



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

IURI BEZERRA DE BARROS

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS  
DE *Coccoloba mollis***

---

Londrina  
2009

IURI BEZERRA DE BARROS

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS  
DE *Coccoloba mollis***

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química de Recursos Naturais da Universidade Estadual de Londrina para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Dalva Trevisan Ferreira

Londrina  
2009

IURI BEZERRA DE BARROS

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS  
DE *Coccoloba mollis***

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química de Recursos Naturais da Universidade Estadual de Londrina para obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Dalva Trevisan Ferreira  
UEL – Londrina - PR

---

Profa. Dra. Silvana Maria de Oliveira Santin  
UEM – Maringá - PR

---

Profa. Dra. Maria Inês Rezende  
UEL – Londrina - PR

Londrina, 30 de Março de 2009.

A minha família.

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Dalva Trevisan Ferreira pela orientação neste trabalho, e também pela sua amizade e apoio.

Ao Mestre Jurandir Pereira Pinto, o grande deus da cromatografia por todo o apoio técnico e principalmente a amizade.

À Profa. Dra. Maria José Sparça Salles de Faria e a todos os estagiários do Laboratório de Toxicologia do Desenvolvimento, especialmente a Liliane Kelen Miguel sem os quais seria impossível a realização do estudo de toxicologia materna.

À Profa. Dra. Maria Inês Rezende e Profa. Dra. Juliana Feijó de Souza Daniel que possibilitaram os ensaios de atividade antimicrobiana.

À Profa. Ms. Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni, ao técnico do Laboratório de Ciências Farmacêuticas Nelson Heitor Fuzinato e o aluno Gideão Silva Ribeiro pelo auxílio na quimiprospecção.

À Profa. Dra. Lúcia Sadayo Assari Takahashi pelo orientação no ensaio de atividade alelopática.

Aos professores Dr. Fernando César de Macedo Júnior, Dr. Cesar Cornélio Andrei e Dra. Terezinha de Jesus Faria que muito contribuíram na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Raimundo Braz Filho da Universidade Estadual Norte Fluminense e o Prof. Dr. Mario Geraldo de Carvalho da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pelos espectros de RMN.

À Profa. Dra. Ana Odete Santos Vieira pela identificação da espécie.

Aos meus irmãos de bancada, Queli Cristina Fidelis, Ana Laura Mantuani Ivan, Luiz Fernando Lepre, Priscilla Bernardes, Gabriel F. dos Santos sem os quais esse trabalho seria inviável.

Aos amigos Danilo Antonio Giarola (Cowboy) e Luciana Natalia Cividatti por todas as risadas.

À minha namorada Dayana Lacerda Custódio pela amizade, carinho e amor.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Mestrado em Química dos Recursos Naturais por viabilizarem o trabalho.

À Capes pelo apoio financeiro.

***Eu não sei quase nada, mas desconfio de  
muita coisa.***

***João Guimarães Rosa***

BARROS, Iuri Bezerra de. **Avaliação química e das atividades biológicas de *Coccoloba mollis***. 2009. 127f. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

## RESUMO

*Coccoloba mollis* (Polygonaceae) é uma planta medicinal amplamente utilizada em Londrina-PR como energético e modulador da memória. Este trabalho apresenta a avaliação química dos extratos etanólicos das raízes e folhas de *C. mollis* e testes biológicos. Os extratos foram submetidos a processos cromatográficos usuais de fracionamento e purificação em Química de Produtos Naturais conduzindo ao isolamento dos seguintes constituintes: Nas folhas e raízes foram identificadas misturas de hidrocarbonetos alifáticos de cadeias longas (C-28 a C-34 excetuando C-30 e 31 e C-16 a C-31 exceto o C-17 respectivamente) e ésteres etílicos de ácidos graxos (C- 18, 22, 24, 25 e 27 e C - 12, 15, 18, 22, 25, 26, 27 respectivamente), nas raízes foram identificadas duas antraquinonas: a emodina (1,6,8-trihidroxi-3- metil-antraquinona) e a fisiona (1,8-dihidroxi-3-metil-6-metoxi-antraquinona) e nas folhas um triterpeno, a taraxerona (13a- metil - 27-norolean-14-en-3-ona (D-Friedoolean-14-en-3-ona)) e o malato de dietila. A quimioprospecção realizada com as raízes e as folhas utilizando-se de métodos farmacognósticos revelou a presença de flavonóides e taninos, em ambas, e antraquinonas apenas nas raízes. Os extratos das raízes e das folhas foram submetidos a testes biológicos: avaliação da atividade antioxidante (DPPH), da atividade antimicrobiana, alelopatia, letalidade de *Artemia salina* e toxicidade materna em camundongos. O poder antioxidante (CMI<sub>50</sub> ug/mL) resultante das folhas (10,11 ± 0,12) e das raízes (15,96 ± 0,55) apresentaram valores semelhantes aos do BHT (butil hidroxi tolueno). Nos testes antimicrobianos as raízes apresentam a melhor atividade antibacteriana e as folhas melhor atividade antifúngica. As raízes apresentaram maior toxicidade em relação à *Artemia salina*, e ambos os extratos não revelaram toxicidade materna nas concentrações testadas. As antraquinonas isoladas das raízes revelaram atividade antifúngica.

**Palavras-chave:** *Coccoloba mollis*. Avaliação química. Antioxidante. Antimicrobianos. Toxicidade materna.

BARROS, Iuri Bezerra de. **Evaluation of chemical and biological activities of *Coccoloba mollis***. 2009. 127f. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

### ABSTRACT

*Coccoloba mollis* (Polygonaceae) is a plant that is being used as medicine in Londrina (memory herb), this specie has been praised as efficient in the treatment of stress, and as memory modulator. This work presents the chemical evaluation of the root and leaf ethanolic extracts of *C. mollis* and biological tests. The extracts were submitted to usual chromatographic methods of separation and purification in Natural Products Chemistry. Leading to the isolation of the following constituents: In the leaves and roots were identified aliphatic hydrocarbons (C-16 to C-31 except -17 and C-28 to C-34 except C-30 and 31 respectively) and fatty acids ethyl esters ( C - 18, 22, 24, 25 and 27 and C - 12, 15, 18, 22, 25, 26, and 27 respectively) . In the roots they were identified two anthraquinones emodin (1,6,8-trihydroxy-3- methyl-anthraquinone) and fission (1,8-dihydroxy-3-methyl-6-metoxi-anthraquinone). In the leaves one triterpen taraxerone (13a- methyl - 27-norolean-14-en-3-one (<i>i</i>-friedoolean-14-en-3-one)) and diethyl malate. Phytochemical screening have been characterized using pharmacognostic methods to determine the major chemical groups present in roots and leafs of this species. Flavonois and tannins in both and anthraquinones in roots. The extracts of roots and leaves were subjected to biological tests: Evaluation of antioxidant activity (DPPH), antimicrobial activity, allelopathy, lethality of *Artemia salina* and maternal toxicity in mice. The antioxidant activity (CMI<sub>50</sub> ug/mL) das folhas (10.11 ± 0.12) e raizes (15.96 ± 0.55) are similar of BHT (butylateg hydroxytoluene). Antimicrobial tests roots showed the best results as antibacterial and the leaves as antifungal. Roots presented toxicity larger against *Artemia salina* than leaves. and both extracts don't show maternal toxicity at the concentrations assayed. The isolated anthraquinones showed antifungal activity.

**Key words:** *Coccoloba mollis*. Chemical evaluation. Antioxidant. Antimicrobial. Maternal toxicity.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5 <sub>H</sub> -	deslocamento químico de hidrogênio
S <sub>C</sub> -	deslocamento químico de carbono
<b>X</b> -	comprimento de onda
%ASR -	atividade de seqüestro de radicais
ANOVA -	análise de variância
AVC -	acidente vascular cerebral
BDA -	Batata Dextrose Ágar
BHT -	2,6-di-t-butil-4-metil-fenol
CG-DIC -	cromatografia gasosa com detector de ionização de chama
CG-EM -	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CMF-1 -	mistura de hidrocarbonetos obtida da fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas de <i>C. mollis</i>
CMF-2 -	mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos obtida da fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas de <i>C. mollis</i>
CMF-3 -	taraxerona obtida da fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas de <i>C. mollis</i>
CMF-4 -	malato de dietila obtido da fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas de <i>C. mollis</i>
CMI50 -	concentração mínima inibitória de 50%
CMR-1 -	mistura de hidrocarbonetos obtida da fração hexano do extrato etanólico das raízes de <i>C. mollis</i>
CMR-2 -	mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos obtida da fração hexano do extrato etanólico das raízes de <i>C. mollis</i>
CMR-3 -	fisciona obtida da fração hexano do extrato etanólico das raízes de <i>C. mollis</i>
CMR-4 -	emodina obtida da fração hexano do extrato etanólico das raízes de <i>C. mollis</i>
DMSO -	dimetilsulfóxido
DPPH -	2,2- difenil-1-picril-hidrazil

EM -	espectrometria de massas
EPM -	erro padrão da medição
FDA -	<i>Food and Drug Association</i>
IV -	Infravermelho
IVG -	índice de velocidade de germinação
LC50 -	concentração letal 50%
m/z -	relação massa carga
NDA -	<i>new drug application</i>
PBS -	<i>Phosphate buffered saline</i>
RMN	ressonância magnética nuclear
ROS -	substâncias reativas oxigenadas
SAMR	<i>Staphylococcus aureus</i> metilicina-resistentes
TPPI -	taxa de perdas pós-implantação
UFC -	unidades formadoras de colônia
UV -	ultravioleta
v/v -	volume / volume
VRE -	vancomicina resistente <i>Enterococcus</i>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estruturas de substâncias utilizadas como princípios ativos isolados de plantas.....	20
<b>Figura 2</b> - Estrutura da palitoxina.....	22
<b>Figura 3</b> - Da planta aos princípios ativos.....	25
<b>Figura 4</b> - Rotas biossintéticas resumidas dos metabólitos secundários.....	26
<b>Figura 5</b> - Rota biossintética dos ácidos graxos.....	29
<b>Figura 6</b> - Rota biossintética dos terpenóides e esteróides.....	32
<b>Figura 7</b> - Ácido giberélico.....	33
<b>Figura 8</b> - Estrutura básica das antraquinonas.....	34
<b>Figura 9</b> - Rota biossintética das antraquinonas exclusivamente via acetato.....	35
<b>Figura 10</b> - Rota biossintética das antraquinonas via acetato – chiquimato.....	36
<b>Figura 11</b> - Estrutura da alizarina (1,2-dihidroxi-9,10-antracenediona).....	37
<b>Figura 12</b> - Estrutura básica dos flavonóides.....	37
<b>Figura 13</b> - Estrutura básica das diferentes classes de flavonóides.....	38
<b>Figura 14</b> - Rota biossintética dos flavonóides.....	39
<b>Figura 15</b> - Exemplos de tanino condensado (proantocianidina) e hidrolisável (corilagina).....	40
<b>Figura 16</b> - Estrutura da betulina e $\beta$ -sitosterol isolados da <i>C. Acrostichoides</i> .....	44
<b>Figura 17</b> - Triterpenos isolados de <i>C. Dugandiana</i> .....	45
<b>Figura 18</b> - Estrutura da miricetina-3-ramnosídeo, flavonóide encontrado em <i>C. Dugandiana</i> .....	45
<b>Figura 19</b> - Estrutura do ácido gálico, presente na <i>C. Dugandiana</i> .....	46
<b>Figura 20</b> - Antraquinonas isoladas da <i>C. Uvifera</i> .....	47
<b>Figura 21</b> - Estrutura da a-amirina isolada da <i>C. Uvifera</i> .....	47
<b>Figura 22</b> - <i>Coccoloba mollis</i> .....	49
<b>Figura 23</b> - Estrutura das substâncias já isoladas na <i>Coccoloba mollis</i> .....	50
<b>Figura 24</b> - Representação da reação entre o DPPH e a molécula doadora de hidrogênios, formando a molécula estável reduzida DPPH-H.....	56

<b>Figura 25</b> - A - Cromatograma da amostra CMF-1; B - Cromatograma da amostra CMR-1 .....	82
<b>Figura 26</b> - Número de carbonos x tempo de retenção em minutos .....	83
<b>Figura 27</b> - A - Cromatograma da amostra CMF-2; B - Cromatograma da amostra CMR-2 .....	84
<b>Figura 28</b> - Gráfico relacionando o número de carbonos dos ésteres etílicos de ácidos graxos vs. o tempo de retenção em minutos .....	84
<b>Figura 29</b> - Cromatograma da amostra CMR-3.....	85
<b>Figura 30</b> - Proposta de fragmentação para a fisiona .....	86
<b>Figura 31</b> - Cromatograma da amostra CMR-4.....	87
<b>Figura 32</b> - Proposta de fragmentação para a emodina.....	88
<b>Figura 33</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra CMR-3 .....	90
<b>Figura 34</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra CMR-4 .....	91
<b>Figura 35</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da amostra CMR-3 .....	92
<b>Figura 36</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da amostra CMR-4 .....	93
<b>Figura 37</b> - Cromatograma da amostra CMF-3.....	95
<b>Figura 38</b> - Proposta de fragmentação para a tarexona .....	96
<b>Figura 39</b> - Fragmentação via retro Diels-Alder em triterpenos da classe dos ursanos e oleananos .....	97
<b>Figura 40</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra CMF-3.....	99
<b>Figura 41</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da amostra CMF-3 .....	100
<b>Figura 42</b> - Ampliação da região entre 13 e 31 ppm do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da amostra CMF-3.....	101
<b>Figura 43</b> - Ampliação da região entre 31 e 56 ppm do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da amostra CMF-3.....	102
<b>Figura 44</b> - Cromatograma da amostra CMF-4 .....	103
<b>Figura 45</b> - Proposta de fragmentação para o malato de dietila .....	104
<b>Figura 46</b> - Gráfico da % de <i>Artemia salina</i> Lench vivos vs. logaritmo da concentração do extrato etanólico das raízes (A) e folhas (B) da <i>C. Mollis</i> .....	106

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Fármacos baseados em produtos naturais em diferentes estágios de Desenvolvimento .....	23
<b>Tabela 2</b> - Categorias terapêuticas de fármacos derivados de produtos naturais nos diferentes estágios de desenvolvimento .....	24
<b>Tabela 3</b> - Classificação das substâncias químicas de acordo com o seu potencial teratogênico, segundo o FDA.....	53
<b>Tabela 4</b> - Quimioprospecção de <i>Coccoloba mollis</i> .....	81
<b>Tabela 5</b> - Deslocamentos químicos observados para as amostras CMR-3 e CMR-4 de referência para a fisciona e emodina respectivamente .....	89
<b>Tabela 6</b> - Deslocamentos químicos observados para a amostra CMF-3 e valores de referência para taraxerona.....	98
<b>Tabela 7</b> - Efeitos do tratamento nos parâmetros maternos de camundongos .....	105
<b>Tabela 8</b> - Efeitos do tratamento nos parâmetros relativos ao desenvolvimento intra-uterino da prole.....	105
<b>Tabela 9</b> - Atividade antioxidante (expressa em CMI <sub>50</sub> ) dos extratos de <i>Coccoloba mollis</i> .....	108
<b>Tabela 10</b> - Atividade antibacteriana dos extratos etanólicos de <i>Coccoloba mollis</i> .....	109
<b>Tabela 11</b> - Atividade antifúngica dos extratos etanólicos de <i>Coccoloba mollis</i> .....	109
<b>Tabela 12</b> - Atividade antifúngica dos extratos etanólicos de folhas e raízes de <i>C. mollis</i> e da fisciona e da emodina .....	110
<b>Tabela 13</b> - Atividade alelopática dos extratos etanólicos das raízes e das folhas de <i>C. Mollis</i> .....	111

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	18
2.1 OBJETIVO GERAL .....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	19
3.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE PRODUTOS NATURAIS .....	19
3.2 METABOLITES SECUNDÁRIOS .....	25
3.2.1 Ácidos Graxos e Derivados .....	28
3.2.1.1 Hidrocarbonetos alifáticos de cadeia longa .....	29
3.2.1.2 Ésteres alifáticos de cadeia longa .....	30
3.2.2 Terpenos e Esteróides .....	31
3.2.3 Antraquinonas .....	33
3.2.4 Flavonóides .....	37
3.2.5 Taninos.....	40
3.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL .....	42
3.4 POLYGONACEAE .....	43
3.4.1 O Gênero <b>Coccoloba</b> .....	43
3.4.1.1 <i>Coccoloba acrostichoides</i> .....	43
3.4.1.2 <i>Coccoloba dugandiana</i> .....	44
3.4.1.3 <i>Coccoloba excoriate</i> .....	46
3.4.1.4 <i>Coccoloba uvifera</i> .....	46
3.4.2 <i>Coccoloba mollis</i> .....	48
3.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA .....	51
3.5.1 Testes de Toxicidade Reprodutiva .....	52
3.5.2 Toxicidade sobre <b>Artemia salina</b> Leach .....	54
3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	55

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	57
3.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO.....	61
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>63</b>
4.1 MATERIAL VEGETAL .....	63
4.2 QUIMIOPROSPECÇÃO.....	63
4.2.1 Pesquisa de Heterosídeos Fenólicos Simples .....	63
4.2.2 Pesquisa de Flavonóides .....	64
4.2.3 Pesquisa de Cumarinas .....	64
4.2.4 Pesquisa de Taninos .....	65
4.2.5 Pesquisa de Antraquinonas.....	66
4.2.6 Pesquisa de Saponinas.....	66
4.2.7 Pesquisa de Glicosídeos Cardiotônicos .....	67
4.2.7.1 Reagente de Kedde.....	68
4.2.8 Pesquisa de Alcalóides .....	68
4.2.8.1 Reagente de Dragendorff .....	69
4.2.8.2 Reagente de Mayer .....	69
4.2.8.3 Reagente Bertrant .....	69
4.3 DESENVOLVIMENTO FITOQUÍMICO .....	70
4.3.1 Equipamentos .....	70
4.3.2 Obtenção dos Extratos Brutos e das Frações.....	70
4.3.3 Isolamento e Purificação dos Constituintes.....	71
4.3.4 Isolamento e Purificação de Constituintes do Extrato Hexânico das Raízes .....	71
4.3.5 Isolamento e Purificação de Constituintes do Extrato em Acetato de Etila das Folhas .....	72
4.3.6 Revelador de Vanilina .....	72
4.4 TOXICIDADE MATERNA DOS EXTRATOS DE <b>COCCOLOBA MOLLIS</b> .....	73
4.4.1 Animais.....	73
4.4.2 Grupos Experimentais para Avaliação da Toxicidade Materna .....	73
4.4.3 Análise Estatística .....	74

4.5	TESTE DE LETALIDADE DE <b>ARTEMIA SALINA</b> .....	75
4.5.1	Composição da Água do Mar Artificial.....	76
4.6	TESTE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	76
4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	77
4.7.1	Avaliação da Atividade Antimicrobiana Frente a Bactérias e Leveduras.....	77
4.7.2	Avaliação da Atividade Antimicrobiana Frente a Fungos Filamentosos .....	78
4.8	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO DE EXTRATOS DE <b>COCCOLOBA</b> <b>MOLLIS.</b> .....	79
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>81</b>
5.1	QUIMIOPROSPECÇÃO.....	81
5.2	IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS CMF-1 E CMR-1 .....	82
5.3	Identificação das Amostras CMF-2 E CMR-2.....	83
5.4	IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS CMR-3 E CMR-4 .....	85
5.5	IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRAS CMF-3 .....	94
5.6	IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA CMF-4.....	103
5.7	TOXICIDADE MATERNA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DAS FOLHAS E DAS RAÍZES DE <b>COCCOLOBA MOLLIS.</b> .....	104
5.8	TESTE DE LETALIDADE DE <b>ARTEMIA SALINA</b> .....	105
5.9	TESTE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	107
5.10	TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	108
5.11	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO.....	111
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>113</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>115</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Há mais de 200 anos o isolamento e estudo de produtos naturais são funções das ciências químicas e biológicas, sendo que o *Dictionary of Natural Products* apresenta dados químicos, estruturais e bibliográficos para mais de 190.000 produtos naturais e substâncias relacionadas (BRAZ-FILHO, 1994; University of Texas Libraries, 2007).

As plantas representam uma importante fonte de fármacos, considerando-se a grande diversidade de moléculas com potencial medicinal e dessa forma podem oferecer uma efetiva contribuição na busca de novas substâncias bioativas, medicamentos semi-sintéticos, e originar modelos de moléculas para sínteses de medicamentos (BARBOSA-FILHO et al., 2007).

O crescente uso e comercialização de plantas consideradas medicinais fizeram com que se intensificassem os estudos para identificar os constituintes químicos e a comprovação das possíveis atividades farmacológicas das espécies empregadas como fitoterápicos (BENT, 2008; HAMBURGER; HOSTETTMAN, 1991 *apud* CRUZ, 1999). As plantas medicinais se apresentam como o único recurso terapêutico de parte da população do Brasil e de 2/3 da população mundial, este mercado de fitoterápicos movimenta aproximadamente U\$ 22 milhões por ano e vem seduzindo cada vez mais adeptos nos países desenvolvidos. Um grave problema na comercialização desses produtos no Brasil bem como na possibilidade de exportação dos mesmos é a falta de garantia de sua eficácia, segurança e qualidade, padrões estes, que devem ser mensurados em bases científicas, para segurança do usuário (PINTO et al., 2002).

A *Coccoloba mollis* está sendo formulada e receitada como fitoterápico, em Londrina, como o nome de "Erva da memória" registrada no "Guia Homeopático da Farmácia Q. *curatun*", como benéfico principalmente em casos de falta de memória e estresse. A inexistência de estudos sobre a espécie na literatura científica justifica o presente trabalho

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudo químico dos extratos das folhas e das raízes de *Coccoloba mollis* complementados pela avaliação das atividades biológicas e toxicológicas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar a quimioprospecção farmacognóstica para determinar as principais classes de metabólitos secundários presentes na *Coccoloba mollis*.

Isolar, purificar e realizar a determinação estrutural de constituintes químicos presentes nas folhas e raízes da *C. mollis*.

Avaliar a toxicidade materna dos extratos etanólicos das folhas e raízes de *C. mollis* utilizando camundongos Swiss.

Realizar a avaliação toxicológica, utilizando o bioensaio com o microcrustáceo *Artemia salina*.

Avaliar a atividade antioxidante dos extratos etanólicos das folhas e raízes de *C. mollis* empregando o método do radical estável DPPH.

Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos das folhas e raízes de *C. mollis* frente bactérias, leveduras e fungos filamentosos.

Avaliar a atividade alelopática dos extratos etanólicos das folhas e das raízes de *C. mollis* usando sementes de *Lactuca sativa*.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE PRODUTOS NATURAIS

Atualmente a biodiversidade recebe importância para o desenvolvimento e bem-estar da humanidade e é a grande responsável pelo equilíbrio ambiental, mesmo tendo apenas uma pequena parte já estudada e os seus benefícios futuros ainda não sejam totalmente conhecidos, cada vez mais se tem valorizado a sua capacidade de gerar benefícios socioeconômicos em virtude de seu potencial como matéria-prima para diferentes campos, entre eles a área de fármacos para a medicina e diversos setores da indústria (FERRO et al., 2006).

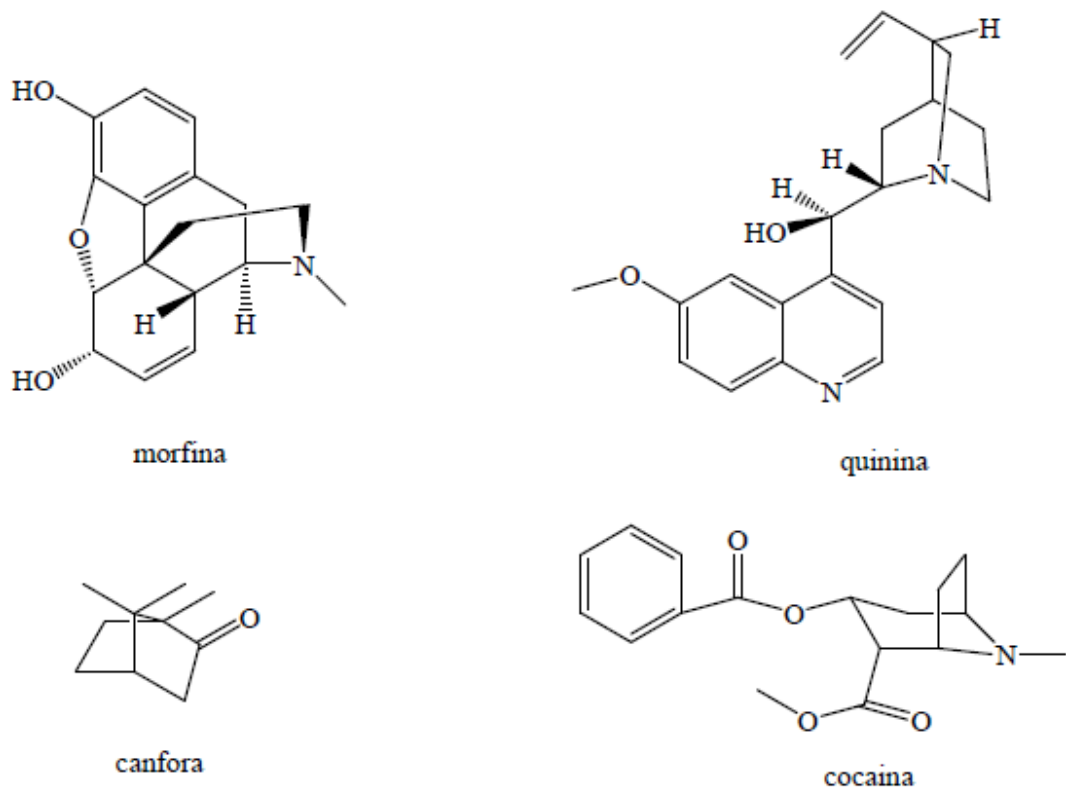
As plantas adquiriram importância crucial na medicina popular, devido as suas propriedades terapêuticas ou tóxicas e o uso de extratos vegetais no tratamento de algumas doenças é um hábito amplamente difundido no Brasil, tal hábito pode ser explicado, ao menos em parte, pela crença de que, devido ao caráter natural, não possuem efeitos colaterais (MOTA et al., 2008).

O tratamento e a cura de enfermidades utilizando plantas é tão antigo quanto a humanidade (MACIEL et al., 2002), sendo a ingestão de ervas e folhas, talvez, uma das primeiras formas de utilização de Produtos Naturais (VIEGA JUNIOR et al., 2006). Evidências indicam que homens de Neanderthal, que viveram há 60.000 anos, onde hoje é o Iraque, utilizavam malva rosa (*Alcea rosea* L.) (COWAN, 1999), planta que até hoje é empregada em etnomedicina para o combate a problemas no sistema respiratório e ciclo menstrual (PAPIEZ, 2004).

As primeiras descrições de plantas medicinais remontam às escrituras sagradas e ao papiro de Ebers. Papiro este, descoberto e publicado por Georg Ebers, traduzido pela primeira vez em 1890 por H. Joachim, encontrado nas proximidades da casa mortuária de Ramsés II, porém pertence à época da XVIII dinastia. Esse papiro enumera aproximadamente 100 doenças e descreve um grande número de drogas de natureza animal e vegetal (PINTO et al., 2002). O vasto conhecimento que os povos

primitivos e os indígenas possuem sobre o arsenal químico da natureza pode ser considerado fator fundamental para a descoberta de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo (VIEGA JUNIOR et al., 2006).

O desenvolvimento da Química Orgânica ocorreu paralelamente com o estudo de plantas, principalmente a partir do século XIX, quando ocorreram os primeiros registros de estudos de plantas com bases científicas. Destes estudos originaram-se algumas substâncias que se consagraram como princípios ativos eficazes, e que ainda hoje, são utilizadas no tratamento de certas doenças, tendo como exemplo: a morfina (potente analgésico), a quinina (antimalárico), a cânfora (antitussígeno local, rubefaciente) e a cocaína (que serviu de modelo para a introdução dos anestésicos locais). As estruturas destas moléculas estão representadas na Figura 1 (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

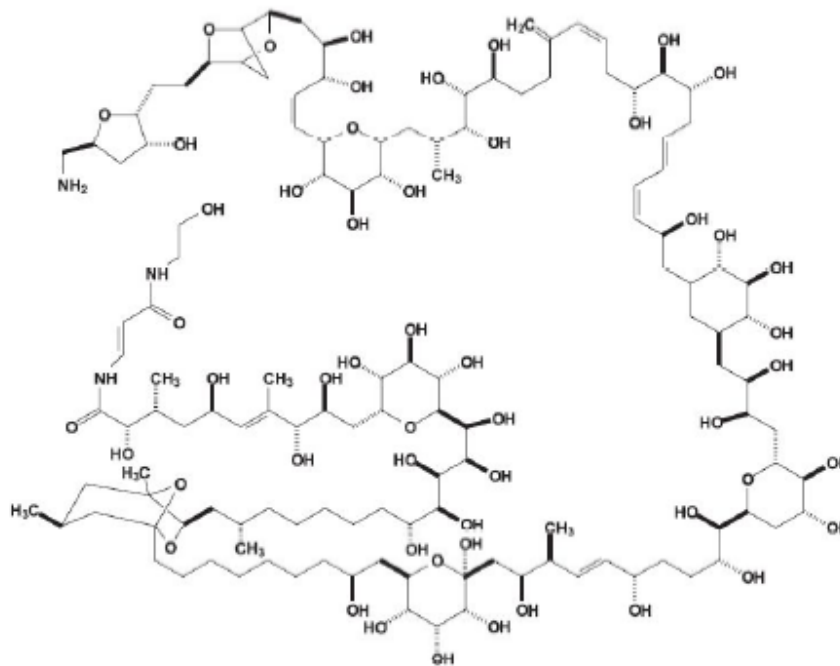


**Figura 1** - Estruturas de substâncias utilizadas como princípios ativos isolados de plantas

A natureza é responsável pela produção da maioria das substâncias orgânicas conhecidas e o reino vegetal é responsável pela maior parcela da diversidade química conhecida e registrada na literatura (VIEGA JUNIOR et al., 2006). Mesmo com o grande desenvolvimento da Síntese Orgânica e de novos processos biotecnológicos, 25 % dos medicamentos prescritos nos países industrializados são derivados do reino vegetal sendo que 120 constituintes de origem natural são obtidos a partir de 90 espécies de plantas. Os produtos naturais estão envolvidos diretamente no desenvolvimento de 40 % de todos os novos fármacos (HOSTETTAMANN et al., 2003).

A grande variedade e complexidade de metabólitos secundários, ou melhor, definidos como metabólitos especiais segundo Gottlieb, biossintetizados pelas plantas teriam se formado e evoluído, como mecanismos de defesa desses vegetais em resposta às condições ambientais. No contexto evolutivo das plantas terrestres, estimativas atuais apontam para 500.000 espécies ocupando todo o planeta, sendo que as angiospermas constituem 50 % desse total. No auge do processo evolutivo, as angiospermas alcançaram um desenvolvimento ímpar, devido à ocorrência de micromoléculas distintas e complexas, com vários centros estereogênicos, tais características constituem uma possível explicação às inúmeras finalidades atribuídas a estas. (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

A mais importante fonte de novos fármacos tem sido os produtos naturais cujas moléculas apresentam freqüentemente alta especificidade de ação biológica, e muitos fármacos de sucesso foram originalmente sintetizados para mimetizar a ação de moléculas encontradas na natureza (FEHER; SCHMIDT, 2003). A biossíntese de substâncias enantioméricas puras é uma característica incrível das plantas considerando-se que a síntese destas moléculas, em laboratório, é um desafio e exige técnicas e recursos humanos especializados (MONTANARI; BOLZANI, 2001). Um ótimo exemplo da extraordinária capacidade sintética da natureza e sua estereoespecificidade é a palitoxina (Figura 2) isolada de corais do gênero *Palythoa* sp que apresenta 64 centros estereogênicos, esta substância parece atuar inibindo a bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, e é uma das substâncias naturais mais ativas e tóxicas conhecidas (VIEGA JUNIOR et al., 2006).



**Figura 2** - Estrutura da palitoxina.

Diversos exemplos de plantas medicinais da Biota brasileira podem ser citados, porém, a maioria dos produtos fitoterápicos comercializados no Brasil é proveniente de outros países. As plantas medicinais endêmicas são ainda pouco conhecidas e se constituem num fascinante assunto de pesquisa acadêmica e de desenvolvimento (PINTO et al., 2002). A Química Medicinal dedica-se, em uma visão moderna, a compreender as razões moleculares da ação dos fármacos, da relação entre estrutura química e atividade farmacológica dos mesmos, considerando fatores farmacodinâmicos e farmacocinéticos que se traduzem em propriedades farmacoterapeuticamente úteis. Este conceito moderno da Química Medicinal inclui, em muitas universidades americanas, na grade curricular o estudo dos fármacos em conjunto com a farmacognosia. (VIEGA JUNIOR et al., 2006).

O panorama dos produtos naturais entra no processo de descoberta de novos fármacos de diversas formas. Na forma mais direta, um produto natural pode possuir potência, seletividade e qualidades farmacocinéticas para ser empregado como medicamento. Mais comumente o produto natural funciona como um guia,

proporcionando uma plataforma estrutural na qual pode ser elaborada, ou simplificada para chegar a um fármaco. Analogamente isso pode ser atingido modificando diretamente o produto natural, o que seria considerado um "derivado de produto natural". Outra alternativa, seria o produto natural biologicamente ativo servir de inspiração para o químico, fornecendo idéias de formas estruturais valiosas. Os produtos naturais vêm recuperando espaço e importância na indústria farmacêutica, seja *per-se*, seja como fonte inspiradora de novos padrões moleculares bioativos (VIEGA Jr. et al., 2006; WILSON; DANISHEFSKY, 2006).

Mais de uma centena de derivados de produtos naturais estão sendo avaliados em testes clínicos, e no mínimo outra centena de projetos similares está em desenvolvimento pré-clínico (Tabela 1). A maioria é derivada de substâncias oriundas de plantas e bactérias, sendo que os projetos baseados em produtos naturais predominantemente buscam armas contra o câncer ou como anti-infecciosas, mas não se pode ignorar a existência de pesquisas em outras linhas (Tabela 2). No entanto, cresce o interesse na possibilidade de desenvolver produtos que contenham uma mistura definida de substâncias extraídas de plantas utilizadas na medicina tradicional. O FDA (*Food and Drug Association*) recentemente aprovou uma nova aplicação de um fármaco "new drug application" (NDA) baseada no extrato do chá verde (*Camelia sinensis*) com o nome registrado "Veregen" para o tratamento tópico de verrugas genitais e perianais (HARVEY, 2008; WU et al., 2008).

