

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRESSA FRIZZO PHILIPPSEN

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
Xylosma ciliatifolium (CLOS) EICHLER, FLACOURTIACEAE
(SALICACEAE *sensu lato*)

CURITIBA
2010

ANDRESSA FRIZZO PHILIPPSEN

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
Xylosma ciliatifolium (CLOS) EICHLER, FLACOURTIACEAE
(SALICACEAE *sensu lato*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Marílis Dallarmi Miguel

CURITIBA
2010

Philippsen, Andressa Frizzo

Caracterização fitoquímica e atividades biológicas de *Xylosma ciliatifolium* Clos (Eichler) Flacourtiaceae (Salicaceae *sensu lato*) / Andressa Frizzo Philippsen- Curitiba, 2010.

x, 111 f. : il., tabs, grafs.

Orientador: Obdulio Gomes Miguel

Co-orientadora: Marílis Dallarmi Miguel

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Inclui Bibliografia

1.Flacourtiaceae (Salicaceae *sensu lato*). 2. *Xylosma ciliatifolium*.
3. Atividade alelopática. 4. *Artemia salina*. 5. Atividade antibacteriana.
I. Miguel, Obdulio Gomes. II. Título. III. Universidade Federal do Paraná.

CDD 615.32

"Nunca é tarde para tentar o desconhecido.

Nunca é tarde para ir mais além."

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Ao Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel, pela orientação, paciência, amizade e pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Marílis Dallarmi Miguel, pelo incentivo, ensinamentos e conselhos oferecidos de forma amiga.

À Prof^a. Dr^a. Ana Luisa Lacava Lordello, pela incansável atenção e ajuda na resolução dos espectros de RMN.

Ao botânico Gert Hatschbach, pela identificação da espécie.

A minha colega e amiga Milena, pela amizade, companheirismo e pelas horas compartilhadas em laboratório no desenvolvimento das técnicas, nos lanches em nossos intervalos e, pelas caronas preciosas até o ponto de ônibus.

À doutoranda Cláudia Alexandra Andrade, pela ajuda na obtenção dos espectros de infravermelho.

À doutoranda Josiane F. G. Dias pelo auxílio e dicas na realização dos testes de alelopatia.

À doutoranda Cristina Mayumi Sasaki Miyasaki, pela obtenção dos espectros de RMN.

À doutoranda Cristina Peitz de Lima, pelo carinho, amizade e bons momentos de conversa vivenciados no laboratório.

À Dr^a. Miriam M. Cunico que em conjunto com Lilian C. Côcco contribuíram para a realização da análise do óleo essencial no Laboratório de Análises de Combustíveis Automotores (LACAU).

Ao Laboratório de RMN da Universidade Estadual de Maringá, pela análise da amostra XC1.

Ao Laboratório de Controle de Qualidade II, representado pela Prof^a. Wanda N. Abraão e pela técnica de laboratório Geni Peruzzo, pela prestatividade na realização dos ensaios de avaliação da atividade antibacteriana.

Ao técnico Paulo Sérgio Diniz do Laboratório de Farmacotécnica, pelo auxílio.

Aos amigos Rodolfo e Marcelo, pela obtenção dos espectros de massas e confecção das estruturas químicas deste trabalho.

EM ESPECIAL:

Aos meus pais, LAURINDO e NILVA, pelo carinho, amor, conselhos e palavras de motivação em todos os momentos vividos em mais esta etapa da minha vida.

À minha irmã DANIELA por ser a amiga mais preciosa e importante na troca de ideias.

Ao meu noivo ALEXANDRE, que mesmo distante sempre esteve ao meu lado, por todo amor, carinho e companheirismo recebidos.

À Dona IRACI, pelo acolhimento e carinho com que me recebeu em sua casa.

RESUMO

Na família Flacourtiaceae (Salicaceae *sensu lato*), o gênero *Xylosma* está representado por cerca de 100 espécies com distribuição em áreas tropicais e subtropicais do planeta, mas não está entre os mais estudados. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial alelopático, citotóxico e antibacteriano da espécie *Xylosma ciliatifolium*, popularmente conhecida como sucará, açúcará, espinho-de-judeu ou espinho-de-agulha. A partir do estudo fitoquímico das cascas das raízes fez-se o isolamento de dois compostos: manitol, um açúcar poliol e de um sesquiterpeno dialdeído, sugerido como ugandensidial. Estes compostos foram relatados pela primeira vez na família Flacourtiaceae. O óleo essencial da mesma porção vegetal foi caracterizado por CG/EM e identificou-se 33 compostos. 3,5 dimetoxi tolueno (26,37%), limoneno (5,73%), cedranol (4,37%), *E*-Nerolidol (3,82%), drimenin (3,18%), α -terpineol (2,94%) e drimenol (2,74%) encontravam-se majoritários. No ensaio alelopático, as frações hexano e clorofórmio das cascas das raízes e o composto XC2 (sesquiterpeno) exerceram influência inibitória sobre o crescimento das plântulas de *Lactuca sativa*. Estas mesmas amostras foram bioativas frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. O teste antimicrobiano por difusão em ágar revelou o potencial antibacteriano das frações das folhas e cascas das raízes e do isolado XC2 frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Na avaliação da concentração inibitória mínima, pelo método da diluição em caldo, somente as frações hexano e clorofórmio das cascas das raízes e XC2 demonstraram atividade sobre as bactérias gram-positivas, nas concentrações de 250, 500 e 62,5 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

Palavras-chave: Flacourtiaceae (Salicaceae *sensu lato*). *Xylosma ciliatifolium*. Atividade alelopática. *Artemia salina*. Atividade antibacteriana.

ABSTRACT

In the family Flacourtiaceae (Salicaceae *sensu lato*), the species *Xylosma* is represented by around 100 species distributed in tropical and subtropical areas on the planet, but it is not among the most studied ones. This paper aimed at evaluating the allelopathic, cytotoxic and anti-bacterial potential of the *Xylosma ciliatifolium*, commonly known as sucará, açúcará, espinho-de-judeu or espinho-de-agulha. Through the phytochemistry study of the barks of the roots two compounds were isolated: mannitol, a polyol sugar and a sesquiterpene dialdehyde, suggested as ugandensidial. These compounds were firstly reported in the family Flacourtiaceae. The essential oil of the same vegetal portion was characterized as GC/MS and 33 compounds were identified. 3,5 dimetoxo tolueno (26,37%), limoneno (5,73%), cedranol (4,37%), *E*-Nerolidol (3,82%), drimenin (3,18%), α -terpineol (2,94%) and drimenol (2,74%) prevailed. Regarding the allelopathic test, the hexane and chloroform fractions of the barks of the roots and the compound XC2 (sesquiterpene) exerted inhibitory influence on the growth of the plantules of *Lactuca sativa*. These samples were bioactive regarding the brine shrimp larva *Artemia salina*. The antimicrobial test in agar diffusion revealed the antibacterial potential of the fractions of the leaves and barks of the roots and the isolated XC2 concerning the *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* bacteria. In the evaluation of the minimum inhibitory concentration, through broth dilution, only the hexane and chloroform fractions of the barks of the roots and XC2 showed some activity against gram-positive bacteria, in the concentrations of 250, 500 and 62.5 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

Key words: Flacourtiaceae (Salicaceae *sensu lato*). *Xylosma ciliatifolium*. Allelopathic activity. *Artemia salina*. Anti-bacterial activity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	FOTOGRAFIA DE <i>X. ciliatifolium</i> (CLOS) EICHLER, FLACOURTIACEAE (SALICACEAE <i>sensu lato</i>).....	25
FIGURA 2 -	ILUSTRAÇÃO DE <i>Xylosma ciliatifolium</i> (CLOS) EICHLER.....	26
FIGURA 3 -	FLUXOGRAMA ILUSTRATIVO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DO MATERIAL VEGETAL DE <i>X. ciliatifolium</i> , CONSTITUÍDO DE FOLHAS E CASCAS DAS RAÍZES.....	39
FIGURA 4 -	ILUSTRAÇÃO DE UM APARELHO DE CLEVINGER MODIFICADO.....	51
FIGURA 5 -	FLUXOGRAMA ILUSTRATIVO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS REALIZADAS COM AS AMOSTRAS OBTIDAS DE <i>X. ciliatifolium</i>	54
FIGURA 6 -	REPRESENTAÇÃO DAS ETAPAS DE PREPARO DAS AMOSTRAS UTILIZADAS PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA.....	55
FIGURA 7 -	ESQUEMA DE DISTRIBUIÇÃO DAS SEMENTES DE <i>L sativa</i> SOBRE O PAPEL FILTRO CONTENDO AS AMOSTRAS.....	56
FIGURA 8 -	FÓRMULA PARA DETERMINAÇÃO DO IVG.....	57
FIGURA 9 -	ILUSTRAÇÃO DE UMA PLÂNTULA NO 7º DIA DE CRESCIMENTO.....	58
FIGURA 10 -	REPRESENTAÇÃO DAS ETAPAS DE PREPARO DAS AMOSTRAS UTILIZADAS PARA O ENSAIO TOXICOLÓGICO SOBRE <i>Artemia salina</i>	59
FIGURA 11 -	REPRESENTAÇÃO DAS ETAPAS DE OBTENÇÃO DAS LARVAS DE <i>Artemia salina</i>	60
FIGURA 12 -	REPRESENTAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DAS LARVAS DE <i>Artemia salina</i> NOS RECIPIENTES CONTENDO AS AMOSTRAS PARA O ENSAIO TOXICOLÓGICO.....	61
FIGURA 13 -	REPRESENTAÇÃO DAS ETAPAS DE PREPARO DAS AMOSTRAS, EM DISCOS DE PAPEL, UTILIZADAS PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	62

FIGURA 14 - ESQUEMA DE PREPARO DOS INÓCULOS PADRONIZADOS A PARTIR DE CEPAS BACTERIANAS LIOFILIZADAS.....	64
FIGURA 15 - REPRESENTAÇÃO DAS ETAPAS REALIZADAS PARA O TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR PELO MÉTODO DO DISCO...	65
FIGURA 16 - REPRESENTAÇÃO DO PROCESSO DE DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS EM CALDO TRÍPTICO DE SOJA PARA A MEDIDA DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	66
FIGURA 17 - CROMATOGRAMA DO MANITOL.....	70
FIGURA 18 - ESPECTRO DE MASSAS DO MANITOL OBTIDO POR ELETROSPRAY.....	71
FIGURA 19 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO COMPOSTO XC1.....	72
FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN ¹³ C PARA O COMPOSTO XC1 (75 MHz, DMSO-d ₆).....	72
FIGURA 21 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO COMPOSTO XC2.....	74
FIGURA 22 - ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO XC2 OBTIDO POR ELETROSPRAY.....	74
FIGURA 23 - ESPECTRO DE RMN ¹ H PARA O COMPOSTO XC2 (200 MHz, CDCl ₃).....	76
FIGURA 24 - ESPECTRO DE RMN ¹³ C PARA O COMPOSTO XC2 (50 MHz, CDCl ₃).....	76
FIGURA 25 - ESPECTRO DE RMN ¹³ C/DEPT (CDCl ₃) PARA O COMPOSTOXC2.....	77
FIGURA 26 - ESPECTRO DE MASSAS DO 3,5-DIMETOXI TOLUENO.....	81
FIGURA 27 - ROTA PROPOSTA PARA A SÍNTESE DE 3,5-DIMETOXI TOLUENO.....	81
FIGURA 28 - INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO DE <i>S. epidermidis</i> PELO MÉTODO DA MEDIDA DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA O ISOLADO XC2.....	100

