

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO

**ESTUDO DE COMPOSTOS ATIVOS (BIOLÓGICOS E FARMACOLÓGICOS) DE
Croton urucurana BAILLON. AVALIAÇÃO DO EFEITO ALELOPÁTICO DE
EXTRATOS DE *Gleichenia pectinata* WILLD (PR.) E DE SEUS ALELOQUÍMICOS.**

**Tese apresentada como um dos requisitos para obtenção do grau de
Doutor em Química Orgânica**

MARIZE TEREZINHA LOPES PEREIRA PERES

ORIENTADOR: PROF. Dr. ROSENDO AUGUSTO YUNES

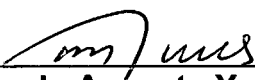
FLORIANÓPOLIS
1997

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO

**ESTUDO DE COMPOSTOS ATIVOS (BIOLÓGICOS E FARMACOLÓGICOS) DE
Croton urucurana BAILLON. AVALIAÇÃO DO EFEITO ALELOPÁTICO DE
EXTRATOS DE *Gleichenia pectinata* WILLD (PR.) E DE SEUS ALELOQUÍMICOS.**

**Esta tese foi julgada e aprovada em sua forma final pelo orientador e
coordenador do Curso de Pós-Graduação em Química**

MARIZE TEREZINHA LOPES PEREIRA PERES



Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes (Orientador)



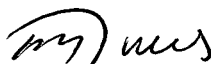
Prof. Dr. Valdir Soldi (Coordenador)

Florianópolis, 21 de novembro de 1997

**ESTUDO DE COMPOSTOS ATIVOS (BIOLÓGICOS E FARMACOLÓGICOS) DE
Croton urucurana BAILLON. AVALIAÇÃO DO EFEITO ALELOPÁTICO DE
EXTRATOS DE *Gleichenia pectinata* WILLD (Pr.) E DE SEUS ALELOQUÍMICOS.**

MARIZE TEREZINHA LOPES PEREIRA PERES

**Esta tese foi julgada e aprovada em sua forma final pelo orientador e membros
da Banca Examinadora**



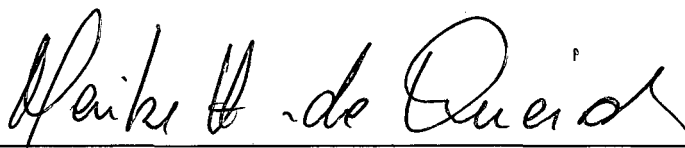
Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes - Orientador - UFSC



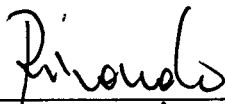
Profa. Dra. Emília Carolina S. Machado Dessoy - UFSM



Prof. Dr. Giuliano Delle Monache - CNR/ Università Cattolica dei Sacro Cuore



Profa. Dra. Maíke Hering de Queiroz - UFSC



Prof. Dr. Ricardo José Nunes - UFSC

Prof. Dra. Inês Maria C. Brighente - UFSC

Florianópolis, 21 de novembro de 1997

“Se o desejo de alcançar a meta estiver vigorosamente vivo dentro de nós, não nos faltarão forças para encontrar os meios e traduzi-las em atos”.

(Albert Einstein)

Ao Dirney, esposo, companheiro de todos os momentos, amigo.

Às nossas filhas Rafaella e Janaina, razão, orgulho e alegria de minha vida.

Aos meus pais, pela dedicação e amor.

Às minhas irmãs, pessoas encantadoras.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, por mais essa conquista.

Ao meu esposo Dirney pelo apoio, compreensão, paciência, carinho e por jamais permitir que eu desistisse, minha eterna gratidão.

Às minhas filhas Rafaella e Janaina, que participaram deste processo ativamente e de forma compreensiva, fortalecendo ainda mais a nossa união.

Aos meus pais Manoel e Noelí que sempre acreditaram nos meus anseios.

Às minhas irmãs Helena Silvia e Mara Rubia pela nossa amizade e companheirismo.

Aos meus sogros Diogo e Dalva pela constante preocupação e compreensão.

Aos meus cunhados pelo carinho e amizade.

Ao professor Dr. Rosendo Yunes, pela orientação, liberdade concedida na realização deste trabalho, compreensão e sábios ensinamentos.

Ao professor Dr. Franco Delle Monache pelo incentivo, amizade e valiosa contribuição na elucidação das estruturas dos compostos isolados.

À professora Dra. Maike Hering de Queiroz pela orientação nos ensaios de germinação e crescimento, amizade e incentivo sempre disponíveis.

Ao professor Dr. Moacir Pizzolatti, pela orientação no laboratório e pelo incentivo na realização deste trabalho.

À professora Dra. Emília Carolina pela amizade e sugestões em vários aspectos do trabalho.

Ao professor Dr. Giuliano Delle Monache pela disposição e boa vontade na discussão deste trabalho.

À UFMS, em especial aos colegas do DEB/CEUD por possibilitarem o meu afastamento.

Aos professores Dr. João de Deus Medeiros e Dra. Ana Maria Viana do departamento de botânica, pela receptividade e auxílio prestado na Análise histológica e determinação do potencial osmótico.

Ao professor Dr. Mércles Moretti do departamento de Matemática, pelo auxílio no tratamento estatístico.

Ao departamento de Farmacologia, em especial à Alessandra Beirith e Adair Santos pelos testes farmacológicos e ao departamento de Tecnologia de Alimentos, em especial à Alexandre Bella Cruz pelos ensaios antimicrobianos.

À Sra. Emilia de Oliveira Paes pela indicação da espécie Sangra-d'água, sabedoria indispensável para o estudo de plantas medicinais.

Ao professor Cláudio Conceição pela identificação da espécie *Croton urucurana*.

À Neide Queiroz, pela valiosa e despretensiosa colaboração na elaboração dos slides e confecção final deste trabalho.

À Mariza Calixto pela agradável convivência e colaboração prestada.

À Flérida Cortizo, Xisto Lehmkuhl e Josy Zarur pelo auxílio prestado.

À Central de Análises em especial ao prof. Dr. Miguel Caro, prof. Dr. Luiz Madureira, à Vanilde, Marcelene e Eliane pela obtenção dos espectros de IV, RMN e Massas.

Ao Departamento de química, Curso de pós-graduação e às bibliotecárias Selma, Diva e Tânia sempre prestativos.

Às professoras Dra. Inês Brighente e Dra. Vilma H. Fonseca e aos colegas do grupo de estrutura-atividade pelo convívio, amizade e troca de idéias.

Aos colegas Ângela Malheiros, Obdulio Miguel e Sonia Hess pela amizade e valiosa ajuda e a todos os colegas da Pós-graduação com quem compartilhamos momentos de alegria e de angústia.

À Graça e ao Jadir pela prontidão e disposição.

À Marli Soldi, pela amizade e solidariedade.

Aos amigos Marina e Nito (Chefe do Departamento de Química) pelo inestimável apoio, carinho e agradável convívio, com saudades.

Ao professor Dr. Ricardo José Nunes pela contribuição prestada e Anete, amigos que deixarão saudades.

À Zezé e Carlos, amigos que sempre nos acolheram.

Aos amigos Sonia e Luiz pelo carinho com que sempre nos receberam.

À Capes pelo suporte financeiro.

À todos, que de uma maneira ou outra contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
1.1 INTRODUÇÃO.....	1
1.2 OBJETIVOS.....	3

CAPÍTULO 2

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. <i>Croton urucurana</i> Ballon.....	4
2.1.1. Posição sistemática de <i>Croton urucurana</i>	4
2.1.2. Sinopse da família Euphorbiaceae.....	4
2.1.3. Descrição do gênero <i>Croton</i>	5
2.1.4. Descrição da espécie em estudo.....	6
2.1.5. Estudos químicos com plantas do gênero <i>Croton</i>	7
2.1.6. Atividade biológica de compostos isolados de diferentes espécies do gênero <i>Croton</i>	11
2.2. <i>Gleichenia pectinata</i> Willd (PR.).....	13
2.2.1. Posição sistemática de <i>Gleichenia pectinata</i>	13
2.2.2. Sinopse da família Gleicheniaceae.....	13
2.2.3. Descrição da espécie em estudo.....	13
2.2.4. Alelopatia.....	14

CAPÍTULO 3

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
3.1. Introdução.....	26
3.2. <i>Croton urucurana</i> Baillon	26

3.2.1. β -sitosterol, estigmasterol e campesterol.....	26
3.2.2. Sitosterol-3-O- β -D-glicosídeo.....	28
3.2.3. Ácido acetil aleuritólico.....	32
3.2.4. Catequina.....	37
3.2.5. Galocatequina.....	43
3.2.6. Sonderianin.....	48
3.2.7. 12- <i>epi</i> -metil-barbascoato.....	55
3.2.8. 15,16-epóxi-3,13(16),14-clerodatrieno-2-ona.....	63
3.3. <i>Gleichenia pectinata</i> Willd (PR.).....	71
3.3.1. Ácido siquímico.....	71
3.3.2. Canferol.....	75
3.3.3. Quercetina.....	80
3.4. Atividade antibacteriana.....	85
3.5. Atividade antinociceptiva.....	86
3.6. Atividade alelopática.....	90
3.6.1. Bioensaios de germinação.....	90
3.6.1.1. <i>Clidemia hirta</i>	90
3.6.1.2. <i>Lactuca sativa</i> var. grand rapids.....	101
3.6.2. Bioensaios de crescimento.....	109
3.6.3. Análise histológica.....	117
3.6.3.1. Análise histológica da radícula de <i>L. sativa</i> var. grand rapids sob influência das frações n-butanólicas de frondes jovens e verdes de <i>G. pectinata</i> em três estações do ano.....	117
3.6.3.2. Análise histológica do hipocótilo de <i>L. sativa</i> var. grand rapids sob influência das frações n-butanólicas de frondes jovens e verdes de <i>G. pectinata</i> em três estações do ano.....	120

CAPÍTULO 4

4 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	123
4.1. Procedimentos experimentais gerais.....	123
4.1.1. Métodos físicos.....	123

4.1.2. Métodos cromatográficos.....	123
4.2. Materiais vegetais.....	124
4.2.1. <i>Croton urucurana</i> Baillon (Euphorbiaceae).....	124
4.2.1.1. Extração e isolamento.....	124
4.2.2. <i>Gleichenia pectinata</i> Willd (PR.).....	128
4.2.2.1. Extração e isolamento.....	128
4.2.2.1.1. Fracionamento de frondes verdes - outono.....	130
4.2.2.1.2. Fracionamento de frondes jovens - outono.....	131
4.3. Materiais vegetais submetidos aos bioensaios.....	132
4.3.1. <i>Clidemia hirta</i> (L.) D. Don.....	132
4.3.2. <i>Lactuca sativa</i> var. <i>grand rapids</i>	132
4.4. Derivados da quercetina.....	133
4.4.1. Acetilação.....	133
4.4.2. Metilação.....	133
4.5. Atividade antibacteriana.....	133
4.6. Atividade antinociceptiva.....	134
4.6.1. Animais.....	134
4.6.2. Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.....	134
4.6.3. Dor induzida pela formalina.....	135
4.7. Atividade alelopática.....	135
4.7.1. Bioensaios de germinação.....	136
4.7.2. Bioensaios de crescimento.....	137
4.8. Determinação do potencial osmótico.....	137
4.9. Análise histológica.....	137

CAPÍTULO 5

5 - CONCLUSÕES.....	139
---------------------	-----

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	141
---------------------------------	-----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Crescimento anual de estudos sobre alelopatia, medido pelo número de publicações listadas no Biological Abstract relativo ao total anual de publicações em ppm. Cada esfera representa o número de publicações em alelopatia.....	15
Figura 2	Sequência hipotética de ação sugerindo o envolvimento de aleloquímicos nos processos vegetais. Cada flecha sugere um impacto negativo.....	16
Figura 3	Curva hipotética e geral de resposta sigmoideal relacionando concentração do substrato versus resposta sigmoideal.....	19
Figura 4	Utilidade dos bioensaios durante o fracionamento e identificação de aleloquímicos.....	20
Figura 5	Relações metabólicas dos cinco maiores grupos de compostos secundários.....	22
Figura 6	Cromatograma da mistura de esteróides.....	27
Figura 7	Espectro no Infravermelho do sitosterol-3-O-β-D-glicosídeo em pastilha de KBr.....	29
Figura 8	Espectro de ¹ H-RMN (300 MHz) do sitosterol-3-O-β-D-glicosídeo em C ₅ D ₅ N, TMS como padrão interno de referência.....	30
Figura 9	Espectro de ¹³ C-RMN/APT (75 MHz) do sitosterol-3-O-β-D-glicosídeo em C ₅ D ₅ N, TMS como padrão interno de referência.....	31
Figura 10	Espectro no Infravermelho do ácido acetil aleuritólico em pastilha de KBr.....	33

Figura 11	Espectro de ^1H -RMN (200 MHz) do ácido acetil aleuritólico em CDCl_3 , TMS como padrão interno de referência.....	34
Figura 12	Espectro de ^{13}C -RMN/APT (75 MHz) do ácido acetil aleuritólico em CDCl_3 , TMS como padrão interno de referência.....	35
Figura 13	Espectro de ^1H -RMN/COSY (200 MHz) do ácido acetil aleuritólico em CDCl_3 , TMS como padrão interno de referência.....	36
Figura 14	Espectro no Infravermelho da catequina em pastilha de KBr.....	39
Figura 15	Espectro de ^1H -RMN (200 MHz) da catequina em acetona- d_6 , TMS como padrão interno de referência.....	40
Figura 16	Espectro de ^{13}C -RMN (50 MHz) da catequina em acetona- d_6 , TMS como padrão interno de referência.....	41
Figura 17	Espectro de ^{13}C -RMN/DEPT (50 MHz) da catequina em acetona- d_6 , TMS como padrão interno de referência.....	42
Figura 18	Espectro no Infravermelho da galocatequina em pastilha de KBr.....	44
Figura 19	Espectro de ^1H -RMN (200 MHz) da galocatequina em acetona- d_6 , TMS como padrão interno de referência.....	45
Figura 20	Espectro de ^{13}C -RMN (50 MHz) da galocatequina em acetona- d_6 , TMS como padrão interno de referência.....	46
Figura 21	Espectro de ^{13}C -RMN/DEPT (50 MHz) da galocatequina em acetona- d_6 , TMS como padrão interno de referência.....	47
Figura 22	Espectro no Infravermelho do sonderianin em pastilha de KBr.....	49

Figura 23	Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) do sonderianin em CDCl_3 , TMS como padrão interno de referência.....	50
Figura 24	Espectro de ^{13}C -RMN/APT (75 MHz) do sonderianin em CDCl_3 , TMS como padrão interno de referência.....	51
Figura 25	Espectro HETCOR I (300 MHz) do sonderianin em CDCl_3 , TMS como padrão interno de referência.....	52
Figura 26	Espectro de HETCOR II (300 MHz) do sonderianin em CDCl_3 , TMS como padrão interno de referência.....	53
Figura 27	Espectro de Massas do sonderianin.....	54
Figura 28	Espectro no Infravermelho de 12- <i>epi</i> -metil-barbascoato em pastilha de KBr.....	58
Figura 29	Espectro I de ^1H -RMN (300 MHz) de 12- <i>epi</i> -metil-barbascoato em CDCl_3 , TMS como padrão interno de referência.....	59
Figura 30	Espectro II de ^1H -RMN (300 MHz) de 12- <i>epi</i> -metil-barbascoato em CDCl_3 , TMS como padrão interno de referência.....	60
Figura 31	Espectro de ^{13}C -RMN/APT (75 MHz) de 12- <i>epi</i> -metil-barbascoato em CDCl_3 , TMS como padrão interno de referência.....	61
Figura 32	Espectro de Massas de 12- <i>epi</i> -metil-barbascoato.....	62
Figura 33	Espectro no Infravermelho de 15,16-epóxi-3,13(16),14-clerodatrieno-2-ona em nujol.....	66
Figura 34	Espectro I de ^1H -RMN (300 MHz) de 15,16-epóxi-3,13(16),14-clerodatrieno-2-ona em CDCl_3 , TMS como padrão interno de referência.....	67

Figura 35	Espectro II de ^1H -RMN (300 MHz) de 15,16-epóxi-3,13(16),14-clerodatrieno-2-ona em CDCl_3 , TMS como padrão interno de referência.....	68
Figura 36	Espectro de ^{13}C -RMN/APT (75 MHz) de 15,16-epóxi-3,13(16),14-clerodatrieno-2-ona em CDCl_3 , TMS como padrão interno de referência.....	69
Figura 37	Espectro de Massas de 15,16-epóxi-3,13(16),14-clerodatrieno-2-ona.....	70
Figura 38	Espectro no Infravermelho do ácido siquímico em pastilha de KBr...	72
Figura 39	Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) do ácido siquímico em CD_3OD , TMS como padrão interno de referência.....	73
Figura 40	Espectro de ^{13}C -RMN/APT (75 MHz) do ácido siquímico em CD_3OD , TMS como padrão interno de referência.....	74
Figura 41	Espectro no Infravermelho do canferol em pastilha de KBr.....	76
Figura 42	Espectro de ^1H -RMN (200 MHz) do canferol em acetona- d_6 , TMS como padrão interno de referência.....	77
Figura 43	Espectro de ^{13}C -RMN (50 MHz) do canfaerol em acetona- d_6 , TMS como padrão interno de referência.....	78
Figura 44	Espectro de Massas do canferol.....	79
Figura 45	Espectro no Infravermelho da quercetina em pastilha de KBr.....	81
Figura 46	Espectro de ^1H -RMN (200 MHz) da quercetina em acetona- d_6 , TMS	

	como padrão interno de referência.....	82
Figura 47	Espectro de ^{13}C -RMN (50 MHz) da quercetina em acetona- d_6 , TMS como padrão interno de referência.....	83
Figura 48	Espectro de Massas da quercetina.....	84
Figura 49	Ação dos extratos aquosos (RIZ, FJ, FV, FS) de <i>G. pectinata</i> (Primavera) à 8,66% sobre sementes de <i>C. hirta</i> (Primavera), durante 89 dias.....	91
Figura 50	Ação dos extratos aquosos (RIZ, FJ, FV, FS) de <i>G. pectinata</i> (Outono) à 8,66% sobre sementes de <i>C. hirta</i> (Outono), durante 133 dias.....	92
Figura 51	Ação dos extratos aquosos (RIZ, FJ, FV, FS) de <i>G. pectinata</i> (Inverno) à 8,66% sobre sementes de <i>C. hirta</i> (Outono), durante 59 dias.....	93
Figura 52	Ação das frações n-BuOH de FJ e FV de <i>G. pectinata</i> (3,84%) de Primavera, Outono e Inverno sobre sementes de <i>C. hirta</i> de Primavera, durante 100 dias.....	95
Figura 53	Efeito da mistura (canferol/quercetina, CQ) à 0,48% sobre sementes de <i>C. hirta</i> coletadas no inverno (CQ-I) e primavera (CQ-P). Para o controle foram usadas sementes coletadas na primavera	96
Figura 54	Efeito da quercetina sobre sementes de <i>C. hirta</i> coletadas no verão	97
Figura 55	Efeito do canferol ($9,7 \times 10^{-4}$ Molar) sobre sementes de <i>C. hirta</i>	98
Figura 56	Efeito da quercetina acetilada sobre sementes de <i>C. hirta</i> de verão.	99

Figura 57	Efeito da quercetina metilada sobre sementes de <i>C. hirta</i> de verão..	100
Figura 58	Efeito das frações n-BuOH de FJ-O de <i>G. pectinata</i> sobre sementes de <i>L. sativa</i> var. grand rapids.....	101
Figura 59	Efeito das frações n-BuOH de FJ e FV de <i>G. pectinata</i> (3,84%) de primavera, outono e inverno sobre sementes de <i>L. sativa</i> var. grand rapids.....	102
Figura 60	Efeito do canferol sobre sementes de <i>L. sativa</i> var. grand rapids...	103
Figura 61	Efeito da quercetina sobre sementes de <i>L. sativa</i> var. grand rapids.....	104
Figura 62	Efeito da quercetina acetilada sobre sementes de <i>L. sativa</i> var. grand rapids.....	105
Figura 63	Efeito da quercetina metilada sobre sementes de <i>L. sativa</i> var. grand rapids.....	106
Figura 64	Efeito do ácido siquímico sobre sementes de <i>L. sativa</i> var. grand rapids.....	107
Figura 65	Efeito de <i>G. pectinata</i> sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de <i>L. sativa</i> var. grand rapids.....	109
Figura 66	<i>L. sativa</i> var. grand rapids submetida à frações n-BuOH de FJ e FV de <i>G. pectinata</i> (3,84%) em três estações do ano.....	110
Figura 67	Efeito das frações n-BuOH de FJ e FV de <i>G. pectinata</i> (3,84%) em três estações do ano sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de <i>L. sativa</i> var. grand rapids.....	111

Figura 68	Efeito do canferol ($1,67 \times 10^{-2}$ Molar) sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de <i>L. sativa</i> var. grand rapids.....	112
Figura 69	Efeito da quercetina sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de <i>L. sativa</i> var. grand rapids.....	113
Figura 70	Efeito da quercetina acetilada sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de <i>L. sativa</i> var. grand rapids.....	114
Figura 71	Efeito da quercetina metilada sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de <i>L. sativa</i> var. grand rapids.....	115
Figura 72	Efeito do ácido siquímico sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de <i>L. sativa</i> var. grand rapids.....	116
Figura 73	Células parenquimáticas do hipocótilo de <i>L. sativa</i> var. grand rapids submetidas à frações n-butanólicas de frondes jovens de primavera de <i>G. pectinata</i> , vistas através de câmara clara A8x11 acoplada ao microscópio Zeis.....	118
Figura 74	Procedimento utilizado na filtração do extrato bruto de <i>C. urucurana</i> Baillon.....	125
Figura 75	Frondes verdes e rizoma de <i>G. pectinata</i>	129
Figura 76	Frondes jovens de <i>G. pectinata</i>	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados de ^1H -RMN (300 MHz) e de ^{13}C -RMN (75 MHz) do sítosterol-3-O- β -D-glicosídeo em piridina deuterada, TMS como padrão interno de referência.....	29
Tabela 2	Dados de ^1H -RMN (200 MHz) e de ^{13}C -RMN (75 MHz) do ácido acetil aleuritólico em clorofórmio deuterado, TMS como padrão interno de referência.....	32
Tabela 3	Dados de ^1H -RMN (200 MHz) e de ^{13}C -RMN (50 MHz) da catequina em acetona deuterada, TMS como padrão interno de referência.....	38
Tabela 4	Dados de ^1H -RMN (200 MHz) e de ^{13}C -RMN (50 MHz) da galocatequina em acetona deuterada, TMS como padrão interno de referência.....	43
Tabela 5	Dados de ^1H -RMN (300 MHz) e de ^{13}C -RMN (75 MHz) do sonderianin em clorofórmio deuterado, TMS como padrão interno de referência.....	49
Tabela 6	Atribuições de ^1H -RMN (300 MHz) e de ^{13}C -RMN (75 MHz) através de experimentos de ^{13}C /APT, HETCOR, HETCOR/LR e INEPT seletivo do 12- <i>epi</i> -metil-barbascoato em clorofórmio deuterado, TMS como padrão interno de referência.....	57
Tabela 7	Atribuições de ^1H -RMN (300 MHz) e de ^{13}C -RMN (75 MHz) através de experimentos de ^{13}C /APT, HETCOR, HETCOR/LR e INEPT seletivo de 15,16-epóxi-3,13(16),14-clerodatrieno-2-ona em clorofórmio deuterado, TMS como padrão interno de referência.....	65
Tabela 8	Atribuições de ^1H -RMN (300 MHz) e de ^{13}C -RMN (75 MHz)	

	através de experimentos de ^{13}C /APT, HETCOR e HETCOR/LR do ácido siquímico em metanol deuterado, TMS como padrão interno de referência.....	71
Tabela 9	Dados de ^1H -RMN (200 MHz) e ^{13}C -RMN (50 MHz) do canferol em acetona deuterada, TMS como padrão interno de referência....	75
Tabela 10	Dados de ^1H -RMN (200 MHz) e ^{13}C -RMN (50 MHz) da quercetina em acetona deuterada, TMS como padrão interno de referência.	80
Tabela 11	Concentração Inibitória Mínima (MIC) em mg/mL para o extrato hidroalcoólico, frações e compostos isolados da casca do caule de <i>C. urucurana</i>	85
Tabela 12	Efeito antinociceptivo do extrato bruto e frações semipurificadas isoladas de <i>C. urucurana</i> no modelo de dor induzido pelo ácido acético.....	86
Tabela 13	Efeito antinociceptivo dos compostos puros isolados de <i>C. urucurana</i> no modelo de dor induzido pelo ácido acético.....	87
Tabela 14	Efeito analgésico da catequina, galocatequina, ácido acetil aieurítico e β -sitosterol-glicosídeo isolados de <i>C. urucurana</i> no modelo de dor causado pela formalina via intra-peritoneal.....	88
Tabela 15	Percentagens de germinação de <i>C. hirta</i> submetida a bioensaios em três estações do ano sobre extratos aquosos de <i>G. pectinata</i> . Análise de variância e teste LSD.....	91
Tabela 16	Percentagens de germinação de <i>C. hirta</i> submetida a frações n-butanólicas de <i>G. pectinata</i> (3,84%) em três estações do ano. Teste de duas proporções sobre duas amostras independentes....	94

Tabela 17	Percentagens de germinação de <i>C. hirta</i> coletadas na primavera e inverno submetidas a mistura de flavonóides (0,48%).....	96
Tabela 18	Percentagens de germinação de <i>C. hirta</i> coletadas no verão submetidas a quercetina em diferentes concentrações.....	97
Tabela 19	Percentagens de germinação de <i>L. sativa</i> submetida a frações n-butanólicas de <i>G. pectinata</i> (frondes jovens de outono). Teste de comparação de duas proporções sobre duas amostras independentes.....	102
Tabela 20	Percentagens de germinação de <i>L. sativa</i> submetida a frações n-butanólicas de <i>G. pectinata</i> (3,84%) em três estações do ano. Teste de comparação de duas proporções sobre duas amostras independentes.....	103
Tabela 21	Percentagens de germinação de <i>L. sativa</i> submetida a quercetina em diferentes concentrações. Teste de comparação de duas proporções sobre duas amostras independentes.....	104
Tabela 22	Percentagens de germinação de <i>L. sativa</i> submetida a quercetina acetilada em diferentes concentrações. Teste de comparação de duas proporções sobre duas amostras independentes.....	105
Tabela 23	Percentagens de germinação de <i>L. sativa</i> submetida a quercetina metilada em diferentes concentrações. Teste de comparação de duas proporções sobre duas amostras independentes.....	106
Tabela 24	Percentagens de germinação de <i>L. sativa</i> submetido ao ácido siquímico em diferentes concentrações. Teste de comparação de duas proporções sobre duas amostras independentes.....	107
Tabela 25	Efeito da fração de fronde jovem de outono em diferentes	

	concentrações sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de <i>L. sativa</i>	110
Tabela 26	Efeito das frações n-butanólicas (3,84%) de frondes jovens e frondes verdes em três estações do ano: Outono (O), Inverno (I) e Primavera (P), sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de <i>L. sativa</i>	112
Tabela 27	Efeito da quercetina em diferentes concentrações sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de <i>L. sativa</i> var. grand rapids.....	113
Tabela 28	Efeito da quercetina acetilada em diferentes concentrações sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de <i>L. sativa</i> var. grand rapids.....	114
Tabela 29	Efeito da quercetina metilada em diferentes concentrações sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de <i>L. sativa</i> var. grand rapids.....	115
Tabela 30	Efeito do ácido siquímico em diferentes concentrações sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de <i>L. sativa</i> var. grand rapids.	116
Tabela 31	Análise histológica da radícula de <i>L. sativa</i> var. grand rapids submetida a frações n-butanólicas de frondes jovens e verdes de <i>G. pectianta</i> nas estações do outono, inverno e primavera. Análise de variância ANOVA one-way.	118
Tabela 32	Análise histológica do hipocótilo de <i>L. sativa</i> var. grand rapids submetida a frações n-butanólicas de frondes jovens e verdes de <i>G. pectianta</i> nas estações do outono, inverno e primavera. Análise de variância ANOVA one-way.	120

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Procedimentos executados para o isolamento de compostos a partir de <i>C. urucurana</i> Baillon.	125
Esquema 2	Procedimento usado para a obtenção do extrato bruto de frondes verdes de outono de <i>G. pectinata</i> .	128
Esquema 3	Procedimento usado para o isolamento de compostos a partir de frondes verdes de outono de <i>G. pectinata</i> .	130
Esquema 4	Procedimento usado para o isolamento de compostos a partir de frondes jovens de outono de <i>G. pectinata</i> .	131

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Acetona-d ₆	acetona deuterada
AcOEt	acetato de etila
APT	Attached Proton Test
CCD	cromatografia em camada delgada
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
C ₅ D ₅ N	piridina deuterada
CG/AR	cromatografia gasosa de alta resolução
COSY	espectroscopia bidimensional de correlação homonuclear a três ligações
d	dublete
dd	duplo dublete
DEPT	distorsionless enhancement by polarization transfer
DCM	diclorometano
DMAP	4,N,N-dimetilaminopiridina
HETCOR	espectroscopia bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação
HETCOR/LR	espectroscopia bidimensional de correlação heteronuclear a duas e três ligações
Hex	hexano
INEPT	insensitive nuclei enhanced polarization
m	multiplete
MeOD	metanol deuterado
MeOH	metanol
n-BuOH	n-butanol
p.f.	ponto de fusão
ppm	partes por milhão
q	quarteto
s	singlete
sl	singlete largo
t	triplete
TMS	tetrametilsilano
φ	diâmetro

RESUMO

O presente trabalho envolveu especialmente a extração, isolamento e identificação de constituintes químicos ativos das cascas do caule de *Croton urucurana* Baillon e das partes aéreas de *Gleichenia pectinata* Willd (PR.).

Das cascas do caule de *C. urucurana* foram obtidos dois novos diterpenos, cujas estruturas foram determinadas como 12-*epi*-metil barbascoato e 15,16-epóxi-3,13 (16)-clerodatrieno-2-ona, além de uma mistura de esteróides (β -sitosterol, stigmasterol e campesterol), ácido acetil aieuritólico, sitosterol-3-O- β -D-glicosídeo, catequina, galocatequina e sonderianim.

As estruturas para os compostos isolados foram estabelecidas por análise espectroscópica (^1H -RMN, ^{13}C -RMN, HETCOR, INEPT, NOE) e por comparação com os dados existentes na literatura.

O ácido acetil aieuritólico e a catequina mostraram atividade antibacteriana para *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*.

Catequina, galocatequina, ácido acetil aleuritólico e β -sitosterol-glicosídeo, exibiram atividade antinociceptiva para o modelo de dor induzida pela injeção intraplantar de formalina nas duas fases.

Das partes aéreas de *G. pectinata* (frondes verdes da estação do outono) foram obtidos canferol e quercetina enquanto das frondes jovens da mesma estação foi isolado o ácido siquímico, sendo que ainda não foram descritos no gênero. Os compostos mencionados foram identificados por técnicas espectroscópicas e por comparação com dados da literatura.

Extratos aquosos, frações n-butanólicas e os compostos quercetina, ácido siquímico e a mistura canferol/quercetina causaram efeitos significativos no processo de germinação e crescimento das espécies *Clidemia hirta* e *Lactuca sativa* var. Grand Rapids.

ABSTRACT

The present work describes especially the extraction, isolation and identification of the chemical compounds, mainly those that exhibit same activity, of the barks of *C. urucurana* Baillon and from the aerial parts of *G. pectinata* Willd (PR.).

From the barks of *C. urucurana* were obtained two new diterpenes whose structures were determined as: 12-*epi*-methyl-barbascoate and 15,16-epóxi-3,13(16)-clerodatriene-2-one besides one mixture of sterols (β -sitosterol, stigmasterol and campesterol), acetyl aleuritolic acid, β -sitosterol-glucoside, catechin, galocatechin and sonderianin.

The structures were established by spectral analysis ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HETCOR, INEPT, NOE) and comparisons among closely related compounds.

Acetyl aleuritolic acid and catechin exhibits activity against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium*.

Catechin, galocatechin, acetyl aleuritolic acid and β -sitosterol-glucoside exhibited significant and dose-related antinociceptive properties against the neurogenic (early phase) and the inflammatory (late phase) of formalin-induces licking in mice.

From the aerial parts (green fronds) of *G. pectinata*, of the autumn season, were obtained kaempferol and quercetin while from the young fronds of the same season was obtained shikimic acid. These compounds were not described in this genus.

Aqueous extracts, n-buthanolic fractions and the compounds quercetin, shikimic acid and the mixture kaempferol/quercetin exhibited significant effects on germination seeds of *C. hirta* and in the growing of shoot and root of *L. sativa* var. Grand Rapids.



Croton urucurana Baillon, popularmente conhecida como Sangra-d'água ou Capixingui



Aspecto do grupamento de *Gleichenia pectinata* Willd (PR), popularmente conhecida como gleiquênia-de-pente ou feito prego

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1. Introdução

Conhecer a atividade biológica e os constituintes químicos de plantas é atraente, não só pela descoberta de novos compostos, mas fundamentalmente porque tais informações podem ser de valor, na revelação de novas fontes econômicas de materiais, tais como corantes, aromas, óleos, gomas, herbicidas, inseticidas, etc., no sentido de expandir a área da quimiotaxonomia (bioquímica sistemática), com relação à biossíntese (rotas biossintéticas) e especialmente para decifrar o valor dos remédios folclóricos e obter novas moléculas ativas.

Esforços têm sido aplicados nos mais diversos laboratórios e nas mais diversas culturas, no sentido de identificar as substâncias ativas bem como avaliar o efeito provocado por esses metabólitos secundários sobre outras plantas, insetos e sobre o homem¹.

Acredita-se que muitos metabólitos secundários encontrados em plantas ocorreram originalmente como resultado da seleção natural durante a co-evolução de insetos e plantas².

Atualmente centenas de plantas são utilizadas na medicina e os químicos de produtos naturais trabalham no sentido de analisar e estudar os efeitos terapêuticos das plantas, comparando e classificando as diversas propriedades, não com a finalidade de diminuir esta confiança na natureza, mas sim para agrupar as plantas de efeitos similares, para conhecer os princípios ativos responsáveis pela cura das enfermidades, separá-los das plantas que os contém, determinar suas estruturas químicas, procurar suas sínteses e propor modificações estruturais em busca de uma maior atividade.

Também na comunicação entre os seres vivos a química representa um campo de grande importância científica e de interesse prático para a convivência de todos os organismos vivos.

Substâncias com potencial de atividade alelopática, também têm sido isoladas de plantas, as quais participam das interações entre os organismos vivos (planta-planta, animal-animal, planta-animal).

Os seres vivos em geral têm a capacidade de sintetizar substâncias alelopáticas, porém as plantas respondem pela maior quantidade e diversidade. A identificação dessas substâncias auxilia os especialistas em melhoramento genético no processo de criação de genótipos mais resistentes à bactérias, fungos e insetos, além de proporcionar dados científicos para combate específico de predadores de culturas utilizadas para alimentação humana e também participar ativamente do processo de convivência ecológica. A alelopatia, considerada a ciência do futuro, também tem ajudado na pesquisa de novos modelos de herbicidas naturais que sejam mais específicos e menos prejudiciais ao homem que os sintéticos usados até o momento na agricultura³.

A química de produtos naturais, atualmente, compreende a síntese ou isolamento de compostos, a elucidação ou confirmação de suas estruturas, a caracterização das propriedades físico-químicas, a determinação da atividade biológica e a exploração dessa atividade ao nível molecular pelo estudo das relações entre estrutura química e atividade biológica⁴.

Com o intuito de contribuir para a química de produtos naturais ativos, investigamos as espécies *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) e *Gleichenia pectinata* (Willd) Pr. (Gleicheniaceae) procurando isolar, identificar os constituintes químicos e avaliar seus potenciais de atividade biológica.

1.2. Objetivos

As espécies *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) e *Gleichenia Pectinata* Willd (Pr.) (Gleicheniaceae) foram objetos de estudo para a realização de uma investigação fitoquímica, que teve como principais objetivos:

- a) Analisar as atividades biológicas dos extratos e frações de *Croton urucurana* e *Gleichenia pectinata*.
- b) Isolar e purificar especialmente os constituintes químicos ativos dos extratos brutos de *C. urucurana* e *G. pectinata* através de técnicas cromatográficas.
- c) Identificar ou determinar as estruturas dos compostos isolados através de métodos comparativos e da aplicação de métodos físicos tais como U.V., I.V., R.M.N. de ^1H e ^{13}C , Análise Elementar e Massas.
- d) Avaliar o potencial de atividade biológica dos compostos puros e se possível realizar modificações estruturais na procura de um conhecimento da relação estrutura-atividade.

CAPÍTULO 2

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Croton urucurana* Baillon

2.1.1. Posição sistemática de *Croton urucurana* Baillon

Segundo o sistema de classificação de CRONQUIST, citado por BARROSO ⁵, a espécie *C. urucurana* Baillon tem a seguinte classificação:

DIVISÃO: MAGNOLIOPHYTA

CLASSE: MAGNOLITAE (DICOTILEDÔNEA)

SUBCLASSE: ROSIDAE

ORDEM: EUPHORBIALES

FAMÍLIA: EUPHORBIACEAE

SUBFAMÍLIA: CROTONOIDEAE

TRIBO: CROTONEAE

GÊNERO: *Croton*

ESPÉCIE: *Croton urucurana* Baillon

SINONÍMIA POPULAR: SANGRA-D'ÁGUA

2.1.2. Sinopse da família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae é representada aproximadamente por 290 gêneros e cerca de 7500 espécies, distribuídas em todas as regiões tropicais e subtropicais do globo, principalmente da América e da África.

No Brasil ocorrem aproximadamente 72 gêneros e cerca de 1100 espécies, de hábito e habitat diferentes, difundidas em todos os tipos de vegetação. São árvores, arbustos, subarbustos, ou ervas com folhas alternadas, simples ou compostas e estipuladas. As folhas simples podem ter limbo inteiro ou dividido em lobos ou segmentos como para os gêneros *Dalechampia*, *Croton*, *Jatropha*, etc. As estipulas podem ser diminutas ou bem desenvolvidas. Além destas, alguns gêneros apresentam estípelas como por exemplo, *Croton*, *Alchornea*, *Acalipha*, etc.⁵ Nem todas as Euphorbiaceae são latexcentes.

O indumento é variável, podendo ser constituído de pêlos simples, uni ou pluricelulares, unisseriados, ou de pêlos ramificados; esse tipo bem como o lepidoto, é encontrado com frequência entre as espécies do gênero *Croton*, *Pera* e *Hieronyma*.

HUTCHINSON, citado por BARROSO⁵, considera a presença de rudimento de ovário ou de estaminódios caráter de primitividade da família. Também é de grande valor para a sistemática dos gêneros de Euphorbiaceae a disposição das flores nas inflorescências. Geralmente as flores são monoclamídeas, com sépalas de pré-floração valvar ou imbricada. Nos gêneros *Croton*, *Chiropetalum*, *Cleidion* e *Amanoa* as pétalas são rudimentares.

O androceu é variável, apresentando de poucos a muitos estames, com filetes longos ou curtos, livres ou concrecidos de vários modos e dispostos em coluna, sobre um andróforo ou assentados sobre uma projeção carnosa do receptáculo. O gineceu típico das Euphorbiaceae é o tricarpelar que se constitui de um ovário livre, trilocular, com três estiletos livres entre si ou concrecidos até certa altura, inteiro, bífido, lobados ou lacinados no ápice.

As sementes podem ser globosas, ovóides, mais ou menos angulares ou podem apresentar o dorso convexo e a parte ventral mais ou menos aplanada ou carenada. Um apêndice carnoso, cônico, branco ou avermelhado, pode ou não desenvolver-se na extremidade da micrópila originando a chamada carúncula, característica das sementes de *Croton*, *Ricinus*, *Jatropha*, etc⁵.

2.1.3. Descrição do gênero *Croton*

Provém do nome grego *Croton* (carrapato), devido a semelhança da semente com este aracnídeo. Os antigos gregos chamavam de *Croton* o *Ricinus communis* (mamoneira), da mesma família, por sua semente se assemelhar também a um carrapato.

Pode se apresentar como árvores, arbustos ou ervas. As folhas são alternas ou raras vezes opostas e pecioladas. Estípulas podem ser evidentes ou não; indumento de escamas ou de pêlos estrelados. As flores são monóicas ou dióicas. Sépalos masculinos e femininos em regra 5, raras vezes 4 ou 6. Pétalos do mesmo número que os sépalos e mais delgados. O ovário se apresenta em regra 3-locular com estiletos dicótomo-divididos. As sementes são miudamente carunculadas.

As cerca de 700 espécies são naturais das regiões tropicais do mundo com poucas espécies um pouco mais ao norte na América do Norte e a Leste da Ásia⁶.

2.1.4. Descrição da espécie em estudo

Croton urucurana, popularmente conhecida como urucurana, (nome indígena) licurana, sangra-d'água, sangue-de-drago, capixingui ou tapixingui é uma árvore que pode atingir até 20 m de altura. Tem como característica a produção de uma seiva de cor vermelha.

Os ramos são robustos, mais ou menos angulados, com raminhos, pecíolos, e a face inferior das folhas e toda a inflorescência cobertos de pêlos estrelados, deprimidos e brancos.

Possui estípulas foliáceas com até 13 mm. As folhas são ovadas, acuminadas com 8 a 18 cm, cordadas pela base e com 2 a 6 glândulas sésses, palminervadas, subglabras na face superior, subinteiras.

São árvores características e exclusivas das margens dos rios da Floresta Estacionai Decidual no Alto Uruguai e da Floresta Estacionai Semidecidual da bacia do rio Paraná no sul do Brasil, onde apresenta larga, porém descontínua e pouco expressiva dispersão⁶.

É uma espécie heliófita ou de luz difusa e seletiva higrófito muito rara em Santa Catarina; mais frequente na bacia do Paraná; desenvolve-se quase que exclusivamente à beira dos rios, nas florestas de galeria, nas florestas ciliares semidevastadas ou nas capoeiras, onde pode formar pequenos agrupamentos, como sucede nas ilhas e margens do rio Paraná.

Área de dispersão: Rio de Janeiro até Mato Grosso e Santa Catarina. Argentina, Paraguai e Bolívia.

Utilidades: A madeira é utilizada na construção de canoas, construção civil e naval, obras internas, externas e hidráulicas, esteios, dormentes; na tinturaria, carroçaria, marcenaria e carpintaria. A casca é utilizada em curtumes e como infusão para fins medicinais⁶.

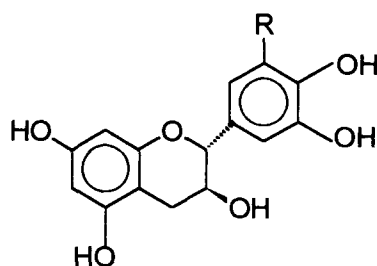
2.1.5. Estudos químicos realizados com plantas do gênero *croton*

A família Euphorbiaceae e o gênero *Croton* têm mostrado ser uma fonte bastante rica no que diz respeito a diversidade de compostos isolados bem como o número de compostos com atividade fármaco-biológica.

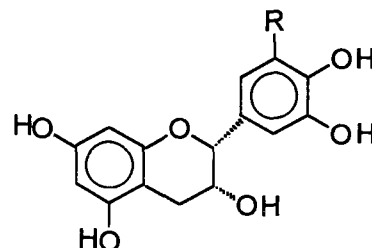
Diversas espécies do gênero *Croton*, tais como *C. lechleri* L., *C. draconóides* também classificado como *C. palanostigma*, *C. draco*, *C. echinocarpus*, *C. gossipifollus*, *C. hibiscifolius*, *C. xalapensis*, *C. erythrochilus*, *C. salutaris* e *C. urucurana* produzem uma seiva viscosa de coloração vermelha que tem sido usada principalmente pelos povos das Américas para o tratamento de um grande número de doenças e enfermidades tais como cicatrização de feridas, distúrbios gástricos, câncer, reumatismo, anti-hipertensivo, anti-epilético e blenorragia^{7,8,9,10}.

Em uma pesquisa quimiotaxonômica de plantas do gênero *Croton* que crescem na Tailândia, SATO e col.¹¹ evidenciaram o alto índice de ocorrência de terpenóides, principalmente diterpenos com os mais diversos esqueletos: labdano, clerodano, pimarano, tiglano, cembrano e crotofolano. Os mesmos autores fazendo uma análise de *C. lechleri* evidenciaram que a seiva dessas plantas é rica em proantocianidinas, consistindo de cerca de 90% do peso seco, variando desde monômeros até heptâmeros e que o perfil cromatográfico da casca e da seiva são bastante semelhantes¹².

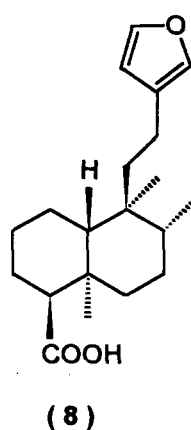
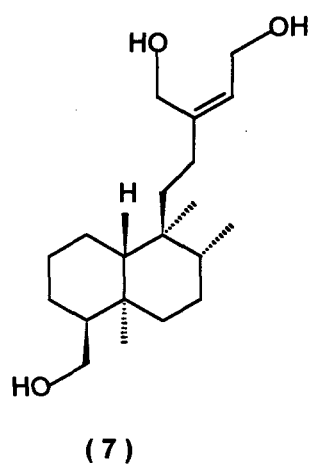
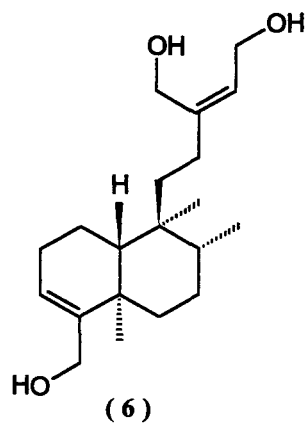
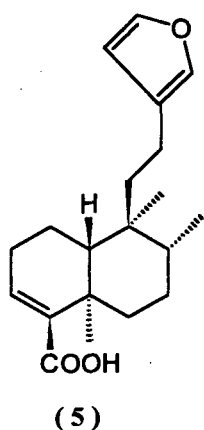
Compostos previamente isolados de espécies do gênero *Croton* incluem: (+) catequina (1), (-) epicatequina (2), (+) galocatequina (3), (-) epigalocatequina (4) e seus dímeros e trímeros⁷, diterpenos do tipo clerodano como o ácido hardwickiico (5), bincatriol (6), crolechinol (7), e ácido crolechínico (8)¹,



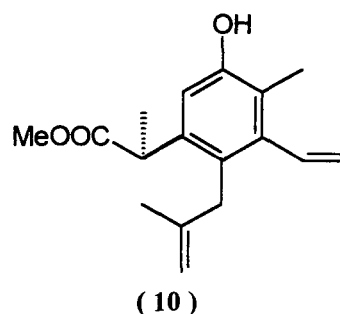
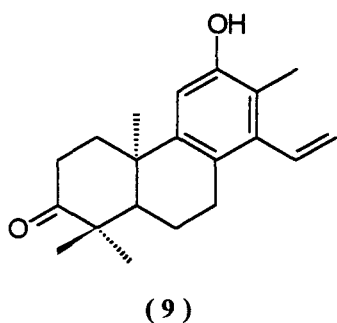
R = H (1)
R = OH (3)

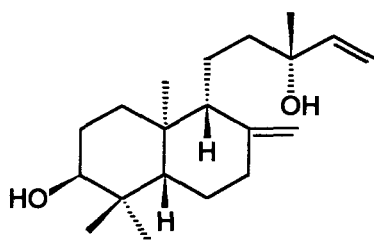


R = H (2)
R = OH (4)

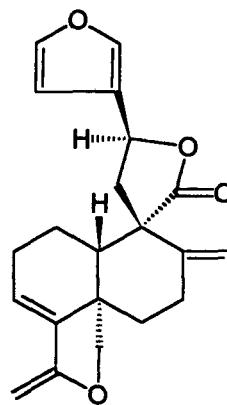


diterpenos do tipo clestantano como o sonderianol **(9)** e 3,4- seco-sonderianol **(10)**¹³, diterpeno álcool do tipo kaurano como ent-3- α -hidroxi-13-epimanool **(11)**¹⁴, diterpeno furano-lactona do tipo ent-clerodano como o plaunolide **(12)**¹⁵,



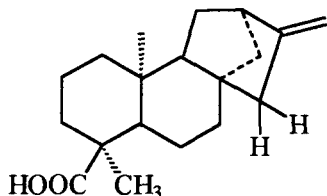


(11)

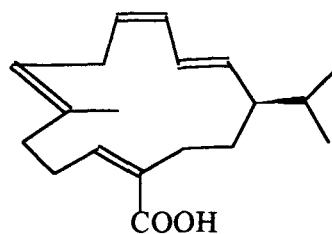


(12)

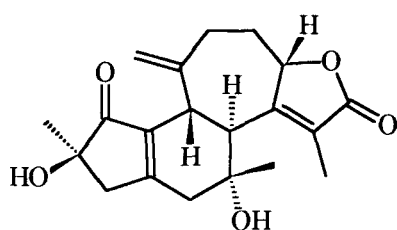
diterpeno ácido do tipo kaurano como o ácido ent-kaur-16-en-18-óico **(13)**¹⁶, diterpeno do tipo cembrano como o ácido poilaneico **(14)**¹⁷, diterpeno com o esqueleto crotofolano como o crotofolin A **(15)**¹⁸ e crothoaxmanoxide **(16)**⁹,



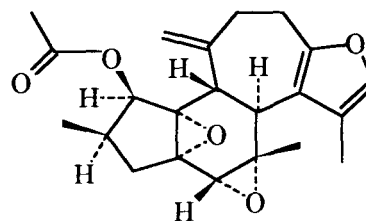
(13)



(14)

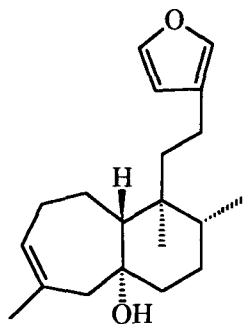


(15)

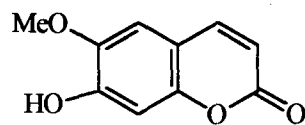


(16)

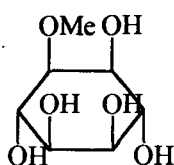
diterpeno com o esqueleto printziano como o 5,10-dihidro-5- α -hidroxi-10- β H-printziano **(17)**¹⁹, cumarina como a escopoletina **(18)**¹³, tocoferol, esqualeno, ácidos graxos, inositol **(19)**^{19,20}, óleos essenciais, benzofurano-sesquiterpeno como o dihidro-1,2,5,8-tetrametil-6-H-indeno (5,4,b) furano **(20)**¹⁰, quercetina, kaenferol-4-O-hidroxicinâmico éster²¹ e lignanas como a 2-(3',4'-dimetoxifenil)-3-hidroximetil-2,3-dihidro-7-metoxi-benzofurano-5-n-propanol **(21)**^{22,23}.



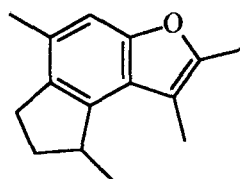
(17)



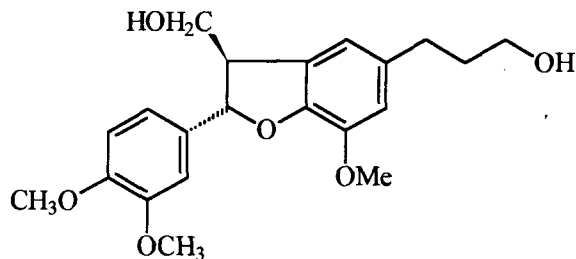
(18)



(19)

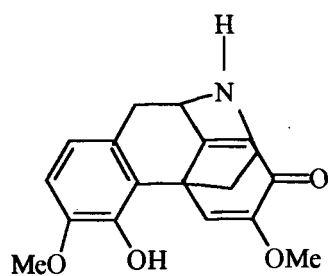


(20)

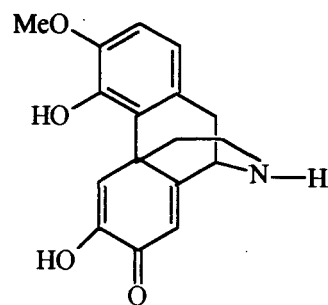


(21)

Alcalóides também têm sido reportados como metabólitos secundários presentes em algumas espécies do gênero *Croton* tais como *C. lechleri*, *C. draconóides*, *C. salutaris*, dos quais já foram isolados taspina, taliporfina, glaucina, salutarina, salutaridina, N-nor-salutaridina (22), e 3-metoxi-4,6-dihidroxi-morfinadien-7-one (23)^{7,24,25,26}.



(22)

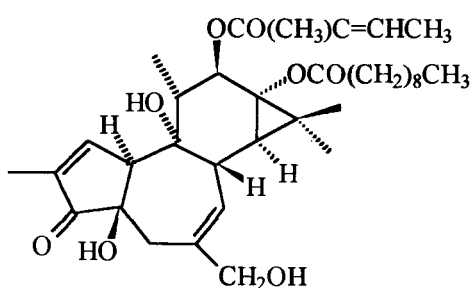


(23)

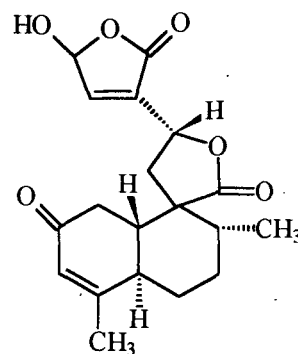
2.1.6. Atividade biológica de compostos isolados de diferentes espécies do gênero *Croton*.

Plantas da família Euphorbiaceae bem como do gênero *Croton* têm sido amplamente utilizadas pela medicina folclórica para o tratamento de câncer, tumores e verrugas mostrando atividade anti-leucêmica contra leucemia linfocítica (P-388) em ratos²⁷.