**Tabela 1** - Fármacos baseados em produtos naturais em diferentes estágios de desenvolvimento (HARVEY, 2008)

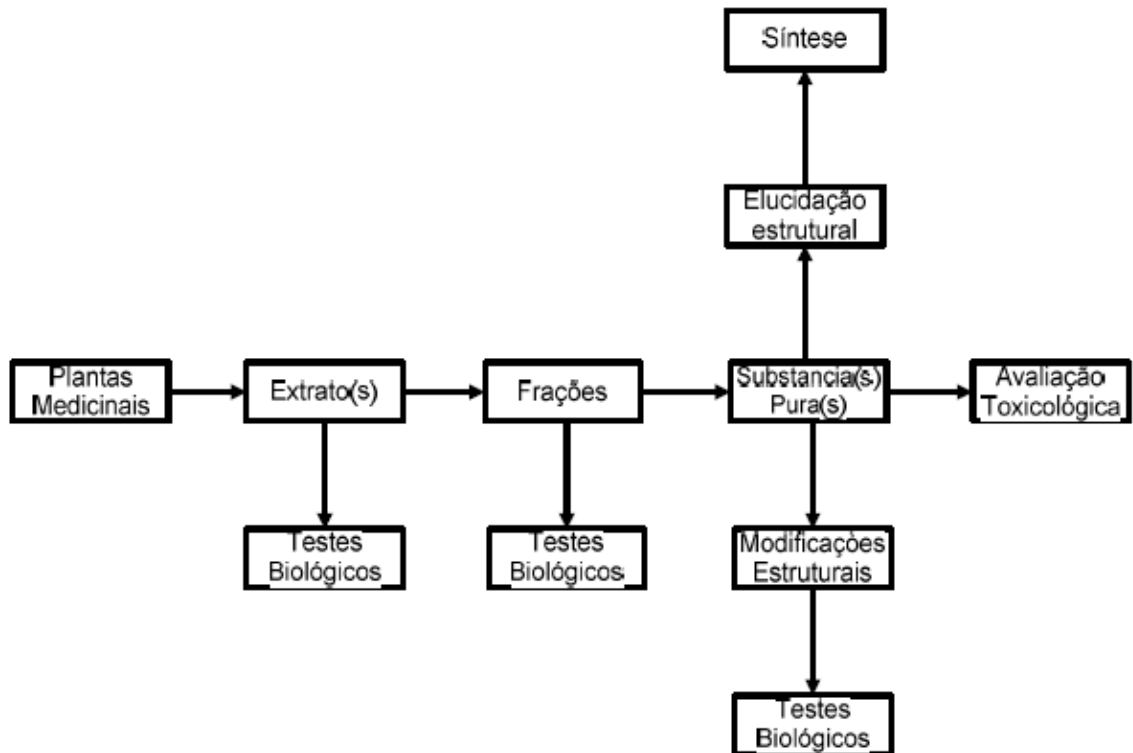
	Planta	Bactéria	Fungo	Animal	Semi-síntese	total
Pré-clínico	46	12	7	7	27	99
Fase I	14	5	0	3	8	30
Fase II	41	4	0	10	11	66
Fase III	5	4	0	4	13	26
Pré-registro	2	0	0	0	2	4
Total	108	25	7	24	61	225

**Tabela 2** - Categorias terapêuticas de fármacos derivados de produtos naturais nos diferentes estágios de desenvolvimento (HARVEY, 2008)

	Pré-clínicos	Fase I	Fase II	Fase III	Pré-registro	Total
Antineoplásicos	34	15	26	9	2	86
Antiinfeciosos	25	4	7	2	2	40
Neurofármacos	6	3	9	4	0	22
Fármacos cardiovasculares/ gastrointestinais	9	0	5	6	0	20
Antiinflamatórios	6	2	9	2	0	18
Metabolismo	7	3	6	1	0	17
Dermatológicos	7	1	2	0	0	10
Hormonais	3	0	2	1	0	6
Imunossupressores	2	2	0	2	0	6
Total	99	30	66	26	4	225

O objetivo da Química de Produtos Naturais é esclarecer e registrar os constituintes resultantes do metabolismo secundário, através do seu isolamento e elucidação de suas estruturas moleculares (NIERO et al., 2003), as principais etapas do trabalho de isolamento e identificação de princípios ativos de uma planta estão resumidas na Figura 3.

Considerando-se que as plantas podem conter milhares de constituintes, processos de separação e isolamento podem ser longos e tediosos. O processo de isolar produtos naturais geralmente combina várias técnicas de separação, que dependem da solubilidade, volatilidade e estabilidade química dos componentes a serem separados, sendo a escolha das técnicas a serem empregadas de grande importância (STICHER, 2008).



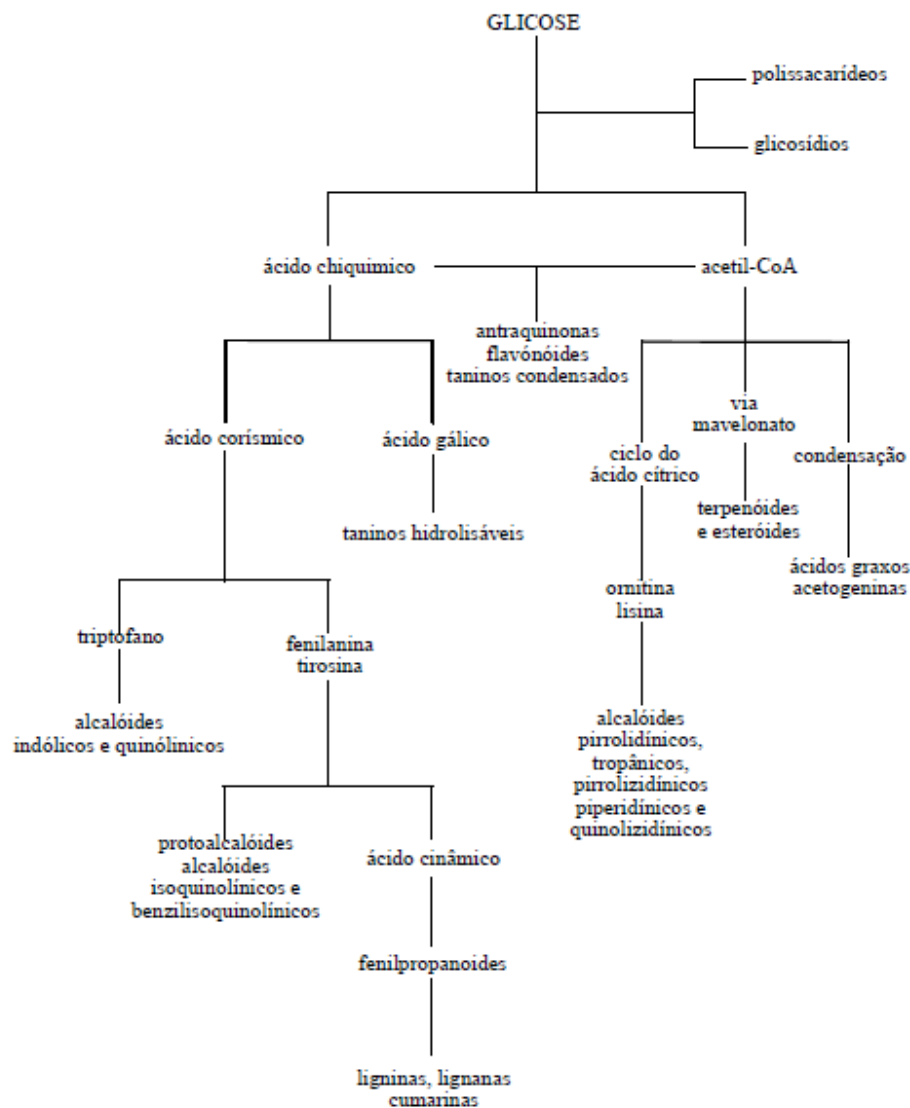
**Figura 3** - Da planta aos princípios ativos.

### 3.2 METABOLITES SECUNDÁRIOS

Ao estudar as características químicas de uma planta, deve-se considerar a existência de dois grupos distintos de metabólitos, os primários que são encontrados em todos os sistemas vivos, essenciais ao crescimento e a vida, como os aminoácidos, monossacarídeos, ácidos carboxílicos, lipídeos, etc.; e os secundários que são produtos metabolizados a partir de metabólitos primários. E em geral, o termo "produto natural" é sinônimo de metabólito secundário (NIERO et al., 2003)

Acreditava-se que os metabólitos secundários eram resultado de aberrações acidentais do metabolismo ou formas ímpares de armazenamento de nutrientes, porém inúmeros estudos apontam que as plantas desenvolveram intrincados mecanismos para produzir e armazenar tais metabólitos, a maioria dos estudos aponta

para mecanismos enzimáticos elaborados, embora, as plantas utilizem poucas rotas biossintéticas para a produção de um impressionante número de moléculas (Figura 4) (LEWINSOHN; GIJZEN, 2009). A definição original de metabólitos secundários advém da idéia de que não são essenciais para a sobrevivência e reprodução da planta, no entanto, o corrente conceito é que numerosos metabólitos secundários produzidos por plantas superiores desempenham importantes funções em interações bióticas e abióticas (IZHAKI, 2002).



**Figura 4** - Rotas biossintéticas resumidas dos metabólitos secundários (SOUZA, 2008)

Os metabólitos secundários são um grande, variado e, às vezes, misterioso grupo de moléculas, sendo que muitos desempenham importantes funções na defesa ou proteção na planta e por isso podem ser considerados biologicamente ativos. Em virtude destas atividades biológicas estas moléculas podem ser utilizadas no tratamento de doenças humanas e através dos séculos as plantas têm sido usadas em medicina tradicional em todo o mundo (KOLEWE et al., 2008)

O vasto número de metabólitos secundários é consequência de forças ecológicas através dos tempos, por exemplo, a resposta defensiva das plantas a predadores, parasitas, e doenças tem sido associada com a biossíntese e ao acúmulo de classes químicas específicas. Desta forma, pequenas alterações na estrutura das moléculas podem acarretar mudanças significativas em sua atividade biológica. Os metabólitos secundários também são associados com competições interespecíficas e como promotores de reprodução produzindo substâncias coloridas ou voláteis para atrair os polinizadores (WU; CHAPPELL, 2008, LEWINSOHN; GIJZEN, 2009).

Os metabólitos secundários podem ser classificados segundo as suas características químicas, a origem da planta ou origem biossintética. Segundo a classificação química os constituintes são divididos em diversas classes, baseadas em determinadas características, por exemplo, os alcalóides são caracterizados por um nitrogênio básico, outros grupos ou subgrupos são caracterizados pela presença de determinados tipos de esqueletos básicos como antracenos, cumarinas, quinonas, etc. A classificação segundo a origem da planta pode ser exemplificada pelos alcalóides do ópio (morfina, hipnoanalgésico, *Papaver somniferum*) e glicosídeos digitálicos (digoxina, cardiotônico, *Digitalis purpurea*). A classificação baseada no origem biossintética tem como exemplo os terpenóides, fenilpropanóides e policetídeos. Todos os terpenóides derivam da rota biossintética do isoprenóide (C<sub>5</sub>), os fenilpropanóides e policetídeos, respectivamente são derivados da fenilalanina/tirosina (C<sub>9</sub>) e acetato (C<sub>2</sub>) (NIERO et al., 2003).

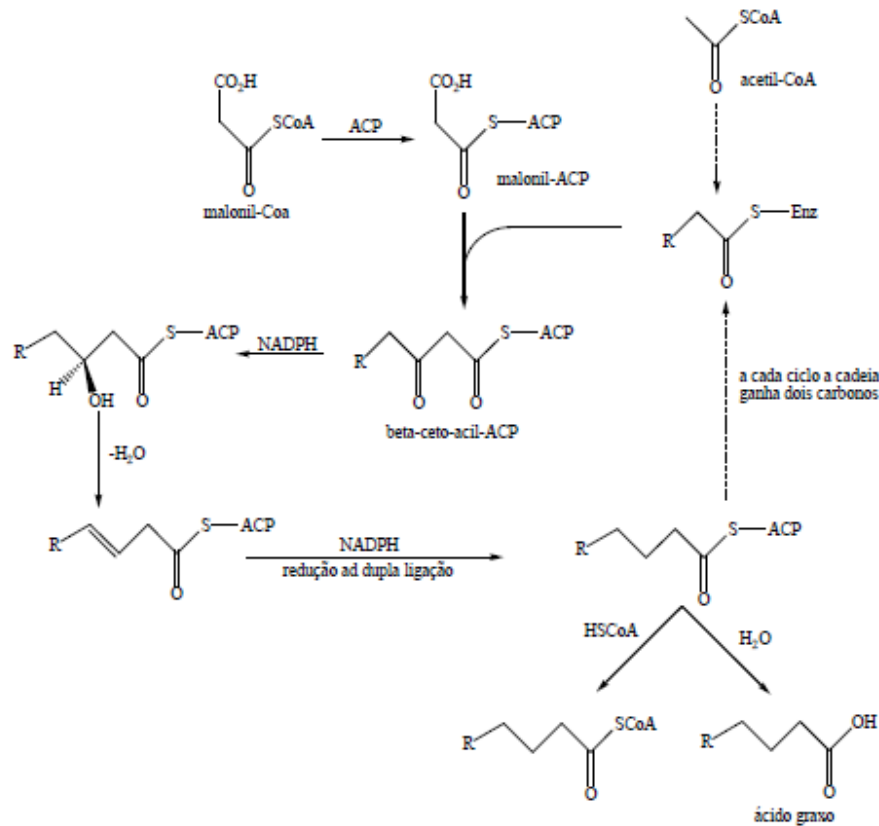
As concentrações relativas e totais dos metabólitos secundários nas plantas sofrem variações temporais em diferentes níveis (sazonais e diárias; intraplanta, inter- e intraespecífica), pois estes representam uma interface química entre as plantas

e o ambiente, desta forma a sua síntese é freqüentemente afetada pelas condições ambientais (GOBBO-NETO; LOPES. 2007).

### 3.2.1 Ácidos Graxos e Derivados

Os ácidos graxos são os lipídios mais simples, caracterizados por uma região hidrofílica conectada a um radical hidrofóbico. Alguns lipídios, incluindo os ácidos graxos, são utilizados para armazenar energia, mas a maioria é encontrada na membrana lipo-protéica das células. Embora os ácidos graxos sejam usados como blocos de construção dos lipídios saponificados, apenas traços são encontrados livres nas células e tecidos, geralmente estão presentes em diferentes formas, incluindo os ésteres de cadeia longa (ceras), os triglicérides ou triglicerídios, como glicerofosfolipídios e esfingolipídios (membrana lipídica). Nas plantas superiores a maioria dos ácidos graxos encontrados apresentam número par de carbonos entre  $C_{14}$  a  $C_{22}$  sendo o ácido oléico ( $C_{18}$ ) o mais comum (BRIELMANN et al., 2006).

A biossíntese de ácidos graxos envolve um conjunto de enzimas e é bem conhecida nas plantas (Figura 5) (DEWICK, 2001).



**Figura 5** - Rota biossintética dos ácidos graxos (DEWICK, 2001).

### 3.2.1.1 Hidrocarbonetos alifáticos de cadeia longa

Os hidrocarbonetos são os menos polares dos produtos naturais, eles formam um grupo relativamente pequeno de moléculas, contendo apenas átomos de carbono e hidrogênio. A ausência de heteroátomos nestes constituintes resulta em estruturas relativamente simples, podendo conter cadeias lineares ou ramificadas assim como anéis. Eles são extremamente insolúveis em água e geralmente de menor densidade que esta (BRIELMANN et al., 2006). Nas plantas os hidrocarbonetos alifáticos geralmente possuem um número ímpar de átomos de carbono, pois diversos estudos demonstram que eles resultam do alongamento seguido pela descarboxilação

de ácidos graxos. Hidrocarbonetos simples ramificados também raramente ocorrem em quantidades significativas (BRIELMANN et al., 2006; KOLATTUKUDY et al., 1974).

Os hidrocarbonetos saturados são universalmente distribuídos nos vegetais como ceras cuticulares presentes nas folhas ou nos frutos (EGLINTON; HAMILTON, 1967). Algumas plantas são ricas em hidrocarbonetos alifáticos que são usados como óleo vegetal, como o óleo de oliva extraído dos frutos da oliveira (*Olea europea*) que contém hidrocarbonetos de C13 a C28 (DELL'AGLI; BOSISIO, 2002).

Entre os metabólitos secundários, os alcanos de ceras epicuticular têm alcançado importância como indicador de relações taxonômicas entre as plantas e a atenção tem sido direcionada a estas substâncias para possibilitar o uso desta distribuição como uma maneira de estabelecer sistemas taxonômicos baseados nas características químicas (SANTOS et al., 2005)

### 3.2.1.2 Ésteres alifáticos de cadeia longa

A ocorrência natural de ésteres de cadeias curtas e longas tem sido documentada em diversas espécies de plantas e animais (LASETER; WEETE, 1971) e eles são formados através da condensação de alcoóis e ácidos e tendem a apresentar um odor característico, geralmente agradável (BRIELMANN et al., 2006).

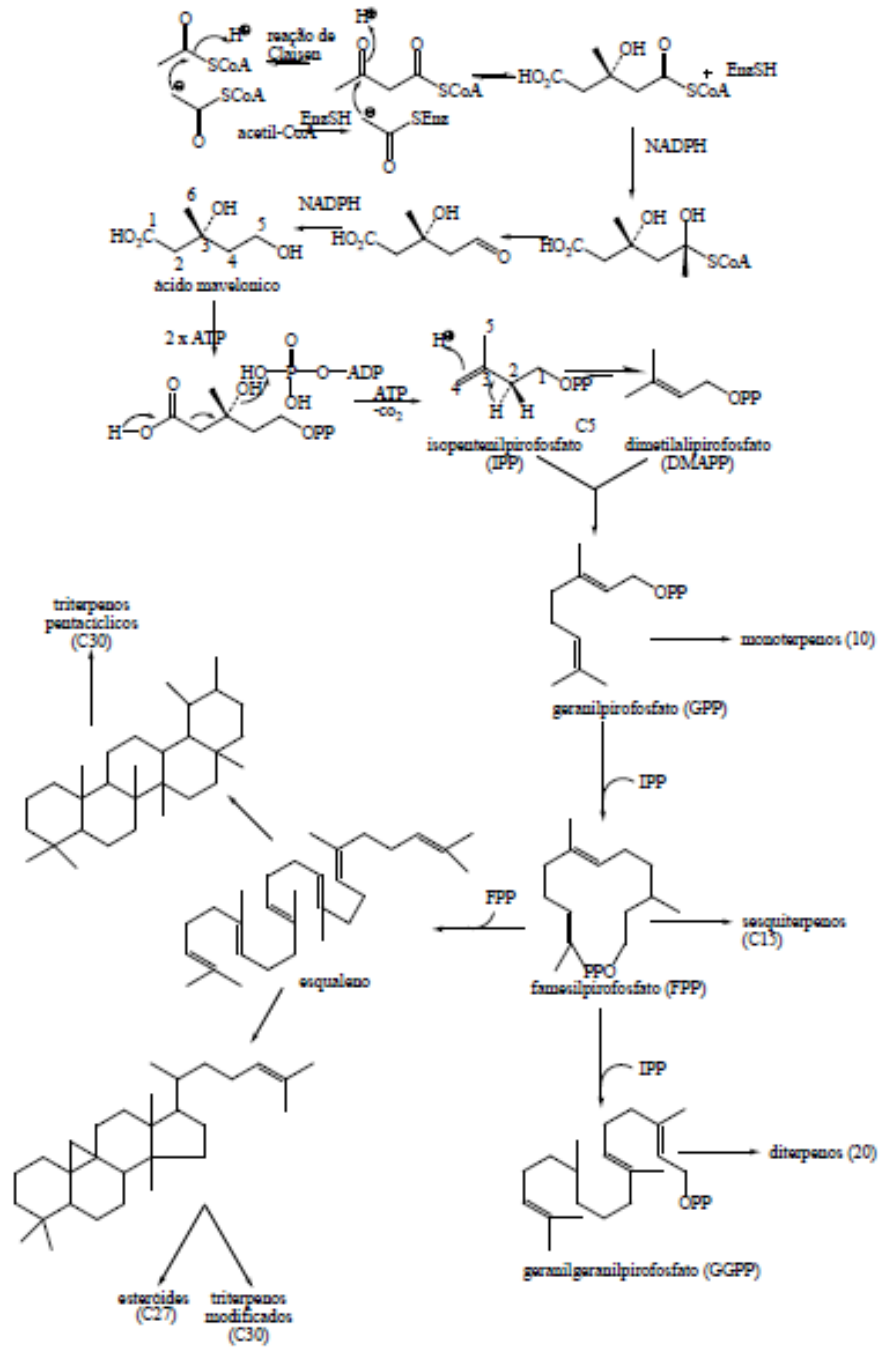
Os ésteres contem as ceras cuticulares das plantas que apresentam uma grande variação entre as espécies, por exemplo, a cutícula de folhas e galhos de *Arabidopsis* contem apenas 0,1 a 0,2% e 0,7 a 2,9% de ésteres respectivamente enquanto na *Copernicia cerifera* representam 85% das cutículas das folhas. Estes ésteres funcionam como reserva energética em sementes de *Simmondsia chinensis* onde constitui aproximadamente 97% do óleo das sementes (LI et al., 2008)

Estudos indicam que teores de metil e etil ésteres de ácidos graxos são indicadores da qualidade de azeitonas e óleo de oliva, onde níveis baixos destes ésteres indicam uma melhor qualidade (BIEDERMANN et al., 2008).

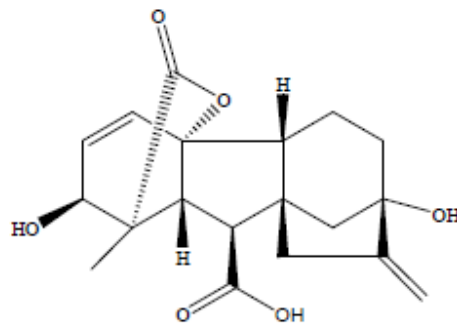
### 3.2.2 Terpenos e Esteróides

Os terpenos e os esteróides são formados através da rota biossintética do mevalonato. A polimerização do mevalonato vai originar moléculas de cadeias carbonadas crescentes de cinco em cinco átomos de carbono (Figura 6) (SANTOS, 2001).

Os terpenos exercem funções ecológicas e fisiológicas nas plantas, muitos inibem o crescimento de outras plantas, alguns apresentam atividade inseticida, outros atraem insetos polinizadores, podemos citar, como exemplo, o ácido giberélico (Figura 7), um diterpeno, que é um dos principais hormônios das plantas (BRIELMANN et al., 2006).



**Figura 6** - Rota biossintética dos terpenóides e esteróides (DEWICK, 2001; SANTOS, 2001)



**Figura 7 - Ácido giberélico**

Diversas propriedades têm sido atribuídas aos terpenos na prevenção e tratamento de doenças, tais como: antineoplásicas, antimicrobianas, anti-parasítica, antivirais, antialérgicas, antiespasmódicas, antiinflamatórias, anti-hiperglicêmicas, além de propriedades imunomoduladoras (PADUCH et al., 2007).

No reino animal os esteróides possuem grande importância como hormônios, coenzimas, e provitaminas, no entanto, no reino vegetal seu papel é menos conhecido. Evidências mostram que alguns fitoesteróides são eficazes no tratamento de doenças vasculares (KRIS-ETHERTON et al., 2002) e outros estudos indicam que o consumo de fitoesteróides pode reduzir os níveis de colesterol (MARTINS, et al., 2004). Os fitoesteróides são utilizados como matéria prima na indústria farmacêutica na produção de fármacos de reposição de hormônios sexuais e anticoncepcionais.

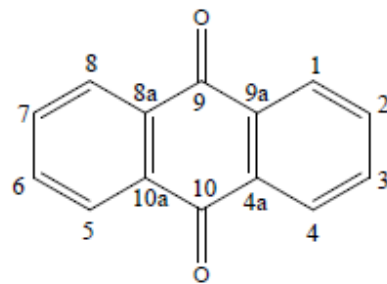
Estudos epidemiológicos e experimentais sugerem que uma dieta rica em fitoesteróides pode oferecer uma proteção para os alguns tipos de câncer comuns na sociedade ocidental, tais como câncer de cólon, de mama e de próstata (AWAD; FINK, 2000).

### 3.2.3 Antraquinonas

As antraquinonas são constituintes importantes de fungos filamentosos, líquens e plantas superiores. Elas são componentes de inúmeros fitoterápicos e

apresentam diversas atividades biológicas ou farmacológicas (MANOJLOVIC et al., 2006). Nas plantas superiores encontram-se as antraquinonas principalmente nas famílias Rubiaceae, Caesalpiniaceae, Rhamnaceae, Polygonaceae, Liliaceae, Verbenaceae e Asphodelaceae (FALKENBERG, 2004).

A estrutura básica das antraquinonas é representada por um anel antracênico com dois grupos cetônicos nas posições C-9 e C-10 (Figura 8). Nas Polygonaceae e Rhamnaceae elas são formadas pela via acetato-malonato (Figura 9) já nas Bignoniaceae e Verbenaceae a rota biossintética envolve o ácido chiquímico (Figura 10). Elas estão presentes, principalmente unidas a moléculas de açúcares na forma de heterosídeos quando o açúcar é a glicose são chamados de glicosídeos, mas comumente são encontradas na forma livre (agliconas) (SANTOS, 2001; IZHAKI, 2002).



**Figura 8** - Estrutura básica das antraquinonas.

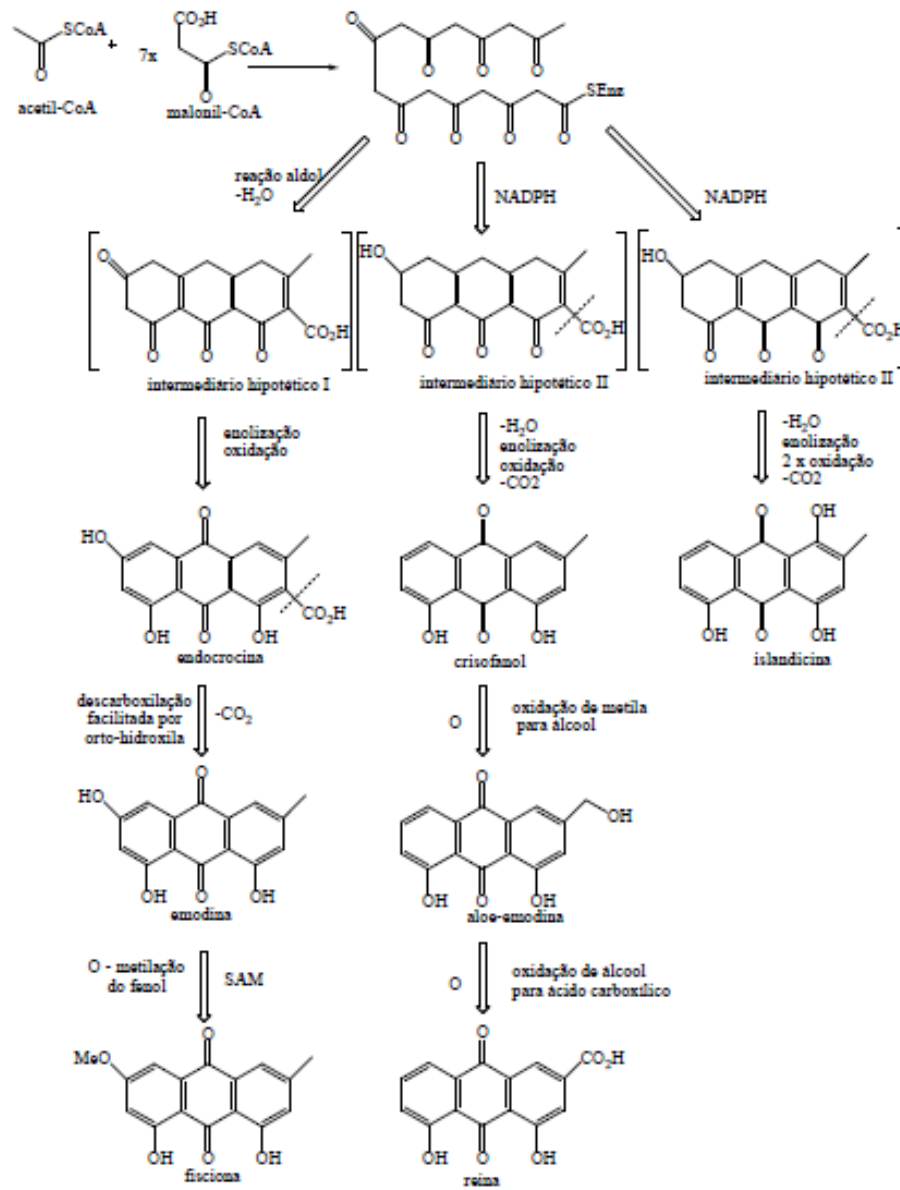
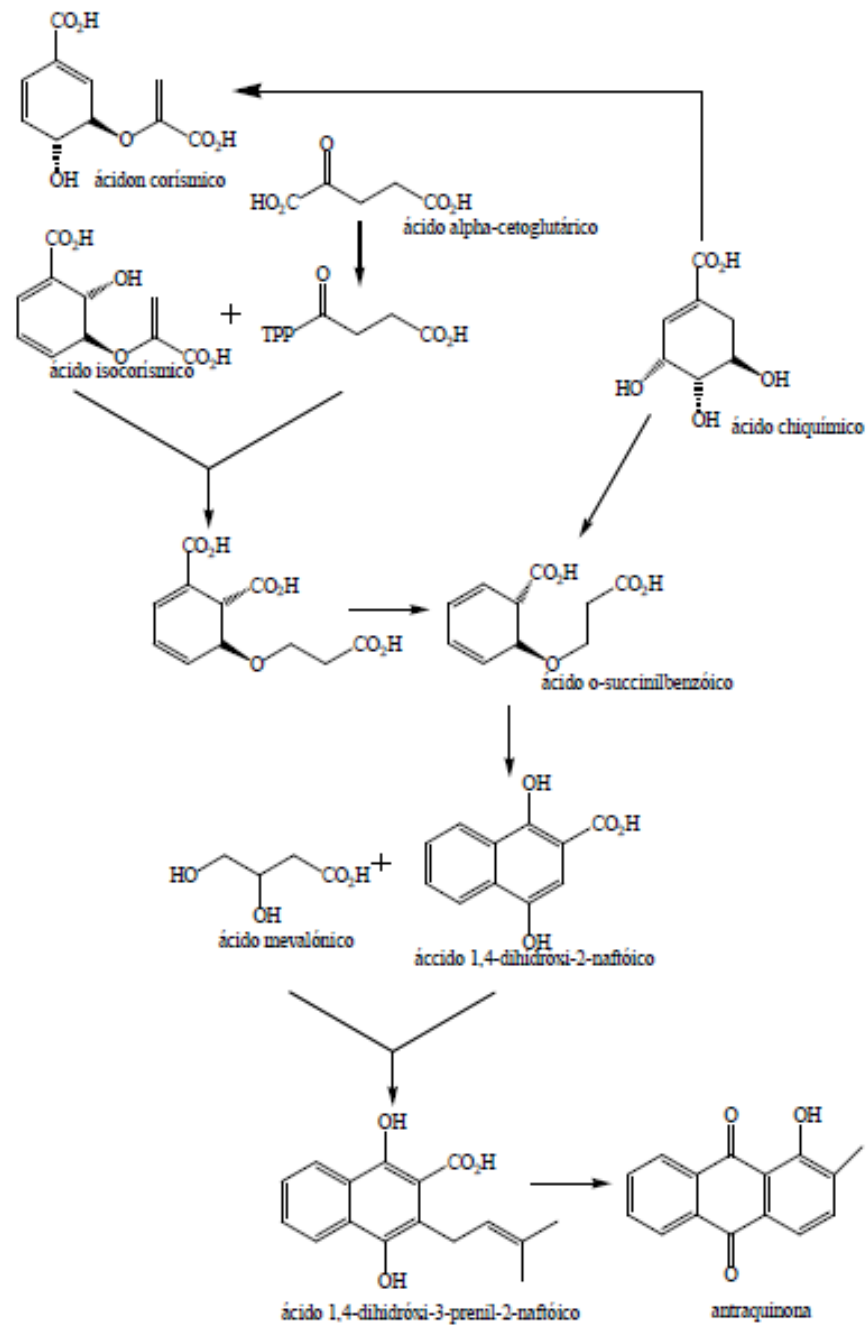


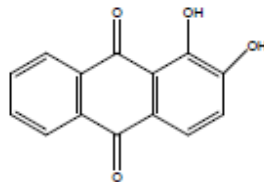
Figura 9 - Rota biossintética das antraquinonas exclusivamente via acetato (DEWICK, 2001).



**Figura 10** - Rota biossintética das antraquinonas via acetato – chiquimato (SANTOS, 2001).

Entre as diversas atividades farmacológicas apresentadas pelas antraquinonas podem ser citadas: antiviral, antibacteriana, antifúngica, antineoplásica, antiinflamatória, adstringente laxativa e diurética. Elas também são empregadas na indústria como tinturas têxteis, corantes alimentícios, e repelente de insetos (LIU et al., 2007; MANOJLOVIC et al., 2006)

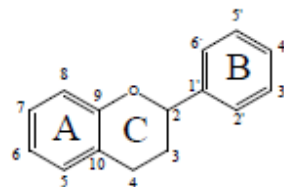
A alizarina (Figura 11), obtida das raízes de *Rubia tinctorum* L. (Rubiaceae) foi um dos primeiros materiais corantes utilizados pelo homem, já era conhecida e empregada no antigo Egito, Pérsia e Índia, (FALKENBERG, 2004).