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE <i>Lactuca sativa</i> SUBMETIDA A ENSAIO ALELOPÁTICO FRENTE ÀS FRAÇÕES DAS FOLHAS DE <i>Xylosma ciliatifolium</i>	84
GRÁFICO 2 - PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE <i>Lactuca sativa</i> SUBMETIDA A ENSAIO ALELOPÁTICO FRENTE ÀS FRAÇÕES DAS FOLHAS DE <i>Xylosma ciliatifolium</i>	84
GRÁFICO 3 - PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE <i>Lactuca sativa</i> SUBMETIDA A ENSAIO ALELOPÁTICO FRENTE ÀS FRAÇÕES DAS CASCAS DAS RAÍZES DE <i>Xylosma ciliatifolium</i>	88
GRÁFICO 4 - PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE <i>Lactuca sativa</i> SUBMETIDA A ENSAIO ALELOPÁTICO FRENTE ÀS FRAÇÕES DAS CASCAS DAS RAÍZES DE <i>Xylosma ciliatifolium</i>	88
GRÁFICO 5 - PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO E DA RADÍCULA DE <i>Lactuca sativa</i> SUBMETIDA A ENSAIO ALELOPÁTICO FRENTE AO ISOLADO XC2 DE <i>Xylosma ciliatifolium</i>	92

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 -	CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DA <i>Xylosma ciliatifolium</i>	24
QUADRO 2 -	ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE REALIZADOS COM EXTRATOS E COMPOSTOS ISOLADOS DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA FLACOURTIACEAE.....	36
QUADRO 3 -	DESCRIÇÃO DOS TRATAMENTOS PARA ANÁLISE ESTATÍSTICA DA ALELOPATIA.....	69
TABELA 1 -	RESULTADOS DOS ENSAIOS FITOQUÍMICOS PARA AS FRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE <i>X. ciliatifolium</i>	67
TABELA 2 -	RESULTADOS DOS ENSAIOS FITOQUÍMICOS COM O EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE <i>X. ciliatifolium</i>	68
TABELA 3 -	SUBSTÂNCIAS OBTIDAS DAS CASCAS DAS RAÍZES DE <i>X. ciliatifolium</i>	69
TABELA 4 -	VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) de RMN ^1H e ^{13}C PARA O COMPOSTO XC2 EM CDCl_3	77
TABELA 5 -	CONECTIVIDADES A LONGA DISTÂNCIA PARA O COMPOSTO XC2.....	78
TABELA 6 -	VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) de RMN ^1H PARA XC2 EM CDCl_3 (200 MHz) EM COMPARAÇÃO COM UGANDENSIDIAL EM CDCl_3 (100 MHz).....	78
TABELA 7 -	COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS CASCAS DAS RAÍZES DE <i>Xylosma ciliatifolium</i>	80
TABELA 8 -	TESTE DE SCOTT-KNOTT PARA OS ÍNDICES DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE <i>L. sativa</i> FRENTE ÀS FRAÇÕES DAS FOLHAS DE <i>X. ciliatifolium</i>	82
TABELA 9 -	TESTE DE SCOTT-KNOTT PARA O CRESCIMENTO DE <i>L. sativa</i> FRENTE ÀS FRAÇÕES DAS FOLHAS DE <i>X. ciliatifolium</i>	83
TABELA 10 -	TESTE DE SCOTT-KNOTT PARA OS ÍNDICES DE	

	VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE <i>L. sativa</i> FRENTE ÀS FRAÇÕES DAS CASCAS DAS RAÍZES DE <i>X. ciliatifolium</i>	85
TABELA 11 -	TESTE DE SCOTT-KNOTT PARA O CRESCIMENTO DE <i>L. sativa</i> FRENTE ÀS FRAÇÕES DAS CASCAS DAS RAÍZES DE <i>X. ciliatifolium</i>	86
TABELA 12 -	TESTE DE SCOTT-KNOTT PARA OS ÍNDICES DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE <i>L. sativa</i> FRENTE AO ISOLADO XC2 DE <i>X. ciliatifolium</i>	89
TABELA 13 -	TESTE DE SCOTT-KNOTT PARA O CRESCIMENTO DE <i>Lactuca sativa</i> FRENTE AO ISOLADO XC2 DE <i>X. ciliatifolium</i>	90
TABELA 14 -	TESTE DE TOXICIDADE SOBRE <i>A. salina</i> DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS CASCAS DAS RAÍZES DE <i>X. ciliatifolium</i>	94
TABELA 15 -	TESTE DE TOXICIDADE SOBRE <i>A. salina</i> DO ISOLADO XC2 OBTIDO DAS CASCAS DAS RAÍZES DE <i>X. ciliatifolium</i>	95
TABELA 16 -	DIÂMETROS MÉDIOS DOS HALOS DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO (MM) FRENTE ÀS FRAÇÕES OBTIDAS DAS FOLHAS DE <i>X. ciliatifolium</i>	96
TABELA 17 -	DIÂMETROS MÉDIOS DOS HALOS DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO (MM) FRENTE ÀS FRAÇÕES OBTIDAS DAS CASCAS DAS RAÍZES DE <i>X. ciliatifolium</i>	97
TABELA 18 -	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DAS FRAÇÕES HEXANO E CLOROFÓRMIO DAS CASCAS DAS RAÍZES DE <i>X. ciliatifolium</i>	98
TABELA 19 -	DIÂMETROS MÉDIOS DOS HALOS DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO (MM) FRENTE AO ISOLADO XC2 OBTIDO DAS CASCAS DAS RAÍZES DE <i>X. ciliatifolium</i>	99

TABELA 20 -	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO ISOLADO XC2	
	OBTIDO DAS CASCAS DAS RAÍZES DE <i>X. ciliatifolium</i>	99

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas
δ	Deslocamento químico
DEPT	Espectro de ^{13}C RMN utilizando transferência de polarização
DL_{50}	Dose letal média
DMT	Dimetoxi tolueno
EBEtOH	Extrato bruto etanólico
FACET	Fração acetato de etila
FCLOR	Fração clorofórmio
FHEX	Fração hexano
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
IV	Infravermelho
IVG	Índice de velocidade de germinação
J	Constante de acoplamento
m/z	Relação massa/carga
MBM	Museu Botânico Municipal
MHz	Megahertz
N	Normal
NIST	National Institute of Standard Technology
OOMT1	Orcinol orto metil transferase 1
OOMT2	Orcinol orto metil transferase 2
pH	Potencial hidrogeniônico
RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
TMS	Tetrametilsilano
UFC/ml	Unidade formadora de colônia por mililitro
XC1	Composto 1
XC2	Composto 2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1 ASPECTOS BOTÂNICOS	21
3.1.1 Família Flacourtiaceae.....	21
3.1.2 Gênero <i>Xylosma</i>	22
3.1.3 Espécie <i>Xylosma ciliatifolium</i>	22
3.2 ASPECTOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS.....	27
3.2.1 Família Flacourtiaceae.....	27
3.2.1.1 Triterpenos.....	27
3.2.1.2 Glicosídeos.....	29
3.2.1.3 Diterpenos.....	31
3.2.2 Gênero <i>Xylosma</i>	37
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	39
4.2 ENSAIOS FITOQUÍMICOS.....	40
4.2.1 Caracterização dos grupos fitoquímicos.....	40
4.2.1.1 Preparo do extrato hidroalcoólico a 20%.....	40
4.2.1.1.1 Pesquisa de alcaloides.....	40
4.2.1.1.2 Pesquisa de leucoantocianidinas.....	41
4.2.1.1.3 Pesquisa de flavonoides.....	41
4.2.1.1.4 Pesquisa de cumarinas.....	43
4.2.1.1.5 Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos.....	43
4.2.1.1.6 Pesquisa de esteroides e/ou triterpenos.....	44
4.2.1.2 Preparo do extrato aquoso a 20%.....	45
4.2.1.2.1 Pesquisa de heterosídeos antocianínicos.....	45
4.2.1.2.2 Pesquisa de heterosídeos saponínicos.....	46
4.2.1.2.3 Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos.....	46
4.2.1.2.4 Pesquisa de taninos.....	46
4.2.1.2.5 Pesquisa de aminogrupos.....	48
4.3 EXTRAÇÃO, FRACIONAMENTO E ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS..	48
4.3.1 Folhas.....	48
4.3.1.1 Obtenção e fracionamento do extrato bruto etanólico (EBEtOH) das folhas de <i>X. ciliatifolium</i>	48
4.3.2 Cascas das raízes.....	49
4.3.2.1 Obtenção e fracionamento do extrato bruto etanólico (EBEtOH) das cascas das raízes de <i>X. ciliatifolium</i>	49
4.3.2.2 Isolamento do composto XC2 por cromatografia em coluna da fração hexano das cascas das raízes de <i>X. ciliatifolium</i>	49
4.4 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	51
4.5 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	51
4.5.1 Faixa de fusão.....	52

4.5.2 Infravermelho (IV).....	52
4.5.3 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN ¹ H e ¹³ C).....	52
4.5.4 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE/EM).....	53
4.5.5 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)	53
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA.....	54
4.6.1 Preparo das amostras.....	55
4.6.2 Preparo do material.....	55
4.6.3 Teste de germinação.....	57
4.6.4 Teste de crescimento.....	57
4.7 ENSAIO TOXICOLÓGICO SOBRE <i>Artemia salina</i>	58
4.7.1 Preparo da solução salina.....	58
4.7.2 Preparo das amostras.....	59
4.7.3 Eclosão dos ovos.....	59
4.7.4 Avaliação da toxicidade.....	60
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	61
4.8.1 Método de difusão em ágar.....	61
4.8.1.1 Preparo das amostras.....	62
4.8.1.2 Preparo dos discos de papel.....	62
4.8.1.3 Meio de cultura.....	63
4.8.1.4 Preparo do inóculo.....	63
4.8.1.5 Teste de sensibilidade.....	64
4.8.2 Concentração inibitória mínima (CIM).....	65
4.8.2.1 Preparo do inóculo.....	65
4.8.2.2 Preparo das amostras e teste da CIM.....	66
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
5.1 ENSAIOS FITOQUÍMICOS.....	67
5.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES.....	68
5.2.1 Rendimento do processo de extração e fracionamento.....	68
5.3 PRODUTOS ISOLADOS E IDENTIFICAÇÃO.....	69
5.3.1 Composto XC1.....	69
5.3.2 Composto XC2.....	73
5.4 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	80
5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA.....	82
5.5.1 Frações das folhas.....	82
5.5.1.1 Avaliação da germinação.....	82
5.5.1.2 Avaliação do crescimento.....	82
5.5.1.3 Avaliação da porcentagem de crescimento de <i>Lactuca sativa</i>	83
5.5.2 Frações das cascas das raízes.....	85
5.5.2.1 Avaliação da germinação.....	85
5.5.2.2 Avaliação do crescimento.....	85
5.5.2.3 Avaliação da porcentagem de crescimento de <i>Lactuca sativa</i>	87
5.5.3 Composto XC2.....	89
5.5.3.1 Avaliação da germinação.....	89
5.5.3.2 Avaliação do crescimento.....	89
5.5.3.3 Avaliação da porcentagem de crescimento de <i>Lactuca sativa</i>	91
5.6 ENSAIO DE TOXICIDADE SOBRE <i>Artemia salina</i>	93
5.6.1 Frações das folhas.....	93
5.6.2 Frações das cascas das raízes.....	93

5.6.3 Composto XC2.....	94
5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	96
5.7.1 Frações das folhas.....	96
5.7.2 Frações das cascas das raízes.....	97
5.7.3 Composto XC2.....	98
6 CONCLUSÕES.....	101
REFERÊNCIAS.....	103

1 INTRODUÇÃO

O contato dos homens com a natureza é conhecido desde a Antiguidade para fins práticos como alimentação, moradia, defesa, práticas religiosas, meios de transporte, fertilizantes, aromas, fragrâncias e saúde. Dados históricos do uso tradicional de plantas medicinais relatam que povos da China, Egito, Ásia e Roma com base em seus conhecimentos realizaram a classificação de diversas espécies vegetais com a respectiva indicação terapêutica (LIMA, 2001).

A partir do século XV, com a colonização da África e das Américas, o conhecimento de uma nova vegetação (tropical e subtropical), bem como as possibilidades de uso de diferentes plantas, aumentou ainda mais o conhecimento de cientistas botânicos europeus (NEVES, 2001).