O fracionamento do óleo de *Croton tiglium* levou ao isolamento de um diterpeno diéster denominado de forbol-12-tiglato-13-decanoato (24) que mostrou atividade biológica como cocarcinogênico²⁷; de *Croton cajucara*, isolaram-se dois diterpenos, cajucarinolide (25)

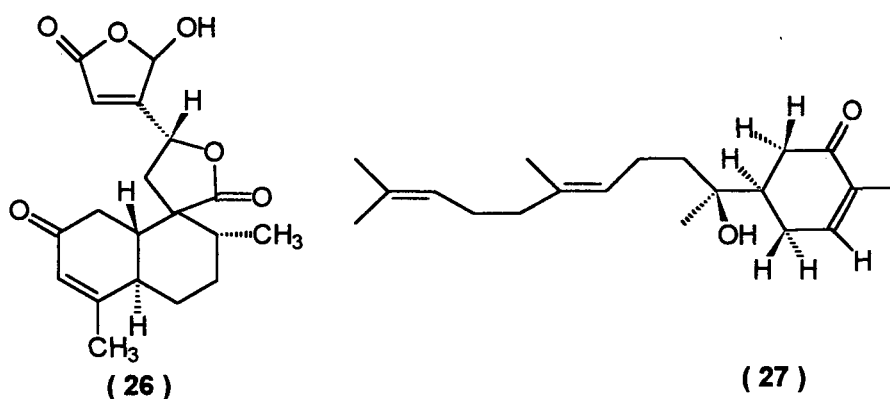


(24)

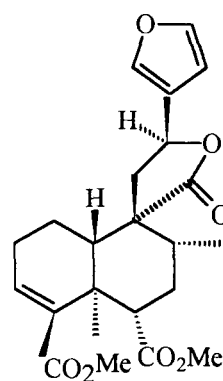
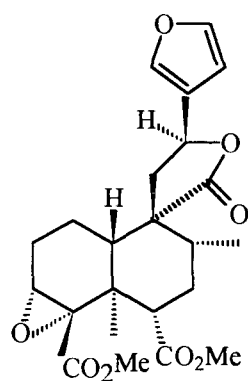
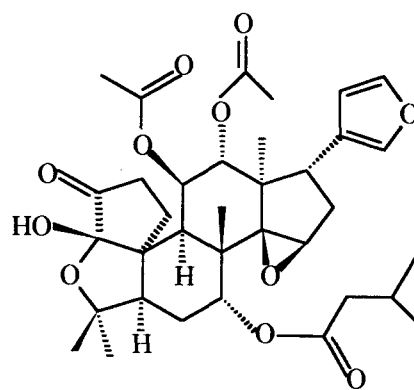
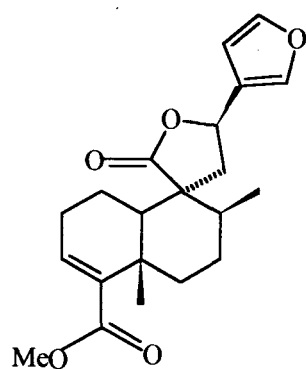


(25)

e isocajucarinolide (26) que apresentaram atividade anti- inflamatória e inibiram a fosfolipase A₂ in vitro²⁸; um diterpeno (27) isolado de *C. linearis* que mostrou atividade inseticida para *Cylas formicarius elegantulus* (Coleoptera) inseto responsável pela mais importante peste de batata-doce do mundo²⁹;



atividade biológica contra *Mycobacterium smegmatis* e *Staphilococcus aureus* do extrato benzênico de *C. sonderianus* do qual posteriormente foi isolado um diterpeno denominado sonderianin **(28)**^{30,31}; um tetranortriterpeno do tipo limonóide **(29)** que apresentou atividade anti-feeding para *Pectinophora gossypiella* isolado de *C. jatrophioides*²; dois diterpenos korberin A **(30)** e korberin B **(31)** que foram ativos contra *Bacillus subtilis* e *Penicillin V* isolados de *C. lechleri*¹².



2.2. *Gleichenia pectinata* Willd (PR.)

2.2.1. Posição sistemática de *Gleichenia pectinata* Willd (Pr.)

Segundo o sistema de classificação de ENGLER, citado por JOLY ³², a espécie *Gleichenia pectinata* Willd (PR.) tem a seguinte classificação:

DIVISÃO: PTERIDOPHYTA

CLASSE: FILICES (PTEROPSIDA)

SUB-CLASSE: LEPTOSPORANGIATAE

ORDEM: FILICALES

FAMÍLIA: GLEICHENIACEAE

GÊNERO: GLEICHENIA

ESPÉCIE: *Gleichenia pectinata* Willd. (PR.)

SINONÍMIA POPULAR: FEITO-PREGO

2.2.2. Sinopse da família Gleicheniaceae

A família Gleicheniaceae é uma família natural que compreende cerca de 130 espécies conhecidas, tropicais ou austrais de origem antártica.

A maioria dos autores têm tratado essa família com um único gênero *Gleichenia*, outros distinguem vários gêneros³³.

Se caracteriza por possuir fetos terrestres com rizoma longamente rasteiro, lenhoso; as frondes pinadas ou mais compostas com divisão dicotômica, terminando em pinas geminadas; botão central abortivo desenvolvido num ramo com pinas, estas geralmente coriáceas, rijas; as veias livres; os esporângios poucos em número, abrindo por uma fenda longitudinal; sem indúcio, os esporos tetraédricos ou bilaterais, sem perispório.

Na região de Santa Catarina cerca de uma dúzia de espécies é conhecida³³.

2.2.3. Descrição da espécie em estudo

Gleichenia pectinata Willd. (PR.) popularmente conhecida como gleiquênia-de-pente, samambaia, feto ou feito-prego é uma heliófita que apresenta uma

estratégia de crescimento de superfície. O rizoma longamente rasteiro (3-4 mm de diâmetro) encontra-se diretamente sobreposto aos solos compactados, formando através de ramificações sucessivas uma trama densa que emite periodicamente novas folhas. Os pecíolos são robustos (cerca de 4 mm de diâmetro), 50-60 cm de comprimento; lâmina enorme com ramificação indefinida, cada um dos dois ramos primários prolonga-se; em cada nova bifurcação um ramo é curto, separando-se em ângulo mais ou menos reto e portanto um ou dois pares de pinas geminadas, o outro mais longo em ângulo aberto repete indefinidamente por novas ramificações o processo; os ramos são desprovidos de segmentos; as pinas geminadas são oblongo-lanceoladas, acuminadíssimas, profundamente pinatipartidas. Os segmentos são oblongos, pouco atenuados para o ápice, obtusos e emarginados; as nervuras fracamente emersas nos dois lados, trifurcadas; as gemas geralmente abortivas revestidas de pelos arruivados, raras vezes uma gema inferior evoluída em ramo; os esporos são lisos e reniformes³³.

Segundo QUEIROZ³⁴, as associações de *Gleichenia pectinata* caracterizam-se pela forte dominância desta espécie, apresentando um cortejo florístico bastante reduzido. A altura média de uma associação de *G. pectinata* (Gleichenietum) encontra-se em torno de 1,5 m. Frequentemente os grupamentos têm dezenas de anos e os indivíduos de outras espécies que se sobressaem são alguns poucos elementos, onde predominam espécies arbustivas como *Dodonaea viscosa*, *Rapanea ferruginea*, *Miconia ligustroides*, *Tibouchina urvilleana* e *Roupala cataractarum*.

É uma espécie que cresce sobre solos compactados sendo frequente em barrancos à beira de estrada. A nível botânico é facilmente reconhecível pela ramificação indefinida, pelo número enorme de pinas e também pela forma perfeitamente pectinada das pinas³⁴.

Área de dispersão: No Brasil encontra-se distribuída nos estados de Santa Catarina, São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia. Também ocorre na Guiana Holandesa e Inglesa, na Venezuela, Panamá e México³³.

2.2.4. Alelopatia

O estudo da alelopatia vem se desenvolvendo progressivamente, tendo sido Cornéiius MÜLLER (década de 60), citado por WILLIAMSON³⁵, o pioneiro. Na

década de oitenta houve o ressurgimento da pesquisa em Alelopatia, (fig. 1) ocorrendo um grande incremento no número de publicações referentes a este fenômeno ³⁵.

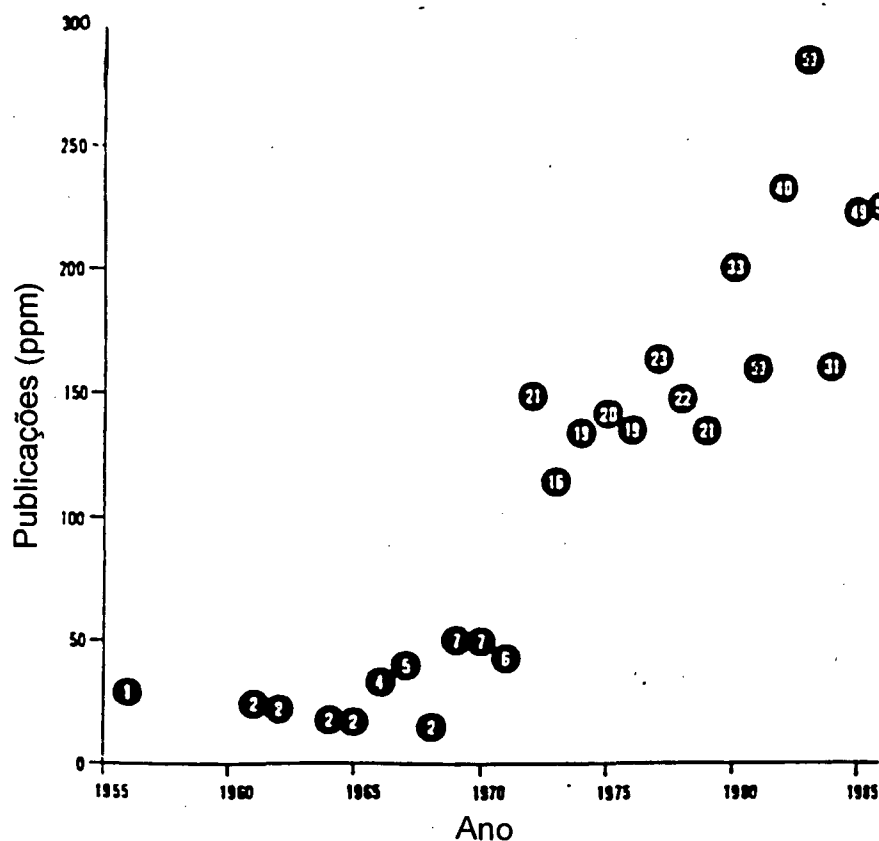


Figura 1 - Crescimento anual de estudos sobre alelopatia, medido pelo número de publicações listadas no Biological Abstract relativo ao total anual de publicações em ppm. Cada esfera representa o número absoluto de publicações em alelopatia. [Williamson, G. B. ³⁵]

Porém, o reconhecimento de interações alelopáticas (inibição de uma planta por outra) data de 1834, quando DE CANDOLE, citado por GLIESSMAN ³⁶ e STOWE ³⁷, expõe a primeira teoria sobre essa interferência reconhecendo “solos doentes” em terras agrícolas e sugerindo que poderiam ser causadas por exsudados químicos.

Desde a década de 60, a Alelopatia vem sendo cada vez mais reconhecida como um importante mecanismo ecológico e agrícola, atuando na sucessão, formação de comunidades e vegetação clímax e produtividade de colheitas,

comprovando a ação alelopática na constituição dos ecossistemas naturais e nas culturas³⁸.

Um pouco antes do final do século XIX surgiram provas cada vez mais concludentes de que as plantas produzem substâncias químicas eventualmente prejudiciais a outras.

Alguns pesquisadores têm mostrado que substâncias químicas liberadas pelas plantas podem causar efeitos indiretos, como inibir o processo de nitrificação e fixação de nitrogênio, ou ainda alterar uma série de processos fisiológicos (fig. 2), o que torna difícil a separação dos efeitos primários dos secundários^{38,39,40}.



Figura 2 - Sequência hipotética de ação sugerindo o envolvimento de aleloquímicos nos processos vegetais. Cada flecha sugere um impacto negativo. [Einhellig et al ³⁸]

O termo **Alelopatia**, foi criado em 1937, pelo pesquisador alemão Hans MOLISCH, citado por STOREY ⁴¹, a partir das palavras gregas **allelon** (mútuo) e

pathos (prejuízo). Apesar da precisão da sua etimologia, esse termo tem sido interpretado de diversas maneiras.

STEWART ⁴² definiu a Alelopatia como sendo a inibição da germinação, crescimento ou metabolismo de uma planta em função da liberação de substâncias químicas orgânicas por outra planta, como observou em regiões temperadas e úmidas de Oregon e Washington, onde as condições eram propícias para uma rápida decomposição dos metabólitos, sugerindo a influência de uma ação alelopática, que interfere no crescimento de certas espécies herbáceas.

RICE ⁴³ e WALLER ⁴⁴ entendem que o termo Alelopatia está relacionado à interações bioquímicas entre todos os tipos de plantas, incluindo microorganismos tradicionalmente locados no reino vegetal.

LAW e REGNIER, citado por NORDLUND⁴⁵, propuseram o termo **semioquímicos** (semeon=sinal) para substâncias químicas que são mediadoras nas interações entre organismos. Estes interagem com outros de mesma e diferentes espécies. As interações podem ser de muitos tipos diferentes, compreendendo desde o tipo predador-presa até de acasalamento.

Os semioquímicos são subdivididos em dois grandes grupos: Feromonas e Aleloquímicos, dependendo se as interações são intraespecíficas ou interespecíficas, respectivamente⁴⁵.

O termo feromona, do grego (phereum=transportar e horman=excitar ou estimular) foi proposto por KARLSON e LUSCHER em 1959, citado por NORDLUND⁴⁵ e é usado para descrever as substâncias que mediam interações intraespecíficas. Esta definição restringiu o uso do termo para substâncias químicas provenientes de animais. Porém, em 1976, NORDLUND e LEWIS, citado por NORDLUND⁴⁵ ampliaram a definição para incluir substâncias químicas de plantas resultando na seguinte forma: uma substância secretada por um organismo que, liberada para o meio, causaria uma reação específica em um organismo receptor da mesma espécie.

Os aleloquímicos compreendem o segundo grande grupo de semioquímicos. O termo aleloquímico, proposto por WHITTAKER, citado por NORDLUND ⁴⁵ e usado para descrever substâncias que mediam interações interespecíficas, é definido como substâncias químicas que são importantes para organismos de espécies diferentes por razões tais que não alimentares.

Os aleloquímicos, por sua vez, são subdivididos em quatro grupos: alomonas, kairomonas, sinomonas e apneumonas⁴⁵.

a) **Alomonas**: São substâncias produzidas ou adquiridas por um organismo que, quando contatam um indivíduo ou outra espécie do contexto natural, evocam no receptor uma resposta comportamental ou fisiológica que é adaptavelmente favorável ao emissor mas não ao receptor. Numerosos tipos de interações são mediados por alomonas. Venenos, por exemplo, são usados na captura de presas e defesa. *Pycnopsyche scabripennis*, por exemplo, produz uma secreção de defesa que contém p-cresol, indol e escatol num par de glândulas exócrinas. Alomonas também são usadas pelas plantas como mecanismo de defesa contra herbívoros interferindo na competição entre as plantas. Defesa não é a única função das alomonas. Certos predadores são capazes de usar alomonas para atrair ou senão manipular a presa⁴⁵.

b) **Kairomonas**: Em contraste às alomonas, as kairomonas beneficiam o receptor e não o emissor nas interações interespecíficas. Uma kairomona é uma substância produzida ou adquirida por um organismo que, quando contata um indivíduo ou outra espécie do contexto natural, evoca no receptor uma resposta comportamental ou fisiológica que é adaptavelmente favorável ao receptor mas não ao emissor. Por exemplo, brevicomina, encontrada em baratas, foi utilizada pelo predador *Thanasimus dubius* para localizar a presa. Também em ambientes marinhos, *Dendroctonus excentricus*, *Pecten*, e *Nassa* todos exibem uma resposta de fuga quando expostos a substâncias químicas provenientes da estrela-do-mar⁴⁵.

c) **Sinomonas**: São substâncias químicas mediadoras de interações mutualísticas. O termo foi definido como substâncias químicas produzidas ou adquiridas por um organismo que, quando contata um indivíduo ou outra espécie do contexto natural, evoca no receptor uma resposta comportamental ou fisiológica que é adaptavelmente favorável à ambos, receptor e emissor. Por exemplo, para sobreviver a uma dieta de madeira, *Cryptocercus punctulatus*, requer um protozoário que digira a madeira em seu intestino. O hormônio ecdisona que regula as trocas de instares em *C. punctulatus*, também age como uma sinomona que induz o ciclo sexual de alguns desses protozoários permitindo sua reprodução⁴⁵.

d) **Apneumonas**: São substâncias químicas emitidas por um material não vivo que evoca uma reação comportamental ou fisiológica que é adaptavelmente favorável para o organismo receptor mas detrimental para um organismo ou outra espécie que

pode ser encontrada no material não vivo. Por exemplo, o parasitóide *Venturia canescens* é atraído pelo odor de farinha de aveia, seu hospedeiro alimentar⁴⁵.

Atualmente, um dos aspectos mais estudados em Alelopatia tem sido o reconhecimento da resposta característica de um organismo em relação aos aleloquímicos isto é, estimulação (vegetal) ou atração (animal) à baixas concentrações dos aleloquímicos e inibição (vegetal) ou repelência (animal) a aumentos de concentração. Este fenômeno tem sido amplamente reconhecido em outras substâncias químicas reguladoras de crescimento, incluindo herbicidas⁴⁶.

Na grande maioria das vezes os resultados dos bioensaios de germinação são expressados na forma de percentagem de germinação. Alguns métodos de quantificação (modelos matemáticos) são usados para prever efeitos alelopáticos na prática. Segundo An e colaboradores, um aleloquímico possui dois atributos complementares: estimulação e inibição, sendo que ambos possuem uma resposta sigmoidal à concentração de aleloquímicos⁴⁶ (fig. 3).

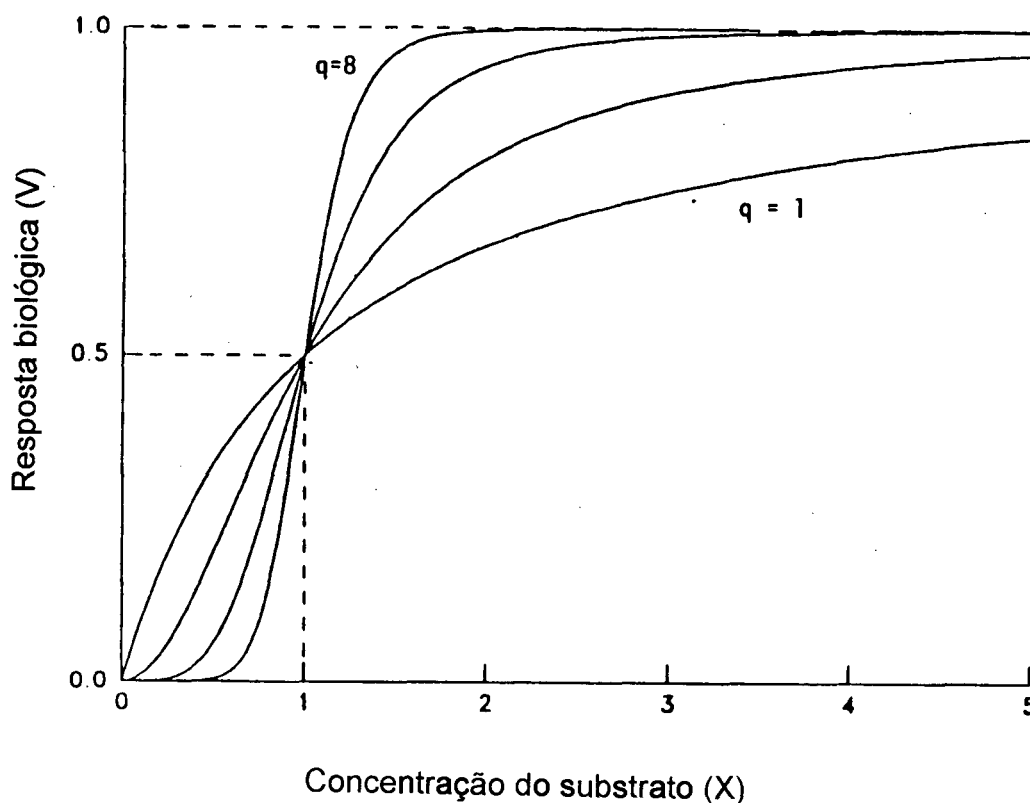


Figura 3 - Curva hipotética e geral de resposta sigmoidal relacionando concentração do substrato versus resposta biológica [An et al.⁴⁶].

A equação matemática usada para definir esta resposta é:

$$V = \frac{V_m \cdot [X]^q}{K^q + [X]^q}$$

onde, $[X]$ é a concentração do aleloquímico, V a resposta biológica, V_m a resposta para uma concentração saturante, K a concentração para a qual $V=V_m/2$ e q a constante que controla a forma da curva

Assim, se:

$$[X] \lll K \therefore V = \frac{V_m \cdot [X]^q}{K^q},$$

$$[X] = K \therefore V = \frac{V_m}{2},$$

$$[X] \ggg K \therefore V = V_m.$$

Também são ferramentas necessárias no estudo da Alelopatia, os bioensaios, que servem para avaliar o potencial alelopático das espécies em estudo e acompanhar a resposta biológica durante as fases de extração, fracionamento, purificação e identificação dos compostos bioativos, (fig. 4)^{47,48}.

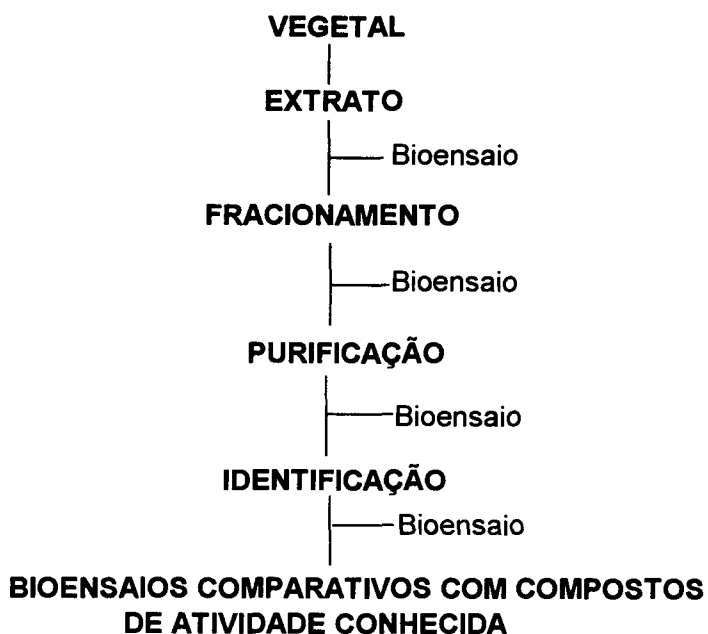


Figura 4 - Utilidade dos bioensaios durante o fracionamento e identificação de aleloquímicos [Leather et al⁴⁷].

O bioensaio mais usado para testar a atividade alelopática é a inibição ou algumas vezes estimulação de germinação de sementes de espécies silvestres ou de cultura, visto que são simples, rápidos e requerem pequenos volumes de solução. Para sementes de cultura, as quais são tratadas para germinar 100 %, avalia-se somente a inibição, enquanto que a estimulação causada por muitos aleloquímicos não é detectada. Tal resposta é na maioria das vezes detectada em sementes silvestres⁴⁷.

Além de ensaios de germinação de sementes, ensaios de crescimento e desenvolvimento de plantas também são usados para demonstrar a atividade alelopática. Nestes, avalia-se o potencial de atividade alelopática através da medida do alongamento da radícula e do hipocótilo, que geralmente é mais sensível que os ensaios de germinação.

Alguns problemas são evidentes na utilização dos bioensaios. Estes incluem: a) as espécies variam em sensibilidade para aleloquímicos específicos, b) sensibilidades diferentes ocorrem para algumas fases de crescimento da planta, c) o modo de ação de numerosos aleloquímicos pode não ser o mesmo^{47,48}.

Cerca de 10.000 metabólitos secundários são conhecidos atualmente, porém supõe-se que o seu número ultrapasse a centena de milhar, visto que até agora, apenas se identificaram os componentes principais em cada classe estrutural e em algumas espécies. Na tentativa de enquadrá-los em grupos químicos têm sido propostas diversas classificações.^{47,48}

WHITTAKER e FEENY⁴⁹, em 1971, classificaram os metabólitos secundários em 5 grandes grupos: ácidos fenólicos (feniipropanos), flavonóides e outros compostos aromáticos (acetogeninas), terpenóides, esteróides e alcalóides (fig. 5).

RICE⁵⁰ propôs 15 categorias de compostos, que são agrupados conforme suas similaridades químicas.

PUTNAM, citado por ALMEIDA⁵¹ agrupou-os em: gases tóxicos, tais como (ácido cianídrico, amônia, etileno, monoterpenos, etc.); ácidos orgânicos e aldeídos (ácido málico e cítrico, ácidos simples alifáticos e derivados, acetaldeído, etc.); ácidos aromáticos (derivados do ácido cinâmico e benzóico); lactonas simples insaturadas (ácido p-sórbico, frequente em frutos e a patulina produzida por fungos no solo, e que se desenvolve em resíduos de trigo incorporados ao solo e responsabilizado pela inibição do desenvolvimento do milho); cumarinas (como a esculina e o psoraleno encontrado nos grãos de legumes e cereais, a escopoletina

encontrada na aveia); quinonas (como a juglona encontrada nas folhas, frutos e casca da noqueira); flavonóides (florizina encontrada nas raízes da macieira, e canferol que inibe o transporte de elétrons e a fosforilação nos cloroplastos do feijão); taninos (ésteres do ácido gálico); alcalóides (cocaína, cafeína, quinina, que inibem a germinação de sementes do tabaco, café e cacau); terpenóides e esteróides (α -pineno, β -pineno, não estando ainda bem definida a ação fitotóxica dos esteróides); e também alguns ácidos graxos de cadeia longa, álcoois, polipeptídeos e nucleosídeos ⁵¹.

Esses metabólitos geralmente ocorrem nas plantas de forma que as protejam de seus efeitos, mantendo-os biologicamente inativos ⁵¹.

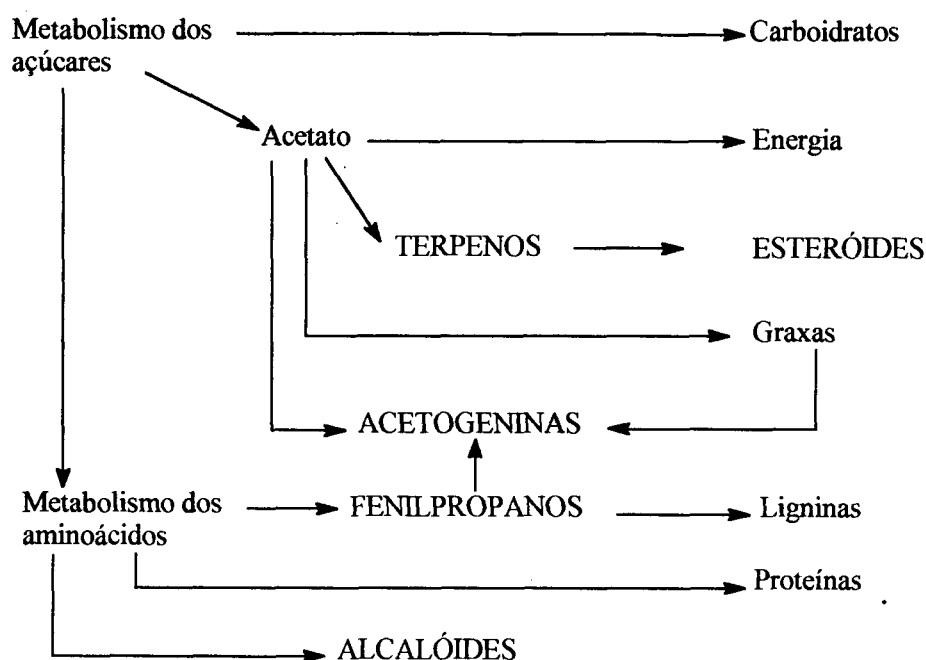


Figura 5 - Relações metabólicas dos cinco maiores grupos de compostos secundários [Whittaker et al ⁴⁹].

As interferências alelopáticas raramente são provocadas por uma única substância sendo mais comum que o efeito se deva a um conjunto delas. Em geral, a concentração de cada metabólito está abaixo do mínimo necessário para que atue isoladamente, cabendo o resultado final à ação aditiva e sinérgica entre elas e aos efeitos ambientais ⁵¹.

Muitas espécies vegetais têm sido citadas na literatura por possuírem ação alelopática ⁵²⁻⁶⁶ entre elas a pteridófito *Pteridium aquilinum*, uma samambaia que tem

a capacidade de dominar uma ampla variedade de vegetação formando populações quase puras, onde apenas poucas espécies coexistem ⁶⁷⁻⁶⁸ e interferir no comportamento alimentar de alguns insetos como *Pieris brassicae*, *Bombix mori* e outros devido ao grande número de aleloquímicos presentes nessas espécies ⁶⁹.

A análise química de alguns tipos de solo, associados a *P. aquilinum* e de frondes tem mostrado elevadas concentrações de ácidos p-hidróxibenzóico, vanílico, p-hidroxicinâmico e ferúlico ⁷⁰.

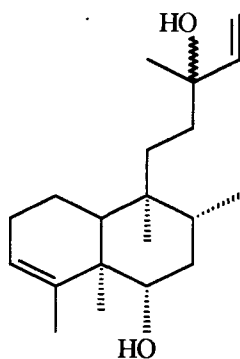
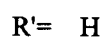
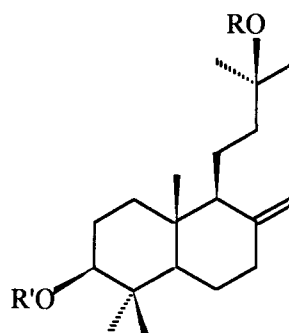
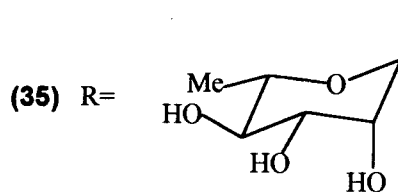
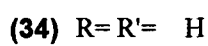
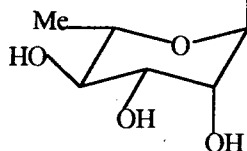
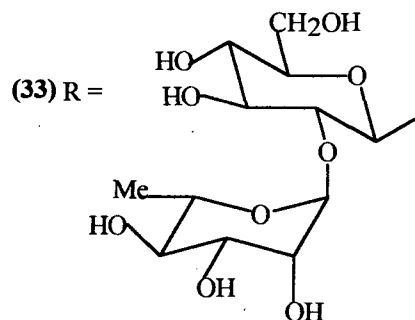
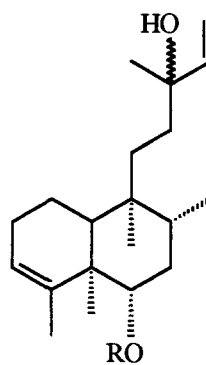
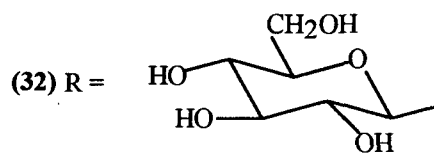
Para avaliar o potencial aleloquímico desses ácidos fenólicos, GLASS ⁷⁰ desenvolveu um experimento com várias espécies de vegetais crescendo hidropônicamente em soluções contendo os ácidos acima citados observando modificações no desenvolvimento das mesmas.

Gleichenia pectinata, uma Gleicheniaceae e também da classe das Pteridófitas, que cresce abundantemente no estado de Santa Catarina apresenta comportamento semelhante ao de *P. aquilinum* ³⁴.

Segundo QUEIROZ ³⁴, *G. pectinata* forma grupamentos clonais praticamente puros, fenômeno este que sugere um mecanismo de bloqueio alelopático da sucessão vegetal.

De uma revisão bibliográfica realizada no Chemical Abstract e Biological Abstract, constatou-se que poucos trabalhos de investigação química do gênero *Gleichenia* têm sido relatados.

Das frondes de *G. cunninghamii* foram isolados quercetina-3-O-glicosídeo, quercetina-3-O-rhamnoglicosídeo, quercetina-3-O-rhamnosídeo ⁷¹; das raízes e talos de *G. japonica* foram obtidos dois diterpenos glicosídicos do tipo clerodano: α -vinil-1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahidro- α -1,2,4a,5-pentametil-1-naftaleno-propanol-4-O- β -glucopiranosídeo (**32**) e α -vinil-1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahidro- α -1,2,4a,5-pentametil-1-naftaleno-propanol-4-O- α -rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -glucopiranosídeo (**33**)⁷²; diterpenos glicosídeos do tipo labdano, (3 S, 13 R)-labda-8 (17), 14-dieno-3,13-diol [(+)-3- β -hidroximanol] (**34**); 13-O- α -rhamnopiranosídeo de (+)-3- β -hidroximanol (**35**); 3-O- α -rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -glucopiranosídeo de (+)-3- β -hidroximanol e 3-O- β -fucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -glucopiranosídeo de 13-O- α -rhamnopiranosil-(+)-3- β -hidroximanol ⁷³; um diterpeno álcool (6S,13 S)-cleroda-3,14-dieno-6,13-diol (**36**) ⁷⁴; triterpenos álcoois e esteróis ⁷⁵; e hidrocarbonetos triterpenóides com o esqueleto hopano ⁷⁶.



(36)

Os compostos isolados a partir de *G. japonica* foram utilizados em ensaios de germinação e alongamento de radículas e hipocótilos de *Lactuca sativa* (alface), mostrando estimulação e/ou inibição⁷²⁻⁷⁴.

O extrato aquoso de *G. pectinata* apresentou atividade alelopática para *Clidemia hirta*, *Rapanea ferruginea*, e *Miconia ligustroides*⁷⁷. Tais resultados serviram de estímulo para procedermos a novos experimentos na investigação da atividade alelopática de *G. pectinata*.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Introdução

A investigação química da casca do caule de *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) levou ao isolamento de uma mistura de esteróides: β -sitosterol, campesterol e estigmasterol (CU5-HD), ácido acetil aleuritólico (CU14-HD), sitosterol-3-O- β -D-glucosídeo (CU30/32-MEC), catequina (CU5/9-AE), galocatequina (CU9/13-AE), sonderianin (CU25-HD), 12-*epi*-metil-barbascoato (CU26-DI) e 15,16-epóxi-3,13 (16)-clerodatrieno-2-ona (CU6-HDDI).

Da espécie *Gleichenia pectinata* Willd (Pr.) (Gleicheniaceae), frondes verdes da estação outono, foi isolado canferol (GP6/9-FVO) e quercetina (GP17/20-FVO) enquanto das frondes jovens da mesma estação foi isolado ácido siquímico (GP10/13-FJO).

Dos compostos isolados, CU5-HD, CU14-HD, CU30/32-MEC, CU5/9-AE, CU9/13-AE, CU25-HD, GP 10/13-FJO, GP6/9-FVO e GP17/20-FVO já foram descritos na literatura^{78,80,82,84,30,91,93}.

Os compostos GP10/13-FJO, GP6/9-FVO e GP17/20-FVO embora já descritos na literatura foram isolados pela primeira vez no gênero *G. pectinata*.

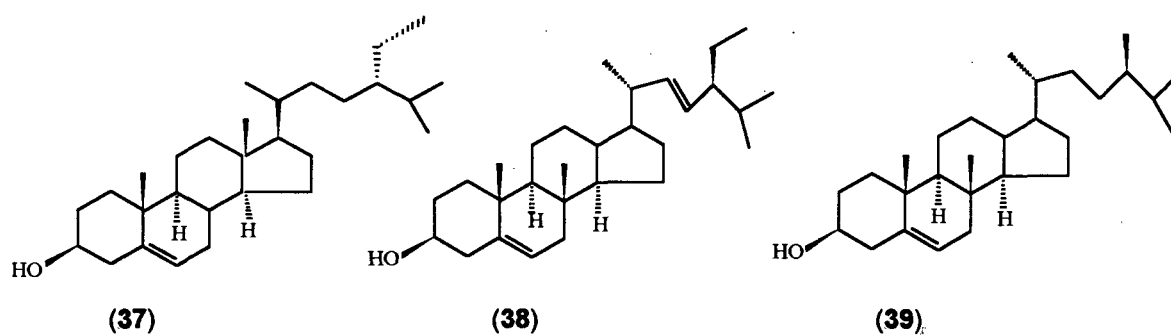
Os compostos CU26 -DI e CU6 -HDDI ainda não foram descritos na literatura.

O extrato, as frações semipurificadas e os compostos puros obtidos das duas espécies sob investigação foram usados para avaliar a atividade biológica através de ensaios antimicrobianos, farmacológicos e alelopáticos.

3.2. *Croton urucurana* Baillon

3.2.1. β -sitosterol, estigmasterol e campesterol (CU5-HD)

A cromatografia em coluna da fração intermediária Hex/DCM (Materiais e Métodos, p. 126) rendeu cristais incolores (450 mg), solúveis em éter de petróleo e clorofórmio, de ponto de fusão 136°, posteriormente identificado como uma mistura de fitoesteróis (CU5-HD): β -sitosterol (56.76 %) (37), estigmasterol (35.60%) (38) e campesterol (7.63 %) (39).



Para a identificação dos esteróides e determinação do percentual de cada componente na mistura, foram realizados experimentos de cromatografia gasosa de alta resolução (CG/AR). Para comparação, foi feita a coinjeção de amostras de padrões obtidos comercialmente e dados da literatura⁷⁸⁻⁷⁹.

A Figura 6 mostra o cromatograma da mistura de esteróides.

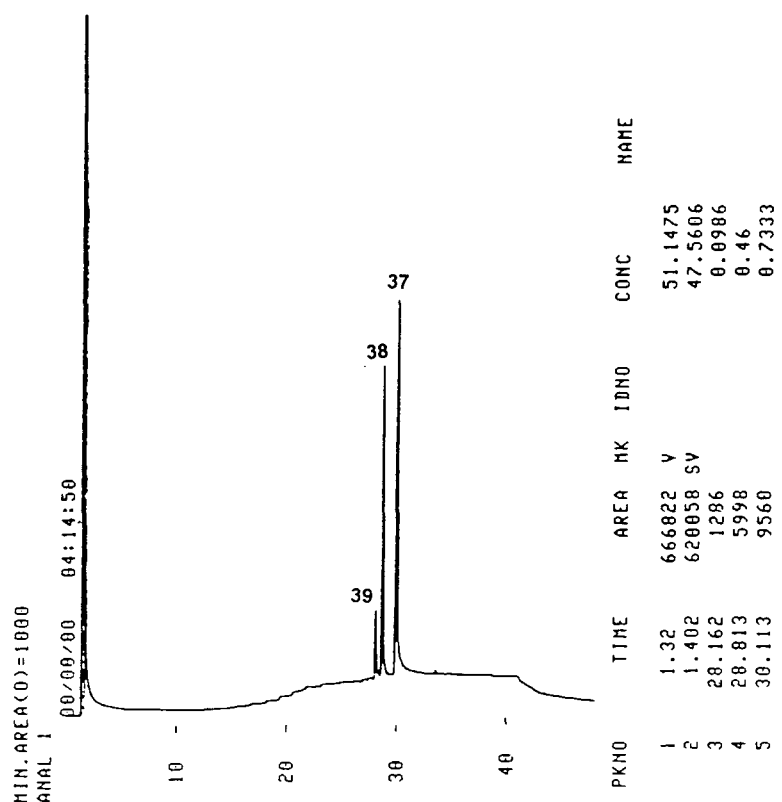
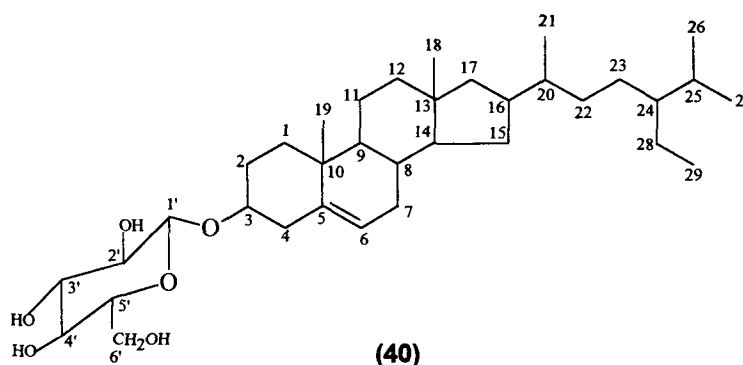


Figura 6 - Cromatograma da mistura de esteróides (β -sitosterol **(37)**, estigmasterol **(38)** e campesterol **(39)**.

3.2.2. Sitosterol-3-O-β-D-glicosídeo (CU30/32-MEC)

Parte da fração metanólica (Materiais e Métodos, p. 127) foi extraída com clorofórmio. Esta fração clorofórmica, após cromatografia em coluna rendeu cristais incolores, (CU30/32-MEC), solúveis em metanol e piridina, apresentando ponto de fusão 295-297° C. Foi identificado como o Sitosterol-3-O-β-D-Glicosídeo (40) por comparação de seus dados espectrais de IV, ¹H-RMN e ¹³C-RMN, com uma amostra autêntica e com dados da literatura⁸⁰⁻⁸¹.



No espectro de IV (fig. 7) se observa bandas intensas referentes a grupos OH (3500 cm^{-1}), a alcanos (2904 cm^{-1}) e olefinas (1400 e 1480 cm^{-1}).

O espectro de ¹H-RMN a 300 MHz (fig. 8, tab. 1), apresenta vários sinais característicos de um esqueleto esteroídico. Assim, os dubletes à δ 0,88, 0,89 e 1,01 ppm com $J=6$ Hz, correspondem às metilas em C-26, C-27 e C-21, respectivamente. O triplete à 0,86 ppm ($J=6$ Hz) é atribuído à metila em C-29, e os singletes à 0,67 e 0,93 ppm, referem-se às metilas em C-18 e C-19, identificando-se assim os seis grupos metílicos em CU30/32-MEC. Pode-se observar na região de 3,97 a 4,57 ppm, vários sinais que podem ser relativos à prótons do fragmento glicopiranosídeo. Os sinais à 5,03 e 5,30 ppm, referem-se respectivamente ao próton anomérico, H-1', e ao próton olefínico, H-6, do esqueleto esteroídico. A presença da ligação β-glicosídica foi reconhecida pelo valor da constante de acoplamento do próton anomérico (7,5 Hz), que permite uma geometria axial-equatorial, para os prótons H-1' e H-2'

O espectro de ¹³C-RMN/APT a 75 MHz (fig. 9) apresenta 35 sinais, sendo vinte e nove pertencentes ao esqueleto esteroídico e seis ao glicosídeo.

Tabela 1 - Dados de ^1H -RMN (300 MHz) e de ^{13}C -RMN (75 MHz) do Sitosterol-3-O- β -D-Glicosídeo em piridina deuterada, TMS como padrão interno de referência.

C	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	C	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1	37,3		19	18,8	0,93 (s)
2	30,1		20	36,2	
3	77,8		21	19,0	1,01 (d)
4	39,1		22	34,0	
5	140,7		23	31,9	
6	121,7	5,30 (m)	24	45,8	
7	26,1		25	29,2	
8	31,9		26	19,2	0,88 (d)
9	50,1		27	19,8	0,89 (d)
10	36,7		28	23,2	
11	21,0		29	11,9	0,86 (t)
12	39,7		1'	102,3	5,03(d;J=7,7Hz)
13	42,3		2'	78,4	
14	56,6		3'	78,3	
15	24,3		4'	77,8	
16	28,4		5'	75,1	
17	56,0		6'	62,6	
18	11,8	0,67 (s)			

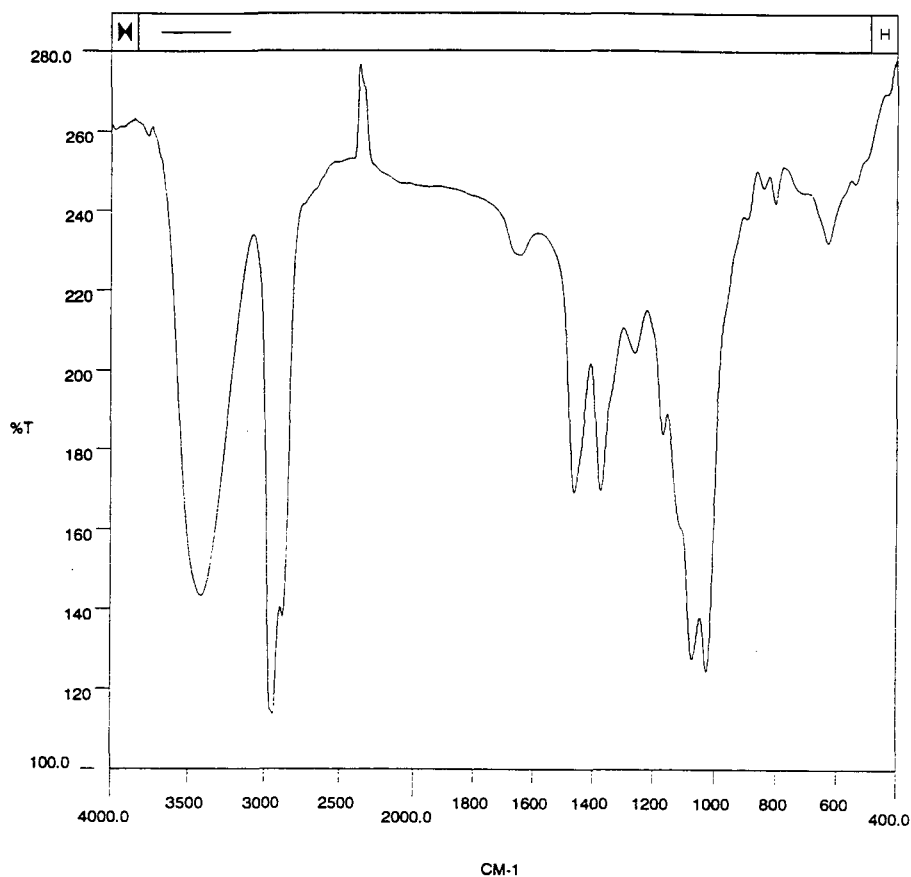


Figura 7 - Espectro no Infravermelho de sitosterol-3-O- β -D-glicosídeo em pastilha de KBr.

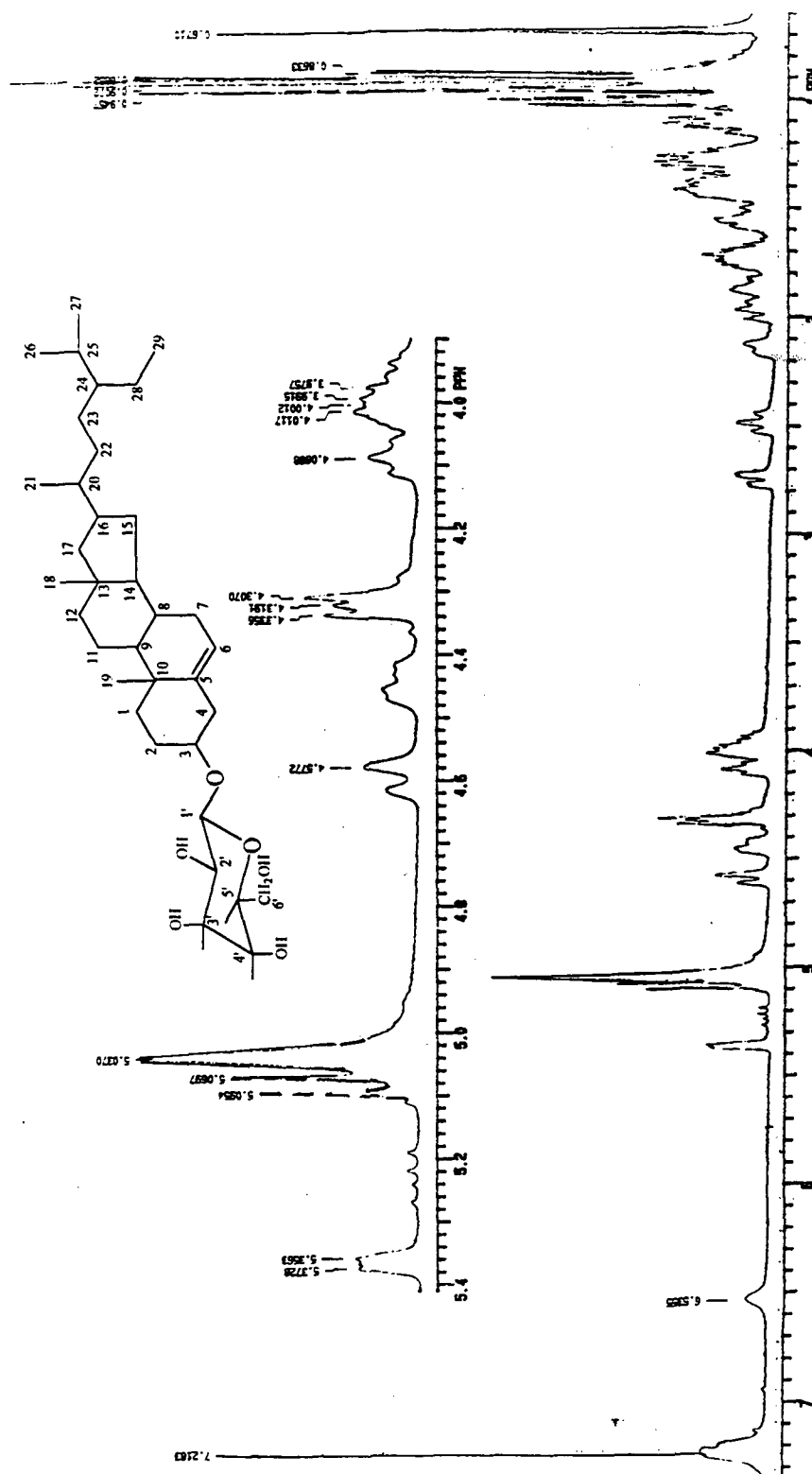


Figura 8 - Espectro de ¹H-RMN (300 MHz) de sitosterol -3-O-β-D-glicosídeo em C₅D₅N, TMS como padrão interno de referência.

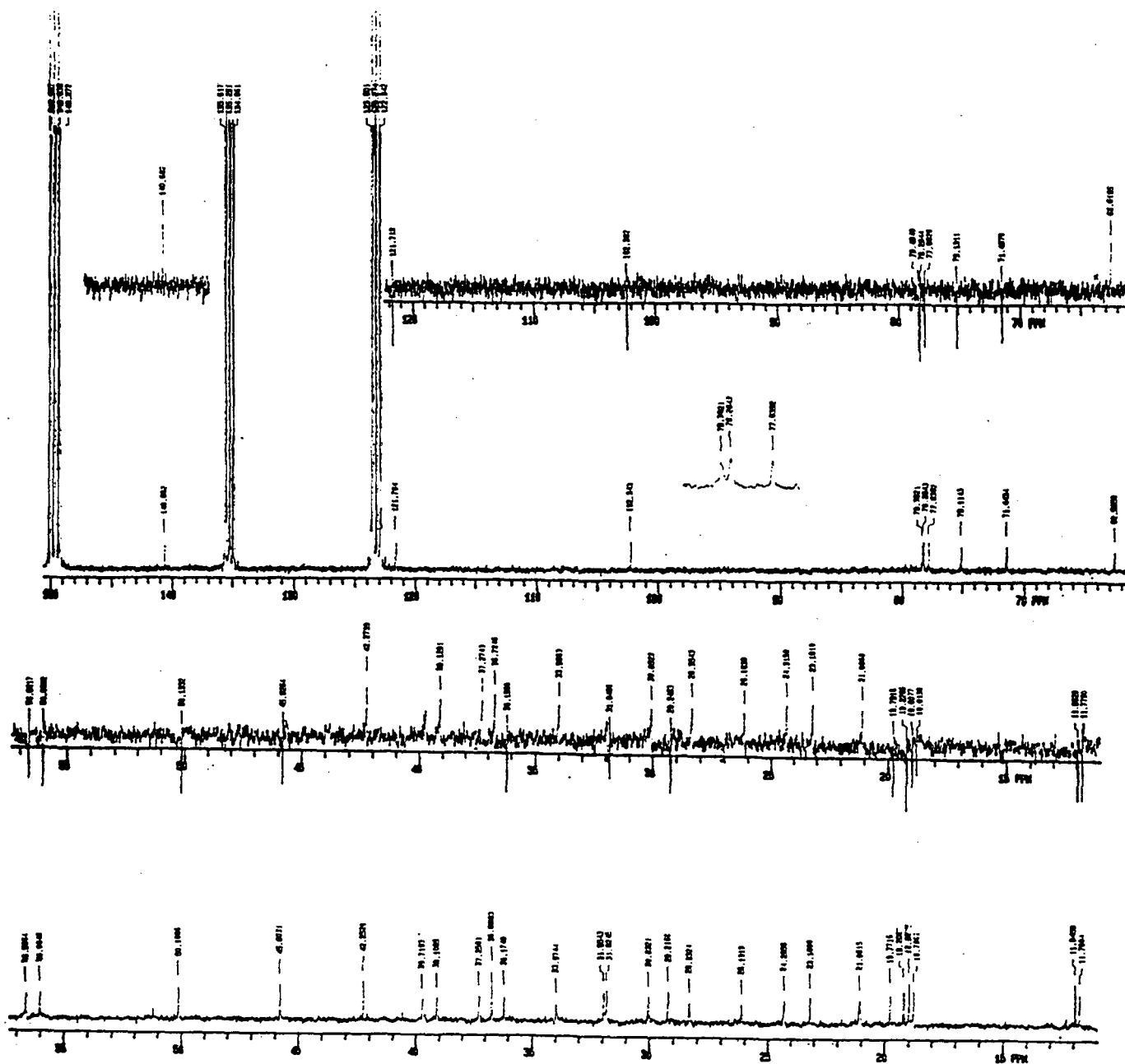
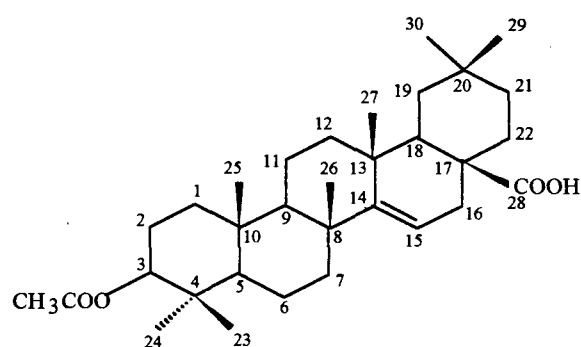


Figura 9 - Espectro de ^{13}C -RMN/APT (75 MHz) de sitosterol-3-O- β -D-glicosídeo em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS como padrão interno de referência.