**Figura 11** - Estrutura da alizarina (1,2-dihidroxi-9,10-antracenediona)

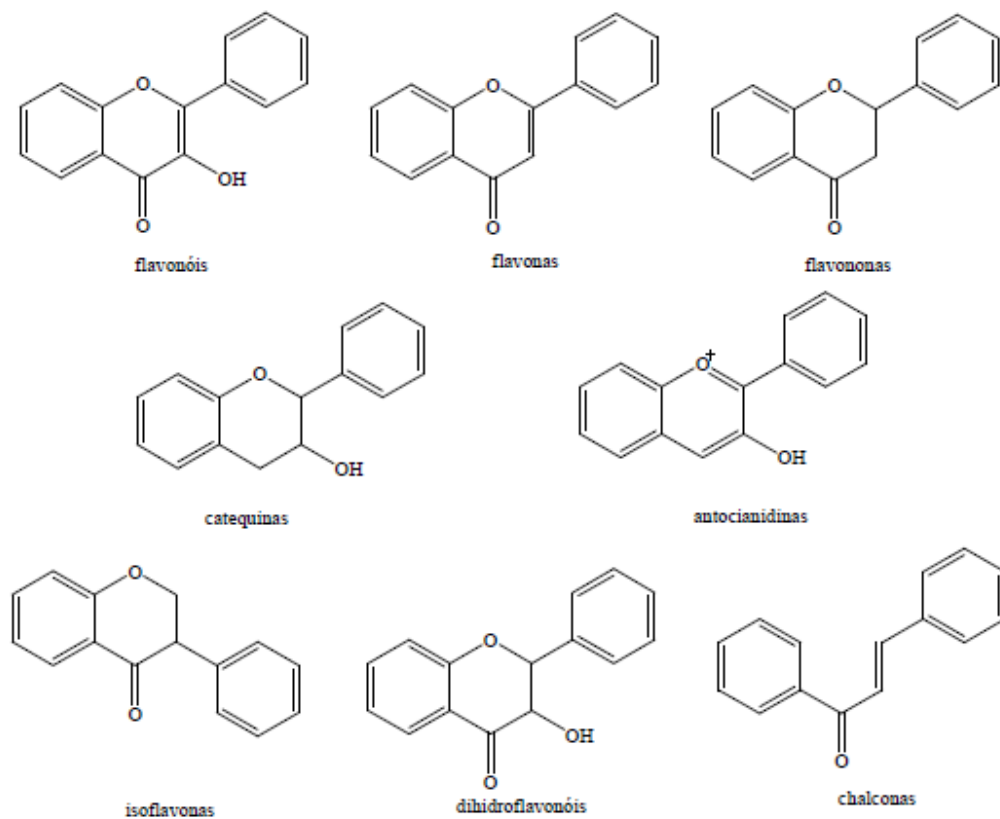
### 3.2.4 Flavonóides

Os flavonóides apresentam um esqueleto básico, formado por dois anéis aromáticos ligados por uma ponte de três carbonos (Figura 12) (ZUANAZZI, 2001).



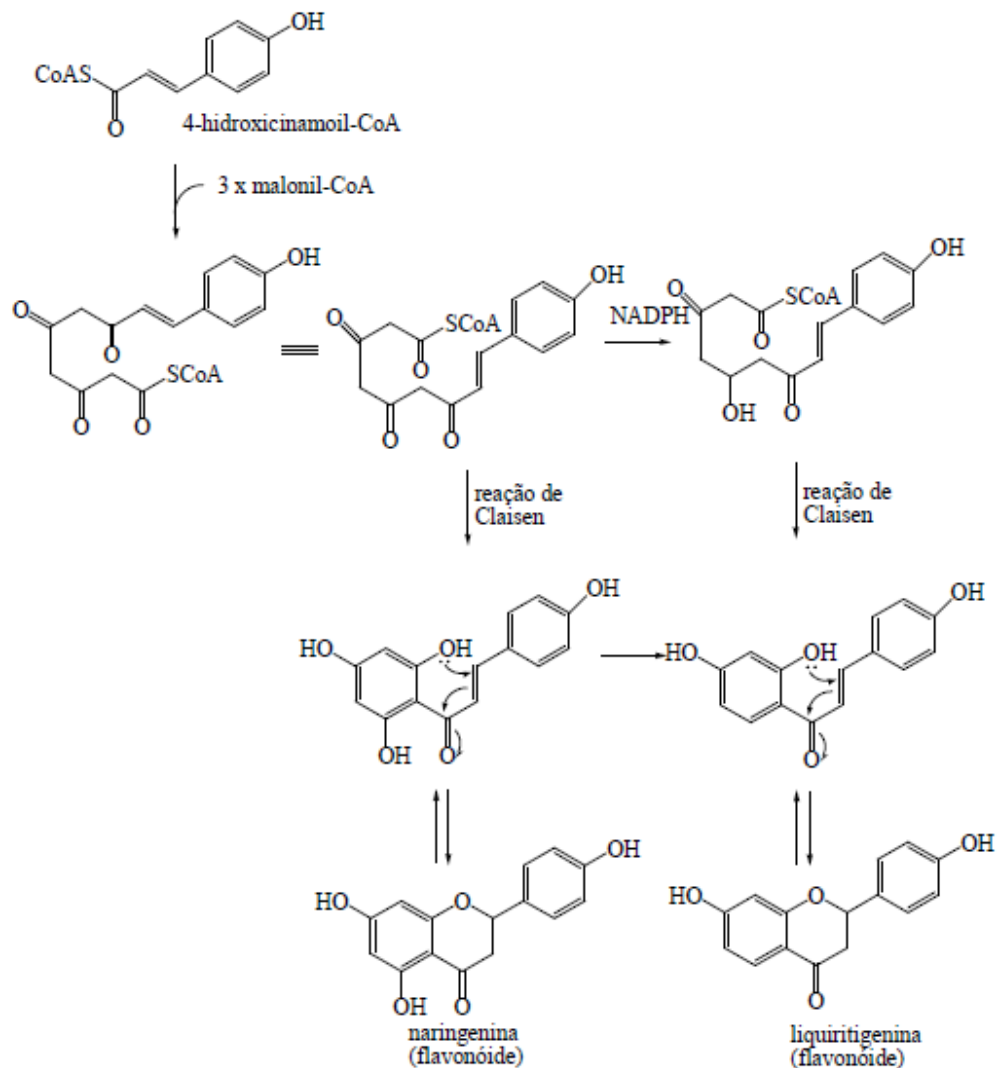
**Figura 12** - Estrutura básica dos flavonóides.

Os flavonóides podem ser divididos em oito classes: flavonóis, flavonas, flavononas, catequinas, antocianidinas, isoflavonas, dihidroflavonóis e chalconas (Figura 13) (PELUSO, 2006).



**Figura 13** - Estrutura básica das diferentes classes de flavonóides.

Os flavonóides resultam de duas rotas biossintéticas distintas, a do ácido chiquímico que origina a fenilalanina, precursor do ácido cinâmico responsável pelo anel B e a ponte de três carbonos. A outra rota, a do acetato origina o outro anel aromático, anel A (Figura 14) (SANTOS, 2001).



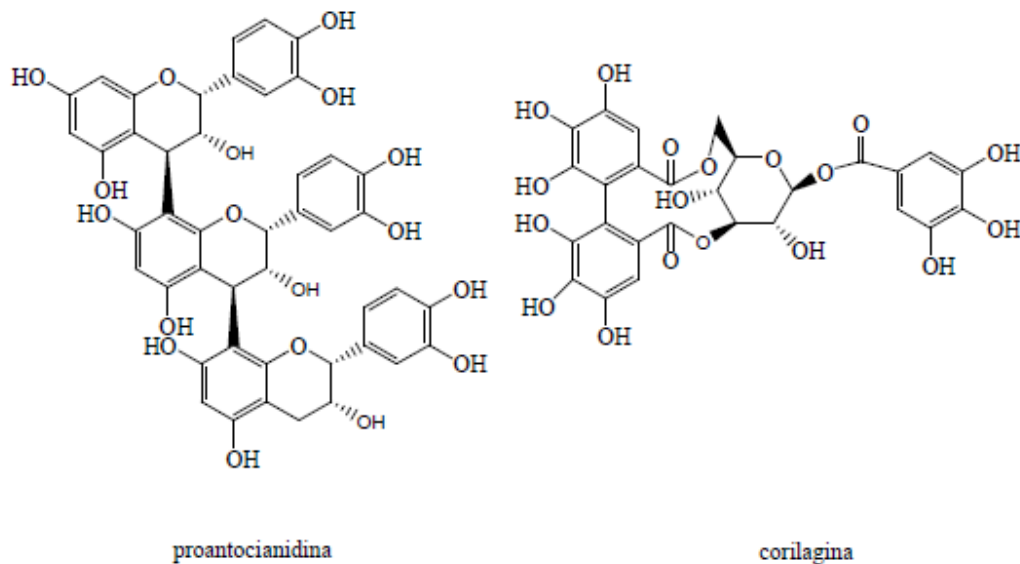
**Figura 14** - Rota biossintética dos flavonóides (DEWICK, 2001).

Os flavonóides exercem efeitos benéficos no tratamento de diversas doenças, incluindo o câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Muito destas atividades têm sido atribuídas às propriedades antioxidantes dos flavonóides, a sua capacidade de auto-oxidação e na possível influência nos processos redox intracelulares (WILLIAMS et al., 2004). Estudos populacionais indicam que o consumo de flavonóides é inversamente correlacionado com a mortalidade por doenças cardiovasculares, e numerosos flavonóides têm apresentado efeitos benéficos no combate à arteriosclerose (PELUSO, 2006).

### 3.2.5 Taninos

Os taninos são oligômeros, ricos em grupamentos fenólicos capazes de se ligar ou precipitar proteínas solúveis em água, são comuns em plantas vasculares, principalmente em tecidos lenhosos, mas também podem ser encontrados em folhas, flores ou sementes. Esses metabólitos conferem um sabor amargo forte aos tecidos onde são encontrados repelindo predadores (BRIELMANN, 2006).

Os taninos podem ser classificados em hidrolisáveis e condensados, os taninos condensados são formados biossinteticamente através da condensação de flavonóis formando polímeros. Os taninos hidrolisáveis são ésteres de um açúcar (geralmente glicose) com uma ou mais moléculas de ácido gálico, a Figura 15 apresenta um exemplo de tanino condensado (proantocianidina) e hidrolisável (corilagina) (MELLO; SANTOS, 2001; BRIELMANN, 2006)



**Figura 15** - Exemplos de tanino condensado (proantocianidina) e hidrolisável (corilagina).

Diversas atividades biológicas têm sido atribuídas a esta classe de metabólitos dentre as quais podem ser citadas: atividade antimicrobiana, antiviral, moluscicida e antitumoral. Para explicar essas atividades empregam-se três características que podem ser atribuídas, em menor ou maior grau, aos taninos: 1) complexação com íons metálicos; 2) atividade antioxidante; 3) habilidade de se complexar com outras moléculas incluindo macromoléculas tais como proteínas e polissacarídeos (MELLO; SANTOS, 2001)

O crescimento de muitos fungos, bactérias e vírus são inibidos por estes metabólitos que apresentam atividade antimicrobiana bem documentada. Há indícios de que sua atividade antimicrobiana está associada com a hidrólise de uma ligação éster entre o ácido gálico e os polifenóis hidrolizados que ocorre, por exemplo, após o amadurecimento de diversas frutas, e neste caso os taninos funcionam com uma defesa natural contra infecções microbianas e esta propriedade pode ser empregada para ampliar a vida útil de determinados alimentos (SAMU; GOPALAKRISHNAKONE, 2008).

Os taninos encontrados em *Vaccinium vitis-idaea* L, apresentam grande atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias com potencial para ser empregados na periodontia (HO et al., 2001). Os taninos condensados presentes na pastagem demonstram potencial no controle de parasitas gastrointestinais em ruminantes (MIN; HART, 2003).

Os extratos aquosos e etanólicos de algumas plantas que apresentavam atividade inibitória das enzimas topoisomerase I e II ao serem submetidos a um processo para eliminação de taninos perderam tal atividade mostrando a ligação entre estes metabólitos e a atividade atribuída aos extratos (WALL et al., 1996).

### 3.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

O fantástico desenvolvimento de técnicas analíticas de separação e elucidação estrutural, nos últimos 30 anos e mais recentemente de instrumentos analíticos hifenizados possibilitou o conhecimento de inúmeros metabólitos secundários isolados de angiospermas, dos quais muitos ainda sem qualquer avaliação com relação ao potencial farmacológico. Desta forma, os produtos naturais foram e continuam sendo de importância determinante em diferentes setores da sociedade moderna, mesmo considerando o grande número de produtos de síntese (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Na identificação de produtos naturais três técnicas são utilizadas habitualmente: espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) e de carbono ( $^{13}\text{C}$ ); espectrometria de infravermelho (IV) e a espectrometria de massas (EM). O conjunto de informações fornecido pelas diferentes técnicas proporciona a compreensão da estrutura da molécula (ANDREI; FACCIONE, 2003). A espectrometria de infravermelho fornece informações relacionadas aos grupos funcionais presentes na molécula, a ressonância magnética nuclear indica a disposição do esqueleto hidrocarbônico, enquanto a espectrometria de massas permite determinar a fórmula, além de poder contribuir para a elucidação estrutural devido ao padrão de fragmentação das diferentes funções orgânicas (RIBEIRO; SOUZA, 2007). A difração de Raios-X também é um método auxiliar valioso na elucidação estrutural, porém a dificuldade de se obter mono cristais ideais dificulta sua utilização (GARCIA, 2007).

Caso as técnicas mencionadas anteriormente ainda mantenham alguma ambigüidade na determinação estrutural, pode se recorrer a modificações químicas da molécula com reagentes contendo grupos específicos ou a degradação da molécula desconhecida de uma maneira previsível, até que uma molécula conhecida seja obtida ampliando a chance de predizer a sua estrutura (NIERO et al., 2003).

### 3.4 POLYGONACEAE

A identificação da família Polygonaceae como um grupo natural ocorreu em 1789, por Jussieu e esta família compreende, atualmente, aproximadamente 1200 espécies distribuídas em 48 gêneros, incluindo desde pequenas ervas até árvores com mais de 20 m de altura distribuídas em todo o mundo, porém a maioria das espécies está concentrada na região temperada do hemisfério norte (SANCHEZ; KRON, 2008). No Brasil sete gêneros ocorrem espontaneamente, sendo o gênero *Coccoloba* o mais representativo, com 45 espécies (MELO, 2000; MELO, 2004).

Algumas espécies apresentam toxidez, tais como as folhas de *Polygonum hydropiper* L. que são tóxicas aos peixes *Heteropneustes fossilis* e *Ctenopharyngodon idella*, e as folhas de *Polygonum hydropiperoides* Michaux, conhecido popularmente como pimenta-do-brejo e erva-de-bicho que possui suco acre e picante (SILVA-BRAMBILLA; MOSCHETA, 2001).

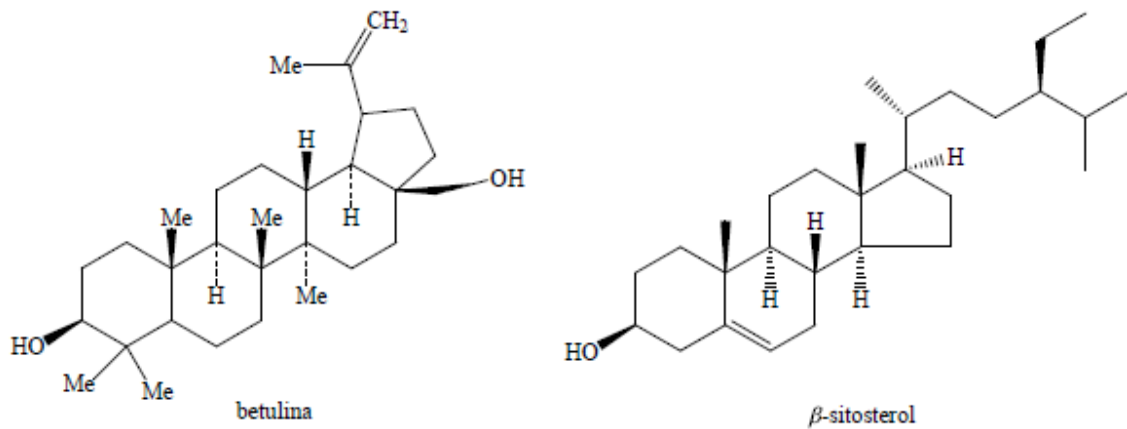
#### 3.4.1 O Gênero ***Coccoloba***

O gênero neotropical *Coccoloba* pertencente à família Polygonaceae compreende cerca de 400 espécies distribuídas desde o México e sul dos Estados Unidos até o sul da América do Sul, sendo que o Brasil apresenta 45 espécies, 23 das quais ocorrem na Amazônia (MELO, 2004).

##### 3.4.1.1 *Coccoloba acrostichoides*

O extrato etanólico e as frações de partes aéreas *C. acrostichoides* mostraram atividade antibacteriana *in vitro*, e ação antifúngica, principalmente as

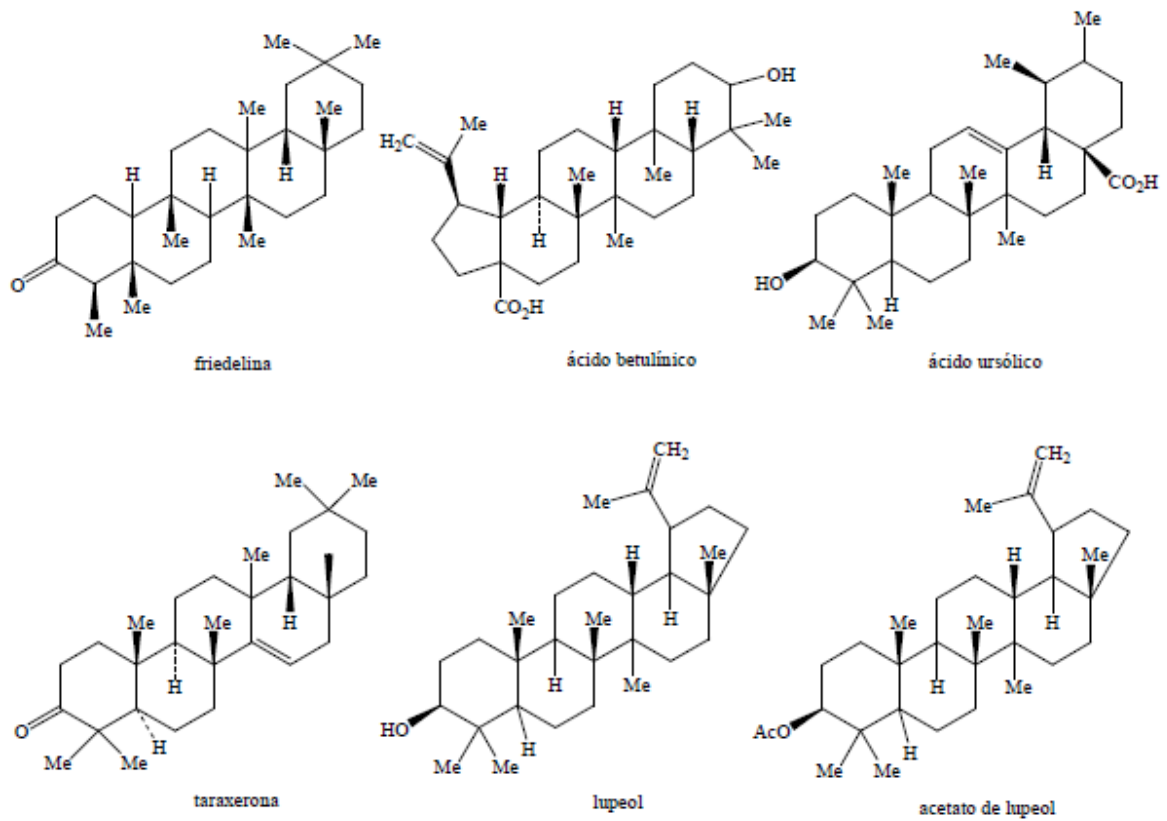
frações n-hexano e acetato de etila. O  $\beta$ -sitosterol e a betulina (Figura 16) isolados a partir das partes da área da planta também foram testados sendo que a betulina se mostrou ativa contra *Fusarium oxysporum* (COTA et al., 2003).



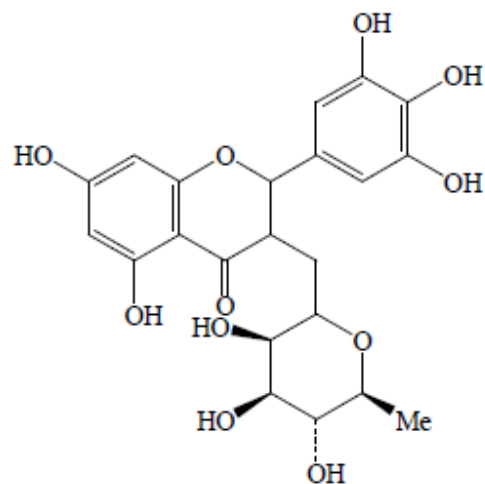
**Figura 16** - Estrutura da betulina e  $\beta$ -sitosterol isolados da *C. Acrostichooides*

#### 3.4.1.2 *Coccoloba dugandiana*

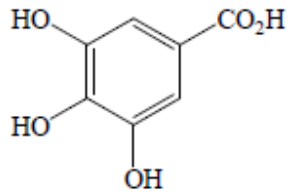
Os triterpenos friedelina, taraxerona, lupeol, acetato de lupeol, ácido botulínico e ácido ursólico (Figura 17) foram isolados em estudos com *C. dugandiana* além do esteróide  $\beta$ -sitosterol realizados por Dan e Dan (1986). O flavonóide miricetina-3-ramnosídeo (Figura 18) e o ácido gálico (Figura 19) foram identificados por Compagnone e colaboradores (1995).



**Figura 17** - Triterpenos isolados de *C. Dugandiana*



**Figura 18** - Estrutura da miricetina-3-ramnosídeo, flavonóide encontrado em *C. dugandiana*.



**Figura 19** - Estrutura do ácido gálico, presente na *C. dugandiana*.

#### 3.4.1.3 *Coccoloba excoriate*

Estudos com as folhas e as cascas de *C. excoriate* permitiram o isolamento de taraxerona, lupeol, ácido betulínico, ácido ursólico e  $\beta$ -sitosterol, e de friedelina apenas nas folhas e acetato de lupeol nas cascas (DAN; DAN, 1986).

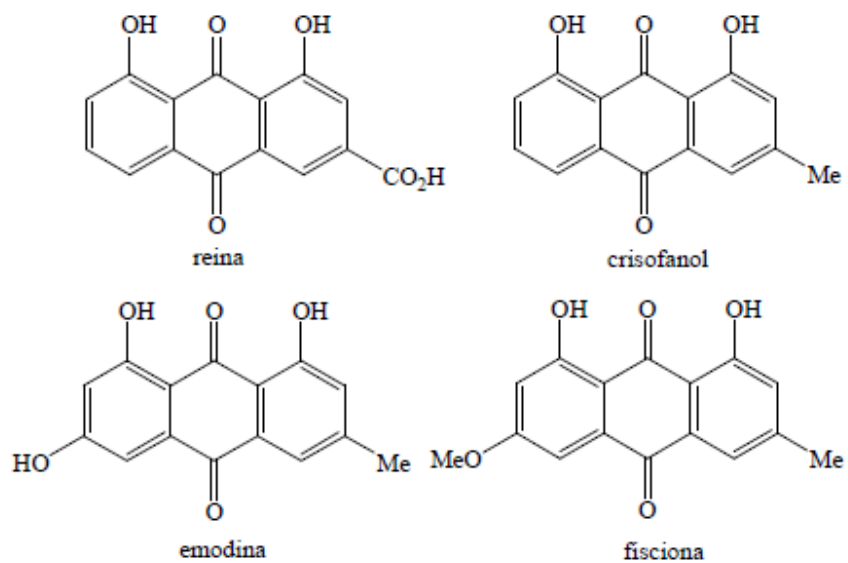
#### 3.4.1.4 *Coccoloba uvifera*

Pesquisas com *C. uvifera* para o controle do nível de glicose no sangue em pacientes diabéticos conduziram a obtenção de um produto que está protegido sob patente (BUCKLEY, 2001). Em outro estudo esta espécie mostrou atividade antioxidante e anti-tirosinase e o seu extrato metanólico apresentou potencial fotoprotetor em melanócitos submetidos à radiação ultravioleta (SILVEIRA et al., 2008).

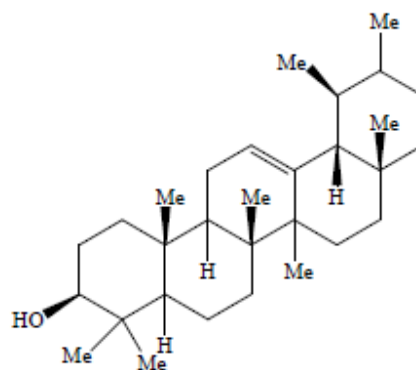
O extrato metanólico das sementes de *C. uvifera* apresentou atividade frente a *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*, enquanto a análise fitoquímica indicou a presença de flavonóides, saponinas, polifenóis e taninos. A partição com acetato de etila do extrato metanólico produziu um precipitado de cor marrom que inibiu o crescimento das bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e dos fungos *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum* e *F. decencellulare*. Este sólido de cor marrom foi submetido a técnicas de separação e purificação

permitindo a obtenção de ácido gálico, ácido hexenodióico e 1,3,4,6,7,8-hexa-hidro-4,6,6,8,8,8-hexametilciclopenta-2-benzopirano (MORALES et al., 2008).

Malathi e colaboradores (1995) relataram a presença das antraquinonas reina, crisofanol, emodina e fisciona (Figura 20), do triterpeno  $\alpha$ -amirina (Figura 21) e do esteróide  $\beta$ -sitosterol em pesquisas com *C. uvifera*.



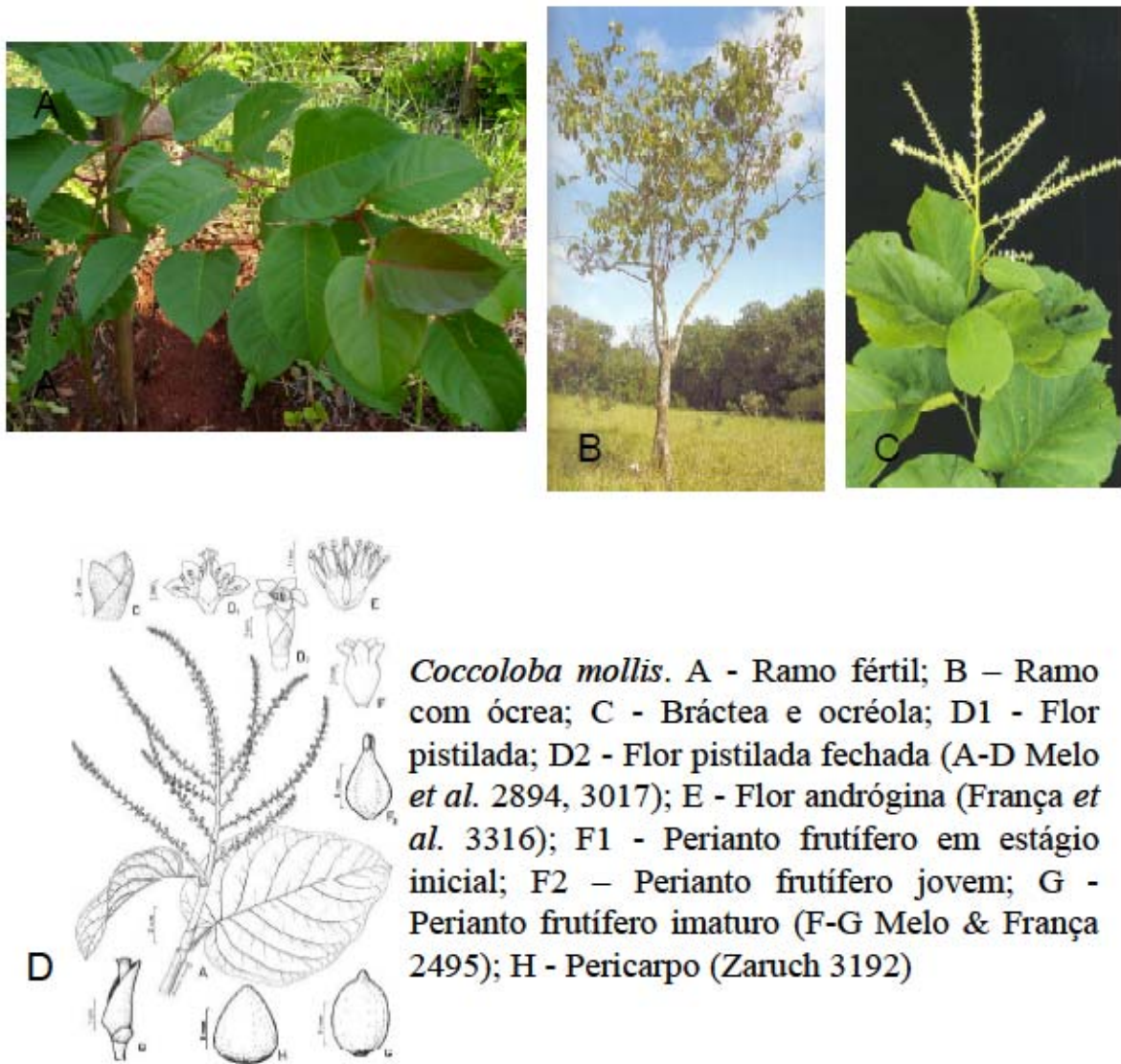
**Figura 20** - Antraquinonas isoladas da *C. uvifera*.



**Figura 21** - Estrutura da  $\alpha$ -amirina isolada da *C. uvifera*.

### 3.4.2 *Coccoloba mollis*

A *Coccoloba mollis* Casaretto (Figura 22) é uma espécie vegetal popularmente pouco conhecida, mas que vem sendo empregada como fitoterápico em Londrina-PR. Uma tintura produzida a partir desta espécie (folhas, caules e raízes) a qual está registrada no "Guia Homeopático da Farmácia Q. *curatun*" com o nome de "Erva da memória", com as seguintes atividades terapêuticas descritas neste formulário: "Rica em cálcio, ferro, fósforo e zinco. O insumo desta planta em forma científica homeopática tem sido maravilhoso nos casos de estresse, na insônia, nas anemias, e em quando há queda de visão. É um remédio para estudantes nervosos. Esse insumo pode ser utilizado em impotência sexual".

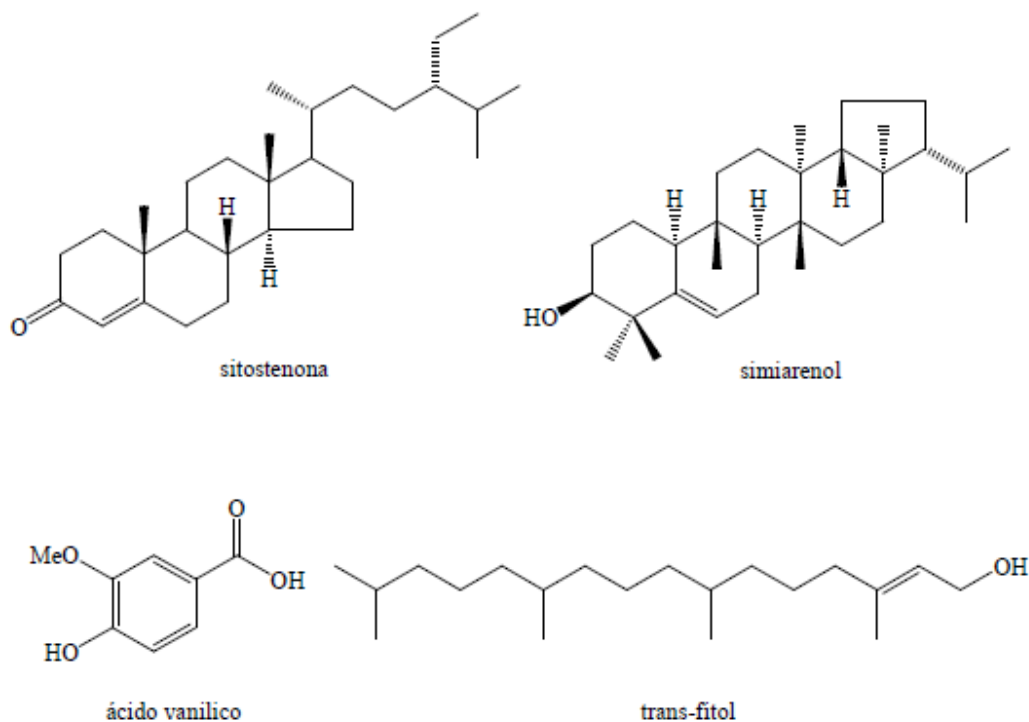


**Figura 22 - *Coccoleba mollis*** (LORENZI, 2002; MELO, 2004).

A *C. mollis* (sin. *C. polystachya* Weddel) , um arbusto ou árvore (4 - 16m de altura por 10 cm de diâmetro), apresenta ampla distribuição geográfica ocorrendo na Costa Rica, Panamá, Colômbia, Venezuela, Suriname, Guiana Francesa, Equador, Bolívia e Brasil. Ela é conhecida popularmente no Mato Grosso por "novateiro", "novato", "pajau", "pau-jau"; no Mato Grosso do Sul, "taquari-de-cachimbo"; em Minas Gerais, "folha-larga", "piscoteira" ou "amora"; em Goiás, "capeiba"; no Rio de Janeiro, "caaussú-da-mata", (MELO, 2004; MELO; FRANÇA, 2006). Ela apresenta

ampla distribuição no Brasil onde ocorre em cerradões e mata semidecídua da bacia do Paraná (MORS et al., 2000; LORENZI, 2002).

A Pesquisa bibliográfica no *Chemical Abstract* indicava a ausência de literatura científica sobre a espécie quando este trabalho foi iniciado. Recentemente foram registrados na literatura dois trabalhos científicos: a investigação fitoquímica das partes aéreas de *C. mollis* apresentando o isolamento de dois fitoesteróides (sitosterol e sitostenona), um diterpeno (trans-fitol), um triterpeno (simiarenol) e de um benzenóide (ácido vanílico) (Figura 23) (OLIVEIRA et al., 2008a). O estudo com diversos extratos vegetais, relata a atividade larvicida da fração hexânica dos talos ( $LC_{50} = 137,9\mu\text{g mL}^{-1}$ ), cascas ( $LC_{50} = 128,3\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e folhas ( $LC_{50} = 129,4\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de *C. mollis* contra *Aedes aegypti* (OLIVEIRA et al., 2008b).



**Figura 23** - Estrutura das substâncias já isoladas na *Coccoloba mollis*.

Em trabalhos de colaboração com o nosso grupo de pesquisa foram realizados estudos com os extratos etanólicos de folhas e raízes da *C. mollis*, em um deles, Remondi e colaboradores (2008), sugerem que os extratos de etanólicos de folhas e raízes de *C. mollis* apresentam, em camundongos, dose letal oral 50% (DL<sub>50</sub>) superior a 2000 mg Kg<sup>-1</sup> e ausência de efeitos farmacológicos no sistema nervoso central. Em outro estudo os extratos foram avaliados quanto a um possível efeito mutagênico, citotóxico e indutor de apoptose em sistemas-teste *in vitro* e *in vivo*. Para a avaliação *in vitro* foi utilizada a linhagem hepática de *Rattus norvegicus* (HTC) nos ensaios de citotoxicidade (MTT) e mutagenicidade (Cometa e Micronúcleo com bloqueio de citocinese - MNCtB) e; as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* no ensaio Salmonella/microssoma. *In vivo*, a mutagenicidade foi avaliada em sangue periférico de camundongos, também através dos ensaios do Cometa e Micronúcleo. Os dados obtidos sugerem que apesar da baixa capacidade de indução de danos ao DNA nas condições experimentais realizadas, os extratos da *C. mollis*, especialmente o obtido das raízes, possuem alta toxicidade e capacidade de indução de apoptose. (TSUBOY, 2008).