Especialmente nas últimas duas décadas, a humanidade vem despertando para a relevância dos produtos naturais para a recuperação e manutenção da saúde e, conseqüentemente, para a melhoria da qualidade de vida. Este dado corrobora com as informações descritas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), na qual conceitua que a medicina tradicional baseada em plantas medicinais é utilizada amplamente e é um sistema com perspectivas de crescimento rápido, com grande relevância econômica. Cerca de 80% da população da África utiliza a medicina tradicional para o tratamento das suas necessidades sanitárias; na Ásia e na América Latina, a medicina tradicional é resultado de circunstâncias históricas e de crenças culturais. Na China, a medicina tradicional, corresponde a 40 % da atenção sanitária desse país (Estratégias da OMS para a medicina tradicional, 2002-2005).

No mundo, existem aproximadamente 250.000 espécies vegetais, das quais somente cerca de 2.500 foram realizados estudos sobre o perfil fitoquímico e atividades biológicas. O Brasil, por sua vez, com grande extensão em área territorial, concentra uma das mais ricas floras do mundo com espécies vegetais pouco estudadas e que, desta maneira, compõem ampla biodiversidade.

Devido à capacidade de sintetizar diversas substâncias, as plantas são uma das mais ricas fontes de novas drogas e, desta maneira, as pesquisas com vegetais contribuem com novas alternativas terapêuticas pelo desenvolvimento de fitoterápicos inovadores, assim como, pela elucidação de substâncias isoladas, que

ainda podem ser utilizadas como moléculas protótipo para a síntese de novos fármacos, a fim de se obter resultados terapêuticos para muitas doenças.

O interesse por substâncias químicas obtidas de plantas é enfoque na pesquisa de novos agentes herbicidas atentando-se principalmente ao controle da contaminação ambiental e à redução do risco de resíduos em alimentos. No campo da alelopatia concentram-se os estudos relacionados à avaliação da influência positiva ou negativa de substâncias produzidas por plantas (agentes alelopáticos) sobre outros sistemas biológicos. Os ensaios laboratoriais constituem o primeiro passo para a identificação de promissores produtos para a área da agricultura ecológica (DIAS, 2005).

Dentre os produtos naturais ativos que têm mostrado resultados mais eficientes na química medicinal, pode-se destacar que aproximadamente 50% apresentam atividades antitumorais (YUNES; CECHINEL FILHO, 2007). Os estudos nessa área aumentaram de forma considerável visto que ainda existe uma lacuna no conhecimento da biogênese de tumores e mecanismo de ação para o controle ou aborto dos mesmos. Estudos laboratoriais com produtos naturais são de grande importância considerando-se que a incidência anual de câncer é estimada em 6 milhões de casos (FERREIRA, 2006).

No que se refere ao problema da resistência microbiana, há uma necessidade urgente de se estabelecer regras para o uso racional de antibióticos e de se fortalecer os estudos para a obtenção de novas drogas bem como, terapias alternativas para o controle de doenças bacterianas (CASTRO *et al.*, 2008). Produtos naturais são considerados fontes de novos agentes antibacterianos, levando-se em conta os dados históricos que relatam desde a instrução de Hipócrates (460-337 a.C.) para a lavagem de feridas, utilizando-se vinho para impedir o processo infeccioso, até descoberta de moléculas com atuações terapêuticas relevantes tais como, a penicilina, a estreptomicina, a bacitracina, o cloranfenicol, entre outros. Partindo-se desse princípio, a pesquisa da atividade antimicrobiana de extratos, frações e substâncias isoladas pode contribuir para a verificação inicial do espectro antibacteriano de potenciais antibióticos inovadores.

Espécies vegetais presentes na flora, que por vezes, apresentam pouco ou nenhum relato etnofarmacológico, também devem ser inclusas no elenco de estudos biológicos multidisciplinares.

Neste sentido, sabendo-se da inexistência de informações em literaturas técnicas e científicas acerca das atividades químicas e biológicas da espécie *Xylosma ciliatifolium*, devido possivelmente ao diminuto e escasso conhecimento etnobotânico nas localidades onde a flora característica está presente, espera-se com este trabalho contribuir para a pesquisa fitoquímica bem como, para possíveis achados de ordem biológica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a composição fitoquímica e avaliar a atividade alelopática, citotóxica e antibacteriana das folhas e cascas das raízes da espécie *Xylosma ciliatifolium* (Clos) Eichler, Flacourtiaceae (Salicaceae *sensu lato*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar fitoquimicamente as folhas de *X. ciliatifolium*.
- Isolar e identificar os compostos químicos presentes nas cascas das raízes por meio de técnicas cromatográficas e espectroscópicas de análise: IV, CLAE/EM, RMN ¹H e RMN ¹³C.
- Identificar os constituintes químicos do óleo essencial das cascas das raízes por CG-EM.
- Avaliar os efeitos alelopáticos das frações das folhas e cascas das raízes e de substâncias isoladas de *X. ciliatifolium* frente às sementes de *Lactuca sativa*.
- Avaliar o potencial citotóxico das frações das folhas e cascas das raízes e de substâncias isoladas de *X. ciliatifolium* frente ao microcrustáceo *Artemia salina*.
- Avaliar a atividade antibacteriana das frações das folhas e cascas das raízes e de substâncias isoladas de *X. ciliatifolium* frente às cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *S. typhimurium* e *P. aeruginosa*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

As publicações utilizadas para esta revisão de literatura foram obtidas através das bases de dados: Science Direct (1950-2010), Web of Science (1945-2010), Scirus for Scientific Information, Lilacs, CAB Abstracts, entre outros, utilizando-se as palavras-chave referentes à família Flacourtiaceae, gênero *Xylosma* e espécie *X. ciliatifolium*. Até o momento não foram encontrados registros de estudos químicos e biológicos na espécie *X. ciliatifolium* nas referências consultadas.

Uma vez que os dados científicos sobre o gênero *Xylosma* são limitados, buscou-se na elaboração da presente revisão relatar aspectos botânicos gerais da espécie em estudo, bem como, aspectos químicos e biológicos de outros gêneros pertencentes à família Flacourtiaceae para a obtenção de um melhor embasamento teórico.

3.1 ASPECTOS BOTÂNICOS

3.1.1 Família Flacourtiaceae

A família Flacourtiaceae Dumort está representada por aproximadamente 86 gêneros e 1300 espécies (JOLY, 1998), distribuídas nas Américas, África, Ásia, Malásia, Austrália e nas costas do Pacífico, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais da América do Sul (JASZCZERSKI, 1987). De acordo com Cronquist (1981), um menor número de espécies desta família é encontrado nas porções temperadas ora citadas.

Na América do Sul foram catalogados 32 gêneros (JASZCZERSKI, 1987) e, na biodiversidade brasileira, segundo Barroso *et al.* (1978) ocorrem 19 gêneros com 92 espécies.

Recentes estudos sobre a filogenia das flacourtiáceas com base no sequenciamento de plastídios *rbcL* de DNA, mostraram que a família Flacourtiaceae

é polifilética e reconhecida por dois clados principais: um com afinidade junto a Salicaceae e outro com Achariaceae (MOSADDIK *et al.*, 2007a). Esta mudança foi publicada a partir da revisão da classificação de várias plantas pelo The Angiosperm Phylogeny Group (2003).

Em virtude de a família Flacourtiaceae estar inserida no clado das Salicaceae, no presente trabalho, fez-se a descrição do nome da família Flacourtiaceae seguido entre parênteses da denominação Salicaceae *sensu lato*, visto que nas publicações científicas recentes, vários autores (MOSADDIK *et al.*, 2007a) utilizam essa nomenclatura.

3.1.2 Gênero *Xylosma*

De acordo com Jaszczerski (1987), o gênero *Xylosma* tem sua denominação oriunda do grego, XYLON = madeira, lenho e OSMEN = cheiro, odor, aroma, perfume, que tem referência ao aroma do lenho da planta.

O gênero *Xylosma* G. Forster reúne cerca de 100 espécies distribuídas em áreas tropicais e subtropicais da América, Ásia e Austrália. Na flora dendrológica paranaense destacam-se quatro espécies: *Xylosma ciliatifolium* (Clos) Eichler – espécie escolhida para este trabalho, *Xylosma glaberrimum* Sleumer, *Xylosma pseudosalzmannii* Sleumer e *Xylosma prockia* (Turcz.) Turcz. (JASZCZERSKI, 1987).

3.1.3 Espécie *Xylosma ciliatifolium*

A espécie *X. ciliatifolium* é popularmente conhecida como sucará (SOBRAL *et al.*, 2006), açúcará, espinho-de-judeu ou espinho-de-agulha (MARCHIORI, 1997). Entre as sinonímias botânicas da espécie destaca-se: *Hisingera ciliatifolia* Clos (1857), *Myroxylon ciliatifolium* (Clos) Kuntze (1891), *Xylosma pou-orfilae* Herter

(1943), *Xylosma velutinum* auct (1947) conforme citado no trabalho realizado por Jaszczerski (1987).

É encontrada em regiões da Guiana, Venezuela e Brasil (SOBRAL *et al.*, 2006). Os exemplares da espécie no Brasil podem ser encontrados nos estados do Maranhão, Ceará, Pernambuco, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Distrito Federal (JASZCZERSKI, 1987).

A geografia de distribuição da espécie no estado do Paraná tem dados de registros para os seguintes municípios: Balsa Nova, Campina Grande do Sul, Colombo, Curitiba, Ivaí, Laranjeiras do Sul, Marechal Cândido Rondon, Marmeleiro, Palmas, Piraquara, Ponta Grossa, Rio Branco do Sul, São José dos Pinhais e Tibagi (JASZCZERSKI, 1987).

O processo de floração ocorre de agosto até outubro, com predominância em setembro e a frutificação compreende o período de novembro a março (JASZCZERSKI, 1987). O tipo de vegetação para o desenvolvimento da espécie é entre porções de mata ciliar (MARQUETE, 2001). No estado do Rio Grande do Sul, habita principalmente a Floresta Ombrófila Mista e Floresta Estacional Caducifólia do Alto Uruguai (MARCHIORI, 1997). No estado do Paraná, a espécie distribui-se em regiões de altitude que variam de 165 a 1085 metros (JASZCZERSKI, 1987), sendo mais frequente em porções de floresta com araucária (SOBRAL *et al.*, 2006).

Até o momento não existem relatos etnobotânicos em literaturas científicas sobre o uso medicinal da espécie. Os aspectos ecológicos, segundo Marchiori (1997), destacam que a madeira da *X. ciliatifolium* é rija e de cor clara, tendo utilização restrita para uso como lenha ou na fabricação de utensílios, pelo pequeno diâmetro dos troncos.

O enquadramento taxonômico para a espécie *X. ciliatifolium* está apresentado no Quadro 1.

	Segundo CRONQUIST (1981)	Segundo JOLY(1998)
Divisão	Magnoliophyta	Angiospermae
Classe	Magnoliopsida	Dicotyledoneae
Subclasse	Dilleniidae	Archichlamydeae
Ordem	Violales	Violales
Família	Flacourtiaceae	Flacourtiaceae
Gênero	<i>Xylosma</i>	<i>Xylosma</i>
Espécie	<i>X. ciliatifolium</i>	<i>X. ciliatifolium</i>

QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DA *Xylosma ciliatifolium*
 FONTE: O autor (2009)

Os estudos de dendrologia realizados para a espécie caracterizam a mesma como uma árvore pequena (até 12 m) com no máximo 20 cm de diâmetro.