3.2.3. Ácido Acetil Aleuritólico (Olean-14(15)-en-3 β -acetoxi-28-oico-ácido) (CU14-HD)

O Ácido Acetil Aleuritólico (CU14-HD), um triterpeno pentacíclico (**41**), foi isolado da fração intermediária Hex/DCM (Materiais e Métodos, p. 126). Apresentou-se como cristais incolores, solúveis em acetato de etila e clorofórmio com ponto de fusão 262-264°C. Foi identificado por comparação de seus dados espectrais de IV, $^1\text{H-RMN}$ e $^{13}\text{C-RMN}$, com uma amostra autêntica e com dados da literatura⁸²⁻⁸³.



(41)

A Tabela 2 mostra a atribuição dos sinais de $^1\text{H-RMN}$ e $^{13}\text{C-RMN}$ de ácido acetil aleuritólico.

Tabela 2 - Dados de $^1\text{H-RMN}$ (200 MHz) e $^{13}\text{C-RMN}$ (75MHz) do ácido acetil aleuritólico em clorofórmio deuterado, TMS como padrão interno de referência.

C	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	C	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1	37,45		17	51,19	
2	23,53		18	41,71	2,30
3	81,46	4,50 (dd)	19	35,56	
4	37,77		20	29,74	
5	55,72		21	33,47	
6	18,74		22	31,08	
7	41,01		23	25,98	
8	39,05		24	16,61	
9	49,18		25	15,59	
10	38,00		26	28,01	
11	17,45		27	22,39	
12	33,84		28	181,79	
13	37,49		29	32,10	
14	160,49		30	28,80	
15	118,83	5,50 (m)	OCOCH ₃	171,77	
16	31,75				

O espectro no IV (fig. 10) além das bandas relativas a vibrações de ligações C-C e C-H, apresenta estiramento de grupos OH (3400 cm^{-1}) e bandas em 1760 e 1730 cm^{-1} , referentes à carbonilas.

O espectro de $^1\text{H-RMN}$, (CDCl_3 , 200 MHz) (fig. 11) sugere a presença de sete grupos metílicos (integração, 21 prótons) na região de 0,84-0,95 ppm, com sinais bastante sobrepostos. O duplo dublete em 4,50 ppm caracteriza substituição do grupo acetil (s, 2,0 ppm) em C-3 enquanto o sinal à 5,5 ppm é referente ao próton olefínico H-15. A atribuição dos sinais foi realizada utilizando-se espectros de $^1\text{H-RMN}$ uni (fig. 11) e bidimensional (COSY-45°) (fig. 13) através das correlações observadas. Assim, através do H-3, atribuiu-se os prótons metilênicos em C-2 a 1,58 ppm. Em consequência, o sinal dos prótons metilênicos diastereotópicos em C-1 foram também atribuídos (1,28 e 2,05 ppm). Através do sinal a 5,5 ppm, foi possível atribuir os sinais dos prótons H-16 (2,38 ppm) e H-16' (1,92 ppm).

O espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75 MHz) (fig. 12) indicou trinta e dois carbonos, sendo dez quaternários, quatro terciários, dez secundários e oito primários.

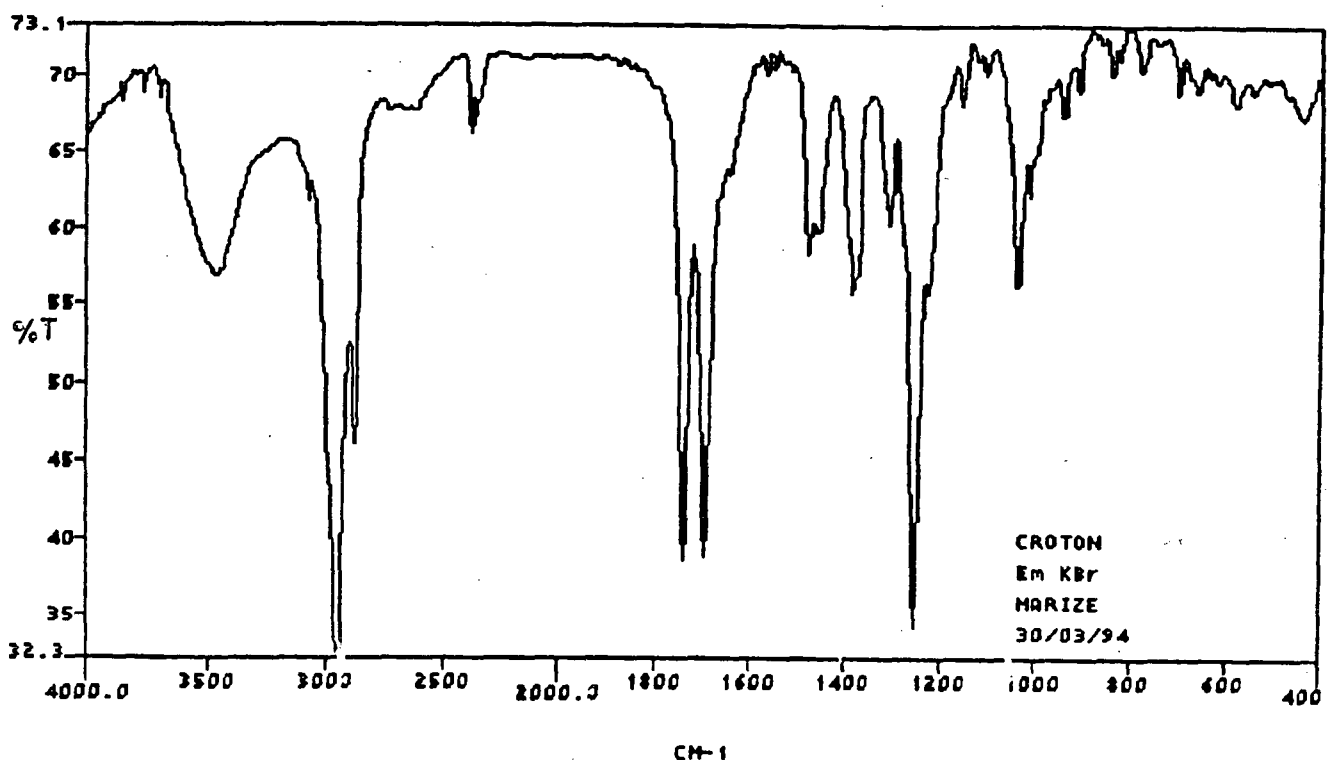


Figura 10 - Espectro no Infravermelho de ácido acetil aleuritólico em pastilha de KBr.

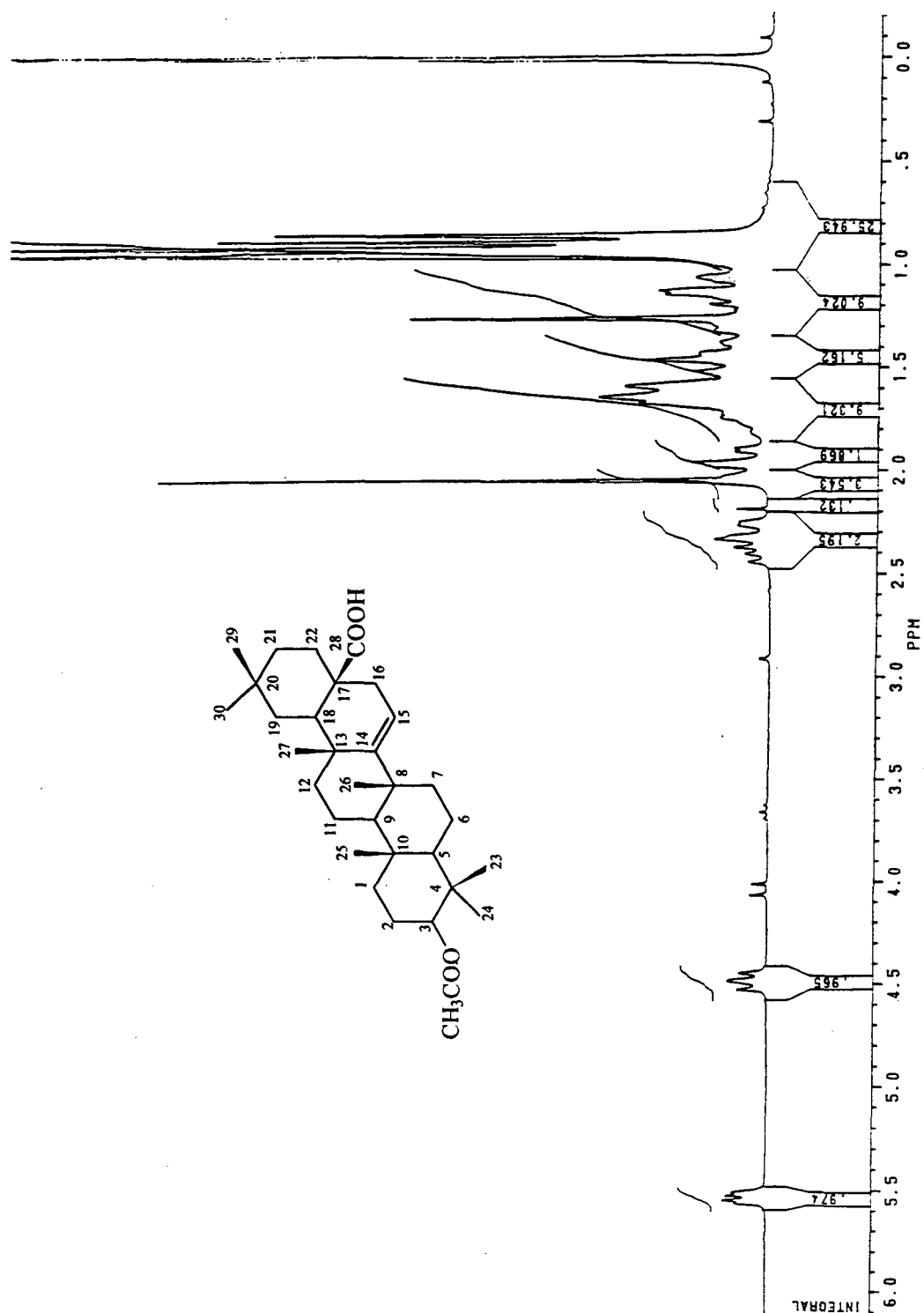


Figura 11- Espectro de ¹H-RMN (200 MHz) de ácido acetil aieurítico em CDCl₃, TMS como padrão interno de referência.

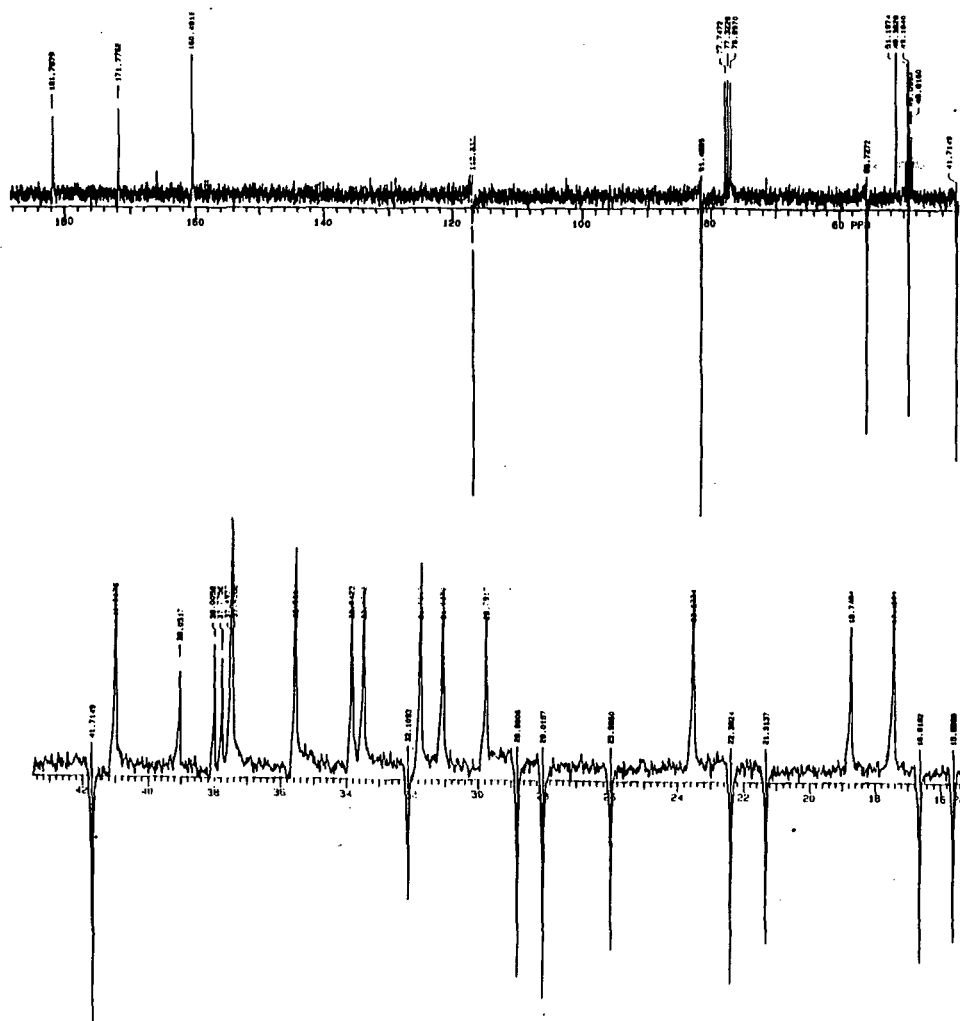


Figura 12 - Espectro de ^{13}C -RMN/APT (75 MHz) de ácido acetil aieuritólico em CDCl_3 , TMS como padrão interno de referência.

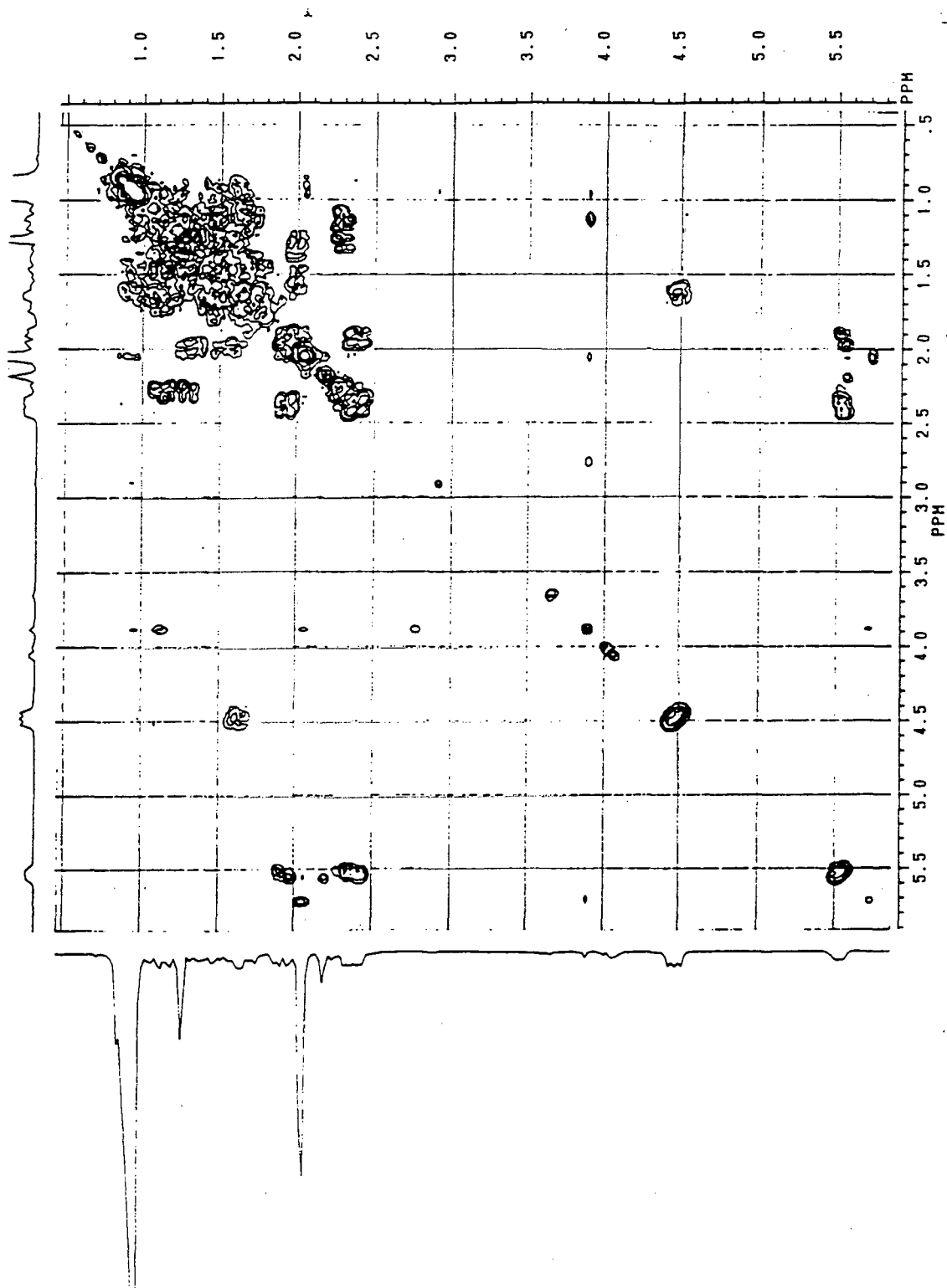


Figura 13 - Espectro de ¹H-RMN/COSY (200 MHz) de ácido acetil aleuritólico em CDCl₃, TMS como padrão interno de referência.

3.2.4. Catequina (3', 4', 5, 7-tetrahidroxi-flavan-3-ol) (CU5/9-AE)

A catequina (CU5/9-AE), um composto fenólico da classe flavan-3-ol, estrutura (1), p.7, foi isolada da fração acetato de etila (Materiais e Métodos, p. 127) e apresentou-se sob a forma de um sólido amorfo de coloração castanho-avermelhada com ponto de fusão 142-143°C, solúvel em acetona. Foi identificada por comparação de seus dados espectrais de IV, ¹H-RMN e ¹³C-RMN com uma amostra autêntica e com dados da literatura.^{80, 84-86}

A Figura 14 mostra o espectro no IV com uma larga banda de absorção em 3400 cm⁻¹ relativa a grupo hidroxila; em torno de 1650 cm⁻¹ outra banda, referente à carbonila; estiramento C-O em torno de 1260 cm⁻¹ e ainda em 1630 cm⁻¹ bandas que indicam a presença de insaturações.

O espectro de ¹H-RMN (fig. 15), em acetona-d₆, forneceu dados que possibilitaram atribuir a estrutura **1**, para CU5/9-AE. O anel C é caracterizado pelos sinais em 4,14 ppm (1H; d; J=4,5 Hz), para H-3 e 4,45 ppm (1 H; d, J=7,6 Hz), para H-2. A estereoquímica em C-2 e C-3 é indicada através da constante de acoplamento, J_{2,3}=7.6 Hz, que indica um ângulo diedro (φ) em torno de 180°, para esses prótons, permitindo uma configuração trans para os prótons metínicos H-2 e H-3. Isso indica a presença de uma catequina, já que a epicatequina (cis, para H-2 e H-3) apresenta J_{2,3}= 2 Hz. Os duplos dubletes à 2,80 ppm (1 H; J_{a,e}= 5,4 e J_{gem}= 16,1 Hz) e 2,45 ppm (1 H; J_{a,a}=8,3 Hz e J_{gem}=16,1 Hz) referem-se aos prótons diastereotópicos H_{4b} e H_{4a}, respectivamente. O anel A, com uma substituição OH-5,7 é caracterizado pelos dois dubletes em 5,72 e 5,80 ppm (J_{6,8}=2,2 Hz), referentes aos prótons H-6 e H-8. Entretanto, os sinais observados na região entre 6,54 e 6,71 ppm, apresentam multiplicidades indicativas de uma substituição OH-3',4', conforme esperado para o anel B. Os prótons H-6' e H-5', aparecem à 6,56 (1 H; dd; J_{6',5'}=8,2 Hz e J_{6',2'}=1,5 Hz) e a 6,61 ppm (1 H; d, J_{5',6'} =8,2 Hz). O dublete em 6,72 ppm, corresponde ao próton H-2', com J_{2',6'}=1,5 Hz, característico de acoplamento de prótons meta.

O espectro de ¹³C-RMN à 50,0 MHz, em acetona-d₆ (fig. 16), de CU5/9-AE, permitiu confirmar a estrutura **1** proposta, através da identificação dos três sistemas de anéis da molécula. Na região espectral relativa a carbonos sp³, caracterizou-se o anel C, através dos sinais à 26,36 ppm, referente ao carbono metilênico C-4, à 66,21 e 80,24 ppm, relativos aos carbonos metínicos C-3 e C-2, respectivamente. O

anel A, que apresenta substituição 5,7-dihidróxi, foi identificado através das ressonâncias em 154,58, para C-5 e 154,97 ppm, para C-7, com desblindagem típica para carbonos sp^2 contendo substituintes com efeito mesomérico (+M). Em consequência, C-6 e C-8, corresponderam aos sinais em 93,34 e 94,07 ppm, demonstrando aumento de densidades eletrônicas para os carbonos em posições orto aos grupos fenólicos. Essa característica também foi observada para o anel B, que apresenta substituição 3',4'-dihidróxi.

O flavan-3-ol catequina (**1**) é um composto que tem sido isolado de várias espécies vegetais ⁸⁰, sendo um dos principais monômeros na formação dos polímeros fenólicos denominados de leucoantocianidinas.

A Tabela 3 mostra a atribuição dos sinais de ¹H-RMN e ¹³C-RMN da catequina.

Tabela 3 - Dados de ¹H-RMN (200 MHz) e de ¹³C-RMN (50 MHz) da catequina em acetona deuterada, TMS como padrão interno de referência

C	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)
2	80,24	4,45 (d; J=7,6 Hz)
3	66,21	4,14 (d; J=4,5 Hz)
4	26,36	2,45 (dd; J=16,1; 8,3 Hz)
4	-	2,80 (dd; J=16,1; 5,4 Hz)
5	154,58*	
6	93,34	5,80 (d; J=2,2 Hz)
7	154,97*	
8	94,07	5,72 (d; J=2,2 Hz)
9	155,35*	
10	98,43	
1'	129,79	
2'	113,03	6,72 (d; J=1,5)
3'	143,39	
4'	143,13	
5'	113,67	6,61 (d; J=8,0 Hz)
6'	117,95	6,56 (dd; J=1,5 e 8,0 Hz)

* Os valores da mesma coluna podem ser intercambiáveis.

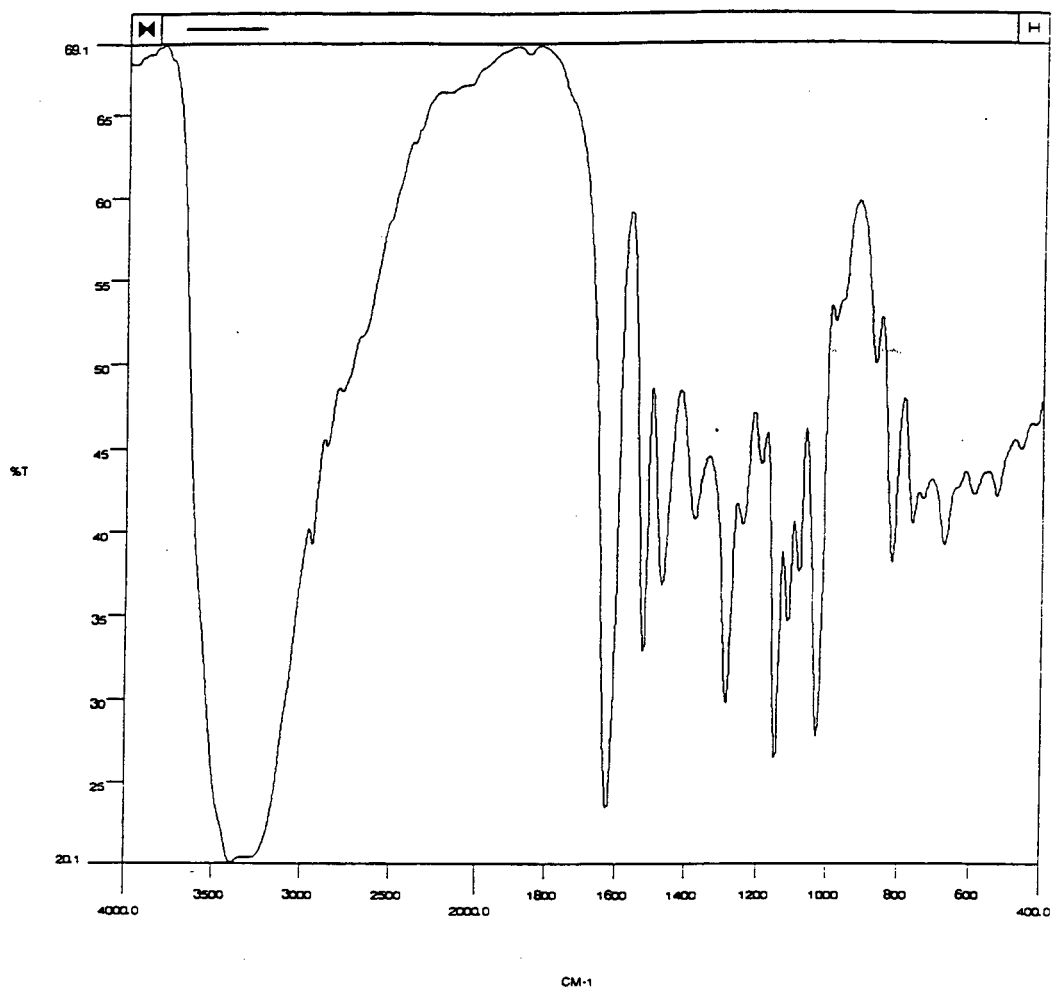


Figura 14 - Espectro no Infravermelho de catequina em pastilha de KBr.

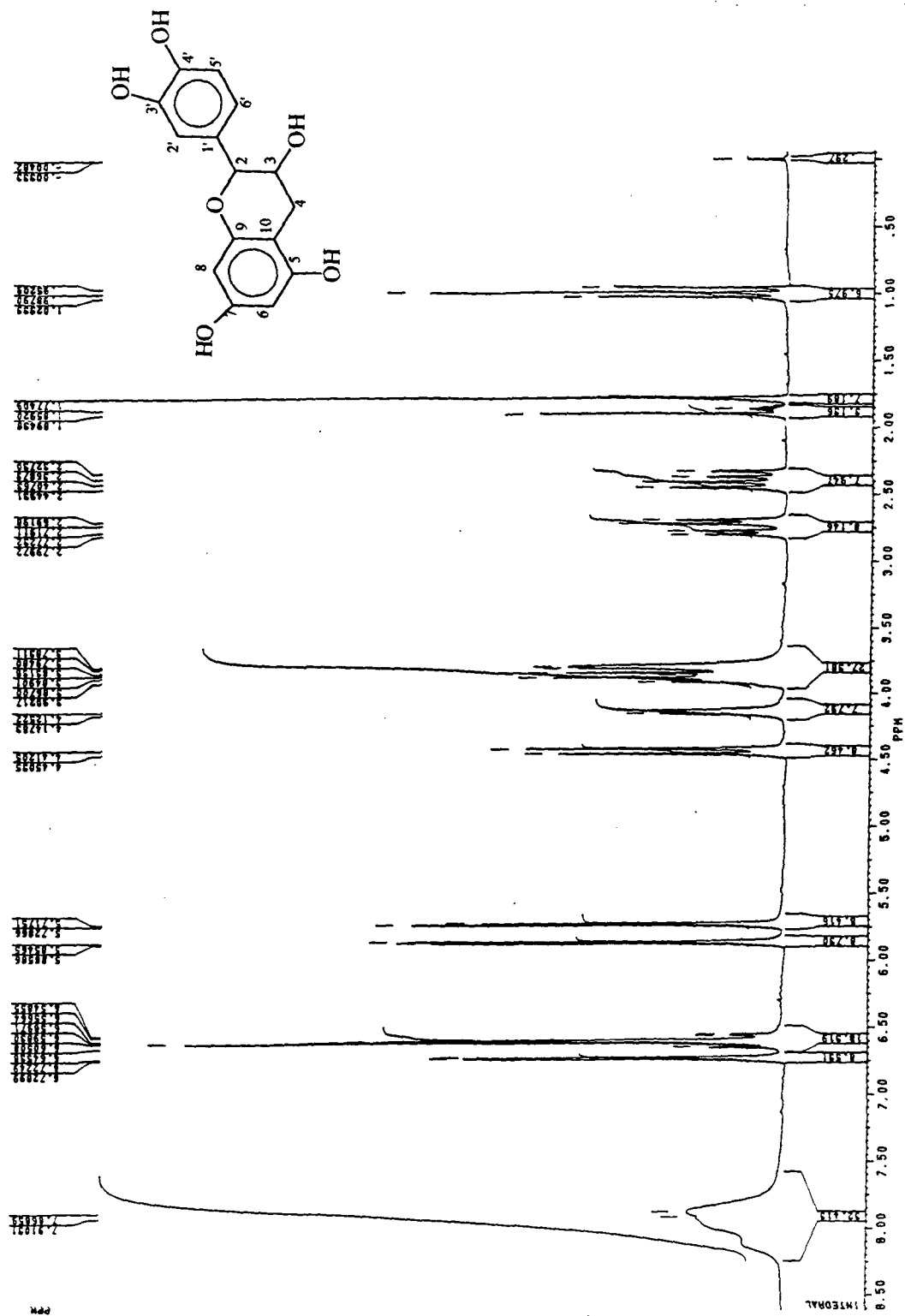


Figura 15 - Espectro de ^1H -RMN (200 MHz) de catequina em acetona- d_6 , T_M interno de referência.

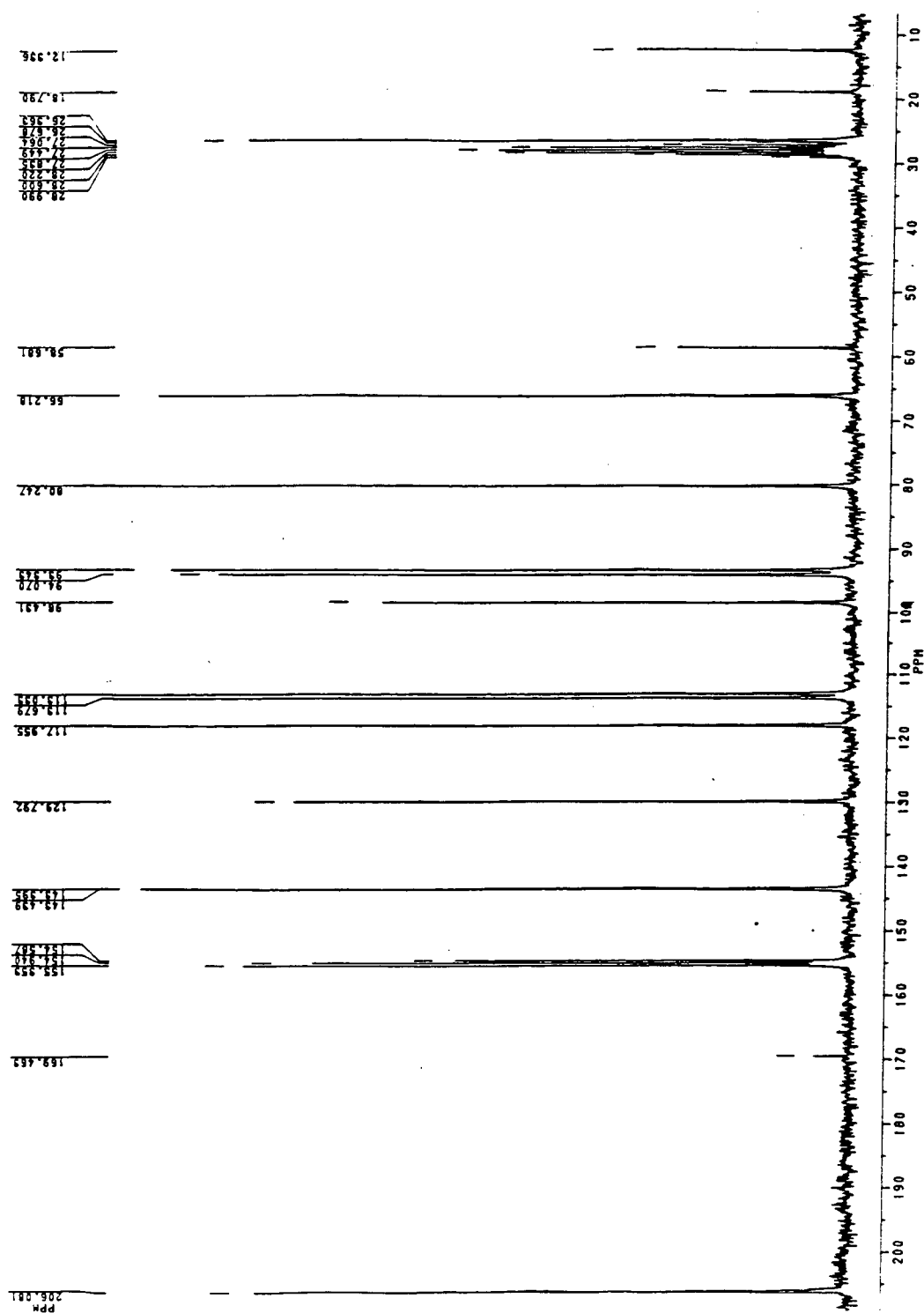


Figura 16 - Espectro de ^{13}C -RMN (50 MHz) de catequina em acetona- d_6 , TMS como padrão interno de referência.

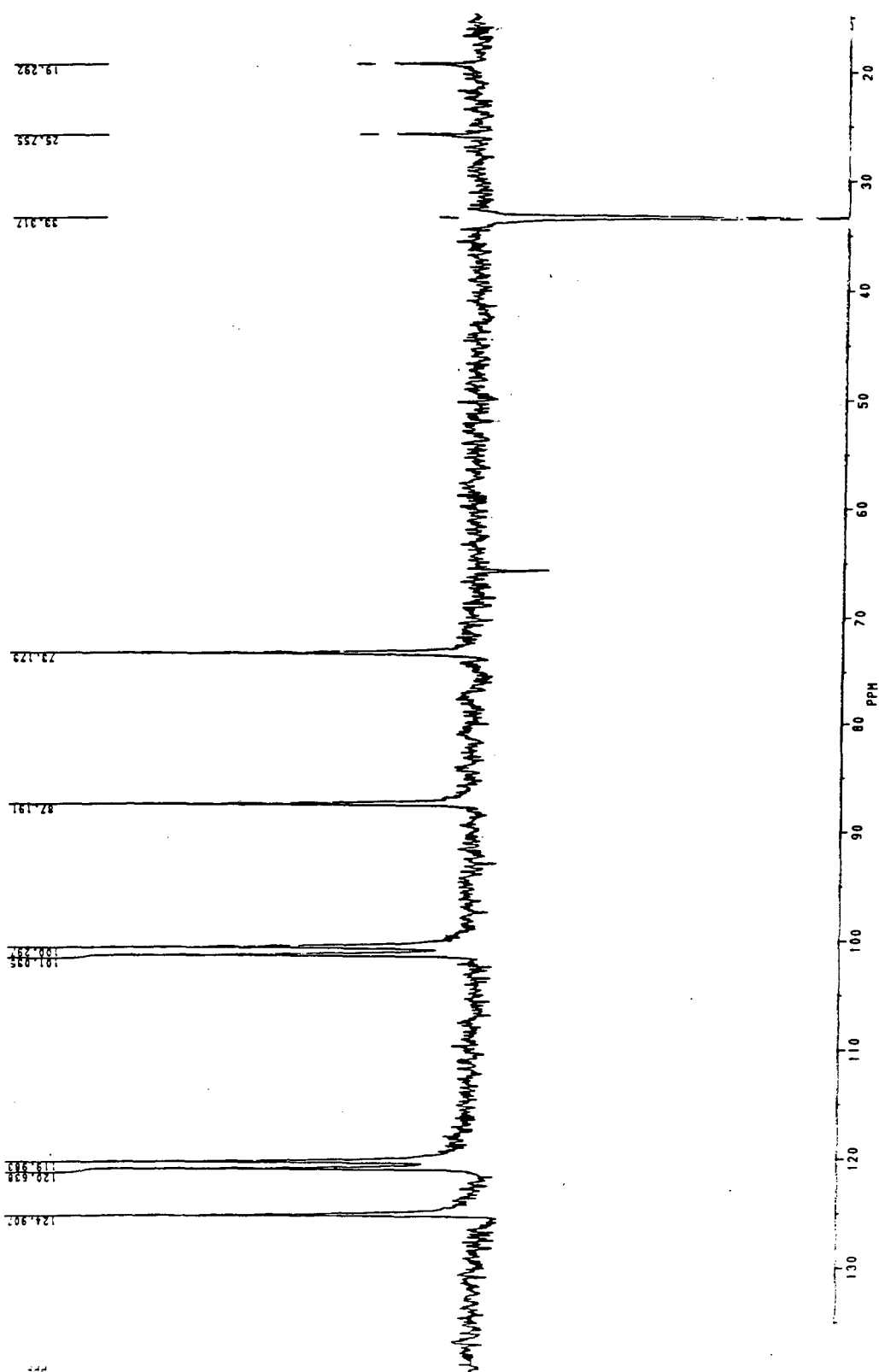


Figura 17 - Espectro de ^{13}C -RMN/DEPT (50 MHz) de catequina em acetona- d_6 , TMS como padrão interno de referência.

3.2.5. Galocatequina (3',4',5',5,7-pentahidroxi-flavan-3-ol) (CU9/13-AE)

A galocatequina (CU9/13-AE), outro composto fenólico, estrutura (3), p. 7, também obtida da fração acetato de etila (Materiais e Métodos, p. 127) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração castanho clara, solúvel em acetona e decompôs-se em 157°C. Foi identificada por comparação de seus dados espectrais de IV, de $^1\text{H-RMN}$ e $^{13}\text{C-RMN}$ com uma amostra autêntica e com dados da literatura.⁸⁴⁻⁸⁶

A Figura 18 mostra o espectro no IV com bandas semelhantes às aquelas observadas para a catequina sugerindo uma estrutura flavonoídica.

O espectro de $^1\text{H-RMN}$ (200 MHz) (fig. 19; tab. 4), apresenta-se semelhante ao obtido para a catequina (fig. 15). A diferença observada refere-se à multiplicidade dos sinais relativos ao anel B (3', 4', 5'-OH), ou seja, apresenta um único sinal à 6,46 ppm (2 prótons) correspondente aos prótons H-2'e H-6' (não se observa desdobramento esperado para esses sinais, ou seja, indicativo de acoplamento meta). Essa substituição é ainda confirmada pelo espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ (fig. 20, tab. 4) onde pode-se observar sinais referentes a 5 grupos hidroxilas ligados a anéis aromáticos. A constante de acoplamento $J_{2,3}=7,6$ Hz indica uma geometria *trans* para o anel C do composto CU9/13-AE.

Tabela 4 - Dados de $^1\text{H-RMN}$ (200 MHz) e $^{13}\text{C-RMN}$ (50 MHz) da galocatequina em acetona deuterada, TMS como padrão interno de referência.

C	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)
2	82,87	4,50 (d; J=7,4 Hz)
3	68,55	
4	28,62	2,49 (dd; J=16,1; 8,2 Hz)
4		2,93 (dd; J=16,1; 5,4 Hz)
5	157,85*	
6	96,38	5,89 (d; J=2,3 Hz)
7	157,41*	
8	95,64	6,03 (d; J=2,3 Hz)
9	156,98*	
10	100,74	
1'	133,54	
2'	107,46	6,46
3'	146,47	
4'	131,60	
5'	146,47	
6'	107,46	6,46

* Os valores da mesma coluna podem ser intercambiáveis.

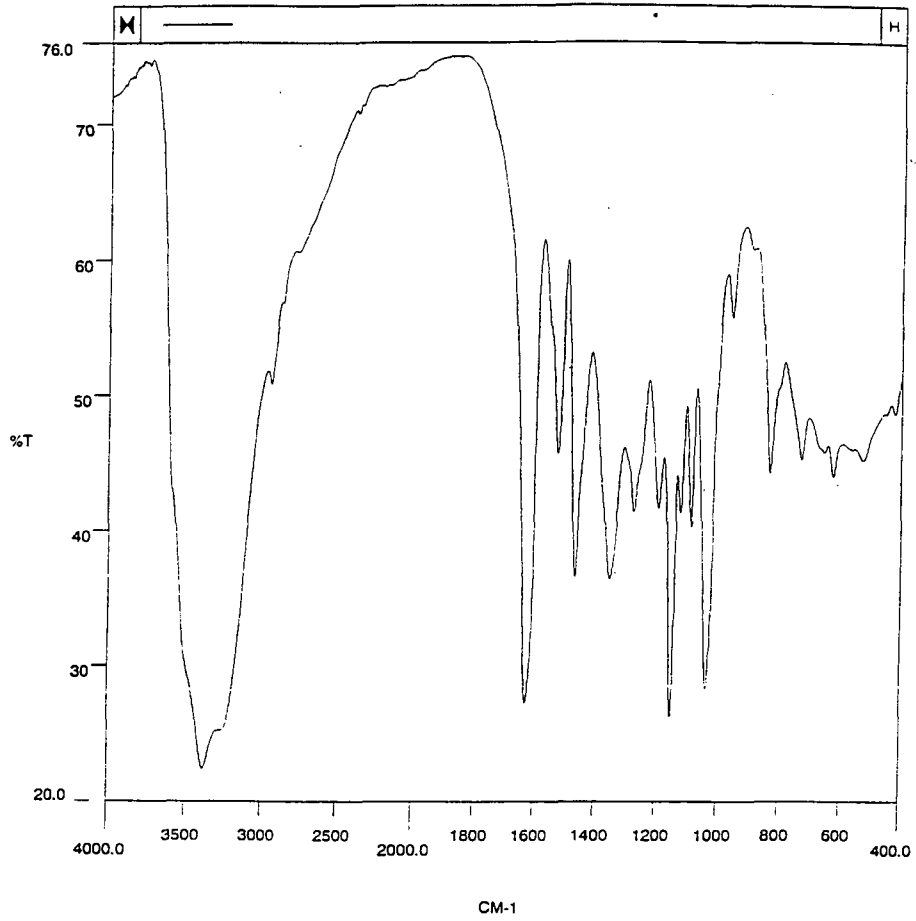


Figura 18 - Espectro no Infravermelho de galocatequina em pastilha de KBr.

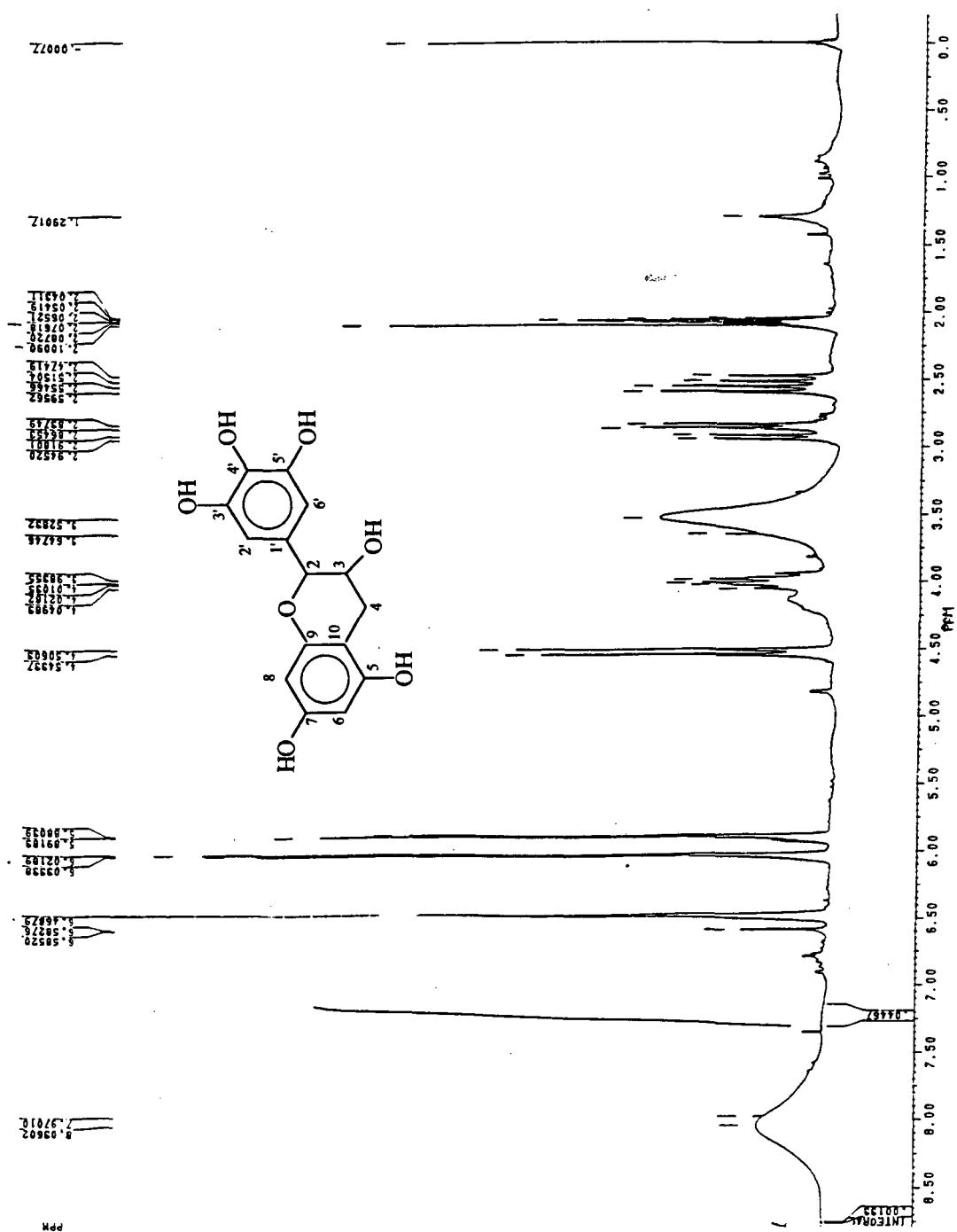


Figura 19 - Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (200 MHz) de galocatequina em acetona- d_6 , TMS padrão interno de referência.

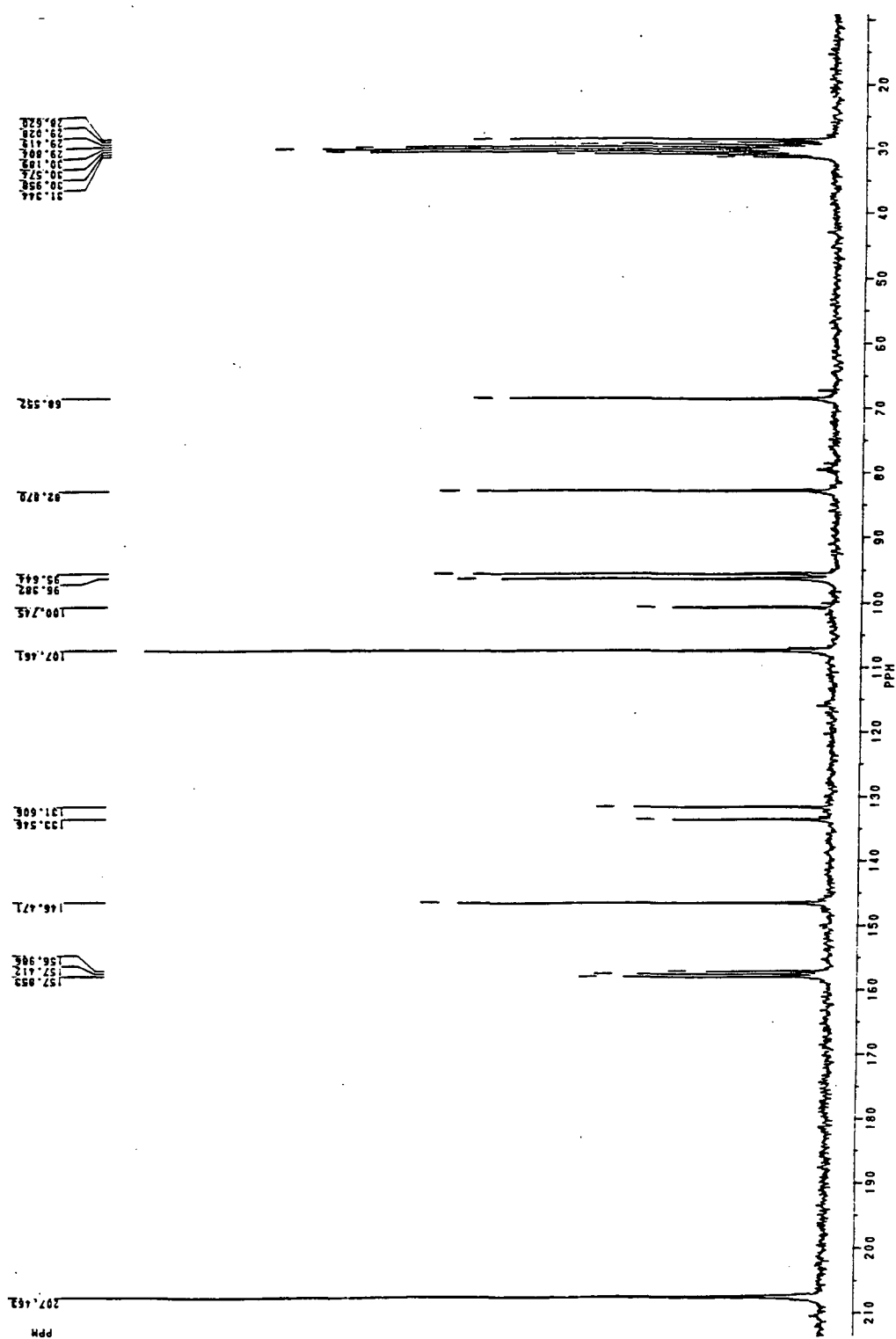


Figura 20 - Espectro de ^{13}C -RMN (50 MHz) de galocatequina em acetona- d_6 , TMS como padrão interno de referência.

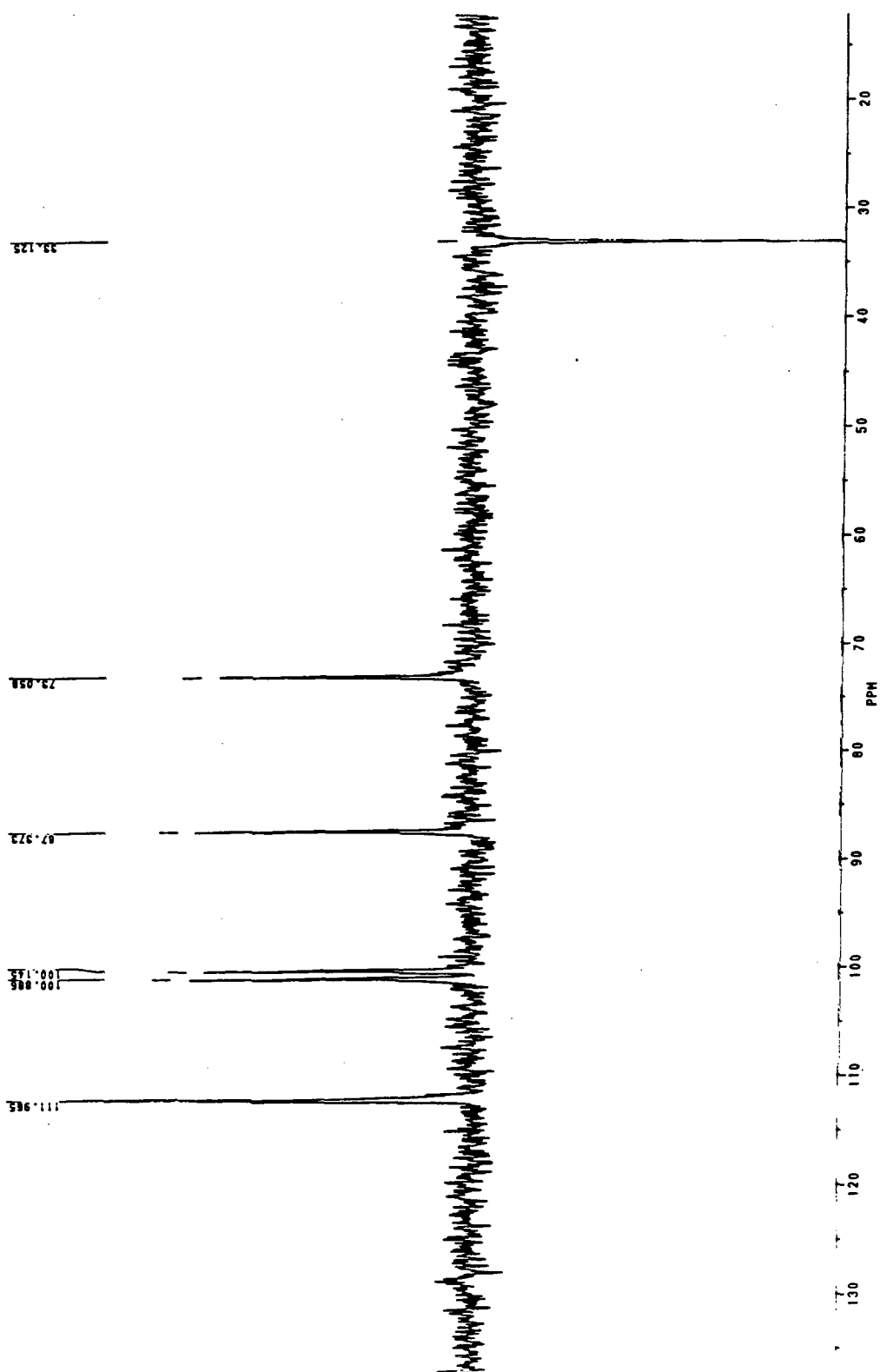


Figura 21- Espectro de ^{13}C -RMN/DEPT (50 MHz) de galocatequina em acetona- d_6 , TMS como padrão interno de referência.

