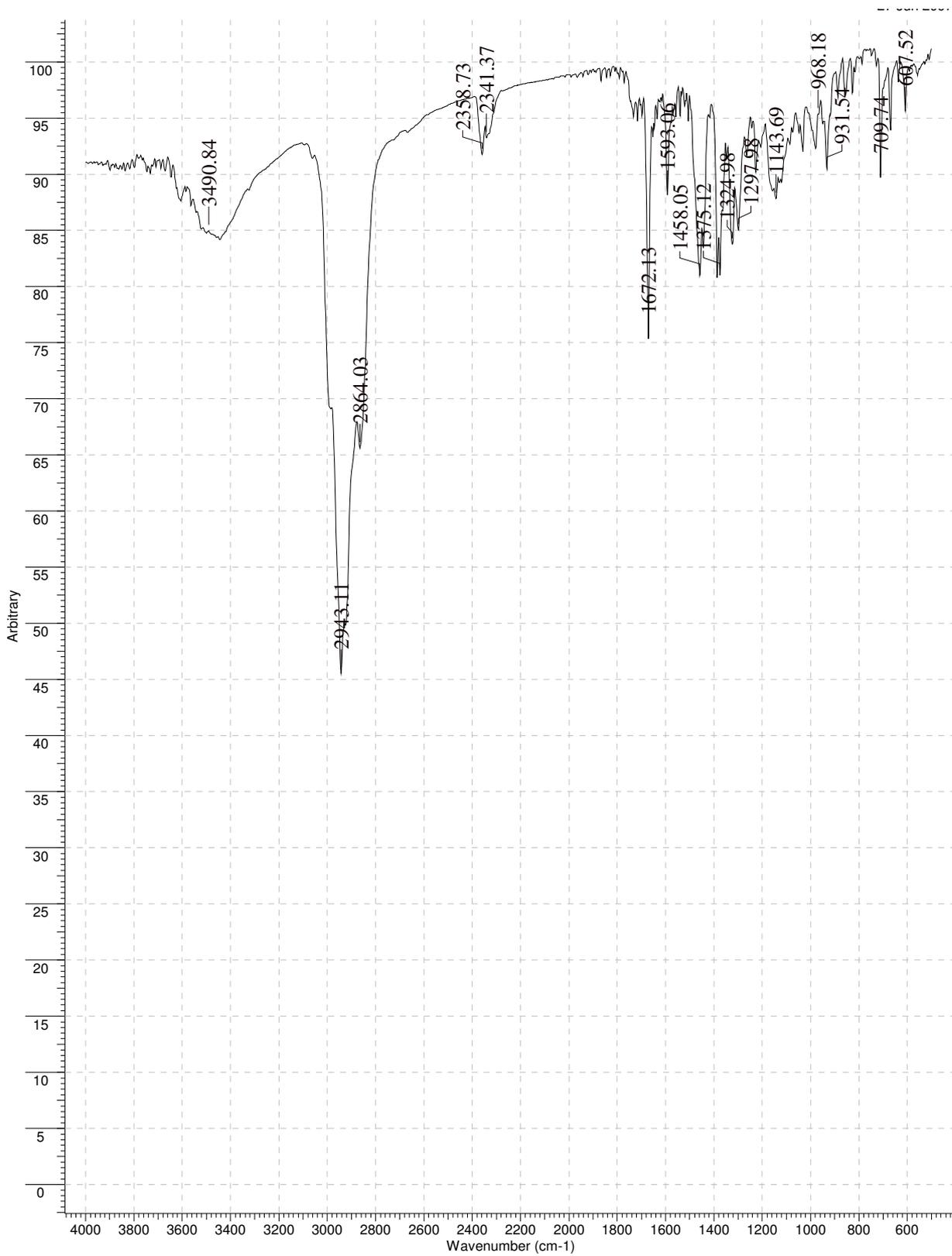
**Figura 11-** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz) do hopan-22-ol em CDCl<sub>3</sub>, TMS como padrão interno de referência



**Figura 12-** Espectro de <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz) do hopan-22-ol em CDCl<sub>3</sub>, TMS como padrão interno de referência



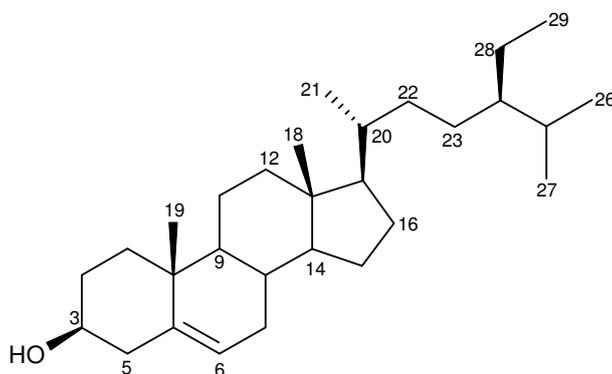
**Figura 13-** Espectro de <sup>13</sup>C-RMN/DEPT-135 (75 MHz) do hopan-22-ol em CDCl<sub>3</sub>, TMS como padrão interno de referência



**Figura 14-** Espectro de infravermelho do hopan-22-ol (pastilha de KBr; T% X cm<sup>-1</sup>)

#### 4.12.2 Identificação do $\beta$ -sitosterol

A fração 530-660 eluída com hexano/AcOEt 98:2, apresentou-se como uma substância sólida branca. O espectro de  $^1\text{H}$  - RMN (**Figura 16**) apresenta vários sinais com deslocamentos químicos entre 0,6 e 0,9 ppm, correspondentes a hidrogênios metílicos, enquanto os sinais com deslocamentos químicos entre 0,9 e 2,1 ppm, correspondem aos hidrogênios metilênicos. O dubleto com  $\delta$  5,3 ppm é atribuído a um hidrogênio olefínico vizinho a hidrogênios metilênicos equivalentes, enquanto o multiplete com  $\delta$  3,5 ppm é característico de um hidrogênio carbinólico vizinho a vários hidrogênios metilênicos. O espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (**Figura 17**) e o espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN/DEPT 135 (**Figura 18**) revelaram a presença do sinal de um carbono olefínico metínico com  $\delta$  121,7 ppm e outro carbono quaternário com  $\delta$  140,7 ppm. Revela, ainda, a presença de um carbono carbinólico com  $\delta$  71,8 ppm e a presença de mais sete carbonos metílicos com deslocamentos químicos de 56,8; 55,9; 50,1; 45,8 e 37,1 ppm, respectivamente. No espectro de infravermelho (pastilha de KBr) (**Figura 19**), há bandas características a  $3444\text{ cm}^{-1}$  (deformação axial da ligação O-H intermolecular),  $2956\text{ cm}^{-1}$  (deformação axial assimétrica da ligação C-H de grupos metílicos),  $2927\text{ cm}^{-1}$  (deformação axial assimétrica de ligação C-H de grupos metilênicos) e  $2852\text{ cm}^{-1}$  (deformação axial simétrica da ligação C-H de grupos metilênicos). O conjunto de informações sugeriu o esqueleto de esteróide. Através da comparação dos dados descritos acima com dados da literatura (WRIGHT *et al.*, 1978) constatou-se que a substância obtida foi o  $\beta$ -sitosterol (**Figura 15**). Na **Tabela 11** são apresentados os dados de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -RMN experimentais e da literatura (WRIGHT *et al.*, 1978) do  $\beta$ -sitosterol.



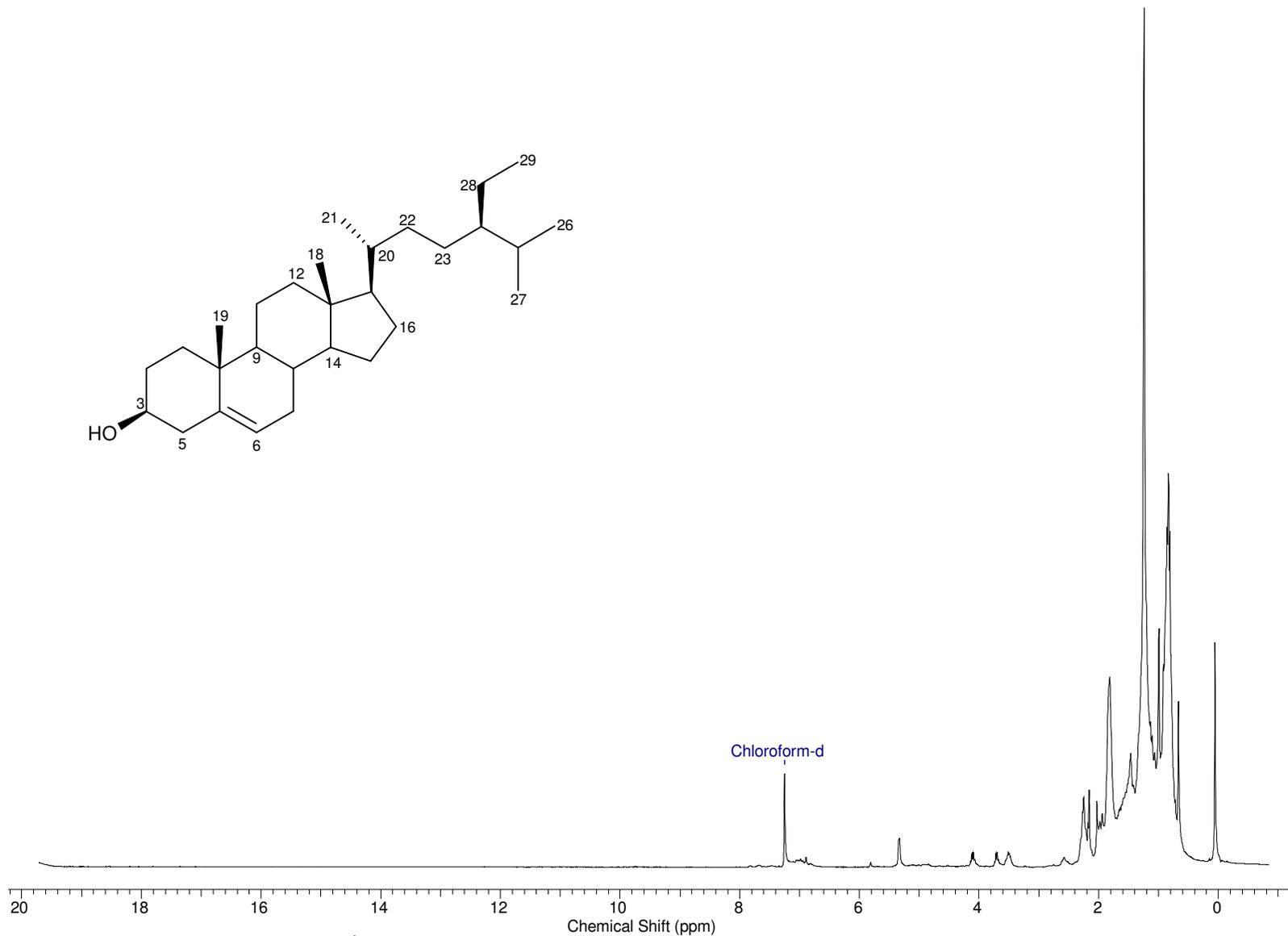
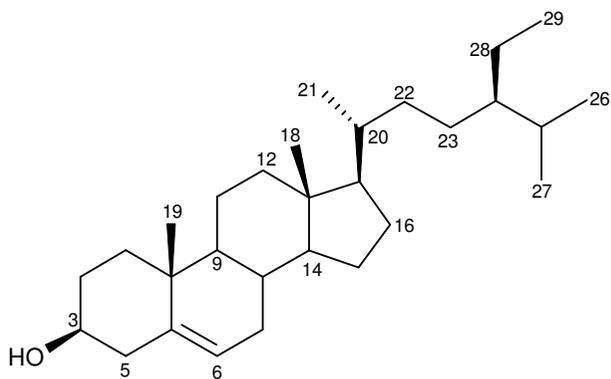
**Figura 15-** Estrutura do  $\beta$ - Sitosterol

**Tabela 11-** Dados de Deslocamentos Químicos de Rmn  $^{13}\text{C}$  (75 Mhz) obtidos para o  $\beta$ -sitosterol (em  $\text{CDCl}_3$ ), comparados com a Literatura (WRIGHT *et al.*, 1978).

<b>C</b>	<b><math>\delta</math> de C (ppm)</b>	<b><math>\delta</math> de C (ppm)</b>	<b>C</b>	<b><math>\delta</math> de C (ppm)</b>	<b><math>\delta</math> de C (ppm)</b>
	<b>530-600</b>	<b>Literat</b>		<b>Literat</b>	<b>530-600</b>
<b>1</b>	37,3	37,3	<b>16</b>	28,9	28,2
<b>2</b>	31,7	31,6	<b>17</b>	56,1	56,1
<b>3</b>	71,8	71,7	<b>18</b>	11,9	11,9
<b>4</b>	42,3*	42,3	<b>19</b>	19,4	19,4
<b>5</b>	140,8	140,8	<b>20</b>	36,2	36,2
<b>6</b>	121,7	121,6	<b>21</b>	18,8	18,8
<b>7</b>	31,9	31,9	<b>22</b>	34,0	34,0
<b>8</b>	31,9	31,9	<b>23</b>	26,1	26,1
<b>9</b>	50,2	50,2	<b>24</b>	45,9	45,9
<b>10</b>	36,5	36,5	<b>25</b>	29,2	29,2
<b>11</b>	21,1	21,1	<b>26</b>	19,8	19,8
<b>12</b>	39,8	39,8	<b>27</b>	19,1	19,0
<b>13</b>	42,3*	42,3	<b>28</b>	23,1	23,1
<b>14</b>	56,8	56,8	<b>29</b>	12,3	12,0
<b>15</b>	24,3	24,3			

\* melhor observado na ampliação no espectro, dois sinais sobrepostos.