Em 1987, Jaszczerski realizou um levantamento detalhado das espécies da família Flacourtiaceae presentes no Estado do Paraná. De acordo com o autor e atribuições complementares de Marchiori (1997) a espécie *X. ciliatifolium* apresenta as seguintes características botânicas:

- a) O CAULE apresenta ramos com espinhos ramificados e pubescentes com até 15 cm de comprimento.
- b) As FOLHAS são completas, simples, variáveis na forma e tamanho; apresentam de 6 a 10 cm de comprimento por 3 a 5 cm de largura. Margens ciliadas, serreadas ou glandular-dentadas.
- c) As INFLORESCÊNCIAS são do tipo racemoso reunido em fascículos.
- d) As FLORES concentram-se principalmente na porção desfolhada dos ramos, de 3 a 4 mm de comprimento e pedicelos delgados. Cálice com 4 sépalas, ovadas. Corola ausente. Flores masculinas: androceu com 15-25 estames. Flores femininas: gineceu com 3 carpelos de ovário glabro.
- e) Os FRUTOS são com 5 a 6 mm de diâmetro, eucárpicos, arredondados e glabros.
- f) As SEMENTES apresentam endosperma carnoso e abundante, de 3 a 4 por fruto com cotilédones ligeiramente expandidos.

A Figura 1 – A apresenta a árvore da espécie *X. ciliatifolium*. Em detalhe, podem-se visualizar os espinhos axilares presentes no caule. Além disso, as folhas da espécie caracterizam-se por serem inteiras e apresentam a margem do limbo dentada (Figura 1 - B).



(A)



(B)

FIGURA 1 – FOTOGRAFIA DE *X. ciliatifolium* (CLOS) EICHLER, FLACOURTIACEAE (SALICACEAE *sensu lato*). (A) Tronco da árvore com espinhos; (B) Folhas.
FONTE: MIGUEL (2008)

A figura 2 representa a ilustração da espécie *X. ciliatifolium* com seus caracteres botânicos.

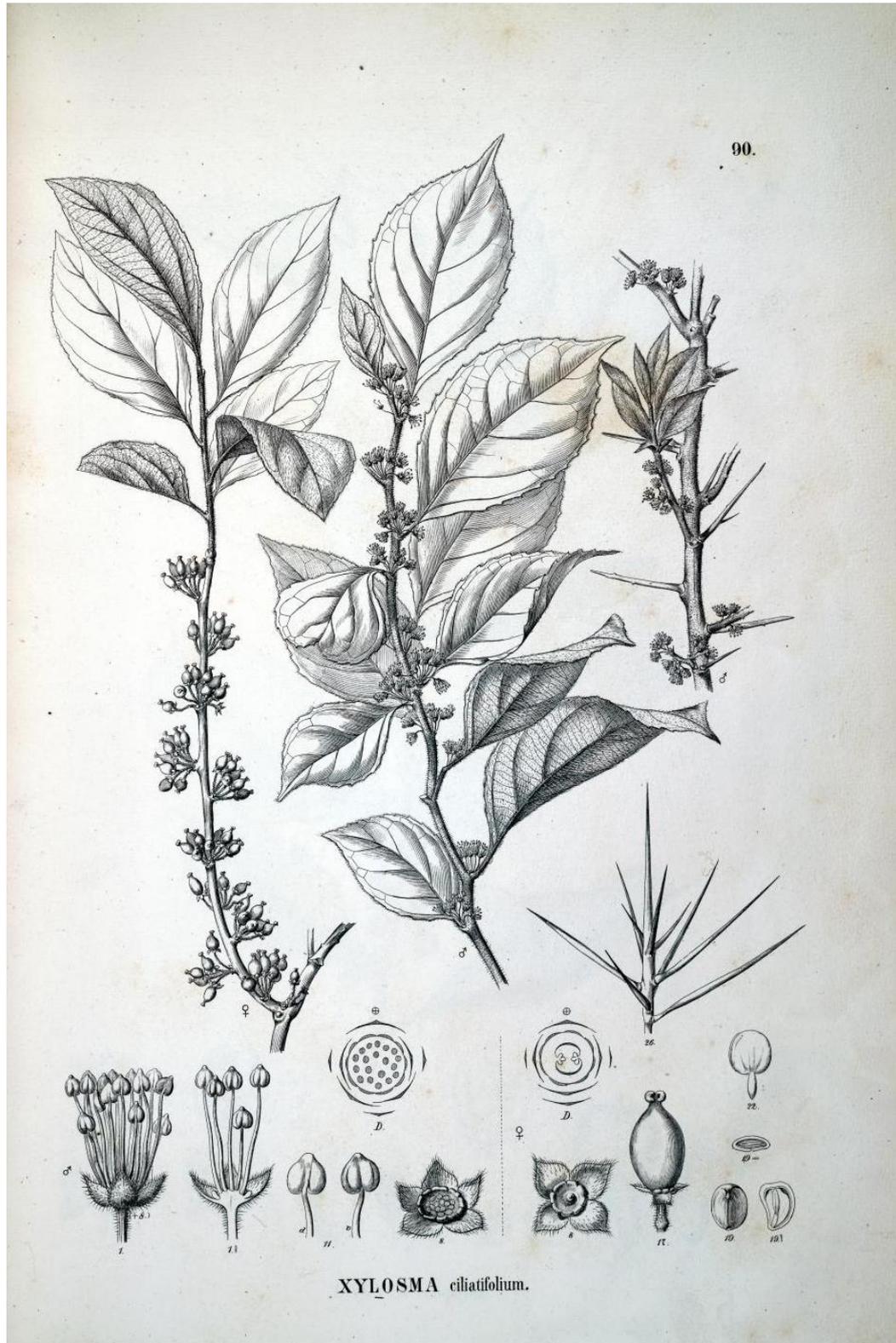


FIGURA 2 – ILUSTRAÇÃO DE *Xylosma ciliatifolium* CLOS (EICHLER)
 FONTE: FLORA BRASILIENSIS (1871)

3.2 ASPECTOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS

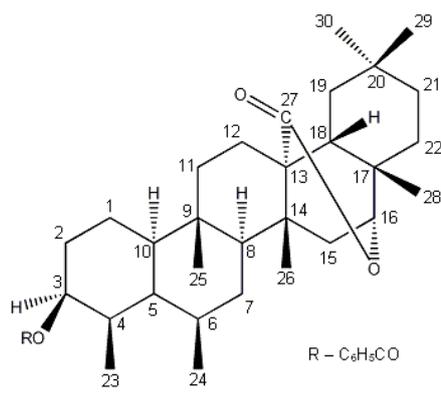
3.2.1 Família Flacourtiaceae

As características fitoquímicas gerais da família apresentam frequentemente proantocianinas e, algumas vezes a produção de alcaloides e pigmentos flavonoides. Quando estes últimos estão presentes, geralmente há a ocorrência de flavonas, mas não de flavonois (CRONQUIST, 1981). Constituintes como glicosídeos aromáticos, lignanas, diterpenos e glicosídeos ciclopentenoides foram também descritos por Xing-Yun *et al.* (2006) como grupo de substâncias presentes na família Flacourtiaceae.

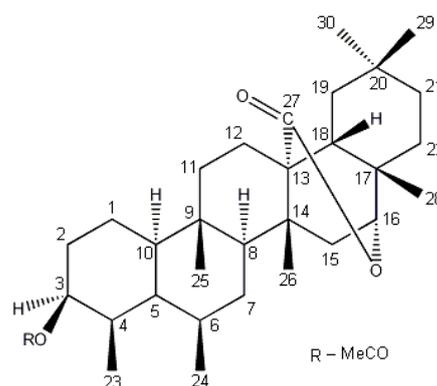
3.2.1.1 Triterpenos

Os pesquisadores Gunasekera, Sultanbawa e Balasubramaniam (1977) relataram a presença de triterpenos a partir de estudos realizados em algumas espécies da família Flacourtiaceae tais como, *Hydnocarpus venenata*, *Erythrospermum zeylanicum*, *Casearia thwaitessi*, *Scolopia schreberi* e *Chlorocarpa pentachista*.

Esta classe de compostos também foi obtida a partir dos caules de *Homalium longifolium*. Dois triterpenos D:A-friedo-oleanatos foram caracterizados como sendo 3 β -benzoil-D:A-friedo-oleanan-27,16 α -lactona (**1**) e 3 β -acetoxi-D:A-friedo-oleanan-27,16 α -lactona (**2**) (SHAARI; WATERMAN, 1996).

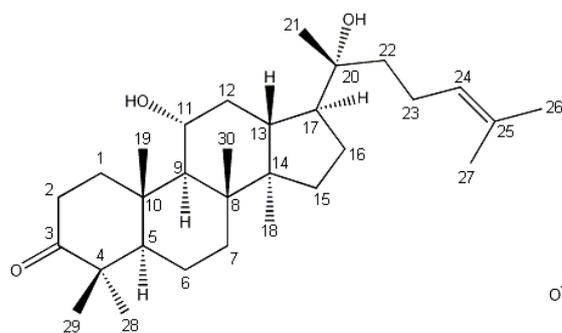


(1)

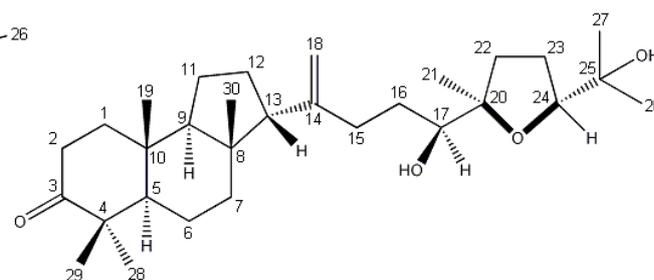


(2)

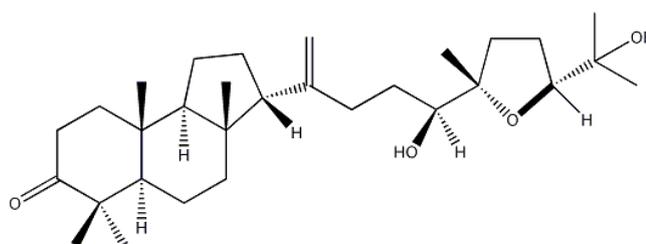
Além destes, os triterpenos dammaranos e malabaricanos inéditos: (11*R*,20*R*)-11,20-dihidroxi-24-dammaren-3-ona **(3)**, (17*S*,20*R*,24*R*)-17,25-dihidroxi-20,24-epoxi-14(18)-malabaricen-3-ona **(4)** e (17*R*,20*S*,24*R*)-17,25-dihidroxi-20,24-epoxi-14(18)-malabaricen-3-ona **(5)** foram isolados das folhas de *Caloncoba echinata* por fracionamento bioquímico e posterior identificação com técnicas espectroscópicas de análise (ZIEGLER *et al.*, 2002).