3.2.6. Sonderianin (CU25-HD)

O composto sonderianin (CU25-HD), um diterpeno furano-lactona de esqueleto clerodano, estrutura **28**, p. 12, isolado da fração intermediária Hex/DCM (Materiais e Métodos, p. 126) apresentou-se como cristais incolores, solúveis em clorofórmio e acetato de etila, cujo ponto de fusão foi de 134-136°C. Foi identificado por comparação de seus dados espectrais de IV, ¹H-RMN, ¹³C-RMN, Massas e com dados da literatura ³⁰.

A Figura 22 mostra o espectro no IV com uma banda na região de 3000-2980 cm⁻¹ referente ao estiramento de C-H de alcanos, 1750 e 1690 cm⁻¹ referentes à carbonilas, 1640 cm⁻¹ atribuída à deformação de olefina e 1500 e 850 cm⁻¹ referentes ao anel furano.

O espectro de Massas (fig. 27) indicou um íon molecular m/z 358, em concordância com a fórmula estrutural C₂₁H₂₆O₅.

O espectro de ¹H-RMN (fig. 23, tab. 5) a 300 MHz, em CDCl₃, apresentou dois grupos metílicos à 1,02 ppm para C-17 (d; J=6,5 Hz) e à 1,46 ppm para C-18 (s). O singlete em 3,70 ppm corresponde ao grupo metoxila ligado em C-19. Na região de prótons aromáticos observa-se três sinais característicos ao anel furano à 6,40 ppm (dd; J=1,7 e 0,8 Hz; H-14), 7,44 ppm (t; J=1,7 Hz; H-15) e 7,46 ppm (sl; H-16). O próton olefínico H-3 é observado a 6,54 ppm (t; J=3,8 Hz).

O espectro de ¹³C-RMN/APT (fig. 24, tab.5) a 75 MHz, em CDCl₃ foi analisado com o auxílio de experimentos uni (fig. 24) e bidimensionais (figs. 25 e 26). Dessa forma, através do espectro de ¹³C-RMN/APT (fig. 24) foi possível identificar dez carbonos metílicos e metínicos e onze carbonos metilênicos e quaternários. A atribuição desses sinais foi realizada utilizando-se experimentos de correlação heteronuclear (HETCOR) onde, através de correlações J_{C-H}, identificou-se os sinais dos carbonos a partir dos deslocamentos químicos dos respectivos prótons em ¹H-RMN.

Os dados espectroscópicos obtidos para **28**, estavam de acordo com os reportados na literatura ³⁰ menos os deslocamentos químicos para as duas carbonilas (δ 176,7 (C-20), 167,5 (C-19) (literatura ³⁰ 173 e 165,4, respectivamente).

O problema foi resolvido com uma amostra autêntica (isolada de *Croton sonderianus*) gentilmente cedida pelo Professor Afrânio Craveiro, através de co-CCD e ponto de fusão da mistura.

Tabela 5 - Dados de ^1H -RMN (300 MHz) e ^{13}C -RMN (75 MHz) de Sonderianin em clorofórmio deuterado, TMS como padrão interno de referência.

C	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1	19,7	1,85 (m)
2	26,7	2,04 (dt)
3	135,5	6,54 (t)
4	142,4	-
5	37,6	-
6	35,1	2,44 (m)
7	26,5	2,35 (m)
8	40,4	1,50 (m)
9	51,7	-
10	52,4	1,60 (dd)
11	44,8	2,40 (d)
12	71,6	5,40 (t)
13	125,7	-
14	108,1	6,40 (dd)
15	144,0	7,44 (t)
16	139,4	7,46 (s)
17	16,8	1,02 (d)
18	19,8	1,46 (s)
19	167,5	-
20	176,7	-
OMe	51,3	3,70 (s)

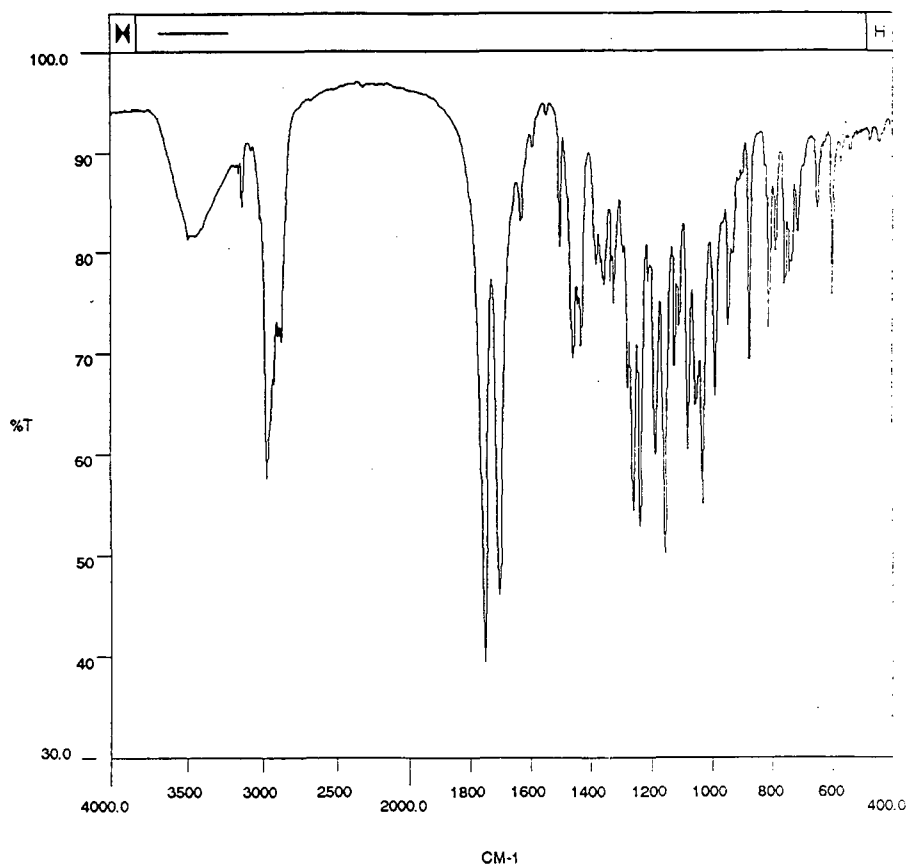


Figura 22 - Espectro no Infravermelho de sonderianin em pastilha de KBr.

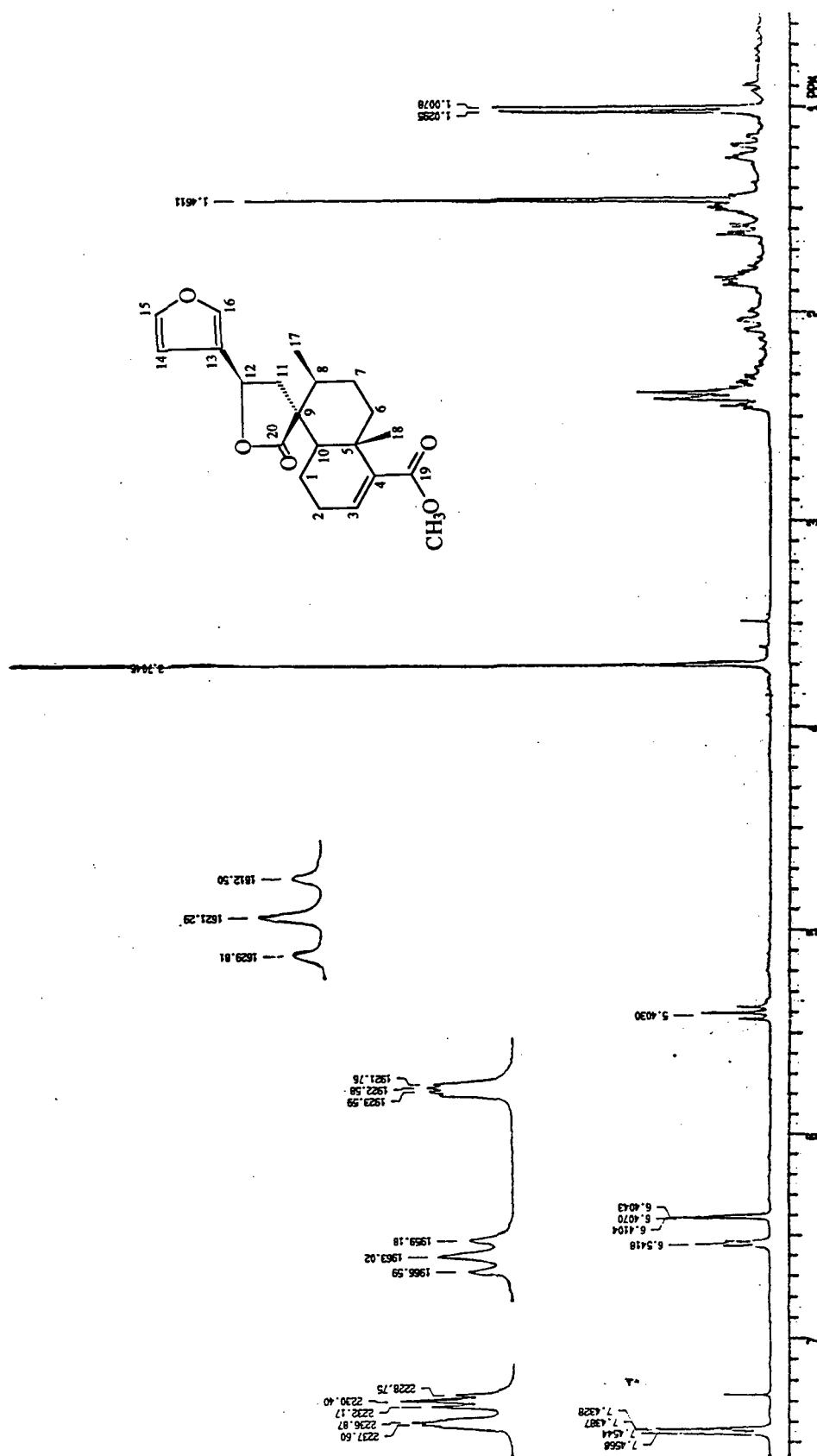


Figura 23 - Espectro de ¹H-RMN (300 MHz) de sonderianin em CDCl₃, TMS como padrão interno de referência.

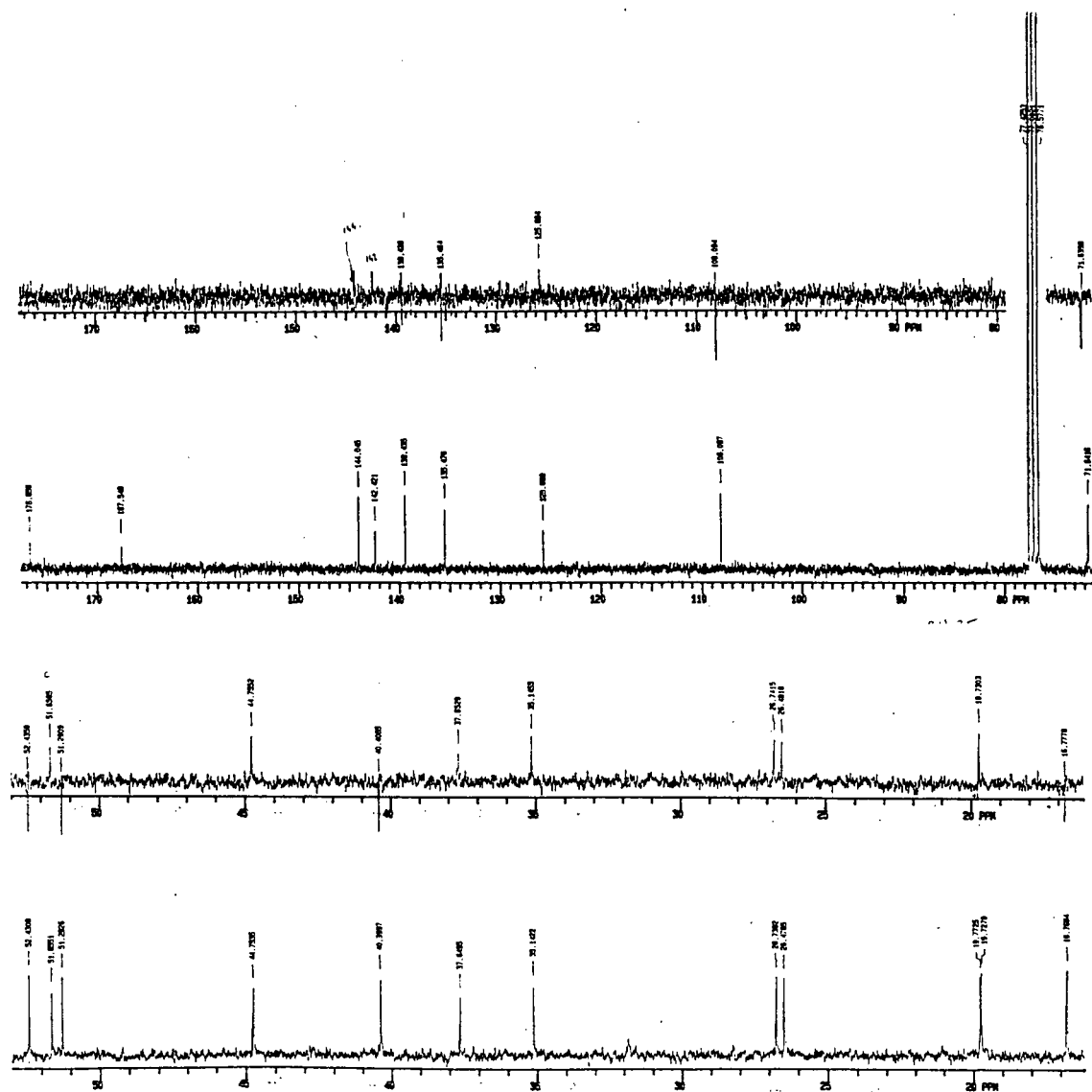


Figura 24 - Espectros de ^{13}C -RMN/APT (75 MHz) de sonderianin em CDCl_3 , TMS como padrão interno de referência.

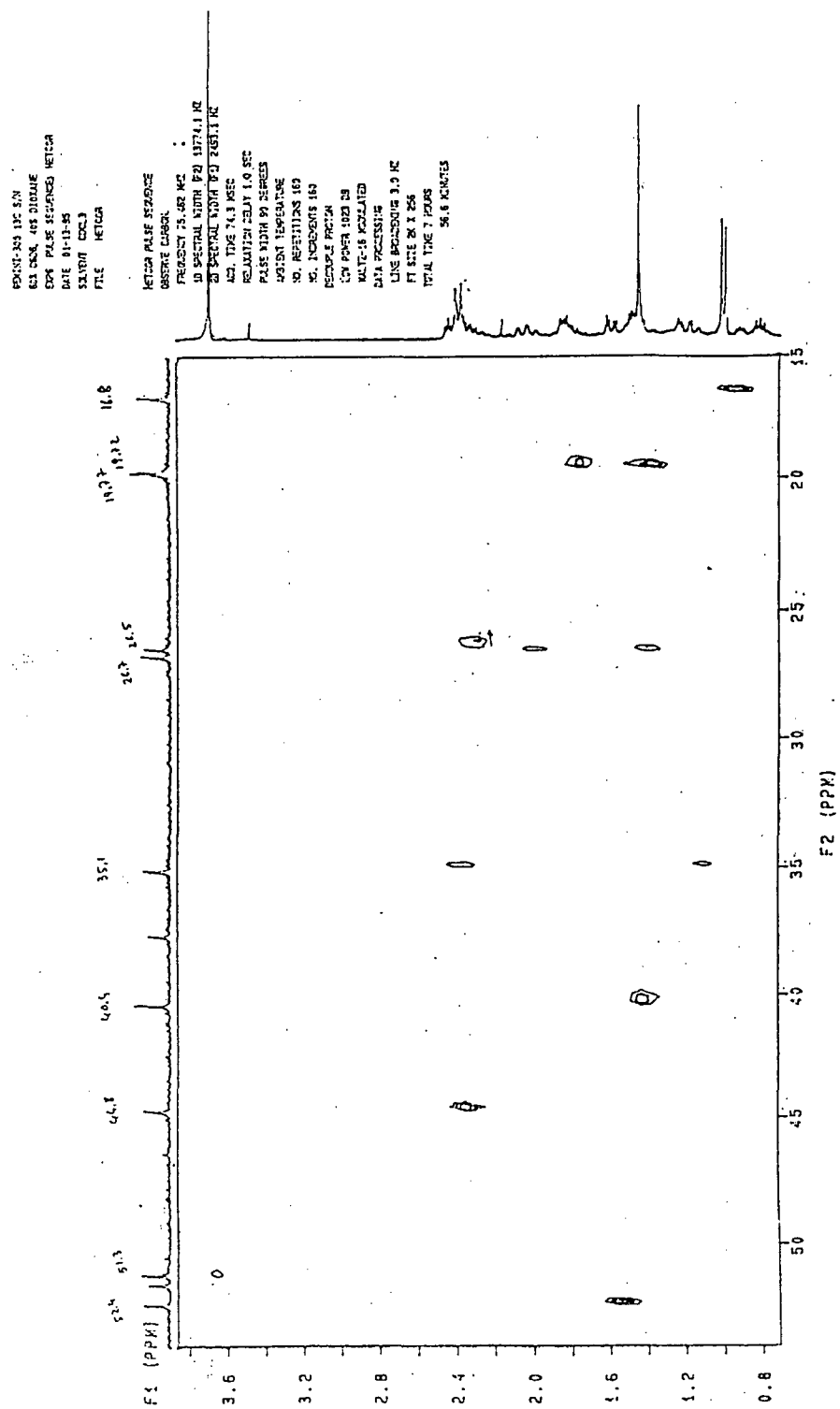


Figura 25- Espectro HETCOR I (300 MHz) de sonderianin em CDCl_3 , TMS como padrão interno de referência.

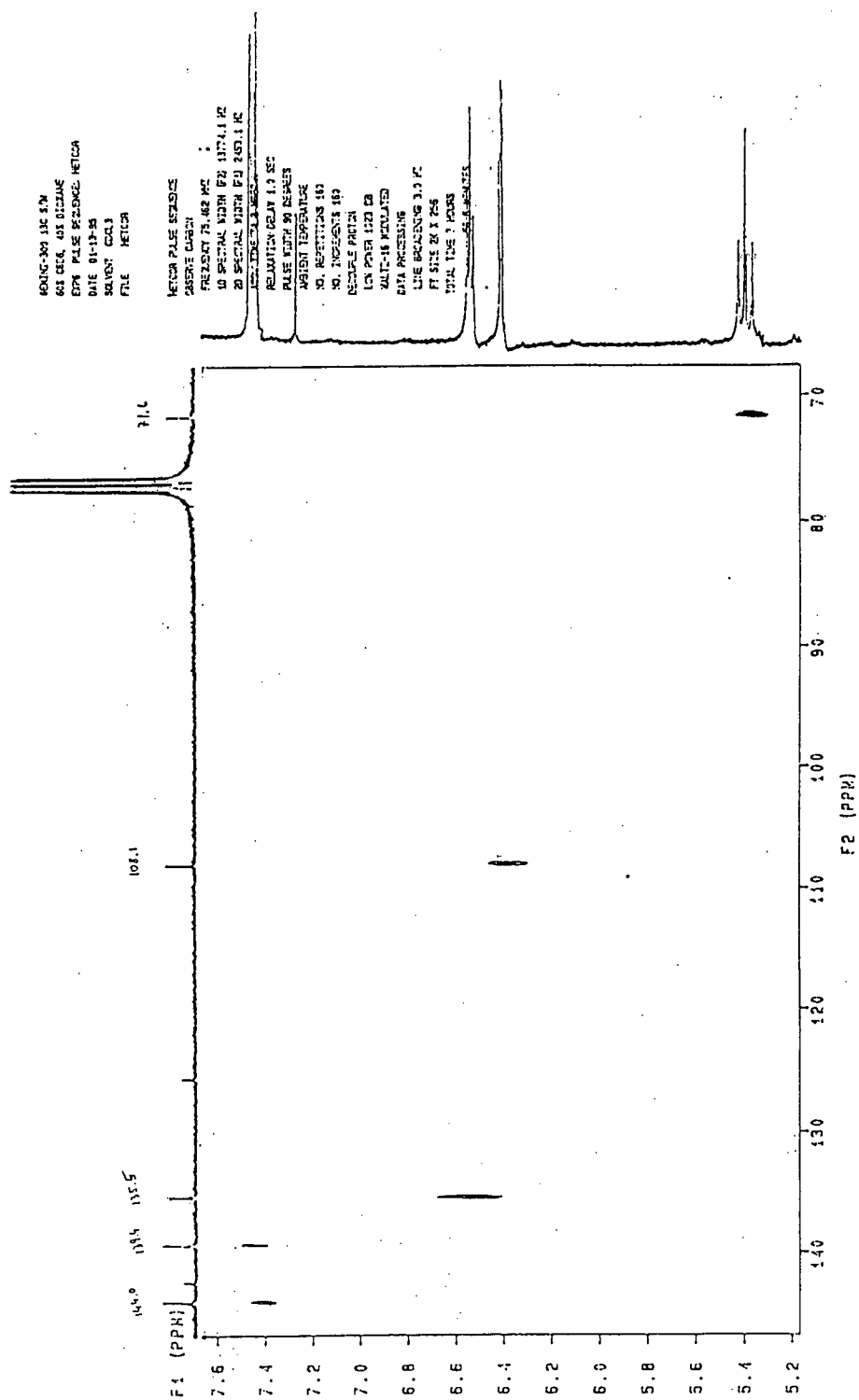


Figura 26- Espectro HETCOR II (300 MHz) de sonderianin em CDCl_3 , TMS como padrão interno de referência.

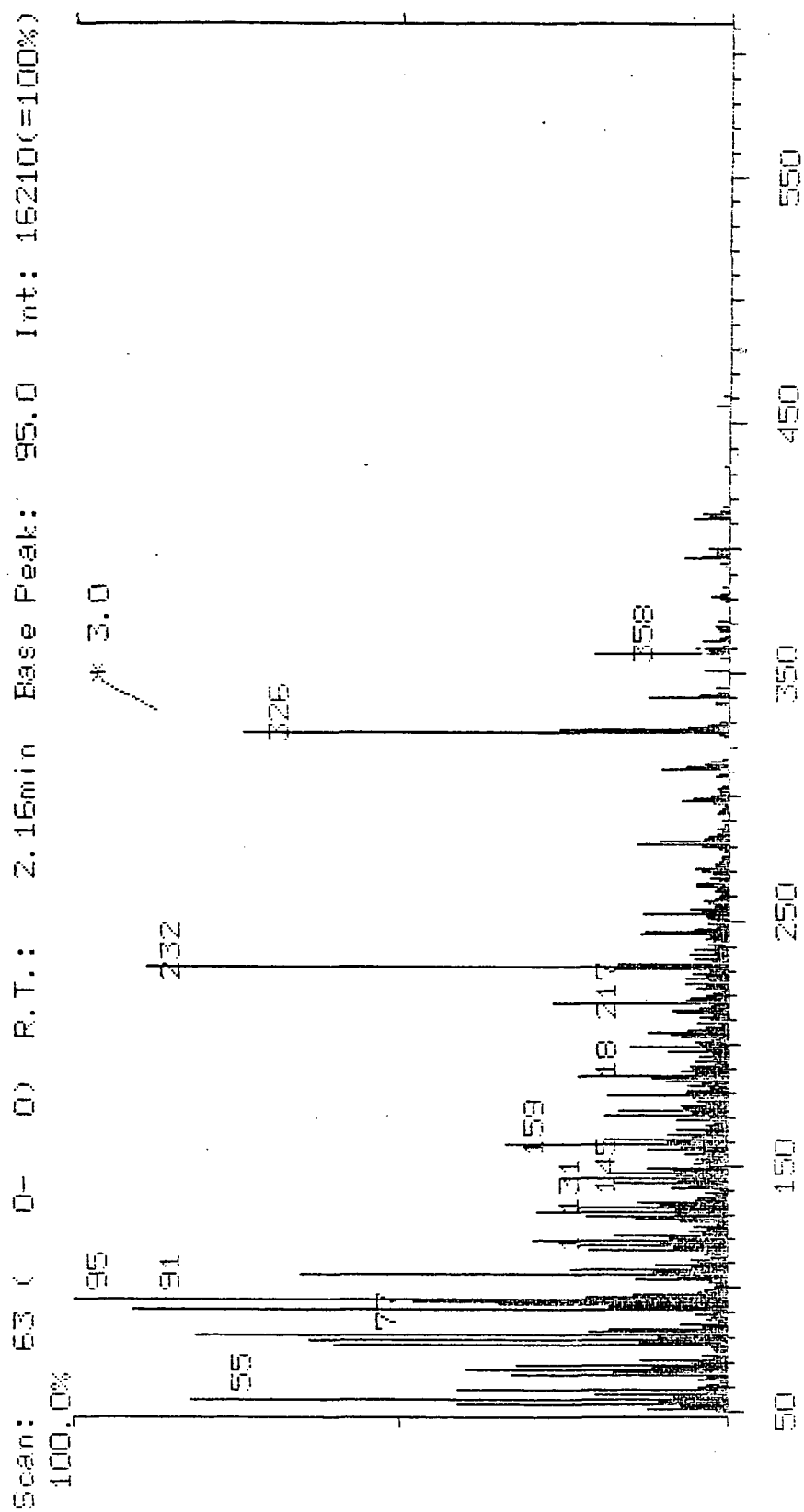
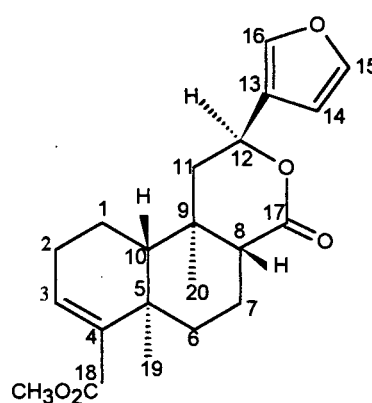


Figura 27- Espectro de Massas de sonderianin.

3.2.7. 12-*epi*-Metil barbascoato (CU26-DI)

O 12-*epi*-metil-barbascoato (CU26-DI) outro diterpeno furano-lactona de esqueleto clerodano (**42**), foi isolado da fração diclorometano I (Materiais e Métodos, p. 126). Este composto apresentou-se sob a forma de cristais incolores com ponto de fusão 115-117°C. Foi solúvel em clorofórmio e acetato de etila e apresentou $[\alpha]_D = -51,8$ (0,5; CHCl₃). Foi identificado por comparação de seus dados espectrais de IV, ¹H-RMN, ¹³C-RMN (HETCOR, Long Range, INEPT seletivo), Massas e com dados da literatura^{87,88}.



(42)

O espectro no Infravermelho (fig. 28) apresenta uma banda de absorção na região de 3020-2950 cm⁻¹ referente ao estiramento de metilas; bandas de absorções intensas em 1720 e 1708 cm⁻¹ indicando a presença de duas carbonilas de éster e lactona; absorções em 1638 e 1590 cm⁻¹ atribuídas à deformação de olefina e absorções em 1504 e 874 cm⁻¹ referentes a um anel furano.

O espectro de massas (fig. 32) apresenta o íon molecular m/z (%) 358 (33, M⁺) sugerindo a fórmula molecular C₂₁H₂₆O₅, indicando nove insaturações, além dos picos m/z 327 (23), m/z 299 (28), m/z 281 (24), m/z 232 (23) e m/z 205 (100). Este mesmo íon molecular foi observado para o sonderianin (fig. 27) porém com diferente fragmentação, descartando a possibilidade da presença de isômeros.

Os espectros de ¹H-RMN (figs. 29 e 30, tab. 6) de CU26-DI, em CDCl₃, a 300 MHz apresentaram sinais característicos. Na região de metilas observa-se dois singletes a 1,10 ppm (s, Me-20) e 1,33 ppm (s, Me-19). Comparando-se esse

espectro com o obtido para o composto sonderianin, observa-se pequena diferença entre eles. No primeiro caso, observa-se um dublete (fig. 23, $\delta=1,01$, Me-17) e para o composto CU26-DI ($\delta=1,10$, Me-20) um singleto, sugerindo assim uma modificação provável no anel contendo o sistema lactônico. O intenso singleto a 3,70 ppm corresponde ao grupo metoxila ligado em C-18. Já o sinal a 5,53 ppm (dd, $J=6,0$ e $11,2$ Hz) é referente ao H-12. A presença de um anel furano β -substituído é indicada pelos sinais característicos entre 6,40-7,45 ppm.

O espectro de ^{13}C -RMN em CDCl_3 , a 75 MHz (fig.31, tab. 6) foi analisado com o auxílio de técnicas como APT, HETCOR, LR e INEPT. Dessa forma foi possível identificar a presença de um anel furano β -substituído, um éster metílico α , β insaturado, uma γ lactona, dois grupos metilas em carbonos quaternários, cinco metilenos, três metinos e dois carbonos quaternários. Estes dados indicam seis insaturações equivalentes sugerindo então a presença de mais três ciclos no composto.

Cumulativamente, os dados obtidos estão de acordo com a estrutura do metil-barbascoato (sem detalhes de estereoquímica) isolado de *Croton californicus*⁸⁷ cuja estrutura foi determinada por cristalografia de Raio X e com parte da estrutura do ácido floribúndico⁸⁸.

Entretanto, a comparação dos dados físicos ($\text{PF}_{\text{Lit}}= 152-53^\circ$, $\text{PF}_{\text{Exp}}= 115-117^\circ$; $[\alpha]_{\text{D Lit}}= -70^\circ$, $[\alpha]_{\text{D Exp}}= -51,8$) e dados de ^1H -RMN⁸⁷ revelam que CU26-DI e metil-barbascoato não são idênticos.

O espectro de ^1H -RMN do metil-barbascoato⁸⁷ exhibe H-12 (próton lactônico) como um triplete ($J=9,0$ Hz) para δ 5,3. O composto CU26-DI (**42**) apresenta o H-12 como um duplo dublete ($J=6,0$ e $11,2$) para δ 5,53, sugerindo então uma estereoquímica diferente para este centro quiral. Isso foi confirmado através de experimentos de DIFFNOE onde a irradiação do H-12 (δ 5,53) modificou a intensidade do sinal para δ 1,10 (CH_3 -20). Posteriormente, irradiando CH_3 -20, o efeito NOE foi observado em ambos, H-12 e CH_3 -19 (δ 1,33) indicando que o H-12 está em posição *cis* com relação às metilas em C-19 e C-20.

Os resultados obtidos através de análise espectroscópicas, sugerem que Cu26-DI corresponde ao composto 12-*epi*-metil-barbascoato (**42**). Este composto está sendo descrito pela primeira vez na literatura⁸⁹.

Tabela 6 - Atribuições de ^1H -RMN (300 MHz) e ^{13}C -RMN (75 MHz) através de experimentos de ^{13}C /APT, HETCOR, HETCOR/LR e INEPT seletivo de 12-*epi*-metilbarbascoato em clorofórmio deuterado. TMS como padrão interno de referência.

C	^{13}C /APT δ	^1H /HETCOR δ , m, (J)	HETCOR/LR*	Proton Irradiado	INEPTL
1	17,4/CH ₂	1,65 m	-	-	
2	26,8/CH ₂	2,35 m	-	-	
3	137,1/CH	6,63 m	-	6,63 (H-3)	167,3 J ³ +36.7 J ³ +17.4 J ³
4	141,2/C	-	1,33 (Me 19)J ³		
5	36,7/C	-	-		17,4 J ³
6	34,8/CH ₂	2,55 m (13,4;3,3) 1,17 dd (13,4;3,3)	-		
7	18,3/CH ₂	Não observado	-		
8	51,2/CH	2,2-2.1 m	-		
9	37/C	-	-		
10	52,5/CH	1,28 dd (13,0;6,0)	-		
11	44,0/CH ₂	2,40d (6,0) 1,60m	-		
12	71,8/CH	5,53 dd (11,2;6,0)	-	5,53 (H-12)	125,9 J ²
13	125,9/C	-	-		
14	108,5/CH	6,42 sl	-	6,42 (H-14)	143,8 J ² +139.3 J ³ +125.9 J ²
15	143,8/CH	7,42 t (1,7;1,7)	-		
16	139,3/CH	7,45 sl	-		
17	172,4/C	-	-		
18	167,3/C	1,33	3,70(OMe)J ³		
19	20,9/CH ₃			1,33 (Me-18)	141.2 J ³ +52.5 J ³ +36.7 J ² ,
20	14,6/CH ₃	1,10 s	2,20(H-8)J ³	1,10(Me-20)	51,2 J ³ +44.0 J ³ +37.0 J ²
OMe	51,3	3,70 s	-	3,70(OMe)	167,3 J ³

*Únicos encontrados devido a baixa concentração de amostra.

δ (deslocamento químico, ppm), m (multiplicidade), J (acoplamento, Hertz).

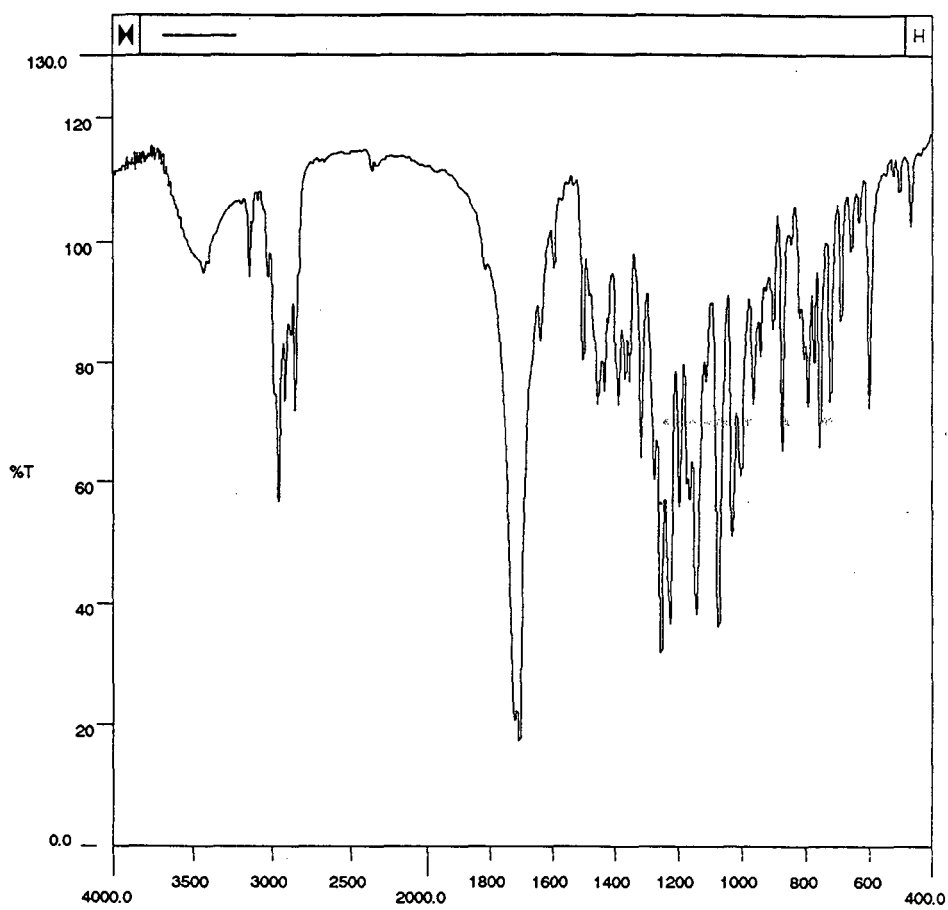


Figura 28 - Espectro no Infravermelho de 12-*epi*- metil-barbascoato em pastilha de KBr.

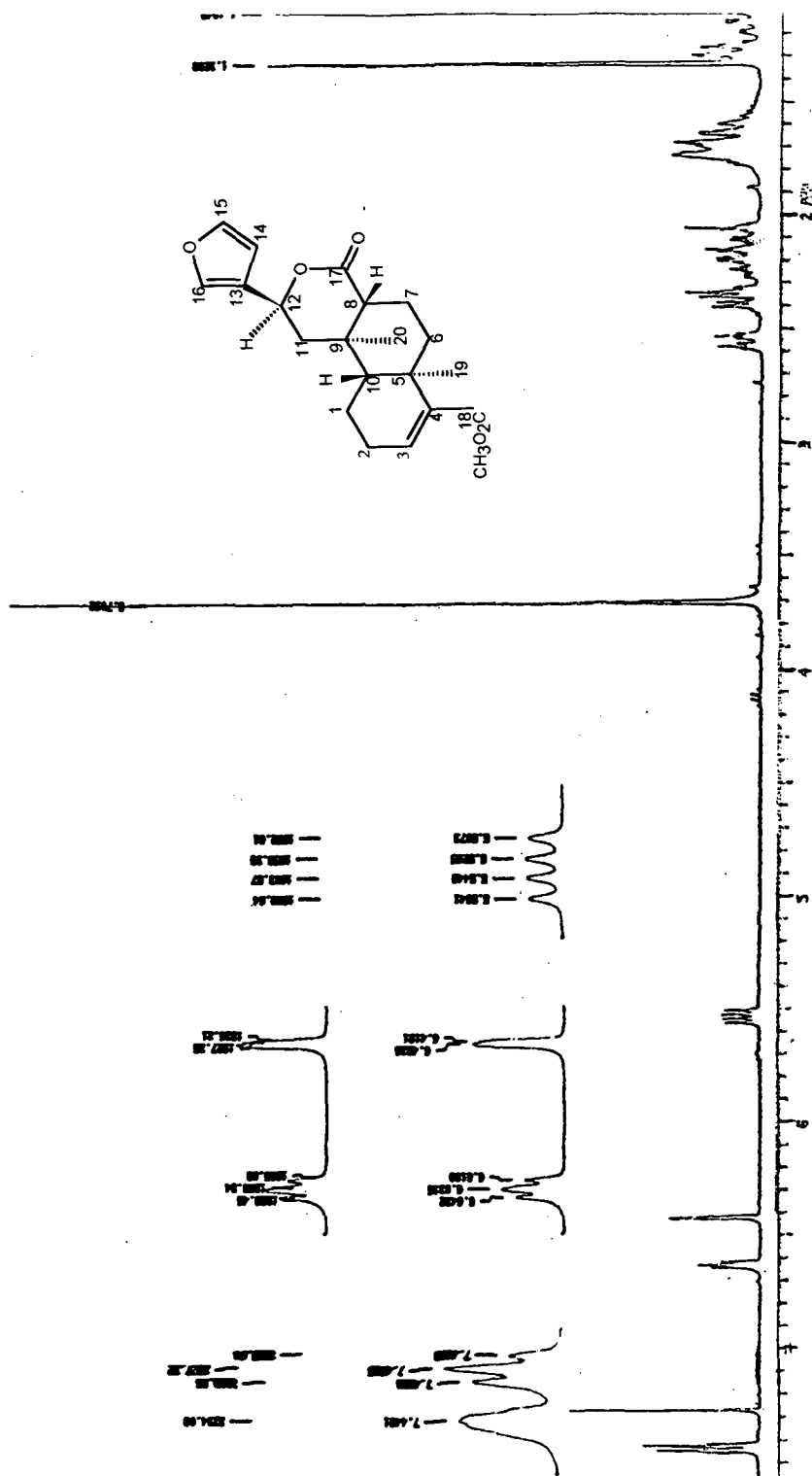


Figura 29 - Espectro I de $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz) de 12-*epi*-metil-barbascoato em CDCl_3 , TMS como padrão interno de referência.

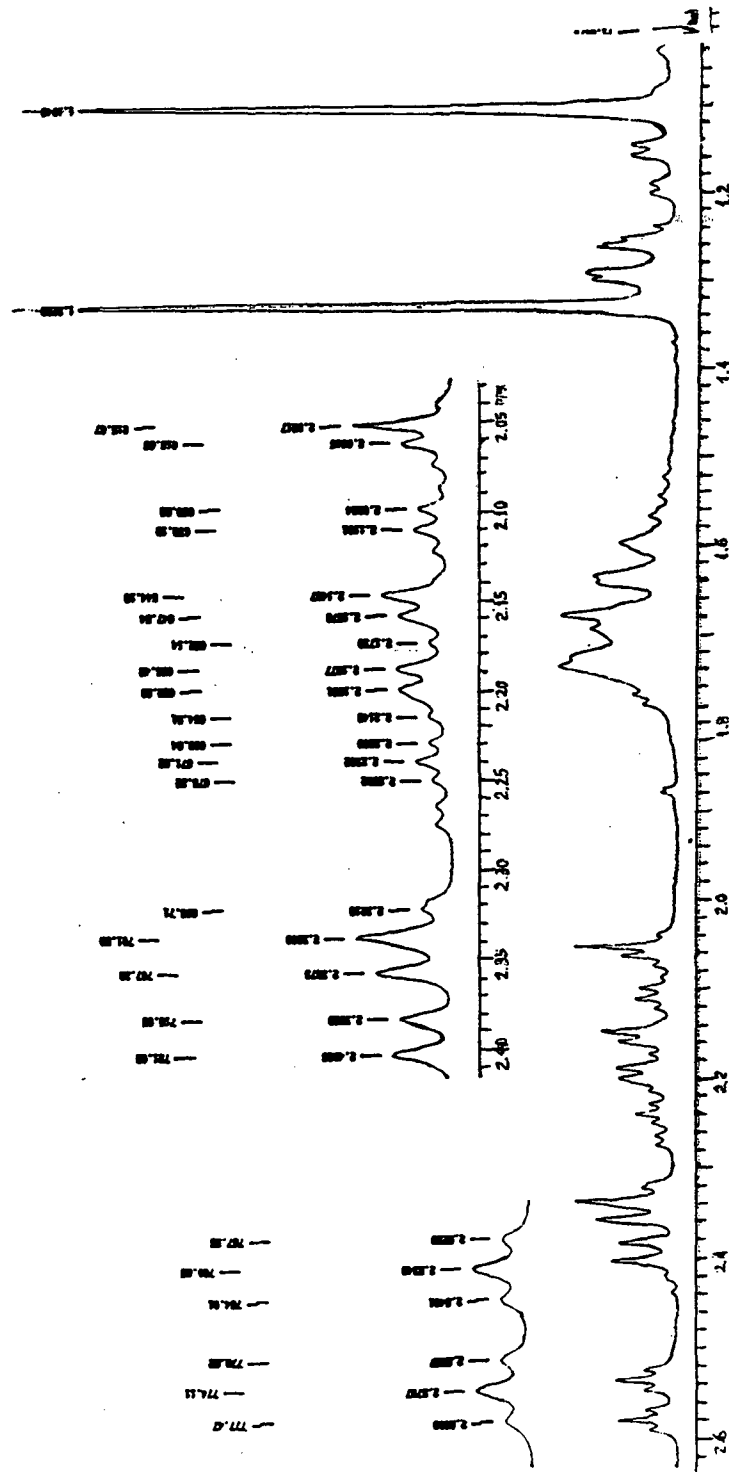


Figura 30 - Espectro II de $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz) de 12-*epi*-metil-barbascoato em CDCl_3 , TMS como padrão interno de referência.

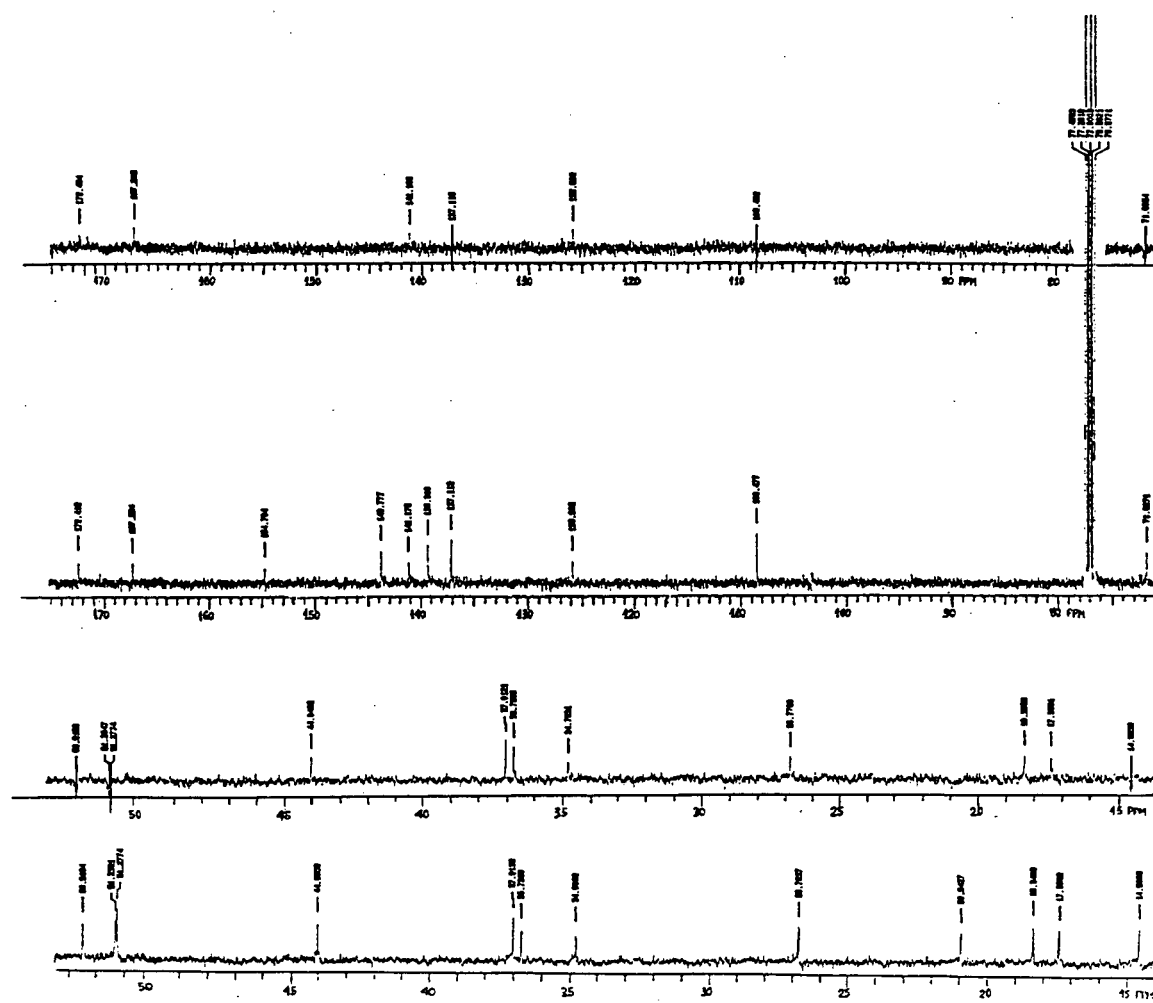


Figura 31- Espectro de ^{13}C -RMN/APT (75 MHz) de 12-*epi*-metil-barbascoato em CDCl_3 , TMS como padrão interno de referência.

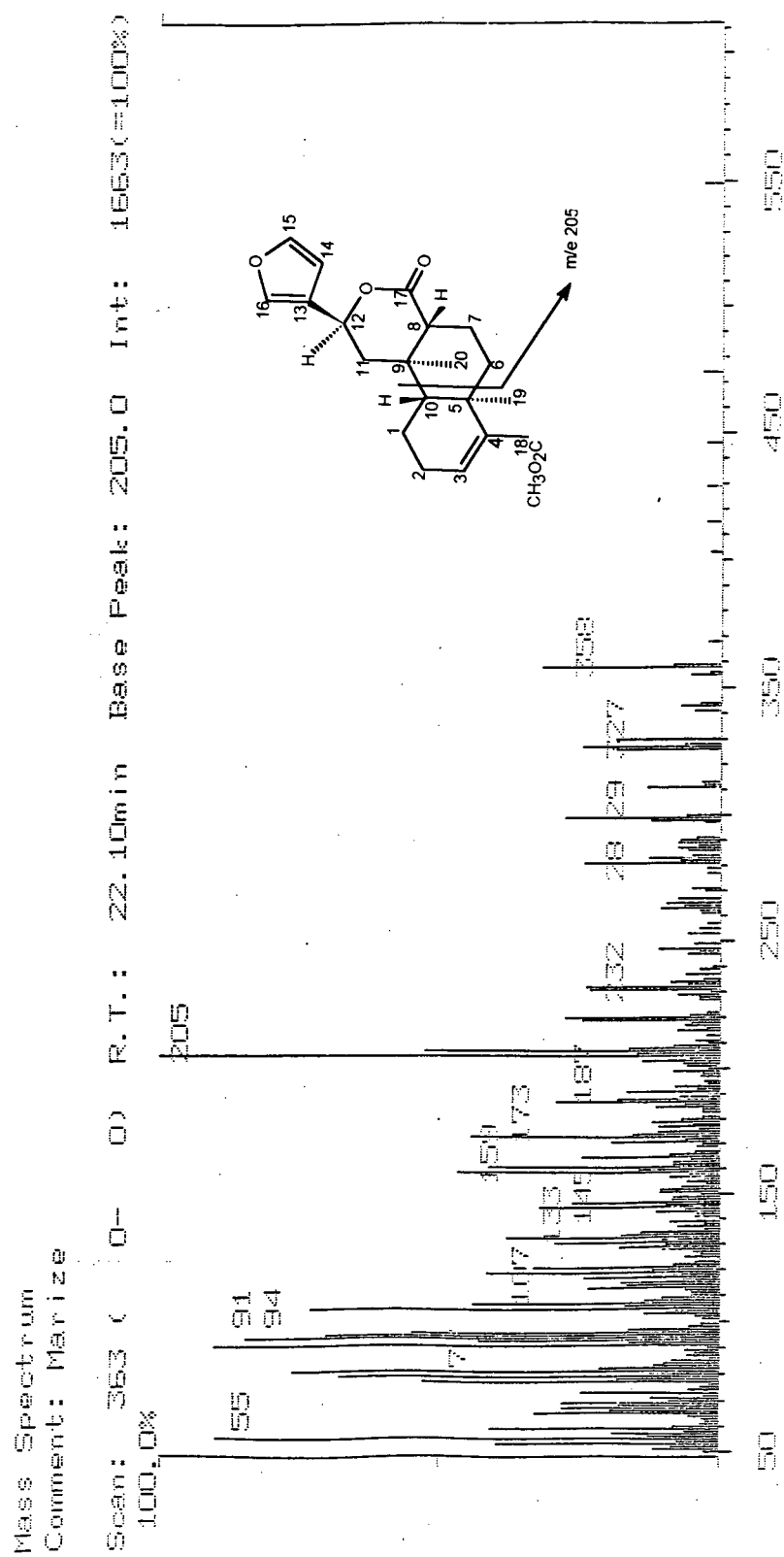
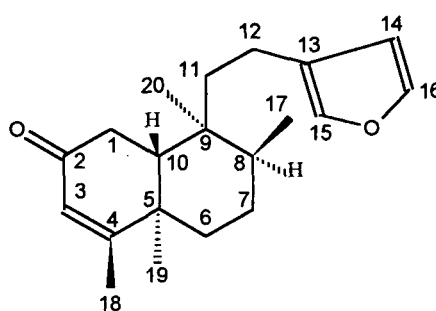


Figura 32 - Espectro de Massas de 12-*epi*-metil-barbascoato.

3.2.8. 15,16-epóxi-3,13(16)-clerodatrieno-2-ona (CU6-HDDI)

O composto 15,16-epóxi-3,13(16)-clerodatrieno-2-ona, um furano-diterpeno de esqueleto clerodano (**43**), foi isolado da união das subfrações 18-23 de Hex/DCM e 17-18 de DCM I (Materiais e Métodos, p. 126) e codificado como CU6-HDDI. Apresentou-se como um óleo de coloração amarelo-clara, solúvel em clorofórmio e acetato de etila com $[\alpha]_D = -30$ (1,1; CHCl_3). Foi identificado através de seus dados espectrais de IV, $^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN/APT}$, HETCOR, LR, INEPT seletivo e com dados da literatura.^{90,91}



(**43**)

O espectro no Infravermelho (fig. 33) apresenta uma banda de absorção intensa em 2960 cm^{-1} referente ao estiramento de metilas; uma absorção em 1670 cm^{-1} sugerindo uma carbonila α, β insaturada e bandas em 1505 e 870 cm^{-1} referentes a um anel furano.

O espectro de Massas (fig. 37) apresenta o pico íon molecular a m/z 300 (40, M^+) indicando a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_2$ além dos picos m/z 285 (47), m/z 206 (22), m/z 191 (36), m/z 136 (37), m/z 135 (40) m/z 124 (37), m/z 121 (76), m/z 95 (55), m/z 81 (100), m/z 55 (46).

O espectro de $^1\text{H-RMN}$, (figs. 34 e 35) de CU6-HDDI, em CDCl_3 exibiu dois singletes (0,82; Me-20 e 1,13 ppm, Me-19) e dois dubletes (0,86 ppm, $J=6,1$ Hz Me-17 e 1,89 ppm, $J=1,4$ Hz Me-18) referentes a quatro metilas. O dublete a 2,40 ppm ($J=9,4$ Hz) é relativo aos prótons metilênicos em C-1. Na região de prótons ligados a C- sp^2 observa-se um sinal a 5,73 ppm referente ao próton olefínico H-3 (q, $J=1,4$ Hz). Além disso, observa-se na região entre 6,23 a 7,33 ppm sinais característicos do anel furânico.

O espectro de ^{13}C -RMN/APT (fig. 36) em CDCl_3 a 75 MHz, apresentou vinte sinais, sendo dez carbonos metílicos e metínicos, dez carbonos metilênicos e quaternários.

As assinalações de ^1H e ^{13}C para CU6HDDI estão reportados na Tabela 7, como resultado de experimentos de HETCOR, HETCOR-LR e INEPT seletivo. A análise destes dados juntamente com o Espectro de Massas (fig.37) sugerem a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_2$, com sete insaturações, sendo cinco equivalentes e duas referentes a dois ciclos.

Além disto, no espectro de HETCOR/LR o C-1 mostrou interação com o H-10 e o C-2 com o H-1. As atribuições dos deslocamentos químicos para os metilenos nas posições 6, 7 e 11 foram obtidas através de irradiação seletiva (INEPTL) dos sinais dos grupos metilas vizinhos CH_3 -19, CH_3 -17 e CH_3 -20 respectivamente. A atribuição para o último metileno (posição 12) foi feita por comparação com outros clerodanos.⁹⁰

A junção *trans* dos anéis A/B foi apoiada⁹¹ nos deslocamentos químicos de ^{13}C -RMN de CH_3 -19 (18,3 ppm) e CH_3 -20 (17,7 ppm) e a configuração relativa dos grupos metilas foi obtida por experimentos de DIFFNOE. Em particular, na irradiação de CH_3 -19 (δ 1,13) o efeito NOE foi observado em CH_3 -20 a 0,82 ppm e vice-versa; ao contrário, a irradiação não mostrou nenhum efeito em CH_3 -17 (δ 0,86). Os resultados obtidos sugerem que o composto CU6-HDDI poderá ser atribuído como o 15,16-epóxi-3,13 (16)-clerodatrieno-2-ona representado pela estrutura **43**. Esse composto está sendo descrito pela primeira vez na literatura⁸⁹.