**Figura 16-** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz) do  $\beta$ -sitosterol em  $\text{CDCl}_3$ , TMS como padrão interno de referência

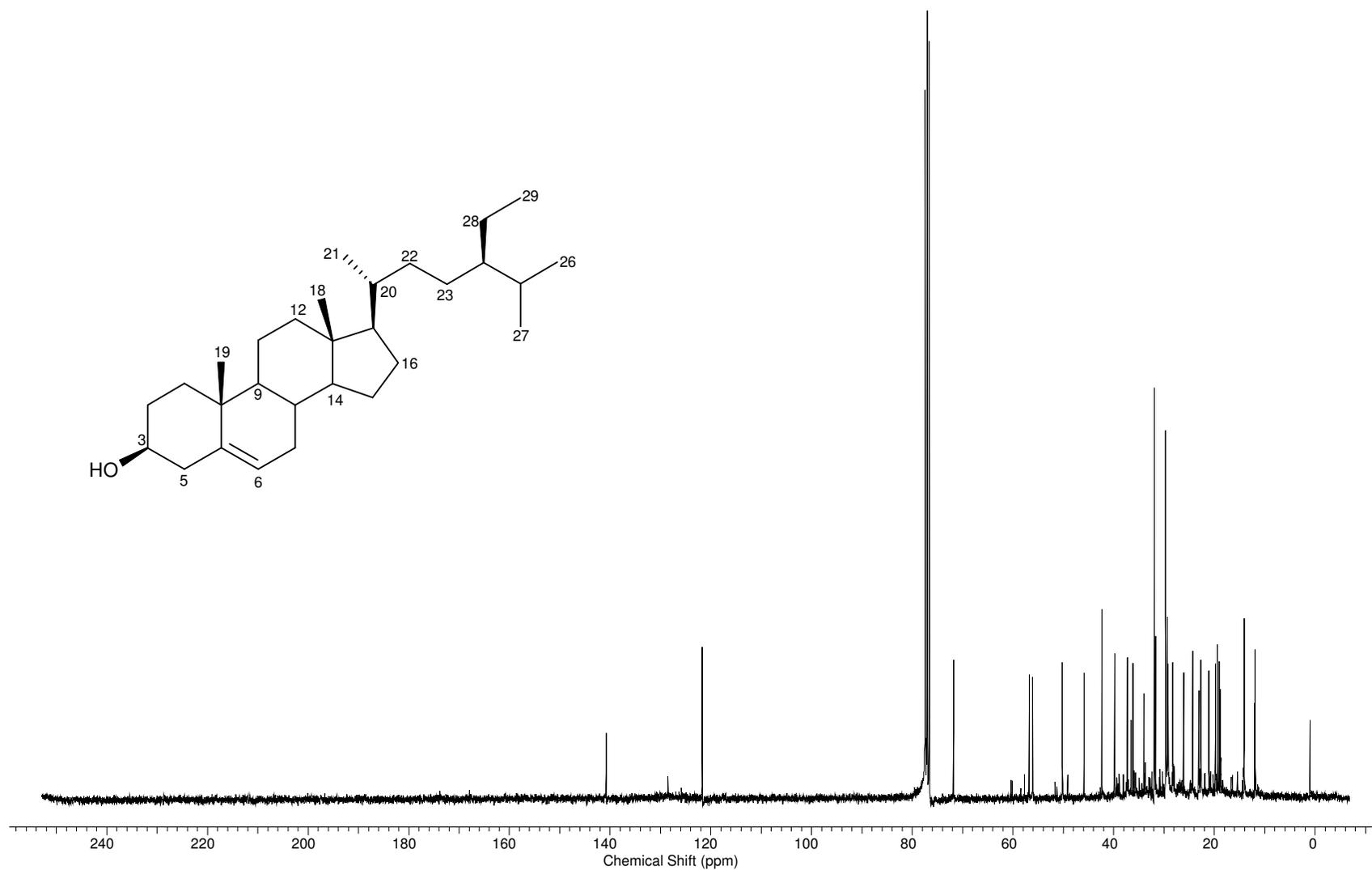
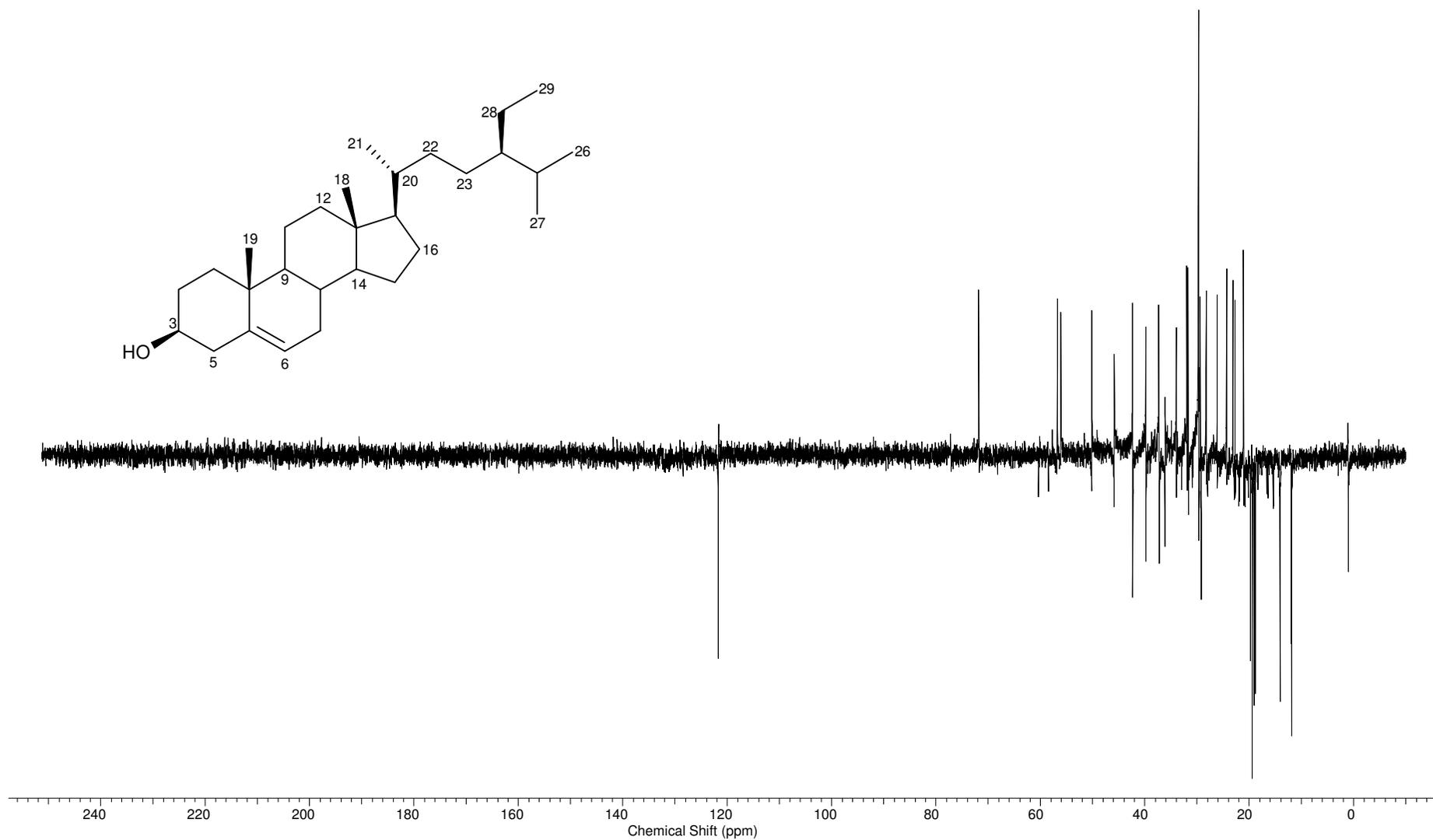


Figura 17- Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz) do  $\beta$ -sitosterol em  $\text{CDCl}_3$ , TMS como padrão interno de referência.



**Figura 18-** Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN/ DEPT-135 (75 MHz) do  $\beta$ -sitosterol em  $\text{CDCl}_3$ , TMS como padrão interno de referência.

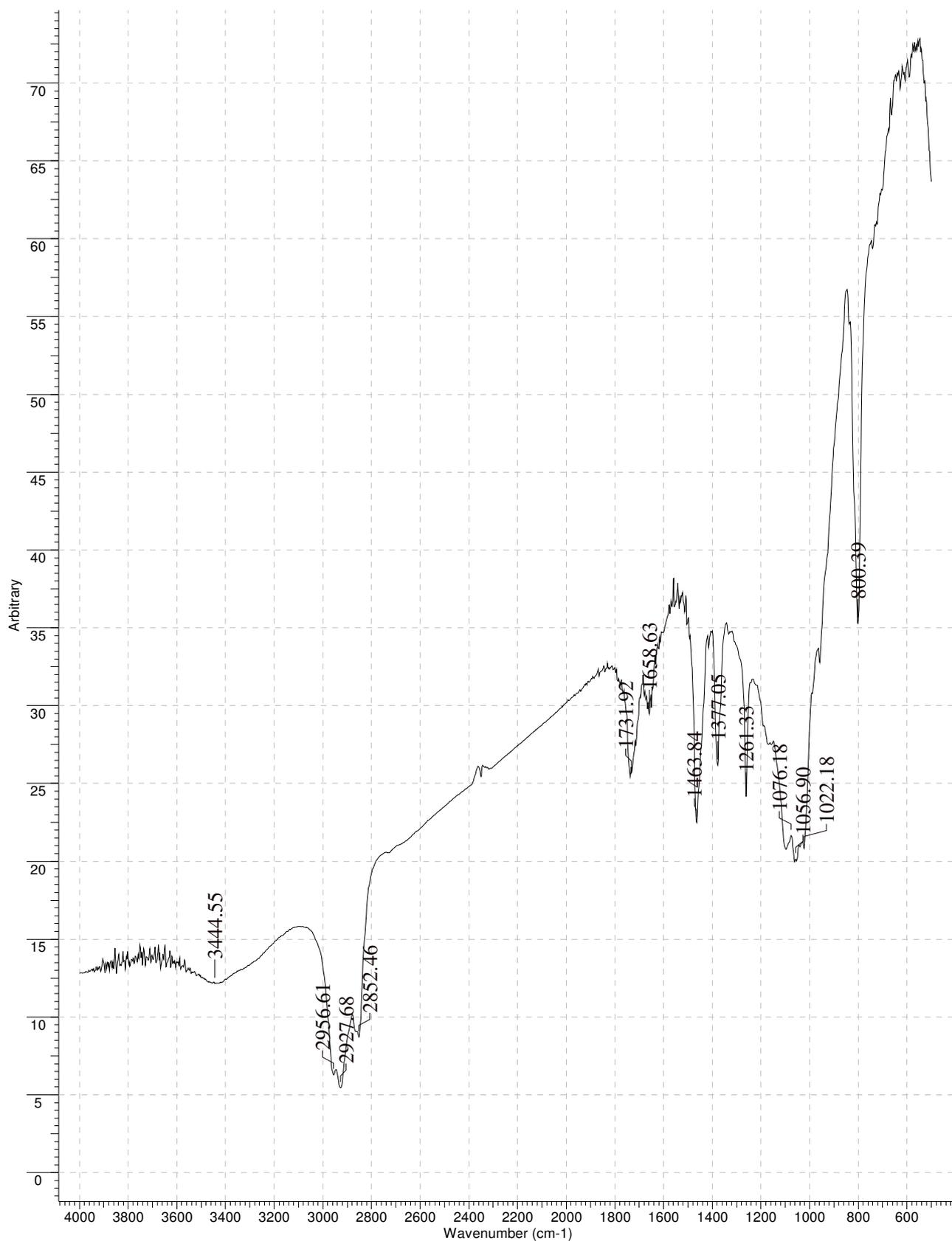
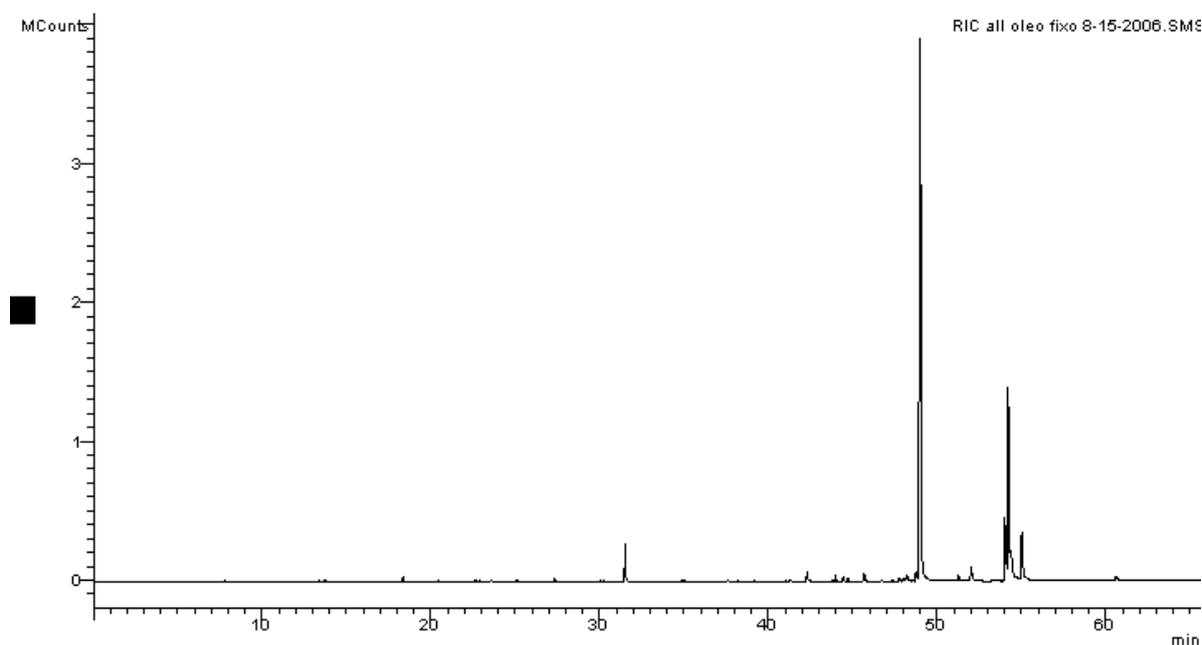


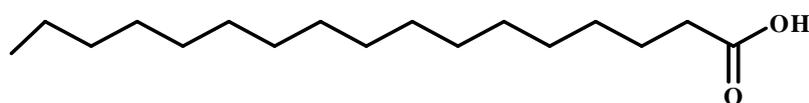
Figura 19- Espectro de Infravermelho do  $\beta$ -sitosterol (pastilha de KBr; T% X cm<sup>-1</sup>)

#### 4.12.3 Identificação da mistura de substâncias graxas da fração hexânica de *M. vacciniifolia*

A reunião das frações de 158-176, eluídas com hexano/AcOEt 99:1, da coluna cromatográfica da fração hexânica de *M. vacciniifolia* forneceu um óleo de aparência viscosa e coloração esverdeada. Esse óleo foi enviado para análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas, possibilitando a identificação de 3 substâncias graxas (**Figura 20**), em que o ácido octadecanóico corresponde a 64,7% (**Figura 21**).