### 3.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA

Os estudos toxicológicos constituem parte essencial no desenvolvimento de uma fitoterapia médica e de um fitoterápico. Wu e colaboradores (2008), em artigo recente, relatam e discutem as exigências e recomendações relacionadas aos estudos de vários tipos de toxicidade não clínicas como suporte aos ensaios de triagens clínicas para uma nova aplicação de um fármaco. Estes tópicos incluem perspectivas em farmacologia/toxicologia não clínicas, em nomenclatura de fitoterápicos, sua identificação, experiência humana prévia, proposta de triagem clínica inicial, aspectos regulatórios de estudos de toxicidade crônica e de toxicidade aguda, estudos de mutagenicidade, estudos de toxicidade reprodutiva e estudos de carcinogenicidade em fitoterápicos.

### 3.5.1 Testes de Toxicidade Reprodutiva.

Durante a gestação, a utilização de qualquer medicamento deve ser feita com cuidado, já que algumas substâncias tóxicas podem atravessar a barreira placentária e interferir no desenvolvimento embriofetal, muitas vezes de forma negativa. Esse mesmo cuidado deve ser aplicado ao uso de plantas medicinais, principalmente devido à escassez de informações sobre as mesmas.

A toxicologia reprodutiva é o estudo da ocorrência, causas, manifestação e seqüelas de efeitos adversos de agentes exógenos durante o processo reprodutivo (ECOBICHON, 2001). Qualquer alteração morfológica ou funcional causada por elementos químicos ou físicos que interferem com crescimento, homeostasia, desenvolvimento, diferenciação e/ou comportamento do feto é considerada toxicidade do desenvolvimento (BRANCH, 2004).

Para avaliar a possível teratogenicidade de um agente (fármaco / produto químico / físico ou agente infeccioso) três princípios devem ser analisados: o genótipo do embrião, os períodos críticos no desenvolvimento e a dosagem de uma droga, fármaco ou produto químico ou físico (MOORE; PERSAUD, 2008).

A agência *Food and Drug Administration* (FDA), com base nos dados obtidos em pesquisas com animais e dados epidemiológicos, classificou os agentes químicos segundo sua ação tóxica pré natal e sobre a reprodução (Tabela 3) (FISHER et al., 2008).

**Tabela 3 -** Classificação das substâncias químicas de acordo com o seu potencial teratogênico, segundo o FDA

Categoria	Descrição
A	Estudos controlados demonstram não haver risco. Estudos adequados, bem controlados, em mulheres grávidas não mostraram risco para o feto.
B	Sem evidência de risco humano. Estudos em animais mostram risco, mas estudos em humanos não o mostram, ou, se não há estudos adequados em humanos, os estudos animais são negativos.
C	O risco não pode ser afastado. Faltam estudos em humanos, e os estudos em animais ou são positivos para o risco fetal ou igualmente faltam. Entretanto, os benefícios potenciais podem justificar o possível risco.
D	Evidência positiva de risco. Dados de investigação preliminar ou pós comercialização mostram risco para o feto. Entretanto, os benefícios potenciais podem ser maiores que o risco potencial.
X	Contra-indicada na gravidez. Estudos em animais ou humanos, ou relatos de investigação preliminar ou pós-comercialização, mostram risco fetal que claramente se sobrepõe a qualquer possível benefício para a paciente.

Os roedores e os coelhos contribuem com os dados sobre a toxicidade reprodutiva devido a estas espécies serem relativamente padronizadas: pequenos, alta fertilidade ( ninhadas grandes), além de fornecerem número adequado de progênie para as análises estatísticas dos resultados. Os efeitos adversos observados em estudos com animais são indicativos de potencial risco para humanos. Mas é óbvio que a ocorrência de um efeito adverso específico em animais não significa que o mesmo efeito será observado em outra espécie, inclusive na humana, embora a concordância de um efeito específico em um alvo específico em múltiplas espécies não é necessariamente obrigatória (COSTA, et al., 2005, ECOBICHON, 2001).

A crença de que produtos naturais não produzem efeitos colaterais transforma as gestantes e lactantes em um grupo populacional de risco e que culturalmente recorre ao uso de plantas medicinais, no entanto, as informações sobre a segurança de utilização destes produtos durante a gravidez são escassas (CLARKE et al., 2007).

### 3.5.2 Toxicidade sobre *Artemia salina* Leach

A avaliação de toxicidade geral é considerada fundamental no estudo de substâncias com propriedades biológicas (MAHLE, 2008). O organismos simples têm sido utilizados para um rápido e relativamente simples monitoramento da resposta biológica, onde existe apenas um parâmetro envolvido: morte ou vida (CAVALCANTE et al., 2000).

O microcrustáceo *Artemia salina* L (Artemiidae), um invertebrado que compõe a fauna de ecossistemas de água salgada, pode ser empregado em bioensaios laboratoriais para determinar a toxicidade. Este método, que determina a concentração letal de 50% (LC50) de substâncias ativas e extratos de plantas em meio salino em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , tem sido usado em pesquisas com plantas medicinais em diferentes países para avaliar a toxicidade (KANWAR, 2007).

O ensaio com microcrustáceos é um método seguro, econômico e prático para determinar a bioatividade de substâncias sintéticas ou naturais (SILVA et al., 2007). Os primeiros trabalhos empregando *Artemia salina* datam de 1956 e desde então inúmeras pesquisas têm empregado esta metodologia para diversos fins, tais como, detectar toxicidade preliminar de algas marinhas, triagem de toxinas fúngicas, avaliar efeitos de exposição a metais pesados e pesticidas, testes de toxicidade em materiais dentários, toxicidade de extratos de plantas (CAVALCANTE et al., 2000; CARBALLO et al., 2002; LHULLER et al., 2006).

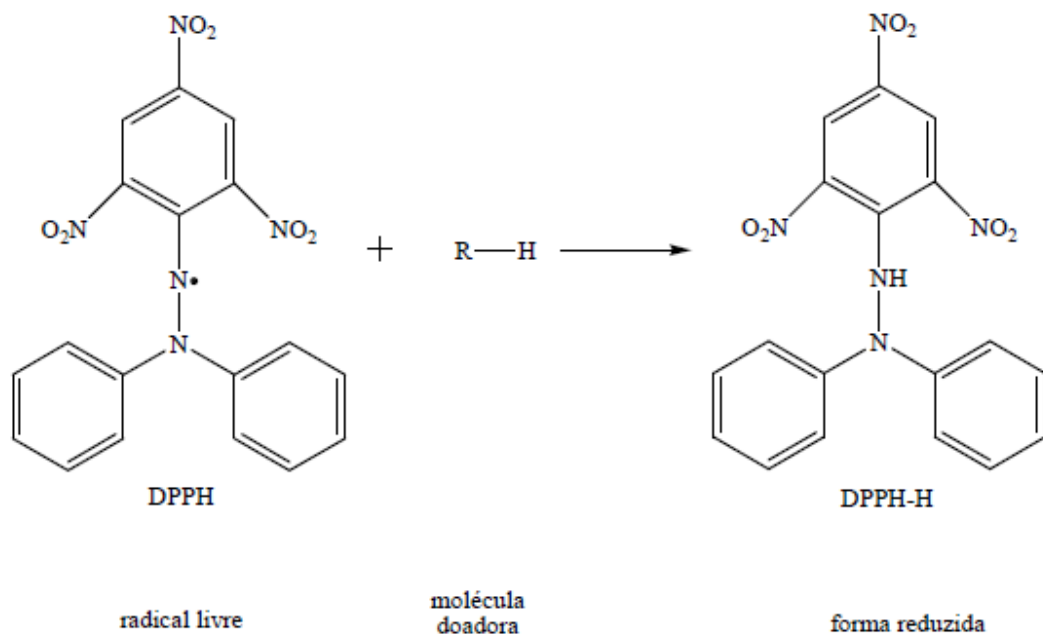
### 3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O metabolismo oxidativo é essencial à sobrevivência das células, porém apresenta um efeito colateral, a produção de radicais livres e outras "espécies reativas de oxigênio = EROs" (ROS, *reactive oxygen species*). Existem evidências do envolvimento destas espécies no sistema regulatório normal *in vivo*. Além disso, os ROS aparentemente estão envolvidos com sistemas de sinalização celular. Porém, quando um excesso de radicais livres é formado, eles podem acarretar efeitos destrutivos ou até letais à célula (ex. apoptose). A oxidação também afeta alimentos, onde é uma das maiores causas de desperdício, acredita-se que metade das lavouras de frutas e vegetais mundiais são perdidas devido à deterioração (ANTOLOVICH, et al., 2002).

Os antioxidantes naturais protegem o corpo humano de radicais livres, prevenindo o estresse oxidativo que está associado a diversas doenças. Evidências epidemiológicas indicam que o consumo de alimentos contendo antioxidantes naturais é vantajoso para a saúde (AMAROWICZ, et al., 2004).

Os carotenóides, flavonóides, e outros derivados fenólicos, tais como ácidos fenólicos, taninos, lignanas e ligninas são comumente encontrados nos diferentes órgãos vegetais. A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e a estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (AMAROWICZ, et al., 2004; LÓPEZ, et al., 2007). Um antioxidante por definição é uma substância que retarda ou previne a oxidação de um substrato oxidável quando presente em baixa concentração em relação a este substrato. O termo "substrato oxidável" inclui praticamente tudo que pode ser encontrado em um tecido vivo, principalmente proteínas, lipídios, carboidratos e DNA (DAN, 2008).

Uma das técnicas para a determinação da atividade antioxidante utiliza o DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), método amplamente difundido e relativamente rápido. Esta técnica é baseada na capacidade do radical livre estável a temperatura ambiente reagir com substâncias doadoras de hidrogênio incluindo derivados fenólicos (SANCHEZ-MORENO, et al., 1998; ROGINSKY; LISSI, 2005). O consumo do DPPH é caracterizado pela alteração da cor roxa para amarelo indicando a formação da molécula estável DPPH-H (Figura 24).



**Figura 24** - Representação da reação entre o DPPH e a molécula doadora de hidrogênios, formando a molécula estável reduzida DPPH-H

O 2,6-di-t-butil-4-metil-fenol ou butil hidroxi tolueno (BHT) é um antioxidante sintético usado, principalmente, como aditivo para alimentos, mas também é usado em cosméticos, fármacos, combustíveis para jatos, borrachas e derivados de petróleo (TURNER; KORKMAZ, 2007). O BHT diminui a taxa de auto-oxidação de alimentos e previne alterações na coloração, odor e sabor dos alimentos reagindo com os radicais livre, podendo ser adicionado diretamente aos alimentos ou às embalagens.

Fujisawa e colaboradores (2004) sugerem que o BHT é eficiente para quebrar a cadeia oxidativa.

A busca de antioxidantes naturais para a indústria alimentícia e farmacêutica aumentou consideravelmente a partir dos anos 80 devido ao potencial de carcinogênese e diversos outros males atribuídos aos antioxidantes sintéticos (DEGÁSPARI et al., 2004; LÓPEZ, et al., 2007), entre os quais se encontra o BHT (FUJISAWA et al., 2004) embora esta substância apresente alguns estudos contraditórios como Slaga (1995) que atribui a inibição da indução de câncer por alguns agentes carcinogênicos ao BHT.

### 3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As substâncias antimicrobianas têm se tornado menos efetivas contra muitos agentes infecciosos e a incidência de infecções oportunistas continua crescendo rapidamente devido ao aumento do número de pacientes imunodeficientes e isto tem criado a necessidade de procurar novas terapias mais eficazes contra estes patógenos. Desta forma, a pesquisa com extratos de plantas representa um ponto de partida para a descoberta de novos fármacos com atividade antimicrobiana (SETZER; VOGLER, 2006).

A resistência bacteriana certamente não representa um fato novo. Desde a introdução da benzilpenicilina em 1943 observa-se que as bactérias desenvolverão resistência a qualquer virtual antibiótico introduzido na prática clínica.

Apesar do surgimento de vacinas e agentes antimicrobianos eficazes na medicina humana, a múltipla resistência bacteriana aos antibióticos é um problema mundial. O surgimento de *Haemophilus*, *Klebsiella*, *Escherichia coli* e muitos outros produtores de  **$\beta$** -lactamase tornaram-se um dos maiores problemas na terapêutica. As cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes (SAMR) estão largamente distribuídas em hospitais. Infelizmente a classe dos antibióticos  $\beta$ lactâmicos de uso corrente são ineficazes para o tratamento das infecções do tipo SAMR.

Em virtude do seu mecanismo de ação diferenciado na parede celular, a vancomicina um preeminente glicopeptídio tornou-se o antibiótico de "último recurso" contra as bactérias Gram-positivas resistentes. O *Enterococcus spp* tornou-se problemático em consequência de sua resistência freqüente a vancomicina originando a sigla VRE (vancomicina resistente *Enterococcus*). Os *Enterococci* e *Enterobacter spp* vancomicina-resistentes, resistem a maioria dos antibacterianos conhecidos incluindo as quinolonas, macrólidos e inibidores da parede celular. (FERREIRA, et al 2004, PEREZ et al., 2008 ).

No mundo mais de 25% das mortes que estão diretamente relacionadas a doenças infecciosas, e muito desta mortalidade é devido a infecções por organismos resistentes e, obviamente, existe uma urgência na descoberta de novos agentes anti-infecciosos com novos mecanismos de ação e perfil de ação ampliado. No entanto, nas últimas três décadas apenas duas novas classes de antibióticos foram introduzidas, representadas pelo produto natural daptomicina (ciclopeptídio) e o linezolida oxazolidinona (KOEHN, 2008).

Na agricultura a procura por novos agentes antimicrobianos é intensa devido à crescente resistência dos microorganismos fitopatogênicos frente aos produtos sintéticos utilizados e outra preocupação é o impacto ambiental do uso de pesticidas a longo prazo. Frente a este problema, uma estratégia atual da agricultura vem sendo buscar métodos alternativos para o controle de doenças e pestes, que visem causar menos danos ao ambiente e à saúde humana (AMARAL et al., 2005). Devido à grande diversidade de constituintes presentes nas plantas elas se tornam fontes potenciais de substâncias que possam ser utilizadas como defensivos agrícolas contra os fitopatógenos (RODRIGUES et al., 2006).

A busca de produtos naturais que sejam eficazes no controle de doenças de plantas tem crescido nos últimos anos visando alternativas aos fungicidas sintéticos e que não apresentem efeitos negativos à saúde humana e ao meio ambiente. Estudos têm demonstrado a eficiência de alguns óleos e extratos de algumas espécies vegetais no controle de doenças de plantas, seja pela ação fungitóxica direta ou pelo aumento da resistência frente as doenças da cultura tratada (CARNEIRO et al., 2007).

As bactérias do gênero *Bacillus* apresentam grande importância econômica sendo empregadas em diversos processos industriais, e o *Bacillus subtilis* é empregado na identificação e validação de novos agentes antibacterianos, onde é empregado para identificar mecanismos e potenciais alvos para novos fármacos (ZEIGLER; PERKINS, 2008).

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno nosocomial freqüente, responsável por infecções em diversas partes do corpo humano, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Ela está amplamente distribuída no ambiente e é capaz de persistir por longos períodos em ambientes adversos desenvolvendo resistência aos agentes antimicrobianos (FUENTEFRÍA et al., 2008).

O principal agente etiológico de infecções do trato urinário, uma das infecções mais comuns, é a bactéria *Escherichia coli*, responsável por 65%-90% dos casos (GUIDONI et al., 2008), e estudos indicam alta taxa de resistência desse microrganismo a amoxicilina/ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprima e cefalotina (KOCH et al., 2008).

A intoxicação estafilocócica é a causa mais freqüente de surtos de doenças microbianas transmitidas por alimentos em diversos países. Sendo a espécie *Staphylococcus aureus* a mais freqüentemente associada a casos e surtos de intoxicação alimentar, devido a sua habilidade de produzir vários tipos de enterotoxinas (BORGES et al., 2008).

Na microbiota normal da boca a *Candida albicans* é o comensal evidenciado com maior freqüência atingindo até 70% do total de isolamentos apresentando um papel relevante no desencadeamento de infecções bucais, porém espécies consideradas patogênicas como *C. kefir*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, entre outras têm sido detectadas em casos de candidose bucal, principalmente naqueles relacionados à imunossupressão (ALVES et al., 2006). Espécies de *Candida* são encontradas no tubo gastrointestinal em 20 a 80 % da população adulta saudável. Estes microrganismos comensais tornam-se patogênicos caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou se ocorre o comprometimento de barreiras anatômicas em função de queimaduras ou de procedimentos médicos invasivos. As alterações dos mecanismos de defesa do

hospedeiro podem ser decorrentes de mudanças fisiológicas características da infância (prematividade) e envelhecimento ou mais freqüentemente, associadas a doenças degenerativas, neoplásicas, imunodeficiências congênitas ou adquiridas e imunodepressão induzida por atos médicos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Os fungos patogênicos do gênero *Botryosphaeria* causam prejuízos a uma diversidade de hospedeiros incluindo várias culturas economicamente importantes tais como maçãs, mangas, uvas e eucalipto embora, eles estejam presentes como endofíticos em plantas saudáveis (BURGESS et al., 2005; TAYLOR et al., 2005). Algumas espécies apresentam os primeiros registros como fungos patogênicos entre eles o *B. ribis* está sendo associado a manchas nas folhas de *Magnolia aff. Candollei* (MACEDO; BARRETO, 2008), e *Botryosphaeria rhodina* associado a manchas brancas em *Pistacia vera* L. (MICHAILIDES ET al., 2002).

O *Lasiodiplodia theobromae* é um fungo cosmopolita, polífago e oportunista vem se constituindo em um sério problema para os agricultores brasileiros. Ele apresenta uma gama de mais de 500 hospedeiros já catalogados em regiões tropicais e temperadas incluindo diversas plantas com interesse econômico entre as quais destacam-se as mangueiras, coqueiros e cajueiros, podendo causar diferentes sintomas nas plantas infectadas, incluindo seca-descendente (*die-back*), cancro em ramos, caules e raízes, lesões em estacas, folhas, frutos e sementes, além de incitar a morte de mudas e enxertos. A sua capacidade de infectar frutos coloca-o dentre os patógenos de maior poder de causar problemas de pós-colheita disseminados por meio de sementes. Em virtude da grande variedade de hospedeiros apresentada pelo o *L. theobromae* o controle químico por si só não oferece proteção nem controle efetivo das culturas sendo então indispensável à adoção de medidas adicionais como o controle biológico e manejo de culturas (FREIRE et al., 2004, PEREIRA et al., 2006).

### 3.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO

Alelopatia como relata Chon e colaboradores (2005), foi definida por Molish em 1937 como a interação química entre as plantas, incluindo influências inibitórias e estimulantes. A alelopatia desempenha um papel importante tanto em ecossistemas naturais quanto agrícolas. A maioria das plantas apresenta efeitos alelopáticos na germinação, crescimento e desenvolvimento de outras plantas liberando substâncias no solo. Os aleloquímicos, como são chamados os compostos alelopáticos, estão presentes em praticamente todas as plantas e nos seus tecidos, tais como folhas, galhos, raízes, flores, sementes, etc. (MUTLU; ATICI, 2008).

Os compostos alelopáticos identificados pertencem a várias classes químicas como terpenos, alcalóides, compostos fenólicos, esteróides, ácidos graxos de cadeia longa e lactonas insaturadas. Estes constituintes apresentam ações como herbicidas naturais, sem apresentar os efeitos prejudiciais dos herbicidas sintéticos (DIAS et al., 2005).

Para a escolha de uma planta teste para atividade alelopática, a espécie deve apresentar germinação rápida e uniforme, e um grau de sensibilidade que permita expressar os resultados sob baixas concentrações de aleloquímicos. A resistência a metabólitos secundários é uma característica espécie-específica, existindo aquelas plantas mais sensíveis como a alface (*Lactuca sativa* L.), o tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller) e o pepino (*Cucumis sativus* L.), que são espécies consideradas indicadoras de atividade alelopática (ALVES et al., 2004).

No âmbito da ecologia, o fenômeno da alelopatia pode explicar os mecanismos da sucessão vegetal, onde espécies invasoras podem excluir espécies nativas a partir de aleloquímicos (HIERRO; CALLAWAY, 2003). Logo, a presença dessas espécies numa área de plantio pode apresentar significativa influência no desenvolvimento de culturas (BATISH et al., 2001; SINGH et al., 2001).

Os aleloquímicos se mantêm nos tecidos das plantas mesmo depois de mortas, de onde são liberadas por volatilização ou lixiviação, sendo arrastadas para o solo, onde, ao atingirem a concentração necessária, podem influenciar o

desenvolvimento das plantas que nele se encontram desta forma o efeito alelopático pode se pronunciar, tanto durante o ciclo de cultivo, quanto nos cultivos subseqüentes (TEIXEIRA et al., 2004). A vegetação de uma área pode ter um modelo de sucessão condicionado às plantas pré-existentes e desta forma, no manejo agrícola, florestal e na horticultura, a ocupação prévia da área pode ter significativa influência sobre os cultivos que estão sendo implantados (FERREIRA; AQUILA, 2000).

A atividade alelopática envolve fatores bióticos (densidade vegetal, estágios de crescimento e microrganismos) e fatores abióticos (disponibilidade de água, temperatura e incidência de raios UV), dentre outros. Tais fatores podem afetar a liberação, a disponibilidade, a composição química e o modo de ação das substâncias alelopáticas (INDERJIT, 1996).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL VEGETAL

As folhas e as raízes de *Coccoloba mollis* foram coletadas em Natingui e Briolândia, distritos de Ortigueira-Paraná e no *campus* da Universidade Estadual de Londrina. O material foi desidratado à sombra e moído. A identificação botânica da espécie vegetal foi realizada pela professora Dra. Ana Odete Santos Vieira e uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Londrina - Paraná (BARROS, I. B de 001).

### 4.2 QUIMIOPROSPECÇÃO

Realizou-se a identificação dos principais grupos químicos presentes na espécie *Coccoloba mollis*. As partes dos materiais vegetais selecionadas para execução das técnicas neste trabalho foram as folhas e as raízes da *C. mollis*. Todos os testes realizados foram conduzidos em duplicatas e seguindo metodologias descritas na Farmacopéia Brasileira (1977 e 1997) com pequenas modificações.

#### 4.2.1 Pesquisa de Heterosídeos Fenólicos Simples

Aproximadamente 1g da droga vegetal foi acondicionada em uma câmara de microsublimação, e na seqüência foram adicionadas seis gotas de ácido clorídrico 6 N. Em seguida a câmara foi coberta com uma lâmina de vidro (1). A câmara de microsublimação foi submetida à ação de uma chapa quente (100 °C). A

sublimação ocorre entre os primeiros dez minutos. A primeira lâmina (1) foi descartada e substituída por duas outras lâminas (2 e 3) devidamente identificadas. O descarte é necessário, pois a primeira lâmina apresenta alto teor de água, o que interferiria nas reações subseqüentes. Ao sublimado formado na lâmina (2) foram adicionadas três gotas de  $\text{AgNO}_3$  (1 % em amônia). A formação de precipitado preto indica reação positiva. Ao sublimado presente na lâmina (3) foram adicionadas três gotas de  $\text{FeCl}_3$  (1 % em água). O desenvolvimento de coloração verde representa uma reação positiva. A presença de heterosídeos fenólicos simples na amostra só é confirmada quando as duas reações, com  $\text{AgNO}_3$  e  $\text{FeCl}_3$ , apresentarem resultados positivos.

#### 4.2.2 Pesquisa de Flavonóides

Uma solução a 10 % da droga vegetal foi preparada, (etanol a 75 % v/v), seguida de filtração com algodão em um balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com álcool etílico. 2 mL da solução a 10 % foi transferida para uma cápsula de porcelana e submetida a banho-maria (45 °C) até secura. O resíduo obtido na cápsula foi submetido a tratamento com 0,2 mL de clorofórmio, para eliminação da clorofila. A cápsula foi retirada do banho-maria, o resíduo obtido foi redissolvido com 1 mL de álcool etílico a 70 % v/v e transferido para um tubo de ensaio. Ao tubo de ensaio foram adicionados 200 mg de magnésio metálico em pó e 1 mL de ácido clorídrico concentrado, cuidadosamente pelas paredes do tubo. O desenvolvimento de coloração róseo-avermelhada representa resultado positivo.

#### 4.2.3 Pesquisa de Cumarinas

Em câmara de microsublimação, foi adicionado 1 g da droga vegetal, aquecida em chapa quente (100 °C, 10 min.). O sublimado formado na lâmina superior

foi dissolvido com 0,5 mL de metanol. Em uma folha de papel filtro foram adicionadas cinco gotas do material dissolvido, de modo a obter uma mancha de aproximadamente um centímetro de diâmetro. Duas gotas de solução de KOH (10 % em etanol) foram adicionadas sobre a mancha e mantida a temperatura ambiente até secar. As manchas foram expostas a radiações ultravioletas (lâmpada UV com  $\lambda$  de 254 a 366 nm). Quando a mancha apresenta uma fluorescência verde ou azul, já aparente após o primeiro minuto o resultado é considerado positivo.

#### 4.2.4 Pesquisa de Taninos

Uma solução a 5 % da droga vegetal foi preparada (5 g da droga foram adicionadas a 100 mL de água destilada e aquecida até fervura). A solução obtida foi filtrada a quente e mantida em temperatura ambiente até resfriamento. A solução foi dividida em quatro tubos de ensaio devidamente identificados. No primeiro tubo de ensaio foram adicionados 2 mL da solução 5 % da droga vegetal duas gotas de ácido clorídrico 6 N e seis gotas de solução de gelatina (2,5 % em água). A formação de precipitado é evidência de presença de taninos. No segundo tubo de ensaio 2 mL da solução 5 % foram acondicionados com 10 mL de água destilada e quatro gotas de solução de  $\text{FeCl}_3$  (1 % em metanol). O desenvolvimento de coloração azul ou verde caracteriza reação positiva para taninos hidrolisáveis ou condensados, respectivamente. No terceiro tubo de ensaio foram adicionados 10 mL de solução de ácido acético (10 % em água), 5 mL de solução de acetato de chumbo (10 % em água) e 5 mL da solução 5 %. A formação de precipitado esbranquiçado é considerada como reação positiva para taninos hidrolisáveis. O último tubo de ensaio foi identificado como o branco, com adição apenas de 5 mL da solução 5 % da droga vegetal. A amostra é considerada como positiva para taninos, desde que no mínimo duas das três reações acima sejam positivas.

#### 4.2.5 Pesquisa de Antraquinonas

A técnica divide-se em duas fases. Na primeira, 2 g da droga vegetal com 4 mL de éter etílico, ou o suficiente para cobrir o pó da droga vegetal, foram adicionadas em um tubo de ensaio com agitação por dois minutos. A solução formada foi filtrada com algodão e adicionada em outro tubo de ensaio. Ao novo tubo de ensaio foi adicionado 1 mL de solução de NaOH (10 % em água). Esta reação, conhecida como reação de Bornträger direta, o desenvolvimento de coloração rósea-avermelhada indica resultado positivo. A segunda fase compreende a Reação de Bornträger indireta com hidrólise, 2 g da droga vegetal foram adicionados em um béquer juntamente com 20 mL de álcool etílico 25 % v/v aquecidos até fervura. A solução obtida foi filtrada a quente em algodão e acondicionada juntamente com 30 mL de ácido sulfúrico (5 % em água) em um funil de separação, que em seguida foi agitado e mantido em temperatura ambiente até resfriamento. Após resfriamento, 20 mL de hexano foram adicionados ao funil de separação que cuidadosamente, foi agitado e mantido em repouso até separação das fases. A fase orgânica foi recolhida e 5 mL da mesma foram transferidos para um tubo de ensaio. Ao tubo de ensaio foram adicionados 3 mL de NH<sub>4</sub>OH (10 % em água). O desenvolvimento de coloração rósea-avermelhada na camada amoniacal é considerado reação positiva.

#### 4.2.6 Pesquisa de Saponinas

Em um béquer foram adicionados 5 g da droga vegetal juntamente com 25 mL de água destilada submetidos à fervura por três minutos. O decoto obtido foi filtrado e transferido, em torno de 10 mL, para um tubo de ensaio com agitação enérgica no sentido vertical por 15 min. A presença de espuma persistente, igual ou maior a um centímetro, é considerada reação positiva.

#### 4.2.7 Pesquisa de Glicosídeos Cardiotônicos

Foram adicionados 5 g da droga vegetal em um sachê feito de papel de filtro seguida da adição de 30 mL de álcool etílico 50 % v/v ou quantidade suficiente para cobrir o sachê, aquecidos sob refluxo até ferver. A solução obtida, foi filtrada a quente por meio de algodão e adicionada com 30 mL de acetato de chumbo (10 % em água). A mistura permaneceu em temperatura ambiente até resfriamento e seguida de nova filtração. Ao filtrado foram adicionados 20 mL de água destilada e particionado em um funil de separação com três porções de 10 mL de clorofórmio. Após repouso a fase orgânica foi coletada, filtrada e dividida em volumes iguais para três cápsulas de porcelana devidamente identificadas. As cápsulas de porcelana foram aquecidas em chapa quente (100 °C) até obtenção de resíduo seco. Na primeira cápsula foi adicionado 1 mL de anidrido acético, transferido para tubo de ensaio, e em seguida adicionado, cuidadosamente pelas paredes do tubo, 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, sem agitar. Essa reação, conhecida como reação de Liebermann-Burchard, é considerada positiva através do desenvolvimento de coloração azul ou verde, vermelha-rósea-púrpura ou violácea para provável presença de núcleo esteroidal e de triterpenos policíclicos. Na segunda cápsula foram adicionadas seis gotas do reativo de Kedde, preparado imediatamente antes do uso. A reação de Kedde é utilizada para identificação do anel lactônico, caracterizada como positiva através do desenvolvimento de coloração castanho-avermelhada a vermelho-violeta. Na terceira cápsula, o resíduo seco foi dissolvido com 1 mL de ácido acético glacial, adicionado de duas gotas de solução de FeCl<sub>3</sub> (2 % em água) e transferido para um tubo de ensaio. Ao tubo de ensaio foi adicionado, cuidadosamente pelas paredes do tubo, 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, de modo que os dois líquidos não se misturassem. A metodologia utilizada, conhecida como reação de Keller-Killiani é utilizada para identificação de açúcares (desoxioses em extremidades livres), evidenciada pela formação de anel vermelho-acastanhado. A presença de glicosídeos cardiotônicos na droga vegetal não pode ser confirmada apenas por resultados positivos para as reações

de Liebermann-Buchard, Kedde e Keller-Kiliani, sendo necessária a realização de uma metodologia adicional.

#### 4.2.7.1 Reagente de Kedde

A uma solução metanólica de ácido 3,5-dinitrobenzóico a 2% (4 mL , recente) foram adicionados 6 mL de solução metanólica de KOH 1N.

#### 4.2.8 Pesquisa de Alcalóides

Dois testes são preconizados, um preliminar e um decisivo. No teste preliminar, em um béquer, 10 g da droga vegetal juntamente com 30 mL de ácido clorídrico 2 N foram aquecidos e submetidos a fervura por três minutos. A solução resfriada foi filtrada e dividida em quatro tubos de ensaio devidamente identificados. Aos tubos um, dois e três, foram adicionadas três gotas do reagente de Dragendorff, Mayer e Bertrand, respectivamente em cada tubo. O tubo quatro foi o branco. A reação positiva é caracterizada pela formação de turvação e/ou precipitado. Para confirmação dos resultados o teste decisivo foi realizado adicionando-se em um béquer, 10 g da droga vegetal com 50 mL de ácido clorídrico 2 N e aquecidos até fervura. A solução obtida foi mantida em temperatura ambiente até resfriamento e então filtrada. Ao filtrado foi adicionado uma solução de NH<sub>4</sub>OH (40 % em água) até pH 9. A solução alcalinizada foi transferida para funil de separação e particionada com a adição de 50 mL de clorofórmio. Após repouso, a fase orgânica foi recolhida, transferida a outro funil de separação, que foi adicionado de 20 mL de ácido clorídrico 2 N. Após os processos de agitação, repouso e separação de fases, a porção aquosa foi recolhida e dividida em quatro tubos de ensaio devidamente identificados. Aos tubos um, dois e três, foram adicionadas três gotas dos reagentes de Dragendorff, Mayer e Bertrand,

respectivamente. O tubo quatro foi o branco. A reação positiva é caracterizada pela formação de turvação e/ou precipitado. A pesquisa de alcalóides só é considerada positiva, quando os resultados são positivos para o teste preliminar e para o decisivo.

#### 4.2.8.1 Reagente de Dragendorff

Para preparar a Solução A, 0,6 g de nitrato de bismuto foram dissolvidos em 2,5 mL de ácido clorídrico concentrado seguida da adição de 2,5 mL de água destilada. Para preparar a Solução B, 1,5 g de iodeto de potássio foram dissolvidos em 10 mL de água destilada. As Soluções A e B foram misturadas em volumes iguais para assim formar o reagente de Dragendorff.

#### 4.2.8.2 Reagente de Mayer

Em um béquer foram adicionados cloreto de mercúrio (2,72 g), a iodeto de potássio (10 g) dissolvidos em 20 mL de água, Dilui-se a solução final para 200 mL com auxílio de um balão volumétrico.

#### 4.2.8.3 Reagente Bertrant

Foi dissolvido 5 g de ácido silicotúngstico em 100 mL de água.

## 4.3 DESENVOLVIMENTO FITOQUÍMICO

### 4.3.1 Equipamentos

As análises de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) foram realizadas no CG17A acoplado com CGMS-QP5000 Shimadzu e o software CLASS 5000 com as bibliotecas NIST12 e NIST62. Os dados foram obtidos por meio de uma coluna capilar DB-1 J&W Scientific (30 m x 0,25 mm, espessura de filme 0,25  $\mu\text{m}$ ). As condições de análise utilizadas foram: gás de arraste He; vazão de 1,5 mL  $\text{min}^{-1}$ ; temperatura do injetor 300 °C; temperatura da coluna programada, sendo iniciada a 60 °C por 4 min, rampa de 10 °C  $\text{min}^{-1}$  até 250 °C, 20 °C  $\text{min}^{-1}$  até 330 °C, permanecendo em 330 °C por 10 min; modo "split" 1:10; faixa de massa 45 a 700. As análises de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC) foram realizadas no CG17A Shimadzu, e uma coluna capilar DB-5 J&W Scientific (30 m x 0,25 mm, espessura de filme 0,25  $\mu\text{m}$ ). As condições de análise foram: temperatura de injetor e detector 300 °C, gás de arraste N<sub>2</sub>, vazão de 1,2 mL  $\text{min}^{-1}$ ; programação de temperatura : 100 °C por 5 min, 20 °C até 320 °C, permanecendo a 320 °C por 10 min; modo "split" 1:10. Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) foram obtidas em um Bruker DRX-500, espectros de <sup>1</sup>H (399,782 MHz) e <sup>13</sup>C (100,525 MHz) foram obtidos a 27 °C utilizando CDCl<sub>3</sub> como solvente.