(3)



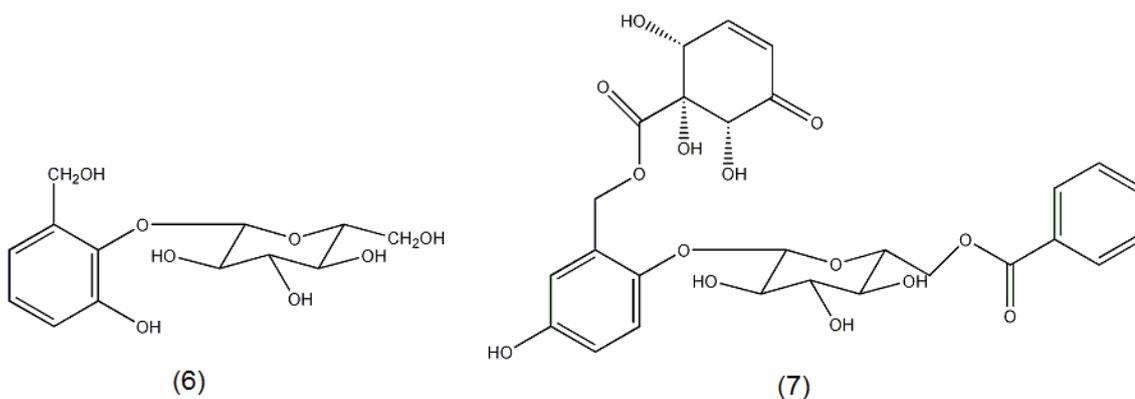
(4)



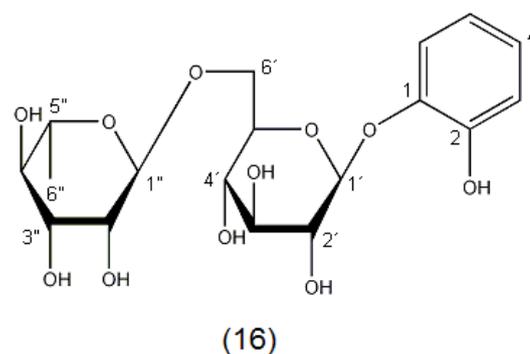
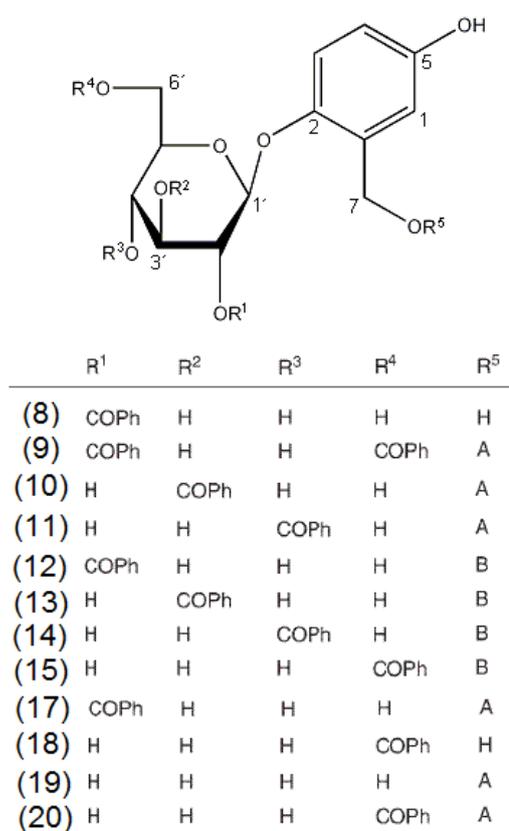
(5)

3.2.1.2 Glicosídeos

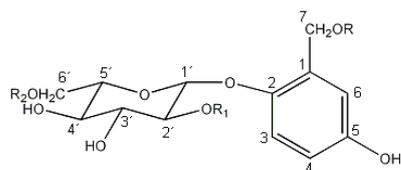
Em estudo realizado com algumas espécies australianas da família Flacourtiaceae (*Casearia costulata*, *Casearia sp.* e *Scolopia braunii*) foram identificados os glicosídeos fenólicos: 2-O-(6-benzoilglucopiranosil)-4-hidroxi benzil álcool **(6)** e (rel)-2-O-(6-benzoilglucopiranosil)-7-O-(1a,2a,6a-trihidroxi-5-oxo-ciclohex-3-enol)-4 hidroxibenzil álcool **(7)** (MOSADDIK *et al.*, 2007b).



Entre as investigações sistemáticas realizadas com os gêneros da família Flacourtiaceae, destacam-se os estudos com a espécie *Itoa orientalis*, que é utilizada na medicina popular chinesa para o tratamento do reumatismo, hepatite e anemia. Chai *et al.* (2007) isolaram 9 novos glicosídeos fenólicos e 4 glicosídeos já descritos na literatura. A inclusão dos radicais: R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ na estrutura química resulta nos diferentes glicosídeos isolados numerados de **(8)** a **(20)**.



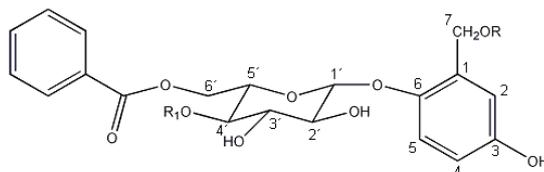
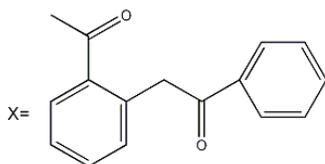
Estudos dos caules e folhas de *Homalium longifolium* resultaram na identificação de 8 glicosídeos inéditos, baseados no esqueleto 2-(β-glucopiranosioxi)-5-hidroxibenzil álcool, representados pelas estruturas químicas numeradas de (21) a (28) (SHAARI; WATERMAN, 1995).



(21) R = X; R₁ = H; R₂ = H

(22) R = X; R₁ = H; R₂ = benzoil

(23) R = X; R₁ = cumaroil; R₂ = benzoil



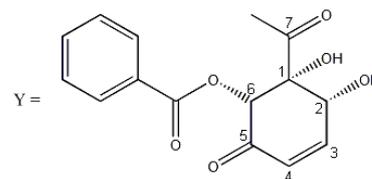
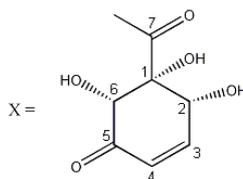
(24) R = H; R₁ = benzoil

(25) R = X; R₁ = benzoil

(26) R = Y; R₁ = H

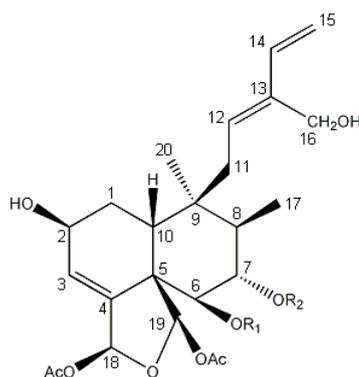
(27) R = X; R₁ = benzoil

(28) R = Y; R₁ = benzoil



3.2.1.3 Diterpenos

A ocorrência de diterpenos clerodanos **(29)** e **(30)** foi relatada ao se investigar a composição química, a partir do extrato clorofórmico das folhas, da espécie *Laetia procera* (GIBBONS; GRAY; WATERMAN, 1996a).

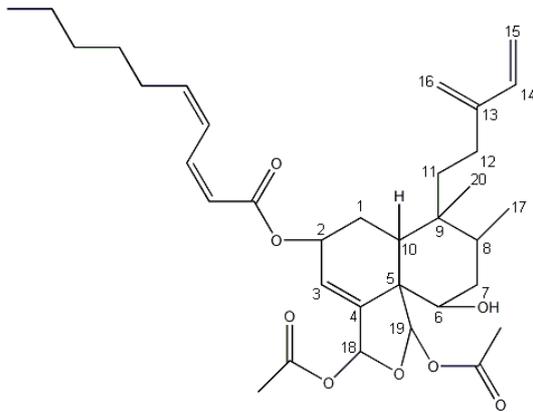


(29) R₁ = Miristoil, Palmitoil; R₂ = H

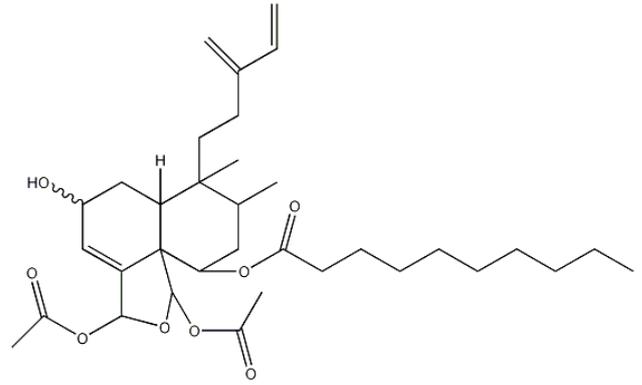
(30) R₁ = H; R₂ = Miristoil, Palmitoil

Do extrato orgânico dos frutos de *Laetia corymbulosa* foram isolados três ésteres diterpenos clerodanos conhecidos como: corymbulosin A **(31)** e corymbulosins B **(32)** e C **(33)**. As estruturas **(32)** e **(33)** diferem na rotação óptica da

molécula. As corymbulosins são substâncias características de outras espécies do gênero *Casearia* como relatado previamente em *C. pitumba* (BEUTLER *et al.*, 2000a).



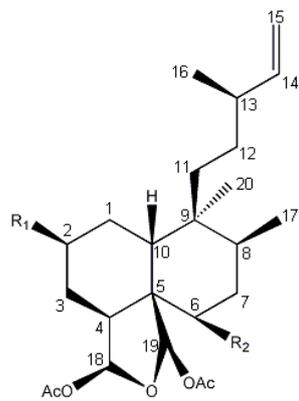
(31)



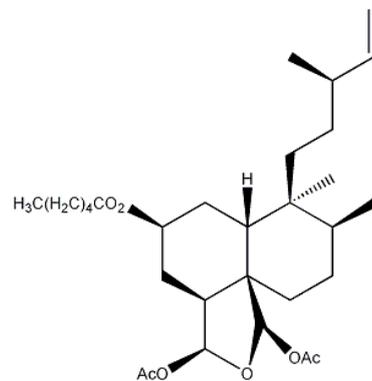
(32) (33)

Nos estudos realizados com diferentes espécies do gênero *Casearia* também tem sido relatada a presença de diterpenos clerodanos.

Gibbons, Gray e Waterman (1996b) isolaram seis novos diterpenos, representados pelas estruturas (34) a (39), a partir das cascas do caule de *Casearia tremula*, espécie encontrada na Costa Rica.

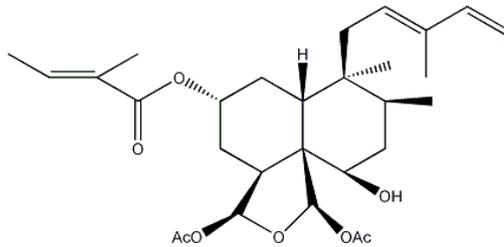


- | R_1 | R_2 |
|---------------------------------------|---------|
| (34) 2(β)-metilbutanoiloxi | metoxi |
| (35) 2(β)-metilbutanoiloxi | H |
| (36) n-ocatonoiloxi e n-undecanoiloxi | hidroxi |
| (37) 2(β)-metilbutanoiloxi | hidroxi |
| (38) 3(β)-hidroxioctanoiloxi | hidroxi |

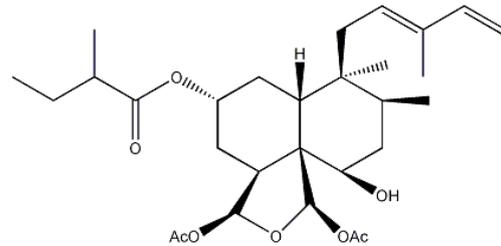


(39)

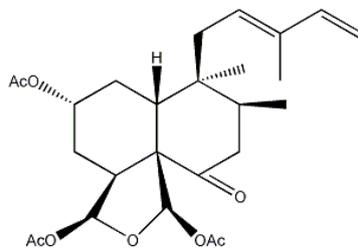
Das folhas de *Casearia guianensis* Which foram identificados 4 diterpenos clerodanos denominados como casearinols A **(40)** e B **(41)** e casearinonas A **(42)** e B **(43)** (HUNTER *et al.*, 1997).