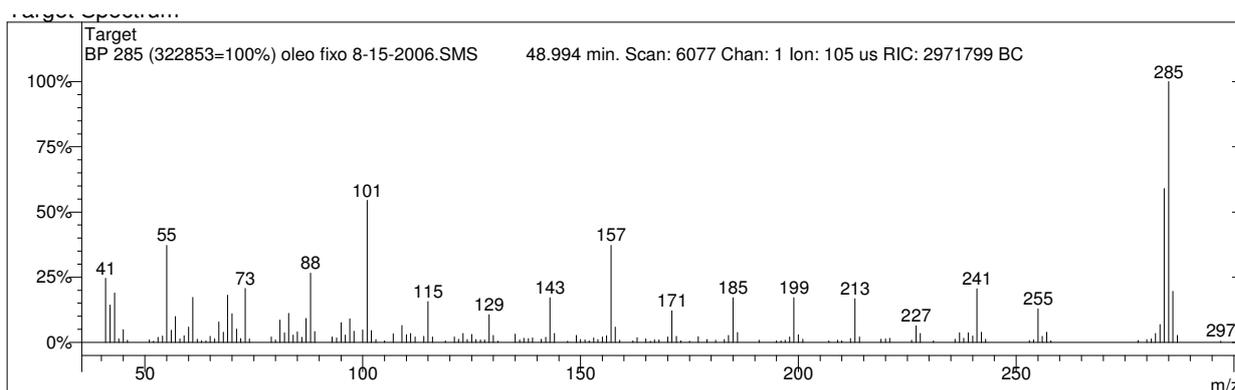


**Figura 20-** Cromatograma da fração 158-176 obtida a partir da coluna cromatográfica em que foi processada a fração hexânica de *M. vacciniifolia*



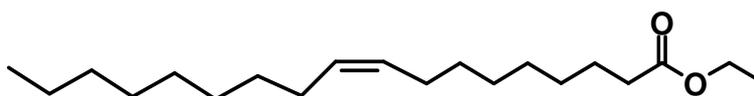
**Figura 21-** Estrutura do ácido octadecanóico

A identificação do composto foi feita mediante comparação do espectro de massas (**Figura 22**) obtido com o espectro de massas da biblioteca NIST.

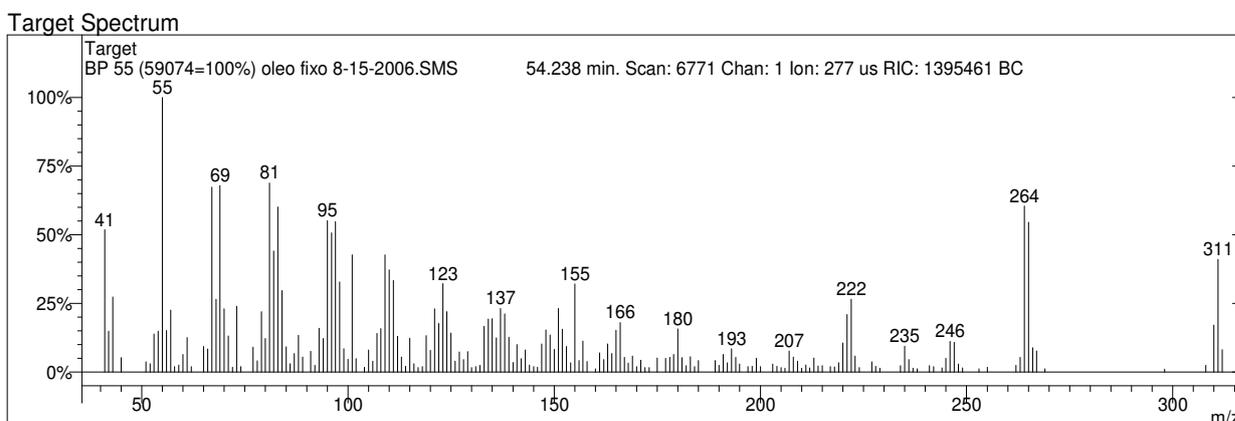


**Figura 22-** Espectro de massas (70 eV) do ácido octadecanoico

A segunda substância mais abundante na fração 158-176, eluiu em 54,254 minutos e corresponde a 13,81% do óleo, trata-se do éster oleato de etila (**Figura 23**), que foi identificado mediante comparação do espectro de massas obtido (**Figura 24**), com o espectro de massas da biblioteca NIST.

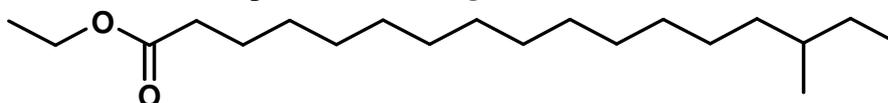


**Figura 23-** Estrutura do oleato de etila

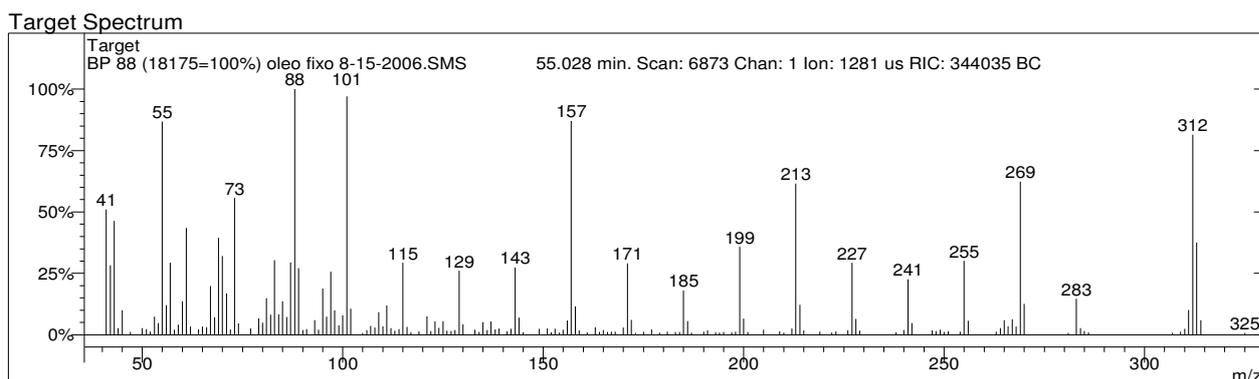


**Figura 24-** Espectro de massas (70 eV) do oleato de etila

O composto em menor quantidade (4,97%) presente no óleo fixo elui em 5,028 minutos e trata-se do éster etílico 15-metil-heptadecanoato de etila, (**Figura 25**), o espectro de massas obtido está representado na **Figura 26**.



**Figura 25-** Estrutura do 15-Metil-Heptadecanoato de Etila

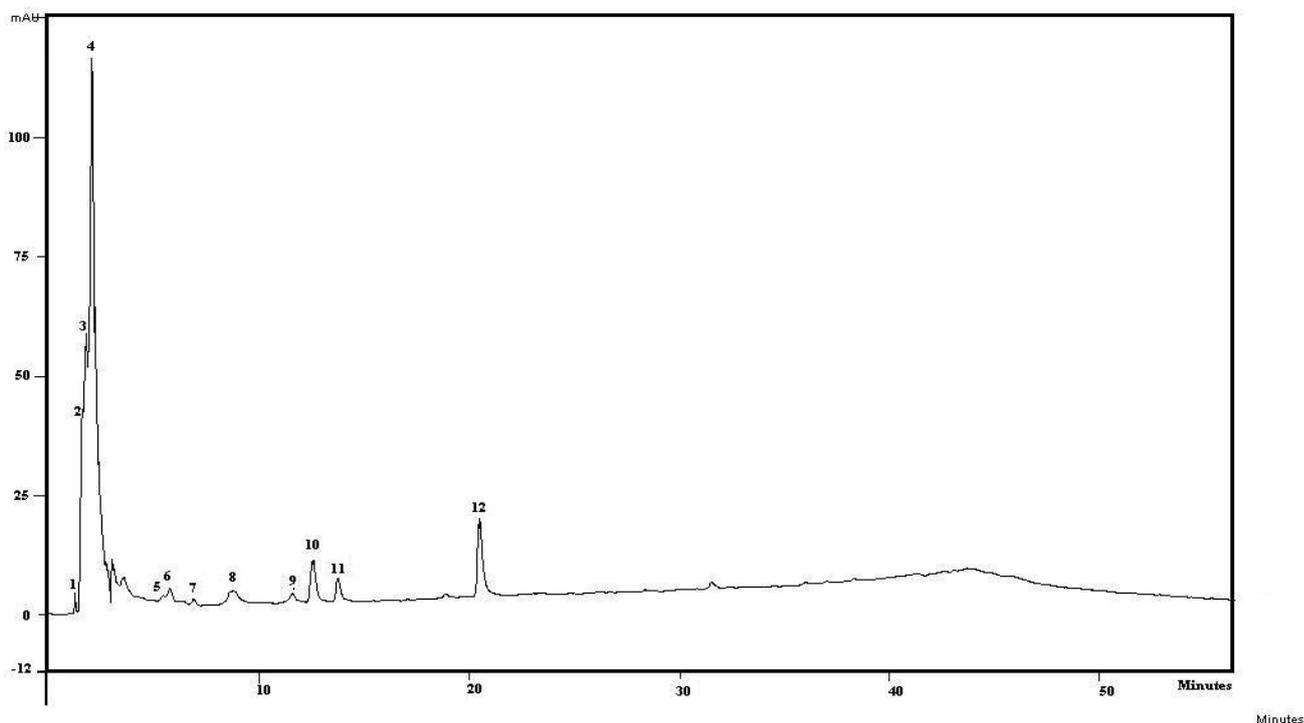


**Figura 26-** Espectro de massas (70 eV) do 15-metil-heptadecanoato de etila

#### 4.13 Estudo químico com a fração acetato de etila de *M. vacciniifolia*

##### 4.13.1 CLAE analítica

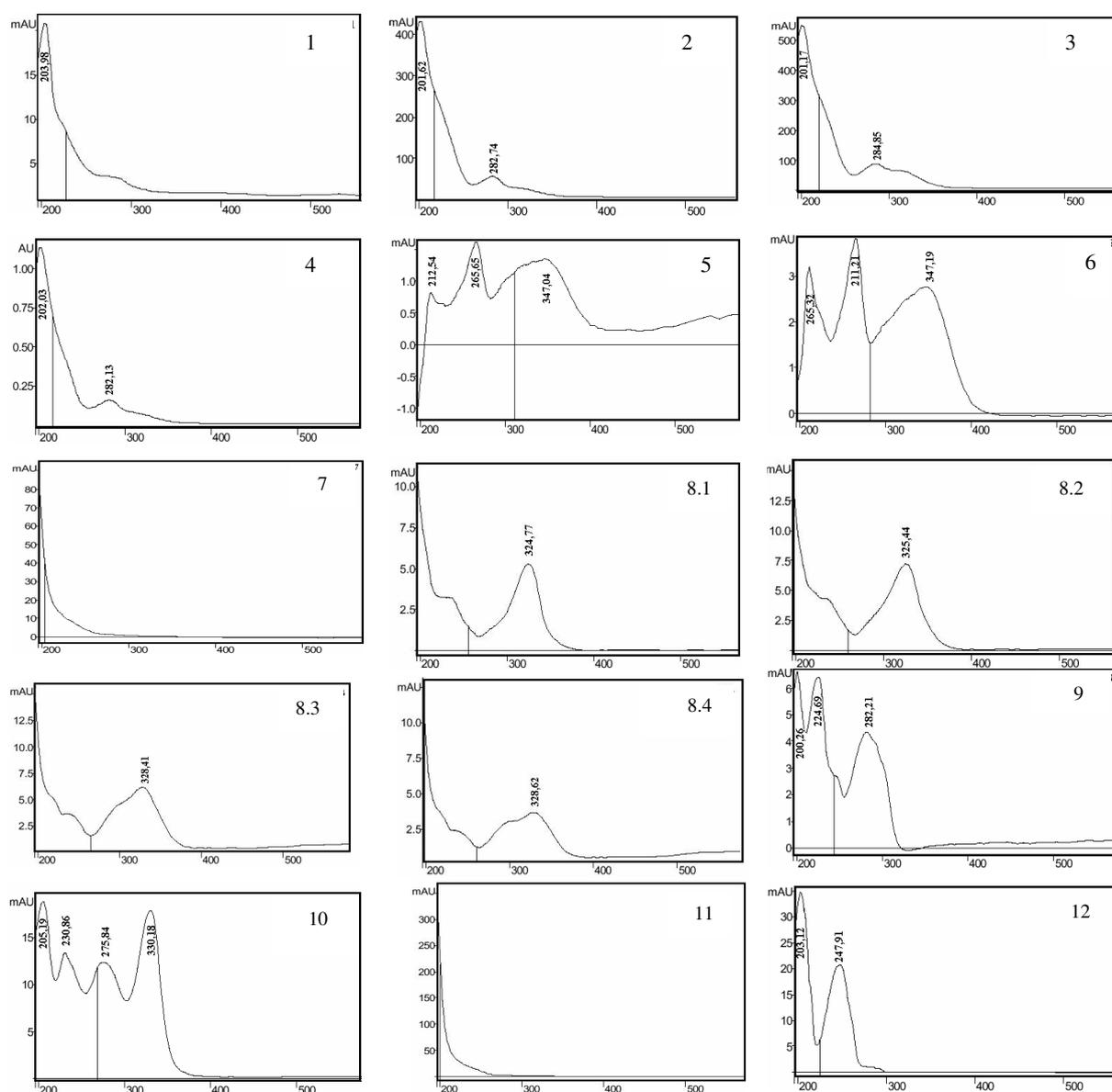
20  $\mu$ L da solução da fração acetato de etila a 0,05 mg/mL foram injetadas e analisadas por CLAE-DRD. Após a varredura de 200 a 800 nm, pode-se observar que os picos apresentaram melhor resposta em 255 nm (**Figura 27**).