### 4.3.2 Obtenção dos Extratos Brutos e das Frações

As raízes e as folhas desidratadas foram trituradas e submetidas à extração exaustiva com etanol. As soluções obtidas foram filtradas e concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Partes dos extratos etanólicos foram

separadas para testes biológicos. O extrato obtido das raízes foi submetido a uma extração com hexano resultando em uma fração solúvel em hexano (6 g), o extrato bruto das folhas foi extraído com acetato de etila gerando uma fração solúvel em acetato de etila (30 g).

#### 4.3.3 Isolamento e Purificação dos Constituintes

Os fracionamentos cromatográficos foram realizados utilizando-se como adsorvente a sílica-gel 60 (0,063 a 0,200 mm) Merck. As cromatografias em camadas delgadas (CCD) foram realizadas com sílica gel G UV<sub>254</sub> (Macherey-Nagel). A revelação das placas cromatográficas foi realizada por meio de detecção na região do ultravioleta (254 nm) e com o reagente de vanilina.

#### 4.3.4 Isolamento e Purificação de Constituintes do Extrato Hexânico das Raízes

Considerando-se as dificuldades encontradas na solubilização do extrato em acetato de etila, para contornar este problema iniciou-se o fracionamento com a fração hexânica mais apolar.

A parte solúvel em hexano (4,5 g) foi eluída em coluna cromatográfica de vidro (4,5 cm de diâmetro) com sílica-gel (163,5 g) como fase estacionária e a pastilha a ser cromatografada foi preparada com sílica gel 60 (5 g). A eluição cromatográfica foi realizada por meio de hexano, Hexano:diclorometano, diclorometano, diclorometano:acetato de etila acetato de etila em polaridades crescentes, 1954 frações (250 mL) foram coletadas. As frações foram concentradas em evaporador rotatório, analisadas por meio de cromatografia em camada delgada, reveladas com vanilina e reunidas de acordo com as suas semelhanças. As frações 001 a 030, 031 a 060 e 270 a 310 foram reunidas, solubilizadas em diclorometano, precipitadas com metanol e

submetidas a resfriamento (-5 °C). Os precipitados obtidos CMR-1 e CMR-2 (cores branca) e CMR-3 (alaranjada), foram separados através de centrifugação. As frações 1501 a 1505 foram submetidas a uma extração ácido-base levando e a fração ácida, de cor alaranjada (CMR-4).

#### 4.3.5 Isolamento e Purificação de Constituintes do Extrato em Acetato de Etila das Folhas

A porção solúvel em acetato de etila (30 g) foi eluída em coluna cromatográfica (4,5 cm de diâmetro) de sílica gel 60 G (174,5 g) e a pastilha a ser cromatografada foi preparada com sílica-gel 60 G. O sistema eluente utilizado foi hexano, Hexano:diclorometano, diclorometano, diclorometano:acetato de etila acetato de etila em polaridades crescentes. Foram coletadas 352 frações de 250 mL cada. As frações foram concentradas em evaporador rotatório, analisadas por cromatografia em camada delgada, reveladas com vanilina e reunidas de acordo com as suas semelhanças. As frações 001 a 019 e 021 a 029 foram reunidas, solubilizadas em diclorometano, seguidas da adição de metanol, levadas ao freezer (-5 °C) conduzindo a formação de precipitados de cores branca. (CMF-1 e CMF-2). As frações 096 a 135 e 248 a 256 foram reunidas e submetidas à Cromatografia de Camada Delgada Preparativa (CCDP) possibilitando a obtenção das amostras CMF-3 e CMF-4.

#### 4.3.6 Revelador de Vanilina

O reagente revelador vanilina (3 g ) foi dissolvido em 135 mL de metanol seguido da adição de 135 mL de água destilada. A solução foi colocada em banho de gelo e cuidadosamente foram adicionados 30 mL de ácido sulfúrico concentrado. A solução foi armazenada em frasco âmbar a 4 °C.

#### 4.4 TOXICIDADE MATERNA DOS EXTRATOS DE *COCCOLOBA MOLLIS*

##### 4.4.1 Animais

Os animais utilizados foram os camundongos Swiss (*Mus musculus*), machos e fêmeas, adultos, pesando aproximadamente 30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com tampa de arame zincado, contendo maravalha e permaneceram em regime de luminosidade controlada, ciclo de 12 horas claro / 12 horas escuro, a  $22 \pm 2$  °C, com água e ração *ad libitum*. Todo o experimento foi conduzido de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina.

Para obtenção dos animais dos diferentes grupos experimentais foram colocados para acasalar no final da tarde, um camundongo macho com dois camundongos fêmeas por gaiola. No dia seguinte, com um intervalo de 12 horas, as vaginas das fêmeas foram examinadas para verificar a presença do "plug vaginal" o qual determinou o dia zero gestacional.

##### 4.4.2 Grupos Experimentais para Avaliação da Toxicidade Materna

As fêmeas foram distribuídas em oito grupos experimentais. Elas foram tratadas via gavagem com o extrato etanólico das folhas e das raízes de *Coccoloba mollis* do quinto ao décimo sétimo dia gestacional. O grupo 1 foi tratado com PBS (*Phosphate Buffered Saline*, tampão de fosfato pH =7) como controle negativo, o grupo 2 foi tratado com uma solução de PBS e DMSO (Dimetilsulfóxido, 20 % v/v), caracterizando o controle do veículo empregado, os grupos 3, 4 e 5 e 6, 7 e 8 foram

tratados com o extrato etanólico das folhas e das raízes de *Coccoloba mollis* respectivamente nas concentrações de 50, 75 e 100 mgKg<sup>-1</sup> em cada grupo.

Para a avaliação do ganho de peso materno, as fêmeas foram pesadas durante todo o período de prenhez. No 18º dia, foram eutanasiadas por deslocamento cervical e, em seguida, foi realizada a laparotomia. O útero com fetos foi pesado e realizou-se a histerectomia e onfalectomia. A correção do ganho de peso materno foi realizada considerando-se o ganho de peso materno menos peso do útero gravídico. O conteúdo uterino das fêmeas foi analisado, verificando-se a presença de reabsorções, número de fetos vivos e mortos, peso fetal e placentário, comprimento e peso fetal. O número de sítios de implantação foi determinado através do método de Salewisk (1964). Com estes dados foram calculados: taxa de reabsorção ( $n^\circ$  de reabsorções x 100 /  $n^\circ$  implantações); taxa de perdas pós-implantacionais ( $n^\circ$  de implantações -  $n^\circ$  fetos vivos x 100 /  $n^\circ$  de implantações); taxa de viabilidade fetal ( $n^\circ$  de fetos vivos x 100 /  $n^\circ$  implantações) e índice placentário (peso placentário / peso fetal). As vísceras maternas: coração, pulmões, fígado e rins foram pesados.

#### 4.4.3 Análise Estatística

Os dados com distribuição normal foram analisados através de ANOVA (análise de variância) seguido do teste de comparação de médias - Teste de *Tukey* e os com distribuição não-normal foram analisados por Mann-Whitney e Dunn através do programa estatístico INSTAT (Software livre para análise estatística). O nível de significância considerado foi de 5 %.

#### 4.5 TESTE DE LETALIDADE DE *ARTEMIA SALINA*

O teste de letalidade de *Artemia salina* foi realizado segundo metodologia descrita por Silva e colaboradores (2007) com pequenas alterações.

Os ovos de *A. salina* foram incubados em água de mar artificial, a 20-30 °C. Para a eclosão dos ovos no período de 48 horas foi utilizada uma caixa de plástico contendo no seu interior uma divisória com microperfurações de forma que, apenas um dos lados ficava iluminado para permitir, por fototropismo, a migração das larvas de um compartimento da caixa para o outro. Os extratos etanólicos das folhas e das raízes foram solubilizados e adicionados a um balão volumétrico de 5 mL com no máximo 3 gotas de Tween 80 e 2 mL de DMSO e o volume foi aferido com água marinha artificial. A solução de água marinha foi empregada para as diluições das diferentes concentrações de extratos testadas. No teste, foram empregadas cinco diferentes concentrações dos extratos entre de 20 a 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em tubos de ensaio com 5 mL de solução. A cada tubo foram adicionadas de 10 a 12 larvas de modo que os tubos ficaram expostos a iluminação por 24 h. Após este período procedeu-se a contagem das larvas verificando quantas permaneceram vivas e quantas morreram. O teste foi realizado em quadruplicata. O valor de DL50 foi calculado através de regressão linear. Os resultados são considerados bioativos se os valores de DL<sub>50</sub> forem inferiores a 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Como controle negativo foi utilizada uma solução idêntica a empregada para solubilizar o extrato e como controle positivo uma solução de dicromato de potássio (10 mg mL<sup>-1</sup>) solubilizada da mesma forma.

#### 4.5.1 Composição da Água do Mar Artificial

Os constituintes da água do mar artificial são: 23 g NaCl, 11 g  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 4 g  $Na_2SO_4$ , 1,3 g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  e 0,7 g de KCl em 1000 mL de água destilada (PARRA et al., 2001).

#### 4.6 TESTE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A capacidade dos extratos de remover o radical estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) foi monitorado pelo método de Amarowicz e colaboradores (2004) com pequenas modificações. Este método baseia-se na remoção do radical estável DPPH do meio reacional pela ação dos antioxidantes presentes na amostra.

O grau de descoloração do radical DPPH foi medido espectrofotometricamente em uma solução metanólica. Os extratos etanólicos das folhas e das raízes foram dissolvidos em 4 mL de metanol de forma a obter soluções de concentrações de 0,2 a 500  $\mu g mL^{-1}$ . A cada amostra foram adicionados 500  $\mu L$  de uma solução de DPPH (0,1 mM). A mistura permaneceu no escuro a temperatura ambiente por 30 minutos. A absorbância das soluções resultantes foram medidas a 517 nm em um espectrofotômetro V-1200 Pró-Análise®. Uma solução metanólica de DPPH que apresentou total decaimento da coloração roxa (2 mg de BHT dissolvido em 4 mL de metanol com 0,5 mL da solução de DPPH a 0,01 mM) foi utilizada para correção de "background". A atividade de seqüestro de radicais (%ASR) foi calculada como porcentagem de descoloramento do DPPH usando a seguinte equação:

$$\%ASR = \frac{AbsCN - AbsA}{AbsCN} \times 100$$

Onde: AbsCN é a absorbância da solução de DPPH sem adição alguma e a AbsA é a absorbância de uma solução de DPPH com adição de extrato em uma determinada concentração.

A concentração mínima inibitória de 50 % (CMI<sub>50</sub>) foi calculada através de regressão linear em um gráfico de dispersão da concentração do extrato versus a %ASR ( $r^2 > 0,98$ ), o teste foi realizado em triplicata e o coeficiente de variação máximo aceito foi de 5 %.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

##### 4.7.1 Avaliação da Atividade Antimicrobiana Frente a Bactérias e Leveduras

As bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), as gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) e as leveduras (*Cândida albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*) foram utilizadas nos testes com os extratos etanólicos das folhas e das raízes de *Coccoloba mollis*.

Com o auxílio de uma alça de platina os microrganismos foram inoculados em meio líquido de Müller Hinton para as bactérias e Sabouraud para as leveduras. Os cultivos foram então incubados a  $37 \pm 2$  °C por 24 h até atingir  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> quando comparados à escala de Mac Farland.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana foram utilizadas placas de Petri com os meios Müller Hinton e Sabouraud acrescidos de 2 % de ágar-ágar, a estas placas foram inoculadas com 50 µL de suspensão de células e espalhadas com alça de Drigalski. Em cada placa foram perfurados oito poços eqüidistantes e um central com auxílio de uma ponteira plástica esterilizada e a cada um deles foi adicionado 30 µL das amostras a serem testadas. As placas foram incubadas a  $37 \pm 2$  °C e avaliadas após 24 e 48 h.

Como controles positivos foram utilizados os antibióticos Tetraciclina para as bactérias gram-positivas, Penicilina para as bactérias gram-negativas e Nistatina para as leveduras (0,05 mg em 30 µL). Foi também avaliado o efeito do solvente DMSO (30 µL) no crescimento dos referidos microrganismos.

#### 4.7.2 Avaliação da Atividade Antimicrobiana Frente a Fungos Filamentosos

Os fungos fitopatogênicos *Botryosphaeria rhodina*, *B.ribis* e *Lasiodiplodia theobromae*, foram cultivados em Batata Dextrose Ágar (BDA) por cinco dias a  $28 \pm 2$  °C, após este período foram retiradas esferas com aproximadamente 0,7 cm de diâmetro e estas foram utilizadas como inóculo para os testes com as substâncias isoladas (fisciona e emodina) e os extratos das folhas e das raízes de *Cocoloba mollis*.

As amostras foram solubilizadas em DMSO nas diferentes concentrações analisadas, 0,8 mL de cada uma destas soluções foram adicionadas em 17 mL de BDA e então o meio foi distribuído em placas de Petri, logo após foram inoculadas as esferas contendo hifas distribuídas homoganeamente, as placas foram incubadas a  $28 \pm 2$  ° C por 5 dias. Após este período o diâmetro das colônias foi medido e foi realizado o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento. Como controles foram utilizados os seguintes cultivos, somente em BDA (controle negativo), BDA contendo DMSO (ação inibitória do DMSO) e BDA contendo 0,18 % de Captan (controle positivo).

A porcentagem de inibição foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\%Inibição = \frac{CC - CE}{CC} \times 100$$

onde, CC é o crescimento micelial no controle, e CE é o crescimento micelial com a adição da amostra teste (QUIROGA et al., 2001).

#### 4.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO DE EXTRATOS DE *COCCOLOBA MOLLIS*.

O ensaio foi conduzido segundo metodologia de Ferreira e colaboradores (2007) com pequenas modificações.

A solução mãe foi preparada com 1 g do extrato etanólico de folhas e de raízes *C. mollis* respectivamente, 5 mL de acetato de etila, 9 gotas de Tween 80 e completou-se para o volume para 50 mL com água destilada em um balão volumétrico, obtendo-se uma solução a 2 % de cada extrato. A partir da solução mãe foram feitas diluições de modo que atingissem as seguintes concentrações: 0,125 %; 0,25 %; 0,50 % e 1,00 %. Para controle do solvente foi utilizada uma solução idêntica a utilizada para solubilizar os extratos e a água destilada como controle negativo.

Para realizar o teste de germinação foram usadas sementes de *Lactuca sativa*, cultivar Simpson, tratadas com Captan 75% a 2%.

Folhas de papel filtro esterilizadas, recortadas em círculos de aproximadamente 9 cm de diâmetro e colocadas em placas de Petri com diâmetro semelhante. Cada círculo de papel filtro pesava em média 1,48 g, deste modo adicionaram-se as soluções diluídas de cada tratamento na proporção de 2,5 vezes o peso do papel. Após o umedecimento do papel de filtro com os devidos extratos, as placas foram expostas por cerca de uma hora para a volatilização dos solventes orgânicos. Em seguida foram colocadas 50 sementes por placa, e foram mantidas em estufa B.O.D. (demanda bioquímica de oxigênio) à temperatura de 25 °C ± 2 fotofase de 14 horas. O experimento foi conduzido em quadruplicata.

As sementes foram avaliadas diariamente no mesmo horário durante sete dias, sendo a germinação considerada efetiva a partir da emissão da radícula com cerca de 2 mm.

Para cada repetição, foi calculado o índice de velocidade de germinação (IVG), somando-se o número de sementes germinadas a cada dia, dividindo pelo respectivo número de dias transcorridos a partir de semeadura, conforme Maguire (1962):

$$IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \dots + \frac{G_N}{N_N}$$

onde: G1, G2 e GN representam o número de sementes normais germinadas até o enésimo dia. N1, N2 e NN representam o número de dias em que se avaliaram as germinações G1, G2 e GN.

Para a análise dos dados foi determinado o delineamento inteiramente casualizado, comparando-se as médias por Tukey, a 5 % de probabilidade utilizando o software SASM-Agri (ALTHAUS; CANTERI; GIGLIOTI, 2001).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 QUIMIOPROSPECÇÃO

A pesquisa fitoquímica tem por objetivos avaliar a presença de classes químicas presentes na espécie de interesse, há necessidade de uma abordagem química, isto é, um exame que forneça uma avaliação geral da composição química da planta, indicando os grupos de metabólitos secundários relevantes da mesma; isto é realizado por meio da análise fitoquímica preliminar (MATOS, 1997; SIMÕES et al., 2000).

Os ensaios realizados demonstraram a presença de flavonóides e taninos nas folhas e raízes e antraquinonas somente nas raízes de *C. mollis* (Tabela 4).

As classes de metabólitos detectados são compatíveis com as substâncias já isoladas neste gênero.

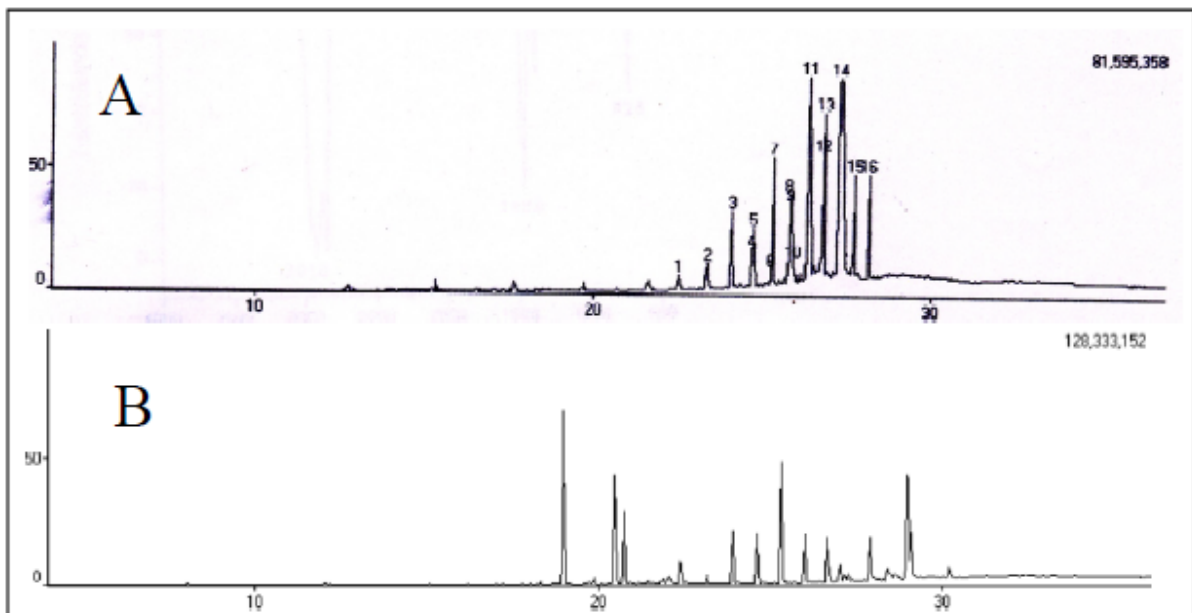
**Tabela 4** - Quimioprospecção de *Coccoloba mollis*

Classe de Metabólitos	RESULTADOS	
	FOLHA	RAIZ
Heterosídeos Fenólicos		
Simples	-	-
Flavonóides	+	+
Cumarinas	-	-
Taninos	+	+
Antraquinonas	-	+
Saponinas	-	-
Glicosídeos Cardiotônicos	-	-
Alcalóides	-	-

+ presença do grupo químico; - ausência do grupo químico

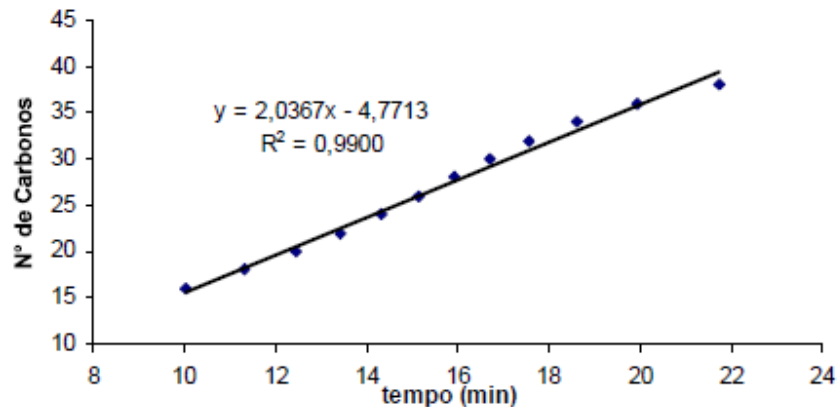
## 5.2 IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS CMF-1 E CMR-1

As amostras CMF-1 e CMR-1 ao serem submetidas a uma análise por CG-EM mostraram constituir-se de uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos de cadeias longas (Figura 25). Para a identificação utilizou-se a análise por CG-DIC na qual foram injetadas as amostras e um padrão composto por hidrocarbonetos (DRH-004S Luft/Lust) nas mesmas condições. A identificação foi realizada comparando-se os tempos de retenção e índices de *Kovats* obtidos com as amostras e o padrão empregado. A Figura 26 apresenta a reta obtida com os padrões relacionando o tempo de retenção e o tamanho das cadeias dos hidrocarbonetos respectivamente.



**Figura 25** - A – Cromatograma da amostra CMF-1; B – Cromatograma da amostra CMR-1

A análise permitiu identificar hidrocarbonetos alifáticos de C-16 a C-31 exceto o C-17 na amostra CMF-1 e C-28 a C-34 excetuando C-30 e 31 na amostra CMR-1.

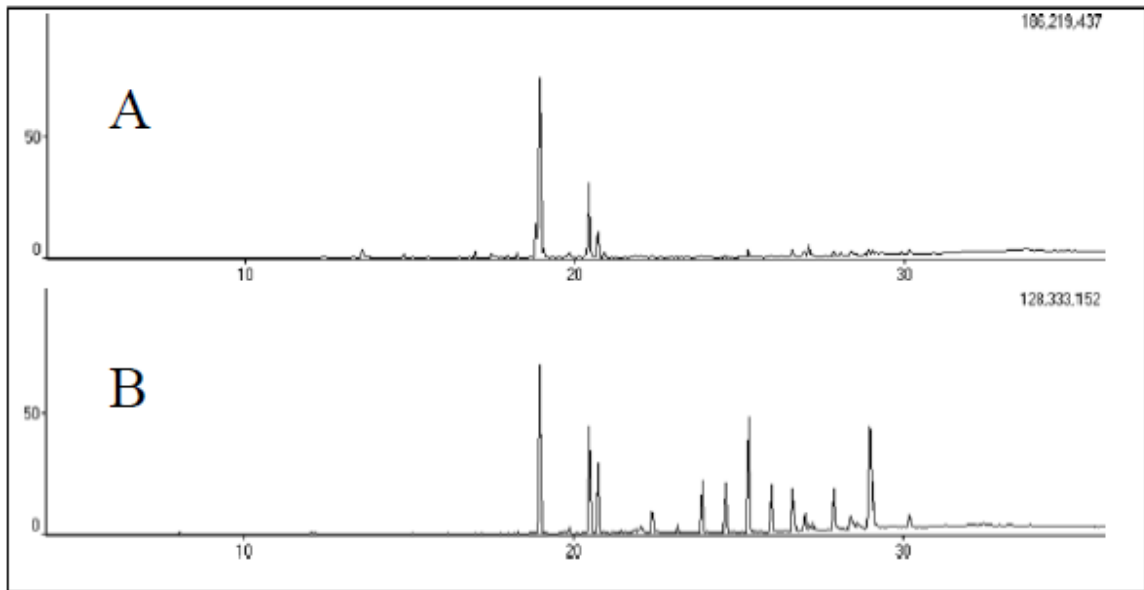


**Figura 26** - Número de carbonos x tempo de retenção em minutos.

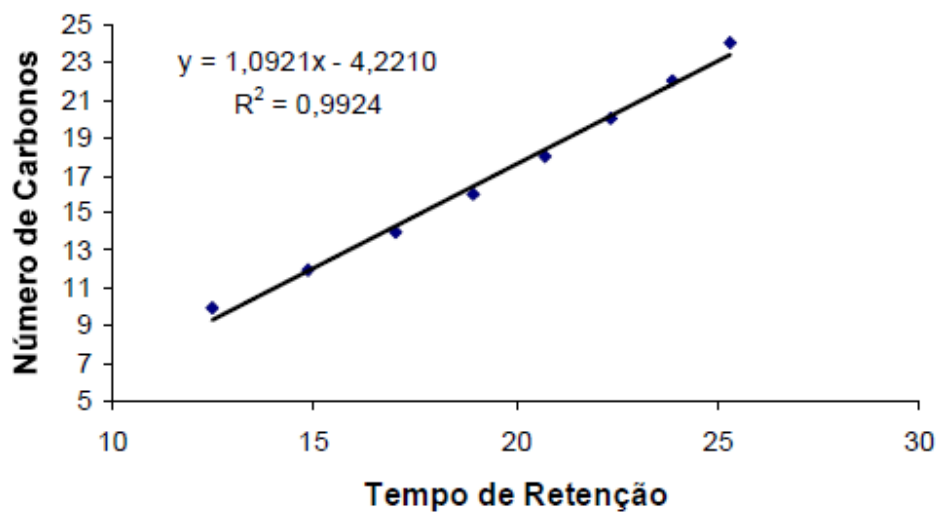
### 5.3 Identificação das Amostras CMF-2 E CMR-2

As amostras CMF-2 e CMR-2 ao serem analisados por CG-EM mostraram-se como misturas de ésteres etílicos de ácidos graxos, a Figura 27 traz os cromatogramas obtidos. Para a identificação utilizou-se a análise por CG-EM na qual foram injetadas as amostras e um padrão composto por ésteres etílicos de ácidos graxos (FAAES 49454-U) nas mesmas condições. A identificação foi realizada comparando-se os tempos de retenção e índices de *Kovats* obtidos com as amostras e o padrão empregado. A Figura 28 mostra o gráfico obtido com os padrões relacionando o tempo de retenção e o tamanho das cadeias dos ésteres etílicos de ácidos graxos.

Foram identificados os ésteres etílicos de ácidos graxos de 12, 15, 18, 22, 25, 26, 27 na mostra CMF-2 e 18, 22, 24, 25 e 27 carbonos na amostra CMR-2.



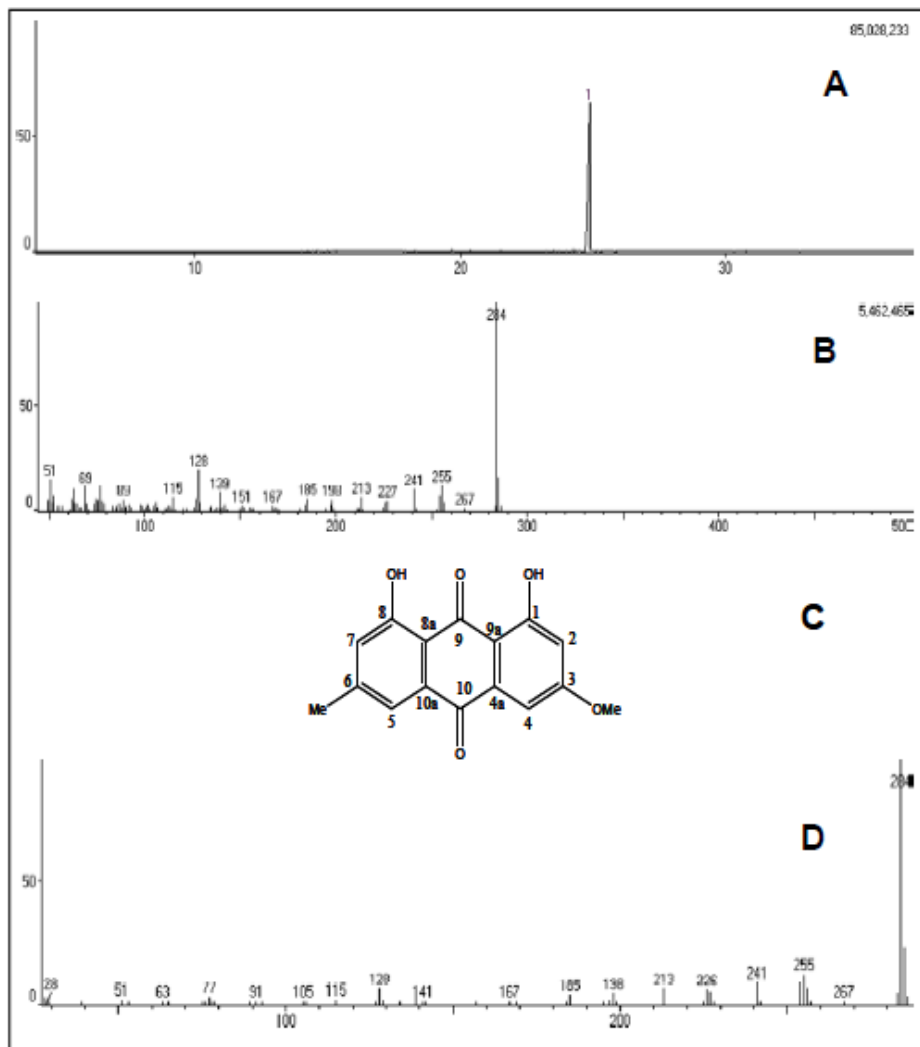
**Figura 27** - A – Cromatograma da amostra CMF-2; B – Cromatograma da amostra CMR-2



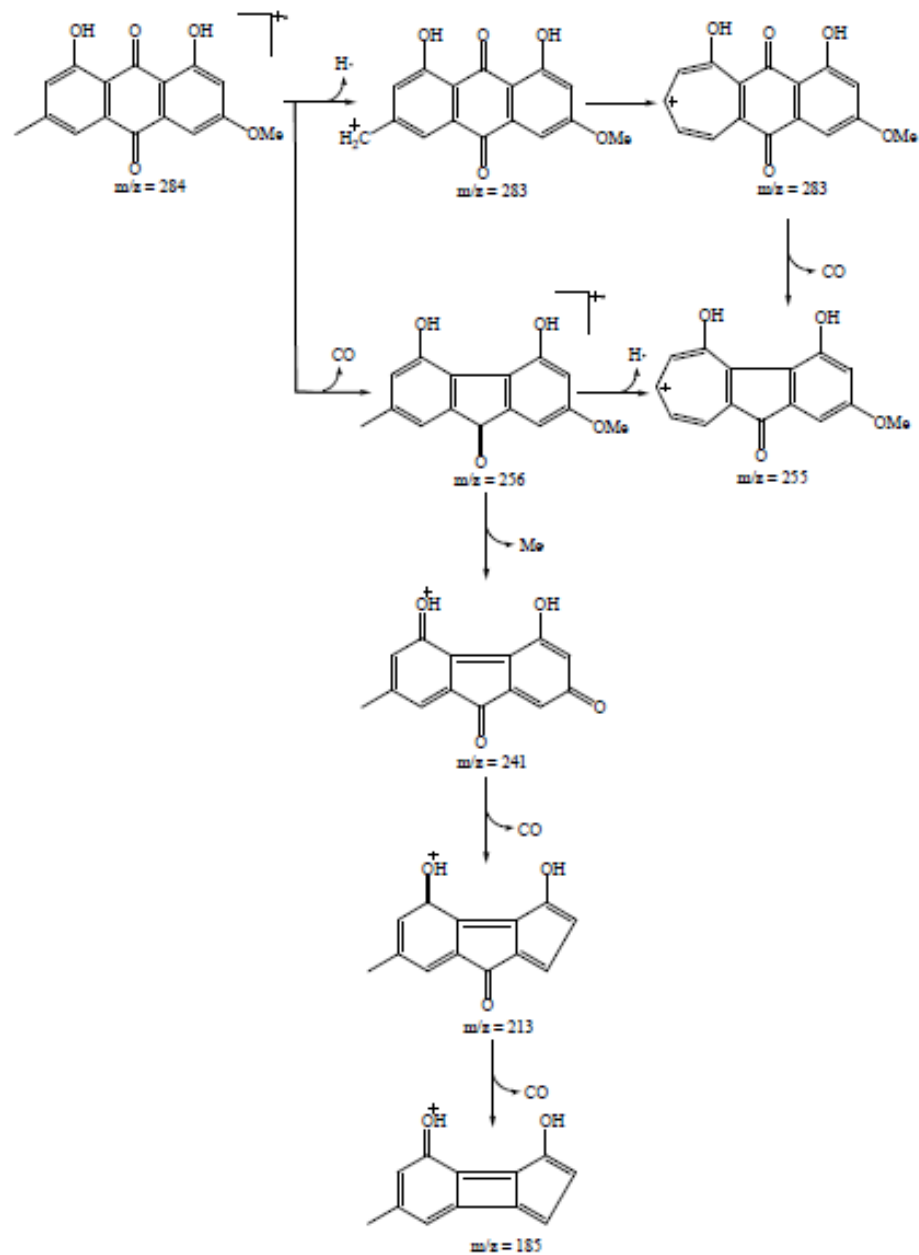
**Figura 28** - Gráfico relacionando o número de carbonos dos ésteres etílicos de ácidos graxos vs. o tempo de retenção em minutos.

#### 5.4 IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS CMR-3 E CMR-4

A amostra CMR-3 foi submetida a CG-EM e o espectro obtido para o único pico que apresentou grande semelhança ao espectro da fisciona (1,8-dihidroxi-3-metil-6-metoxi-antraquinona) que consta na biblioteca NIST12 com pico do íon molecular sendo o pico base em 284 m/z (Figura 29). A Figura 30 traz uma proposta de fragmentação para a fisciona.