Tabela 7 - Atribuições de ^1H -RMN (300 MHz) e ^{13}C -RMN (75 MHz) através de experimentos de ^{13}C /APT, HETCOR, LR e INEPT seletivo do composto 15,16-epóxi-3,13(16),14-clerodatrieno-2-ona em clorofórmio deuterado. TMS como padrão interno de referência.

C	^{13}C /APT	^1H /HETCOR δ , m, J	HETCOR/LR	Proton Irradiado	INEPTL
1	34.8/CH ₂	2.40 d (9,4)	1.96 J ² (H-10)	2.40	200 J ² +45.6 J ² +39.8 J ³
2	200.3/C	-	2.40 J ³ (H-1)	-	-
3	125.4/CH	5.73 q (1,4)	1.89 J ³ (CH ₃ -18)	5.73	39.8 J ³ +34.8 J ³ +18.9 J ³
4	172.6/C	-	1.89 J ² (CH ₃ -18) 1.13 J ³ (CH ₃ -19)	-	-
5	39.8/C	-	-	-	-
6	35.5/CH ₂	*	1.13 J ³ (CH ₃ -19)	-	-
7	26.8/CH ₂	*	-	-	-
8	35.9/CH	*	-	-	-
9	38.7/C	-	0.86 J ³ (CH ₃ -17)	-	-
10	45.6/CH	1.96 t (9,4)	1.13 J ³ (CH ₃ -19) 0.82 J ³ (CH ₃ -20)	-	-
11	37.9/CH ₂	*	0.86 J ³ (CH ₃ -17)	-	-
12	17.8/CH ₂	2.30-2.1 m	-	-	-
13	125.4/C	-	-	-	-
14	110.8/CH	6.23 dd (1,0;1,6)	-	6.23	142.8 J ³ +138.4 J ² +124.9 J ²
15	138.4/CH	7.18 dd (1,0;1,6)	-	7.18	142 J ³ +124 J ³ +110.9 J ²
16	142.8/CH	7.33 t (1,6)	-	7.33	138.4 J ³ +124.9 J ² +110.8 J ³
17	15.7/CH ₃	0.86 d (6,1)	-	0.86	38.7 J ³ +35.9 J ² +26.8 J ³
18	18.9/CH ₃	1.89 d (1,4)	-	1.89	172.6 J ² +125.4 J ³ +39.8 J ³
19	18.3/CH ₃	1.13 s	-	1.13	172.6J ³ +45.3J ³ +39.8J ² +35.5J ³
20	17.7/CH ₃	0.82 s	-	0.82	45.6J ³ +38.7J ² +37.9J ³ +35.9J ³

δ (deslocamento, ppm), m (multiplicidade), J (acoplamento, Hertz).

* 1.60-1.50 (sobreposição de multipletes)

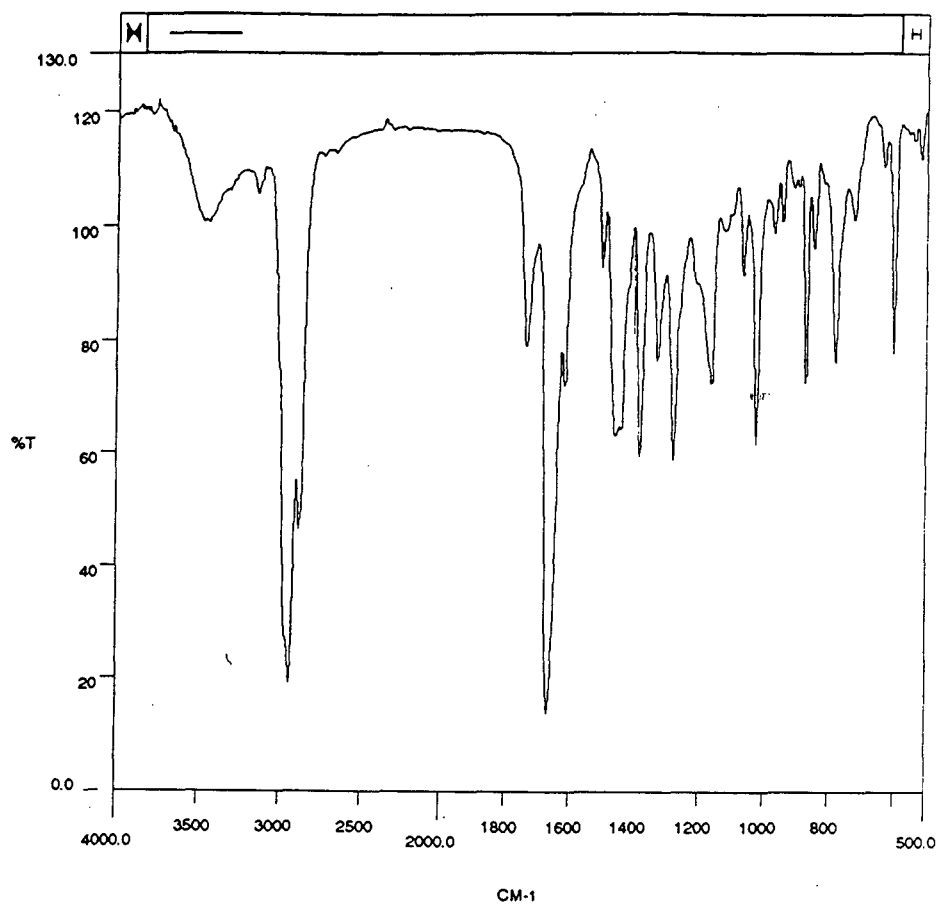


Figura 33 - Espectro no Infravermelho de 15,16-epóxi-3,13(16),14-clerodatrieno-2-ona em nujol.

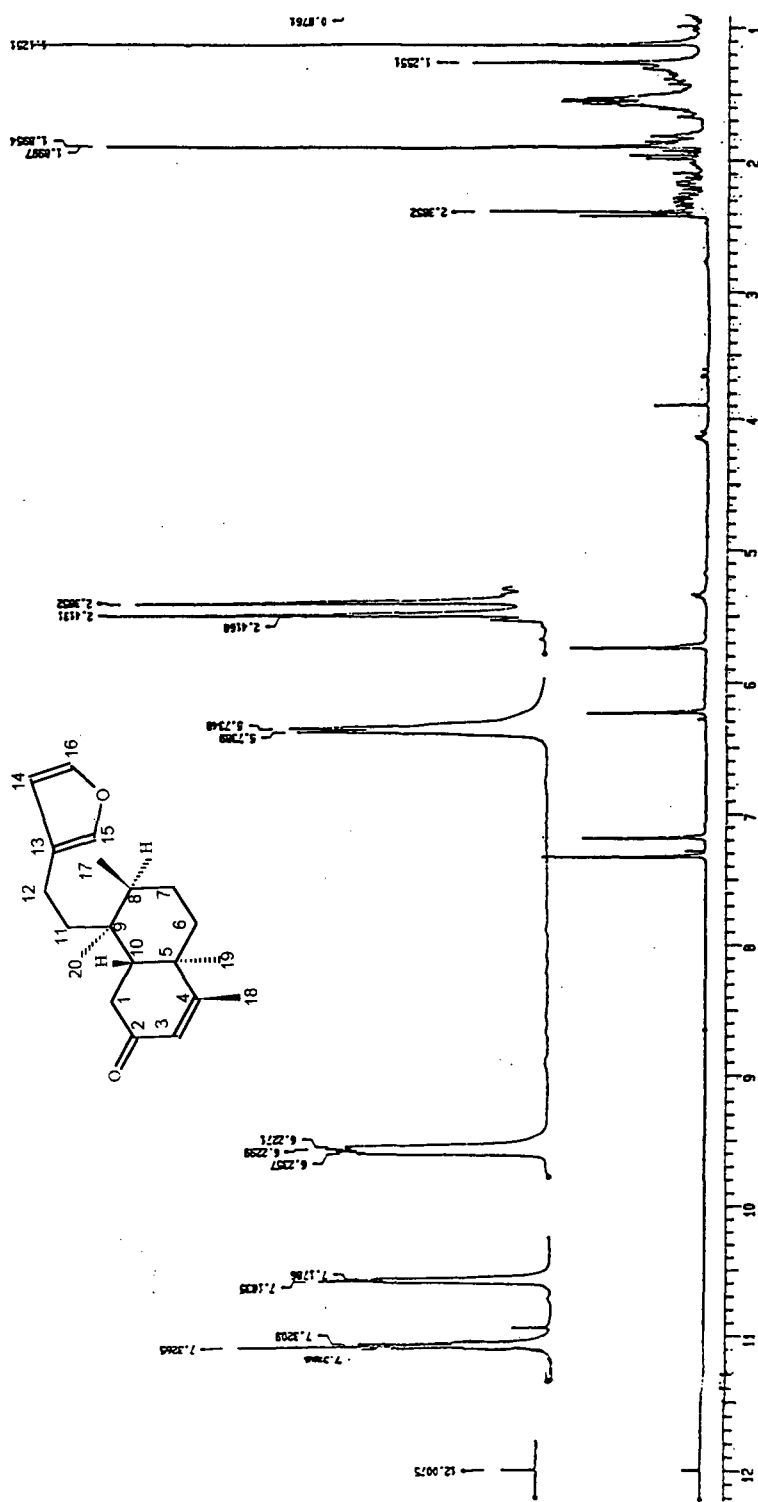


Figura 34 - Espectro I de $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz) de 15,16-epóxi-3,13(16),14-clerodatrieno-2-ona em CDCl_3 , TMS como padrão interno de referência.

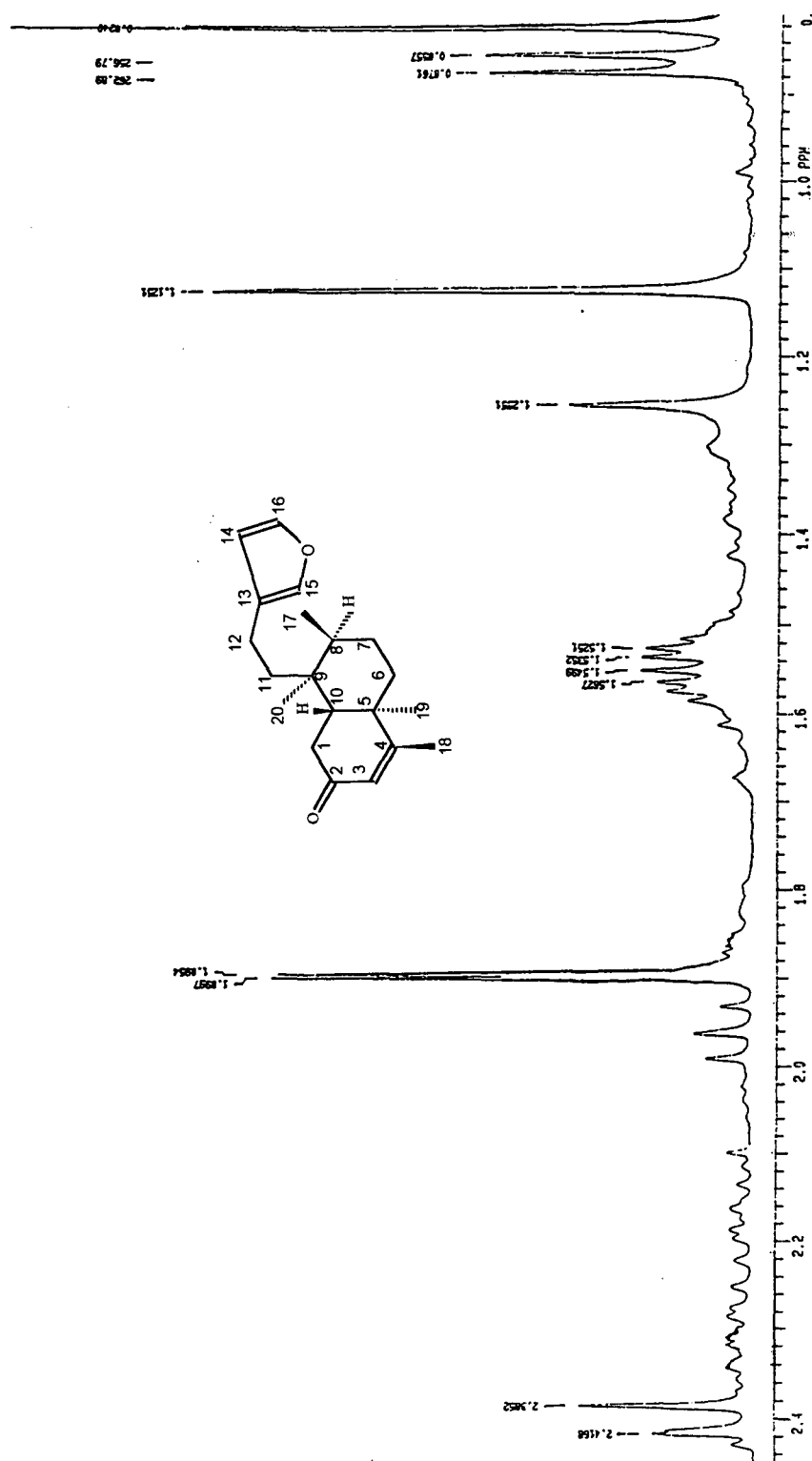


Figura 35 - Espectro II de $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz) de 15,16-epóxi-3,13(16),14-clerodatrieno-2-ona em CDCl_3 , TMS como padrão interno de referência.

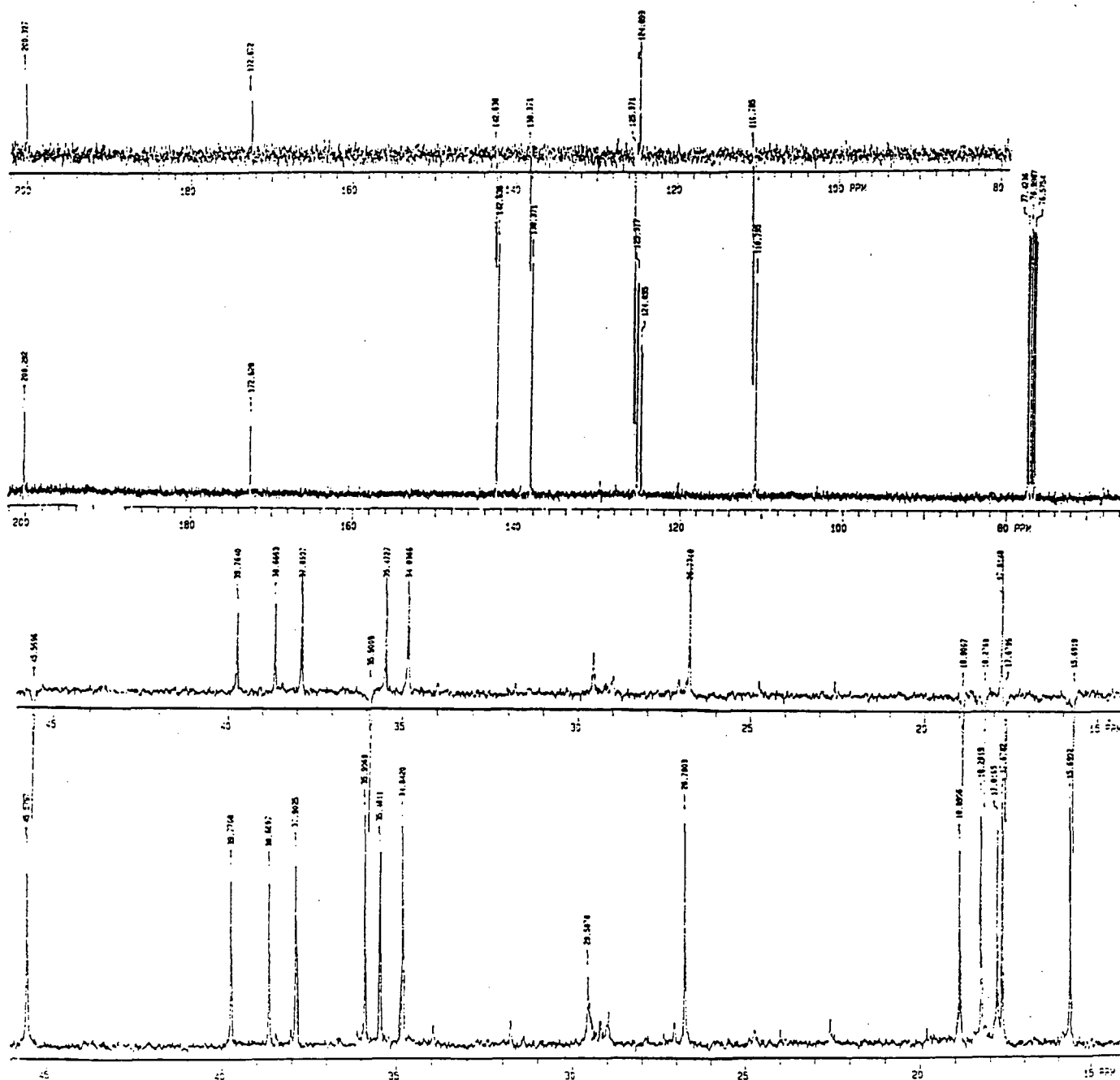


Figura 36- Espectro de ^{13}C -RMN/APT (75 MHz) de 15,16-epóxi-3,13(16),14-clerodatrieno-2-ona em CDCl_3 , TMS como padrão interno de referência.

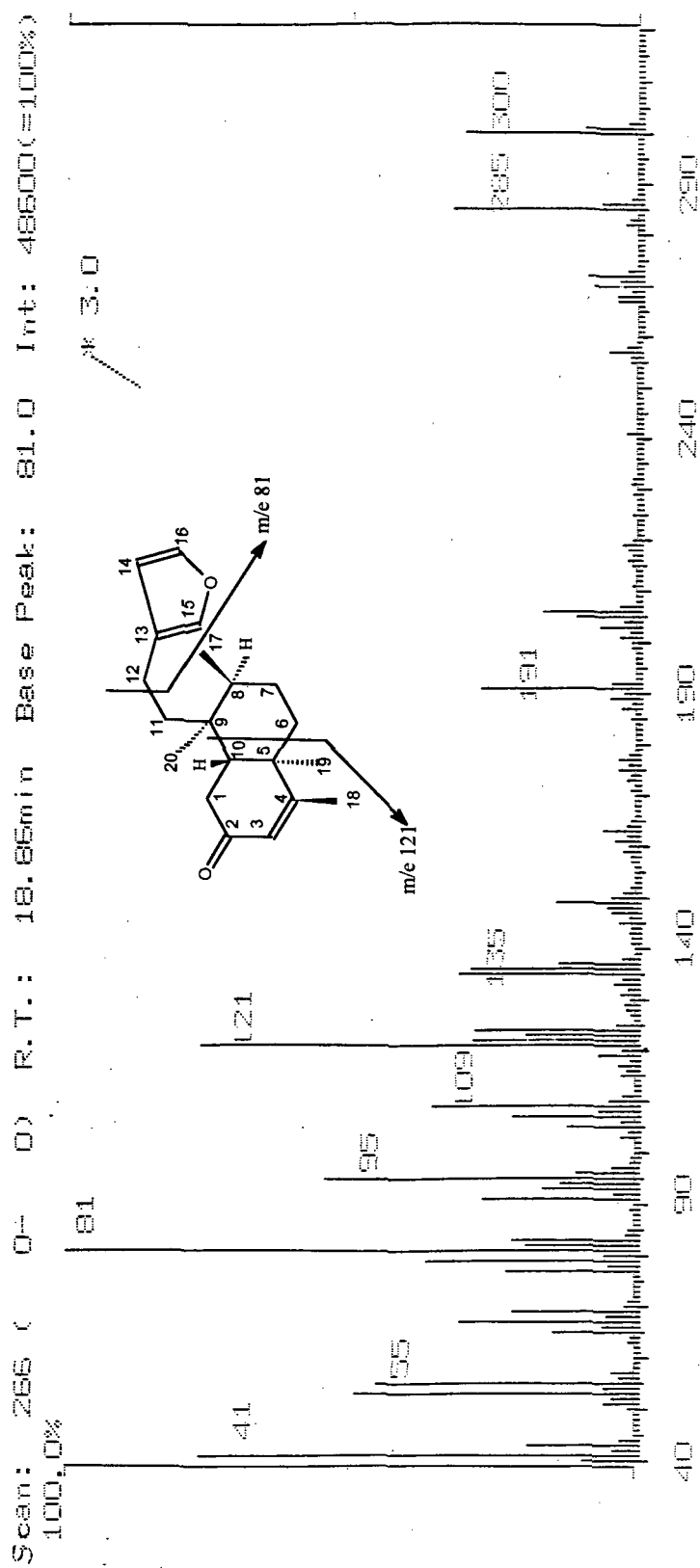
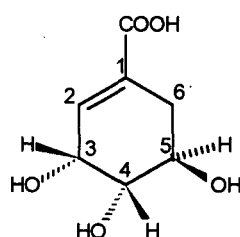


Figura 37- Espectro de Massas de 15,16-epóxi-3,13(16),14-clerodatrieno-2-ona.

3.3. *Gleichenia pectinata* Willd (Pr.)

3.3.1. Ácido siquímico (GP 10/13-FJO)

O ácido siquímico (44), um intermediário chave na biossíntese dos flavonóides, foi isolado da fração acetato de etila (Materiais e Métodos p. 131-132) de frondes jovens de outono. Foi codificado como (GP 10/13-FJO) e apresentou-se como um sólido de coloração castanho clara, com ponto de fusão 177-180°C e solúvel em metanol e água. Foi identificado por comparação de seus dados espectrais de IV, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e com dados da literatura.^{92,93}



(44)

A Tabela 8 mostra a atribuição dos sinais de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN através de experimentos de ^{13}C /APT, HETCOR, LR.

Tabela 8 - Atribuições de ^1H -RMN (300 MHz) e ^{13}C -RMN (75 MHz) através de experimentos de ^{13}C /APT, HETCOR e LR do ácido siquímico em metanol deuterado. TMS como padrão interno de referência.

C	^{13}C /APT (ppm)	^1H /HETCOR (ppm)	LR (ppm)
1	130.7/C	-	4.38 J ³ +2.70 J ² +2.19 J ²
2	138.7/CH	6.80 m	4.38 J ² +2.70 J ³ +2.19 J ³
3	67.2/CH	4.38 t	-
4	72.7/CH	3.68 dd	6.80 J ³ + 2.70 J ³
5	68.2/CH	4.0 q	2.19 J ²
6	31.6/CH ₂	2.70 dd; 2.19 dd	-
7	170.0/C	-	6.80 J ³

O espectro no IV em pastilha de KBr (fig. 38), apresenta bandas de absorção na região de 3482-3224 cm⁻¹ referente às hidroxilas, 1682 cm⁻¹ referente à carbonila e 1646 cm⁻¹ atribuída a estiramento olefínico.

O espectro de ^1H -RMN a 300 MHz (fig. 39) mostra sinais na região de 3,68-4,38 ppm referentes a prótons metínicos carbinólicos. O sinal a 6,80 ppm é atribuído a um próton olefínico enquanto os sinais à 2,70 e 2,19 ppm referem-se aos prótons metilênicos.

O espectro de ^{13}C -RMN/APT a 75 MHz (fig. 40) apresenta sete sinais, sendo 3 carbonos metínicos oxigenados, um carbono metínico olefínico e dois carbonos quaternários sendo uma carbonila de ácido e um carbono sp^2 . Esses dados, aliados aos espectros de HETCOR e LR permitiram atribuir a estrutura (44) para o composto GP10/13-FJO.

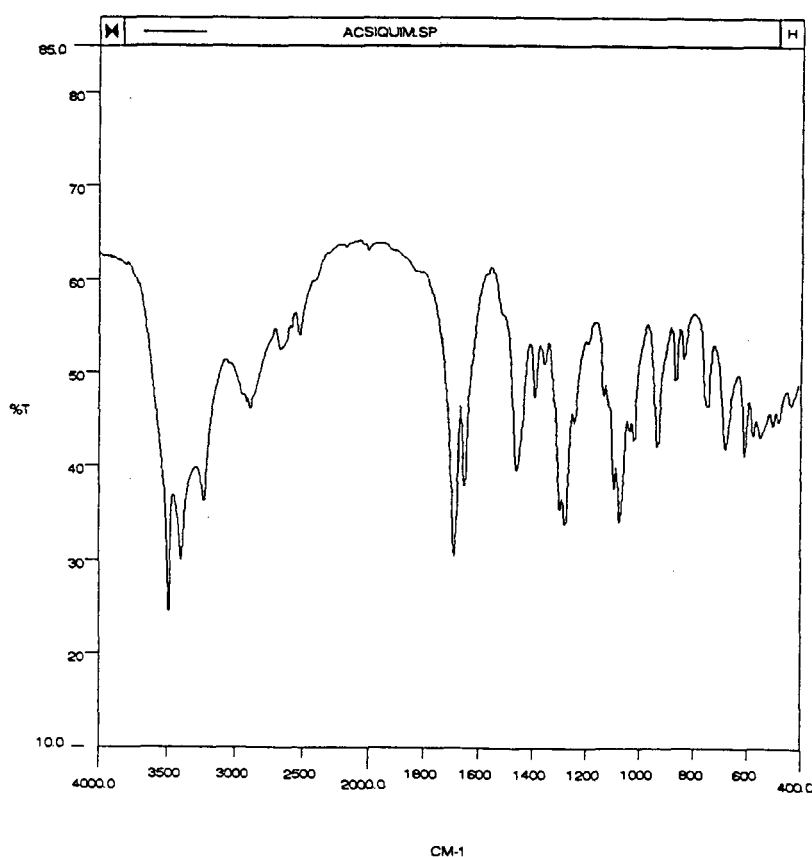


Figura 38 - Espectro no Infravermelho de ácido siquímico em pastilha de KBr.

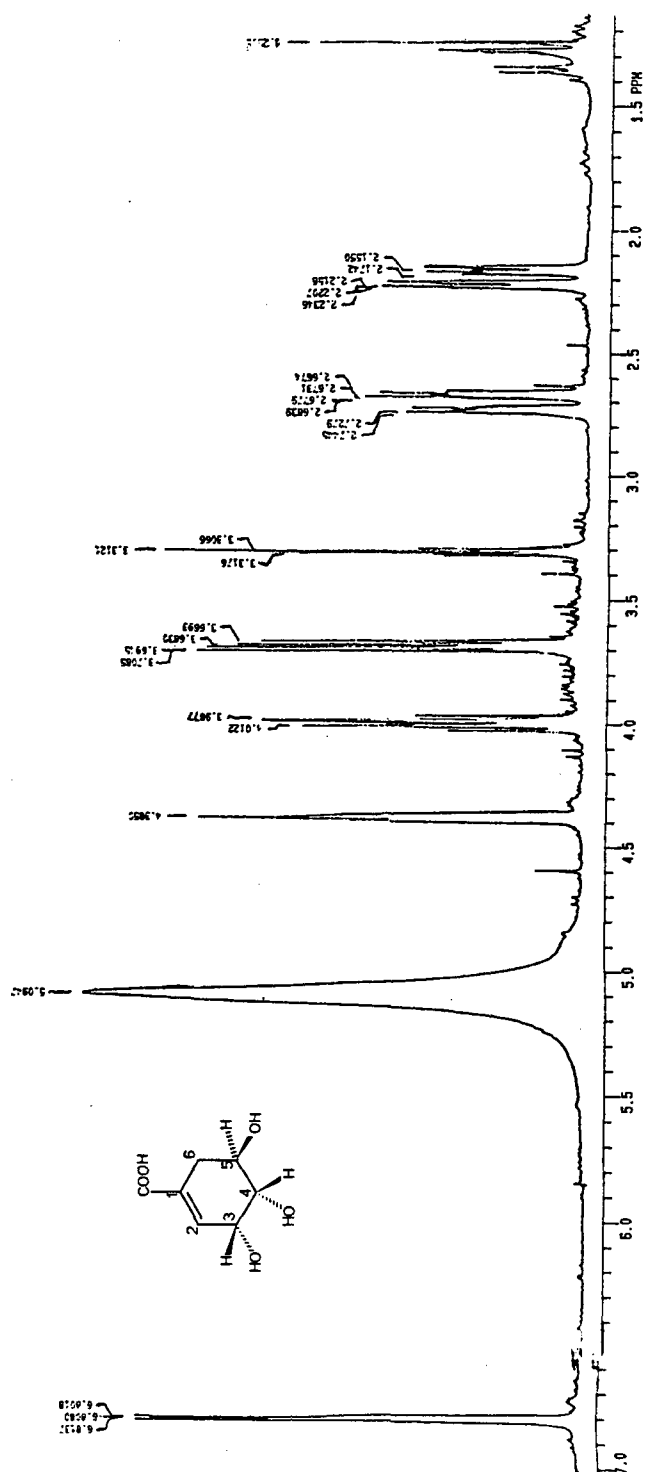


Figura 39 - Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) de ácido siquímico em CD_3OD , TMS como padrão interno de referência.

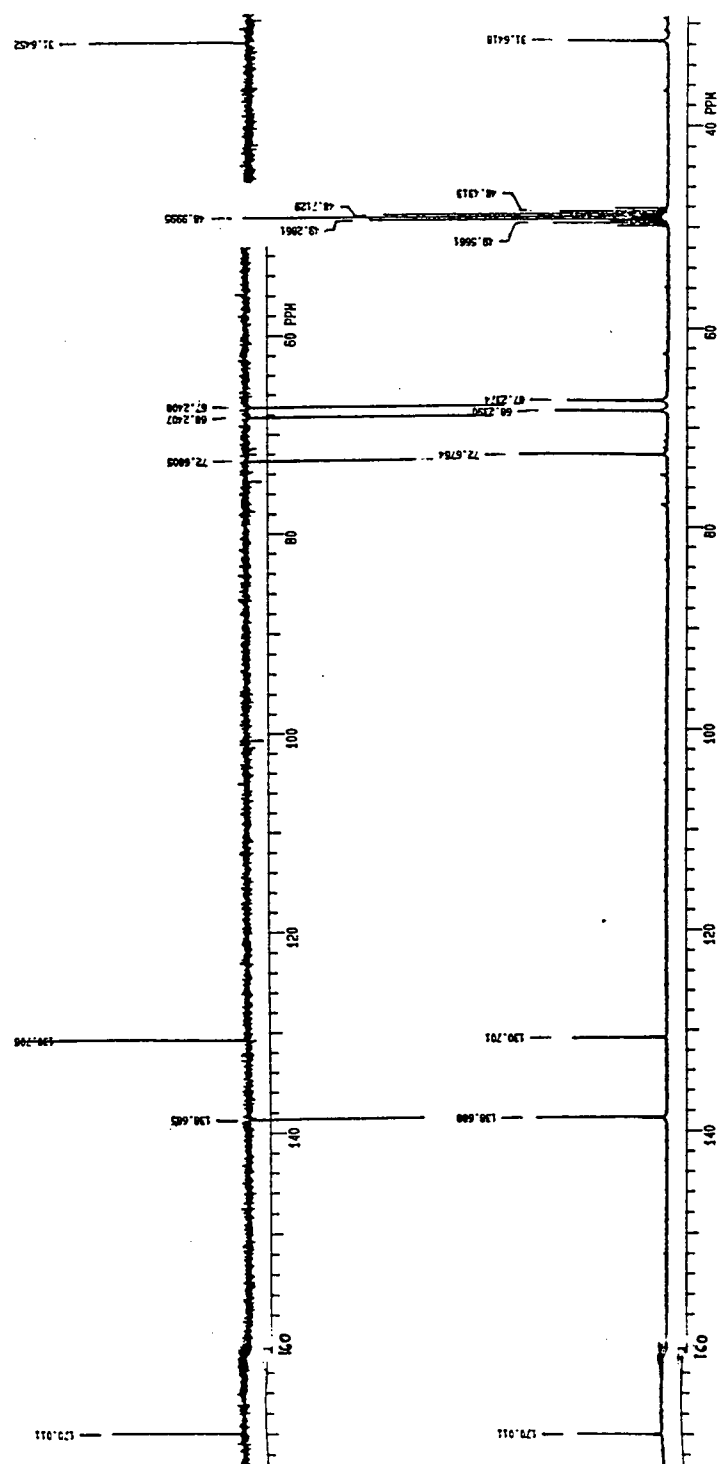
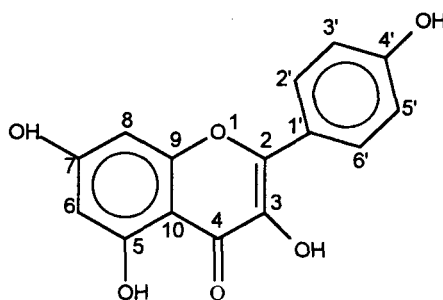


Figura 40 - Espectros de ^{13}C -RMN/APT (75 MHz) de ácido siquímico em CD_3OD , TMS como padrão interno de referência.

3.3.2. Canferol (3, 4', 5, 7-tetrahydroxi-flavona) (GP 6/9-FVO)

O canferol (GP 6/9-FVO), um flavonóide da classe flavonol (45), isolado da fração n-butanólica (Materiais e Métodos p. 130-131) de frondes verdes de outono apresentou-se como um cristal de coloração amarela, solúvel em acetona e metanol com ponto de fusão 276-78°C. Foi identificado por comparação de seus dados espectrais de $^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$, Massas, através de CCD com uma amostra autêntica e com os dados da literatura.⁹⁴⁻⁹⁶



(45)

A Tabela 9 mostra a atribuição dos sinais de $^1\text{H-RMN}$ e $^{13}\text{C-RMN}$ do canferol em acetona deuterada, TMS como padrão interno de referências.

Tabela 9 - Dados de $^1\text{H-RMN}$ (200 MHz) e $^{13}\text{C-RMN}$ (50 MHz) de canferol em acetona deuterada, TMS como padrão interno de referência.

C	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)
2	147,0	
3	136,74	
4	176,6	
5	162,3	
6	99,2	6,4 (d; J=2,0 Hz)
7	165,1	
8	94,5	6,2 (d; J=2,0 Hz)
9	158,8	
10	104,1	
1'	123,3	
2'	130,5	8,1 (d; J=8,8 Hz)
3'	116,3	6,9 (d; J=8,8 Hz)
4'	160,2	
5'	116,3	6,9 (d; J=8,8 Hz)
6'	130,5	8,1 (d; J=8,8 Hz)

A Figura 41 mostra o espectro no IV (pastilha de KBr), com bandas características em 3390 cm^{-1} relativa à hidroxila, 1679 cm^{-1} indicando carbonila conjugada e ainda em 1630 cm^{-1} sugerindo insaturação.

O espectro de Massas (fig. 44) mostrou o pico íon molecular 286 e fragmentação característica de flavonóis.

No espectro de ^1H -RMN (fig. 42) observa-se sinais característicos na região de prótons aromáticos, dois dubletes em 6,9 ppm ($J=8,8\text{ Hz}$) e 8,1 ppm ($J=8,8\text{ Hz}$), os quais foram atribuídos para os prótons H-3'; H-5'e H-2'; H-6'do anel B, respectivamente. Os dois dubletes a 6,2 ppm ($J=2,0\text{ Hz}$) e a 6,4 ppm ($J=2,0\text{ Hz}$) correspondem aos prótons H-6 e H-8 do anel A.

O espectro de ^{13}C -RMN (50 MHz) (fig. 43) permitiu confirmar a estrutura 45 através da atribuição de todos os carbonos presentes.

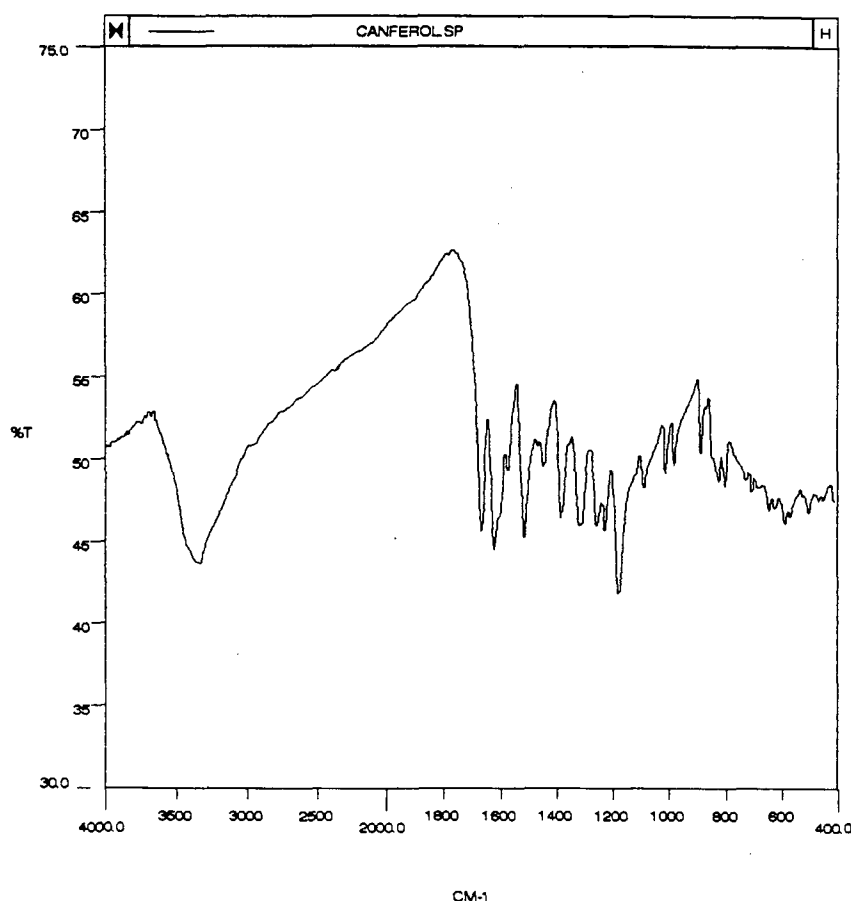


Figura 41 - Espectro no Infravermelho do canferol em pastilha de KBr.

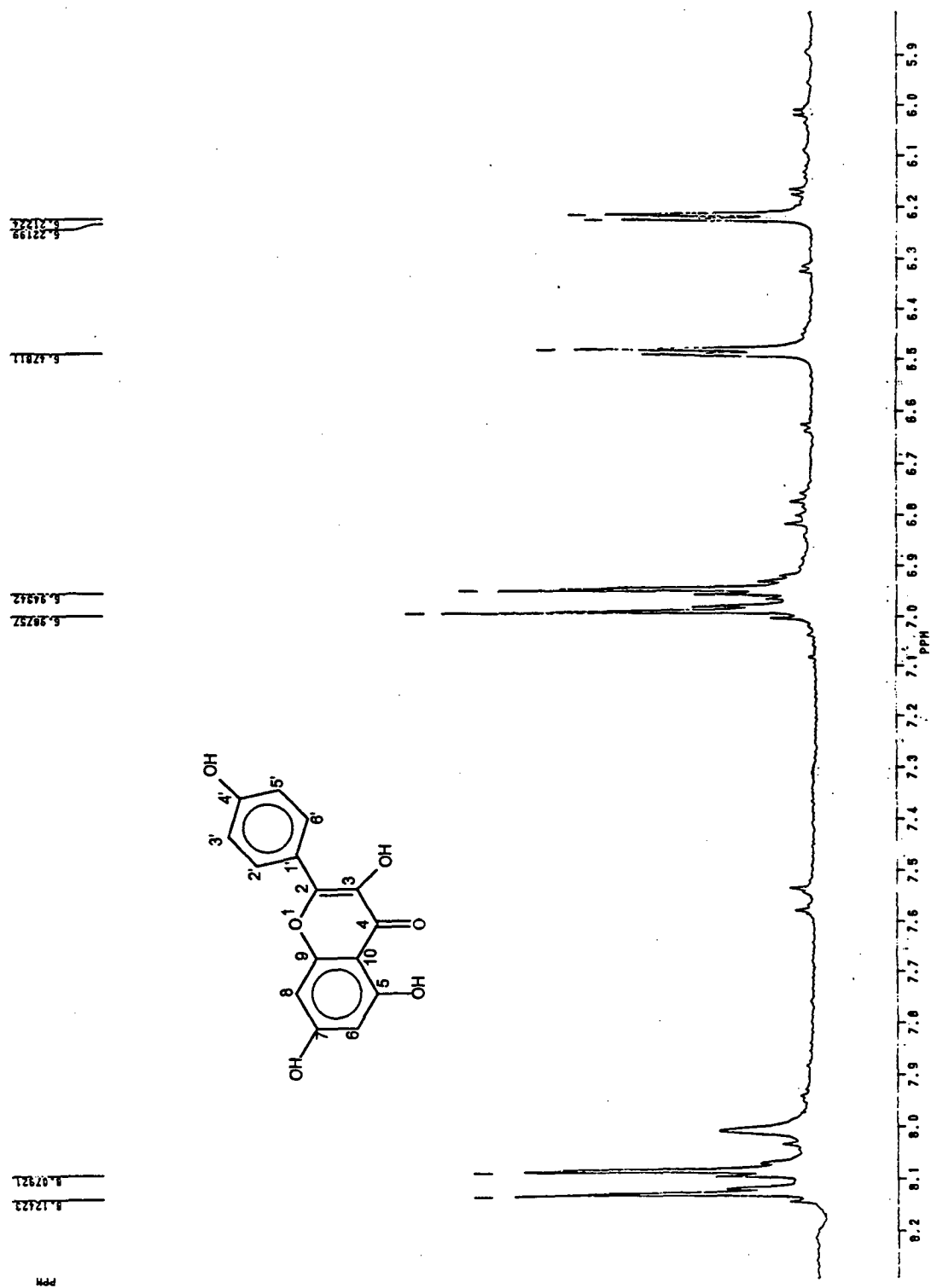


Figura 42 - Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz) de canferol em acetona- d_6 , TMS como padrão interno de referência.

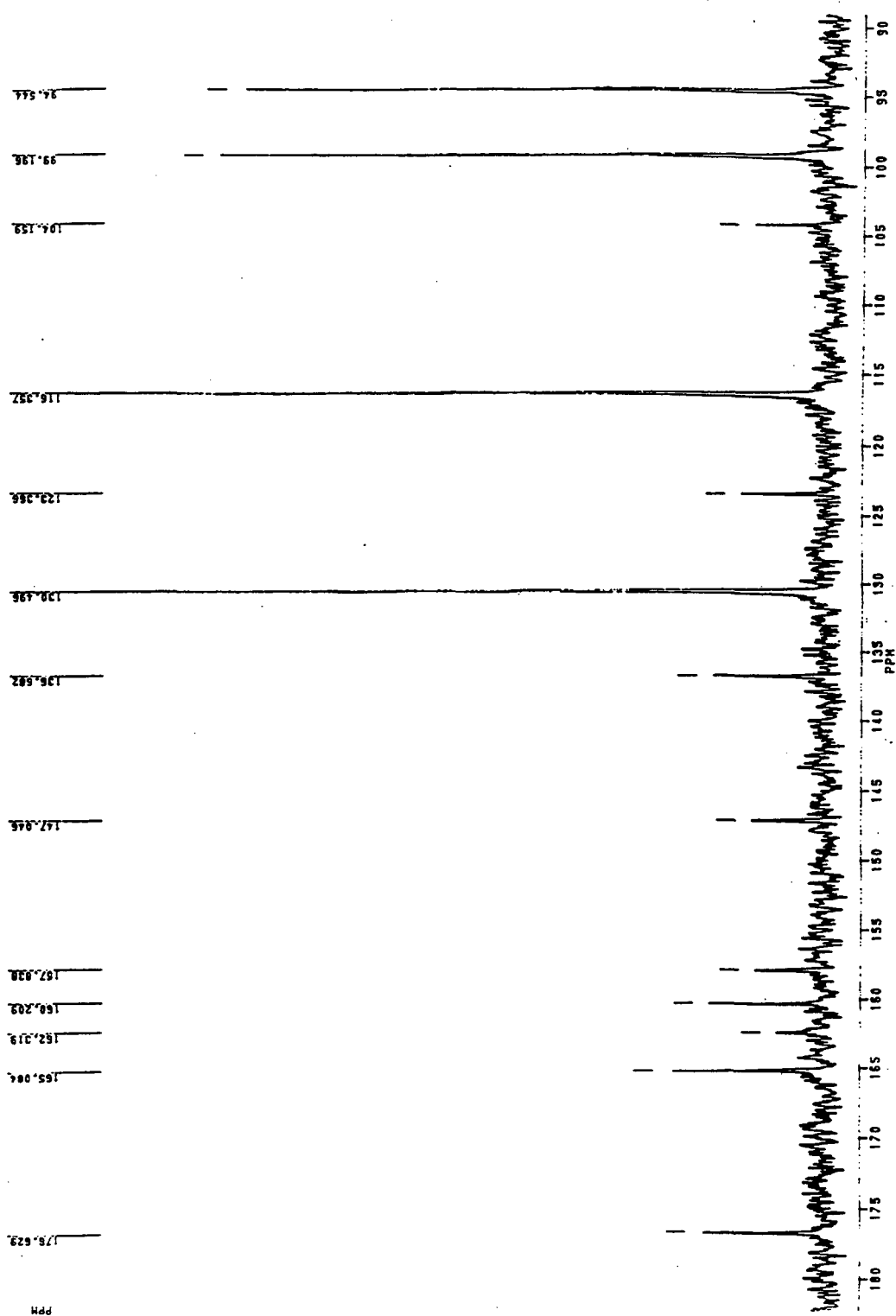


Figura 43 - Espectro de ^{13}C -RMN (50 MHz) de canferol em acetona- d_6 , TMS como padrão interno de referência.

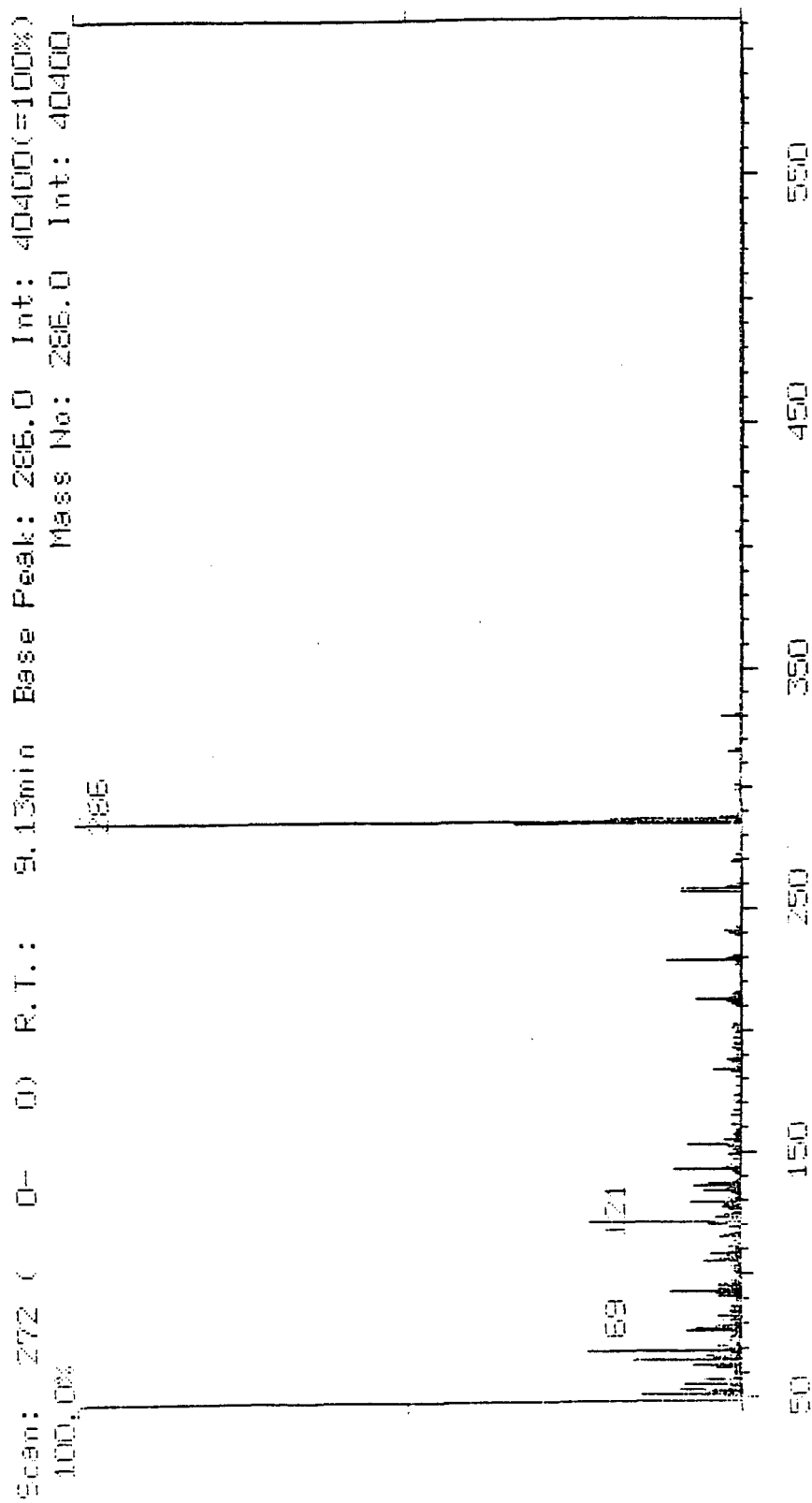
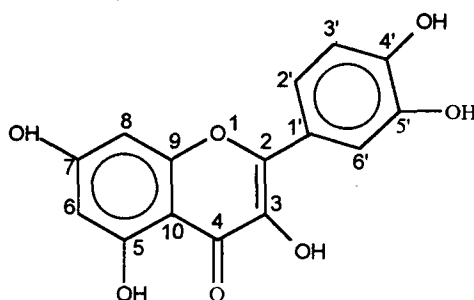


Figura 44- Espectro de Massas do canferol.

3.3.3. Quercetina (3, 4', 5', 5, 7-pentahidroxi-flavona) (GP 17/20-FVO)

A quercetina (GP 17/20-FV-O), outro flavonóide da classe flavonol (46), foi isolada da fração n-butanólica (Materiais e Métodos p. 130-131) de frondes verdes de outono. Apresentou-se como um cristal de coloração amarela, solúvel em acetona e metano com ponto de fusão 312-14°C. Foi identificada por comparação de seus dados espectrais de $^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$ e Massas com uma amostra autêntica e com dados da literatura.⁹⁴⁻⁹⁶



(46)

A Tabela 10 mostra a atribuição dos sinais de $^1\text{H-RMN}$ e de $^{13}\text{C-RMN}$ para a quercetina em acetona deuterada, TMS como padrão interno de referência.

Tabela 10 - Dados de $^1\text{H-RMN}$ (200 MHz) e de $^{13}\text{C-RMN}$ (50 MHz) da quercetina em acetona deuterada, TMS como padrão interno de referência.

C	δ_c (ppm)	δ_H (ppm)
2	148,3	
3	136,7	
4	171,0	
5	153,6	
6	99,1	6,5 (d; J=1,8 Hz)
7	165,0	
8	94,4	6,2 (d; J=1,8 Hz)
9	150,8	
10	103,6	
1'	21,4	
2'	115,7	7,8 (d; J=1,8 Hz)
3'	145,8	
4'	150,4	
5'	116,2	7,0 (d; J=8,1 Hz)
6'	118,8	7,7 (q; J=1,8; 8,1 Hz)

A Figura 45 mostra o espectro no IV (pastilha de KBr), com bandas similares ao espectro do canferol, indicando esqueleto flavonoídico. O espectro de ^1H -RMN (200 MHz), (fig.46) é bastante parecido com o espectro de canferol (fig. 42) porém apresenta mais uma substituição no anel aromático, a qual se observa através do desaparecimento do sinal referente ao próton H-3'. Isso pode ser comprovado pelo espectro de ^{13}C -RMN (50 MHz) (fig. 47) com o surgimento do sinal em 145,8 ppm característico de carbono oxigenado.

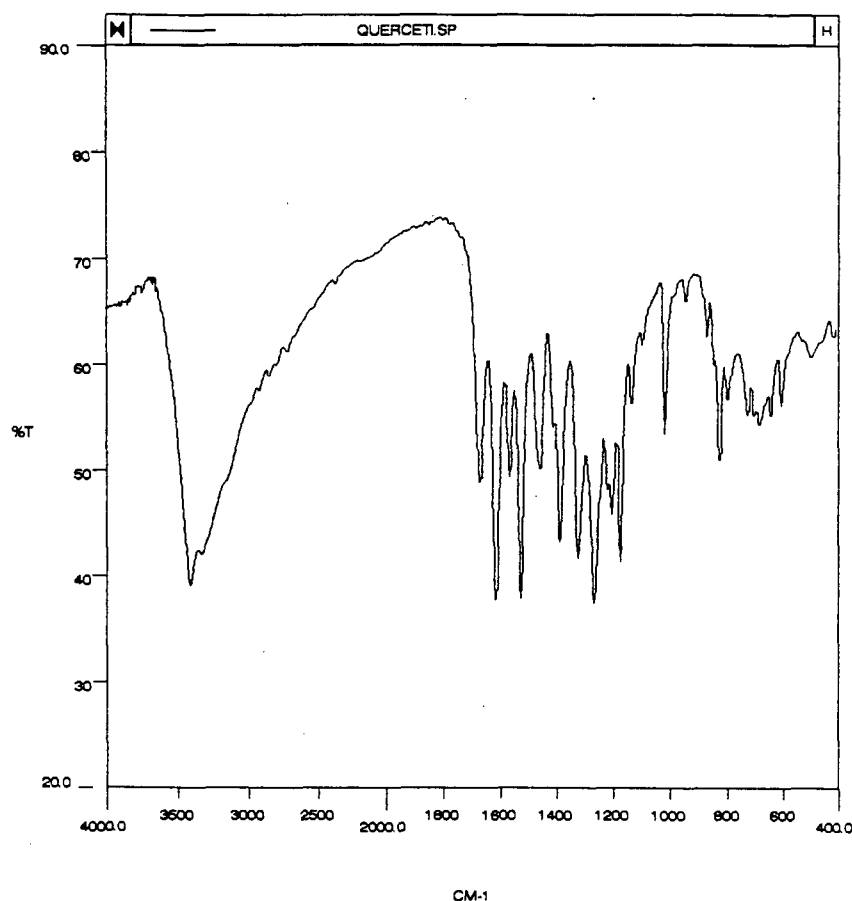


Figura 45 - Espectro no Infravermelho de quercetina em pastilha de KBr.