**Figura 27-** Cromatograma da fração AcOEt de *M. vacciniifolia* em CLAE-DRD a 255nm

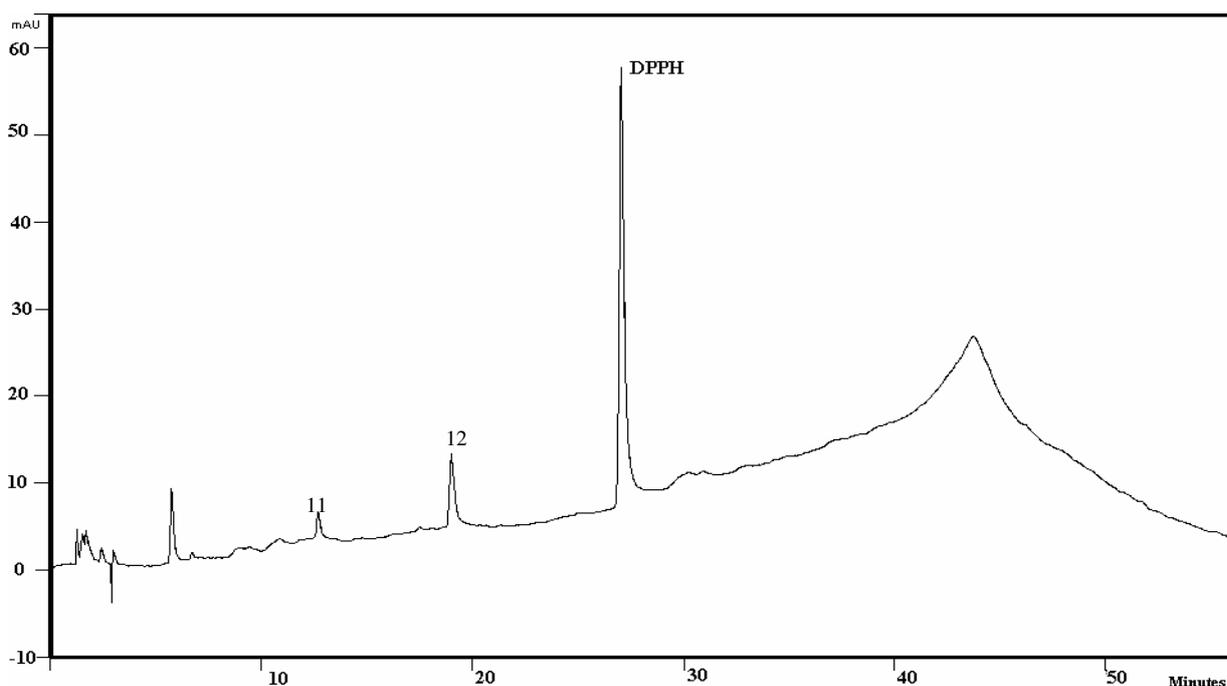
Os sinais entre 0 a 2 minutos apresentaram-se em mistura, o espectro representativos destes estão apresentados com o índices como 1, 2, 3 e 4 na **Figura 28**, os quais apresentaram uma similaridade. Esta similaridade pode estar associada a compostos

químicos semelhantes. Os sinais 5 e 6 apresentaram espectros característicos de compostos puros e o sinal 7 não apareceu no comprimento de onda examinado. O sinal 8 apresentou espectros de absorção distintos (representados pelos índices 8.1, 8.2, 8.3, 8.4), indicando que o mesmo não está puro. Os sinais 9, 10, 11 e 12 apresentaram uma pureza em relação aos espectros de absorção obtidos (representados pelos índices 9, 10, 11 e 12). Os espectros obtidos desta fração foram comparados com os padrões: rutina, quercetina, ramnose, quercetina galactose, vitexina, isovitexina, isoornitina e ácido cafeico, porém não obtiveram similaridade espectral e nem relação com o tempo de retenção.



**Figura 28-** Espectros obtidos do cromatograma da fração AcOEt de *M. vacciniifolia*

A fração AcOEt de *M. vacciniifolia* foi submetida à adição de DPPH e analisada no CLAE (**Figura 29**). Na região de 0 a 2 minutos ocorreu uma redução acentuada na intensidade dos sinais, sendo que, comparando-se os espectros associados aos tempos de retenção houve a supressão do sinal 4 (**Figura 28**). O sinal 4 pela sua forma é característico de uma mistura de substâncias, as quais reagiram com o DPPH. Os sinais de 5 a 10 (**Figura 27**) foram suprimidos do cromatograma (**Figura 29**) indicando sua reação com o DPPH. Os sinais 11 e 12 mantiveram-se presentes no extrato após a adição de DPPH. Com base nestes dados, foi possível concluir que a fração AcOEt apresenta várias substâncias antioxidantes que reagem com o DPPH, o que está de acordo com o baixo valor obtido de  $CI_{50}$  para esta fração.



**Figura 29-** Cromatograma obtido após adição de DPPH à fração AcOEt de *M. vacciniifolia*

#### **4.14 Análise Microbiológica do extrato etanólico bruto, fração hexânica e fração AcOEt de *M. vacciniifolia***

A atividade antimicrobiana de *M. vacciniifolia* foi avaliada frente a 10 microorganismos, sendo quatro bactérias gram-positivas, três bactérias gram-negativas e três

fungos. A fração hexânica (**Tabela 12**) mostrou-se pouco ativa frente às bactérias, porém, com relação aos fungos *Sacharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* apresentou uma concentração mínima inibitória mais significativa (250 µg.mL<sup>-1</sup>).

**Tabela 12-** Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima letal (CML) frente a 10 microorganismos, da fração hexânica de *M. vacciniifolia*.

Microorganismos <sup>a</sup>	FH		Padrão <sup>c</sup>
	<i>M. vacciniifolia</i>		
	CMI <sup>b</sup>	CML <sup>b</sup>	CMI <sup>b</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	>500	-	1,56
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	>500	-	1,56
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	>500	-	1,56
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11103)	>500	-	3,12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC27853)	>500	-	3,12
<i>Salmonella setubal</i> (ATCC 19796)	>500	-	1,56
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 10031)	>500	-	3,12
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> (ATCC 2601)	250	>500	5,15
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	250	>500	10,3
<i>Cryptococcus neoformans</i> (ATCC 28952)	>500	-	10,3

<sup>a</sup> ATCC (American Type Culture Collection); <sup>b</sup> em µg.mL<sup>-1</sup>; <sup>c</sup> Cloranfenicol para bactérias e nistatina para fungos.

Na **Tabela 13** são mostrados os resultados dos testes da atividade antimicrobiana para a fração AcOEt de *M.vacciniifolia*, que não apresentou resultados significativos com relação à concentração mínima inibitória para o crescimento dos microorganismos testados.

**Tabela 13-** Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima letal (CML) frente a 10 microorganismos, da fração AcOET De *M. vacciniifolia*

Microorganismos <sup>a</sup>	Fração AcOEt de		Padrão <sup>c</sup>
	<i>M. vacciniifolia</i>		
	CMI <sup>b</sup>	CML <sup>b</sup>	CMI <sup>b</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	>500	-	1,56
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	>500	-	1,56
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	>500	-	1,56
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11103)	>500	-	3,12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC27853)	>500	-	3,12
<i>Salmonella setubal</i> (ATCC 19796)	>500	-	1,56
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 10031)	>500	-	3,12
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> (ATCC 2601)	>500	-	5,15
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	>500	-	10,3
<i>Cryptococcus neoformans</i> (ATCC 28952)	>500	-	10,3

<sup>a</sup> ATCC (American Type Culture Collection); <sup>b</sup> em µg.mL<sup>-1</sup>; <sup>c</sup> Cloranfenicol para bactérias e nistatina para fungos.

Na **Tabela 14** são apresentados os resultados dos testes de atividade antimicrobiana realizados com o extrato etanólico bruto, que também mostrou-se pouco eficiente com relação a inibição do crescimento dos microorganismos testados.

**Tabela 14-** Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima letal (CML), frente a 10 microorganismos do extrato etanólico bruto de *M. vacciniifolia*

Microorganismos <sup>a</sup>	Extrato Etanólico Bruto de <i>M. vacciniifolia</i>		Padrão <sup>c</sup>
	CMI <sup>b</sup>	CML <sup>b</sup>	CMI <sup>b</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	>500	-	1,56
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	>500	-	1,56
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	>500	-	1,56
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11103)	>500	-	3,12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC27853)	>500	-	3,12
<i>Salmonella setubal</i> (ATCC 19796)	>500	-	1,56
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 10031)	>500	-	3,12
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> (ATCC 2601)	>500	-	5,15
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	>500	-	10,3
<i>Cryptococcus neoformans</i> (ATCC 28952)	>500	-	10,3

<sup>a</sup> ATCC (American Type Culture Collection); <sup>b</sup> em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; <sup>c</sup> Cloranfenicol para bactérias e nistatina para fungos.

A fração H<sub>2</sub>O/EtOH mostrou-se insolúvel no líquido de análise não sendo possível a realização dos testes.

#### 4.15 Atividade Alelopática do Extrato Etanólico Bruto (EEB) , Fração Hexânica (FH) , Fração Acetato de Etila (FAE) e Fração Etanol Água (FEA) de *Microgramma vacciniifolia*

O extrato etanólico bruto (EEB) de *M. vacciniifolia* reduziu significativamente o índice de velocidade de germinação (IVG) de alface, nas maiores concentrações testadas (**Tabela 15**), sendo essa redução de 20%, em relação ao controle, na concentração de 1.000 mg.L<sup>-1</sup>. Porém, apesar do EEB ter atrasado a germinação de alface em relação ao controle, não influenciou na porcentagem final de aquênios germinados (**Tabela 16**). Em cebola nenhum efeito significativo na germinação foi observado quando submetidos ao EEB de *M. vacciniifolia* (**Tabelas 15 e 16**). Com relação as frações semipurificadas (FS), verifica-se que todas as FS ensaiadas reduziram o IVG de alface (**Tabela 15**), verificando-se

atrasos na germinação de 76% pela fração hexânica (FH), 50% pela fração acetato de etila (FAE), e 56% pela fração etanol-água (FEA), em relação ao controle, na maior concentração ensaiada. Na germinabilidade (**Tabela 16**), apenas a FAE reduziu significativamente a porcentagem de germinação de alface em 43%, em relação ao controle, na concentração de 1.000 mg.L<sup>-1</sup>. Em cebola, a FH e a FAE afetaram a germinação das sementes, reduzindo o IVG (63% e 33%) e a porcentagem de germinação (62% e 29%), respectivamente, na maior concentração ensaiada (**Tabelas 15 e 16**). O crescimento da raiz primária de alface (**Figura 30A**) foi estimulado pelo EEB e FEA nas menores concentrações ensaiadas, a FAE inibiu o crescimento inicial da raiz primária de alface em 60% em relação ao controle na concentração de 1.000 mg.L<sup>-1</sup>. O crescimento do hipocótilo de alface (**Figura 30B**) foi estimulado pelas menores concentrações ensaiadas do EEB e todas as FS.

O comprimento médio da raiz primária de cebola foi reduzido em 16%, em relação ao controle, pela FH na concentração de 1.000 mg.L<sup>-1</sup>. A FAE, em todas as concentrações ensaiadas, reduziu o crescimento da raiz primária de cebola, sendo essa redução de 81%, em relação ao controle, na maior concentração ensaiada (**Figura 31A**). O comprimento médio do coleótilo de cebola (**Figura 31B**), foi inibido pela maior concentração da FH (-24%) e FAE (-30%). O EEB e a FEA não interferiram no crescimento de cebola. Analisando-se os resultados pode se verificar que a FH possui compostos químicos que reduzem a germinação de cebola e a FAE de alface e cebola. No crescimento, a FAE inibiu a raiz primária de alface e cebola e o hipocótilo de cebola e a FH inibiu a raiz primária e o coleótilo de cebola.

**Tabela 15-** Efeito do extrato etanólico bruto e frações semipurificadas de *M. vacciniifolia* no índice de velocidade de germinação (IVG) de alface e cebola.