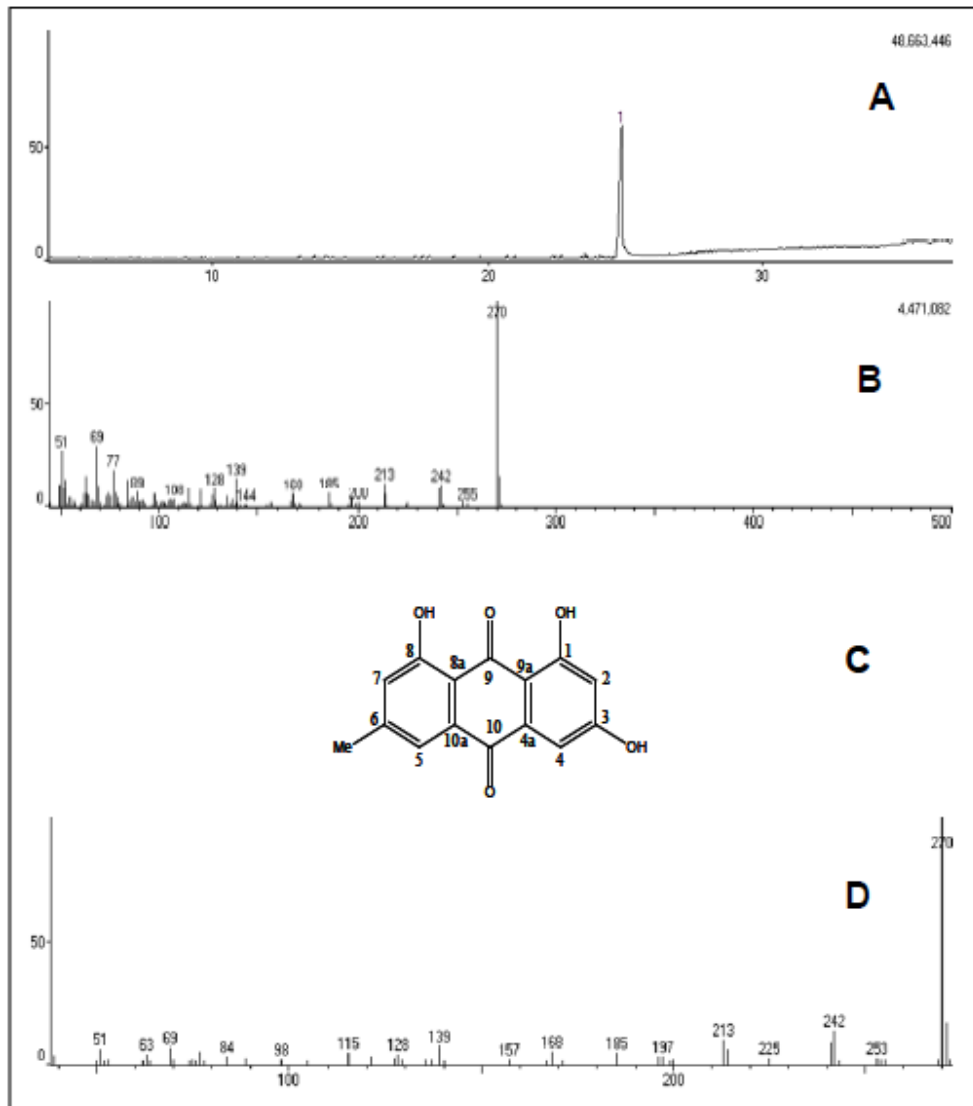


**Figura 29** - Cromatograma da amostra CMR-3 (A), seguida pelo espectro de massas do único pico presente no cromatograma (B), que apresenta grande semelhança com o espectro de massas da fisciona (C) da biblioteca NIST12 (D).

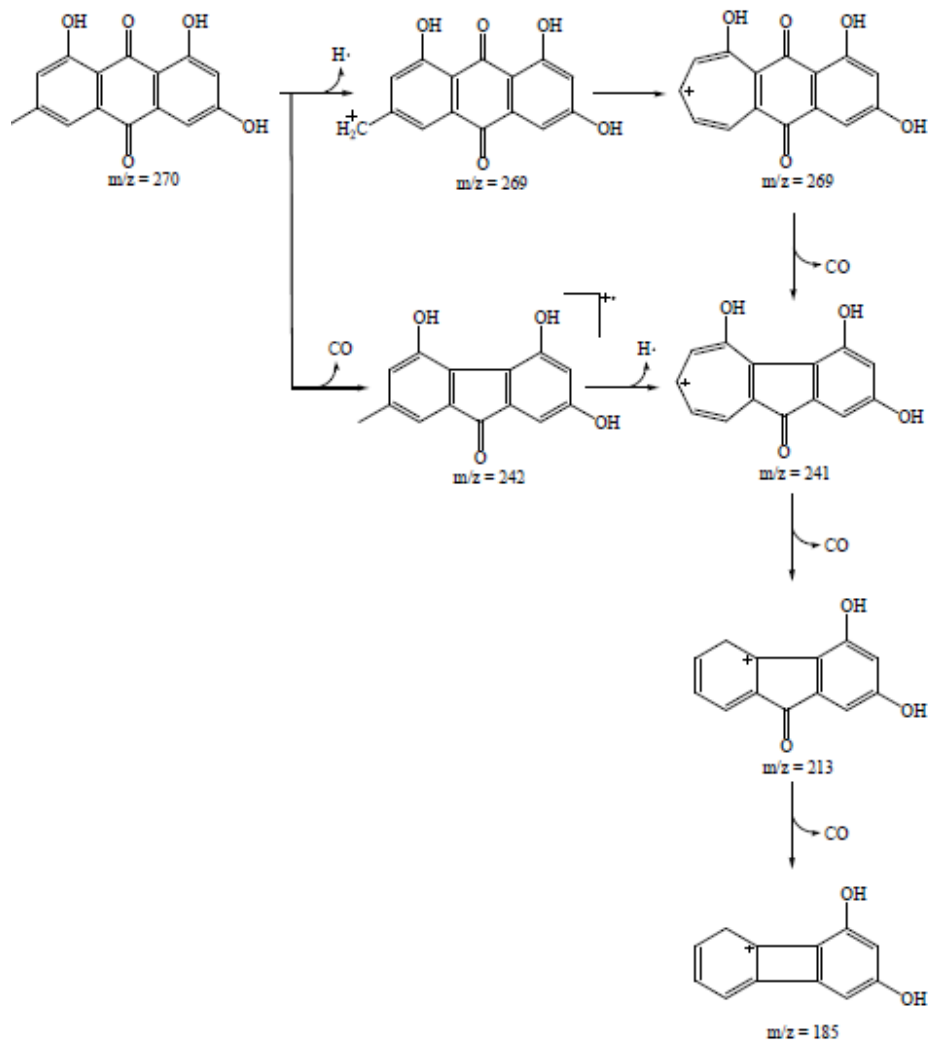


**Figura 30** - Proposta de fragmentação para a fisciona.

A amostra CMR-4 apresentou um único pico quando submetida à CG-EM, e o espectro de massas obtido para esse pico apresentou grande semelhança com o espectro da emodina (1,6,8-trihidroxi-3-metil-antraquinona) presente no banco de dados NIST12 sendo o pico base e íon molecular em 270  $m/z$ . (Figura 31). A Figura 32 apresenta uma proposta para a fragmentação para a emodina.



**Figura 31** - Cromatograma da amostra CMR-4 (A), seguida pelo espectro de massas do único pico presente no cromatograma (B), que apresenta grande semelhança com o espectro de massas da emodina (C) da biblioteca NIST12 (D).



**Figura 32** - Proposta de fragmentação para a emodina.

A Tabela 5 traz os deslocamentos químicos observados nos espectros de ressonância magnética realizados a fim de confirmar a identificação das amostras CMR-3 e CMR-4 [RMN de  $^1H$  (Figura 33 e 34 respectivamente) e de  $^{13}C$  (Figura 35 e 36 respectivamente)]. O espectro de RMN  $^1H$  revelou para cada antraquinona dois sinais simples ( $5_H$  12,06 e 12,19 (CMR-3); 11,96 e 12,04 (CMR-4)) referentes aos grupamentos hidroxila quelados por ligações de hidrogênio e em  $8_H$  2,51 (CMR-3) e 2,38 (CMR-4), um sinal integrado para três hidrogênios referente aos grupamentos metila e CMR-3 apresentou um sinal referente aos 3H de uma metoxila em  $\delta_H$  3,95.

Essas informações aliadas à análise dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e comparação com valores da literatura permitiram confirmar a determinação estrutural das amostras CMR-3 e CMR-4.

**Tabela 5** - Deslocamentos químicos observados para as amostras CMR-3 e CMR-4 de referência para a fisciona e emdoína respectivamente (CHU et al., 2005)

	fisciona		CMR-3		emdoína		CMR-4	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
C <sub>1</sub>	12,06	166,1	12,01	166,92	11,96	164,6	11,96	166,44
C <sub>2</sub>	6,74	106,1	6,62	107,30	6,56	107,9	6,54	108,17
C <sub>3</sub>		161,9		162,48		161,4		162,14
C <sub>4</sub>	7,32	107,8	7,21	108,47	7,11	108,8	7,10	109,36
C <sub>5</sub>	7,64	124,0	7,57	124,84	7,42	124,0	7,40	124,51
C <sub>6</sub>		148,0		149,13		148,2		148,76
C <sub>7</sub>	7,09	120,7	6,89	121,10	7,07	120,4	7,10	121,23
C <sub>8</sub>	12,19	164,7	12,21	164,81	12,04	164,4	12,06	166,17
C <sub>9</sub>		190,2		190,76		189,6		190,43
C <sub>10</sub>		181,6		182,11		181,2		181,34
C <sub>4a</sub>		134,7		135,82		135,0		135,47
C <sub>8a</sub>		113,1		114,32		113,3		113,90
C <sub>9a</sub>		110,2		110,34		108,7		109,36
C <sub>10a</sub>		132,7		133,25		132,7		133,10
O-Me	3,92	55,7	3,95	57,09				
Me	2,42	21,7	2,51	22,44	2,38	21,5	2,38	

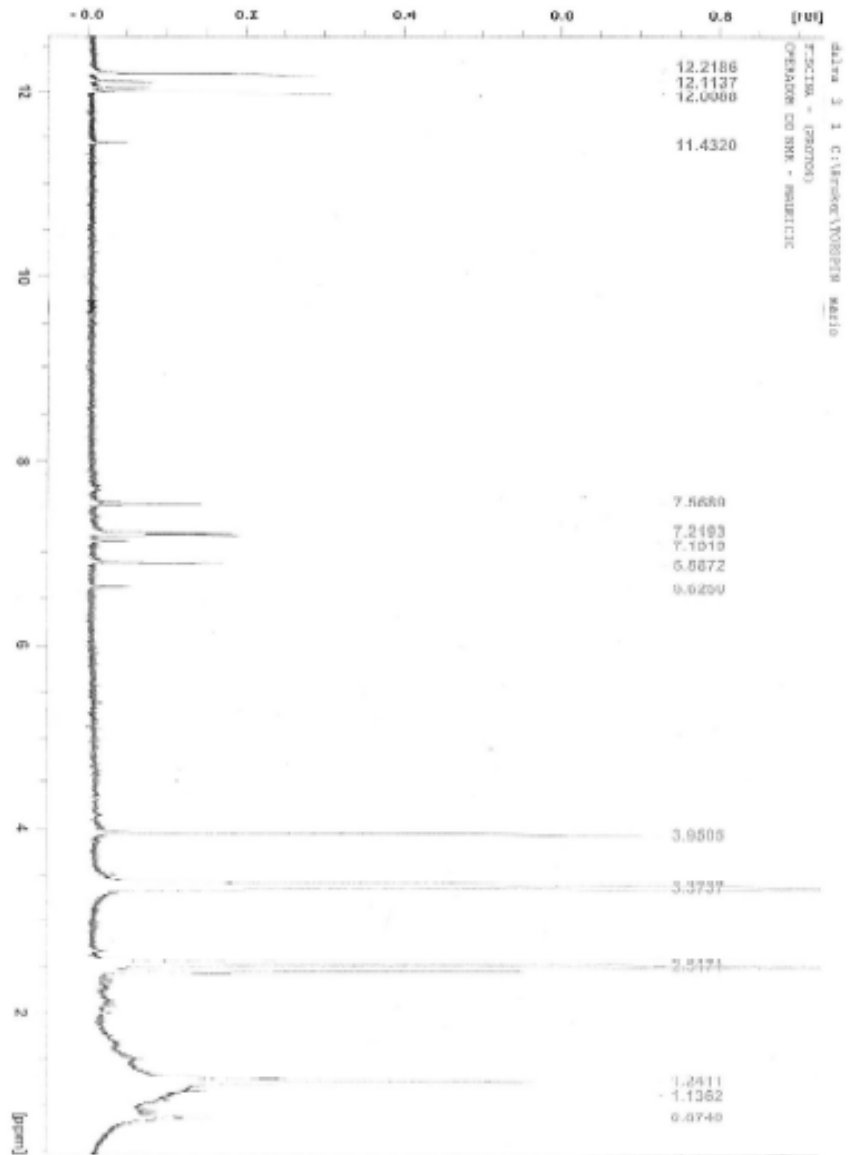


Figura 33 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra CMR-3.

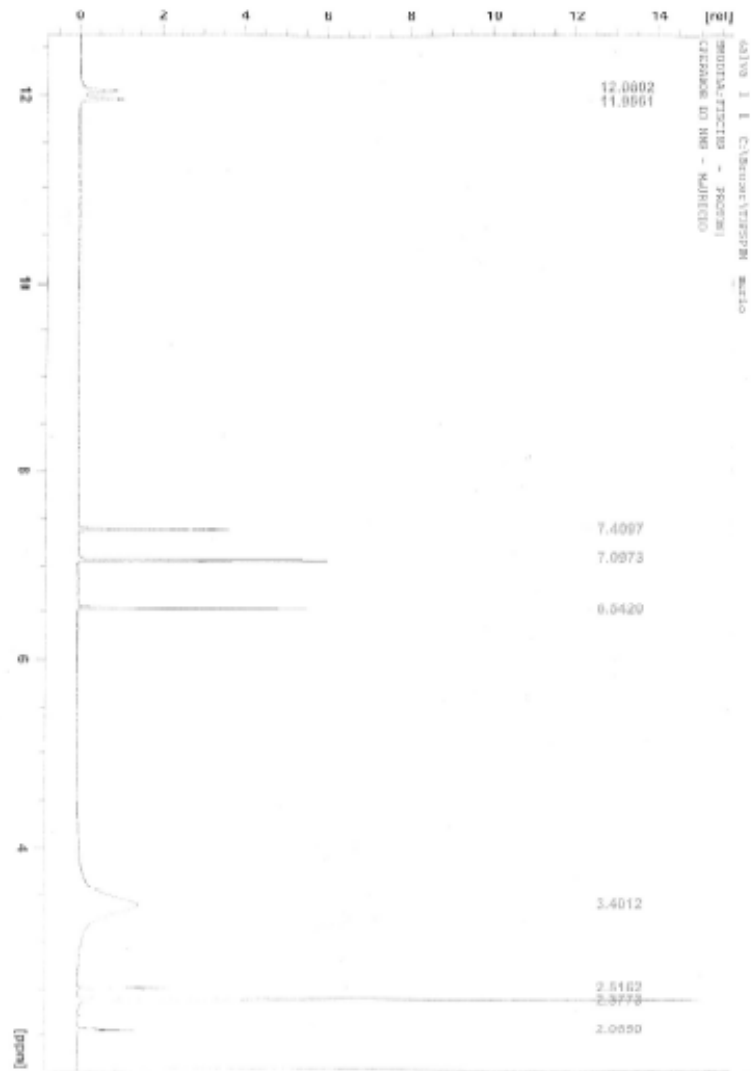


Figura 34 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra CMR-4.

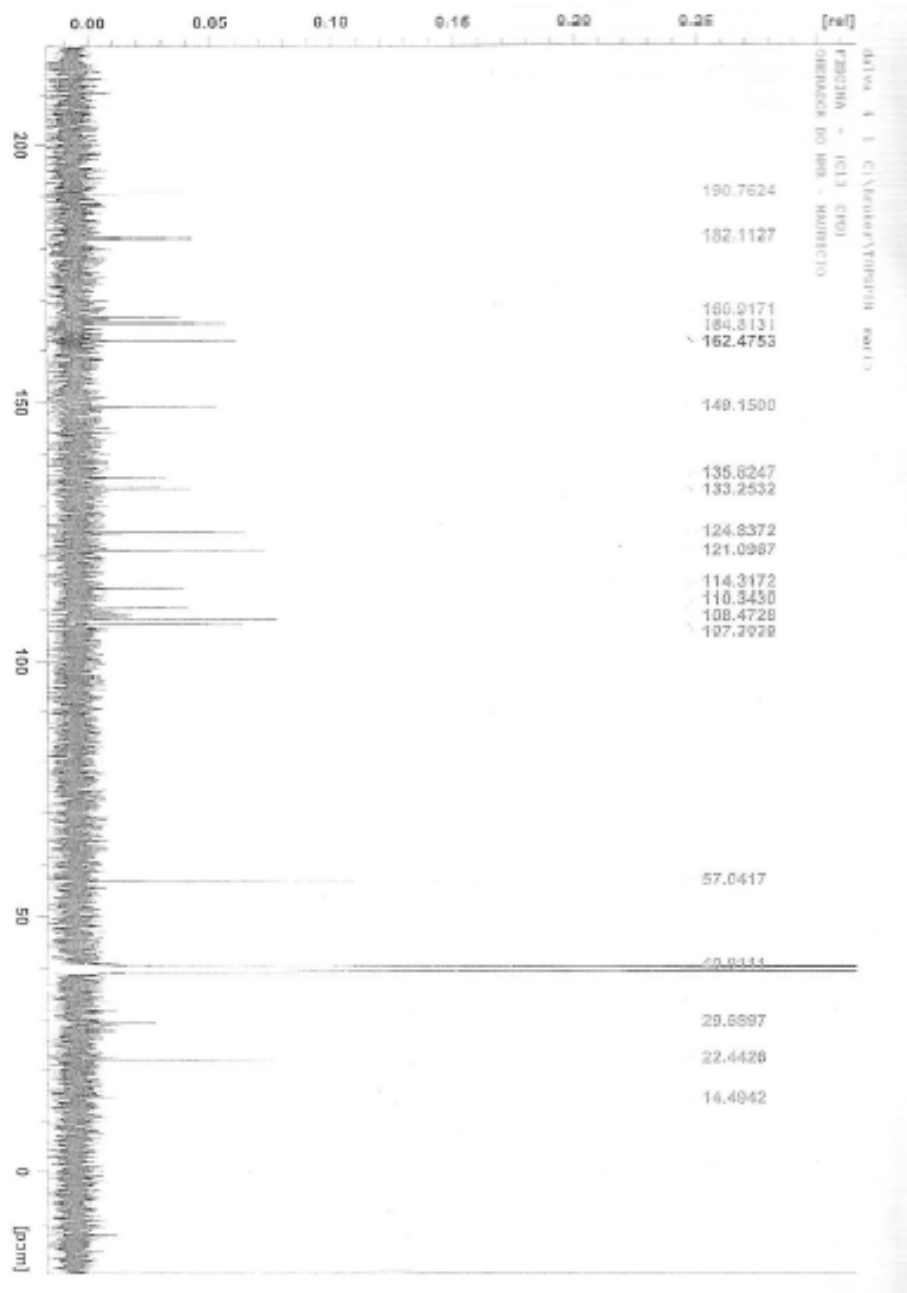


Figura 35 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da amostra CMR-3.



As antraquinonas encontradas apresentam diversas propriedades farmacológicas relatadas na literatura (IZHAKI, 2002; CHUKWUJEKU et al., 2006). Entre as pesquisas realizadas destacam-se os resultados obtidos com fisiona que, em ratos, apresentou efeitos protetores contra acidentes vasculares cerebrais (ZHANG et al., 2005a; ZHANG et al., 2005b).

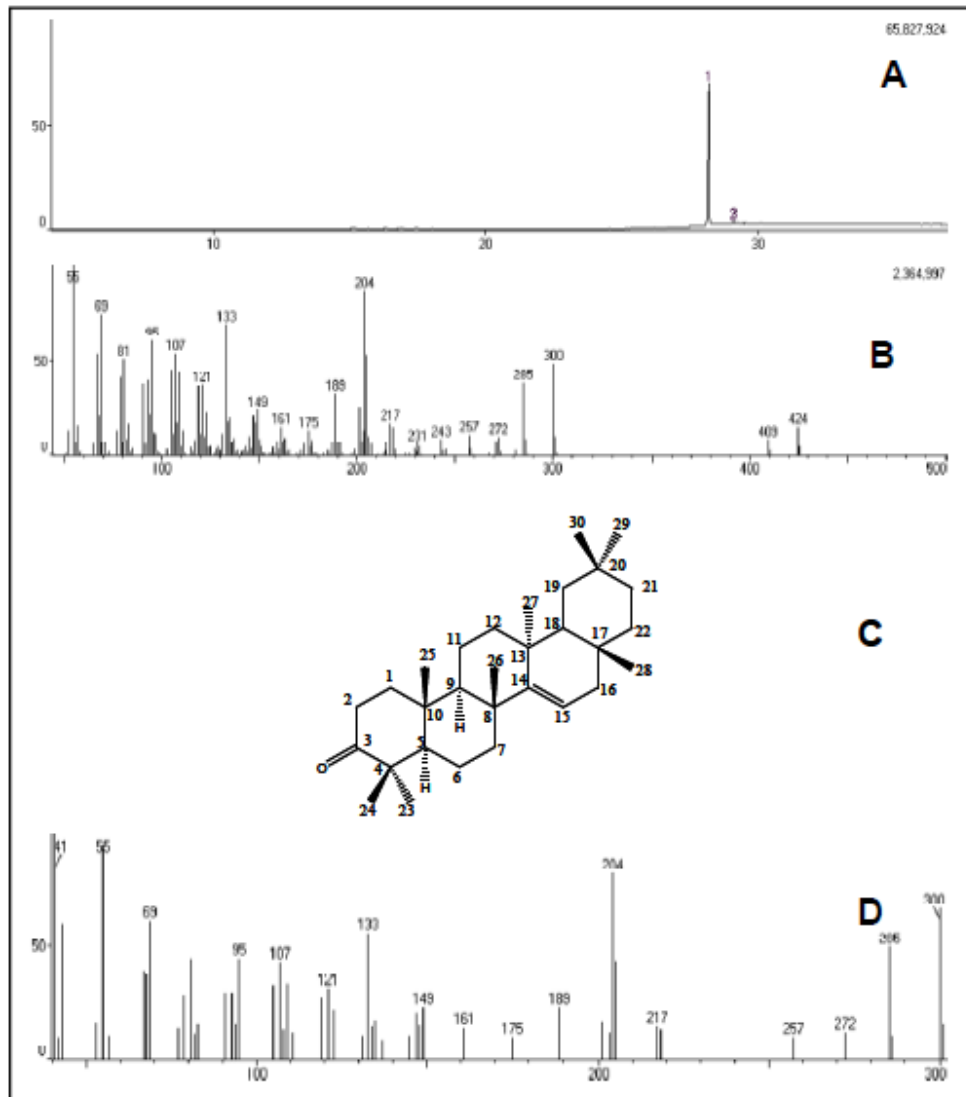
### 5.5 IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRAS CMF-3

O cromatograma obtido por CG-EM para a amostra CMF-3 apresentou dois picos, porém com grande predominância do pico 1, que apresentou um espectro de massas semelhante ao da taraxerona (13a- metil-27-norolean-14-en-3-ona (D-Friedoolean-14-en-3-ona)), apresentando o pico base em 55 m/z e pico do íon molecular 424 m/z , além de picos proeminentes em 204 e 200 m/z (Figura 37). A Figura 38 traz uma proposta para a fragmentação da taraxerona.

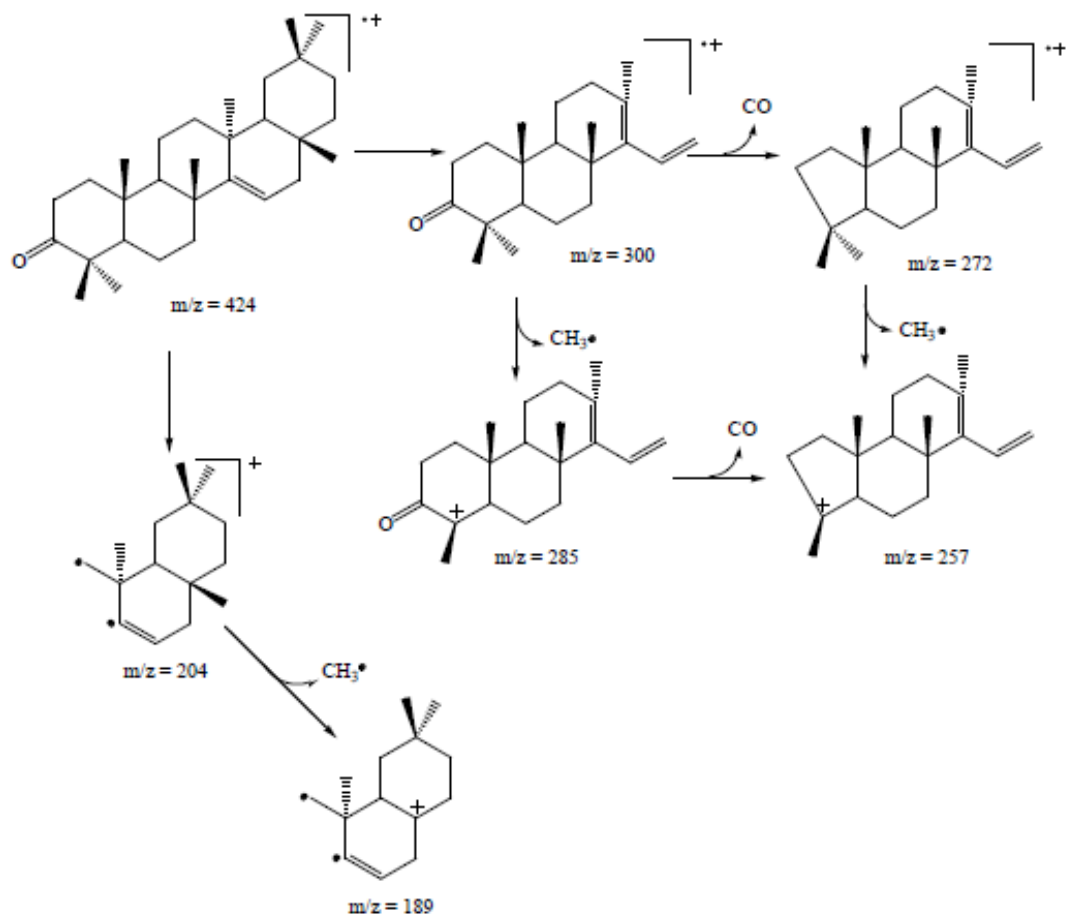
Na série do grupo do taraxerol (triterpeno pentacíclico) tendo como representante a taraxerona a fragmentação via retro-Diels-Alder conduz ao íon (m/z 300) no qual os anéis A, B e C permanecem unidos. A presença deste íon auxilia na identificação com base no espectro de massas se ele pertence à classe do taraxerol ou a classe dos ursanos e oleananos. Os representantes das  $\alpha$  e  $\beta$ -amirinas não são rapidamente diferenciados por meio dos espectros de massas considerando-se que eles exibem uma fragmentação principal idêntica que ocorre no processo da retro-Diels-Alder reação que envolve a dupla ligação em  $\Delta^{12}$  e que os picos de massas mais intensos representam os anéis D e E (Figura 39), (DJERASSI, 1963).

Para confirmar a identificação, a amostra CMF-3, foi analisada por RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 40) e de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 41, 42 e 43), e os resultados comparados aos da literatura estão apresentados (Tabela 6). O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou 30 sinais destacando a presença de um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  217,3 referente ao carbono carbonílico e dois sinais ( $\delta_{\text{C}}$  157,6 e 117,2) referentes aos carbonos da dupla ligação. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  apresenta oito sinais simples referentes a metilas ( $\delta_{\text{H}}$  0,82, 0,90, 0,91,

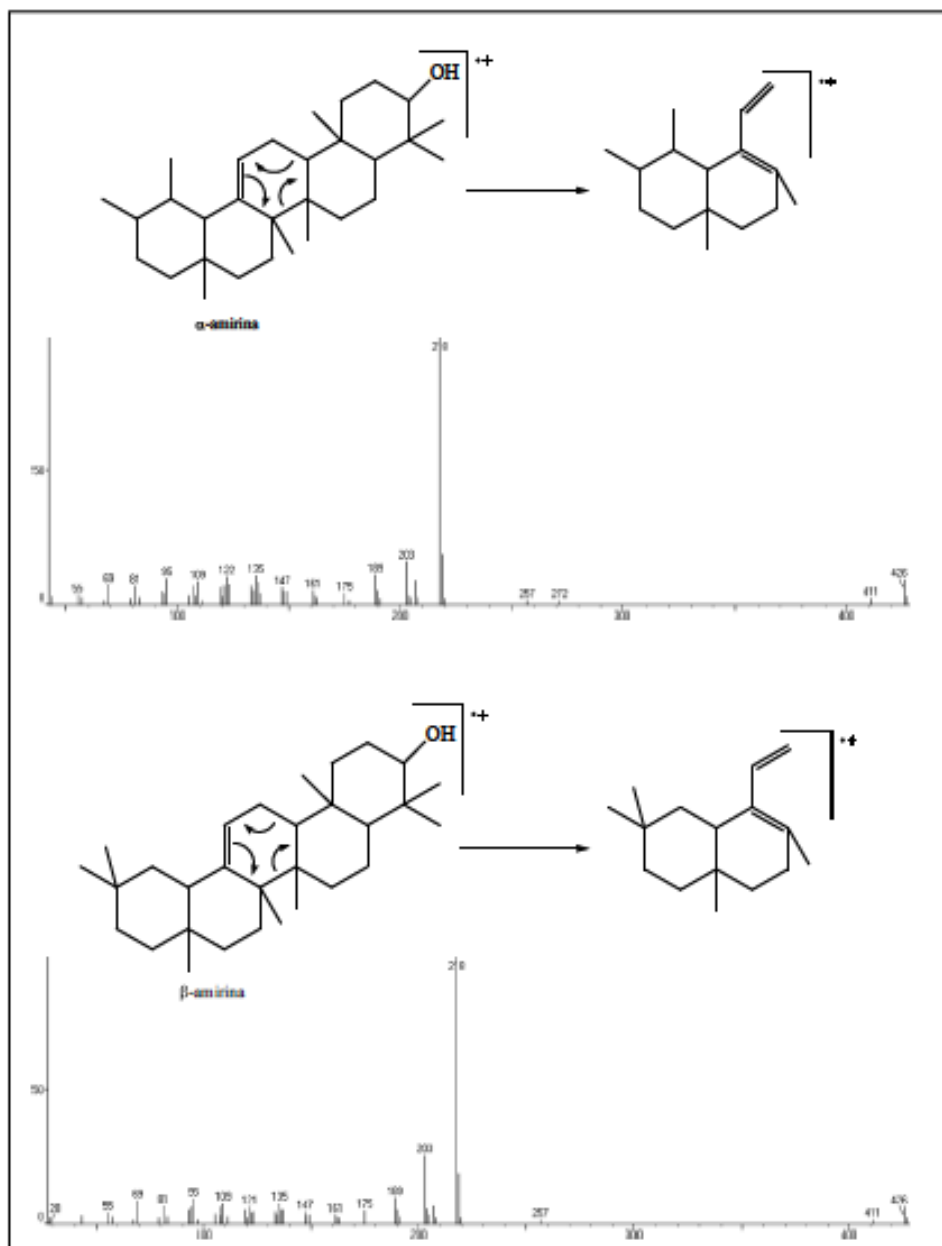
0,95, 1,06, 1,07, 1,08, 1,13) e um duplo duplete em  $\delta_{\text{H}}$  5,55 referente ao hidrogênio ligado ao carbono 15.



**Figura 37** - Cromatograma da amostra CMF-3 (A), seguida pelo espectro de massas do pico 1 presente no cromatograma (B), que apresenta grande semelhança com o espectro de massas da taraxerona (C) da biblioteca NIST12 (D).