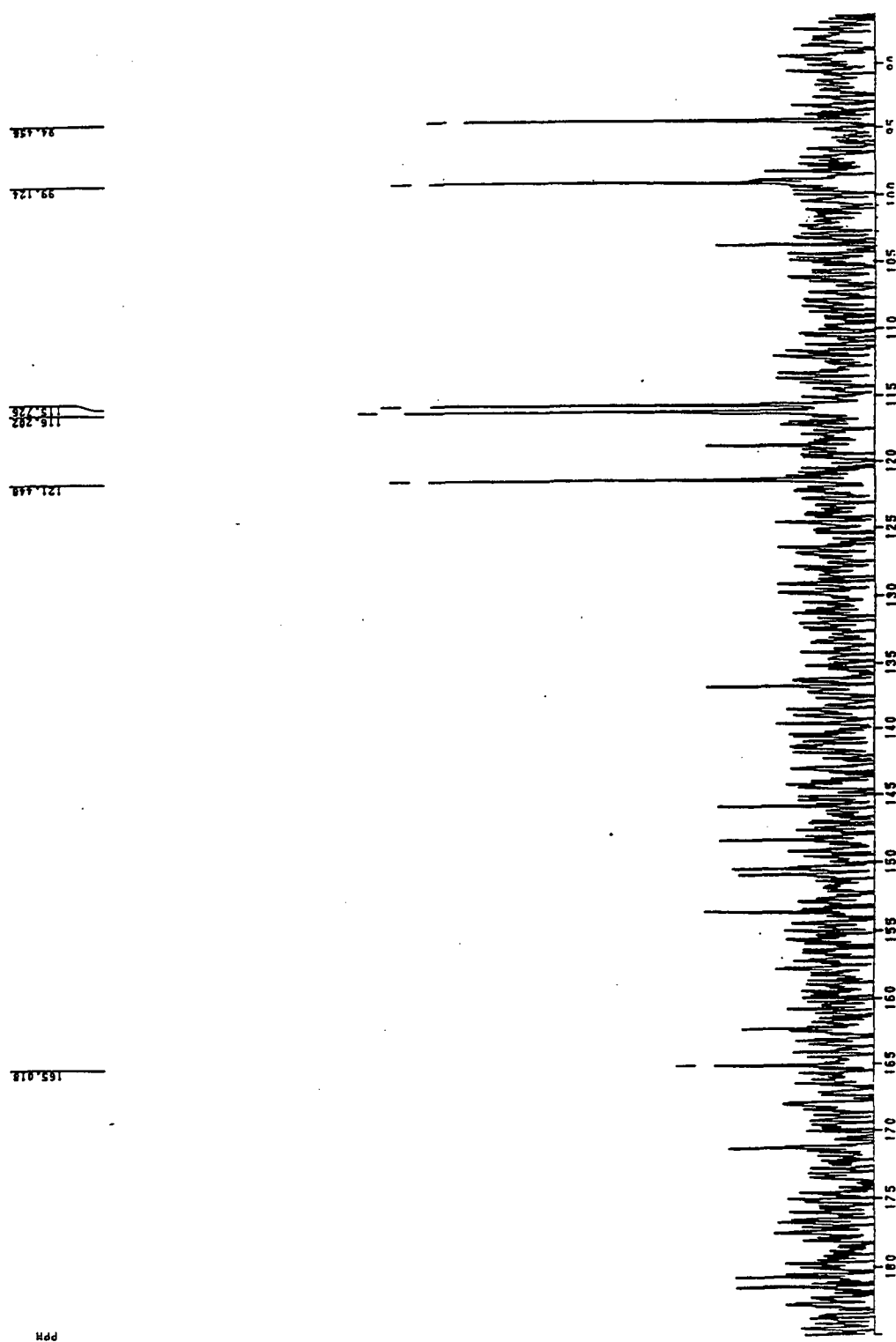


Figura 47 - Espectro de ^{13}C -RMN (50 MHz) de quercetina em acetona- d_6 , TMS como padrão interno de referência.

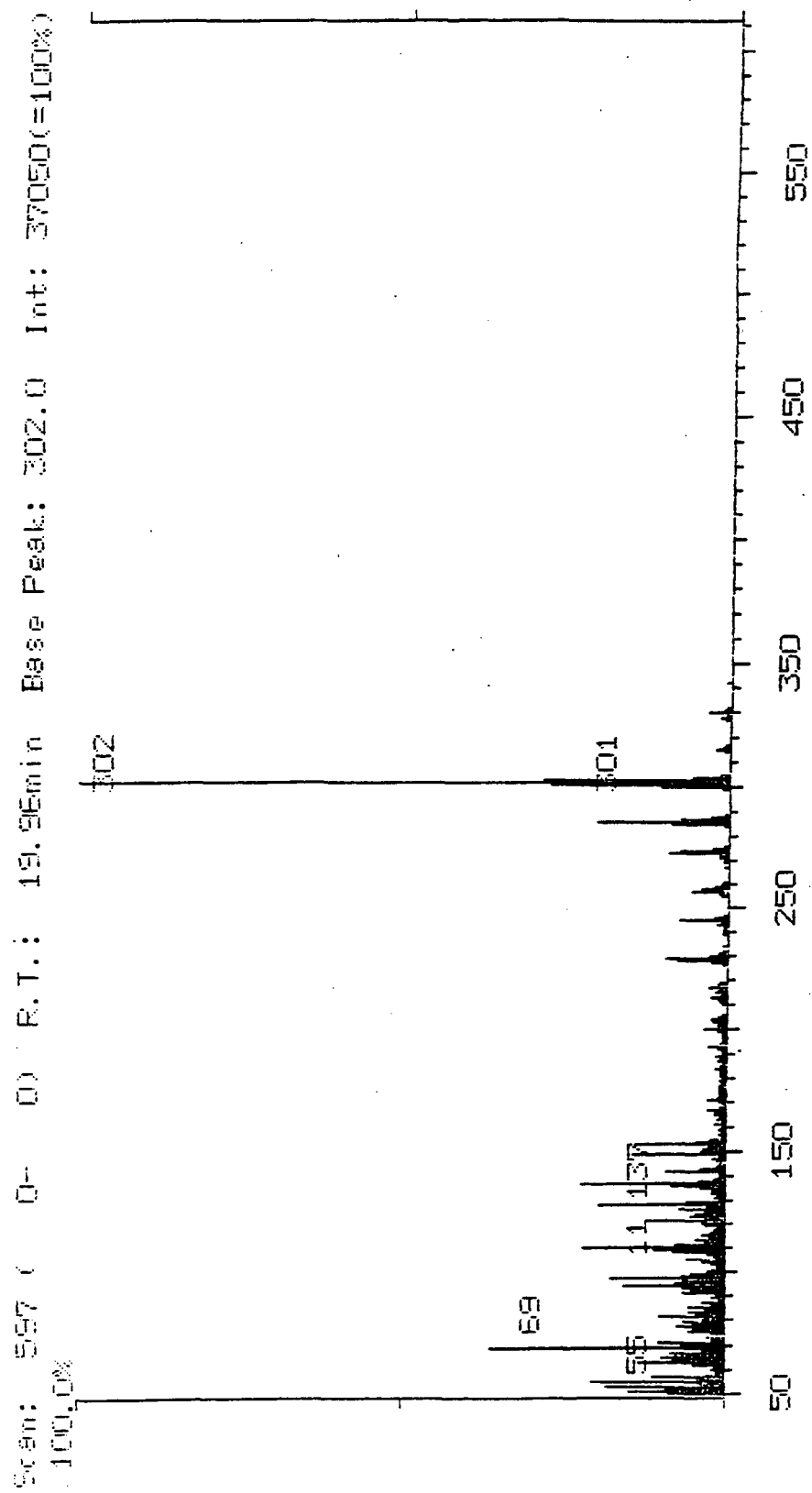


Figura 48- Espectro de Massas de quercetina.

3.4 - Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana do extrato hidro-alcoólico (**aq. EtOH**), das frações n-Hexano (**Hex**), Hexano/Diclorometano (**Hex/DCM**), Acetato de Etila (**AcOEt**), Metanol (**MeOH**) e dos compostos puros **catequina** e **ácido acetil aleuritólico** todos obtidos da casca de *Croton urucurana*, foram testados contra *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium* e a Concentração Inibitória Mínima (MIC) é mostrada na Tabela 11.

Tabela 11 - Concentração Inibitória Mínima (MIC) em mg/mL para o extrato hidroalcoólico, frações e compostos isolados da casca do caule de *C. urucurana*.

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
	mg/mL	mg/mL
Extr.aq. EtOH	2,0	5,0
Fr. Hex	3,5	6,0
Fr. Hex/DCM	0,8	4,0
Fr. AcOEt	4,0	4,0
Fr. MeOH	5,0	5,0
Catequina	1,0	1,0
Ác. Acetil Aleuritólico	0,1	0,1

A análise da Tabela 11 mostra que o extrato **aq. EtOH** e as frações **Hex** e **Hex/DCM** exibiram melhor atividade contra *S. aureus* que contra *S. typhimurium*. O maior efeito inibidor foi observado para a fração Hex/DCM (0,8 mg/mL). *S. typhimurium* foi resistente ao extrato hidro-alcoólico e a todas as frações num intervalo de 4 a 6 mg/mL. Os resultados obtidos com os dois compostos puros mostraram que a catequina, isolada da fração AcOEt, é dez vezes menos ativa que o ácido acetil aleuritólico, isolado da fração Hex/DCM contra *S. aureus* e *S. typhimurium*. É interessante observar que, considerando a relação entre concentração e atividade do ácido acetil aleuritólico isolado da fração Hex/DCM, torna-se claro que deverá existir outro (s) compostos (s) nesta fração com boa atividade contra *S. aureus*. A fração Hex/DCM deverá ser submetida a novos estudos, na tentativa de se isolar outros compostos, que deverão ser testados quanto á atividade antibacteriana⁹⁷.

3.5. Atividade antinociceptiva

Existem alguns critérios que devem ser observados quando se estuda uma planta do ponto de vista químico-farmacológico.

O primeiro, é observar que entre as indicações dadas na medicina popular exista alguma relacionada com os estudos farmacológicos que se pretende efetuar de forma a orientar o "screening" farmacológico do extrato.

O segundo, é obter métodos simples para localizar e isolar os compostos bioativos e determinar se esses compostos são responsáveis pela total atividade dos extratos.

Estes objetivos nem sempre são fáceis de atingir, porque as plantas geralmente apresentam mais de um composto ativo, e alguns deles em proporções muito pequenas podendo não ser detectados.

Por outro lado é necessário verificar se os compostos encontrados são ativos quando administrados por via oral, tal como usados na medicina popular.

Desta forma, o efeito antinociceptivo de *C. urucurana* como descrito na medicina popular foi analisado através de dois modelos de dor: Modelo de dor induzido pelo Ácido Acético e Modelo de dor induzido pela Formalina com o intuito de avaliar o potencial de atividade analgésica.

Os resultados (tab 12) demonstram que o extrato bruto, as frações semipurificadas HEX/DCM, AcOEt e MeOH (1-200 mg/Kg, i.p.), administradas 30 min. antes do experimento, inibiram de forma significativa as contorções abdominais provocadas pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos.

Tabela 12 - Efeito antinociceptivo do extrato bruto e frações semipurificadas isolados de *C. urucurana* no modelo de dor induzido pelo Ácido acético.

Frações	DI ₅₀ (mg/kg) ^a	IM (%) ^b
Extrato bruto	20,0 (9,3-42,6)	97,0 ±3
Fração HEX	*	*
Fração HEX/DCM	36,0 (28,1-46,5)	94,0 ±3
Fração AcOEt	20,5 (13,4-31,2)	78,0 ±4
Fração MeOH	12,2 (10,3-14,5)	99,9 ±1

^aDI₅₀ = Dose inibitória a 50 %.

^bIM = Inibição Máxima.

* Fracamente ativa

A Tabela 13 mostra que os compostos catequina, galocatequina, ácido acetil aleurítico e β -sitosterol-glicosídeo (3-60 mg/kg, i.p.), administrados 30 min antes dos experimentos, da mesma maneira que o extrato bruto e as frações semipurificadas, inibiram, de maneira significativa, as contorções abdominais.

Tabela 13 - Efeito antinociceptivo dos compostos puros isolados de *C. urucurana* no modelo de dor induzido pelo ácido acético.

Composto	DI ₅₀ (mg/kg) ^a	IM (%) ^b
Catequina	26,3 (22,9-30,2)	65,0±5
Galocatequina	12,0 (7,0-16,1)	75,0 ±3
Ácido acetil aleurítico	21,6 (15,0-31,2)	76,0 ±5
β -sitosterol-glicosídeo	28,7 (23,9-33,2)	81.0 ±4

^aDI₅₀ = Dose Inibitória a 50%.

^bIM = Inibição Máxima.

Os esteróides β -sitosterol e stigamasterol já foram testados anteriormente por nosso grupo e mostraram significativo efeito analgésico⁹⁸.

Com relação ao efeito analgésico da catequina foi possível observar que de 28,6 g da fração AcOEt foi isolado 412,9 mg de catequina, que representa 1/69 do extrato total (424 g).

A dose inibitória a 50 % (DI₅₀) para a fração AcOEt correspondeu a 20,5 mg/kg (tab. 12); para a catequina, a dose inibitória a 50 % (DI₅₀) foi de 26,3 mg/kg (tab. 13). Isto indica claramente a existência de um ou mais compostos que são mais ativos que a catequina.

A galocatequina (45,9 mg), que representa 1/623 do extrato total, mostrou uma atividade de 12 mg/kg (tab. 13), somente o dobro da fração AcOEt (tab. 12). Isto mostra mais uma vez, que esta fração contém um ou mais compostos, os quais são mais ativos e não foram detectados, ou então, a existência de um efeito sinérgico desconhecido. Este problema tem sido observado em nosso grupo durante o estudo de outras plantas.

O ácido acetil aleurítico, que mostrou uma dose inibitória a 50 % (DI₅₀) de 21,6 mg/kg, também não explica a atividade mostrada pelo extrato.

E finalmente, com relação ao β -sitosterol-glicosídeo (18 mg), isolado da fração MeOH, obteve-se uma dose inibitória a 50 % (DI₅₀) de 28,7 mg/kg a qual novamente não justifica a total atividade mostrada pelo extrato.

Os compostos catequina, galocatequina, ácido acetil aieuritólico e β -sitosterol-glicosídeo também foram testados no modelo de Dor induzida pela injeção intraplantar de formalina.

Os resultados apresentados na Tabela 14 demonstram que os compostos catequina, ácido acetil aieuritólico e β -sitosterol-glicosídeo causaram efeito analgésico significativo quando avaliados na dor neurogênica (primeira fase) e inflamatória (segunda fase), induzidas pela injeção intraplantar de formalina.

A galocatequina, foi efetiva em inibir ambas as fases da dor induzida pela formalina, sendo que na primeira fase não foi possível calcular sua DI_{50} , pois sua IM (%) foi de $47,0 \pm 4$.

Na segunda fase sua IM (%) foi de $62,0 \pm 5$ e sua DI_{50} (mg/kg) foi de 15,1 (8,3-27,3).

Tabela 14 - Efeito analgésico da catequina, galocatequina, ácido acetil aieuritólico e β -sitosterol-glicosídeo isolados de *C. urucurana* no modelo de dor causado pela formalina via intra-peritoneal.

Composto	primeira fase		segunda fase	
	DI_{50} (mg/Kg)	IM (%)	DI_{50} (mg/Kg)	IM (%)
catequina	42,0 (36,9-47,8)	$58,0 \pm 4$	31,0 (23,2-41,5)	$72,0 \pm 3$
galocatequina	-	$47,0 \pm 4$	15,1 (8,3-27,3)	$62,0 \pm 5$
ácido acetil aieuritólico	64,7 (42,8-97,8)	$51,0 \pm 4$	30,4 (22,8-40,6)	$97,0 \pm 2$
β -sitosterol-glicosídeo	14,2 (9,6-21,1)	$61,0 \pm 3$	22,2 (22,3-39,4)	$71,0 \pm 10$

Cada grupo representa a média de 6-8 animais.

Os critérios químico-farmacológicos descritos neste trabalho demonstram importantes propriedades antinociceptivas do extrato bruto, das frações semipurificadas e compostos puros isolados das cascas de *C. urucurana*⁹⁹.

No modelo de contorções induzidas pelo ácido acético, que tem relativamente pouca especificidade porém fácil observação, o extrato bruto, as frações semipurificadas e os compostos puros isolados de *C. urucurana*, apresentam efeito antinociceptivo significativo quando administrados 30 min antes, por via intraperitoneal. No entanto, é importante notar que enquanto no caso da fração HEX/DCM o composto identificado poderia explicar a atividade do extrato, no caso das frações AcOEt e MeOH os compostos isolados não explicam a atividade total observada. Este fato nos sugere a existência de outro ou outros compostos

mais importantes, presentes em *C. urucurana*, que são mais ativos, mas não foram isolados, ou que existe um efeito sinérgico especial que requer pesquisa posterior.

A injeção intraplantar de formalina, na pata posterior do animal, induz dor caracterizada por lambidas, mordidas e sacudidas. Duas fases de dor podem ser caracterizadas nesse modelo: uma fase inicial, que ocorre nos primeiros 5 min após injeção do irritante (formalina) e uma fase tardia persistente que vai dos 20 aos 30 min após a injeção do irritante. Os resultados obtidos, mostram que os compostos isolados de *C. urucurana* foram efetivos em inibir ambas as fases da dor induzida por formalina. Também é importante determinar que compostos são ativos quando administrados oralmente, como na medicina popular, sob forma de chás e infusões para obter uma real avaliação científica do uso popular desta planta. Novos testes estão sendo feitos, a fim de esclarecer o (s) mecanismo de ação antinociceptivo, dos compostos isolados dessa espécie.

3.6 - Atividade Alelopática

Geralmente a atividade alelopática é avaliada por meio de ensaios de germinação e de crescimento, podendo utilizar sementes de plantas silvestres ou culturas.

As plantas nativas frequentemente têm um perfil de germinação mais longo, para assegurar que algumas das sementes germinem em condições favoráveis, tendo em vista as variações climáticas. Já as culturas, têm a sua estratégia de germinação alterada para uma germinação maciça por melhoramento genético e facilidade de manejo.

3.6.1. - Bioensaios de Germinação

3.6.1.1. *Clidemia hirta* (L.) D. Don

Os dados obtidos dos bioensaios preliminares, realizados com os extratos aquosos de *G. pectinata* por CORTIZO ⁷⁷ foram submetidos ao modelo matemático proposto por AN et al. ⁴⁶ e os resultados são apresentados a seguir:

Efeito dos extratos aquosos (8,66%) de rizoma (RIZ), fronde jovem (FJ), fronde verde (FV) e fronde seca (FS), de *G. pectinata* sobre sementes de *C. hirta* em três estações do ano.

Ensaio 1: Primavera (frondes e rizoma coletados em 8/12/94 e sementes de *C. hirta* coletadas na mesma estação).

Na Figura 49 observa-se o comportamento germinativo de *C. hirta*. Todos os extratos de *G. pectinata* provocaram um nítido retardamento na germinação, porém, aumentaram significativamente o número de sementes germinadas (tab. 15). O extrato aquoso de FJ mostrou o maior retardo, iniciando a germinação 14 dias após o controle, enquanto o extrato aquoso de FV apresentou o maior percentual de sementes germinadas (89%).

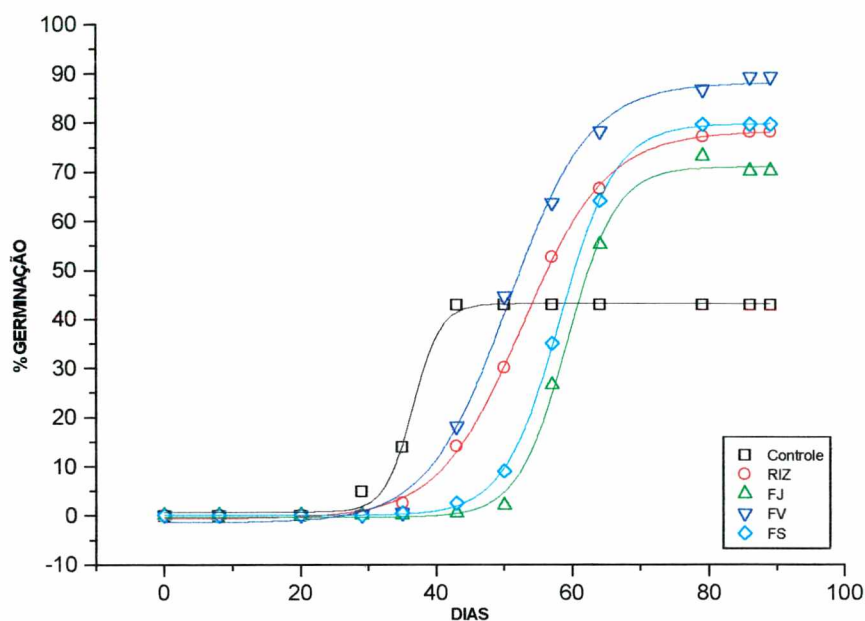


Figura 49 - Ação dos extratos aquosos (RIZ, FJ, FV, FS) de *G. pectinata* (Primavera) à 8,66% sobre sementes de *C. hirta* (Primavera), durante 89 dias.

Tabela 15 - Percentagens de germinação de *C. hirta* submetida a bioensaios em três estações do ano sobre extratos aquosos de *G. pectinata*. Análise de variância e teste LSD.

Época do ano		Primavera	Outono	Inverno
Espécie	Sementes →	<i>Clidemia hirta</i>	<i>Clidemia hirta</i>	<i>Clidemia hirta</i>
<i>G. pectinata</i>	Extratos ↓			
	Fronde Jovem	70,0 b	61,5 ab	79,5 a
	Fronde Verde	89,0 c	77,5 bc	81,5 a
	Fronde Seca	79,5 bc	71,0 bc	77,5 a
	Rizoma	78,0 bc	87,0 cd	78,0 a
	Controle	43,0 a	54,0 a	71,0 a

Números seguidos de mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si a nível de 5 %.

Ensaio 2: Outono (frondes e rizoma coletados em 24/3/94 e sementes de *C. hirta* coletadas na mesma estação).

Da mesma forma como na primavera, as sementes submetidas aos extratos aquosos apresentaram um estímulo da germinação com relação ao controle (tab. 15) mas somente os extratos de FJ e FV retardaram a germinação em 22 e 15 dias, respectivamente (fig. 50).

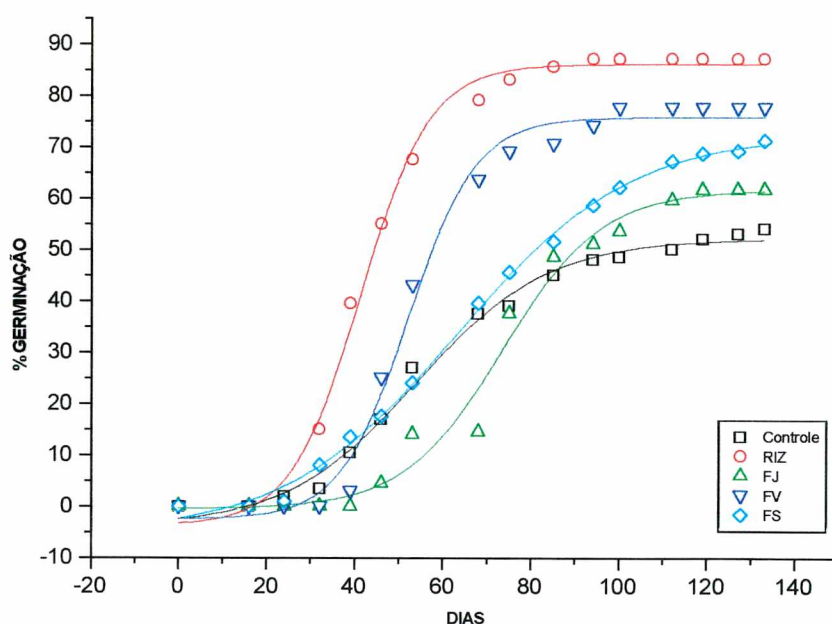


Figura 50 - Ação dos extratos aquosos (RIZ, FJ, FV, FS) de *G. pectinata* (Outono) à 8,66% sobre sementes de *C. hirta* (Outono), durante 133 dias.

Ensaio 3: Inverno (Fronde e rizoma coletados em 2/6/94 e sementes de *C. hirta* coletadas em 24/3/94).

O comportamento germinativo de *C. hirta* no inverno (fig. 51) foi similar ao da primavera e outono, embora a percentagem de sementes germinadas no controle tenha sido superior (tab. 15). As sementes submetidas aos extratos aquosos de FJ e FV iniciaram sua germinação 10 dias após o controle.

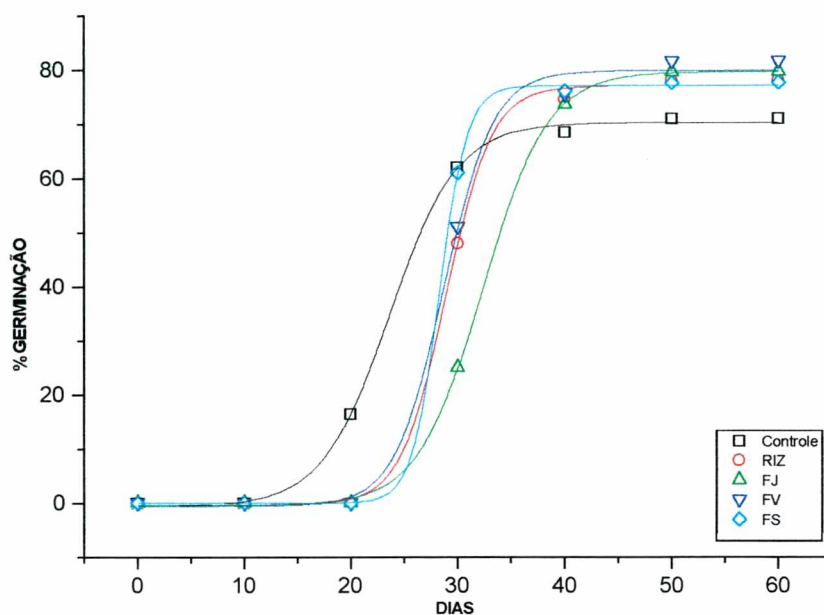


Figura 51 - Ação dos extratos aquosos (RIZ, FJ, FV, FS) de *G. pectinata* (Inverno) à 8,66% sobre sementes de *C. hirta* (Outono), durante 59 dias.

Analisando-se os resultados obtidos pôde-se observar que todos os extratos aquosos apresentaram um comportamento bastante semelhante nas três estações ensaiadas.

A variação observada no controle mostra que as sementes apresentam uma dormência e que portanto os efeitos alelopáticos na natureza desta espécie são efetivos apenas para as estações da primavera e outono. Esta dormência é possivelmente quebrada pela ação de aleloquímicos concentrando a germinação, o que pode representar para *C. hirta* uma perda do estoque de sementes que naturalmente constituiriam um banco de sementes¹⁰⁰ para germinação futura.

Nos diferentes extratos aquosos ensaiados nas três estações pôde também ser observado um nítido mecanismo de retardo no tempo requerido para a germinação o que em termos ecológicos pode resultar em menor probabilidade do estabelecimento da plântula⁴².

O estímulo causado nestas circunstâncias não necessariamente confere uma vantagem para a espécie alvo em condições naturais.

Do ponto de vista sazonal, como observado para *Pteridium aquilinum*^{67,68}, também *G. pectinata* manteve a produção de aleloquímicos nas partes vegetais estudadas.

Com base nos resultados obtidos com os extratos aquosos e prosseguindo na investigação do princípio responsável pelos efeitos observados, foram realizados bioensaios com as frações n-butanólicas. Os resultados obtidos estão mostrados abaixo:

Efeito das frações n-butanólicas de Frondes Jovens (FJ) e Frondes Verdes (FV) de *G. pectinata* nas estações da Primavera, Outono e Inverno sobre sementes de *C. hirta*.

Ensaio 4 : Efeito das frações n-butanólicas de Frondes Jovens (FJ) e Frondes Verdes (FV) (3,84 %) nas estações da primavera, outono e inverno sobre sementes de *C. hirta* coletadas na primavera.

Para ambas as frondes e estações ensaiadas pôde ser observado um nítido estímulo (caracterizado pela quebra de dormência) na germinação de *C. hirta* (fig. 52) sendo mais significativo para os extratos de FJ e FV de primavera (tab. 16).

Tabela 16 - Percentagens de germinação de *C. hirta* submetida a frações n-butanólicas de *G. pectinata* (3,84 %) em três estações do ano. Teste de comparação de duas proporções sobre duas amostras independentes.

Época do ano		Primavera	Outono	Inverno
Espécie	Sementes →	<i>Clidemia hirta</i>	<i>Clidemia hirta</i>	<i>Clidemia hirta</i>
<i>G. pectinata</i>	Extratos ↓			
	Controle	45,0 a	-	-
	FJ	87,5 bc	81,0 bc	84,0 bc
	FV	87,5 bc	84,5 bc	82,5 bc

Números seguidos de mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si a nível de 5 %.

* As sementes de *C. hirta* usadas neste bioensaio foram coletadas na Primavera.

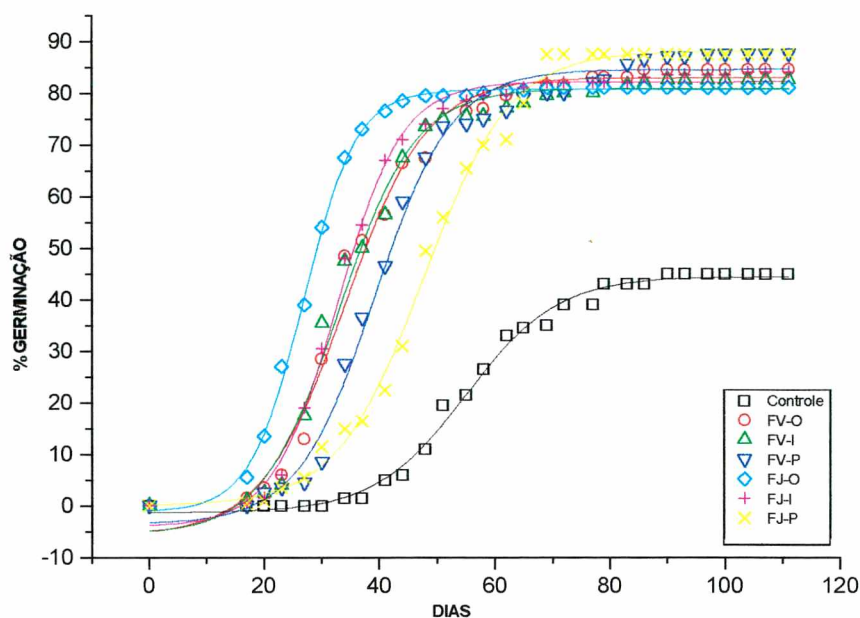


Figura 52 - Ação das frações n-BuOH de FJ e FV de *G. pectinata* (3,84%) de Primavera, Outono e Inverno sobre sementes de *C. hirta* de Primavera, durante 100 dias.

Neste bioensaio, pôde ser observado um comportamento de antecipação com relação ao tempo de germinação, contrário ao observado nos extratos aquosos. A taxa de germinação final, porém, apresentou o mesmo perfil observado nos extratos aquosos. Novamente fica caracterizada uma alteração do comportamento germinativo natural desta espécie pela interferência de substâncias químicas (possíveis agentes alelopáticos) ¹⁰¹.

Prosseguindo na busca do princípio ativo responsável pelos resultados até então observados, procedeu-se a investigação fitoquímica da fração n-BuOH de frondes verdes de outono (FV-O) que rendeu dois flavonóides: canferol e quercetina, dos quais testou-se a mistura e cada um separadamente.

Efeito da mistura de flavonóides (canferol + quercetina) e de quercetina e canferol sobre sementes de *C. hirta*.

Ensaio 5: Efeito da mistura de flavonóides (canferol/quercetina, C-Q 50:50; 0,48%) sobre sementes de *C. hirta* coletadas na primavera e no inverno.

Neste bioensaio pôde ser observado uma antecipação de 17 dias em relação ao controle. (fig. 53) e um estímulo de 104% para as sementes de *C. hirta* coletadas na primavera e 65,5% para o inverno (tab. 17).

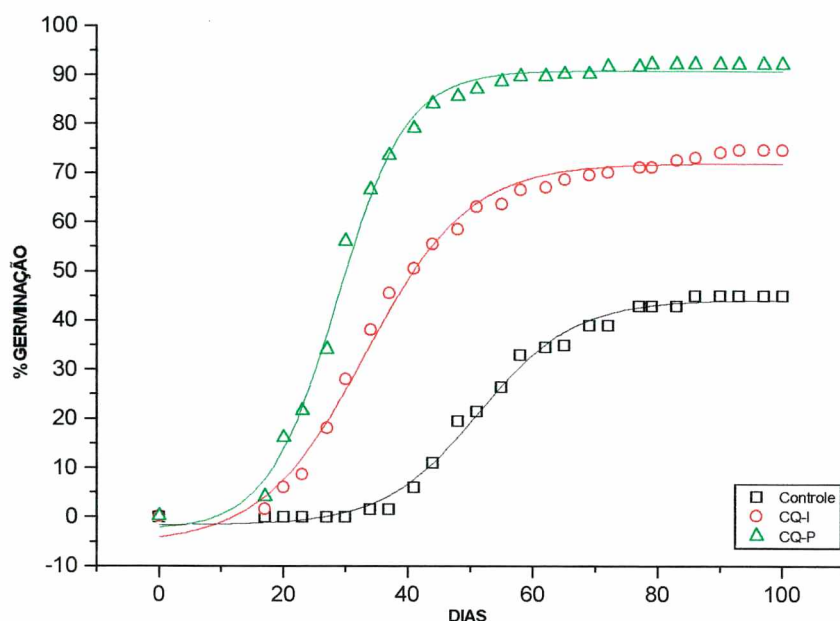


Figura 53 - Efeito da mistura (canferol/quercetina, CQ) à 0,48% sobre sementes de *C. hirta* coletadas no inverno (CQ-I) e primavera (CQ-P). Para o controle foram usadas sementes coletadas na primavera.

Tabela 17 - Percentagem de germinação de *Clidemia hirta* coletadas na primavera e inverno submetidas a mistura de flavonóides (0,48%). Teste de comparação de duas proporções sobre duas amostras independentes ao nível de significância 5%.

Controle	CQ-Inverno	CQ-Primavera
45,0 a	74,5 b	92,0 c

Ensaio 6: Efeito da quercetina nas concentrações: $1,25 \times 10^{-1}$ Molar, $1,58 \times 10^{-2}$ Molar, $7,90 \times 10^{-3}$ Molar e $9,7 \times 10^{-4}$ Molar sobre sementes de *C. hirta* coletadas no verão (sementes desta estação têm a taxa final de germinação similar à primavera).

Neste bioensaio (fig. 54, tab. 18) pôde ser observado que para as três menores concentrações houve estímulo na germinação de *C. hirta*. Este, porém, foi inferior àquele observado para a mistura dos dois flavonóides.

Com relação ao tempo (dias) requerido para a germinação não houve mudanças quando comparado ao controle. Porém, se observou que o número de sementes germinadas diariamente (submetidas à quercetina), foi superior, especialmente para a concentração de $1,58 \times 10^{-2}$ Molar. Estes resultados diferem do observado para a mistura de flavonóides, onde houve uma antecipação de 17 dias comparado ao controle.

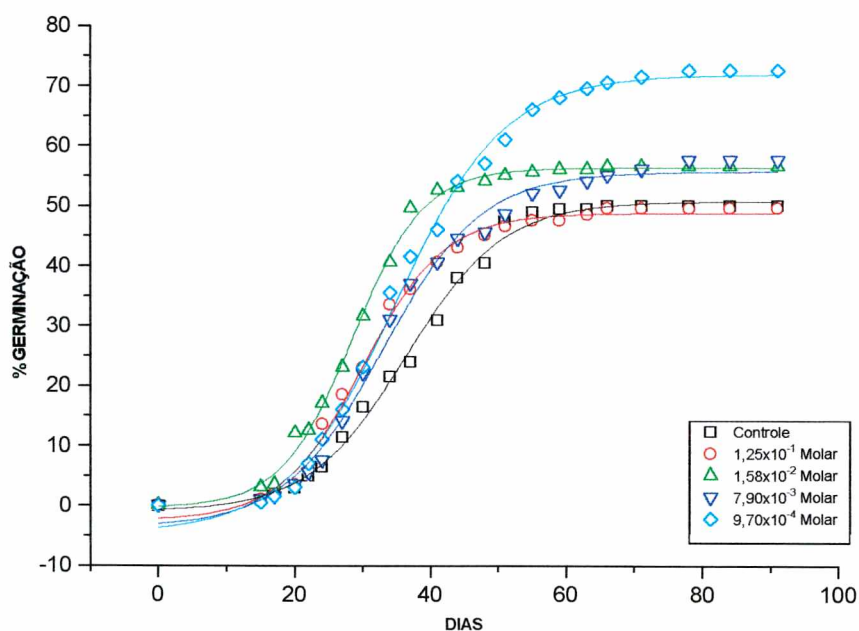


Figura 54 - Efeito da quercetina sobre sementes de *C. hirta* coletadas no verão.

Tabela 18 - Percentagem de germinação de *Clidemia hirta* coletadas no verão submetidas a quercetina em diferentes concentrações.

Controle	$1,25 \times 10^{-1}$ Molar	$1,58 \times 10^{-2}$ Molar	$7,90 \times 10^{-3}$ Molar	$9,70 \times 10^{-4}$ Molar
50,0	49,5	56,5	57,5	72,5

Ensaio 7: Efeito do canferol ($9,7 \times 10^{-4}$ Molar) sobre sementes de *C. hirta* de verão.

Neste bioensaio pôde ser observado que o canferol apresentou um perfil de germinação bastante similar ao apresentado pelo controle (fig. 55). Cabe ressaltar que a concentração usada foi a mesma em que a quercetina apresentou o maior estímulo na germinação.

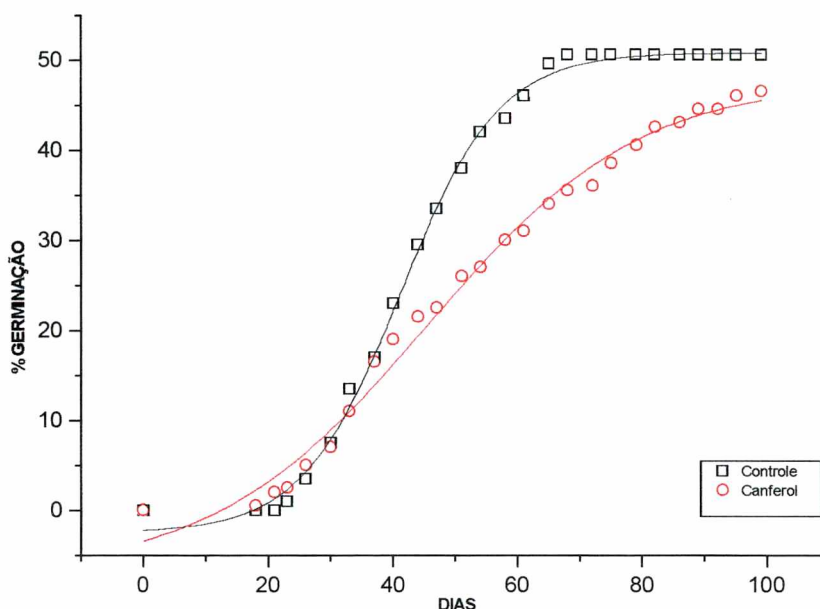


Figura 55 - Efeito do canferol ($9,7 \times 10^{-4}$ Molar) sobre sementes de *C. hirta*.

Considerando o efeito de cada flavonóide em separado e na mistura pôde-se observar que : a quercetina estimulou a germinação (45,0%) para a menor concentração ensaiada; o canferol apresentou um perfil similar ao controle; e a mistura dos dois flavonóides estimulou a germinação em 104,0% para sementes de *C. hirta* coletadas na primavera e 65,5% para as de inverno.

Logo, o estímulo observado com a mistura dos flavonóides, pode ser decorrente de um efeito sinérgico proveniente da combinação de algumas classes de compostos⁴⁰. Como tais combinações de compostos agem a nível celular ainda não se tem conhecimento⁴⁰.

Prosseguindo na avaliação do potencial de atividade biológica dos compostos puros foram realizadas modificações estruturais na quercetina na procura de um conhecimento da relação estrutura-atividade deste composto em ensaios de germinação com *C. hirta*.

Efeito da quercetina acetilada e metilada sobre sementes de *C. hirta* coletadas no verão.

Ensaio 8: Efeito da quercetina acetilada nas concentrações: $1,58 \times 10^{-2}$ Molar, $7,90 \times 10^{-3}$ Molar, $9,70 \times 10^{-4}$ Molar e $5,0 \times 10^{-4}$ Molar sobre sementes de *C. hirta* de verão.

Neste bioensaio pôde ser observado que com o aumento da concentração da quercetina acetilada houve um aumento na taxa de germinação final de *C. hirta* (fig. 56). Estes resultados são contrários aos observados para a quercetina que na menor concentração ($9,7 \times 10^{-4}$ Molar) resultou em uma germinação de 72,5%, isto é, a maior taxa de germinação final.

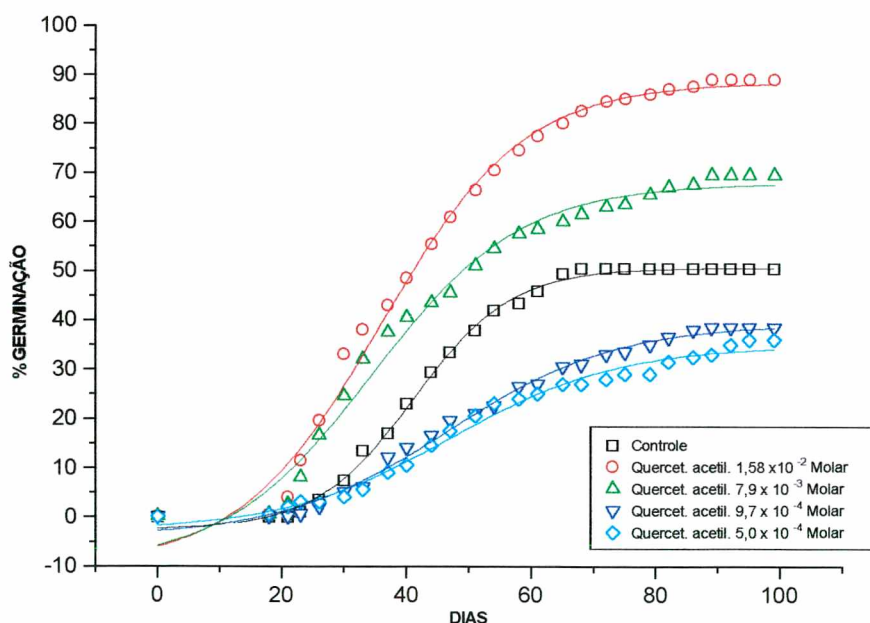


Figura 56 - Efeito da quercetina acetilada sobre sementes de *C. hirta* de verão.

Ensaio 9: Efeito da quercetina metilada nas concentrações: $1,58 \times 10^{-2}$ Molar, $7,90 \times 10^{-3}$ Molar, $9,70 \times 10^{-4}$ Molar e $5,0 \times 10^{-4}$ Molar sobre sementes de *C. hirta* de verão.

Neste bioensaio pôde ser observado um estímulo (17,8%) na germinação para a maior concentração ($1,58 \times 10^{-2}$ Molar), enquanto que para as concentrações menores, houve redução de até 28,7% ($5,0 \times 10^{-4}$ Molar) na germinação, quando comparada ao controle (fig. 57).

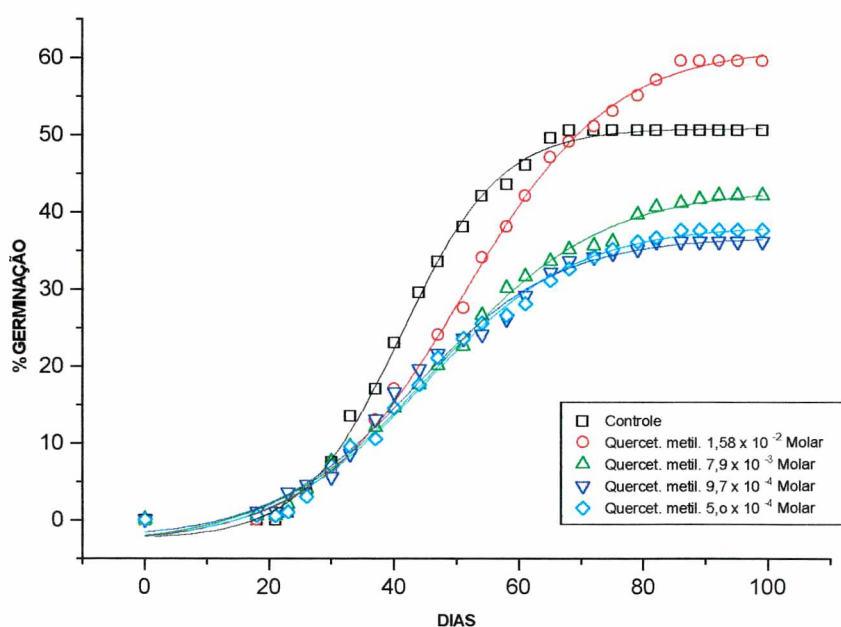


Figura 57 - Efeito da quercetina metilada sobre sementes de *C. hirta* de verão.

No bioensaio realizado com a quercetina acetilada (ensaio 8), pôde-se observar que na maior concentração ($1,58 \times 10^{-2}$ Molar) ensaiada ocorreu a maior taxa de germinação (89,0%), sendo similar ao observado com a mistura dos dois flavonóides.

Com a quercetina metilada (ensaio 9) a maior concentração ensaiada ($1,58 \times 10^{-2}$ Molar) causou um estímulo de apenas 17,8%, quando comparada ao controle.

Os resultados obtidos até o momento com *C. hirta*, sugerem que os flavonóides, já isolados de outros vegetais e com atividade alelopática

comprovada⁴⁸, são ao menos parcialmente, os responsáveis pelos efeitos observados. Esses efeitos foram mais acentuados quando se testou a mistura dos dois flavonóides (canferol/quercetina), o que sugere um efeito sinérgico destes metabólitos. Efeitos similares também foram obtidos com a quercetina acetilada.

Na sequência dos experimentos, com o intuito de analisar os efeitos desses princípios ativos sobre sementes de uma cultura foram realizados ensaios com *Lactuca sativa* var. Grand Rapids, já utilizada por outros autores^{74,75}.

Inicialmente, realizou-se um bioensaio em várias concentrações.

3.6.1.2. *Lactuca sativa* var. Grand Rapids

Ensaio 10 : Efeito das frações n-butanólicas de Frondes Jovens de Outono (FJ-O) nas concentrações de 0,24%; 0,48%; 0,96 %; 1,91 %; 3,84 %; 5,76 %; 7,68 % sobre sementes de *L. sativa*, variedade Grand Rapids.

Neste bioensaio, houve um nítido retardo na germinação para todas as concentrações ensaiadas (fig. 58). A taxa de germinação final foi menor (significativa) para as concentrações acima de 0,96%(tab. 19).

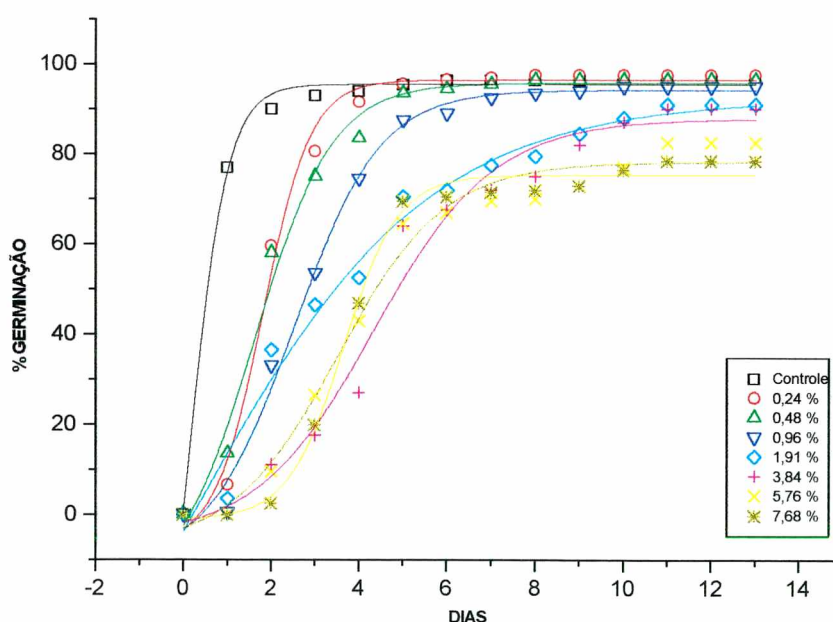


Figura 58- Efeito das frações n-BuOH de FJ-O de *G. pectinata* sobre sementes de *L. sativa* var. Grand Rapids.

Tabela 19 - Percentagens de germinação de *L. sativa* submetida a frações n-butanólicas de *G. pectinata* (frondes jovens de outono). Teste de comparação de duas proporções sobre duas amostras independentes.

Concentrações das frações (%)	controle	0,24	0,48	0,96	1,91	3,84	5,76	7,68
	96,5 a	97,5 a	96,5 a	95,0 a	91,0 b	90,0 b	82,5 c	78,0 d

Números seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si a nível de 5 %.

Com base nos resultados obtidos, fez-se a opção pela concentração intermediária de 3,84 % para os bioensaios seguintes.

Ensaio 11 :Efeito das frações n-butanólicas de Frondes Jovens (FJ) e Frondes Verdes (FV), 3,84 % nas estações da primavera, outono e inverno sobre sementes de *L. sativa* var. Grand Rapids.

Neste bioensaio, foi observado um retardo na germinação para todas as frações ensaiadas (fig. 59). A taxa de germinação diária e final foi menor para ambas as frondes e todas as estações (tab. 20), sendo mais significativa para as FJ-I.

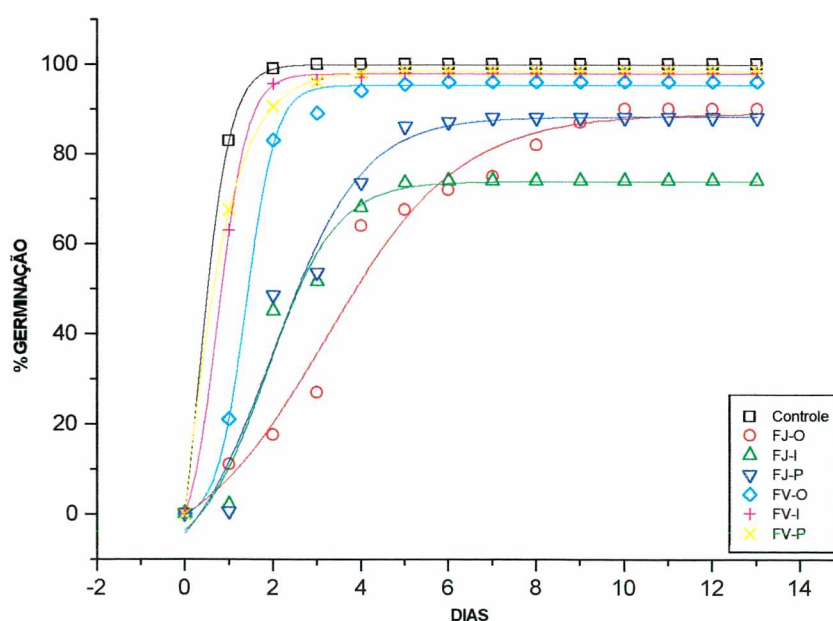


Figura 59 - Efeito das frações n-BuOH de Fj e FV de *G. pectinata* (3,84%) de primavera, outono e inverno sobre sementes de *L. sativa*, var. Grand Rapids.

Tabela 20 - Percentagens de germinação de *L. sativa* submetida a frações n-butanólicas de *G. pectinata* (3,84 %) em três estações do ano. Teste de Comparação de duas proporções sobre duas amostras independentes.

Época do ano		Primavera	Outono	Inverno
Espécie <i>G. pectinata</i>	Sementes → extratos ↓	<i>L. sativa</i>	<i>L. sativa</i>	<i>L. sativa</i>
	FJ	88,0 b	90,0 b	74,0 d
	FV	98,5 a	96,0 c	98,0 a

A percentagem de germinação do Controle foi de 100,0 % a.

Números seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si a nível de 5 %.

Ensaio 12: Efeito do canferol ($1,67 \times 10^{-2}$ Molar) sobre sementes de *L. sativa*

Neste bioensaio pode ser observado que o canferol, na concentração ensaiada, não interferiu no processo de germinação de *L. sativa* (fig. 60).

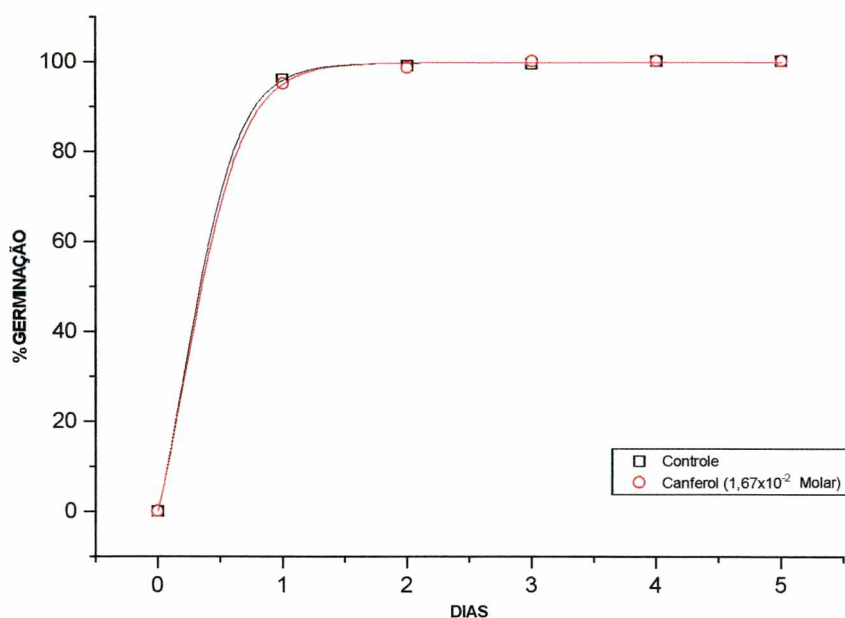


Figura 60 - Efeito do canferol sobre sementes de *L. sativa* var. Grand Rapids.