Índice de Velocidade de Germinação (IVG)*				
	Controle	250 mg.L <sup>-1</sup>	500 mg.L <sup>-1</sup>	1.000 mg.L <sup>-1</sup>
<b>ALFACE</b>				
(EEB) <sup>1</sup>	40,18±1,55a	39,86±2,16a	32,33±1,43b	32,00±1,61b
(FH) <sup>1</sup>	40,18±1,55a	31,08±2,15b	27,40±2,06b	9,49±0,44b
Índice de Velocidade de Germinação (IVG)*				
	Controle	250 mg.L <sup>-1</sup>	500 mg.L <sup>-1</sup>	1.000 mg.L <sup>-1</sup>
(FAE) <sup>1</sup>	40,18±1,55a	32,23±1,43b	29,66±1,70b	20,12±1,86b
(FEA) <sup>1</sup>	40,18±1,55a	38,93±1,59a	33,07±1,66b	17,46±1,62b
<b>CEBOLA</b>				
(EEB) <sup>1</sup>	7,39±0,41a	6,89±0,58a	7,43±0,21a	6,99±0,52a
(FH) <sup>1</sup>	7,39±0,41a	4,49±0,18b	4,52±0,35b	2,72±0,43b
(FAE) <sup>1</sup>	7,39±0,41a	6,69±0,22a	6,57±0,32a	4,94±0,20b
(FEA) <sup>1</sup>	7,39±0,41a	7,71±0,19a	7,42±0,49a	7,50±0,14a

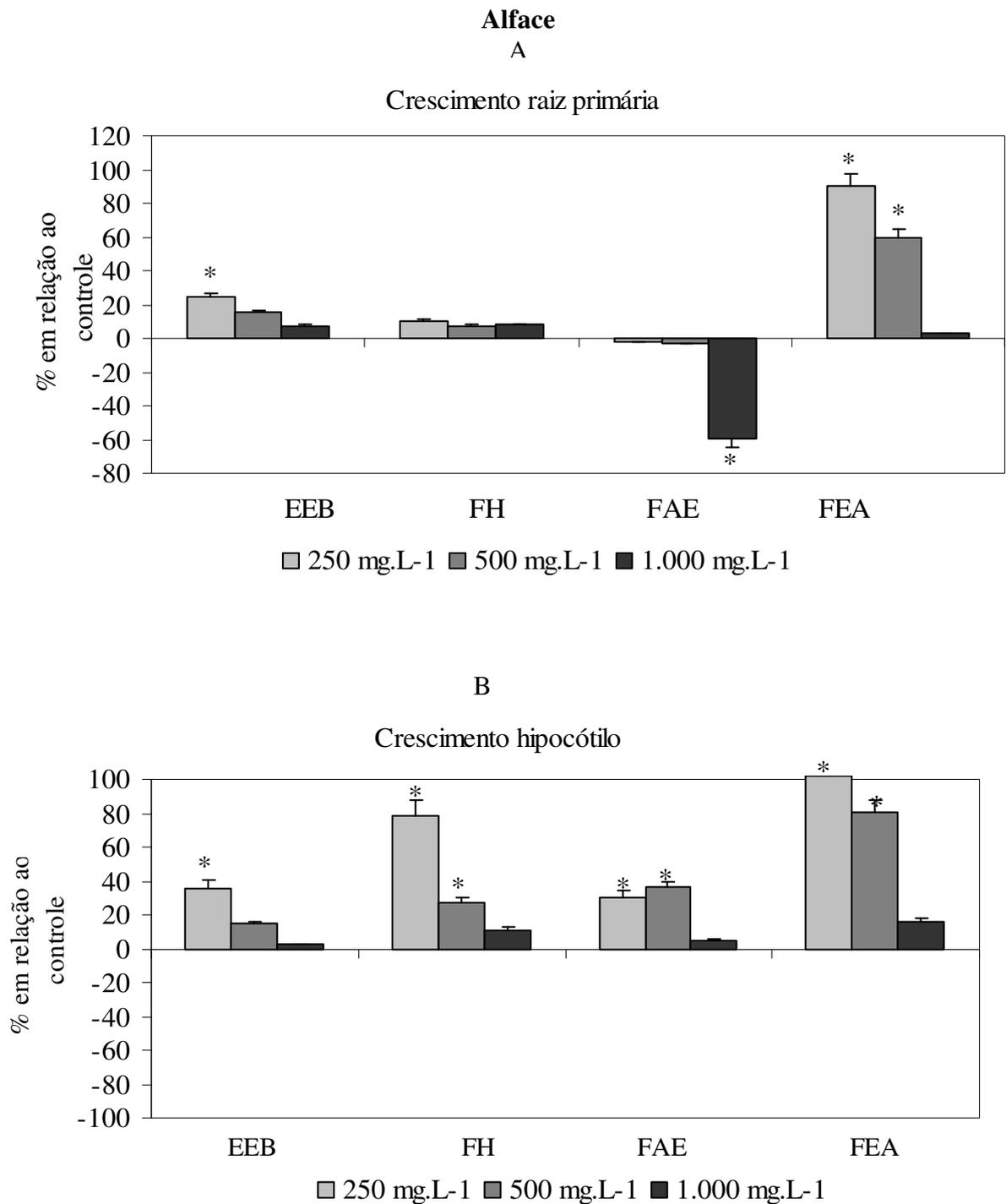
<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra do controle não difere entre si pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade. \* Média ± Desvio padrão.

**Tabela 16-** Efeito do extrato etanólico bruto e frações semipurificadas de *M. vacciniifolia* na porcentagem de germinação de alface e cebola.

Porcentagem de germinação (G%)*				
	Controle	250 mg.L <sup>-1</sup>	500 mg.L <sup>-1</sup>	1.000 mg.L <sup>-1</sup>
<b>ALFACE</b>				
(EEB) <sup>2</sup>	100,00±0,00a	100,00±0,00a	99,50±1,00a	98,50±1,00a
(FH) <sup>2</sup>	100,00±0,00a	99,50±1,00a	99,00±2,00a	96,00±5,42a
(FAE) <sup>2</sup>	100,00±0,00a	98,50±1,91a	98,50±1,91a	57,00±1,15b
(FEA) <sup>2</sup>	100,00±0,00a	98,00±1,63a	99,50±1,00a	99,00±1,15a
<b>CEBOLA</b>				
(EEB) <sup>1</sup>	92,50±1,91a	91,50±1,91a	91,00±2,58a	89,00±2,58a
Fração hexano	92,50±1,91a	89,50±2,52a	57,50±1,00b	35,50±2,52b
(FH) <sup>1</sup>				
(FAE) <sup>1</sup>	92,50±1,91a	89,50±2,52a	86,00±1,63b	66,00±1,63b
(FEA) <sup>1</sup>	92,50±1,91a	94,00±2,83a	92,50±3,00a	92,50±1,91a

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra do controle não difere entre si pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade.

<sup>2</sup>kruskal-Wallis (Mann Whitney U). \* Média ± Desvio padrão.

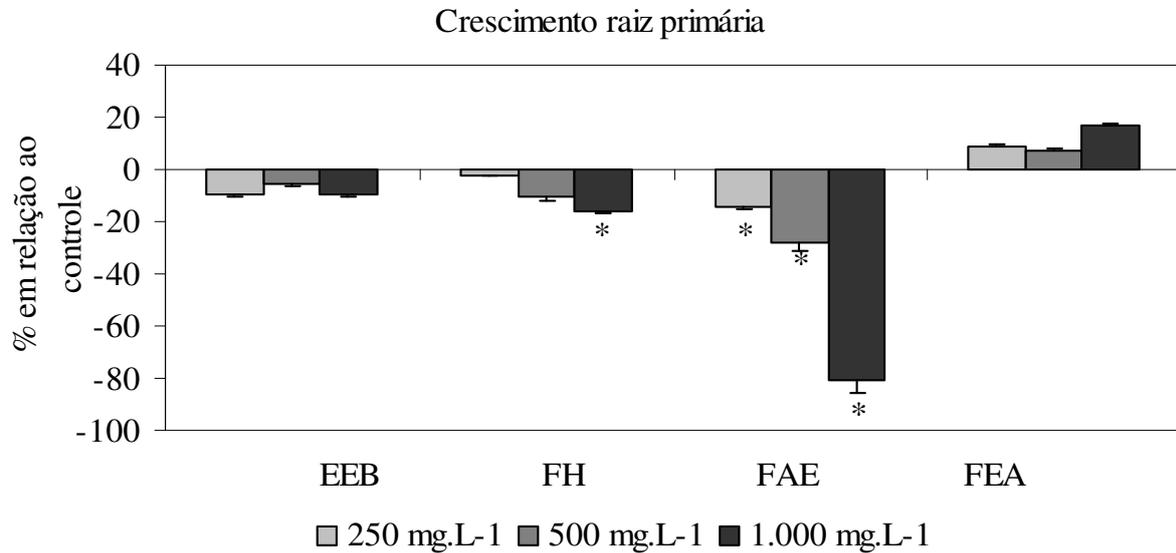


**Figura 30-** Efeito do extrato etanólico bruto (EEB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE) e fração etanol-água (FEA) de *M. vacciniifolia* no crescimento da raiz Primária (A) e hipocótilo (B) de alface. Dados expressos em percentual em relação ao controle.

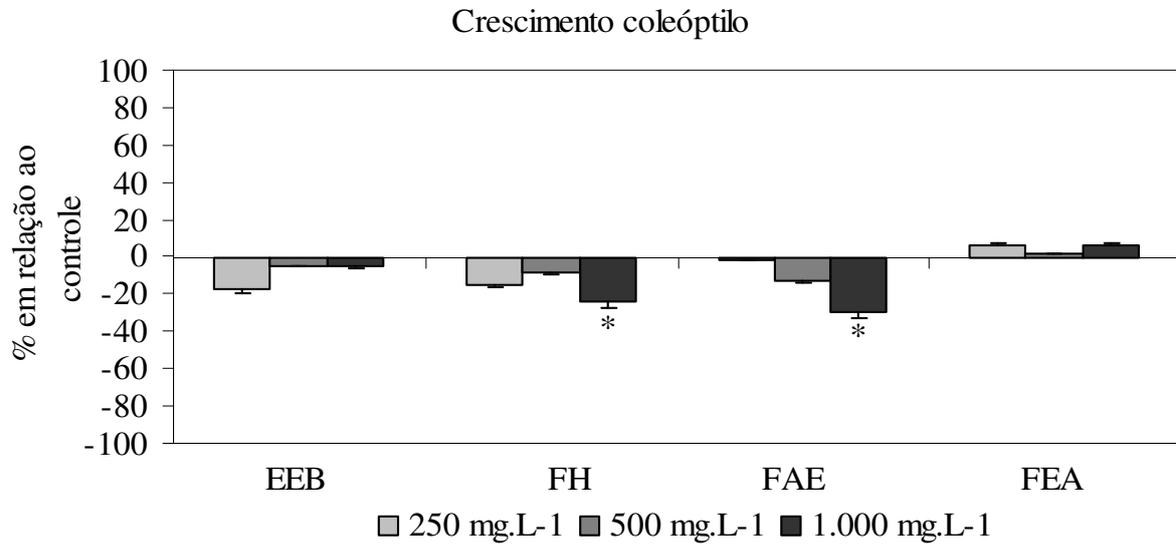
\*A média do tratamento difere significativamente em comparação com a média do controle, pelo teste de Dunnet.

## Cebola

A



B



**Figura 31-** Efeito do extrato etanólico bruto (EEB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE) e fração etanol-água (FEA) de *M. vacciniifolia* no crescimento da raiz primária (A) e coleóptilo (B) de cebola. Dados expressos em percentual em relação ao controle.

\*A média do tratamento difere significativamente em comparação com a média do controle, pelo teste de Dunnet.

## 5 CONCLUSÃO

O presente trabalho levou à identificação e quantificação de 83 componentes do óleo essencial da casca do caule de *Croton urucurana*, correspondendo a 94,6% do total de compostos presentes no óleo essencial bruto. O borneol (14,7%), acetato de bornila (5,2%), o-cimeno (3,2 %), terpineol (2,8%) e 1,8-cineol (1,8%) foram os monoterpenóides majoritários identificados no óleo essencial da casca do caule de *C. urucurana*. A análise também mostrou que a mistura é constituída por uma alta proporção de sesquiterpenóides, com predomínio do sesquicineol (10,5%), 1-isopropil-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8-hexahidro-2H-naftalen-4a-ol (14,7%), epóxido de  $\gamma$ -gurjuneno (5,4%),  $\alpha$ -bisabolol (1,8%), elemenona (1,8%) e  $\alpha$ -eudesmol (1,5%). O sesquiterpenóide majoritário isolado por CCDP em silicagel foi o 1-isopropil-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8-hexahidro-2H-naftalen-4a-ol, sendo o este o primeiro relato da ocorrência desta substância em *C. urucurana* e na família Euphorbiaceae.

A purificação da fração com atividade antioxidante deu-se por CCDP e levou à identificação e quantificação de um total de 21 componentes, correspondendo a 87,1% do total, sendo o  $\alpha$ -bisabolol (38,3%), o  $\alpha$ -eudesmol (9,3%) e o guaiol (8,2%) as substâncias majoritárias presentes, bem como a uma  $CI_{50}$  de 1,05 mg.mL<sup>-1</sup> no ensaio de atividade sequestradora de elétrons frente ao DPPH. O óleo essencial das cascas do caule de *C. urucurana* foi submetido ao ensaio de avaliação da atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH e exibiu  $CI_{50}$  de 3,21 mg.mL<sup>-1</sup>.

O óleo essencial bruto de *C. urucurana* apresentou atividade antimicrobiana frente a todos os organismos testados, sendo que *S. epidermidis* e *E. coli* foram os microorganismos mais afetados pelo óleo. Este óleo essencial, bem como o sesquiterpenóide isolado a partir deste, apresentaram forte atividade citotóxica frente à células de carcinoma de mama MCF-7, tendo potencial para uso terapêutico.

O sesquiterpenóide isolado 1-isopropil-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8-hexahidro-2H-naftalen-4 $\alpha$ -ol está sendo descrito pela primeira vez no gênero *Croton*, e sua atividade biológica até então não havia sido relatada.

O extrato etanólico bruto de *Microgramma vacciniifolia* conduziram ao

isolamento e à identificação de 5 componentes da fração hexânica: o esteróide  $\beta$ -sitosterol, o triterpenóide hopan-22-ol e uma mistura de substâncias graxas: ácido octadecanóico, oleato de etila e 15-metil-heptadecanoato de etila. Ensaio espectrofotométricos revelaram que a fração AcOEt do extrato etanólico bruto de *M. vacciniifolia* é rica em substâncias fenólicas e flavonóides. No ensaio com DPPH verificou-se que esta fração é uma fonte promissora de materiais com atividade antioxidante.

Em testes de avaliação da atividade antifúngica, a fração hexânica de *M. vacciniifolia* foi a mais ativa, tendo inibido o crescimento de *C. albicans* e *S. cerevisiae*.

Com relação à atividade alelopática, a fração hexânica de *M. vacciniifolia* contém substâncias que inibem a germinação das sementes de cebola, ao passo que a fração AcOEt, inibe a germinação das sementes de alface e cebola. Nos testes de avaliação do crescimento, a fração AcOEt inibiu a raiz primária de alface e cebola e o hipocótilo de cebola, enquanto a fração hexânica inibiu a raiz primária e o coleóptilo de cebola.