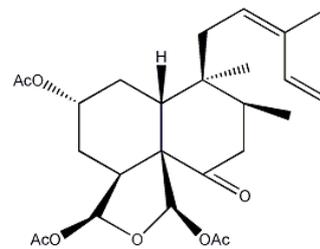
(40)



(41)

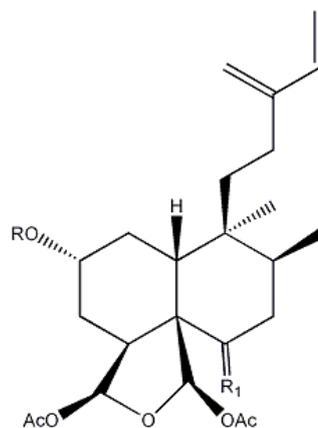


(42)



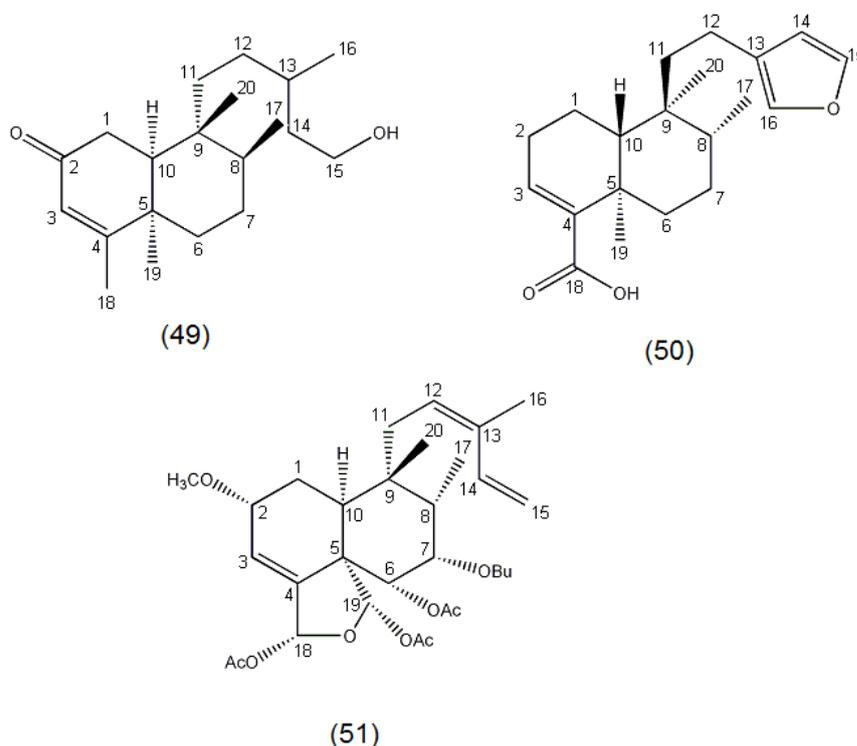
(43)

Em estudos realizados com a espécie *Casearia grewiifolia* var. *gelonioides*, Mosaddik *et al.* (2007b) caracterizaram cinco diterpenos clerodanos representados pelas estruturas **(44)** a **(48)**. Dois destes compostos já haviam sido descritos em trabalhos anteriores e três são isolados inéditos.

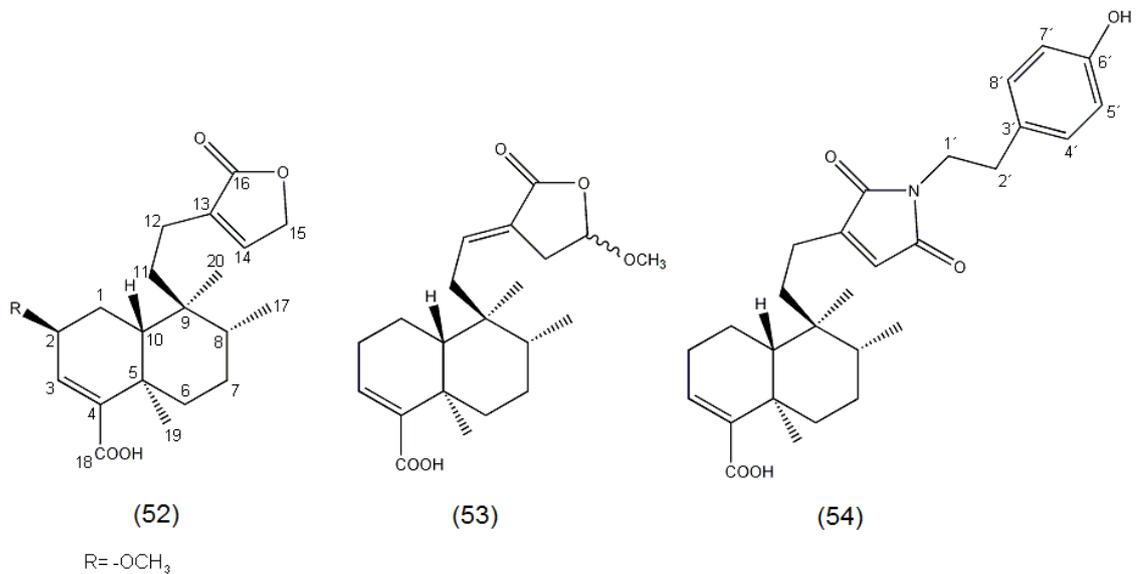


	R	R ₁
(44)	CH ₃ CO	O
(45)	CH ₃ CO	H ₂
(46)	EtCH(Me)CO	O
(47)	Me ₂ CHCO	H ₂
(48)	EtCH(Me)CO	H ₂

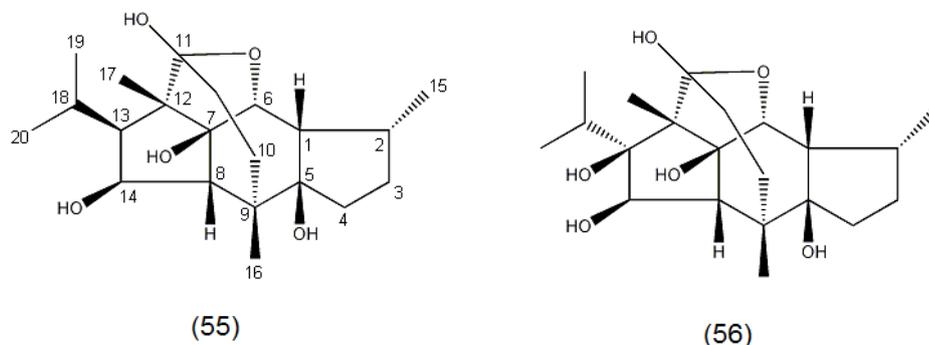
Investigações fitoquímicas das folhas de *Casearia sylvestris* revelaram a ocorrência de diterpenos tricíclicos oxigenados já conhecidos como casearinas B **(49)** e G **(50)** e de compostos novos tal como, 15-hidroxi-3-cleroden-2-ona **(51)** (SANTOS *et al.*, 2007).



Wang *et al.* (2009a) mais recentemente identificaram dois novos diterpenos ao estudar as folhas de *Casearia sylvestris*: 2 β -metoxi-clerodan-3,13-dien-18-carboxi-15,16-olide **(52)** e 15 ξ -metoxi-cleroda-3,12-dien-18-carboxi-15,16-olide **(53)**. Além disso, um terceiro composto da mesma classe contendo um átomo de nitrogênio na molécula foi isolado neste estudo. A substância denominada 15-oxo-echinophyllin A está demonstrada pela estrutura **(54)**.



No estudo recente desenvolvido por Tang *et al.* (2009) foi obtido por fracionamento bioguiado um novo diterpeno isorrianodano, 13-deoxiitol A **(55)** e o isolado já conhecido como itol A **(56)** das sementes de *Itoa orientalis*.



Diterpenos da classe dos clerodanos tem sido alvo de estudos biológicos com potencial terapêutico para o câncer. De acordo com Newman *et al.* (2003), do total de drogas antitumorais disponíveis entre 1940 e 2002, 40% das mesmas foram produtos naturais ou oriundas de produtos naturais e outros 8% foram substâncias sintéticas semelhantes a moléculas de fontes naturais. O quadro 2 descreve alguns dos estudos de citotoxicidade realizados com extratos e compostos isolados de diferentes espécies da família Flacourtiaceae.

ESPÉCIE	EXEMPLOS DE COMPOSTOS COM ATIVIDADE CITOTÓXICA	REFERÊNCIA
<i>Casearia arborea</i>	Casearborins A-E	BEUTLER <i>et al.</i> (2000b)
<i>Laetia corymbulosa</i>	Corymbulosins B and C	BEUTLER <i>et al.</i> (2000a)
<i>Casearia lucida</i>	CasearLucins A-K	PRAKASH; HOCH; KINGSTON. (2002)
<i>Casearia sylvestris</i>	Casearvestrins A-C	OBERLIES <i>et al.</i> (2002)
Screening com várias espécies da família Flacourtiaceae	Extrato metanólico de diferentes partes das plantas	MOSADDIK <i>et al.</i> (2004)
<i>Laetia thamnia</i>	Ácido ent-kaur-16-en-19-oico , ent-3 β hidroxikaur-16-eno, ent-kaur-16-en-3 α ,19-diol, ácido ent-17-hidroxikaur-15-eno-19-oic o	HENRY <i>et al.</i> (2006)
<i>Casearia nigrescens</i>	Caseanigrescens A-D	WILLIAMS <i>et al.</i> (2007)
<i>Casearia sylvestris</i>	Óleo essencial das folhas	SILVA <i>et al.</i> (2008)
<i>Casearia obliqua</i>	Caseobliquins A e B, <i>rel</i> -6 β hidroxizuelanin-2 β -benzoato, <i>rel</i> -2 α hidroxizuelanin-6 β -benzoato	VIEIRA JÚNIOR <i>et al.</i> (2009)

QUADRO 2 - ESTUDOS DE CITOTOXIDADE REALIZADOS COM EXTRATOS E COMPOSTOS ISOLADOS DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA FLACOURTIACEAE.
 FONTE: O autor (2009)

Segundo Xing-Yun *et al.* (2006), as substâncias isoladas ou presentes nos extratos das plantas da família Flacourtiaceae podem ainda evidenciar atividades antibacterianas, antivirais, hipolipêmicas e hipoglicemiantes. Além disso, nas literaturas científicas envolvendo a ação de plantas medicinais, destacam-se estudos de atividades anti-inflamatória e anti-oftálica (RECIO *et al.*, 1995; ESTEVES *et al.*, 2005).

Em estudo realizado com a espécie *Erythrospermum monticolum*, Recio *et al.* (1995) isolaram a partir do extrato metanólico das folhas dois flavonoides: quercetina 3-O-xilosil (1 \rightarrow 2) rhamnosídeo e quercetina 3-O- rhamnosídeo. Ambos os isolados foram ativos contra a inflamação aguda em ratos induzida por 12-O-tetradecanoilforbol acetato, produzindo significativa redução do edema (71% e 62%, respectivamente) na dose de 0,5 mg/orelha.

Esteves *et al.* (2005) ao investigar as atividades anti-úlceras e anti-inflamatória do óleo essencial das folhas de *Casearia sylvestris* relataram uma significativa inibição no edema da pata de rato induzida por carragenina. A substância que

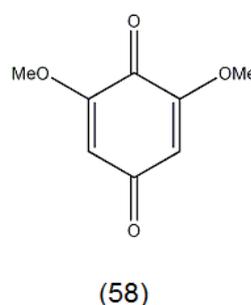
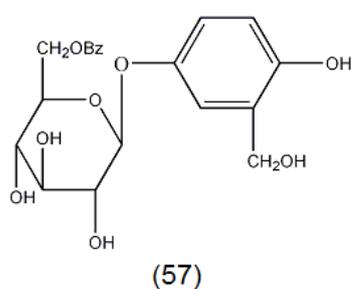
apresentou maior porcentagem no óleo foi o sesquiterpeno biciclogermacreno, cujos dados na literatura sugerem atividades anti-inflamatória e antibacteriana. Ressalta-se que neste estudo obteve-se inibição de 90% no estresse gástrico induzido e 70% para o controle medicamentoso: cimetidina.

O extrato aquoso das folhas de *C. sylvestris* foi estudado por Borges *et al.* (2001) para avaliar a neutralização da atividade hemorrágica, proteolítica e coagulante induzida por venenos de cinco diferentes espécies de cobras. Este trabalho evidenciou que os compostos presentes no extrato promoveram a inibição de proteases.

Em estudo semelhante com a espécie *Casearia mariquitensis* foi relatado que o extrato aquoso das folhas foi capaz de neutralizar as alterações hematológicas sobre eritrócitos quando da indução pelo veneno cru em incubação na proporção de 1:10 (p/p; veneno/extrato) (IZIDORO *et al.*, 2003).