**Figura 38** - Proposta de fragmentação para a taraxerona



**Figura 39** - Fragmentação via retro Diels-Alder em triterpenos da classe dos ursanos e oleananos.

**Tabela 6** - Deslocamentos químicos observados para a mostra CMF-3 e valores de referência para taraxerona (AHMAD; RAHMAN, 1994).

	taraxerona		CMF-3	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$
C				
3	217,3		213,57	
4	47,6		47,52	
8	38,9		38,82	
10	37,6		37,68	
13	37,7		37,59	
14	157,6		157,60	
17	37,7		37,73	
20	28,8		28,79	
CH				
5	55,8		55,7	
9	47,7		48,69	
15	117,2	5,56(dd)	117,18	5,55 dd)
18	48,8		48,78	
CH <sub>2</sub>				
1	38,4		38,34	
2	34,1		34,13	
6	20,0		19,94	
7	35,2		35,09	
11	17,5		17,43	
12	35,8		35,76	
16	36,7		36,66	
19	40,7		40,62	
21	33,6		33,57	
22	33,1		33,06	
CH <sub>3</sub>				
23	26,2	1,12 (s)	26,09	1,13 (s)
24	21,5	1,06 (s)	21,47	1,08 (s)
25	14,8	1,06 (s)	14,79	1,07 (s)
26	29,9	1,06 (s)	29,91	1,06 (s)
27	25,6	0,97 (s)	25,55	0,95 (s)
28	29,9	0,93 (s)	29,89	0,91 (s)
29	33,4	0,93 (s)	33,35	0,90 (s)
30	21,4	0,83 (s)	21,33	0,82 (s)

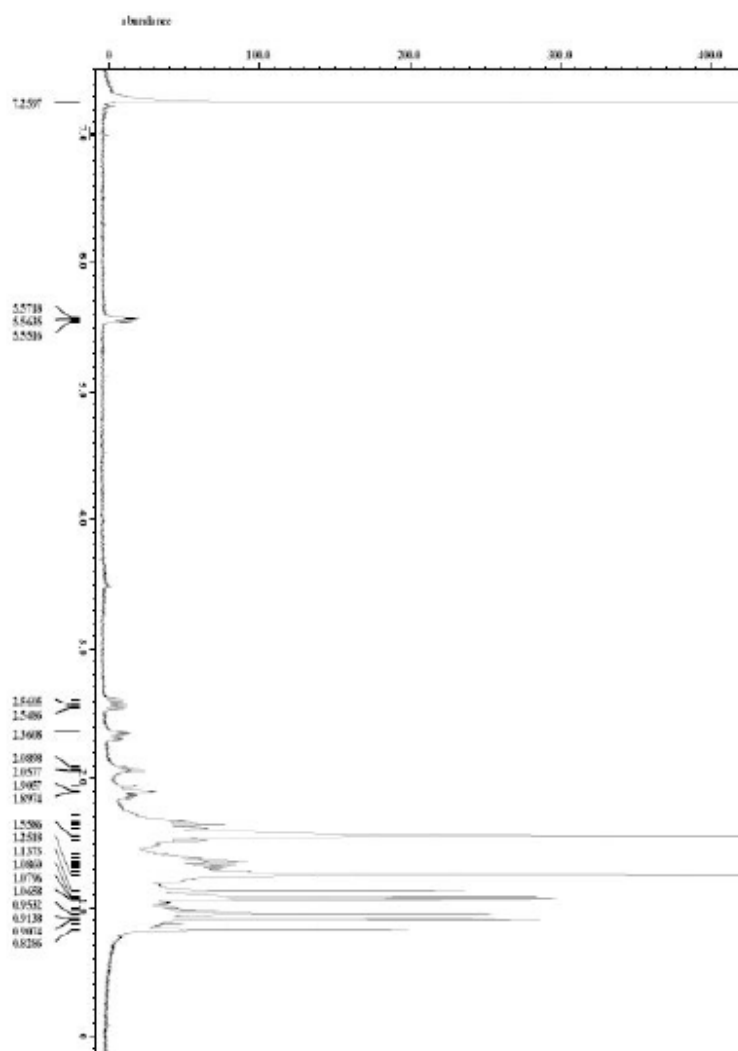


Figura 40 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra CMF-3

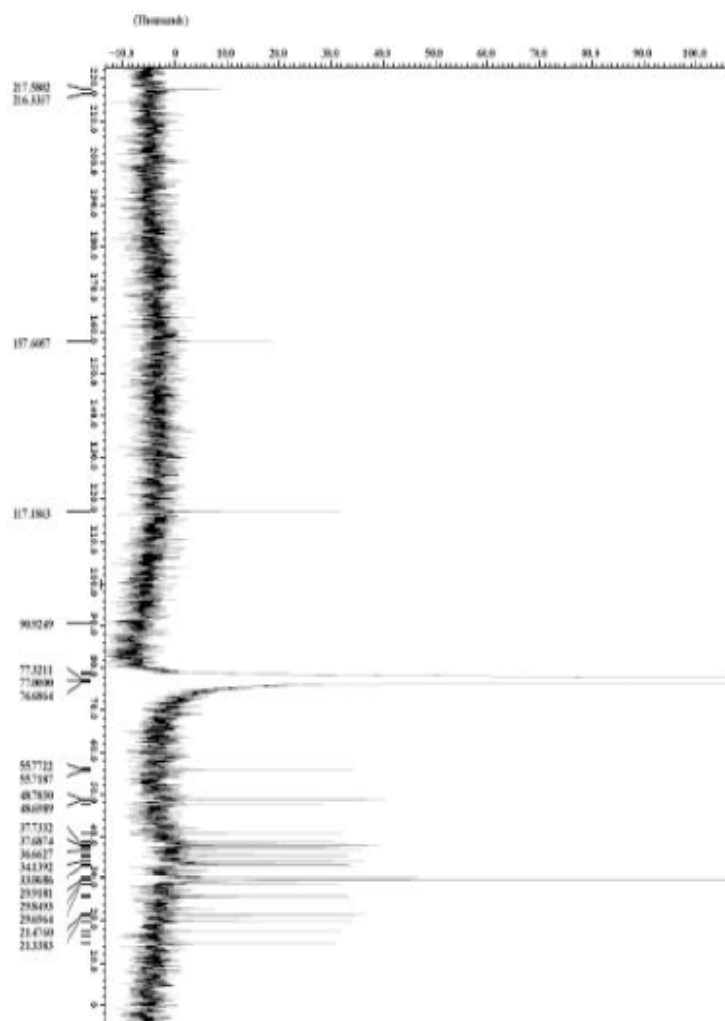
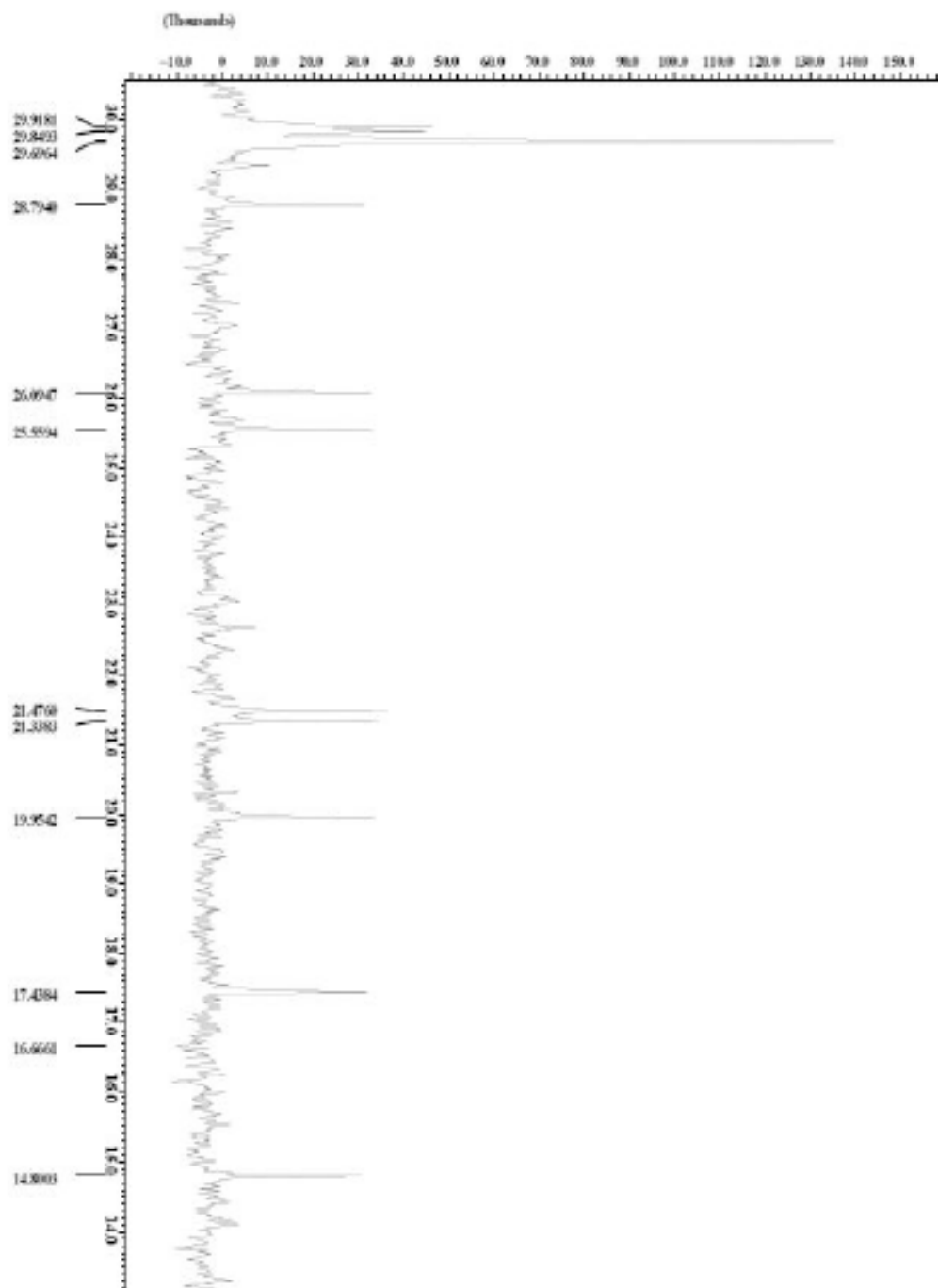
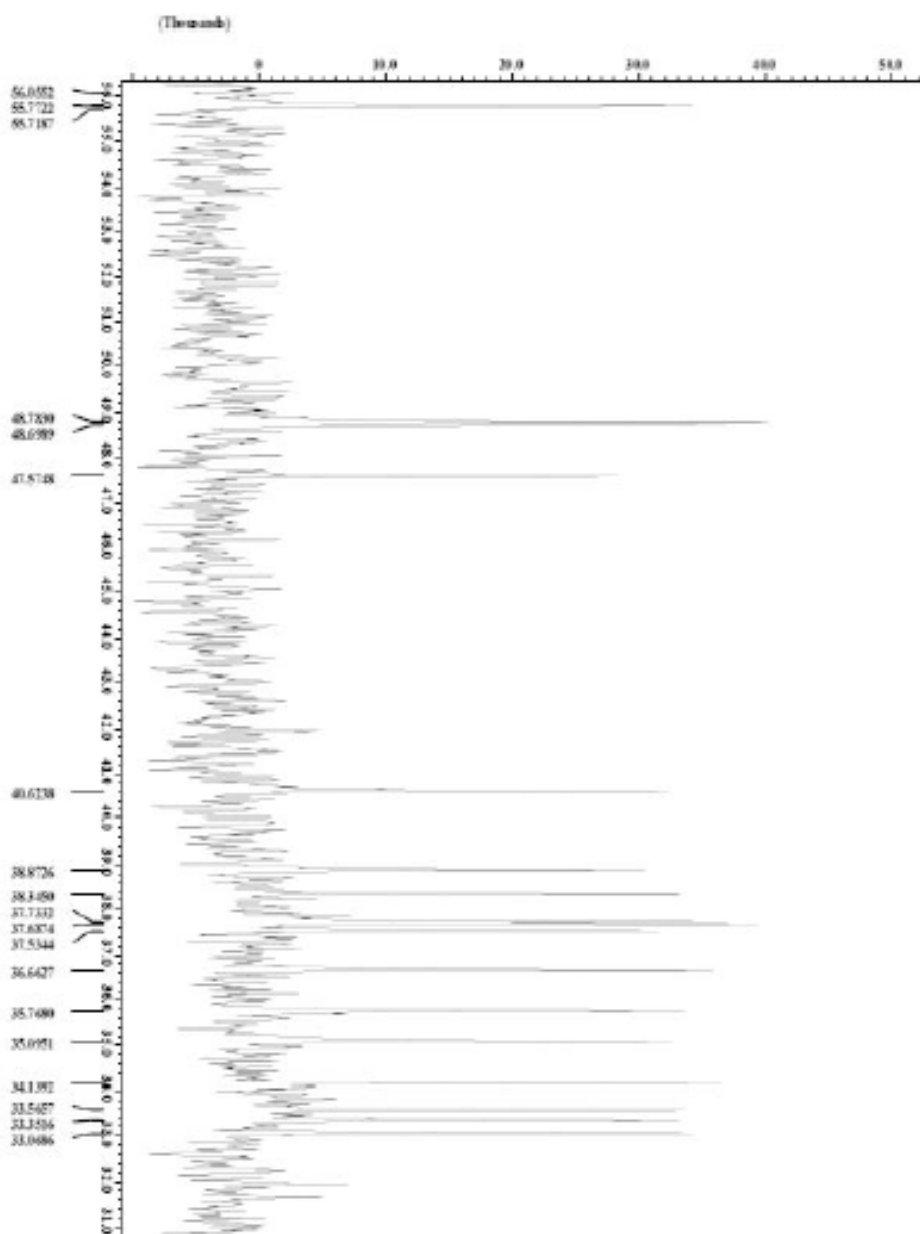


Figura 41 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da amostra CMF-3



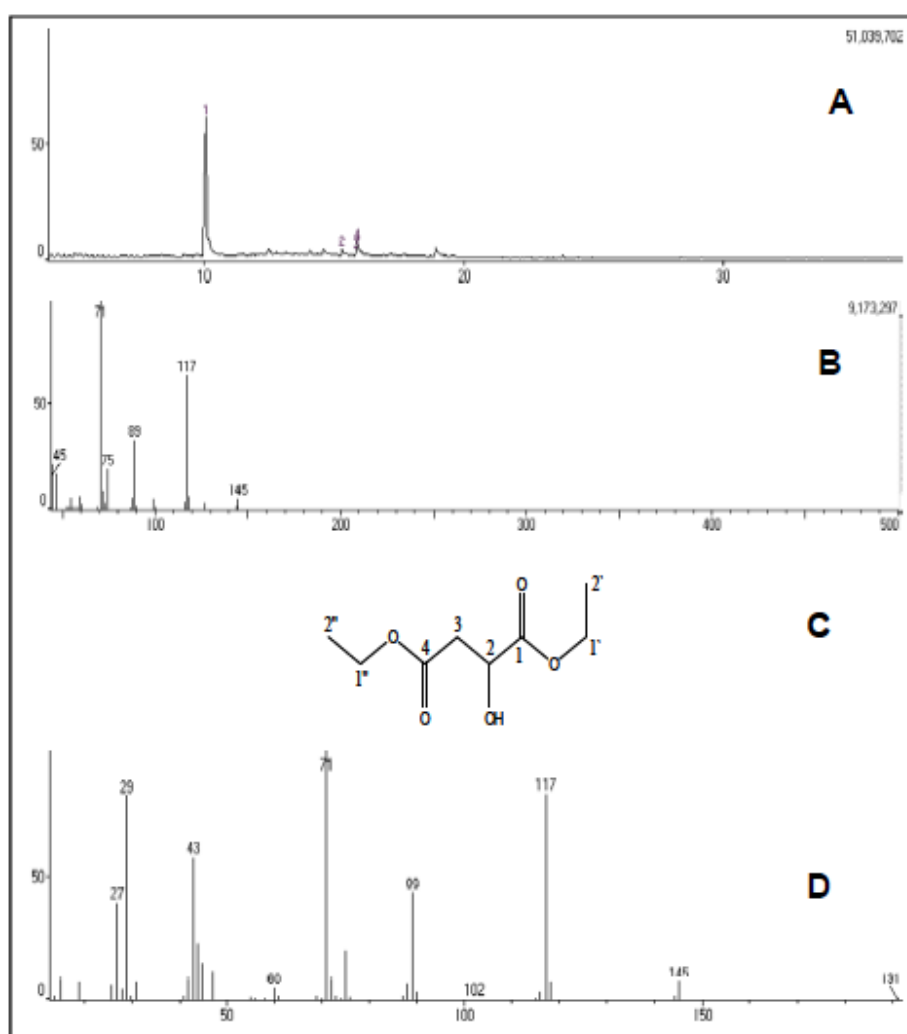
**Figura 42** - Ampliação da região entre 13 e 31 ppm do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da amostra CMF-3



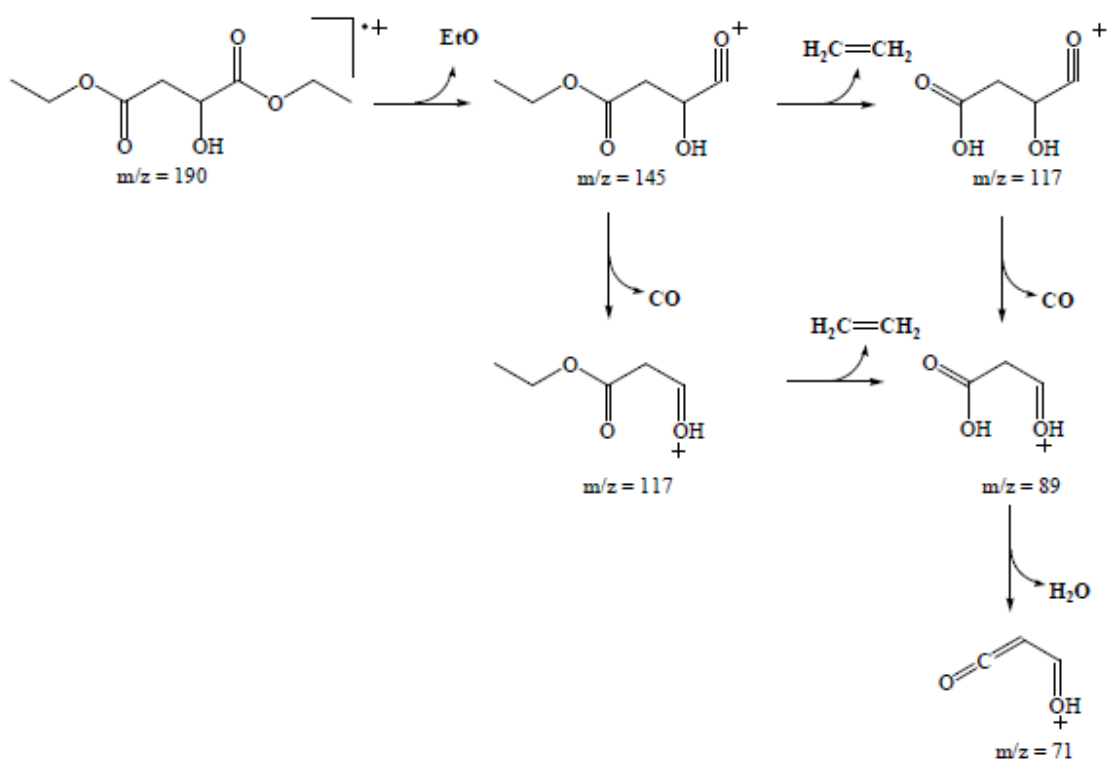
**Figura 43** - Ampliação da região entre 31 e 56 ppm do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da amostra CMF-3

## 5.6 IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA CMF-4.

A amostra CMF-4, quando submetida a CG-EM, apresentou 4 picos, porém com grande predominância do pico 1, o espectro de massas deste pico apresentou grande semelhança ao espectro de massas do malato de dietila com o pico base em 71 m/z e um pico proeminente em 117 m/z (Figura 44), a Figura 45 traz uma proposta de fragmentação para esta molécula.



**Figura 44** - Cromatograma da amostra CMF-4 (A), seguida pelo espectro de massas do pico 1 presente no cromatograma (B), que apresenta grande semelhança com o espectro de massas do malato de dietila (C) da biblioteca NIST12 (D).



**Figura 45** - Proposta de fragmentação para o malato de dietila.

## 5.7 TOXICIDADE MATERNA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DAS FOLHAS E DAS RAÍZES DE *COCCOLOBA MOLLIS*

Dentre os parâmetros analisados para verificar a toxicidade do extrato etanólico das folhas e das raízes de *Coccoloba mollis* sobre a performance reprodutiva das fêmeas, não houve diferença estatística entre os grupos experimentais com o grupo controle em relação a ganho de peso materno corrigido, peso relativo dos órgãos maternos (Tabela 7).

Os parâmetros relativos ao desenvolvimento intra-uterino da prole são apresentados na Tabela 8 e demonstraram que os extratos de *Coccoloba mollis* não alteraram nenhum parâmetro analisado quando comparado ao grupo controle.

Os resultados deste estudo indicam que os extratos etanólicos das folhas e das raízes de *C. mollis*, nas doses administradas, e período estudado não apresentaram toxicidade materna e também não causaram teratogenicidade na prole das fêmeas tratadas. Portanto, podemos considerar que o seu uso é seguro durante o período gestacional.

**Tabela 7** – Efeitos do tratamento nos parâmetros maternos de camundongos

	Controle	Controle do	Extrato etanólico das folhas de <i>C. mollis</i>			Extrato etanólico das raízes de <i>C. mollis</i>		
	negativo	veículo	50 mg Kg <sup>-1</sup>	75 mg Kg <sup>-1</sup>	100 mg Kg <sup>-1</sup>	50 mg Kg <sup>-1</sup>	75 mg Kg <sup>-1</sup>	100 mg Kg <sup>-1</sup>
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7	Grupo 8
n° de Fêmeas	15	13	12	12	14	14	13	14
Ganho de Peso Total <sup>g</sup>	22,20 ± 1,49	17,47 ± 1,88	19,43 ± 0,98	22,03 ± 2,69	17,90 ± 4,50	22,06 ± 2,30	19,98 ± 1,42	21,92 ± 3,68
Ganho de Peso Conjugido (g)	5,58 ± 0,43	4,21 ± 0,75	5,47 ± 0,72	4,03 ± 0,83	5,10 ± 0,58	5,82 ± 1,15	3,79 ± 0,83	4,10 ± 0,83
Útero com fetos (g)	16,63 ± 1,46	13,45 ± 1,93	13,95 ± 1,05	15,52 ± 1,20	15,86 ± 1,32	16,24 ± 1,50	16,20 ± 1,16	15,12 ± 1,51
			<i>Peso dos órgãos</i>					
Coração (g)	0,182 ± 0,002	0,167 ± 0,009	0,177 ± 0,012	0,171 ± 0,005	0,176 ± 0,007	0,176 ± 0,007	0,161 ± 0,014	0,167 ± 0,007
Pulmão (g)	0,209 ± 0,007	0,205 ± 0,008	0,363 ± 0,013	0,203 ± 0,008	0,202 ± 0,008	0,195 ± 0,006	0,203 ± 0,016	0,209 ± 0,008
Fígado (g)	2,237 ± 0,086	1,966 ± 0,124	2,182 ± 0,098	2,210 ± 0,053	2,334 ± 0,110	2,271 ± 0,103	2,208 ± 0,106	2,111 ± 0,144
Rins (g)	0,368 ± 0,012	0,355 ± 0,014	0,363 ± 0,013	0,374 ± 0,007	0,385 ± 0,011	0,361 ± 0,010	0,375 ± 0,019	0,371 ± 0,014

Valores apresentados em média ± EPM. Teste: ANOVA/Tukey (p < 0,05)

**Tabela 8** – Efeitos do tratamento nos parâmetros relativos ao desenvolvimento intra-uterino da prole

	Controle	Controle do	Extrato etanólico das folhas de <i>C. mollis</i>			Extrato etanólico das raízes de <i>C. mollis</i>		
	negativo	veículo	50 mg Kg <sup>-1</sup>	75 mg Kg <sup>-1</sup>	100 mg Kg <sup>-1</sup>	50 mg Kg <sup>-1</sup>	75 mg Kg <sup>-1</sup>	100 mg Kg <sup>-1</sup>
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7	Grupo 8
n° de Fêmeas	15	13	12	12	14	14	13	14
Implantações	12,93 ± 0,67	10,46 ± 0,87	10,92 ± 0,73	11,00 ± 0,59	11,71 ± 0,58	11,57 ± 0,95	11,92 ± 0,80	12,11 ± 0,64
*TFPI	23,11 ± 6,25	25,43 ± 8,06	23,03 ± 5,48	16,91 ± 5,44	17,80 ± 6,47	18,52 ± 4,24	16,68 ± 4,91	29,06 ± 5,55
Taxa de reabsorção	23,11 ± 6,25	24,94 ± 8,14	23,03 ± 5,48	16,91 ± 5,44	17,80 ± 6,48	18,52 ± 4,25	16,68 ± 4,91	26,11 ± 5,84
Índice Placentário	0,0751 ± 0,0027	0,0813 ± 0,0029	0,0756 ± 0,0023	0,0832 ± 0,0070	0,0875 ± 0,0046	0,0881 ± 0,0094	0,0826 ± 0,0031	0,0785 ± 0,0042
Peso Fetal (g)	1,37 ± 0,03	1,27 ± 0,03	1,35 ± 0,03	1,26 ± 0,03	1,34 ± 0,02	1,34 ± 0,04	1,35 ± 0,04	1,34 ± 0,03
Comprimento Fetal (cm)	2,81 ± 0,05	2,67 ± 0,05	2,75 ± 0,08	2,88 ± 0,07	2,82 ± 0,06	2,76 ± 0,08	2,76 ± 0,07	2,71 ± 0,08
Viabilidade Fetal	76,89 ± 6,25	74,55 ± 8,06	76,97 ± 5,48	83,09 ± 5,44	82,20 ± 6,47	81,49 ± 4,25	83,32 ± 4,91	70,53 ± 5,55

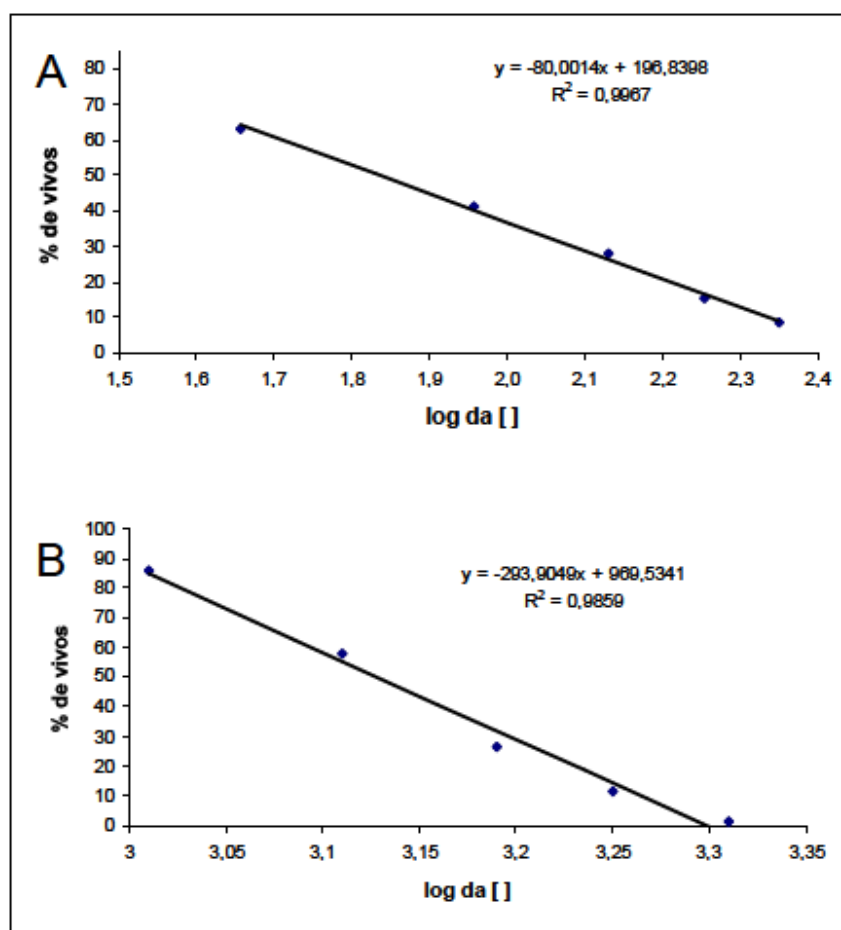
Valores apresentados em média ± EPM. Teste: ANOVA/Tukey (p < 0,05) \*TFPI: Taxa de perda pós-implantação

## 5.8 TESTE DE LETALIDADE DE *ARTEMIA SALINA*

O teste de letalidade de *Artemia salina* é uma técnica rápida, simples e de baixo custo além de precisar de uma quantidade pequena de amostra, capaz de detectar um amplo espectro de bioatividade em extratos brutos. A toxicidade a *A. salina* é um indicativo de citotoxicidade e atividade pesticida, particularmente existindo uma correlação positiva entre a letalidade da *A. salina* e citotoxicidade frente a células 9 KB

(carcinoma nasofaríngeo humano) e outros tumores sólidos, assim como linhagem celular P388 (leucemia de roedores *in vivo*) (GHISALBERTI, 2007).

O ensaio realizado permitiu estimar a  $DL_{50}$  para o extrato etanólico das raízes de *C. mollis* em  $68,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 46a) e para o extrato etanólico das folhas em  $1342 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 46b). A maior toxicidade do extrato etanólico das raízes em comparação com o das folhas condizem com os resultados obtidos por Tsuboy (2008) que relata uma maior toxicidade do extrato etanólico das raízes em comparação com o extrato etanólico das folhas em testes citotóxicos.



**Figura 46** - Gráfico da % de *Artemia salina* Lench vivos vs. logaritmo da concentração do extrato etanólico das raízes (A) e folhas (B) da *C. mollis*.

A grande diferença entre a letalidade dos extratos testados, ao menos em parte, pode ser explicado pela presença de antraquinonas no extrato das raízes, Montoya e colaboradores (2003) encontraram resultados semelhantes em estudos com extratos de *Heterophyllae pustulata* onde os extratos ricos em antraquinonas eram significativamente mais tóxicos a *Artemia salina* em comparação aos demais extratos, outro estudo, realizado por Ayo e colaboradores (2007) determinou a DL50 da emodina como  $42,77 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Diversos trabalhos mostram o isolamento de antraquinonas guiado pelo teste de letalidade de *Artemia salina*, entre os quais podemos citar o trabalho de Feng e colaboradores (2005) que a partir de um extrato de *Prismatomeris tetrandra* que apresentava toxicidade a *Artemia salina* e linhagens de células tumorais humanas foram isolados 3 novas antraquinonas (1-hidroxi-2,3-dimetoxi-7-metil-9,10-antraquinona, 1,3-dihidroxi-5,6-dimetoxi-2-metil-9,10-antraquinona e 3-hidroxi-1,5,6-trimetoxi-2-metil-9,10-antraquinona) além de 5 outras antraquinonas já conhecidas.

## 5.9 TESTE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O DPPH é um radical orgânico que apresenta coloração roxa, com absorvância máxima entre 515 e 528 nm. Moléculas antioxidantes podem suprimir o radical DPPH (doando um átomo de hidrogênio, um elétron ou via ataque radicalar) promovendo uma visível alteração na coloração de roxo para amarelo (AMAROWICZ et al., 2004; GALOTTA et al., 2008)

O extrato etanólico das folhas de *C. mollis* apresentou uma  $\text{CMI}_{50}$  de  $10,11 \pm 0,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ , já o extrato das raízes apresentaram  $\text{CMI}_{50}$  igual a  $15,96 \pm 0,55 \mu\text{g mL}^{-1}$ , ambos os extratos apresentaram um grande potencial antioxidante destacando-se o das folhas que apresentou resultados melhores que os do BHT ( $\text{CMI}_{50} = 13,23 \pm 0,27 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), um antioxidante sintético amplamente utilizado como aditivo alimentar (Tabela 9).

**Tabela 9** - Atividade antioxidante (expressa em CMI<sub>50</sub>) dos extratos de *Coccoloba mollis*.

	CMI <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )
extrato etanólico das folhas	10,11 ± 0,12
extrato etanólico das raízes	15,96 ± 0,55
BHT	13,23 ± 0,27

A presença de taninos e flavonóides nas folhas e raízes da *C. mollis* contribuem para o bom desempenho dos extratos etanólicos avaliados, pois esses metabólitos são conhecidos por suas propriedades antioxidantes (WILLIAMS et al., 2004; MELLO; SANTOS, 2001). O maior potencial antioxidante do extrato etanólico das folhas em relação ao das raízes pode ser explicado, ao menos em parte, pela presença das clorofilas e seus derivados que apresentam atividade antioxidante (LANFER-MARQUEZ et al., 2005; KRÀUTLES, 2008) e ação antimutagênica destacando indícios de que dietas ricas em clorofila e seus derivados podem ser benéficas à saúde (FERRUZZI et al., 2002). A atividade antioxidante demonstrada pelos derivados de clorofila aparentemente não é relacionada a capacidade de doar hidrogênio, mas provavelmente na proteção do ácido linoléico contra oxidação e/ou decomposição por hidroperóxidos (LANFER-MARQUEZ et al., 2005).

#### 5.10 TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os extratos etanólicos das folhas e raízes de *C. mollis* foram submetidos a uma avaliação quanto ao seu potencial antibacteriano empregando-se a técnica de difusão em ágar, frente às bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*). O extrato etanólico das folhas apresentou atividade apenas frente a *E. coli*, enquanto que o extrato das raízes não apresentou atividade frente a esse microorganismo mas apresentou atividade frente a todas as demais bactérias testadas (Tabela 10), o maior potencial antibacteriano do extrato das raízes em comparação com o das folhas pode

estar associado a presença das antraquinonas que possuem efeito antibacteriano e estão ausentes nas folhas.

**Tabela 10** - Atividade antibacteriana dos extratos etanólicos de *Coccoloba mollis*.

Amostra (mg)	Diâmetro do halo de inibição (cm)			
	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) *	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 23853)*	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)**	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 8276)**
extrato etanólico das folhas (0,189)	0,9	Negativo	Negativo	Negativo
extrato etanólico das raízes (0,210)	Negativo	1,2	1,2	1,0
Tetraciclina* (0,05)	2,0	1,5	ND	ND
Penicilina** (0,05)	ND	ND	2,0	2,5

Diversos microrganismos patogênicos comuns apresentam sensibilidade a emodina (AYO et al., 2007), a substância isolada em maior quantidade das raízes de *Coccoloba mollis*. Chukwujekwu e colaboradores (2006), em estudos com emodina isolada de *Cassia occidentalis*, determinaram sua concentração mínima inibitória como  $7,8 \times 10^{-3}$  e  $3,9 \times 10^{-3}$  mgmL<sup>-1</sup> respectivamente frente às bactérias gram-positivas *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* e a ausência de atividade até a concentração de  $5 \times 10^{-1}$  mg mL<sup>-1</sup> frente duas bactérias gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*).

Os extratos etanólicos da folhas e raízes de *C. mollis* foram avaliados quanto ao seu potencial antifúngico através da técnica de difusão em ágar frente às leveduras *Candida tropicalis*, *C. krusei* e *C. albicans*. O extrato das folhas apresentou atividade frente as três leveduras testadas enquanto que o extrato das raízes não apresentou atividade frente a *Candida tropicalis* (Tabela 11).

**Tabela 11** - Atividade antifúngica dos extratos etanólicos de *Coccoloba mollis*.

Amostra (mg)	Diâmetro do halo de inibição (cm)		
	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida albicans</i>
extrato etanólico das folhas (0,189)	1,0	1,1	1,1
extrato etanólico das raízes (0,210)	Negativo	1,3	1,0
Nistatina (0,05)	2,0	Negativo	2,0

Empregando a técnica de diluição em ágar além dos extratos das folhas e raízes as antraquinonas fisciona e emodina isoladas das raízes de *C. mollis* foram avaliadas quanto seu potencial antifúngico frente aos fitopatógenos *Botryosphaeria rhodina*, *B. ribis* e o *Lasiodiplodia theobromae*. Os microrganismos testados cresceram satisfatoriamente nos controles do meio (Controle-I), o solvente empregado, DMSO (Controle II), inibiu o crescimento dos três fungos testados principalmente sobre o *Botryosphaeria ribis*, o Captan (Controle III) inibiu completamente o crescimento do *Botryosphaeria ribis*, enquanto que o *Botryosphaeria rhodina* e o *Lasiodiplodia theobromae* apresentaram uma porcentagem de inibição de 60,5 e 49,4 respectivamente. O extrato etanólico das folhas apresentou atividade antifúngica superior ao das raízes e a substância que apresentou a maior porcentagem de inibição foi a emodina sendo 43,7 para o *Botryosphaeria rhodina*, 30,3 para o *Botryosphaeria ribis* e 31,6 para o *Lasiodiplodia theobromae* (Tabela 12).

**Tabela 12** - Atividade antifúngica dos extratos etanólicos de folhas e raízes de *C. mollis* e da fisciona e da emodina.

Amostras	<i>Botryosphaeria rhodina</i>		<i>Botryosphaeria ribis</i>		<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	
	Halo de crescimento (cm)	% de Inibição	Halo de crescimento (cm)	% de Inibição	Halo de crescimento (cm)	% De Inibição
Controle-I (BDA 17 mL)	8,0	0	8,0	0	8,0	0
Controle-II (BDA+DMSO 0,8 mL)	6,3		5,0		6,3	
Controle-III (BDA+Captan 0,18%)	2,5	60,5	0,0	100	3,2	49,4
Emodina (1 mg / 17 mL)	3,5	43,7	3,5	30,3	4,3	31,6
Fisciona (1 mg / 17 mL)	4,0	36,1	4,2	16,7	5,6	11,7
Extrato etanólico das folhas de <i>C. mollis</i> (3mg / 17mL)	3,5	43,5	4,0	21,1	4,2	33,2
Extrato etanólico das raízes de <i>C. mollis</i> (3 mg / 17mL)	4,1	34,9	4,3	14,4	6,9	0

Os triterpenos lupeol, ácido betulínico, ácido ursólico, e ácido 2-hidroxi-ursólico isolados de *Curtisia dentata* demonstraram atividade antifúngica frente aos fungos *Sporothrix schenckii*, *Microsporum canis*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida guilliermondi* e *Candida spicata* com concentração mínima inibitória entre 8 a 65  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (SHAI, et al., 2008) estes mesmos

triterpenos foram relatados no gênero *Coccoloba*, excetuando o ácido 2-hydroxi-ursólico (DAN; DAN, 1986; COTA et al., 2003) sendo que a betulina isolada de *Coccoloba acrostichoides* mostrou atividade frente ao fungo *Fusarium oxysporum* (COTA et al., 2003) esses dados coadunam com os resultados obtidos com os extratos das folhas de *C. mollis* que apresentam os triterpenos simiarenol (OLIVEIRA et al., 2008a) e taraxerona.