## 6 REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Illinois Allured - USA: Publishing, 1995.
- BABU, B.H; SHYLES, B.S.; PADIKKALA, J. Tumour reducing and anticarcinogenic activity of *Acanthusilicifolius* in mice. **J. Ethnopharmacol.** V 79, p. 27–33, 2002.
- AGETA, H.; SHIOJIMA K.; SUZUKI, H.; NAKAMURA, S. NMR Spectra of triterpenoids. I. Conformation of the side chain of hopane and isohopane and their derivatives. **Chem. Pharm. Bull.** V. 41, n. 11, p. 1939-1943, 1993.
- ALMEIDA, F.L.S. **A alelopátia e as plantas**. Londrina: IAPAR, 1988.
- ALMEIDA, F.L.S.; DURIGAN, J.C. **Noções sobre alelopátia**. Jaboticabal: FUNEP, 1993, 28p.
- ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado, espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA, 1998.
- ALONSO-LEBRERO, J. L.; DOMÍNGUEZ-GIMÉNEZ, C.; TEJEDOR, R., BRIEVA, A.; PIVEL, J. P. Fotoprotective properties of a hydrophilic extract of the fern *Polypodium leucotomus* on human skin cells. **J. Photochem. Photobiol. B.** V.70, p. 31-37, 2003.
- ALVIANO, W. S.; MENDONÇA, R. R.; ALVIANO, D. S.; BIZZO, H. R.; SOUTO-PADRON, T.; RODRIGUES, M. L.; BOLOGNESE, A. M.; ALVIANO, C. S.; SOUZA, M. M. G. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. **Oral Microbiol. Immunol.** V. 20, n. 2, p. 101-105, 2005.
- AMARAL, A. C. F.; BARNES, R. A.; RODERICK A. Alkaloids of *Croton celtidifolius*. **Planta Med.** V. 63, n. 5, p. 485, 1997.
- AMARAL, A.C. F.; BARNES, R. A. The clerodane diterpenes from *Croton hemiargyreus*. **Nat. Prod. Lett.** P. 767-776, 1998.
- APPENDINO, G.; BORRELLI, F.; CAPASSO, R.; CAMPAGNUOLO, C.; FATTORUSSO, E.; PETRUCCI, F.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. Minor diterpenoids from *Cascarilla* (*Croton eluteria* Bennet) and evaluation of the *Cascarilla* extract and cascarillin effects on gastric acid secretion **J. Agric. Food Chem.** V. 51, n. 24, p. 6970-6974, 2003.
- ARAI Y.; YAMAIDE, M.; YAMAZAKI, S.; AGETA, H. Fern constituents: triterpenoids isolated from *Polypodium vulgare*, *P. faurei* and *P. virginianum*. **Phytochemistry.** V. 30, n. 10, p. 3369 - 3377, 1991.
- ARGOLO, A. C. C.; SANT'ANA, A. E. G.; PLETSCH, M.; COELHO, L.C.B.B. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. **Bioresour. Technol.** V. 95, p. 229–233, 2004.
- ASSAD-LUDEWIGS, I. Y. **Propagação, crescimento e aspectos ecofisiológicos em *Croton urucurana* Baill.(Euphorbiaceae), arbórea nativa pioneira de mata ciliar**. In: SIMPÓSIO SOBRE MATA CILIAR, 1989, Campinas. *Anais*. Campinas: Fundação Cargil, 1989, p. 84-298.
- ASSIMOPOULOU, A.N.; BOSKOU, D.; PAPAGEORGIOU, V.P. Antioxidant activities of alkannin, shikonin and *Alkanna tinctoria* root extracts in oil substrates. **Food Chem.** V. 87, p. 433–438, 2004.

AVIDOS, M.F.D.; FERREIRA, L.T. Frutos dos Cerrados. Preservação gera muitos frutos. **Biotecnologia, ciência e desenvolvimento**. P. 36-41, Julho/Agosto 2000.

BALARAMAN, R.; BAFNA, P. A.; KOLHAPURE; S.A. Antioxidant activity of DHC-1—a herbal formulation. **J. Ethnopharmacol.** V. 94, p. 135–141, 2004.

BARBOSA FILHO, J. M. Lignanais, neo-lignanais e seus análogos. 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/Porto Alegre: Editora UFSC/Editora UFRGS, 2000. p. 489-516.

BARNES, J.P.; PUTNAM, A.R., BURKE, B.A., AASEN, A.J. Isolation and characterization of allelochemicals in rye herbage. **Phytochemistry**.V. 26, p. 1385-1390, 1987.

BARROS, I.C.L.; ANDRADE, L.H.C. **Pteridófitas medicinais (samambaias, avencas e plantas afins)**. Recife: Editora Universitária da Universidade Federal de Pernambuco, 1997.

BARROSO, GM. **Sistemática de agiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV, 1984, 377p.

BATATINHA, M. J. M.; SOUZA-SPINOSA, H. DE; BERNARDI, M. M. *Croton zehntneri*: Possible central nervous system effects of the essential oil in rodents. **J. Ethnopharmacol.** V.45, n. 1, p. 53-7, 1995.

BLOCK, S.; BACCELLI, C.; TINANT, B.; MEERVELT, L. C.; ROZENBERG, R.; JIWAN, J-L. H.; LLABRÈS, G.; PAUW-GILLET, M-C.; QUETIN-LECLERCQ, J. Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus*. **Phytochemistry**. V. 65, p. 1165-1171, 2004.

BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; PEREIRA, F. C.; YOSHIDA, M. Lipophyllic antioxidants from *Iryanthera juruensis* fruits. **Phytochemistry**. V. 54, p.437 - 442, 2001.

BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; RIBEIRO, A. B. Antioxidant flavonol glycosides from *Nectranda grandiflora* (Lauraceae). **Revista Eclética Química**. V. 27, p.35 - 44, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para a análise de sementes**. p. 365, 1992.

BRENTANI, R.R.; CHAMMAS, R.; COELHO, F.R.G. Mecanismos de invasão e metástases. In: BRENTANI, M.N.; COELHO, F.R.G.; IYEYASU, H.; KOWALSKI, L.P. **Bases da Oncologia**. 1ª ed., São Paulo, Livraria e Editora Marina, p. 91-98, 1998.

BUDAVARI, S. (Ed.). **The merck index - An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. 11. Ed. Rahway: Merck, 1989.

CAI, Y.; EVANS, F.; ROBERTS, M.; PHILLIPSON, J. D.; ZENK, M.; GLEBA, Y. Polyphenolic compounds from *Croton lechleri*. **Phytochemistry**. V. 30, n. 6, p. 2033-2040, 1991.

CAI, Y.; CHEN, Z. P.; PHILLIPSON, J. D. Diterpenes from *Croton lechleri*. **Phytochemistry**. V. 32, n. 3, p. 755-760, 1993 a.

CAI, Y.; CHEN, Z. P.; PHILLIPSON, J. D.; Clerodane diterpenoids from *Croton lechleri*. **Phytochemistry**. V. 34, n. 1, p. 265, 1993 b.

CAIRNS J. The origin of human cancers. **Nature**. 289,353-7, 1981

CALDERON, A.I.; TERREAUX, C.; GUPTA, M. P.; HOSTETTMANN, K. In vitro cytotoxicity of 11 panamanian plants. **Fitoterapia** V. 74, p. 378–383, 2003.

CAMPOS, A. R.; ALBUQUERQUE, R.A.A; RAO, V. S. N; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C. Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. **Fitoterapia**. V. 73, p. 116-120, 2002.

CANELA, A. P. R. F. ; ROSA, P. T. V.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction of fatty acids and carotenoids from the microalgae *Spirulina maxima*. **Ind. Eng. Chem. Res.** V. 41, p. 3012-3018, 2002.

CARDOSO, C. L.; GAMBOA, I. C.; SILVA, D. H. S.; FURLAN, M.; EPIFANIO, R. A.; PINTO, A. C.; REZENDE, C. M.; LIMA, J. A.; BOLZANI, V. S. Indole glucoalkaloids from *Chimarrhis turbinata* (Rubiaceae), and their evaluation as antioxidant agents and acetylcholinesterase inhibitor. **J. Nat. Prod.** V. 67, n.11, p. 1882-1885, 2004.

CARLIN, L.; VAISBERG, A. J.; HAMMOND, G. B. Isolation of sinoacutine from the leaves of *Croton lechleri*. **Planta Med.** V. 62, n. 1, p. 90-91, 1996.

CARVALHO, P. R. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Antioxidant quinonamethide triterpenes from *Salacia campestris*. **Chem. Biodiversity**. V. 2, n. 3, p. 367-372, 2005.

COELHO-DE-SOUZA, A. N.; CRIDDLE, D. N.; LEAL-CARDOSO, J. H. Selective modulatory effects of the essential oil of *Croton zehntneri* on isolated smooth muscle preparations of the guinea -pig. **Phytotherapy** V. 12, n. 3, p. 189-194, 1998.

COELHO-DE-SOUZA, A.N.; BARATA, E.L.; MAGALHAES, P. J. C.; LIMA, C. C.; LEAL-CARDOSO, J. H. Effects of the essential oil of *Croton zehntneri* and its constituent estragole on intestinal smooth muscle. **Phytotherapy** V. 11, n. 4, p. 299-304, 1997.

CORSINO, J.; SILVA, D. H. S.; BOLDRIN, M. V.; BOLZANI, V. S.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S.; FURLAN, M. Antioxidant flavan-3-ols and flavonol glycosides from *Maytenus aquifolium*. **Phytotherapy**. V.17, p. 913 - 916, 2003.

CRAGG, G.M.; BOYD, M.R.; CARDELLINA II, J.H. Ethnobotany and drug discovery: the experience of the U.S. National Cancer Institute. In: **Ethnobotany and the Search for New Drugs**. Ciba Foundation Symposium 185, edited by D.J. Chadwick, J. Marsh, Chichester, U.K., Wiley & Sons, pp 178-196., 1994

DALBO, S.; JUNGENSEN, S.; HORST, H.; RUZZA, A. A.; SOETHE, D. N.; SANTOS, A. R. S.; PIZZOLATI, M. G.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Antinociceptive effect of proanthocyanidins from *Croton celtidifolius* bark. **J. Pharm. Pharmacol.** V. 57, n. 6, p. 765-772, 2005.

DANILENKO, M.; STUDZINSKI, G.P. Enhancement by other compounds of the anti-cancer activity of vitamin D3 and its analogs. **Exp. Cell Res.** V. 298, p. 339– 358, 2004.

DJERIDANE, A.; YOUSFI, M.; NADJEMI, B.; BOUTASSOUNA, D.; STOCKER, P.; VIDAL, N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. **Food Chem.** V. 97, p. 654-660, 2006.

DUKE, S.O.; RIMANDO, A.; SCHEFFER, B.; DAYAN, F.E. Strategies for research in applied aspects of allelopathy. In: **First European Allelopathy Symposium**. Vigo, Spain. June 21-23, 2001.

DURAK, I.; AYTAC, B.; ATMACA, Y.; DEVRIM, E. Effects of garlic extract consumption on plasma and erythrocyte antioxidant parameters in atherosclerotic patients. **Life Sci.** V.75, p.1959–1966, 2004.

- DUVOIX, A.; BLASIUS, R.; DELHALLE, S.; SCHNEKENBURGER, M.; MORCEAU, F.; HENRY, E.; DICATO, M.; DIEDERICH, M.; Chemopreventive and Therapeutic Effects of Curcumin, **Cancer Letters**, 233, 181-190, 2005.
- ERDOGAN, H.; FADILLIOGLUB, E.; OZGOCMENC, S.; SOGUTD, S.; OZYURTE, B. AKYOLF, O.; ARDICOGLU, O. Effect of fish oil supplementation on plasma oxidant/antioxidant status in rats. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essent. Fatty Acids**. V. 71, p. 149–152, 2004.
- EVANS, C.W. **Trease and Evan's Pharmacognosy**. 14. Ed. London: W B Saunders, 1996.
- FARIAS, M.C.A. **Taninos em *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. e Fisch.) Copel**. Recife: Dissertação (Mestrado em Criptógamos). Universidade Federal de Pernambuco, 1994.
- FATTORUSSO, E.; TAGLIATELA-SCAFATI, O.; CAMPAGNUOLO, C.; SANTELIA, F. U.; APPENDINO, G.; SPAGLIARDI, P. Diterpenoids from Cascarilla (*Croton eluteria* Bennet). **J. Agric. Food Chem.** V. 50, n. 18, p. 5131-5138, 2002.
- FELLOWS, L.E. Pharmaceuticals from traditional medicinal plants and others: Future prospects. In: Coombes, JD, ed. **New drugs from natural sources**. London, IBC Technical Services, 1995.
- FERREIRA, A.G. & BORGHETTI, F. Interpretação de resultados de germinação. In: A.G. FERREIRA & F. BORGHETTI, (eds). **Germinação do Básico ao aplicado**. Porto Alegre, Ed. Artmed, p. 209-222, 2004.
- FESSENDEN, R.J. **Organic chemistry**. Boston: Willard Grant Pres, 1982.
- FINNEY, D.J. **Probit Analysis**. 3 ed. Cambridge: University Press, 1971.
- FOTI, M. C.; INGOLD, K. U. Mechanism of inhibition of lipid peroxidation by  $\alpha$ -terpinene, an unusual and potentially useful hydrocarbon antioxidant **J. Agric. Food Chem.** V. 51, p. 2758-2765, 2003.
- FRESHNEY, I.R. **Culture of animal cells. A manual of basic technique**. 3. Ed.: New York, Wiley-Liss, 1994.
- FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de Própolis. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** V.26, n. 1, p. 171-178, 2006.
- GAMBOA, I. C.; CARDOSO, C. L.D. H. S.; CAVALHEIRO, A. J.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S. HPLC-EICD: Useful tool for the pursuit of novel analytical strategies for the detection of antioxidant secondary metabolites. **J. Braz. Chem. Soc.** V. 14, p.771 - 776, 2004.
- GIULIA, D.C.; NICOLA, M.; ANGELO, A.I.; FRANCESCO, C. In: **Life Science Flavanoids: Old and new aspects of a class of naturaltherapeutic drugs**. Life Science, vol. 65, (4) pp. 33–353, 1999.
- GOMBAU, L.; GARCIA, F.; LAHOZ, A.; FABRE, M.; RODA-NAVARRO, P.; MAJANO, P. ALONSO-LEBRERO, J. L.; CASTELL, J. V.; GÓMEZ-LECHON, M.J.; GONZÁLEZ, S. *Polypodium leucotomus* extract: Antioxidant activity and disposition. **Toxicol. in vitro**. V.20, p. 464-471, 2006.
- GORDON, M. H. Dietary antioxidants in disease prevention. **Nat. Prod. Rep.** V. 13, n. 4, p. 265-273, 1996.