Ensaio 13: Efeito da quercetina nas concentrações: $1,58 \times 10^{-2}$ Molar, $7,90 \times 10^{-3}$ Molar, $9,70 \times 10^{-4}$ Molar, $5,00 \times 10^{-4}$ Molar sobre sementes de *L. sativa* var. Grand Rapids.

Neste bioensaio (fig. 61, tab. 21) pôde ser observado que a quercetina não exerceu nenhuma influencia sobre o perfil de germinação de *L. sativa*

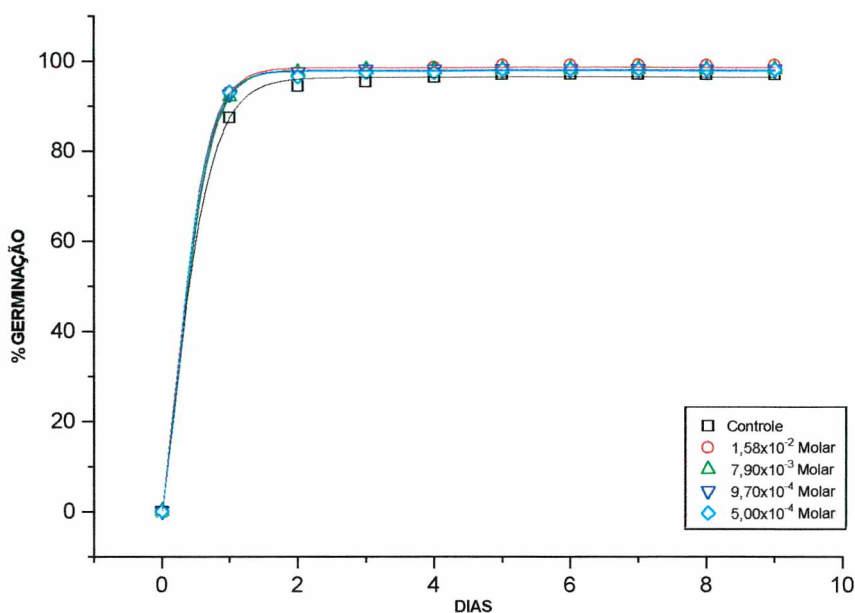


Figura 61 - Efeito da quercetina sobre sementes de *L. sativa* var. Grand Rapids.

Tabela 21 - Percentagem de germinação de *L. sativa* submetida a quercetina em diferentes concentrações. Teste de comparação de duas proporções sobre duas amostras independentes.

Controle	1,58x10 ⁻² Molar	7,90x10 ⁻³ Molar	9,70x10 ⁻⁴ Molar	5,00x10 ⁻⁴ Molar
97,0 a	99,0 a	98,0 a	98,0 a	98,0 a

Números seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si a nível de 5%.

Fazendo-se uma análise dos resultados obtidos com a fração n-BuOH de FJ e FV (nas três estações ensaiadas) pôde-se observar que houve um retardo no tempo requerido para a germinação e também uma redução da taxa final de germinação. O mesmo não ocorreu com canferol e quercetina, isolados da fração n-BuOH, os quais não interferiram no perfil germinativo desta espécie.

Como procedido com *C. hirta*, as sementes de *L. sativa* var. Grand Rapids também foram submetidas a ensaios com quercetina acetilada e metilada na

procura de um conhecimento da relação estrutura-atividade deste composto em ensaios de germinação.

Ensaio 14: Efeito da quercetina acetilada nas concentrações: $1,58 \times 10^{-2}$ Molar, $7,90 \times 10^{-3}$ Molar, $9,70 \times 10^{-4}$ Molar e $5,00 \times 10^{-4}$ Molar sobre sementes de *L. sativa*.

A acetilação da quercetina praticamente não exerceu influência no processo de germinação de *L. sativa* (fig. 62, tab. 22)

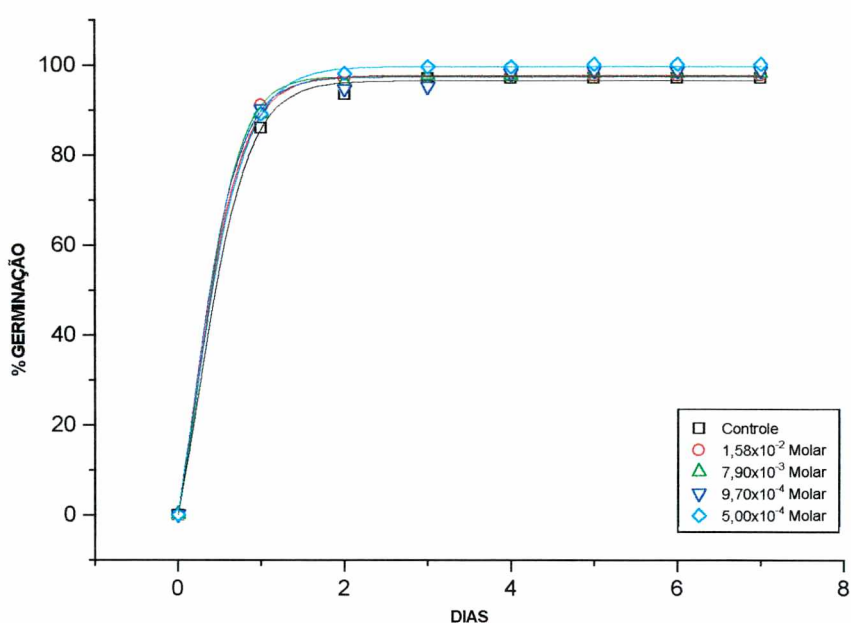


Figura 62 - Efeito da quercetina acetilada sobre sementes de *L. sativa* var. Grand Rapids.

Tabela 22 - Percentagem de germinação de *L. sativa* submetida a quercetina acetilada em diferentes concentrações. Teste de comparação de duas proporções sobre duas amostras independentes.

Controle	$1,58 \times 10^{-2}$ Molar	$7,90 \times 10^{-3}$ Molar	$9,70 \times 10^{-4}$ Molar	$5,00 \times 10^{-4}$ Molar
97,0 a	97,5 a	98,0 a	98,5 a	100,0 a

Números seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si a nível de 5%.

Ensaio 15: Efeito da quercetina metilada nas concentrações: $1,58 \times 10^{-2}$ Molar, $7,90 \times 10^{-3}$ Molar, $9,70 \times 10^{-4}$ molar e $5,0 \times 10^{-4}$ Molar sobre sementes de *L. sativa*.

Da mesma forma como para a quercetina acetilada, a quercetina metilada não alterou, pelo menos de forma significativa, o processo de germinação de *L. sativa* (fig. 63, tab. 23)

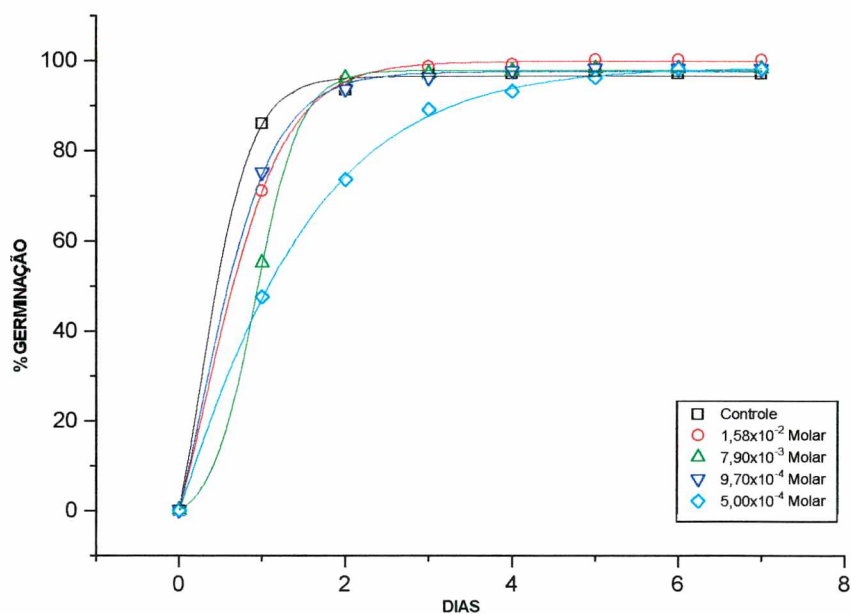


Figura 63 - Efeito da quercetina metilada sobre sementes de *L. sativa* Grand Rapids.

Tabela 23 - Percentagem de germinação de *L. sativa* submetida a quercetina metilada em diferentes concentrações. Teste de comparação de duas proporções sobre duas amostras independentes.

Controle	$1,58 \times 10^{-2}$ Molar	$7,90 \times 10^{-3}$ Molar	$9,70 \times 10^{-4}$ Molar	$5,00 \times 10^{-4}$ Molar
97,0 a	100,0 a	98,0 a	98,0 a	98,0 a

Números seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si a nível de 5%.

Prosseguindo a busca do princípio ativo, procedeu-se a investigação fitoquímica da fração n-BuOH de frondes jovens de outono (FJ-O) que rendeu o ácido siquímico, o qual também foi testado sobre sementes de *L. sativa*.

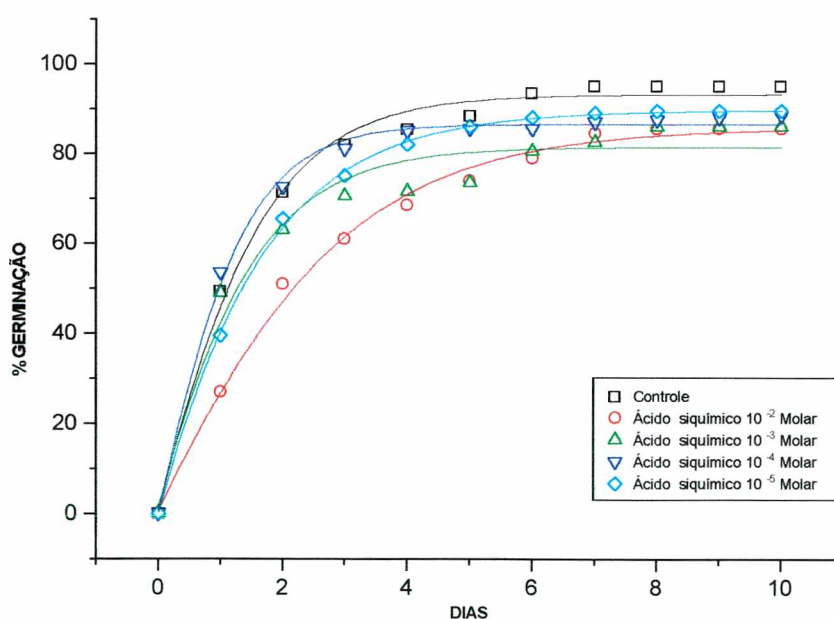
Ensaio 16: Efeito do ácido siquímico nas concentrações: 1×10^{-2} Molar, 1×10^{-3} Molar, 1×10^{-4} Molar e 1×10^{-5} Molar sobre sementes de *L. sativa*.

Neste bioensaio pôde ser observado uma redução (10%) na taxa final de germinação para a maior concentração ensaiada (tab. 24, fig. 64). Este resultado foi similar ao observado com a fração n-butanólica de frondes jovens de outono (Ensaio 11).

Tabela 24 - Percentagem de germinação de *L. sativa* submetida ao ácido siquímico em diferentes concentrações. Teste de comparação de duas proporções sobre duas amostras independentes.

Controle	10^{-2} Molar	10^{-3} Molar	10^{-4} Molar	10^{-5} Molar
95,0 a	85,5 b	86,0 b	88,5 b	89,5 a

Números seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si a nível de 5%.



Figuar 64 - Efeito do ácido siquímico sobre sementes de *L. sativa* var. Grand Rapids.

Os resultados obtidos com a quercetina acetilada e metilada sugerem que a atividade biológica avaliada através da germinação de *L. sativa* var. Grand Rapids nas concentrações ensaiadas praticamente não variou com modificações da estrutura.

Para STENLID e colaboradores¹⁰² que trabalharam com mitocôndrias provenientes de hipocótilos de pepino (*Cucumis sativus*), pequenas alterações na estrutura dos flavonóides ensaiados causaram mudanças na atividade biológica avaliada (inibição da formação de ATP na mitocôndria das plântulas).

Para ELLIGER e colaboradores¹⁰³ que testaram 42 flavonóides como inibidores do crescimento da larva *Heliothis zea*, moléculas com diferentes polaridades mantiveram a mesma atividade.

Comparando os resultados das frações n-butanólicas de frondes jovens e verdes de *G. pectinata* a 3,84% (Ensaio 11) com os resultados dos compostos puros (canferol e quercetina) e também das quercetinas modificadas observa-se que estes metabólitos sozinhos e nas concentrações ensaiadas não devem ser os responsáveis pela inibição na germinação de *L. sativa*.

O ácido siquímico foi o composto que maior inibição causou à germinação de *L. sativa*, embora esta inibição não tenha sido tão expressiva como observada para a fração n-butanólica de frondes jovens de inverno (tab. 20).

Analisando-se de forma geral os resultados obtidos com as duas espécies alvo, pode-se inferir que *G. pectinata* apresenta pelos nossos resultados três princípios ativos: canferol e quercetina que parecem agir de forma sinérgica na germinação de *C. hirta* e o ácido siquímico que mostrou inibição para a germinação de *L. sativa* var. Grand Rapids.

Do ponto de vista ecológico, esses resultados vão de encontro ao observado na natureza onde *G. pectinata* forma comunidades quase que puras³⁴.

Além dos ensaios de germinação pode-se também usar ensaios de crescimento e desenvolvimento de plantas para demonstrar a atividade alelopática. Nestes ensaios avalia-se o potencial de atividade alelopática através da medida do hipocótilo e radícula.

3.6.2. - Bioensaios de Crescimento

Efeito das frações n-butanólicas e dos compostos puros, isolados de *G. pectinata* sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de *L. sativa*.

Ensaio 17: Efeito da fração n-butanólica de Fronde Jovem de Outono em diferentes concentrações sobre o alongamento do hipocótilo e da radícula de *L. sativa*.

Neste bioensaio pôde ser observado uma acentuada diminuição no comprimento do hipocótilo e especialmente da radícula, à medida que se aumentou a concentração, (fig. 65, tab. 25). Além da variação no comprimento do hipocótilo e da radícula observou-se também uma mudança na morfologia das plântulas como, tortuosidade das radículas, mudança de coloração no ápice (de branca à marron) e ausência de pêlos absorventes (fig. 66).

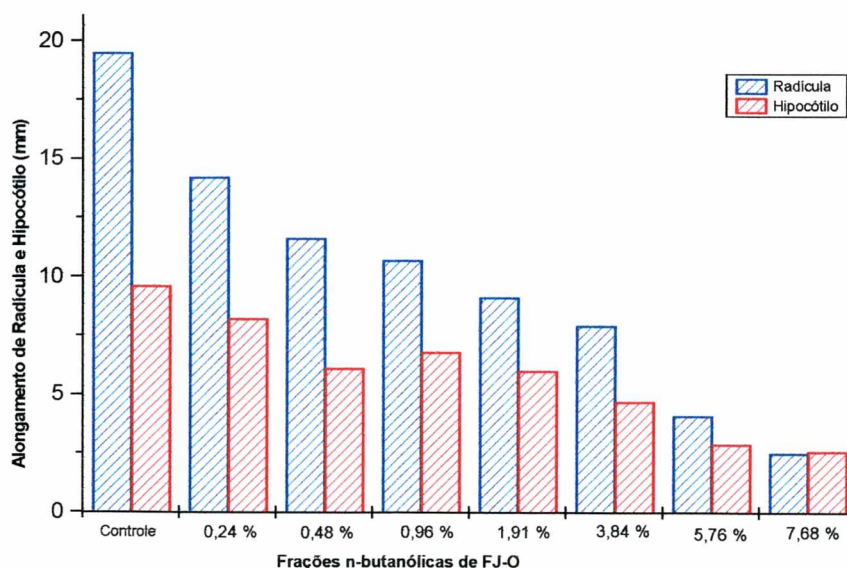


Figura 65 - Efeito de *G. pectinata* sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de *L. sativa* var. Grand Rapids.

Tabela 25 - Efeito da fração n-butanólica de Fronde Jovem de Outono em diferentes concentrações sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de *L. sativa*.

Concentração(%)	Radícula (mm)	Redução (%)	Hipocótilo (mm)	Redução (%)
Controle	19,5	-	9,6	-
0,24	14,2	27,2	8,2	14,6
0,48	11,6	40,5	6,1	36,5
0,96	10,7	45,2	6,8	29,2
1,91	9,1	53,4	6,0	37,5
3,84	7,9	59,5	4,7	51,1
5,76	4,1	78,2	2,9	69,8
7,68	2,5	87,2	2,6	73,0

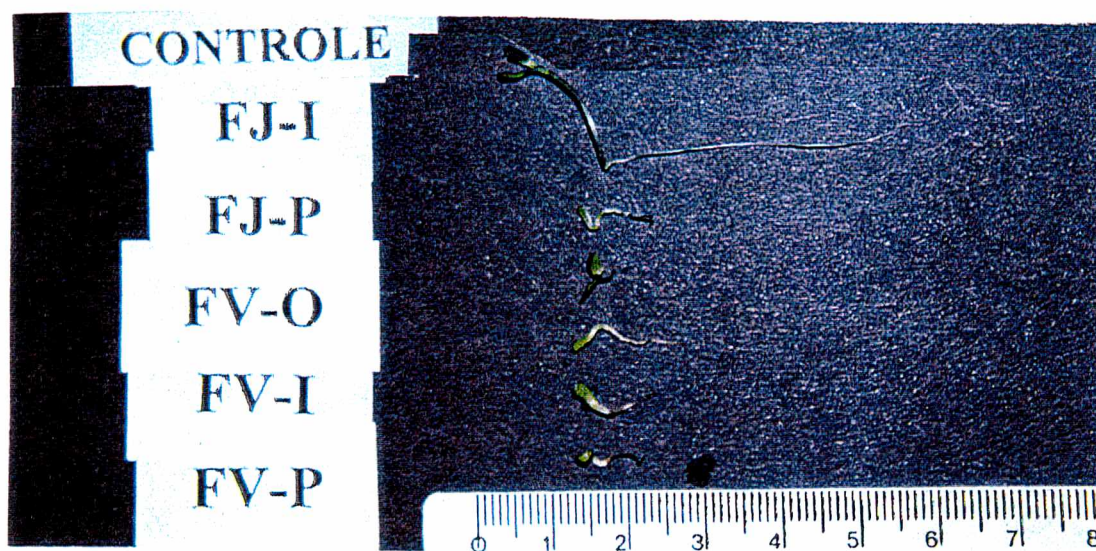


Figura 66 - *L. sativa* var. Grand Rapids submetida a frações n-BuOH de FJ e FV de *G. pectinata* (3,84%) em três estações do ano.

Ensaio 18: Efeito das frações n-butanólicas (3,84%) das Frondes Jovens e Frondes Verdes em três estações do ano (primavera, outono e inverno) sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de *L. sativa*.

Neste bioensaio pôde ser observado uma redução no comprimento do hipocótilo e da radícula especialmente àqueles submetidos às frações n-BuOH de Frondes jovens de primavera. (fig.67, tab.26). Também foram observadas modificações na morfologia da plântula como ocorrido no ensaio anterior.

Sendo a primavera uma estação de ativação do metabolismo (germinação e crescimento), ressalta-se a importante ação desta fração sobre o sistema radicular, com possíveis efeitos de prejuízo das espécies sob influência direta destes princípios ativos.

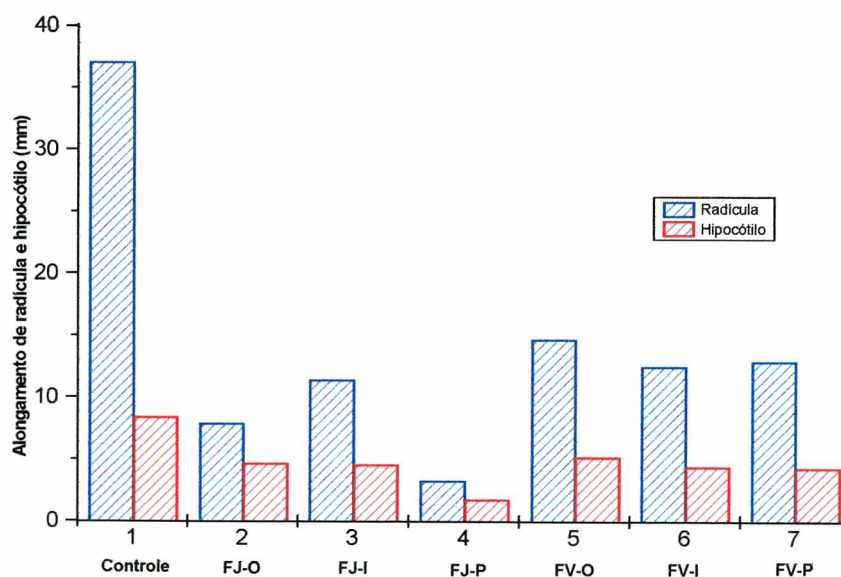


Figura 67 - Efeito das frações n-BuOH de frondes jovens e verdes de *G. pectinata* (3,84%) sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de *L. sativa* var. Grand Rapids.

Tabela 26 - Efeito das frações n-butanólicas (3,84%) de Frondes Jovens (FJ) e Frondes Verdes (FV) em três estações do ano: Outono (O), Inverno (I) e Primavera (P), sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de *L. sativa*.

Frações	Radícula (mm)	Redução (%)	Hipocótilo (mm)	Redução (%)
Controle	37,1	-	8,4	-
FJ-O	7,9	59,5	4,7	51,1
FJ-I	11,4	69,3	4,6	45,2
FJ-P	3,3	91,1	1,8	78,6
FV-O	14,7	60,4	5,2	38,1
FV-I	12,5	66,3	4,4	47,6
FV-P	12,9	65,2	4,3	48,8

Ensaio 19: Efeito do canferol ($1,67 \times 10^{-2}$ Molar) sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de *L. sativa*.

O canferol, na concentração ensaiada não exerceu influência sobre o crescimento da radícula e hipocótilo (fig. 68). Resultados similares foram observados para a germinação (Ensaio 12).

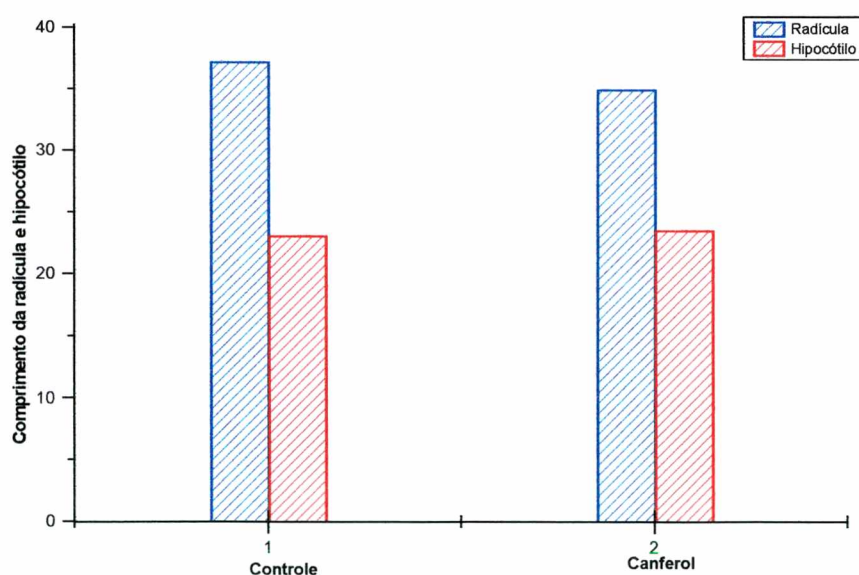


Figura 68 - Efeito do canferol ($1,67 \times 10^{-2}$ Molar) sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de *L. sativa*.

Ensaio 20: Efeito da quercetina em diferentes concentrações sobre o alongamento da radícula e do hipocótilo de *L. sativa*.

Embora no ensaio de germinação (Ensaio 13) a quercetina não tenha exercido influência na taxa final de germinação, neste bioensaio pôde ser observado uma redução no comprimento da radícula (tab. 27), especialmente na concentração $7,9 \times 10^{-3}$ Molar (16,7%). Quanto ao comprimento do hipocótilo para as duas concentrações menores foi observado um aumento no comprimento do hipocótilo, especialmente para a concentração $5,0 \times 10^{-4}$ Molar (50,7%) (fig. 69).

Tabela 27 - Efeito da quercetina em diferentes concentrações sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de *L. sativa* var. Grand Rapids.

Concentração	Radícula (mm)	Redução	Hipocótilo (mm)	Redução/Aumento
Controle	43,9	-	6,9	-
$1,58 \times 10^{-2}$	41,8	4,8	6,6	4,4
$7,90 \times 10^{-3}$	36,6	16,7	5,9	14,5
$9,70 \times 10^{-4}$	37,0	15,8	10,1	46,3
$5,00 \times 10^{-4}$	39,3	10,5	10,4	50,7

Concentração em Molaridade; Redução/Aumento em %.

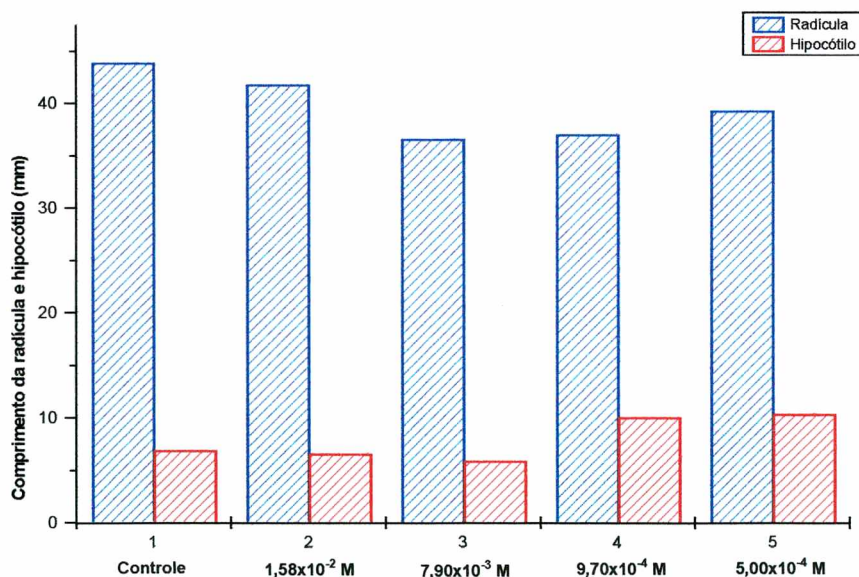


Figura 69 - Efeito da quercetina sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de *L. sativa* var. Grand Rapids.

Ensaio 21: Efeito da quercetina acetilada em diferentes concentrações sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de *L. sativa*.

A quercetina acetilada provocou redução no crescimento da radícula e hipocótilo, especialmente da radícula, 54,5% (tab. 28, fig. 70). Este efeito foi bem mais pronunciado do que o observado para a quercetina. Quanto ao hipocótilo, também houve redução de 21,8% do comprimento na mesma concentração.

Tabela 28 - Efeito da quercetina acetilada em diferentes concentrações sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de *L. sativa* var. Grand Rapids.

Concentração (M)	Radícula (mm)	Redução (%)	Hipocótilo (mm)	Redução (%)
Controle	45,0	-	5,5	-
$1,58 \times 10^{-2}$	30,5	32,3	5,2	5,5
$7,90 \times 10^{-3}$	28,0	37,8	5,1	7,3
$9,70 \times 10^{-4}$	26,0	42,2	5,3	3,7
$5,00 \times 10^{-4}$	20,5	54,5	4,3	21,8

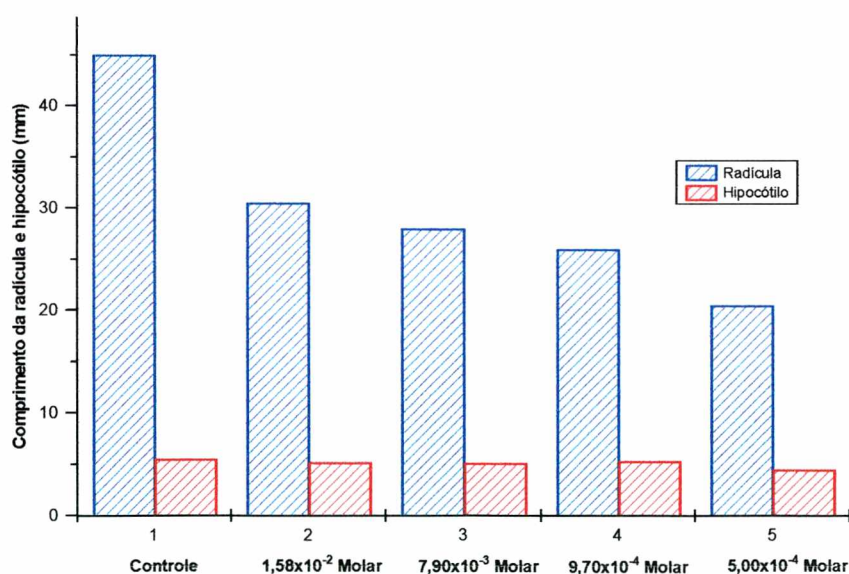


Figura 70 - Efeito da quercetina acetilada sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de *L. sativa* var. Grand Rapids.

Ensaio 22: Efeito da quercetina metilada em diferentes concentrações sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de *L. sativa*.

Neste bioensaio pôde ser observado uma redução no crescimento da radícula (tab. 29, fig. 71) para todas as concentrações, especialmente para a concentração $1,58 \times 10^{-2}$ Molar (48,5%). No crescimento do hipocótilo foi observado uma redução de 24% para a menor concentração ensaiada ($5,0 \times 10^{-4}$ Molar) enquanto que nas concentrações $7,9 \times 10^{-3}$ Molar e $9,7 \times 10^{-4}$ Molar foi observado um estímulo de 4% e 10% respectivamente.

Tabela 29 - Efeito da quercetina metilada em diferentes concentrações sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de *L. sativa* Var. Grand Rapids.

Concentração	Radícula (mm)	Redução	Hipocótilo (mm)	Redução/Aumento
Controle	47,5	-	5,0	-
$1,58 \times 10^{-2}$	24,5	48,5	4,3	14,0
$7,90 \times 10^{-3}$	32,0	32,7	5,2	4,0
$9,70 \times 10^{-4}$	35,5	25,3	5,5	10,0
$5,00 \times 10^{-4}$	35,0	26,2	3,8	24,0

Concentração em Molaridade; Redução/Aumento em %.

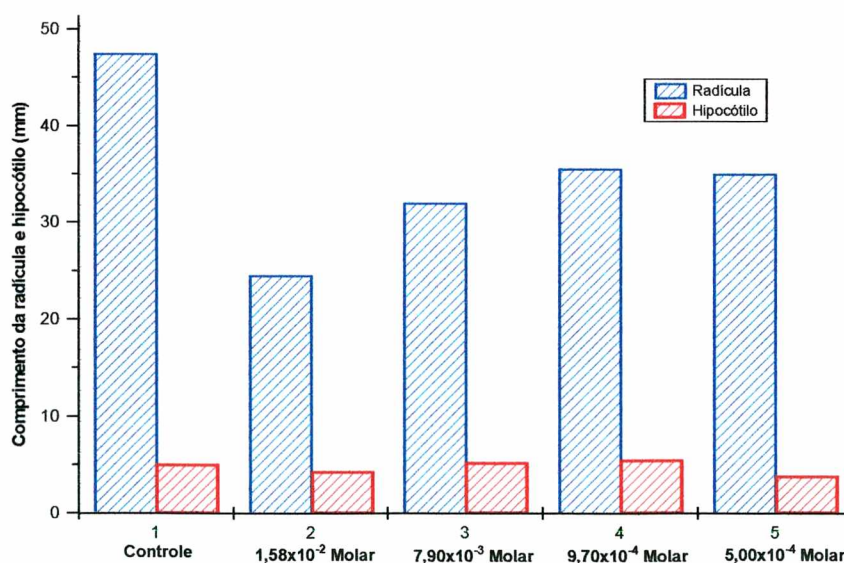


Figura 71 - Efeito da quercetina metilada sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de *L. sativa* var. Grand Rapids.

Ensaio 23: Efeito do ácido siquímico em diferentes concentrações sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de *L. sativa*.

O ácido siquímico estimulou o crescimento da radícula para todas as concentrações (tab. 30, fig. 72), especialmente para a maior concentração ensaiada (73,6%). No crescimento do hipocótilo foi observado um pequeno estímulo nas três maiores concentrações, enquanto que para a menor concentração (10^{-5} Molar) houve uma redução no comprimento do mesmo de 40,5%.

Tabela 30 - Efeito do ácido siquímico em diferentes concentrações sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de *L. sativa* var. Grand Rapids.

Concentração (M)	Radícula (mm)	Aumento	Hipocótilo (mm)	Aumento/Redução
Controle	20,5	-	10,0	-
10^{-2}	35,6	73,6	10,5	6,0
10^{-3}	28,5	39,0	10,5	6,0
10^{-4}	24,5	9,5	10,7	8,0
10^{-5}	21,0	2,4	5,9	40,5

Aumento/Redução em %

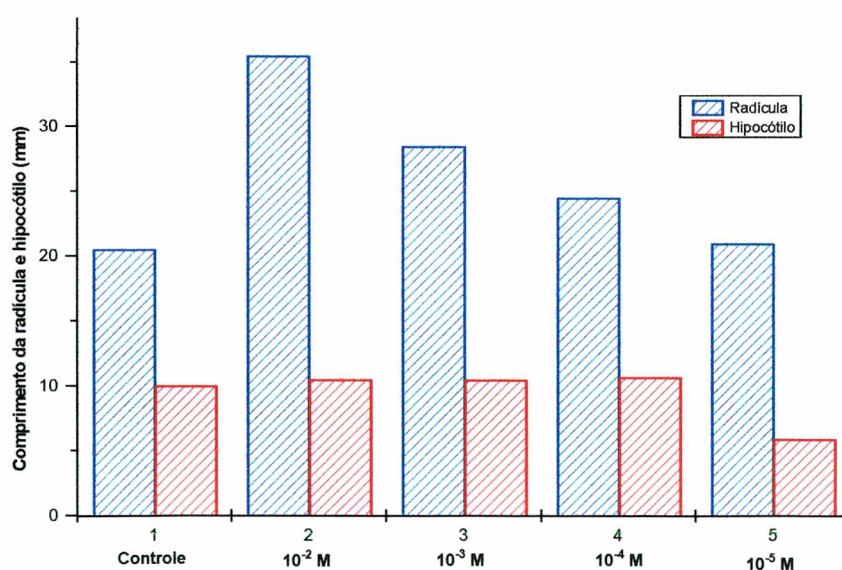


Figura 72 - Efeito do ácido siquímico sobre o alongamento da radícula e hipocótilo de *L. sativa* var. Grand Rapids.

Como observado por INDERJIT e DAKSHINI ¹⁰⁴ quercetina e quercitrina isolados das folhas e solo de *Pluchea lanceolata* inibiram o crescimento de plântulas (radícula e hipocótilo) de *Asparagus bean*. Também a mistura (equimolar) dos dois flavonóides inibiu o crescimento da radícula e hipocótilo para concentrações de 10^{-4} e 10^{-3} Molar.

O efeito da quercetina acetilada, metilada e ácido siquímico sobre o crescimento da radícula e hipocótilo foi mais efetivo do que sobre a germinação de *L. sativa* var. Grand Rapids.

A inibição no crescimento de plântulas, sob ação alelopática, do ponto de vista ecológico, é um mecanismo mais eficiente de seleção do que a inibição da germinação. Isto porque a descendência seria eliminada por morte dos indivíduos, desaparecendo o DNA competidor, ou, nos casos mais severos, por retardamento do crescimento ou da germinação ^{105,106}.

A elucidação do mecanismo de ação dos aleloquímicos que alteram o processo de germinação e crescimento de plantas tem sido um desafio contínuo e difícil.

Na tentativa de determinar este mecanismo, procedeu-se a análise histológica da radícula e hipocótilo de *L. sativa* var. Grand Rapids.

3.6.3 - Análise histológica

3.6.3.1 - Análise histológica da radícula de *L. sativa* var. Grand Rapids sob influência das frações n-butanólicas de Frondes Jovens e Verdes de *G. pectinata* em três estações do ano.

Na análise histológica procedeu-se a identificação e mensuração das células parenquimáticas (córtex) desprezando-se as células da epiderme e da região vascular (fig. 73).

Os resultados obtidos no bioensaio com células parenquimáticas da radícula de *L. sativa* var. Grand Rapids estão apresentados na Tabela 31.

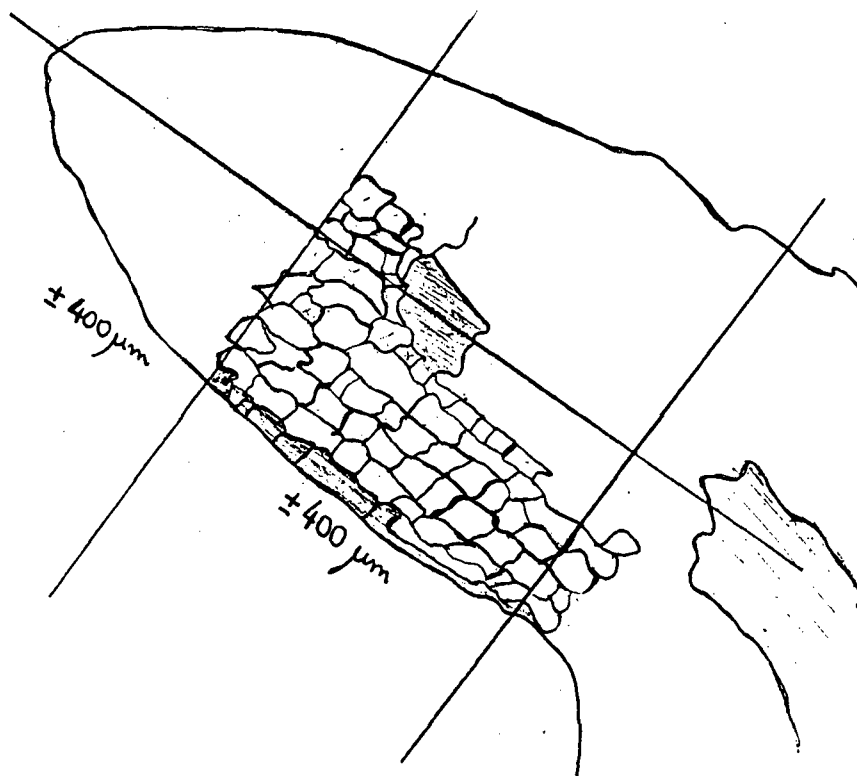


Figura 73 - Células parenquimáticas do hipocótilo de *L. sativa* var. Grand Rapids submetidas a frações n-butanólicas de frondes jovens de primavera de *G. pectinata*, vistas através de câmara clara A8x11 acoplada ao microscópio "Zeis".

Tabela 31 - Análise histológica da radícula de *L. sativa* var. Grand Rapids submetida a frações n-butanólicas de frondes jovens e verdes de *G. pectinata* nas estações do outono, inverno e primavera. Análise de Variância ANOVA one-way.

Frações	Medidas do comprimento das células parenquimáticas (μm)
Controle	64,928 a
FJ-I	69,907 a
FJ-P	66,966 a
FV-O	46,275 b
FV-I	133,931 c
FV-P	66,514 a

Número de células medidas: 34

Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si a nível de 5% para Tukey.

A análise da Tabela 31 mostra uma diferença significativa no comprimento médio das células da radícula de *L. sativa* submetidas às frações n-butanólicas de FV-O e FV-I, quando comparadas ao controle. Por outro lado, as células da radícula de *L. sativa* submetidas às frações n-butanólicas de FJ-I e FJ-P não mostraram reação aos efeitos dos metabólitos presentes nestas frações.

Novamente fica caracterizado que a espécie alvo (*L. sativa*) sofreu influência dos metabólitos presentes nas frações n-butanólicas de frondes jovens e verdes de *G. pectinata* nas diferentes concentrações e estações estudadas.

Estes resultados podem estar relacionados a uma alteração do balanço hormonal, isto é, estímulo no metabolismo do AIA (Ácido Indol Acético) ou de compostos análogos que favorecem um alongamento da célula.

Quando os resultados obtidos com os bioensaios histológicos são comparados àqueles relativos ao comprimento médio da radícula (tab. 26), observa-se que embora o comprimento da radícula de plântulas de *L. sativa* submetidas às frações n-butanólicas de FV-I, tenha sofrido uma redução de 66,3% comparado ao controle, o comprimento médio das células parenquimáticas da radícula sofreu um aumento significativo, o que indica uma inibição da divisão celular (mitose). Nestas circunstâncias pode-se interpretar o fenômeno do alongamento celular como uma estratégia de compensação a esta inibição das divisões celulares, visando minimizar o impacto negativo do comprometimento do desenvolvimento normal da radícula. Os dados mostram que tal estratégia minimiza apenas em parte este efeito, já que o comprimento médio do órgão mostra ainda uma redução significativa.

Estudos anatômicos e histoquímicos têm mostrado que metabólitos secundários (aleloquímicos) afetam o alongamento celular e a divisão celular que são fases essenciais para o desenvolvimento de uma planta. As células da radícula e do hipocótilo de plantas expostas a substâncias alelopáticas podem sofrer alterações em relação ao comprimento e ao volume ¹⁰⁴.

3.6.3.2 - Análise histológica do hipocótilo de *L. sativa* var. Grand Rapids sob influência das frações n-butanólicas de frondes jovens e verdes de *G. pectinata* em três estações do ano.

Fazendo-se uma análise da Tabela 32 pode-se observar uma diferença significativa no comprimento médio das células do hipocótilo de *L. sativa* submetidas às frações n-butanólicas de FJ-I e FJ-P, quando comparadas ao controle, por ex., 41,852 μm (FJ-P) x 60,403 μm (controle). O comprimento médio das células do hipocótilo de *L. sativa* submetidas às frações n-butanólicas de Frondes Verdes não sofreu alteração significativa.

Tabela 32 - Análise histológica do hipocótilo de *L. sativa* var. Grand Rapids submetida a frações n-butanólicas de frondes jovens e verdes de *G. pectinata* nas estações do outono, inverno e primavera. Análise de Variância ANOVA one way.

Frações	Medidas do comprimento das células parenquimáticas (μm)
Controle	60,403 a
FJ-I	42,303 b
FJ-P	41,852 b
FV-I	61,987 a
FV-O	60,856 a
FV-P	52,505 a

Número de medidas=34

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente a nível de 5% para Tukey.

Comparando-se estes resultados com àqueles obtidos na medida do hipocótilo (tab. 26) onde o hipocótilo de plântulas de *L. sativa* submetidas à FJ-P apresentou uma redução de 78,6% e também na medida do comprimento médio das células do hipocótilo de *L. sativa* submetidas a FJ-P se observou o encurtamento mais significativo.

Observa-se uma diferença extremamente significativa no comprimento médio do órgão, que é cerca de 5 vezes mais longo no controle. A diferença observada no comprimento médio das células é também significativa, contudo, quando comparada

à diferença de comprimento total do órgão, observa-se que esta é bem menor; no controle o comprimento médio das células é cerca de 1,4 vezes maior. Pode-se deduzir que o efeito inibidor das divisões mitóticas é aqui também preponderante, porém não se observa uma estratégia de compensação, via alongamento celular como constatado na radícula. Ao contrário, observa-se igualmente uma restrição no alongamento celular. Em outros termos, pode-se inferir que a fração n-BuOH de FJ-P promove inibição da divisão e do alongamento celular, condicionando uma drástica redução no comprimento médio do hipocótilo.

Em termos de direção e velocidade de diferenciação, a raiz é muito mais simples do que o caule, pois neste caso não existe a complicação constituída pelas folhas.¹⁰⁸ Ainda segundo GEMMEL¹⁰⁸ na raiz ocorre uma liberação de grande número de metabólitos da sua superfície, entre os quais pode-se destacar alcalóides, vitaminas, auxinas, açúcares, enzimas, que foram sintetizadas dentro da raiz. Estas substâncias são liberadas principalmente no ápice, na zona de alongamento e na zona dos pêlos. Assim, a interação com tais metabólitos pode ocasionar reações com as substâncias oriundas da fração n-BuOH de FJ-P, alterando-a estrutural e qualitativamente, condicionando assim um efeito diverso do observado para o hipocótilo.

Outra hipótese que pode ser aventada, é a relação com o processo de iniciação e diferenciação preliminar da raiz. Assim sendo, se fatores inibitórios incidem igualmente em caule e raiz, é de se esperar que a planta 'procure' neutralizar ou minimizar tal efeito, inicial e preponderantemente nas raízes. Tal comportamento reflete um caráter adaptativo claro, visto que toda a continuidade do crescimento depende da absorção e transporte de água e nutrientes, processos relacionados diretamente à fisiologia das raízes.

ALLEN, citado por ROMBERGER¹⁰⁹, já mencionava a dificuldade de se estabelecer homologias entre tecidos ou regiões do caule e raiz.

Novamente fica caracterizada a interferência de aleloquímicos no desenvolvimento da espécie *L. sativa* var. Grand Rapids. Esforços para caracterizar o modo de ação destes aleloquímicos têm sido constantes nos últimos anos, porém segundo EINHELLIG⁴⁰ compostos fenólicos como ácidos fenólicos, cumarinas,

flavonóides e outros polifenóis podem causar interações com hormônios e com a divisão celular modificando a estratégia de desenvolvimento das plantas.

Impactos sobre o balanço hídrico, fotossíntese, mitose, síntese de proteína, captura de minerais, crescimento induzido por hormônios e outros processos podem ser diretamente relacionados ao crescimento. A importância relativa de algumas dessas ações depende do aleloquímico especificamente, stress associados ao meio ambiente e qual fase do crescimento da planta é inibido ou estimulado (germinação, ou alongamento de radícula e hipocótilo).

Os resultados obtidos, colocam *G. pectinata* como uma fonte potencial de aleloquímicos, podendo ser útil na pesquisa de novos herbicidas ou reguladores de crescimento naturais.

CAPÍTULO 4

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Procedimentos Experimentais Gerais

4.1.1. Métodos físicos:

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho Microquímica Modelo APF-301 e não foram corrigidos.

Os espectros na região de absorção do infravermelho foram feitos em espectrofotômetro Perkin-Elmer FT-16 PC, em pastilha de KBr ou filme .

Os espectros de ^1H e ^{13}C RMN foram feitos em um aparelho Bruker AC-200F e Varian XL 300, utilizando-se solventes deuterados adquiridos comercialmente e TMS como padrão interno de referência.

Os espectros de massas foram obtidos em um aparelho Shimadzu CGMS-QP 2000A a 35 eV.

4.1.2. - Métodos Cromatográficos:

Nas cromatografias em coluna utilizou-se sílica gel 60, com granulações de 35-70 mesh, 230-400 mesh (para coluna Flash) e sephadex LH-20.

Nas cromatografias em camada delgada utilizou-se placas Merck 60 F₂₅₄, placas de celulose ou placas de vidro (2x7 cm) preparadas com sílica gel 60 de procedência Merck. Como eluentes utilizaram-se solventes puros ou misturas de solventes de grau de pureza analítica, de procedência Merck, Reagen ou Grupo Química.

Para as revelações utilizaram-se lâmpadas U.V. 254 nm e 365 nm e pulverização com solução de ácido sulfúrico e etanol (10:90), anisaldeído, cloreto férrico, vanilina sulfúrica ou fosfórica e Draggendorf quando necessários seguidas por aquecimento.

O grau de pureza dos compostos isolados foi verificado através de experimentos de cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa de alta resolução, e por avaliação de seus espectros de I.V., ^1H e ^{13}C RMN e Massas.

O experimento de CG/AR foi realizado utilizando-se um aparelho marca Shimadzu, Modelo A-14, com detector de ionização de chama, coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária OV 1 (espessura do filme 0,25 μm), de 25 m de comprimento e 0,25 mm de d.i.; temperatura do detector 320°C; temperatura do injetor 310°C; temperatura da coluna programada de 80-290°C por 20 mi.; gás de arraste hidrogênio, com velocidade linear de 20 cm/min.

4.2. Materiais Vegetais

4.2.1. *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae)

A espécie *Croton urucurana* Baillon (casca do caule) foi coletada no mês de maio de 1994, na região de Dourados, sul do Mato Grosso do Sul, e identificada pelo botânico Cláudio A. Conceição da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Uma excicata foi depositada no herbário da UFMS (Conceição, 5009).

4.2.1.1. Extração e Isolamento

O material vegetal (casca do caule) seco ao ar e moído (3,6 Kg) foi extraído 3 vezes com 5,0 litros de metanol por 21 dias, com repetidas reposições de solvente.

Após evaporação do metanol em evaporador rotatório obteve-se 424,13 g (que corresponde a 11,78 % do material vegetal) de um sólido de coloração marron-avermelhado, o qual foi posteriormente percolado sobre um leito de sílica gel 60 (200,0 g) em uma coluna (77x9,5 cm), usando-se hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, sucessivamente e de forma exaustiva como eluentes (fig. 74 e esquema 1).

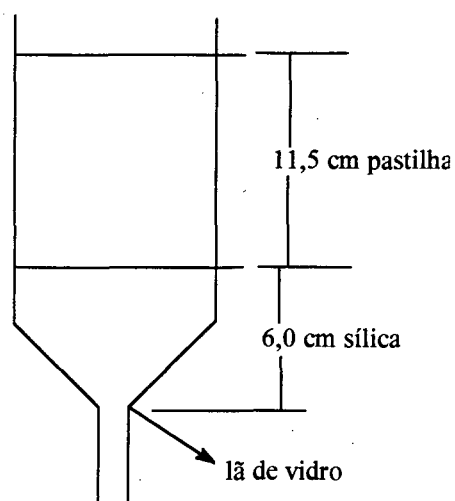
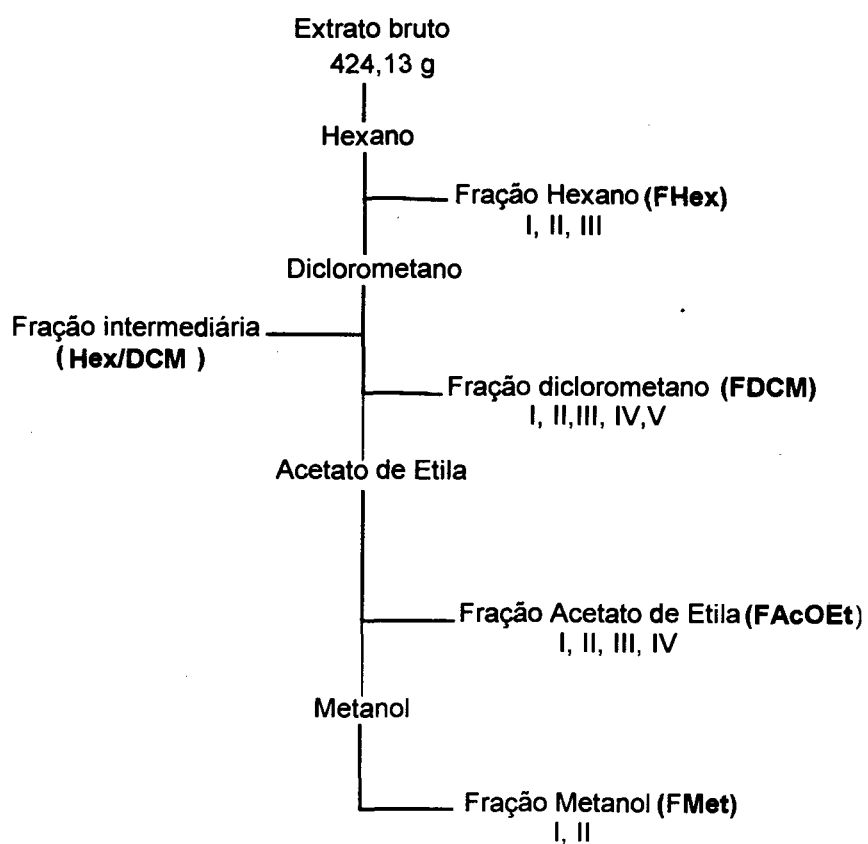


Figura 74 - Procedimento utilizado na filtração do extrato bruto de *C. urucurana* Baillon.



Esquema 1 - Procedimentos executados para o isolamento de compostos a partir de *C. urucurana* Baillon.

A fração eluída com hexano (**FHex**) (7,83 g), não foi investigada.

A fração intermediária Hexano/Diclorometano (**Hex/DCM**) (8,67 g) foi cromatografada sobre uma coluna (70,0x 3,9 cm) de silicagel 60 (200,0 g) eluída com n-hexano gradualmente enriquecida com acetato de etila e metanol, coletando-se 57 frações de 125 mL. A fração 5, após evaporação do solvente e purificação por recristalização com hexano/acetato de etila 5% resultou em cristais incolores (450 mg) denominado de **CU5-HD**, posteriormente identificado como uma mistura de esteróides: β -sitosterol (**37**), estigmasterol (**38**), campesterol (**39**). As frações 14-16 foram reunidas e purificadas por recristalização com hexano/acetato de etila 9:1 resultando em cristais incolores (251 mg), denominado de **CU14-HD**, posteriormente identificado como ácido acetil aleurítico (**41**). A fração 25 , após ser lavada sucessivas vezes com hexano/acetato de etila 9:1, rendeu 16,7 mg de cristais incolores, chamado de **CU25-HD**, posteriormente identificado como sonderianin (**28**).