3.2.2 Gênero *Xylosma*

Pesquisas realizadas por Chang *et al.* (1977a) com a espécie *Xylosma velutina* resultaram no isolamento e caracterização do ácido velutínico e alguns de seus derivados. Em estudo complementar, Chang *et al.* (1977b) elucidaram o xilosmacin (metil 3-formil-2,4-dihidroxi-6-metil benzoato) **(57)** e 2,6-dimetoxibenzoquinona **(58)** substâncias isoladas igualmente da espécie *Xylosma velutina*.



Na espécie *Xylosma controversum* encontrada no sul e sudeste da China, Xu e colaboradores (2007) realizaram o estudo fitoquímico que resultou no isolamento

de 12 compostos: glucopiranosídeo, siringaresinol-4,4'-bis-O- β -D-glucopiranosídeo, (β)-catequina, catequina-3-O- β -D-glucopiranosídeo, catequina-5-O- β -D-glucopiranosídeo, 1,3-bis-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-1,3-propanodiol, (R)-(+)-ácido chaulmoogrico, friedelina, uracila, ácido benzoico, ácido vanílico e ácido 4-hidroxi benzoico. Em estudo posterior foram isolados 7 novos glicosídeos denominados de xylocosides A-G (XU *et al.*, 2008).

Algumas patentes foram registradas citando-se o uso medicinal de algumas espécies do gênero *Xylosma*. A espécie *Xylosma japonicum* tem sido estudada acerca de suas atividades biológicas por um grupo de pesquisadores chineses. Diante de tais achados, Yu (1995) fez o registro de uma patente relatando o uso da espécie em associação com outras plantas medicinais, na forma de comprimidos, bem como o seu preparo, para o tratamento e atenuação dos sintomas de vários tipos de câncer.

Em 2000, Jiang depositou a patente do uso do córtex da espécie *Xylosma japonicum* para tratamento de doenças causadas por enterovírus.

Zeng (2008) patenteou a criação de uma cápsula contendo associação de plantas utilizadas na medicina chinesa, incluindo-se a espécie *Xylosma japonicum*, com a finalidade de tratar dores abdominais e diarreias.

Mosaddik *et al.* (2004) realizaram estudos com algumas espécies da família Flacourtiaceae incluindo: *Xylosma terraereginae* e *Xylosma sp.* Nessas pesquisas, as espécies foram avaliadas em relação a estudos de citotoxicidade, atividade antimicrobiana e antioxidante, tendo demonstrado resultados relevantes.

Relato breve de atividades biológicas e terapêuticas foi descrito recentemente para a espécie *Xylosma longifolium* no Indian Medicinal Plants (KHARE, 2007). Nesta publicação, está descrito que a planta exibe atividade antiespasmódica, narcótica e sedativa; sendo que a mesma é popularmente utilizada para casos de disenteria e insônia.

Castro e colaboradores (2008) realizaram um estudo para avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de diferentes extratos de plantas brasileiras contra bactérias patogênicas para peixes. Dentre as espécies avaliadas, as folhas de *Xylosma sp.* II apresentaram inibição do crescimento de *Flavobacterium columnare* com valor de 375 μ g/ml para a concentração inibitória mínima.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A figura 3 apresenta o fluxograma geral da metodologia de extração e fracionamento utilizada para o material vegetal de *Xylosma ciliatifolium*, constituído por folhas e cascas das raízes.

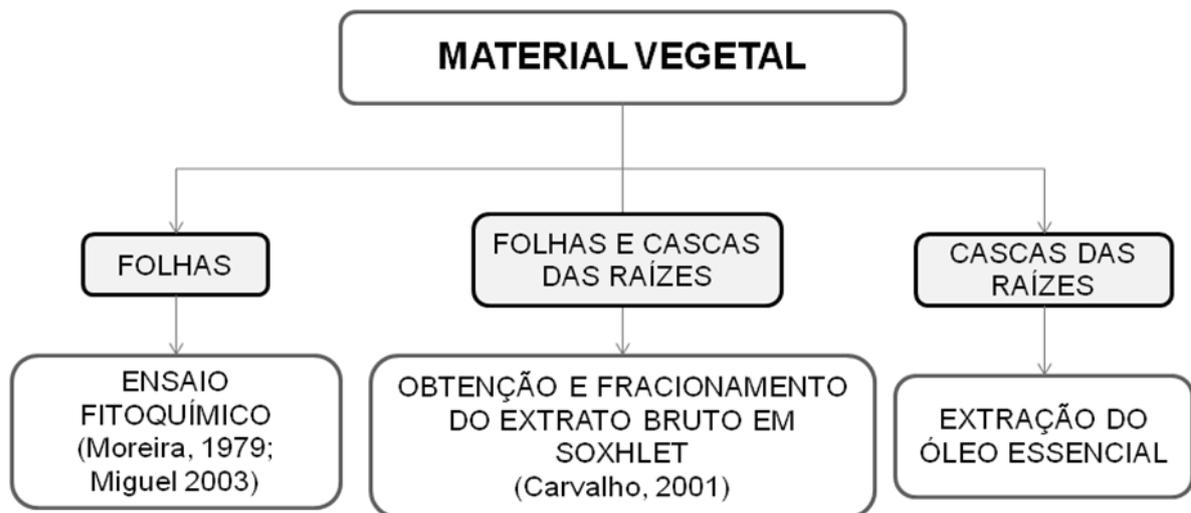


FIGURA 3 - FLUXOGRAMA ILUSTRATIVO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DO MATERIAL VEGETAL DE *X. ciliatifolium*, CONSTITUÍDO DE FOLHAS E CASCAS DAS RAÍZES. FONTE: O autor (2010)

4. 1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Folhas e porções das raízes de *X. ciliatifolium* foram coletadas na localidade de Campo Comprido, Município de Curitiba (coordenadas 25°42' S e 49°27' W), Estado do Paraná, em abril e julho de 2008, respectivamente.

A identificação botânica da espécie foi realizada no Museu Botânico Municipal (MBM) da Prefeitura de Curitiba pelo botânico Gert Hatschbach. A amostra representativa do vegetal coletado foi comparada com a exsicata catalogada no herbário do MBM sob o número 208.965.

4.2 ENSAIOS FITOQUÍMICOS

4.2.1 Caracterização dos grupos fitoquímicos

A identificação qualitativa dos grupos químicos presentes nas folhas da espécie *X. ciliatifolium* foi realizada de acordo com a metodologia desenvolvida por Moreira (1979) e adaptada por Miguel (2003). Os ensaios fitoquímicos das cascas das raízes não foram efetuados pela indisponibilidade de material vegetal.

4.2.1.1 Preparo do extrato hidroalcoólico a 20%

A obtenção do extrato hidroalcoólico a 20% foi realizada a partir da maceração de 40 g do material vegetal seco e estabilizado de *X. ciliatifolium* (folhas), em 200 ml de álcool etílico a 70% v/v. O processo extrativo foi efetuado em banho-maria à 70 °C pelo período de uma hora. Transcorrido esse tempo, o extrato foi filtrado em papel filtro e concentrado a um terço do volume inicial.

O fracionamento sequencial do extrato foi realizado com os solventes orgânicos: hexano, clorofórmio e acetato de etila, nesta ordem de polaridade. Desta maneira, efetuou-se a agitação por 10 vezes com volumes de 20 ml de cada solvente em funil de separação. As porções resultantes tiveram seus volumes completados para 200 ml com os solventes que constituíram aquelas. O resíduo do extrato remanescente teve seu volume completado para 200 ml com etanol.

4.2.1.1.1 Pesquisa de alcaloides

Para a realização deste ensaio utilizaram-se 50 ml de cada fração e as mesmas foram evaporadas à secura, em banho-maria a 70 °C. O resíduo resultante

foi, então, dissolvido em 1 ml de etanol, fazendo-se na sequência a adição de 20 ml de ácido clorídrico a 1%. Cada uma das soluções obtidas foi particionada em 5 tubos de ensaio em porções de 1 ml, tendo como objetivo a pesquisa de alcaloides com os seguintes reativos.

- Reativo de Mayer: reação positiva consiste na formação de precipitado branco ou turvação branca.
- Reativo de Dragendorff: reação positiva é indicada pela formação de precipitado cor vermelho-tijolo.
- Reativo de Bouchardat: reação positiva é indicada pela formação de precipitado alaranjado.
- Reativo de Bertrand: a formação de precipitado branco ou turvação branca indica reação positiva.

4.2.1.1.2 Pesquisa de leucoantocianidinas

Para a realização deste método, foram transferidos para um béquer 10 ml de cada fração. A estas foram adicionadas 5 gotas de ácido clorídrico concentrado e, em seguida, levou para ebulição. A positividade da reação para a presença de leucoantocianidinas é evidenciada pelo aparecimento de coloração vermelha.

4.2.1.1.3 Pesquisa de flavonoides

a) Heterosídeos flavônicos

Fez-se a transferência de 20 ml das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila para cápsulas de porcelana e levou-se à secura em banho-maria. Em seguida, efetuou-se a dissolução do resíduo em 10 ml de etanol. Não houve necessidade de proceder à evaporação da fração hidroalcoólica.

O próximo passo envolveu a transferência de 5 ml de cada fração para tubos de ensaio com a adição consecutiva de 200 mg de limalha de magnésio e 1 ml de ácido clorídrico fumegante pelas paredes do recipiente.

A interpretação dos resultados decorre do desenvolvimento de diferentes colorações. Neste sentido, a formação de cor laranja indica a presença de flavonas, a violácea indica a presença de flavanonas e a vermelha indica a presença de flavonóis.

b) Teste do oxálico bórico ou reação de Taubock

Em cápsulas de porcelana separadas, 10 ml de cada uma das frações foram levadas à secura em banho-maria. Ao resíduo foram adicionados 5 gotas de acetona e 30 mg de uma mistura na proporção 1:1 de ácido bórico e ácido oxálico. Após agitação, o volume foi levado à secura e, ao resíduo fez-se a adição de 5 ml de éter etílico. O conteúdo resultante foi transferido para tubos de ensaio e visualizado sob lâmpada ultravioleta.

A observação de fluorescência indica reação positiva principalmente para flavonóis. As flavanonas e isoflavonas não têm esta propriedade e os derivados antociânicos coram-se, mas não produzem fluorescência.

c) Ensaio de Pacheco

Dez mililitros de cada fração foram colocados em cápsulas de porcelana e levados à secura em banho-maria. O resíduo foi na sequência aquecido em chapa de aquecimento e, ao mesmo, fez-se a adição de alguns cristais de acetato de sódio e 0,1 ml de anidrido acético. A essa mistura, foi acrescentado ainda 0,1 ml de ácido clorídrico concentrado.

O desenvolvimento de coloração roxa indica reação positiva para diidroflavonóis, flavonas, chalconas, auronas e flavonóis e negativa para flavononas.

4.2.1.1.4 Pesquisa de cumarinas

Em cápsulas de porcelana foram adicionados 30 ml de cada fração e, em seguida, acidificados com ácido clorídrico 2N até pH 1. Os volumes foram concentrados em banho-maria até 5 ml.

As alíquotas resultantes foram então passadas para um funil de separação e efetuou-se a extração com duas vezes de 10 ml de éter etílico. Os volumes obtidos foram concentrados novamente em banho-maria até 5 ml.

Do extrato etéreo obtido, foram transferidos 3 ml para tubos de ensaio e a estes foram adicionados 2 ml de hidróxido de sódio N. Os recipientes foram levados à câmara de luz ultravioleta a 366 nm por um período de 15 minutos.

A positividade da reação decorre da formação de fluorescência de coloração azul ou verde-amarelada.

O restante do extrato etéreo obtido foi depositado em papel de filtro sob três pontos previamente marcados com grafite. As manchas 1 e 2 foram tratadas com hidróxido de sódio N. A mancha 1 foi coberta com papel alumínio e, posteriormente, o papel filtro foi colocado na câmara de luz ultravioleta a 366 nm por 15 minutos.