GOTTLIEB, O. New and underutilized plants in the Americas: solution to problems of inventory through systematics. **Interciência**, v.6, n.1, p.22-29, 1981.

GOTTLIEB, O. R. **Micromolecular evolution, systematics and Ecology: na essay into a novel botanical discipline**. Berlin: Springer-Verlag, 1982, 181p.

GUERRERO, M. F.; CARRÓN, R.; MARTYN, M. L.; SAN ROMAN, L.; REGUERO, M. T. Antihypertensive and vasorelaxant effects of aqueous extract from *Croton schiedeanus* Schlecht in rats. **J. Ethnopharmacol.** V. 75, p. 33–36, 2001.

GUERRERO, M. F.; PUEBLA, P.; CARRÓN, R. MARTYN, M. L.; SAN ROMAN, L.; Vasorelaxant effect of new neo-clerodane diterpenoids isolated from *Croton schiedeanus* . **J. Ethnopharmacol.** V. 94, p.185–189, 2004.

GUERRERO, M. F. ; PUEBLA, P.; CARRON, R. ; MARTIN, M. L. ; SAN ROMAN, L. Quercetin 3,7-dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from *Croton schiedeanus* Schlecht. **J. Pharm. Pharmacol.** V. 54, n. 10, p. 1373-1378, 2002.

GURGEL L A; SILVA R M; SANTOS F A; MARTINS D T; MATTOS P O; RAO V S. Studies on the antidiarrhoeal effect of dragon's blood from *Croton urucurana*. **Phytotherapy Res.** V. 15, n. 4, 2001.

HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: some new concepts. **The FASEB Journal**, V. 1, p, 358-364, 1987.

HAMMER KA, CARSON CF, RILEY TV. Antimicrobial activity of essential oils and others plants extracts. **J. Appl. Microbiol.** V.86, p. 985-990, 1999.

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radical Biol. Med.** V. 16, p. 845-850, 1994.

HARBORNE, J. B. **Introduction to Ecological biochemistry**. 3 ed. London: Academic Press, 1988, 382 p.

HIRUMA-LIMA, C. A.; SPADARI-BRATFISCH, R. C.; GRASSI-KASSISSE, D. M. ; BRITO, A. R. M. S. Anti-ulcerogenic mechanisms of dehydrocrotonin, a diterpene lactone obtained from *Croton cajucara*. **Planta Med.** V. 65, n. 4, p. 325-30, 1999.

HOU, J.; SUN, T.; HU, J.; CHEN, S.; CAI, X.; ZOU, G. Chemical composition, cytotoxic and antioxidant activity of the leaf essential oil of *Photinia serrulata*. **Food Chem.** V. 103, n. 2, 355-358, 2007.

ITHARAT A, HOUGHTON, AMOOQUAYE E, BURKE PJ, SAMPSON J, RAMAN, A. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **J. Ethnopharmacol.**, 90: 33-39, 2004.

JELLER, A. H.; SILVA, D. H. S.; LIÃO, L. M.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Antioxidant phenolic and quinonemethide triterpenes from *Cheiloclinium cognatum*. **Phytochemistry** V. 65, n. 13, p.1977-1982, 2004.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Nacional, 1993, 777p.

KATALINIC, V.; MILOS M.; MODUN, D.; MUSIÉ I.; BOBAN, M. Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. **Food Chem.** 86, p. 593-600, 2004.

KEITH, M.W., SALLY, A.L., MICHAEL, W.S., THOMAS, J.G., GARRY, M.M. Taxus Spp. Needles contain amounts of taxol comparable to the stem bark of taxus brevifolia: analysis and isolation. **J. Nat. Prod.** 53, 1249–1255, 1990.

KELMANSON, J.E., JAGER, A.K., VAN STADEN, J., Zulu medicinal plants with antibacterial activity. **J. Ethnopharmacol.** V. 69, p. 241–246, 2000.

KIOKIAS, S., GORDON, M. H. Antioxidant properties of carotenoids in vitro and in vivo. **Food Reviews International.** V. 20, p. 99-121, 2004.

LABOURIAU, L.G. **A germinação das sementes.** Washington: OEA, 1983, p.174.

LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H.; MAGALHAES, P. J. C. Essential oil of *Croton nepetaefolius* decreases blood pressure through an action upon vascular smooth muscle: studies in DOCA-salt hypertensive rats. **Planta Med.** V. 66, n. 2, p. 138-143, 2000.

LAMBERT, J. D.; HONG, J.; YANG, G.; LIAO, J.; YANG, C. S. Inhibition of Carcinogenesis by Polyphenols: Evidence From Laboratory Investigations, **American Journal Clinican Nutrition**, 81 (suppl), 284- 291, 2005.

LEDERER, J. **Alimentação e câncer.** São Paulo: Mamole Dois, 1990.

LEITÃO, G. G.; LEITÃO, S. G.; VILEGAS, W. Quick preparative separation of natural naphthopyranones with antioxidant activity by high-speed counter-current chromatography. **Z. Naturforsch., B: Chem. Sci.** V. 57c, p. 1051-1055, 2002.

LIN, J-Y.; TANG, C-Y. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. **Food Chem.** V. 101, n.1,p. 140–147, 2007.

LOPES, D.; BIZZO, H. R.; SOBRINHO, A. F. S.; PEREIRA, M. V. G. Linalool-rich essential oil from leaves of *Croton cajucara* Benth. **J. Essent. Oil Res.** V. 12, p. 705- 708, 2000.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R; THOMAS M.B. **The Sistematic Identification of Flavonoids.** New York: Springer-Verlag, 1970.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; ARRUDA, A. C.; PAMPLONA, S. G.S. R.; VANDERLINDE, F. A.; LAPA, A. J.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N. F.; CÔLUS, I. M. S.; FARIAS, R. A. F.; COSTA, A. M. L.; RAO, V. S. N. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. **J. Ethnopharmacol.** V. 70, n. 1, p. 41-55, 2000.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; BRABO, S. N.; SILVA, M. N. Terpenoids from *Croton cajucara*. **Phytochemistry** .V. 49, n. 3, p. 823-828, 1998.

MAGALHÃES, P. J. C.; CRIDDLE, D. N.; TAVARES, R. A.; MELO, E. M.; MOTA, T. L.; LEAL-CARDOSO, J. H. Intestinal myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius*, and its constituents cineole, methyl-eugenol and terpineol. **Phytother. Res.** V. 12, n. 3, p. 172-177, 1998.

MANN J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews (Cancer).** V. 2, p.143-148, 2002.

MARTIN-BETTOLO, G.B., Present aspects of the use of medicinal plants in traditional medicine. **J. Ethnopharmacol.** V. 2, p. 5–7, 1980.

MASUDA, T.; INABA, Y.; MAEKAWA, T.; TAKEDA, Y.; YAMAGUCHI, H.; NAKAMOTO, K.; KUNINAGA, H.; NISHIZATO, S.; NONAKA, A. Simple detection method of powerful antiradical compounds in the raw extract of plants and its application for the identification of antiradical plant constituents. **J. Agric. Food Chem.** V. 51, p. 1831-1838, 2003.

MATA, A.T.; PROENÇA C.; FERREIRA A.R.; SERRALHEIRO M. L. M.; NOGUEIRA, J. M. F.; ARAUJO, M. E. M. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. **Food Chem.** V.103, p. 778-786, 2007.

MEDEIROS, A.R.M. Alelopatia – importância e suas aplicações. **Horti Sul.** 1990

MEDEIROS, A.R.M.; LUCCHESI, A.A. Efeitos alelopáticos da ervilhaca (*Vicia sativa* L.) sobre a alface em testes de laboratório. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília.** V.28, n.1. p.9-14, jan.1993.

MIDDELKAMP-UP, M. A.; PATHAK, M. A.; PARRADO, C.; GOUKASSIAN, D.; RIUS-DÍAZ F.; MIHM, M. C.; FITZPATRICK, T. B. GONZÁLEZ, S. Oral *Polypodium leucotomus* Extract Decreases Ultraviolet-Induced Damage of Human Skin. **Journal American Academy of Dermatology.** V. 51, n. 6, 2004.

MILANOWSKI, D. J.; WINTER, R. E. K.; ELVIN-LEWIS, M. P. F.; LEWIS, W. H. Geographic Distribution of Three Alkaloid Chemotypes of *Croton lechleri*. **J. Nat. Prod.** 65, 6, 814 - 819, 2002.

MILLER, M. J. S.; MACNAUGHTON, W. K.; ZHANG, X-J.; THOMPSON, J. H.; CHARBONNET, R. M.; BOBROWSKI, P.; LAO, J.; TRENTACOSTI, A. M.; SANDOVAL, M. Treatment of gastric ulcers and diarrhea with the Amazonian herbal medicine sangre de grado. **Am. J. Physiol.-Gastroint. Liver Physiol.** V. 279, n. 1, p. G192-200, 2000.

MILO B.; RISCO E.; VILA R.; IGLESIAS J.; CANIGUERAL, S. Characterization of a fucoarabinogalactan, the main polysaccharide from the gum exudate of *Croton urucurana*. **J. Nat. Prod.** V. 65, n. 8, p. 1143-6, 2002.

MORA, A.; PAYÁ, M.; RÍOS, J. L.; ALCARAZ, M. J. Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. **Biochem. Pharmacol.** V. 40, p. 793-797, 1990.

MORAN, R. C. Polypodiaceae. In: R. C. MORAN & R. RIBA (Eds.), **Flora Mesoamericana 1. Psilotaceae a Salviniaceae.** Cidade do México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1995, p. 333.

MOURA, V. L. A.; MONTE, F. J. O.; BRAZ FILHO, R. A new casbane-type diterpenoid from *Croton nepetaefolius*. **J. Nat. Prod.** V. 53, n. 6, p. 1566-71, 1990.

MUKHERJEE, R.; AXT, EDGARDO M. Cyclitols from *Croton celtidifolius*. **Phytochemistry** V. 23, n. 11, p. 2682-2684, 1984.

NARDI, G. M.; FELIPPI, R.; DALBÓ, S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. M.; ARRUDA, D. C.; DELLE MONACHE, F.; TIMBOLA, A. K.; PIZZOLATTI, M. G.; CKLESS, K.; RIBEIRO-DO-VALE, R. M. Antiinflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. **Phytomedicine.** V. 10, n. 2-3, p. 176-184, 2003.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Reference Method of Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts.** Standard M77-T. Villanova: NCCLS, 1995.

NISHIMURA, H. & NAKAMURA, T.M.J. Allelopathic effects of p-Menthane — 3,8 — Diols in *Eucalyptus citriodora*. **Phytochemistry**. V. 23, n. 12, p. 2777-2779, 1984.

O'KENNEDY, R. & THORNES, R. A. Coumarins: Biology, applications and mode of action. New York: John Willwy, 1997. in GONÇALVES, A. L., ALVES FILHO, A. MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 353-358, jul./set., 2005.

OGURA, Y. **Comparative anatomy of vegetative organs of the pteridophytes**. 2. Ed. Berlin: Gebrüder Borntraeger, 1972.

OLIVEIRA, A. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; SANTOS, C. F.; MORAIS, S. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntneri* in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. V. 34, n.11, p. 1471-1474, 2001.

ORTURK M., ORTURK A. F., DURU, M. E., TOPÇU, G. Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*) : An edible medicinal plant. **Food Chem**. V. 103, p. 623-630, 2007.

PAIVA, L.A.F. ; GURGELA, L.A. ; CAMPOSA, A.R. ; SILVEIRAB, E.R. ; RAO, V.S.N. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Life Sci**. V. 75, p. 1979–1987, 2004.

PARANHOS- FILHO, A.C. **Análise geo-ambiental multitemporal : O estudo de caso da região de coxim e bacia do Taquarizinho**. Tese (doutorado em geologia)- Universidade Federal do Paraná, 2000.

PAULETTI, P. M.; GAMBOA, I. C.; SILVA, D. H. S.; YOUNG, M. C. M.; TOMAZELA, D. M.; EBERLIN, M. N.; BOLZANI, V. S. New Antioxidant C-glucosylxanthenes from Stems of *Arrabidaea samyoides* . **J. Nat. Prod**. V. .66, p.1384 - 1387, 2003.

PCBAP – Plano de Conservação da Bacia do Alto Paraguai. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. In : **Plano de conservação da bacia do alto Paraguai**. Volumes : I. 73 p. II, Tomos I e II-A, 334 p. e 386 p. Programa Nacional do Meio Ambiente – PNMA. 1997.

PEREIRA, A. B. **Introdução ao estudo das pteridófitas**. Canoas: Ed. ULBRA, 1999.172 p.

PERES, M.T.L.P.;MONACHE, F.D.; CRUZ, A.B.; PIZZOLATTI, M.G.; YUNES, R.A. Chemical composition and microbial activity of *Croton urucurana* Baillon. (Euphorbiaceae). **J. Ethnopharmacol**. V. 66, p. 223-226, 1997.

PERES, M.T.L.P.; PIZZOLATTI, M.G.; YUNES, R.A. ; MONACHE, F.D . Clerodane diterpenes of *Croton urucurana*. **Phytochemistry**. V.33, p. 131-137, 1998.

PERES, M.T.L.P.; MONACHE, F.D; PIZZOLATTI, M.G.; SANTOS, A. R. S.; BEIRITH, A.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. Pharmac-chemical criteria used in their isolation. **Phytotherapy Res**. V. 209-211, 1998.

PIAO, X. L.; PARK, I. H.; BAEK, S.H.; KIM, H.Y.; PARK, M. K.; PARK, J. H. Antioxidative activity of furanocoumarins isolated from *Angelicae dahuricae*. **J. Ethnopharmacol**. V. 93, p. 243–246, 2004.

PIETERS, L.; BRUYNE, T.; CLAEYS, M.; VLIETINCK, A.M.C.; VANDEN BERGHE, D. Isolation of a Dihydrobenzofuran Lignan from South American Dragon's Blood (*Croton* spp.) as an Inhibitor of Cell Proliferation. **J. Nat. Prod**. V. 56, n. 6, p. 899 – 906, 1993.

PIETTA, Piet-Giorgio. Flavonoids as Antioxidants. **J. Nat. Prod**. V. 63, p. 1035-1042, 2000.