A fração diclorometano, após CCD foi subdividida em fração diclorometano I (**FDCM I**) e fração diclorometano II-V (**FDCM II-V**)

A fração diclorometano I (**FDCM I**), (10,16 g) foi cromatografada em uma coluna (50,0x5,5 cm) de Si-gel 60 (100 g) eluída com hexano, Acetato de etila, metanol gradiente, coletando-se 44 frações de 200 ml. As frações 21-26 (4,0 g), após CCD foram reunidas e recromatografadas em uma coluna (20x2,5 cm) de Si-gel (50 g) eluída com hexano, Acetato de etila, metanol gradiente, obtendo-se na fração 26, 18,0 mg de um cristal incolor, denominado de **CU26-DI**, posteriormente identificado como 12-*epi*-metil-barbascoato (**42**).

As frações 18-23 (**Hex/DCM**) com as frações 17-18 (**DCM I**) foram reunidas resultando uma fração de 3,0 g que foi cromatografada em uma coluna (20x2,5 cm) de Si-gel 60 (50 g) eluída com benzina e enriquecida com Acetato de etila até 100%, coletando-se 18 frações de 100 ml cada. As frações 2-5 foram reunidas e recromatografadas em uma coluna (10x1,5 cm) sobre Si-gel 60 (20 g) e eluída com hexano e acetato de etila gradiente coletando-se 28 frações de 100 ml cada. Desta coluna reuniram-se as frações 13-25 que foram recromatografadas de forma idêntica à descrita acima, rendendo nas frações 6-7, um óleo de coloração amarela clara, (120,0 mg) denominado de **CU6-HDDI**, posteriormente identificado como 15,16-epóxi-3,13 (16)-clerodatrieno-2-ona (**43**)

A fração Diclorometano II-V (**FDCM II-V**) (15,68 g) não foi investigada.

Após análise por cromatografia em camada delgada reuniram-se as frações de acetato de etila I a IV, passando a ser designada como fração acetato de etila (**FAcOEt**).

A **FAcOEt** (28,61 g) foi cromatografada em uma coluna (50,0x3,5 cm) de silicagel 60 (120 g) e eluída com hexano gradualmente enriquecida com acetato de etila e metanol rendendo 100 frações de 200 mL que foram reunidas de acordo com suas similaridades em R_f . As frações 67-73 (3,74 g) apresentaram-se como um sólido amorfo de cor castanho-clara constituído de uma mistura de dois compostos ($R_f=0,46$ e $R_f=0,33$, sistema de solventes Hex/AcOEt/MeOH 30:60:10) que foram recromatografadas por Cromatografia Flash¹¹⁰ (70,0 g) com um sistema de solventes constituído por hexano/acetato de etila/metanol, 30:60:10, rendendo dois compostos: um, nas frações 5-7 (190,6 mg) denominado de CU 5/7 AE e outro nas frações 9-11 (11,3 mg) denominado de CU 9/11-AE. Posteriormente as frações 74-79 foram reunidas, o solvente evaporado, e o sólido amorfo de coloração castanho-claro resultante (4,3 g), foi cromatografado de forma idêntica à descrita para as frações 67-73, rendendo nas frações 7-9, (222,3 mg) um sólido de coloração castanho-claro denominado de CU 7/9-AE e nas frações 11-13 (34,6 mg) um composto denominado de CU 11/13-AE. Analisando-se por CCD os compostos CU 5/7-AE e CU 9/11-AE obtidos da fração 67-73 com os compostos CU 7/9-AE e CU 11/13-AE obtidos da fração 74-79, verificou-se que CU 5/7-AE era similar à CU 7/9-AE e CU 9/11-AE era similar a CU 11/13-AE. Desta forma obteve-se um total de 412,9 mg de um composto denominado de **CU5/9-AE**, posteriormente identificado como catequina(1) e 45,9 mg de um composto denominado de **CU9/13-AE**, posteriormente identificado como galocatequina (3).

A fração Metanol após CCD foi subdividida em fração metanol I (**FMet I**) (112,7 g) e fração metanol II (**FMet II**) (121,9 g).

Parte da fração metanol I (**FMet I**) (30,34 g) foi suspensa em 70 mL de água destilada e particionada com clorofórmio (5x100 mL), rendendo 4,21 g de fração clorofórmica (**FC**).

A **FC** (4,21 g) foi cromatografada em uma coluna (50,0x2,0 cm) de silicagel 60 (70 g) eluída com diclorometano enriquecida com metanol em um gradiente de polaridade, coletando-se 41 frações de 100 mL. As frações 30-32 após evaporação do solvente forneceram 18 mg de um sólido de coloração branca, denominado de **CU30/32-MEC**, posteriormente identificado como sitosterol-3-O- β -D-glicosídeo (40).

4.2.2. *Gleichenia pectinata* Willd (PR.) (Gleicheniaceae)

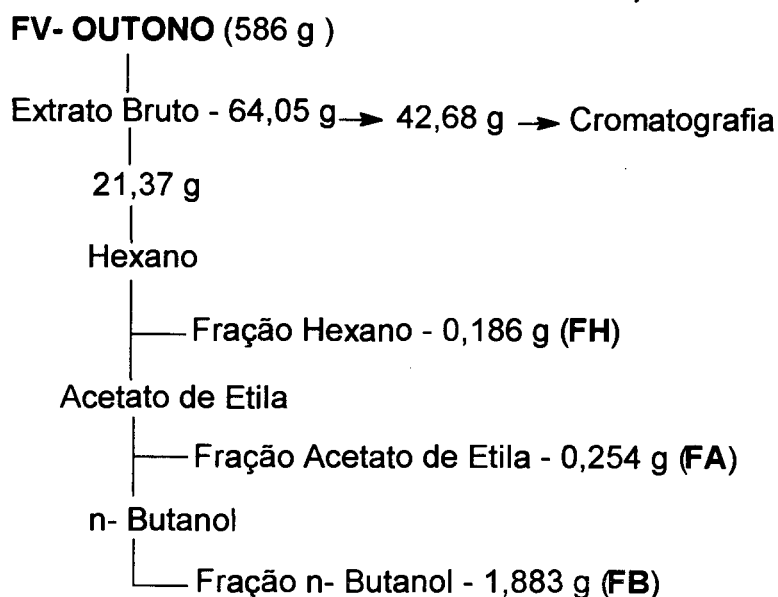
A espécie *Gleichenia pectinata* Willd (PR.) (frondes jovens e frondes verdes) foi coletada em três estações do ano: outono (março/94), inverno (agosto/94) e primavera (dezembro/94). A coleta foi feita nas encostas de Santo Antônio de Lisboa, Florianópolis, Santa Catarina, a uma altitude de 184 m, correspondendo fitossociologicamente a um *Gleichenietum pectinatae*. Nesta área houve intensa atividade agrícola e pastoril sendo abandonada há mais de 50 anos.

A identificação do material vegetal foi feita pela Professora Dra. Maike H. de Queiroz (UFSC) e uma exsicata se encontra depositada no Herbário Flor do Horto Botânico da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) .

4.2.2.1. Extração e Isolamento

O material vegetal, frondes verdes e frondes jovens, (fig. 75 e 76) foi triturado e extraído 3 vezes com metanol por 21 dias com repetidas reposições do solvente.

O extrato bruto e frações semipurificadas das frondes verdes de outono foram obtidos segundo o Esquema 2.



Esquema 2 - Procedimento usado para a obtenção do extrato bruto e frações de frondes verdes de outono de *G. pectinata*.

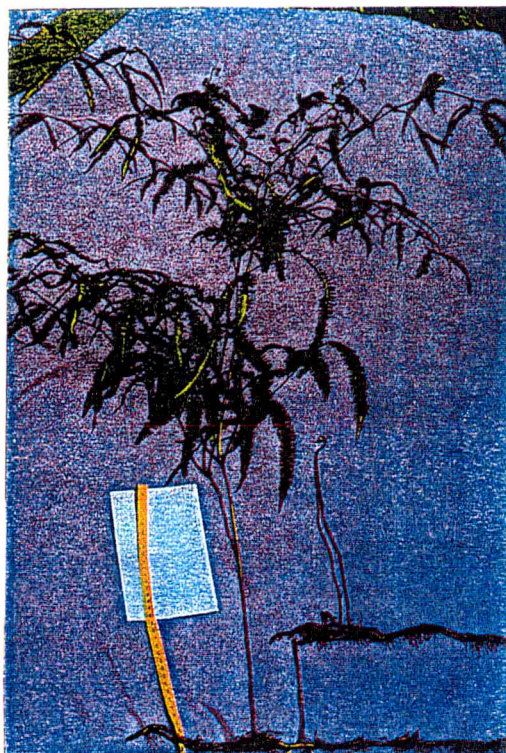


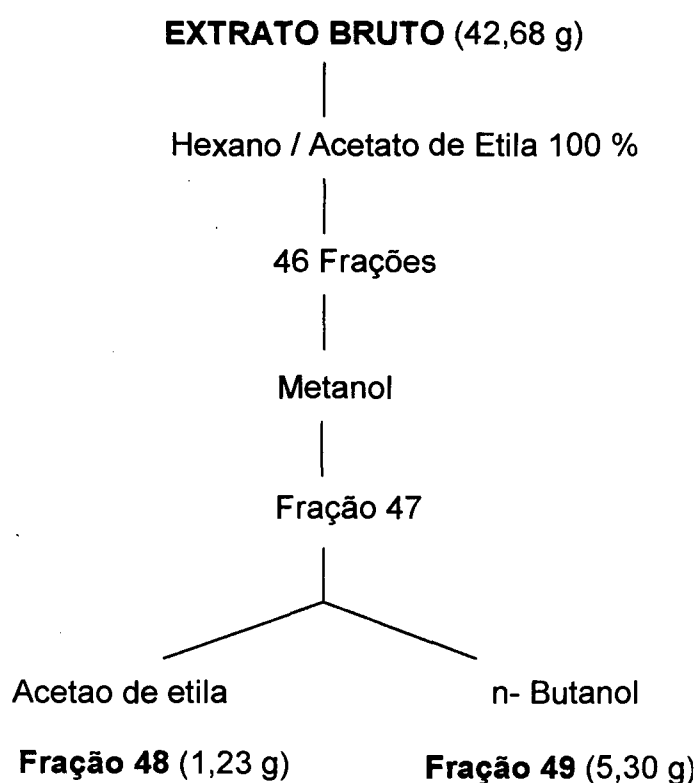
Figura 75 - Frondes verdes e rizoma de *G. pectinata*.



Figura 76 - Frondes jovens de *G. pectinata*.

4.2.2.1.1. Fracionamento de Frondes Verdes - Outono

O extrato metanólico bruto (42,68 g) foi cromatografado em uma coluna (50 x 8,5 cm) de silicagel 60 (200,0 g) eluída com n-hexano e misturas de n-hexano e acetato de etila de polaridade crescente, coletando-se 46 frações de 125 mL cada. Após, eluiu-se exaustivamente com metanol coletando-se uma única fração denominada de fração 47, que foi particionada com acetato de etila (3 x 100 mL) obtendo-se a fração 48 (1,23 g) e com n-butanol (3 x 100 mL) obtendo-se a fração 49 (5,30 g) (esquema 3).



Esquema 3 - Procedimento usado para o isolamento de compostos a partir de frondes verdes de outono de *G. pectinata*.

A fração 48 (1,23 g) foi cromatografada em uma coluna (30 x 1,5 cm) de sephadex LH-20 e eluída com MeOH / H₂O 80:20 coletando-se 18 frações de 10 mL cada. Por CCD, reuniram-se as frações 15-17 que apresentavam uma coloração castanho-amarelada e passou a ser designada por Gp-48-A.

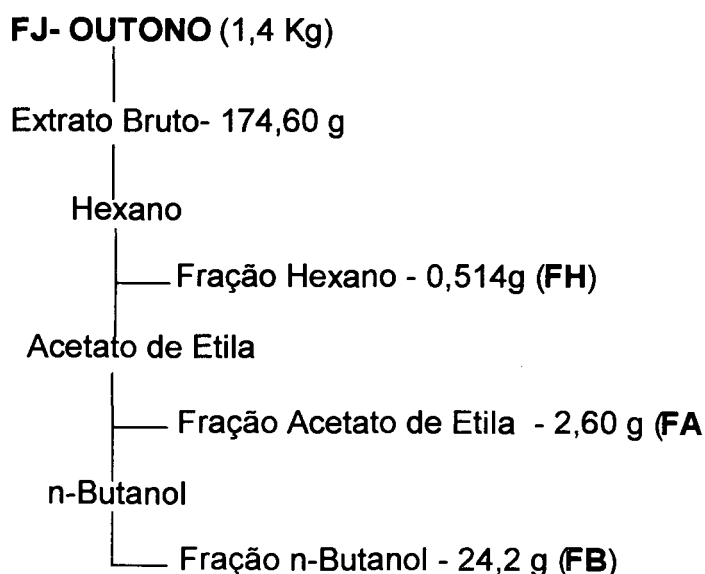
A fração 49 (3,0 g) foi cromatografada em uma coluna (30 x 1,5 cm) de sephadex LH-20 eluída com metanol, coletando-se frações de 10 mL cada. As

frações coletadas apresentavam três colorações distintas: castanho-escuro (Gp-49-C), vermelha (Gp-49-V) e castanho-amarelada (Gp-49-A).

A fração Gp-49-A (78,0 mg) foi cromatografada em uma coluna (35 x 1,5 cm) de silicagel 60 (5,0 g) eluida com clorofórmio, enriquecida com metanol em um gradiente de polaridade, coletando-se 32 frações de 100 mL cada. As frações 11-15 de Gp-49-A e a fração Gp-48-A foram reunidas e submetidas à Cromatografia Flash ¹⁰⁷ rendendo nas frações 6-9 (46,0 mg) de um sólido amarelo, denominado de **GP6/9-FVO**, posteriormente identificado como canferol (**45**) e 16,1 mg de outro sólido amarelo, nas frações 17-20 denominado de **GP17/20-FVO**, posteriormente identificado como quercetina (**46**).

4.2.2.1.2. . Fracionamento de Frondes Jovens - Outono

Parte da fração Acetato de Etila (**FA**), obtida conforme esquema 4, foi cromatografada (660 mg) em uma coluna (30,0x1,5 cm) de Si-gel 60 (50 g) usando-se como eluente uma mistura de clorofórmio e metanol nas proporções 9:1 (até fração 5), 8:2 (até fração 15), 7:3 (até fração 17) e 1:1 (até fração 20).



Esquema 4 - Procedimento usado para a obtenção do extrato bruto e frações de frondes jovens de outono de *G. pectinata*.

As frações 10-13 foram reunidas e, após evaporação do solvente, forneceram 145 mg de um sólido amorfo de coloração castanho-claro, denominado de **GP10/13-FJO**, posteriormente identificado como ácido siquímico (**44**).

Parte da fração n-butanol (**FB**) foi cromatografada (1,5 g) em uma coluna (30,0x1,5 cm) de Sephadex LH-20 usando-se como eluente metanol até a fração 12 e metanol/água 9:1 até a fração 15.

As frações 7-9 foram reunidas (827 mg) e, após evaporação do solvente, obteve-se um sólido de coloração castanho-claro que por CCD (clorofórmio/metanol 80;20) mostrou ser uma mistura de vários compostos, porém sendo o composto majoritário (55%) similar a **GP10/13-FJO (44)**.

Os extratos brutos e frações de frondes jovens e verdes de inverno e primavera foram obtidos de forma similar ao apresentado no esquema 4.

4.3. - Materiais Vegetais submetidos aos bioensaios

4.3.1. - *Clidemia hirta* (L.) D. Don.

As sementes de *C. hirta* (Melastomataceae, dicotiledónea) foram coletadas à medida em que foram efetuados os experimentos: outono(12 de junho de 1995),inverno (30 de agosto de 1994), primavera (16 de outubro de 1995), verão (28 de fevereiro de 1996) no Campus da Universidade Federal de Santa Catarina e na região de Santo Antônio de Lisboa, Florianópolis, S.C.

4.3.2. - *Lactuca sativa* var. *Grand rapids*

As sementes de *L. sativa* (alface) (Compositae, dicotiledónea) variedade Grand Rapids, lote 5150 (pureza, 95% e germinação 99,8%) e lote 7217 (pureza 99% e germinação 100%) foram adquiridas comercialmente

4.4.- Derivados da quercetina

4.4.1.- Acetilação

Em um balão de fundo redondo (50 mL) foram colocados 100 mg de quercetina, 5,0 mL de acetato de etila, 1,0 mL de ácido acético, 1,0 mL de anidrido acético e quantidade catalítica de DMAP. A mistura foi mantida sob agitação magnética, à temperatura ambiente, por 24 horas. Após esse período, foi extraída com éter etílico (3x 15 mL). A solução etérea foi secada com sulfato de magnésio anidro, filtrada, e o solvente evaporado em evaporador rotatório fornecendo um sólido branco amarelado resultante da acetilação dos grupos hidroxilas nas posições 3, 7, 3', 4', confirmados por experimentos de RMN.

4.4.2.- Metilação

Em um balão de fundo redondo (50 mL) foram colocados éter etílico (10 mL), 100 mg de quercetina, e uma solução etérea de diazometano (10 mL) previamente preparada. A mistura foi mantida sob agitação magnética, à temperatura ambiente, por aproximadamente 2 horas. O final da reação foi indicado pelo término da liberação de H₂ e por análise em CCD.

Após esse período, o solvente foi evaporado em rotavapor e o sólido resultante, de coloração amarela foi o produto da metilação dos grupos hidroxilas nas posições 3, 7 3', 4', confirmados por experimentos de RMN.

4.5.-Atividade antibacteriana

Os testes biológicos para verificar a atividade antibacteriana dos extratos e compostos em estudo foram realizados no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina pelo MsC. Alexandre Bella Cruz, sob a orientação da professora Dra. Eliane Moretto.

Os extratos e compostos puros foram investigados determinando-se a Concentração Mínima Inibitória (CMI) na presença das bactérias: *Staphylococcus aureus* (SA) ITALSFCO 001 (obtida do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL)

em Campinas / SP) ; Salmonella typhimurium FTPTAT 1035 (obtida da Fundação André Tosello (FTPTAT) em Campinas / SP.

Os valores de CMI foram determinados por uma técnica previamente descrita¹¹¹.

4.6. - Atividade antinociceptiva

Os testes farmacológicos com *Croton ururcurana* Baillon para investigação da ação analgésica do extrato metanólico bruto, das frações hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e dos compostos puros catequina e galocatequina (isolada da fração acetato de etila), β -sitosterol-glicosídeo (isolada da fração metanol I) e ácido acetil aleuritólico (isolado da fração Hex/DCM) foram realizados no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina pelo MsC. Adair R.S. Santos e pela aluna de pós-graduação Alessandra Beirith sob a orientação do Professor Dr. João Batista Calixto.

4.6.1. - Animais

Foram utilizados camundongos "Suiços" machos (25-35 g) acondicionados a 22 ± 2 °C com um ciclo 12 h claro/ 12 h escuro, com água e comida *ad libitum*. Os animais foram aclimatizados no laboratório por pelo menos uma hora antes da realização dos experimentos e utilizados apenas uma vez em cada teste.

4.6.2.- Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

A resposta nociceptiva foi induzida utilizando-se o "writhing test" com ácido acético (0,6 %, i.p.). As contorções consistem, basicamente, na contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão de uma das patas anteriores.

Os animais foram tratados com o extrato metanólico bruto (10-200 mg/Kg, i.p.), as frações hexano (10-60 mg/Kg, i.p), diclorometano (10-20 mg/Kg, i.p.), acetato de etila (10-180 mg/Kg, i.p.), metanol (1-60 mg/Kg, i.p.) e os compostos puros catequina (10-60 mg/Kg, i.p.), galocatequina (3-30 mg/Kg, i.p.), sitosterol-3-O- β -D-glicosídeo (10-60 mg/Kg, i.p.), ácido acetil aleuritólico (10-60 mg/Kg, i.p.) 30 min. antes da injeção do ácido acético. O grupo controle recebeu volume

semelhante de uma solução de NaCl 0,9 % (10 mL/Kg). Após a injeção de ácido acético, os camundongos foram observados em pares, colocados em caixas individuais, e o número de contorções foi contado cumulativamente durante um período de 20 minutos. A atividade analgésica foi expressa pela inibição do número de contorções dos animais pré-tratados com as frações ou com os compostos obtidos de *Croton urucurana* em relação ao grupo controle.¹¹²

4.6.3. - Dor induzida pela formalina

Os animais foram injetados com 20 µl de salina ou formalina (2,5%, s.c.) na região dorsal da pata posterior esquerda e direita, respectivamente. Logo após iniciou-se a observação da reação à dor, cronometrando-se durante 30 min. o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata, considerando-se esse período como indicativo de dor. Duas fases de sensibilidade são observadas nesse modelo, a primeira aparece nos primeiros 5 min. e a segunda ocorre entre 15 a 30 min. após a injeção de formalina, representando a resposta tônica e inflamatória relacionada com a liberação de mediadores químicos, respectivamente.¹¹³

Os animais foram tratados com catequina (10-100 mg/Kg, i.p.), galocatequina (3-60 mg/Kg, i.p.), sitosterol-3-O-β-D-glicosídeo (3-30 mg/Kg, i.p.) 30 min. antes da injeção de formalina. O grupo controle recebeu o veículo (NaCl, 0,9%; 10 mL/Kg) utilizado para diluir os compostos. Ao final do tempo de observação, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as patas posteriores cortadas e pesadas em balança analítica para quantificação do edema. A diferença de peso (mg) da pata direita (injetada com formalina) e da pata esquerda (injetada com salina) foi considerada como edema induzido pela formalina.

4.7.- Atividade Alelopática

Os bioensaios de germinação e crescimento foram realizados no Departamento de Botânica (Laboratório de sementes florestais - LASEF) sob a orientação da professora Dra. Maíke Hering de Queiroz, com o auxílio do técnico de laboratório Xisto Lehmkuhl e da aluna de graduação do curso de Ciências Biológicas, Flérida Regueira Cortizo. As sementes utilizadas como indicadores da

presença de aleloquímicos foram *Clidemia hirta* (L.) D. Don. e *Lactuca sativa*, variedade Grand Rapids.

Para os bioensaios de germinação a metodologia utilizada foi a de Nishimura et al ⁶⁰ e para os bioensaios de crescimento utilizou-se a metodologia de Barnes et al ⁵⁷ ambas com modificações adaptadas ao local.

4.7.1.-Bioensaios de germinação

As frações n-butanólicas e os compostos puros foram dissolvidos em solvente apropriado (acetona, etanol ou água, nas concentrações desejadas), impregnadas (1 mL) em discos de papel filtro Whatman n° 1 (5,5 cm de diâmetro) e posteriormente colocadas em placas de Petri (6,0 cm de diâmetro). Após a evaporação do solvente, Tween 80 (100 µg/mL; 1,5 mL) foi adicionado e deixado em repouso por uma noite. No dia seguinte, cada disco de papel filtro recebeu 50 sementes (distribuídas sem obedecer a um espaçamento uniforme), da espécie teste com 4 repetições conforme BRASIL ¹¹⁴

Como controle, procedimento similar foi utilizado, porém com ausência das frações ou compostos.

A germinação foi conduzida em germinador, modelo 347-G-FANEM, com condições de luz e temperatura (25 °C) constantes sendo os discos de papel filtro mantidos úmidos, através de regas com água destilada. As placas de Petri foram mudadas de lugar, no germinador, a cada 24 horas, durante a condução do experimento.

As leituras para avaliação do percentual de germinação de *L. sativa* foram diárias, enquanto que para *C. hirta* foram realizadas de três em três dias. O experimento foi considerado concluído quando a germinação foi nula por três contagens consecutivas.

Como critério de germinação foi estabelecido a protusão radicular.

Os dados obtidos foram submetidos ao modelo matemático proposto por An et al ⁴⁶ dentro do programa MICROCAL ORIGIN 3.0, à análise de variância ANOVA one-way e teste LSD (Least Significant Difference) dentro do programa STATGRAPHICS 5.1 (extratos aquosos) e ao teste de comparação de duas proporções sobre duas amostras independentes dentro do programa STATITCF versão 5 (frações n- butanólicas).

4.7.2.-Bioensaios de crescimento

Os discos de papel filtro impregnados com as soluções (1 mL) foram colocados em placas de Petri, sobre os quais foram semeadas 10 sementes em 4 repetições e incubadas com luz e temperatura constantes de 25 °C. Três dias após a protusão radicular, efetuou-se as medidas do comprimento da radícula e do hipocótilo com papel milimetrado.

O controle constituiu-se do papel filtro impregnado com o solvente utilizado na dissolução das frações ou compostos a serem testados e Tween 80 (100 µg/mL; 1,5 mL).

4.8. - Determinação do potencial osmótico

O potencial osmótico foi determinado no Departamento de Botânica da UFSC sob a orientação da Professora Dra. Ana Maria Viana, auxiliada pela técnica de laboratório Josy Zarur de Matos.

O método utilizado foi o Método de Chardakov ¹¹⁵ modificado e adaptado ao uso dos extratos aquosos de frondes jovens e frondes verdes de *G. pectinata*, cuja eficácia foi comprovada através das medidas dos potenciais osmóticos dos extratos aquosos de batata que foram similares aqueles observados na utilização do tecido vegetal (pedaços de batata)

O potencial osmótico dos extratos aquosos de frondes jovens e frondes verdes de *G. pectinata* a 8,66% foi de -0,3 bars.

4.9. - Análise histológica

O experimento da análise histológica foi realizado no Departamento de Botânica da UFSC sob a orientação do Prof. Dr. João de Deus Medeiros.

O material vegetal (*Lactuca sativa* var. Grand Rapids) anteriormente submetido aos ensaios de germinação e ensaios de crescimento foi utilizado na preparação de lâminas para observação microscópica, sendo fixado em F.A.A. 50° GL. ¹¹⁶ desidratado com álcool etílico e emblocado em parafina. ¹¹⁷

Os cortes foram obtidos através de micrótomo rotativo "American Optical", com espessura de 10 μm e submetido a coloração dupla com Fucsina básica e Azul de Astra.¹¹⁸

O testes histoquímicos para determinar a presença de compostos fenólicos foram realizados com o emprego de fixador de Schneider.¹¹⁹

As ilustrações das estruturas observadas foram feitas através de câmara clara A8x11 acoplada aos microscópio "Zeiss". As medidas do comprimento das células foram determinadas a partir da projeção das células em câmara clara, obtendo-se as dimensões em mm e convertendo-as a μm por método algébrico, tomando-se como referência a projeção de lâmina micrométrica.

Os dados obtidos foram tratados com o programa QUATRO PRO for windows e submetidos a tratamento estatístico dentro do programa MICROSTAT e à Análise de Variância ANOVA one-way.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico da espécie *Croton urucurana* Baillon (PR.) permitiu-nos as seguintes conclusões:

1) Dois novos diterpenos de esqueleto clerodano foram determinados como: 12-*epi*-metil-barbascoato e 15,16-epóxi-3,13 (16)-clerodatrieno-2-ona, além de β -sitosterol, estigmasterol e campesterol; ácido acetil aleuritólico; sonderianin; catequina; galocatequina e sitosterol-3-O- β -D-glicosídeo.

2) O ácido acetil aleuritólico isolado da fração Hex/DCM e a catequina isolada da fração AcOEt mostraram uma atividade de 0,1 mg/ml e 1,0 mg/ml respectivamente contra *S. aureus* e *S. typhimurium*, justificando pelo menos em parte o uso popular de *C. urucurana* como antibacteriana.

3) A catequina, galocatequina, ácido acetil aleuritólico e β -sitosterol-glicosídeo quando testados no modelo de dor induzida pela injeção intraplantar de formalina causaram efeito analgésico significativo quando avaliados na dor neurogênica (primeira fase) e inflamatória (segunda fase). Comparando a atividade dos extratos com a correspondente a seus compostos foram observadas diferenças que sugerem a existência de outro ou outros compostos mais ativos, mas não detectados, ou que existe um efeito sinérgico especial que requer pesquisa posterior.

O estudo fitoquímico da espécie *Gleichenia pectinata* levou-nos as seguintes conclusões:

4) De frondes verdes e jovens da estação outono foram isolados canferol, quercetina e ácido siquímico, ainda não descritos para este gênero.

Os extratos aquosos de *G. pectinata* coletada nas estações do outono, inverno e primavera causaram um retardo no tempo requerido para a germinação e um estímulo na germinação de *Clidemia hirta*.

As frações n-BuOH de frondes jovens e verdes de *G. pectinata* coletada nas três estações do ano mostraram um mecanismo de antecipação (17 dias) da germinação de *C. hirta*, e um efeito estimulador (94%) para ambas as frondes de primavera

A quercetina mostrou um efeito estimulador (45,0%) sobre a germinação de *C. hirta*.

O canferol não mostrou efeito sobre a germinação de *C. hirta*.

A mistura canferol/quercetina apresentou um estímulo de 104%. Estes resultados sugerem a existência de um efeito sinérgico de ambos os compostos.

O estudo de correlação entre estrutura-atividade realizado com a quercetina, quercetina acetilada e quercetina metilada mostrou que os efeitos variam segundo sua concentração podendo ir de inibição a estímulo ou inversamente. Isto não permitiu estabelecer uma similaridade de comportamento e portanto uma relação estrutura-atividade.

5) As frações n-BuOH de FJ e FV de *G. pectinata* á 3,84% de outono, inverno e primavera mostraram um mecanismo de retardo no tempo requerido para a germinação e inibiram a germinação de *L. sativa* var. Grand Rapids. Estas frações também causaram reduções no comprimento do hipocótilo e da radícula de *L. sativa* de até 91%.

A análise histológica das células da radícula submetidas às frações n-BuOH de FV-O e FV-I mostrou uma diferença significativa no comprimento médio das células da radícula de *L. sativa* o que pode indicar uma inibição da divisão celular, porém se observa uma estratégia de compensação via alongamento celular.

A análise histológica das células do hipocótilo submetida à frações n-BuOH de FJ-I e FJ-P mostrou uma redução significativa no comprimento médio das células do hipocótilo sugerindo também a inibição das divisões mitóticas, porém sem a estratégia de compensação via alongamento celular.

6)O ácido siquímico isolado da fração n-BuOH de FJ-O causou uma redução (10%) na taxa final de germinação de *L. sativa*, resultado similar ao observado para a fração n-BuOH (3,84%) de frondes jovens de outono. Tais resultados nos levam a pensar que o ácido siquímico deve ser um dos agentes alelopáticos responsáveis pela inibição da germinação de *L. sativa* var. Grand Rapids. O crescimento do hipocótilo e da radícula foi estimulado para todas as concentrações ensaiadas, exceto para o hipocótilo na concentração de 10^{-5} M.

O canferol, a quercetina, e quercetinas modificadas nas concentrações ensaiadas não exerceram influência sobre a germinação de *L. sativa*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- CAI, Y., CHEN, Z. P., PHILLIPSON, J. D. Diterpenes from *Croton lechleri*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 3, p. 755-760, 1993.
- 2- KUBO, I., HANKE, F. J., ASAKA, Y. et al. Insect antifeedants from tropical plants I. Structure of Dumsin. **Tetrahedron**, v. 46, n. 5, p. 1515-1522, 1990.
- 3- BRAZ FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um pacatubano. **Quím. Nov.**, v.17, n. 5, p. 405-445, 1994.
- 4- MONTANARI, C. A. Química medicinal: contribuição e perspectiva no desenvolvimento da farmacoterapia. **Quím. Nov.**, v.18, n. 1, p. 56-63, 1995.
- 5- BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. São Paulo: Livros Técnicos e Científicos, 1978. v. I, II, III.
- 6- SMITH, L. B., DOWNS, R. J., KLEIN, R. et al. Euforbiáceas. In: REITZ, R. **Flora ilustrada catarinense**. Itajai: EMPASC, 1988. 408 p.
- 7- CAI, Y., EVANS, F.J., ROBERTS, M. F. et al. Polyphenolic compounds from *Croton lechleri*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 6, p. 2033-2040, 1991.
- 8- AQUINO, R., CIAVATTA, M.L., DE SIMONE, F. Catechins from *Croton draconoides*. **Fitoterapia**, v. 62, n. 5, p. 454, 1991.
- 9- TCHISSAMBOU, L., CHIARONI, A., RICHE, C. et al. Crotochryliferan and Crotohaumanoxide, new diterpenes from *Croton haumanianus*. **Tetrahedron**, v. 46, n.15, p.5199-5202, 1990.
- 10- MACCHESNEY, J. D., SILVEIRA, E. R., CRAVEIRO, A. et al. The use of carbon-carbon connectivity in the structure determination of marmelerin, a novel benzofuran sesquiterpene from *Croton sonderianus*. **J. Org. Chem.**, v. 49, p. 5154-5157, 1984.
- 11- SATO, A., OGISO, A., KUWANO, H. Acyclic diterpenes from *Croton Kerrii*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 2207-2209, 1980.
- 12- CAI, Y., CHEN, Z. P., PHILLIPSON, J. D. Clerodane diterpenoids from *Croton Lechleri*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 265-268, 1993.

- 13- CRAVEIRO, A. A. & SILVEIRA, E. R. Two cleistanthane type diterpenes from *Croton sonderianus*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 10, p. 2571-2574, 1982.
- 14- KITAZAWA, E. & OGISO, A. Two diterpene alcohols from *Croton sublyratus*. **Phytochemistry**, v. 20, p. 287-289, 1981.
- 15- TAKAHASHI, S., KURABAYASHI, M., KITAZAWA, E. et al. Plaunolide, a furanoid diterpene from *Croton sublyratus*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 1, p. 302-303, 1983.
- 16- MONTE, F. J. Q., DANTAS, E. M. G., BRAZ FILHO, R. New diterpenoids from *Croton argyrophyloides*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 10, p. 3209-3212, 1988.
- 17- SATO, A., KURABAYASHI, M., OGISO, A. et al. Poilaneic acid, a cembranoid diterpene from *Croton Poilanei*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 8, p. 1915-1918, 1981.
- 18- BURKE, B. A., CHAN, W. R., PRINCE, E. C. et al. The structure of corylifuran, a clerodane-type diterpene from *Croton corylifolius* Lam. **Tetrahedron**, v. 32, p. 1881-1884, 1976.
- 19- SIEMS, K., DOMINGUEZ, X. A., JAKUPOVIC, J. Diterpenes and other constituents from *Croton cortesianus*. **Phytochemistry**, v.31, n. 12, p. 4363-4365, 1992.
- 20- MUKHERJEE, R. & AXT, E. M. Cyclitols from *Croton celtidifolius*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 11, p. 2682-2684, 1984.
- 21- LEMOS, T. I. G., MONTE, F. J. Q., MATOS, F. J. A. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from brazilian plants. **Fitoterapia**, v. 63, n. 3, p. 266, 1992.
- 22- PIETERS, L. A., VANDEN BERGHE, D. A., VLIETINCK, A. J. A dihydrobenzofuran lignan from *Croton erythrochilus*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 1, p. 348-349, 1990.
- 23- _____ DE BRUYNE, T., CLAEYS, M. et al. 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.
- 24- BETTOLO, R. M. & SCARPATI, M. L. Alkaloids of *Croton draconoides*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 520, 1979.

- 25- BARNES, R. A. & SOEIRO, O. M. The alkaloids of *Croton salutaris*. **Phytochemistry**, v. 20, p. 543-544, 1981.
- 26- TIWARI, K. P., CHOUDHARY, R. N., PANDEY, G. D. 3-Metoxo-4,6-dihydroxymorfinandien-7-one, an alkaloid from *Croton bonpladianum*. **Phytochemistry**, v. 20, n.4, p. 863-864, 1981.
- 27- KUPCHAN, S. M., UCHIDA, I., BRANFMAN, A. R. et al. Antileukemic principles isolated from Euphorbiaceae plants. **Science**, v.191, p. 571-572, 1976.
- 28- ICHIHARA Y., TAKEYA, K., HITOTSUYANAGI, Y. et al. Cajucarinolide and isocajucarinolide: Anti-inflammatory diterpenes from *Croton cajucara*. **Planta Med.**, v. 58, p. 549-551, 1992.
- 29- ALEXANDER, I. C., PASCOE, K. O., MANCHARD, P. et al. An insecticidal diterpene from *Croton linearis*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 6, p. 1801-1803, 1991.
- 30- CRAVEIRO, A.A., SILVEIRA, E.R., BRAZ FILHO, R. et al. Sonderianin, a furanoid diterpene from *Croton sonderianus*. **Phytochemistry**, v. 20, n.4, p. 852-854, 1981.
- 31- SILVEIRA, E.R. & McCHESNEY, J.D. 6,7-oxygenated neo-clerodane furan diterpenes from *Croton sonderianus*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 6, 1457-1463, 1994.
- 32- JOLY, A. B. Botânica. 3^{ed}. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1978.
- 33- SEHNEM, A. Gleiqueniáceas. In: REITZ, R. **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1970. 37 p.
- 34- QUEIROZ, M. H. de. **Approche phytoécologique et dynamique des 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**. Nancy-França, 1994. Tese (Doutorado em Ciências Florestais). E.N.G.R.E.F. - École Nationale du Génie rural, des Eaux et de Forêts.
- 35- WILLIAMSON, G. B. Allelopathy, Koch's Postulates, and the Neck Riddle. In: _____ **Perspectives on plant competition**. Department of Agriculture

- under agreement n. 88-33520-4077: Cooperative State research service U.S., 1990. p. 143-162.
- 36- GLIESSMAN, S.R. & MULLER, C.H. The phytotoxic potential of bracken (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn). **Madroño**, v. 21, p. 299-304, 1972.
- 37- STOWE, L. Allelopathy and its influence on the distribution of plants in an Illinois old-field. **J. Chem. Ecol.**, v.67, p. 1065-1085, 1979.
- 38- PUTNAM, A. R. & WESTON, L. A. Adverse impacts of allelopathy in agricultural systems. In: _____ **The science of allelopathy**. New York: John Wiley, 1986. p. 43-56.
- 39- EINHELLIG, F.A., MUTH, M.S., SCHON, M.K. Effects of allelochemicals on plant-water relationships. In: _____ **Chemistry of allelopathy: biochemical interaction among plants**. Washington: American Chemical Society, 1985. p. 181-195.
- 40- _____ Mechanisms and modes of action of allelochemicals. In: PUTNAM, A.R. & TANG, C.S. **The science of allelopathy**. New York: John Willey, 1986. p. 171-188.
- 41- STOREY, I. N. J. Allelopathy in bracken *Pteridium aquilinum* (Dennstaediaceae: Pteridophyta). **Fern Gaz.**, v.14, n. 2, p. 51-53, 1991.
- 42- STEWART, R. E. Allelopathic potential of western bracken. **J. Chem. Ecol.**, v. 1, n. 2, p. 161-169, 1975.
- 43- RICE, E. L. Allelopathy: An overview. In: WALLER, G. R. **Allelochemicals: role in agriculture and forestry**. ACS Symposium series n. 330, 1987. p. 8-22
- 44- WALLER, G. R. **Allelochemicals: role in agriculture and forestry**. ACS Symposium series n. 330, 1987
- 45- NORDLUND, D. A. Semiochemicals: a review of the terminology. In: NORDLUND, D., JONES, R .L., LEWIS, W .J. **Semiochemicals: their role in pest control**. New York: John Willey & Sons, 1981. p.13-28.
- 46- AN, M.; JOHNSON, I. R.; LOVETT, J. V. Mathematical modeling of allelopathy: biological response to allelochemicals and its interpretation. **J. Chem. Ecol.**, v.19, n. 10, p. 2379-2388, 1993.

- 47- LEATHER, G. R. & EINHELLIG, F. A. Bioassays in the study of allelopathy. In: PUTNAM, A. R.; TANG, C. S. **The science of allelopathy**. New York: John Willey, 1986. p.133-145.
- 48- EINHELLIG, F. A., LEATHER, G. R., HOBBS, L. L. Use of *Lemna minor* as a bioassay in allelopathy. **J. Chem. Ecol.**, v. 11, n. 1, p. 65-72, 1985.
- 49- WHITTAKER, R. H. & FEENY, P. P. Allelochemicals: chemical interactions between species. **Science**, v. 171, p. 757-770, 1971.
- 50- RICE, E. L. **Allelopathy**. 3.ed. New York: Academic Press, 1974.
- 51- ALMEIDA, F. S. de . **A alelopatia e as plantas**. Londrina: Fundação Instituto Agrônômico do Paraná, 1988.
- 52- BORGES, E. E. de L., LOPES, E. da S., SILVA, G. F. Avaliação de substâncias alelopáticas em vegetação de uma floresta secundária 1- Árvores. **Rev. árv.**, v. 17, n.1, p. 69-84, 1993.
- 53- _____ SILVA, G. F., LOPES, E. da S. Avaliação de substâncias alelopáticas em vegetação de uma floresta secundária 2- Arbustos. **Rev. Árv.**, v.18, n. 3, p. 275-286, 1994.
- 54- ALMEIDA, F. S. de . Efeitos alelopáticos de resíduos vegetais. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 26, n. 2, p. 221-236, 1991.
- 55- YAMADA, K., ANAI, T., HASEGAWA, K. Lepidimolide, as allelopathic substance in the exudates from germinated seeds. **Phytochemistry**, v. 39, n. 5, p. 1031-1032, 1995.
- 56- PÉREZ, F. J. Allelopathic effect of hydroxamic acids from cereals on *Avena sativa* and *Avena fatua*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 3, p. 773-776, 1990.
- 57- BARNES, J. P., PUTNAM, A. R., ZBURKE, B. A. et al. Isolation and characterization of allelochemicals in rye herbage. **Phytochemistry**, v. 26, n. 5, p. 1385-1390, 1987.
- 58- TANRISEVER, N., FISCHER, N.H., WILLIAMSON, G.B. Menthofurans from *Calamintha ashei*: effects on *Schizachyrium scoparium* and *Lactuca sativa*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 8, p. 2523-2526, 1988.
- 59- _____ FRONCZEK, F.R.; FISCHER, N.H. et al. Ceratiolin and other flavonoids from *Ceratiola ericoides*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 1, p. 175-179, 1987.

- 60- NISHIMURA, H., NAKAMURA, T., MIZUTANI, J. Allelopathic effects of p-menthane-3,8-diols in *Eucalyptus citriodora*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 12, p. 2777-2779, 1984.
- 61- PELLISSIER, F. Allelopathic inhibition of spruce germination. **Acta Ecolog.**, v. 14, n. 2, p. 211-218, 1993.
- 62- ONIKI, T. & VALIO, F.M. Endogenous coumarin and germination of seeds of *Myroxylon peruiferum* L.f. (cabriúva). **Rev. Bras. Bot.**, v. 15, n. 1, p. 43-45, 1992.
- 63- GLASS, A. D .M. & BOHM, B .A. The accumulation of cinnamic and benzoic acid derivatives in *Pteridium aquilinum* and *Athyrium felix-femina*. **Phytochemistry**, v .8, p. 371-377, 1969.
- 64- EINHELLIG, F. A. & RASMUSSEN, J .A. Effects of three phenolic acids on chlorophyll content and growth of soybean and grain sorghum seedlings. **J. Chem. Ecol.**, v. 5, n. 5, p. 815-824, 1979.
- 65- _____ ECKRICH, P .C. Interactions of temperature and ferulic acid stress on grain sorghum and soybeans. **J. Chem. Ecol.**, v. 10, n. 1, p. 161-170, 1984.
- 66- HEDIN, P .A. (ed.) **Bioregulators for pest control**. ACS Symposium Series 276. Washington: American Chemical Society, 455-468, 1984.
- 67- GLIESSMAN, S. R. & MULLER, C .H. The allelopathic mechanisms of dominance in bracken (*Pteridium aquilinum*) in Southern California. **J. Chem. Ecol.**, v. 4, n. 3, p. 337-362, 1978.
- 68- _____ Allelopathy in a broad spectrum of enviroments as illustrated by bracken. **Botan. J. Linn. Soc.**, v. 73, p. 95-104, 1976.
- 69- JONES, C. G. & FIRN, R .D. Some allelochemicals of *Pteridium aquilinum* and their involvement in resistance to *Pieris brassicae*. **Biol. System. Ecol.**, v. 7, p. 187-192, 1979.
- 70- GLASS, A .D. M. The allelopathic potentail of phenolic acids associated with the rhizosphere of *Pteridium aquilinum*. **Can. J. Bot.**, v. 54, p. 2440-2444, 1976.
- 71- WALLACE, J. W. & MARKHAM, K. R. Flavonoids of the primitive ferns: *Stromatopteris*, *Schizaea*, *Gleichenia*, *Hymenophyllum*, and *Cardiomanes*. **Amer. J. Bot.**, v. 65, n. 6, p. 965-969, 1976.

- 72- SIDDIQUI, H .L., MUNESADA, K., SUGA, T. Biologically active novel clerodane-type diterpene glycosides from the root-stalks of *Gleichenia japonica*. **Chem. Lett.**, p. 701-704, 1991.
- 73- MUNESADA, K., SIDDIQUI, H.L., SUGA, T. Biologically active labdane-type diterpene glycosides from the root-stalks of *Gleichenia japonica*. **Phytochemistry**, v.31, n. 5, p. 1533-1536, 1992.
- 74- SIDDIQUI, H .L., MUNESADA, K., SUGA, T. Biologically active clerodane-type diterpene alcohol and glycosides from the root-stalks of ferns. **J. C. S. Perkin Trans. I**, n. 7, p. 781-785, 1992.
- 75- AKIHISA, T., KOKKE, W. C .M .C., HAYASHI, Y. et al. Triterpene alcohols and sterols from the fern *Gleichenia japonica* SPR. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 41, n. 3, p. 624-26, 1993.
- 76- SHIOJIMA, K., MATSUMURA, M.S.T., AGETA, H. Fern constituent: A new triterpenoid hydrocarbon, trisnorhopane, isolated from the leaves of *Dryopteris crassirhizoma* and *Gleichenia japonica*. **Chem. Pharm. Bull.** v. 42, n. 2 , p. 377-378, 1994.
- 77- CORTIZO, F.R. **Estudo preliminar do efeito alelopático de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn e *Gleichenia pectinata* (Willd) SPR. sobre a germinação de espécies nativas.** Florianópolis, SC, 1994. Trabalho apresentado para obter o grau de bacharel em Ciências Biológicas - Departamento de Botânica, UFSC,
- 78- PIZZOLATTI, M.G. **Constituintes químicos de *Velozias* brasileiras e reatividade química de diterpenos.** Rio de Janeiro, 1992. Tese de doutorado em química orgânica - NPPN, UFRJ
- 79- NIERO, R. **Isolamento e Identificação de compostos de *Phyllanthus cocorvadensis* (Euphorbiaceae) com efeito analgésico; correlação estrutura-atividade.** Florianópolis, 1993. Dissertação de Mestrado em Ciências - Departamento de Química, UFSC.
- 80- MACHADO, E.C. **Estudo químico das espécies *Eubrachion ambiguum* Hook & Arn, Loranthaceae, e *Cecropia catharinensis* Quatrecasas,**

Moraceae. Florianópolis, 1995. Tese de doutorado em Química - Departamento de Química, UFSC.

- 81- CARNEIRO, E. **Identificação de glicosídeos na *Hymenaea martiana* Hayne, Arzeik. Estruturas e Atividades farmacológicas.** Florianópolis, 1989. Dissertação de Mestrado em Ciências - Departamento de Química, UFSC.
- 82- MISRA, D.R. & KHASTGIR, H.N. Chemical Investigation of Aleurites montana and the structure of Aleuritolic Acid - a new triterpene acid. **Tetrahedron**, v. 26, n. 12, p. 3017-3021, 1970.
- 83- McLEAN, S., PERPICK-DUMONT, M., REYNOLDS, W.F. et al. Unambiguous structural and nuclear magnetic resonance spectral characterization of two triterpenoids of Maprounea guianensis by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Can. J. Chem.**, v. 65, p. 2519-2525, 1987.
- 84- DELLE MONACHE, F., FERRARI, F., POCE-TUCCI, A. et al. Catequins with (+) epi-configuration in nature. **Phytochemistry**, v. 1, p. 2333, 1972.
- 85- SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tanins. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991.
- 86- DELLE MONACHE, F. A. bianthraquinone and 4'-O-methyl-ent-galocatechin from Cassia trachypus. **Phytochemistry**, v. 31, n. 1, p. 259-261, 1992.
- 87- WILSON, S.R.; NEUBERT, L.A.; HUFFMAN, J.C. The chemistry of the Euphorbiaceae. A new diterpene from Croton californicus. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 98, n. 12, p. 3669-3674, 1976.
- 88- DADOUN, H., MULLER, A.H., CESARIO, M. et al. Cordatin, a new diterpene from Aparisthimum cordatum. **Phytochemistry**, v. 26, n. 7, p. 2108-2110, 1987.
- 89- PERES, M.T.L.P., PIZZOLATTI, M.G., YUNES, R.A. et al. Clerodane diterpenes of *Croton urucurana*. **Phytochemistry**, (aceito para publicação em outubro/97).
- 90- RAHMAN, A. & AHMAD, V.V. **¹³C NMR of natural products.** New York: Plenum Press, 1989.
- 91- MANABE, S. & NISHINO, C. Stereochemistry of cis-clerodane diterpenes. **Tetrahedron**, v. 42, n. 13, p. 3461-3470, 1986.

- 92- FUKUOKA, M. Chemical and toxicological studies on bracken fern, *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*. VI. Isolation of 5-O-Caffeoylshikimic acid as an antithiamine factor. **Chem. Pharm. Bull.**, v.30, p. 3219-3224, 1982.
- 93- HALL, L.D. The conformation of cyclic compounds in solution.I. Shikimic acid. **J. Org. Chem.**, v. 29, p. 297-299, 1964.
- 94- MARKHAM, K.R., TERNAI, B., STANLEY, R. et al. Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. **Tetrahedron**, v. 34, p. 1389-1397, 1977.
- 95- AGRAWAL, P.K. & RASTOGI, P. ¹³C-NMR spectroscopy of flavonoids. **Heterocycles**, v. 16, n. 12, p. 2181-2236, 1981.
- 96- AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of flavonoids**. Holanda: Elsevier, 1989.
- 97- PERES, M.T.L.P.; DELLE MONACHE, F.; BELLA-CRUZ, A. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). **J. Ethnopharm.**, v. 56, p. 223-226, 1997.
- 98- SANTOS, A.R.S., NIERO, R., CECHINEL-FILHO, V. et al. Antinociceptive properties of steroids isolated from *Phyllanthus cocorvadensis* in mice. **Planta Med.**, v. 61, p. 329-332, 1995.
- 99- PERES, M.T.L.P., DELLE MONACHE, F., PIZZOLATTI, M.G. et al. Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. Pharmaco-chemical criteria used in their isolation. **Phytoterapy Research** (submetido para publicação, maio/97).
- 100- VÁZQUEZ-YANES, C. & OROZCO- SEGOVIA, A. Ecophysiology of seed germination in the tropical humid forest of the world: A review. In: MEDDINA, C.; MOONEY, H.A.; VÁZQUEZ-YANES, C. (ed.) **Physiological Ecology of plants in the wet tropics**. The Hague: Junk Publishers, 1984. The Hague. 37-50. Task for vegetation science. 12. 1984.
- 101- PERES, M. T. L. P., PIZZOLATTI, M. G., QUEIROZ, M. H. de et al. Potencial de Atividade alelopática de *Gleichenia pectinata* Willd (PR.) **Pesq. Agropec. Brasil.**, (aceito para publicação, jun/97).

- 102- STENLID, G. Flavonoids as inhibitors of the formation of adenosine triphosphate in plant mitochondria. **Phytochemistry**, v.9, p.2251-2256, 1970.
- 103- ELLIGER, C.A., CHAN, B.C., WAISS, A.C. Flavonoids as larval growth inhibitors. Structural factors governing toxicity. **Naturwissenschaften**, v .67, n. 7, p. 358-360, 1980.
- 104- INDERJIT, DAKSHINI, K.M.M., EINHELLIG, F.. **Allelopathy-organisms, processes and applications**. ACS Symposium Series 582. Washington: American Chemical Society, 1995.
- 105- JACOBI, U.S. & Ferreira, G.A. Efeitos alelopáticos de *Mimosa bimucronata* (DC) OK. sobre espécies cultivadas. **Pesq. Agropec. Brasil.**, v. 26, n. 7, p. 935-943, 1991.
- 106- SALAS, M.C. & VIEITIZ, E. Inhibidores de germinacion en Ericaceas. **Anal. Inst. Cavanilles**, v. 32, n. 2, p. 619-631, 1975.
- 107- MULLER, W.H. Allelochemical mechanism in the inhibition of herbs by Chaparral Shrubs. In: PUTNAM, A. R. & TANG, C. S. **The science of allelopathy**. New York: John Willey, 1986. p.189-199,
- 108- GEMMEL, A.R.. **Anatomia do vegetal em desenvolvimento**. São Paulo: Edusp,v. 12 1981.
- 109- ROMBERGER, J.A.. **Meristems, growth and development in woody plants**. Technical Bulletin n.1293, US. Department of Agriculture, Forest service. Beltsville, Md., 1963.
- 110- STILL, W.C. & MITRA, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. **J. Org. Chem**, v. 43, n. 14, p. 2923-2925, 1978.
- 111- MITSCHEN, L.A., LEU, R.P., BATHOLA, M.S. et al. Antimicrobial agents from higher plants. I: Introduction to rationale on methodology. **Lloydia**, v. 35, p. 157-166, 1972.
- 112- SANTOS, A.R.S., CECHINEL-FILHO, V., NIERO, R. et al. Analgesic effects of callus culture extracts from selected species of *Phyllanthus* in mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 46, p. 755-794, 1994.

- 113- CORREA, C.R., CALIXTO, J.B.. Evidence for participation of B₁ and B₂ kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, p. 193-198, 1993.
- 114- BRASIL. **Ministério da Agricultura**. Regras para análise de sementes. 365 pp. 1992.
- 115- SALISBURY, F.B. & ROSS, C.W.. **Plant Physiology**. 4^{ed.} Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1992.
- 116- Johansen, D.A. **Plant Microtech**. New York: Mc Grow Hill, 1940.
- 117- SASS, J.E.. **Botanical Microtech**. 2. ed. IOWA: 1951.
- 118- ROESER, K.R. Die Nadel der schwazkiefermassen produkt und kuntswerk der natur. **Mikrokosmo**, v. 61, n. 2, p. 33-36, 1972.
- 119- SCHNEIDER, H. Indicator hosts for pear decline. Symptomatology, hystology and distribution of mycoplasmalides organisms in leaf veins. **Phytopatology**, v. 67, p. 592-601, 1977.