Estudos recentes demonstram que diversos extratos e óleos essenciais de plantas além de algumas substâncias isoladas destes, inibem o crescimento de vários fungos e o uso de tais matérias no combate a fitopatógenos tem crescido (ACHARYA et al., 2006).

#### 5.11 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO

Todos os tratamentos utilizando-se dos extratos de *C. mollis* atingiram germinação superior a germinação nominal das sementes empregadas (95%) no segundo dia do experimento mostrando ausência de atividade alelopática dos extratos nas concentrações analisadas (Tabela 13).

**Tabela 13** - Atividade alelopática dos extratos etanólicos das raízes e das folhas de *C. mollis*.

	Controle		Extrato etanólico das raízes <i>C. mollis</i>				Extrato etanólico das folhas de <i>C. mollis</i>			
	negativo	solvente	0,125 %	0,25 %	0,5%	1%	0,125 %	0,25 %	0,5%	1%
IVG	47,4	46,6	46,0	46,1	46,9	48,5	45,5	45,5	46,4	45,3
Germinação (%)	97,5	96,0	96,5	96,0	96,0	97,0	96,5	95,5	96,5	95,0

IVG – índice de velocidade de germinação

Este resultado é contraditório aos registrados na literatura, que indicam atividade alelopática a taninos que estão presentes nos dois extratos avaliados, outro grupo de metabólitos comuns aos dois extratos avaliados são os flavonóides, e entre estes alguns também são considerados aleloquímicos (EINHELLIG, 2003).

Um número relativamente grande de aleloquímicos fitotóxicos é proveniente da rota dos terpenóides (DUKES; OLIVA, 2003) e o triterpeno taraxerona, que foi isolado nas folhas de *C. mollis*, inibe o crescimento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. (Solanaceae) var. Pomodoro) e capim-arroz [*Echinochloa crus-galli* L. (Beauv.) (Poaceae)] (MACÍAS-RUBALCAVA et al., 2007). As antraquinonas também apresentam atividade alelopática, inclusive a emodina, que foi isolada em quantidade considerável a partir das raízes de *C. mollis*, inibe fortemente o crescimento de alface (IZHAKI, 2002), a planta teste empregada, que é uma planta conhecidamente sensível (ALVES et al., 2004).

## 6 CONCLUSÕES

A política nacional de plantas medicinais inserida no decreto n 5.813, de 22 de junho de 2006 tem como objetivo: "*Garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional.*" Desta forma o presente estudo coaduna com os objetivos do decreto supra citado. O conhecimento de constituintes químicos e os testes biológicos realizados contribuem para a utilização mais segura da espécie *Coccoloba mollis* que esta sendo empregada como fitoterápico no município de Londrina - PR.

O isolamento de antraquinonas nesta espécie indica a sua importância na área de fitoterápicos uma vez que elas apresentam atividades diversas (antineoplásica, anti-mutação, antibacteriana, antifúngica, ativas contra o *Schistosoma mansoni*, antiinflamatória, laxante, efeito inibitório na lipoperoxidação e da monoaminoxidase e como ativador da lípase). A identificação da fisiona é altamente promissora considerando-se o número elevado de pesquisas científicas que estão sendo realizadas com este princípio ativo em que ela apresenta muitas das atividades descritas para as antraquinonas e destacam-se os resultados obtidos em ratos em que a fisiona apresentou efeitos protetores em acidentes vasculares cerebrais (AVC isquêmico). O número de fármacos utilizados no tratamento desta patologia é restrito, dessa forma, esta antraquinona e a planta *C. mollis* representam um novo agente terapêutico para o AVC em que 30 % das vezes conduz à morte do paciente.

Os extratos etanólicos das folhas e das raízes demonstraram atividade antimicrobiana destacando a atividade antibacteriana das raízes e antifúngica das folhas. As antraquinonas isoladas também apresentaram atividade antifúngica com destaque para a emodina.

Os ensaios de quimioprospecção realizados demonstraram a presença de flavonóides e taninos nas folhas e raízes e antraquinonas somente nas raízes desta espécie. Enquanto nos processos de isolamento, purificação e determinação estrutural realizados somente as antraquinonas foram identificadas, novos fracionamentos com

solventes mais polares deverão ser direcionados para a pesquisa de flavonóides e taninos.

O ensaio de atividade antioxidante (DPPH) mostrou que os extratos etanólicos das folhas ( $IMC_{50} = 10,11 \pm 0,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e das raízes ( $IMC_{50} = 15,96 \pm 0,55 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) apresentam capacidade de capturar radicais comparáveis ao BHT ( $IMC_{50} = 13,23 \pm 0,27 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), um antioxidante amplamente empregado pela indústria, principalmente alimentícia e farmacêutica.

O teste de letalidade de *Artemia salina* apresentou resultados de toxicidade condizentes com os resultados obtidos em testes de citotoxicidade onde as raízes se mostraram mais tóxicas que folhas.

Os resultados dos testes de toxicidade materna indicam que os extratos etanólicos das folhas e das raízes de *C. mollis*, nas doses administradas, e período estudado não apresentaram toxicidade materna ou nem causaram teratogenicidade na prole das fêmeas tratadas. Portanto, podemos considerar que o seu uso é seguro durante o período gestacional.

## REFERÊNCIAS

- ACHARYA, D.; GADE, A.; RAI, M. Bioactivity of fabaceous plants against foodborne and plant pathogens: potentials and limitations. In: RAI, M.; CARPINELLA, M. C. **Naturally occurring bioactive compounds**. Elsevier, 2006. cap. 6, p. 125-138.
- AHMED, V. U.; RAHMAN, A. U. **Handbook of natural products data: pentacyclic triterpenoids**. Amsterdam, Elsevier, 1994. v. 2.
- ALTHAUS, R. A.; CANTERI, M. G.; GIGLIOTI, E. A. Tecnologia da informação aplicada ao agronegócio e ciências ambientais: sistema de análise e separação de médias pelos métodos de Duncan, Tukey e Scott-Knott. In: ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, PARTE 1. Ponta Grossa., 10, 2001. **Anais...** Ponta Grossa: [s.l.], 2001. p.280-281.
- ALVES, M. C. S.; MEDEIROS-FILHO, S.; INENECCO, R.; TORRES, S. B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.11, p.1083-1086, 2004.
- ALVES, P. M.; LEITE, P. H. A. S.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, L. F.; PEREIRA, M. S. V.; HIGINO, J. S.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira) sobre leveduras do género *Candida* da cavidade oral: uma avaliação *in vitro*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 192-196, 2006.
- AMARAL, M. F. Z. J.; BARA, M. T. F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2 sup. n. 2, p. 5- 8, 2005.
- AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J. A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from Canadian prairies. **Food Chemistry**, v. 84, p. 551-562, 2004.
- ANDREI, C. C.; FACCIONE, M. Identificação espectrométrica de Substâncias. In: ANDREI, C. C.; FERREIRA, D. T.; FACCIONE, M.; FARIA, T. J. **Da química medicinal à química combinatória e modelagem molecular: um curso prático**. São Paulo: Manole, 2003. cap. 4, p. 65-96.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; McDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst**, v. 127, p.183-198, 2002.
- AWAD, A. B.; FINK, C. S. Phytosterols as Anticancer Dietary Components: Evidence and Mechanism of Action. **The Journal Nutrition**, v. 130, p. 2127-2130, 2000.
- AYO, R. G.; AMUPITAN, J. O.; ZHAO, Y. Cytotoxicity and antimicrobial Studies of 1,6,8-trihydroxy-3methyl-anthraquinone (emodin) isolated from the leaves of *Cassia nigricans* Vahl. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 11, p. 1276-1279, 2007.

BARBOSA-FILHO, J. M.; NASCIMENTO JUNIOR, F. A. do; TOMAZ, A. C. de A.; *et al.*. Natural Products With Antileprotic Activity. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17 n. 1, p. 141-148, 2007.

BATISH, D. R.; SINGH, H. P.; KOHLI, R. K.; KAUR, SHALINDER. Crop allelopathy and its role in ecological agriculture. **Journal of Crop Production**, v. 4, n. 2, p. 121-161, 2001.

BENT, S. Herbal Medicine in the United States: Review of Efficacy, Safety, and Regulation. **Journal of General Internal Medicine**, v. 23, n. 6, p. 854-859, 2008.

BIEDERMANN, M.; BONGARTZ, A.; MARIANI, C.; GROB, K. Fatty acid methyl and ethyl esters as well as wax esters for evaluating the quality of olive oils. **European Food Research and Technology**, v. 228, p. 65-74, 2008.

BORGES, M, de F.; NASSU, R. T.; PEREIRA, J. L.; ANDRADE, A. P. C. de; KUAYE, A. Y. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1431-1438, 2008

BRANCH, S. Teratogenesis. In: HODGSON, E. **A textbook of modern toxicology**. 3.ed. New York: John Wiley & Sons, 2004. cap. 13, p. 251-260.

BRAZ-FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. a peregrinação de um Pacatubano. **Química Nova**, v. 17 n. 5, p 405-443, 1994.

BRIELMANN, H. L.; SETZER, W. N.; KAUFMAN, P. B.; KIRAKOSYAN, A.; CSEKE, L. J. Phytochemicals: The Chemical Components of Plants. In: CSEKE, L. J.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P. B.; WARBER, S. L.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. **Natural products from plants**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. cap. 1, p. 1-49.

BUCKLEY, W. Method of Controlling blood sugar levels in diabetic patients using *Coccoloba Uvifera*. **Brit. UK Pat. Appl.** (2001) CODEN: BAXXDU GB 2355407 A1 20010425 AN 2004:1085072.

BURGESS, T. I.; BARVER, P. A.; HARDY, G. T. ST J. *Botryosphaeria* spp. Associated with eucalypts in Western Australia, including the description of *Fusicoccum macroclavatum* sp. nov. **Australasian Plant Pathology**, v. 34, p. 557-567, 2005.

CARBALLO, J. L.; INDA, Z. L. H.; PÉREZ, P.; GRÁVALOS, M. D. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology**, v. 2, p. 1-5, 2002.

CARNEIRO, S. M. DE T. P. G.; PIGNONI, E.; VASCONCELLOS, M. E. DA C.; GOMES, J. C. Eficácia de extratos de nim para o controle do oídio do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 1, p. 34-39, 2007.

CAVALCANTE, M. F.; OLIVEIRA, M. C. C.; VELENDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 20-22, 2000.

CHON, S. -U.; JANG H. -G.; KIM, D. -K.; KIM, Y. -M; BOO, H. -O.; KIM, Y. -J. Allelopathic potential in lettuce (*Lactuca sativa* L.) plants. **Scientia Horticulturae**, v. 106, p. 309-317, 2005.

CHU, X.; SUN, A.; LIU, R. Preparative isolation and purification of Five compounds from the Chinese medicinal herb *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1097, p. 33 - 39, 2005.

CHUKWUJEKWU, J. C.; COOMBES, P. H.; MULHOLLAND, D. A.; VAN STADEN, J. Emodin, an antibacterial anthraquinone from roots of *Cassia occidentalis*. **South African Journal of Botany**, v. 72, p. 295-297, 2006.

CLARKE, J.H.R.; RATES, S. M. K.; BRIDI, R. Um alerta sobre o uso de produtos de origem vegetal na gravidez. **Infarma**, v. 19, n. V2, p. 41-48, 2007.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

COMPAGNONE, R S.; CASTILLO S. A.; DELLE MONACHE, F. Myricetin-3-O-hamnoside from the leaves and twigs of *Coccoloba dugandiana*. **Revista Colombiana de Quimica**, v. 24, n. 2, p. 65-68, 1995.

COSTA, L. G.; HODGSON, E.; LAWRENCE, D. A.; REED, D. J.; GREENLEE, W. L. **Current Protocols in Toxicology**. New York: John Wiley & Sons, 2005. 2759p.

COTA, B. B.; OLIVEIRA, A. B.; SOUZA-FILHO, J. D.; BRAGA, F. C. Antimicrobial Activity and Constituents of *Coccoloba Acrostichoides*. **Fitoterapia**, v. 74, n. 7-8, p. 729-731, 2003.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582. 1999.

CRUZ, P. F. **Estudo fitoquímico preliminar de *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Acariçoba) e avaliação inicial de suas atividades biológicas.** 1999. 51f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1999.

DAN, S.; DAN, S. S. Phytochemical study of *Adansonia digitata*, *Coccoloba excoriata*, *Psychotria adenophylla* and *Schleichera oleosa*. **Fitoterapia**, v. 57, n. 6, p.445-446, 1986.

- DAN, Y. Biological functions of antioxidants in plant transformation. **Vitro cellular and developmental biology – plant**, v. 44, p. 149-161, 2008.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. ; SANTOS, R. J. Atividade antioxidante de Extrato de Fruto de Aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi). **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 2, p. 83-90, 2004.
- DELL'AGLI, M.; BOSISIO, E. Minor polar compounds of olive oil: Composition, factors of variability and bioactivity. In: ATTA-UR-RAHMAN. **Studies in natural products chemistry bioactive natural products** (Part H), Elsevier, 2002. p. 697-734. v. 27.
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2.ed. Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd, 2001. 507p.
- DIAS, J. F. G.; CÍRIO, G. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Contribuição ao estudo alelopático de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., Celastraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p.220-223, 2005.
- DJERASSI, C. Mass spectrometric investigations in the steroid, terpenoid and alkaloid fields. **Pure Applied Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 575 - 600, 1963.
- DUKE, S. O.; OLIVA, A. Mode of action of phytotoxic terpenoids. In: MACIAS, F. A.; GALINDO, J. C. G.; MOLINILLO, J. M. G.; CUTLER, H. G. **Allelopathy: chemistry and mode of action of allelochemicals**. Boca Raton: CRC Press, 2003, cap. 10, p. 201-216.
- ECOBICHON, D. J. Reproductive toxicology. In: DERELANKO, M. J.; HOLLINGER, M. **Handbook of toxicology**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2001. cap. 11.
- EGLINTON, G.; HAMILTON, R. J. Leaf epicuticular waxes. **Science**, v. 156, n. 780, p. 1322-1335, 1967.
- EINHELLIG, F. A. Mode of allelochemical action of phenolic compounds. In: MACIAS, F. A.; GALINDO, J. C. G.; MOLINILLO, J. M. G.; CUTLER, H. G. **Allelopathy: chemistry and mode of action of allelochemicals**. Boca Raton: CRC Press, 2003, cap. 11, p. 217-238.
- FALKENBERG, M. B. Quinonas. In: SIMÕES, C. M. O.; et al. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento** 5.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS/ Editora UFSC, 2004. p. 656-683.
- FARMACOPEIA Brasileira. 3.ed. São Paulo: Ateneu, 1977.
- FARMACOPEIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Ateneu, 1997.
- FEHER, M.; SHMIDT, J. M. Property Distributions: Differences between Drugs, Natural Products, and Molecules from Combinatorial Chemistry. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 43, p. 218-227, 2003.

FENG, Z. -M.; JIANG, J. -S.; WANG, Y. -H.; ZHANG, P. -C. Anthraquinones from the Roots of *Prismatomeris tetrandra*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 10, p. 1330-1332, 2005.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12 (ed. esp.), p. 175-204, 2000.

FERREIRA, D. T.; ANDREI, C. C.; SARIDAKIS, H. O.; FARIA, T. J.; VINHATO, E.; CARVALHO, K. E.; DANIEL, J. F. S.; MACHADO, S. L.; SARIDAKIS, D. P.; BRAZ-FILHO, R. Antimicrobial Activity and chemical Investigation of Brazilian Drosera. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 7, p. 753-756, 2004.

FERREIRA, M. C.; SOUZA, J. R. P.; FARIA, T. J. Potenciação alelopática de extratos vegetais na germinação e no crescimento inicial de picão-preto e alface. **Ciência Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1054-1060, 2007.

FERRO, A. F. P.; BONACELLI, M. B. M.; ASSAD, A. L. D. Oportunidades tecnológicas e estratégias concorrenciais de gestão ambiental: o uso sustentável da biodiversidade brasileira. **Gestão & Produção**, v. 13, n. 3, p. 489-501, 2006.

FERRUZZI M. G.; BOHM V.; COURTNEY P. D.; SCHWARTZ S. J. Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 7, p. 2589-2595, 2002.

FISHER, B.; ROSE, N. C.; CAREY J. C. Principles and Practice of teratology for the Obstetrician. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 51, n. 1, p. 106-118, 2008.

FREIRE, F. C. O.; VIANA, F. M. P.; CARDOSO, J. E.; SANTOS, A. A. Novos hospedeiros do fungo *Lasiodiplodia theobromae* no estado do Ceará. **Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza, 2004. (Comunicado Técnico nº 91).

FUENTEFRIA, D. B.; FERREIRA, A. E.; GRÄF, T.; CORÇÃO, G. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 470-473, 2008.

FUJISAWA, S.; KADOMA, Y.; YOKOE, I. Radical-scavenging activity of butylated hydroxytoluene (BHT) and its metabolites. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 130, p. 189-195, 2004.

GALOTTA, A. L. Q. A.; BOAVENTURA, M. A. D.; LIMA, L. A. R. S. Antioxidant and cytotoxic activities of 'açai' (*Euterpe precatoria* Mart.). **Química Nova**, v. 31, n. 6 p. 1427-1430, 2008.

GARCIA, C. M. **Estudo fitoquímico e atividade biológica de *Pavonia distinguenda* A.ST.-HILL. et NAUDIN E *Dorstenia brasiliensis* LAM. 2007**, 210p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS.

- GHISALBERTI, E. L. Detection and isolation of bioactive natural products. In: COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. **Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. cap. 2, p. 11-76.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p 374-381, 2007.
- GUIDONI, E. B. M.; BEREZIN, E. N.; NIGRO, S.; SANTIAGO, N. A.; BENINI, V.; TOPOROVSKI, J. Antibiotic resistance patterns of pediatric community-acquired urinary infections. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 4, p. 321-323, 2008.
- HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19/20, p. 894-901, 2008.
- HIERRO, J. L.; CALLAWAY, R. M. Allelopathy and exotic plant invasion. **Plant and Soil**, v. 256, p. 29-39, 2003.
- HO, K. Y.; TSAI, C.C.; HUANG, J. S.; CHEN, C. P.; LIN, T. C.; LIN, C. C. Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitis-idaea* L. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 2, p. 187-191, 2001.
- HOSTETTAMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFSCAR, 2003.
- INDERJIT. Plant phenolics in allelopathy. **Botanical Review**, v. 62, n. 2, p. 186-202, 1996.
- IZHAKI, I. Emodin - a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants. **New Phytologist**, v. 155, p. 205-217, 2002.
- KANWAR, A. S. Brine shrimp (*Artemia salina*) - a marine animal for sample and rapid biological assays. **Journal of Chinese Clinical Medicine**, v. 2, n.4, p. 236-240, 2007.
- KRAUTLER, B. Chlorophyll breakdown and chlorophyll catabolites in leaves and fruit. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 7, n. 10, p. 1114-1120, 2008.
- KRIS-ETHERTON, P. M.; HECKER K. D.; BONANOME, A.; COVAL, S. M.; BINKOSKI, A. E.; HILPERT, K. F.; GIRWL, A. E.; ETHRTHON, T. D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American Journal of Medicine**, v. 113, n. 9, suppl. 2, p. 71-88, 2002.
- KOCH, C. R.; RIBEIRO, J. C.; SCHNOR, O. H.; ZIMMERMANN, B. S.; MÜLLER, F. M.; DAGOSTIN, J.; MACHADO, V.; ZHANG, L. Resistência antimicrobiana dos uropatógenos em pacientes ambulatoriais, 2000-2004. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 277-281, 2008.

- KOEHN, F. E. New Strategies and Methods in the Discovery of Natural Product Anti-Infective Agents: The Mannopectimycins. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2613-2617, 2008.
- KOLATTUKUDY, P. E.; CROTEAU, R.; BROWN, L. Structure and Biosynthesis of Cuticular Lipids - HYDROXYLATION OF PALMITIC ACID AND DECARBOXYLATION OF C28, C30, AND C32 ACIDS IN VICIA FABIA FLOWERS. **Plant Physiol.**, v. 54, p. 670-677, 1974.
- KOLEWE, M. E. ; GAURAV, V. ; ROBERTS, S. C. Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 2, p. 243-256, 2008.
- LANFER-MARQUEZ, U. M.; BARROS, R. M. C.; SINNECKER, P. Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. **Food Research International**, n. 38, p. 885-891, 2005.
- LASETER, J. L.; WEETE, J. D. Fatty acid ethyl esters of *Rhizopus arrhizus*. **Science**, v. 172, n. 398S, p. 864-88S, 1971.
- LEWINSOHN, E.; GIJZEN, M. Phytochemical diversity: The sounds of silent metabolism. **Plant Science**, v. 176, p. 161-169, 2009.
- LHULLER, C.; HORTA, P. A.; FALKNER, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 158-162, 2006.
- LI, F.; WU, X.; LAM, P.; BIRD, D.; ZHENG, H.; SAMUELS, L.; JETTER, R.; KUNST, L. Identification of the wax ester synthase/acyl-coenzyme A: Diacylglycerol acyltransferase WSD1 required for stem wax ester biosynthesis in arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 148, p. 97-107, 2008.
- LIU, S. -Y.; LO, C. -T.; CHEN, C.; LIU, M. -Y.; CHEN, J. -H.; PENG, K. -C. Efficient isolation of anthraquinone-derivatives from *Trichoderma harzianum* ETS 323. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, n. 3, p. 391-395, 2007.
- LÓPEZ, V.; AKERRETA, S.; CASANOVA, E.; GARCÍA-MINA, J. M.; CAVERO, R. Y.; CALVO, M. I. *In vitro* Antioxidant and Anti-rhizopus Activities of Lamiaceae Herbal Extracts. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 62, p. 151-155, 2007.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. v.2.
- MACEDO, D. M.; BARRETO, R. W. First record of *Botryosphaeria ribis* associated with leaf spots on *Magnolia* aff. *candollei* in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 321-324, 2008.

MACÍAS-RUBALCAVA, M. L.; HERNÁNDEZ-BAUTISTA, B. E.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; CRUZ-ORTEGA, R.; ANAYA, A. L. Pentacyclic Triterpenes with Selective Bioactivity from *Sebastiania adenophora* Leaves, Euphorbiaceae. **Journal of Chemical Ecology**, v. 33, n. 1, p. 147-156, 2007.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F., GRYNBERG, N. F., ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAHLE, F.: **Atividade antimicrobiana e toxicidade de protótipo N-antipirino-3,4-dicloronialeiniida e seus derivados**. 2008. 100p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmaceuticas). Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Itajaí, SC.

MALATHI, S.; et al. Constituents of *Coccoloba uvifera* leaves. **Fitoterapia**, v. 66, n. 3, p. 277, 1995.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, v. 2, p. 176-177, 1962.

MANOJLOVIC, I.; BOGDANOVIC-DUSANOVIC, G.; GRITSANAPAN, W.; MANOJLOVIC, N. Isolation and identification of anthraquinones of *Caloplaca cerina* and *Cassia tora*. **Chemical Papers**, v. 60, n. 6, p. 466-468, 2006.

MARTINS, S. L. C., SILVA, H. F., NOVAES, M. R. C. G.; ITO, M. K. Efeitos terapêuticos dos fitosteróis e fitostanóis na colesterolemia. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 54, n. 3, p. 257-263, 2004.

MATOS, F. J. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza – CE: UFC, 1997.

MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/Ed. Da UFSC, 2001. p. 527-554.

MELO, E. Polygonaceae da cadeia do espinhaço, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 14, n. 3, p. 273-300, 2000.

MELO, E. As espécies de *Coccoloba* P. Browne (Polygonaceae) da Amazônia brasileira. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 4, p. 525-531, 2004.

MELO, E.; FRANÇA, F. A família Polygonaceae no semi-árido brasileiro. In: GIULIETTI, A. M.; CONCEIÇÃO, A. A.; QUEIROZ, L. P. (Org.). Diversidade e caracterização das fanerógamas do semi-árido brasileiro. **Associação Plantas do Nordeste**, 2006. v.1, p. 437-488.

MICHAILIDES, T. J.; MORGAN, D. P.; FELTS, D. First report of *Botryosphaeria rhodina* causing shoot blight of pistachio in California. **Plant Disease**, v. 86, n. 11, p. 1273, 2002

- MIN, B. R.; HART, S. P. Tannins for suppression of internal parasites. **Journal of Animal Science**, v. 81, p 102-109, 2003.
- MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. da S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.
- MONTOYA, S. C.; AGNESE, A. M.; PÉREZ, C.; TIRABOSCHI, I. N.; CABRERA, J. L. Pharmacological and toxicological activity of *Heterophyllaea pustulata* anthraquinone extracts. **Phytomedicine**, v. 10, p. 569-574, 2003.
- MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia clínica**. 8.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- MORALES, S. M.; VALLEJO, O. C.; GUZMAN, W. H.; POLANCO, G. L.; MATA, H. H. Three constituents with biological activity from *Coccoloba uvifera* seeds. **Ciencia**, v. 16, n.1, p. 84-89, 2008.
- MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal plants of Brazil**. DeFilipps RA (Ed), Reference Publications, 2000.
- MOTA, K. S. L.; PITA, J. C. L. R.; ESTEVAN, E. C.; MEDEIROS, V. M.; TAVARES, J. F.; AGRA, M. F.; DINIZ, M. F. F. M.; SILVA, M. S.; BATISTA, L. M. Evaluation of the toxicity and antiulcerogenic activity of the ethanol extract of *Maytenus obtusifolia* Mart, leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 441-446, 2008.
- MUTLU, S.; ATICI, O. Allelopathic effect of *Nepeta meyeri* Benth. extracts on seed germination and seedling growth of some crop plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, n. 1, p. 89-93, 2008.
- NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C. M. S.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S. N.; CECHINEL-FILHO, V. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: CECHINEL-FILHO, V.; BRASOLIN, T. M. B. CECHINEL-FILHO, V. (Org.). **Ciências farmacêuticas: contribuições ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí - SC, Univali, 2003. p. 9-56.
- OLIVEIRA, P. E. S.; SANTOS, W. S.; CONSERVA, L. M.; LEMOS, R. P. L. Constituintes químicos das folhas e do caule de *Coccoloba mollis* Casaretto (Polygonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18 (supl.), p. 713-717, 2008a.
- OLIVEIRA, P. E. S.; LIMA, G. S.; MOURA, F. S.; CONSERVA, L. M.; BRITO, A. C.; LEMOS, R. P. L.: Larvicidal activity os some species of the flora from Alagoas State in the controlo f *Aedes aegypti* L. (Diptera; Culicidae). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL X CONGRESSO INTERNACIONAL DE ETNOFARMACOLOGIA, 20., São Paulo: **Anais...** São Paulo, 2008b.
- PADUCH, R.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 55, p. 315-327, 2007.

- PAPIEZ, M. A. The influence of hollyhock extract administration on testicular function in rats. **Journal of Molecular Histology**, v. 35, p. 733-740, 2004.
- PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDINAS, I. G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD<sub>50</sub> value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.
- PELUSO, M. R. Flavonoids Attenuate Cardiovascular Disease, Inhibit Phosphodiesterase, and Modulate Lipid Homeostasis in Adipose Tissue and Liver. **Experimental Biology and Medicine**, v. 231, p. 1287-1299, 2006.
- PEREIRA, A. L.; SILVA, G. S.; RIBEIRO, V. Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 6, p. 572-578, 2006.
- PEREZ, F.; SALATA, R. A.; BOBOMO, R. A. Current and novel antibiotics against resistant Gram-positive bacteria. **Infection and Drug Resistance**, v. 1, p. 27-44, 2008.
- PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.
- QUIROGA, E. N.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 89-79, 2001.
- REMONDI, F. A.; RODRIGUES, R.; FERREIRA, D. T.; MOREIRA, E. G.. Avaliação da toxicidade aguda e ação depressora do sistema nervoso central de extratos de *Coccoloba mollis*. In: ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 17., Foz do Iguaçu, 2008. **Anais...** Foz do Iguaçu: [s.l], 2008.
- RIBEIRO, C. M. R.; SOUZA, N. A. Esquema geral para elucidação de substâncias orgânicas usando métodos espectroscópico e espectrométrico. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 1026-1031, 2007.
- RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLINZ, J. R.; CRUZ, M. E. S.; FIORI-TUTIDA, A. C. G. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de gengibre e eucalipto *in vitro* e em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium* sp. **Acta Science Agronomy**, v. 28, n. 1, p. 123127, 2006.
- ROGINSKY, V.; LISSI E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.
- SALEWSKI, E. Faerbemethoden zum makroskopischen nachweis von implantationsstellen am uterus der ratte. **Naynyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.**, v. 247, p.367, 1964.

- SAMY, R. P.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Therapeutic potential of plants as anti-microbials for drug discovery. Evidence-based Complementary. **Alternative Medicine**, 2008. Epub ahead of print.
- SANCHEZ, A.; KRON, K. A. Phylogenetics of Polygonaceae with an Emphasis on the Evolution of Eriogonoideae. **Systematic Botany**, v. 33, n. 1, p. 87-96, 2008.
- SANCHEZ-MORENO, C.; LAURRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A. Procedure to measure the anti-radical efficiency of polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 76, n. 10, p. 270-276, 1998.
- SANTOS, L. C.; DOKKEDAL, A. L.; SANNOMIYA, M.; SOARES, M. C. P.; VILEGAS, W. n-alkanes from *Paepalanthus* Mart. species (Eriocaulaceae). **Acta Botânica Brasileira**, v. 19, n. 4, p. 727-732, 2005.
- SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; et al. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/Ed. Da UFSC, 2001. p 333-364.
- SETZER, W. N.; VOGLER, B. Bioassays for Activity. In: CSEKE, L. J.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P. B.; WARBER, S. L.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. **Natural products from plants**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. cap. 10, p. 389-414.
- SHAI, L. J.; MCGAW, L. J.; ADEROGBA, M. A.; MDEE, L. K.; ELOFF, J. N. Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm. Leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 238-244. 2008.
- SILVA, T. M. S.; NASCIMENTO, R. J. B.; BATISTA, M. M.; AGRA, M. F.; CAMARA C. A. Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 35-38, 2007.
- SILVA-BRAMBILLA, M. G.; MOSCHETA, I. S. Anatomia foliar de Polygonaceae (Angiospermae) da planície de inundação do alto rio Paraná. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 23, n. 2, p. 571-585, 2001.
- SILVEIRA, J. E. P. S.; PEREDA, M. C. V.; EBERLIN, S.; DIEAMANT, G. C.; DI STASI, L. C. Effects of *Coccoloba uvifera* L. on UV-stimulated melanocytes. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 24, p. 308-313, 2008.
- SIMÕES, C. M.O.; et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/Ed. Da UFSC, 2000.
- SINGH, H. P.; BATISH, DAIZY R.; KOHLI, R. K. Allelopathy in agroecosystems: An overview. **Journal of Crop Production**, v. 4, n. 2, p. 1-41, 2001.
- SLAGA, T. J. The inhibition of skin tumor initiation, promotion, and progression by antioxidants and related compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, p. 51-57, 1995.

SOUZA, W. M. **Estudo químico e das atividades biológicas dos alcalóides indólicos de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Wodsoon, Apocynaceae - (Agoniada)**. 2008. 173p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR.

STICHER, O. Natural product isolation. **Natural Products Reports.**, v. 25, p. 517-554, 2008.

TAYLOR, A.; HARDY, G. T. ST J.; WOOD, P.; BURGESS, T. Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 34, p. 187-195, 2005.

TEIXEIRA, C. M.; ARAÚJO, J. B. S.; CARVALHO, G. J. Potencial alelopático de plantas de cobertura no controle de picão-preto (*Bidens pilosa* L.). **Ciência e agrotecnologia**, v. 28, n. 3, p. 691-695, 2004.

TSUBOY, M. S. F. **Avaliação da mutagenicidade dos extratos de folha e raiz da planta medicinal *Coccoloba mollis* (Polygonaceae) em diferentes sistemas-teste**. 2008. 100p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR.

TUNER, H.; KORKMAZ, M. Radiostability of butylated hydroxytoluene (BHT): An ESR study. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 258, p. 388-394, 2007.

UNIVERSITY OF TEXAS LIBRARIES, Disponível em: <<http://www.lib.utexas.edu/>>. Acesso em: 4 out. 2007.

VIEGA JR., C. ; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29 n. 2, p. 326-337, 2006.

WALL, M. E.; et al. Effect of tannins on screening of plant extracts for enzyme inhibitory activity and techniques for their removal. **Phytomedicine**, v. 3, n. 3, p. 281-285, 1996.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, n. 7, p. 838 - 849, 2004.

WILSON, R. M.; DANISHEFSKY S. J. Small Molecule Natural Products in the Discovery of Therapeutic Agents: The Synthesis Connection. **J. Org. Chem.**, v. 71, n. 22, p. 8329-8351, 2006.

WU, K.-M.; GHANTOUS, H.; BIRNKRANT, D. B. Current regulatory toxicology perspectives on the development of herbal medicines to prescription drug products in the United States. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n.8, p. 2606-2610, 2008.

WU, S.; CHAPPELL, J. Metabolic engineering of natural products in plants; tools of the trade and challenges for the future. **Current Opinion in Biotechnology**, v.19, p. 145-152, 2008.

ZEIGLER, D. R.; PERKINS, J. B. The Genus *Bacillus*. In: GOLDMAN, E.; GREEN, L. H. **Practical handbook of microbiology**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. cap. 24, p. 309-338

ZHANG, P.; SU, L.; WANG, D.; ZHAO, Y. ; LI, X. ; YANG, Z.; CUI, X. Protective effects of physcion on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Zhongguo Linchuang Kangfu**, v. 9, n. 13, p. 240-243, 2005a.

ZHANG, P.; SU, L.; LI, H.; ZHAO, Y.; YANG, Z.; CUI, X. Protective effects of physcion against cerebral injury induced by ischemia-reperfusion in rats. **Zhongguo Bingli Shengli Zazhi**, v. 21, n. 9, p. 1829-1833, 2005b.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In : Simões, C. M. O.; et al. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/Ed. Da UFSC, 2001. p. 499-526.