PIRES, M.M.Y.; SOUZA, L.A.; TERADA, Y. Biologia floral de *Croton urucurana* Baill. (Euphorbiaceae) ocorrente em vegetação ripária da ilha Porto Rico, Porto Rico, Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**. V. 26, n. 2, p. 209-215, 2004.

POTT, A.; POTT, V.J. **Plantas do pantanal**. Corumbá/MS: EMBRAPA, 1994.

POULLAIN, C.; GIRARD-VALENCIENNES, E.; SMADJA, J. Plants from reunion island: evaluation of their free radical scavenging and antioxidant activities. **J. Ethnopharmacol.** V. 95, n. 1, p. 19-26, 2004.

PUEBLA, P.; LÓPEZ, J. L.; GUERRERO, M.; CARRÓN, R.; MARTÍN, M. L.; SAN ROMÁN, L.; SAN FELICIANO, A. Neo-clerodane diterpenoids from *Croton schiedeanus*. **Phytochemistry**. V. 62, n. 4, p.551-555, 2003.

PUTNAM, A.R. Weed allelopathy. In: DUKE, S.O. Weed physiology volume 1.: **Reproduction and Ecophysiology**. CRC Press, p. 131-155, 1985.

QUEIROZ EF, ROBLLOT F, LAPRÉVOTE O, SERANI L, CAVÉ A, HOCQUEMILLER R. A new monothetrahydrofuran acetogenin from the roots of *Annona spinesces* . **J. Nat. Prod. Let.** V. 13, p. 21, 1999.

QUEIROZ, M. H. de. **Approche phytoécologique et dynamique dès formations végétales secondaires développées après abandon des activités agricoles, dans le domaine de la Forêt Ombrophile dense de versant (Forêt Atlantique à Santa Catarina – Brésil)**. Thèse (Doctorat). Nancy: École Nationale du Génie Rural dès et de Forêts. 1994. 251 p.

RATTY, A. K.; DAS, N. P. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: Structure-activity relationship. **Biochemical medicine and metabolic biology**. V. 39, p. 69-79, 1988.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Pteridófitas: o mundo das plantas vasculares sem sementes**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Ganabara Koogam, 2001.

RAYWARD, J.; VILLARRUBIA, V. G. ; GUILLEN, C.; PRIETO, A.; RODRIGUEZ-ZAPATA, M.; SADA, G.; and ALVAREZ-MON, M. An extract of the fern *Polypodium leucotomos* inhibits human peripheral blood mononuclear cells proliferation *in vitro*. **Int. J. Immunopharmac.** Vol. 19, n. 1, p. 9-14, 1997.

RIBEIRO, A. B.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V.S. Flavonóis glicosilados antioxidantes de *Nectandra grandiflora* (Lauraceae). **Eclet. Quím.** V. 27 (n. especial), p. 35-44, 2002.

RICE, E.L. **Allelopathy**. 2. Ed. New York: Academic Press. 1974.

RISCO, E.; GHIA, F.; VOLA, R.; IGLESIAS S.; ALVAREZ, E.; CANIGUERAL, S. Immunomodulatory activity and chemical characterization of sangre de drago (dragon's blood) from *Croton lechleri*. **Planta Med.** V. 69, n.9. p. 785-794, 2003.

ROJA, G., HEBLE, M.R. The quinoline alkaloid Camptothecin and 9-methoxy camptothecin from tissue cultures and mature trees of *Nothapodytes foetida*. **Phytochemistry**. V. 36, p. 65-66, 1994.

ROSA, M. D. S.; MENDONÇA, R. R.; BIZZO, H. R.; RODRIGUES, I. D.; SOARES, M. A.; SOUTO PADRON, T.; ALVIANO, C. S.; LOPES, A. H. C. S. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrob. Agents Chemother.** V. 47, p. 1895-1901, 2003.

ROWINSKY E.K.; GILBERT M.; MCGUERE W.P.; NOE D.A.; GROCHOW L.B.; FORASTIERE A.A.; ETTINGER D.S.; LUBEJKO B.G.; CLARK B, SARTORIUS S.E.;

- CORNBLATH D.R.; HENDRICKS C.B.; DONEHOWER R.C. Sequences of taxol and cisplatin: a phase I and pharmacologic study. **J. Clin. Oncol.** 9: 1692-1703, 1995
- SALATINO, A.; SALATINO, M.; NEGRI, G. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). **J. Braz. Chem. Soc.** Vol. 18, n. 01, p. 11-33, 2007.
- SANDOVAL, M.; OKUHAMA, N. N.; CLARK, M.; ANGELES, M. F.; LAO, J.; BUSTAMANETE, S.; MILLER, M. J. S. Sangre de grado *Croton palanostigma* induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cells. **J. Ethnopharmacol.** V. 80, n. 2 , p. 121-129, 2002.
- SANTOS, M. G.; SYLVESTRE, L. S. Aspectos florísticos e econômicos das pteridófitas de um afloramento rochoso do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Bot. Bras.** V. 20, n. 1, p. 115-124, 2006.
- SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry.** V. 30, p.3875-3883, 1991.
- SELLES, A. J. N.; CASTRO, H. T. V.; AGUERO-AGUERO, J.; JOHANES GONZALEZ-GONZALEZ, J.; NADDEO, F.; DE SIMONE, F.; LUCA RASTRELLI, L. Isolation and quantitative analysis of phenolic antioxidants, free sugars, and polyols from mango (*Mangifera indica* L.) stem bark aqueous decoction used in Cuba as a nutritional supplement **J. Agric. Food Chem.** V. 50, p. 762-766, 2002.
- SEMPERE-ORTELLS, J. M.; CAMPOS, A.; VELASCO, I.; MARCO, F.; RAMIREZ-BOSCA, A.; DIAZ, J. and PARDO, J. Anapsos (*Polypodium leucotomos*) modulates lymphoid cells and the expression of adhesion molecules. **Pharmacological Research** V. 46, n. 2, p. 185-190, 2002.
- SHIOJIMA, K.; ARAI, Y.; AGETA, H. Seasonal fluctuation of triterpenoid constituents from dried leaflets of *Dryopteris crassirhizom*. **Phytochemistry.** V. 29, n. 4, p. 1079-1082, 1990
- SILVA, P. C. R. **Introdução à estatística econômica- 2º ano.** Disponível em [www.ai.com.br/indices/2a16.htm](http://www.ai.com.br/indices/2a16.htm). Acessado em 27/julho/2007.
- SINGH, D.; CHANDER, V.; CHOPRA, K. Protective effect of naringin, a bioflavonoid on glycerol-induced acute renal failure in rat kidney. **Toxicology** .V. 201, p. 143–151, 2004.
- SINGH, K. V; SHUKLA, N.P. Activity on multiple resistant bacteria and garlic (*Allium sativum*) extract. **Fitoterapia.** V. 55, p. 313-315, 1984.
- SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M.R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay For Anticancer-Drug Screening. **Journal of the National Cancer Institute.** V. 82, p.1107-1112, 1990.
- SKERGET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; HRA, A. R.; SIMONI, M.; KNEZ, Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some Plant materials and their antioxidant activities. **Food Chem.** V. 89, p. 191–198, 2005.
- SOKMEN, A., JONES, B.M., ERTURK, M. The in vitro antibacterial activity of Turkish medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.** V. 67, 79–86, 1999.
- SRINIVASAN, D., NATHAN, S., SURESH, T., PERUMALSAMY, O. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. **J. Ethnopharmacol.** V. 74, p. 217–220, 2001

SUÁREZ AI, COMPAGNONE RS, SALAZAR-BOOKAMAN MM, TILLET S, DELLE MONACHE F, DI GIULIO C, BRUGES G. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo* bark aqueous extract. **J. Ethnopharmacol.** V. 88, n. 1, p. 11-14, 2003.

SUAREZ, ALIRICA I.; VASQUEZ, LUIS J.; MANZANO, MARIA A.; COMPAGNONE, REINALDO S. Essential oil composition of *Croton cuneatus* and *Croton malambo* growing in Venezuela. **Flavour and Fragrance Journal** V. 20, n. 6, p.611-614, 2005.

SUFFREDINI, I. B.; BACCHI, E. M.; SERTIÉ, J.A.A.A. Antiulcer action of *Microgramma squamulosa* (Kaulf.) Sota. **J. Ethnopharmacol.** V. 65, . 217-223, 1999.

TERAO, J.; PISKULA, M.; YAO, Q. Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** V. 308, p. 278-284, 1994.

TERRAS,F.R.G.;SCHOOF,H.M.E.;THEVISSSEN,H.M.E.;BROEKAERT, W.F. Synergistic enhancement of the antifungal activityof wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. **Plant Physiology.** V.103, p.1311-1319, 1993.

TORSSEL, B.G. **Natural product chemistry. A mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism.** New York: John Willey, 1989. 401p.

TROUILLAS, P.; FAGNERE, C.; LAZZARONI, R.; CALLISTE, C.;MARFAK, A.; DUROUX, J. A theoretical study of the conformational behavior and electronic structure of taxifolin correlated with the free radical-scavenging activity. **Food Chem.** V. 88, p. 571–582, 2004.

TRYON, R. M.; TRYON, A. F. **Ferns and allied plants with special reference to tropical America.** New York: Spring-Verlag, 1982.

VAISBERG, A. J.; MILLA, M.; PLANAS, M. DEL C.; CORDOVA, J. L.; ROSAS DE AGUSTI, E.; FERREYRA, R.; MUSTIGA, M.DEL C.; CARLIN, L.; HAMMOND, G. B. Taspine is the cicatrizant principle in Sangre de Grado extracted from *Croton lechleri*. **Planta Med.** V. 55, n. 2, p.140-3,1989.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P.D. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **J. Chromatogr.** V.11, p.463-71, 1963.

VAN ZYL, R. L.; SEATLHOLO, S. T.; VAN VUUREN, S. F.; VILJOEN, A. M. The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. **Journal of Essential Oil Research.** V. 18, p. 129-133, 2006.

VASTINGE-TUOMINEN, M.; PERERA-IVARSSON, P.; SHEN, J.; BOHLIN, L.; ROLFSEN, W. The fern *Polypodium decumanum*, used in the treatment of psoriasis, and its fatty acid constituents as inhibitors of leukotriene B4 formation. **Prostaglandins leukotrienes and Essent. Fatty acids.** V. 50, p. 279-284, 1994.

VAYA, J.; AVIRAM, M. **Nutritional antioxidants: Mechanisms of action, analyses of activities and medical applications.** Disponível em <http://www.bentham.org/cmciemal-1/sample/cmciemal-1/vaya-ms.htm>, acesso em julho/2007.

VIGOR, C.; FABRE, N.; FOURASTÉ, I.; MOULIS, C. Neoclerodane diterpenoids from *Croton eluteria*. **J. Nat. Prod.** V. 65, n. 8, 1180-1182, 2002.

VIGOR, C.; FABRE, N.; FOURASTÉ, I.; MOULIS, C. Three clerodane diterpenoids from *Croton eluteria* Bennett. **Phytochemistry.** V. 57, 1209-1212, 2001.

VINSON, J. A.; DABBAGH, Y. A.; SERRY, M. M.; JANG., J. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an *in vitro* oxidation model for heart disease. **J. Agric. Food Chem.** V. 43, p. 2800-2802, 1995.

VOULDOUKIS, I.; LACAN, D. .; KAMATEA, C.; COSTE, P.; CALENDIA, A.; MAZIER, D.; CONTI, M.; DUGASA, B. Antioxidant and anti-inflammatory properties of a *Cucumis melo* LC.extract rich in superoxide dismutase activity. **J. Ethnopharmacol.** V. 94, p. 67–75, 2004.

WAGNER, H.; BLADT, S; ZGAINSKI, E. M.. **Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas.** Berlin: Springer-Verlag, 1984.

WANI MC, TAYLOR H.L.; WALL M.E., COGOON P; MCPHAIL A.T. Plant antitumor agent. The isolation and struture of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* **J. Am. Chem. Soc.** V. 93,p. 2325-2327, 1971.

WEBSTER, G. L. A Provisional Synopsis of the Sections of the Genus Croton (Euphorbiaceae) . **Taxon.** Vol. 42, n. 4 .p. 793-823, 1993.

WEYERSTAHL P.; MARSCHALL, H.; SON , P. T.; GIANG, P. M. Constituents of the flower essential oil of *Aglaia odorata* Lour. from Vietnam. **Flavour Fragr. J.** V. 14, p. 219-224, 1999.

WILHELM FILHO, D.; SILVA, E.L.; & BOVERIS, A.. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna.** Chapecó: Argos. p. 317-334, 2001.

WOISKY, RG; SALATINO, A. Analysis of Propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research** .V. 37, n.2, p. 99-105, 1998.

WONG, S.P; LEONG. L.P., KOH J.H.W. Antioxidant activies of aqueos extracts of selected plants. **Food Chem.** V.99, n.4, p. 775-783, 2006.

WRIGHT, J. L. C.; McINNES, A. G.; SHIMRU, S.; SMITH, D. G.; WALTER, J. A.; IDLE, D.; KHALIL, W. Identification of C-24 alkil epimers of marine sterols by C-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Canadian Chemistry Journal.** V. 56, n. 14, p. 1898-1903, 1978.

YOKOZAWA, T.; DONG, E.; NAKAGAWA, T.; KASHIWAGI, H.; NAKAGAWA, H.; TAKEUCHI, S.; CHUNG, H.Y. *In vitro* and *in vivo* studies on the radical-scavenging activity of tea. **J. Agric. Food. Chem.** V. 46, p 2143 – 2150, 1998.

YUTING, C.; RONGLIANG, Z.; ZHONGJIAN, J.; YONG, J. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. **Free Radical Biol. Med.** V. 9, p. 19-21, 1990.

ZHANG, Y. & LEWIS, K. Fabatins: new antimicrobial plant peptides. **FEMS Microbiological Letters.** V.149, p.59-64, 1997.

ZHUANG, Q.; SCHOLZ, F.; PRAGST, F. The voltametric behaviour of solid 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) microparticles. **Electrochem. Commun.** V. 1, p. 406-410, 1999.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. 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/Porto Alegre: Editora UFSC/Editora UFRGS, 2000. p. 489-516.

## **ANEXOS**