A reação positiva é caracterizada por fluorescência de coloração azul ou verde-amarelada na mancha 2 (tratada e não coberta).

4.2.1.1.5 Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos

O teste foi iniciado com a adição de 30 ml da fração hidroalcoólica e 5 ml de solução aquosa de ácido sulfúrico a 10 % em um balão de fundo chato com capacidade para 250 ml. O balão, então, foi acoplado a um condensador, na qual ficou em refluxo por 30 minutos. Após, o volume foi filtrado ainda quente em papel de filtro. Ao filtrado, fez-se a adição de 30 ml de água destilada e, o conteúdo foi transferido para um funil de separação para realizar a extração com duas alíquotas de 10 ml de éter etílico. Os extratos etéreos resultantes foram concentrados em banho-maria até 5 ml e, posteriormente, foram transferidos para um tubo de ensaio

onde foi realizada a reação de Borntraeger, efetuando-se a adição de 5 ml de solução de hidróxido de amônio e agitando-se de forma lenta.

O desenvolvimento de coloração vermelha na solução alcalina evidencia reação positiva para a presença de naftoquinonas e/ou antraquinonas.

4.2.1.1.6 Pesquisa de esteroides e/ou triterpenos

a) Reação de Liebermann-Burchard

Trinta mililitros de cada uma das frações foram levados à secura em banho-maria. Ao resíduo foram adicionados 5 ml de clorofórmio, fazendo-se a filtração em seguida. O extrato clorofórmico obtido foi pipetado para três tubos de ensaio nos volumes de 0,1 ml, 0,5 ml e 1,0 ml. Todos os tubos tiveram seus volumes completados para 2 ml com clorofórmio.

Em seguida, utilizando-se de uma capela, realizou-se a reação de Liebermann-Burchard, fazendo-se a adição lenta de 1 ml de anidrido acético e 2 ml de ácido sulfúrico.

A observação da formação de cor rósea escura ou azul indica a presença da função carbonila na posição 3 e dupla ligação entre os carbonos 5 e 6. Ainda, a formação de coloração verde indica a presença da função carbonila na posição 3 e ligação dupla nas posições 5 e 6. A ocorrência da formação de cor amarela, provavelmente, indica que a reação é devido à existência de uma metila no carbono 14.

b) Reação de Keller Kiliani

De maneira inicial, fez-se a transferência de 2 ml do extrato clorofórmico para um tubo de ensaio e, levou-se o mesmo à secura em banho-maria. Ao resíduo foram

adicionados 2 ml de ácido acético glacial e 0,2 ml de cloreto férrico a 1%. A mistura foi cuidadosamente transferida para um tubo de ensaio contendo 2 ml de ácido sulfúrico concentrado.

A positividade da reação é observada pelo desenvolvimento de coloração na zona de contato dos sistemas líquidos e/ou coloração na fase acética. A coloração indica a presença de desoxi açúcares, sendo que tonalidade azul é sugestiva para esteroides e tonalidade verde para triterpenos.

4.2.1.2 Preparo do extrato aquoso a 20%

O processo extrativo para a obtenção do extrato aquoso a 20% (m/v) envolveu a maceração de 40 g do material vegetal de *X. ciliatifolium*, seco e estabilizado (folhas), com 200 ml de água destilada em banho-maria a 60 °C, pelo período de duas horas e com agitação ocasional.

4.2.1.2.1 Pesquisa de heterosídeos antociânicos

Este ensaio caracteriza-se pela adição inicial de porções de 5 ml do extrato aquoso em três tubos de ensaio. Ao primeiro tubo foi adicionado ácido sulfúrico N até pH 1 para acidificação do meio; ao segundo, acrescentado hidróxido de sódio até pH 10, com a finalidade de alcalinizar o meio; por fim, no terceiro tubo efetuou-se o ajuste para neutralização do meio (pH=7).

A detecção de diferentes colorações são indicadores da presença de heterosídeos antociânicos.

Concomitantemente, foi verificada a presença de leucoantocianidinas (amarelas) a partir da reação de formação de antocianidinas (vermelhas) da seguinte forma: transferência de 10 ml do extrato aquoso para um funil de separação. Na sequência, fez-se a extração com duas vezes de 10 ml de butanol saturado com água. A reunião das frações de butanol em cápsula de porcelana e

concentração das mesmas ao volume de 5 ml foi a etapa seguinte. Nesta alíquota, foi realizada a adição de 5 gotas de ácido clorídrico concentrado e, posterior, aquecimento até ebulição.

4.2.1.2.2 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Para a obtenção dos dados deste teste foram utilizados os três tubos de ensaio da análise de heterosídeos antociânicos. Desta maneira, cada um dos tubos foi energicamente agitado por 5 minutos e, após, os mesmos foram deixados em repouso por 30 minutos. Transcorrido o tempo, fez-se a medida da espuma formada, em centímetros. A ocorrência de espuma com característica persistente, maior ou igual a um centímetro indica a presença de heterosídeos saponínicos.

4.2.1.2.3 Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos

O ensaio envolveu a adição de 15 ml de extrato aquoso em um tubo de ensaio com posterior inserção de 1 ml de ácido sulfúrico N sem a umectação das paredes do tubo. A etapa seguinte consistiu na suspensão de uma tira de papel picro-sódico na boca do tubo, com o auxílio de uma rolha de cortiça, a fim de que a tira não toque o extrato. O recipiente foi colocado em banho-maria a 60 °C, pelo período de 30 minutos. A presença de heterosídeos cianogenéticos é indicada pelo desenvolvimento de coloração vermelha na tira de papel.

4.2.1.2.4 Pesquisa de taninos

a) Reação com cloreto férrico a 1%

Em um tubo de ensaio foi adicionado 1 ml do extrato aquoso e, após, 5 gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1% foram acrescentadas.

O desenvolvimento de coloração azul é indicativo de reação positiva para taninos hidrolisáveis, verde para taninos condensados e marrom para polifenóis.

b) Precipitação com solução de gelatina a 2,5%

Em 3 tubos de ensaio foram adicionados, respectivamente, 0,5 ml, 1,0 ml e 2,0 ml do extrato aquoso e 2 ml de solução aquosa de gelatina a 2,5%.

A reação é considerada positiva se ocorrer desenvolvimento de precipitado.

c) Reação com formol-clorídrico

Em um balão de fundo chato de 250 ml de capacidade foram adicionados 30 ml do extrato aquoso, 6 ml de formaldeído e 4 ml de ácido clorídrico 37%. O recipiente foi acoplado a um condensador de bolas e o mesmo ficou em refluxo por uma hora. Após o sistema esfriar, o extrato formol-clorídrico foi filtrado e reservado para a pesquisa de taninos hidrolisáveis.

O resíduo da filtração foi lavado com solução alcoólica a 50%. Em seguida, foi efetuado o gotejamento com solução aquosa de hidróxido de potássio 5% sobre o resíduo da lavagem. A observação de coloração verde ao gotejar hidróxido de potássio indica reação positiva para taninos condensados.

Separadamente, ao filtrado reservado foi realizada a adição de excesso de acetato de sódio, sem agitação, e gotas de cloreto férrico a 1%.

A reação positiva para taninos hidrolisáveis é indicada pelo desenvolvimento de coloração azul ao se adicionar cloreto férrico.

4.2.1.2.5 Pesquisa de amino grupos

Em cápsula de porcelana e com auxílio do banho-maria à temperatura de 60°C, o volume de 10 ml de extrato aquoso foi concentrado até 5 ml. Em tira de papel de filtro, foram adicionadas 5 gotas do extrato aquoso concentrado em pontos previamente demarcados. Após secagem, o papel filtro foi nebulizado com solução de ninhidrina e levado à estufa à temperatura de 95-100 °C, por um período de 15 minutos. A reação é considerada positiva se ocorrer o aparecimento de coloração azul violácea.

4.3 EXTRAÇÃO, FRACIONAMENTO E ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS

4.3.1 Folhas

4.3.1.1 Obtenção e fracionamento do extrato bruto etanólico (EBEtOH) das folhas de *X. ciliatifolium*

Folhas secas e moídas (720 g) de *X. ciliatifolium* foram submetidas à extração em aparelho de Soxhlet modificado, durante 6 horas em álcool etílico 96° GL à quente, conforme metodologia descrita por Carvalho (2001).

O EBEtOH foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida (40°C) e obteve-se o volume de 485 ml após a filtração.

Para obter as frações a partir do EBEtOH foi utilizado um aparelho de Soxhlet adaptado semelhante, utilizando solventes em ordem crescente de polaridade. Desta maneira, o fracionamento foi iniciado com hexano, por conseguinte, em clorofórmio e em acetato de etila; obtendo-se, conseqüentemente, a fração hexano (FHEX), a fração clorofórmio (FCLOR) e a fração acetato de etila (FACET).

As frações obtidas foram levadas à secura em banho-maria (40-50°C) e acondicionadas em local seco e fresco.

OBS: Não foi elencada no texto a descrição das cromatografias em coluna realizadas para as frações das folhas, pois não se obteve sucesso no isolamento e purificação dos compostos.

4.3.2 Cascas das raízes

4.3.2.1 Obtenção e fracionamento do extrato bruto etanólico (EBEtOH) das cascas das raízes de *X. ciliatifolium*

Da mesma forma como para o processo extrativo descrito para as folhas no item 4.3.1.1, o EBEtOH das cascas das raízes foi obtido por extração em aparelho de Soxhlet a partir de 290 g de material vegetal. Transcorrido o tempo extrativo, quando o meio já se encontrava à frio, observou-se a formação de um precipitado branco em forma de rosetas no líquido de extração. O extrato foi filtrado a vácuo e o resíduo foi lavado com metanol. O pó branco obtido foi pesado, acondicionado em recipiente ao abrigo da luz, em local seco e fresco e identificado como XC1.

O extrato líquido resultante da filtração foi guardado para o fracionamento sequencial em aparelho de Soxhlet com solventes de polaridade crescente.

As frações das cascas das raízes foram sequencialmente obtidas a partir do EBEtOH com os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila conforme foi descrito para o processo de particionamento das folhas de *X. ciliatifolium*, obtendo-se as seguintes frações: FHEX, FCLOR e FACET.

As frações obtidas foram levadas à secura em banho-maria (40-50°C) e acondicionadas em local seco e fresco.

4.3.2.2 Isolamento do composto XC2 por cromatografia em coluna da fração hexano das cascas das raízes de *X. ciliatifolium*

A montagem da coluna cromatográfica utilizou 55 g de sílica gel 60 com partículas de tamanho entre 70-230 mesh da marca Merck®. A pastilha contendo a

fração hexano das cascas das raízes foi confeccionada com 20 g da mesma sílica utilizada para o empacotamento da coluna.

O sistema eluente utilizado compreendeu, inicialmente, 100% do solvente hexano, tendo como gradiente de polaridade o solvente acetato de etila. A modificação do gradiente consistiu na variação crescente de 5% na relação hexano/acetato de etila até a eluição com 100% de acetato de etila. Porções de aproximadamente 20 ml foram coletadas em frascos de vidro e evaporadas à temperatura ambiente.

Dentro do sistema eluente proposto, obteve-se após a evaporação dos solventes nos frascos, pequenos cristais de coloração amarelo, a partir da subfração 10 a 12, o que correspondeu à relação de 95% hexano/5% acetato de etila. A partir do frasco 13 ao 22 observou-se a formação de cristais alongados transparentes e intensos obtidos da relação do gradiente entre 85-90% de hexano/10-15% de acetato de etila.

As subfrações 13 à 18 foram lavadas com éter de petróleo gelado, homogeneizadas e filtradas em funil sinterizado. O resíduo de cada uma das subfrações foi recolhido, obtendo-se os seguintes rendimentos: 13 = 57 mg; 14 = 60,2 mg; 15 = 64,4 mg; 16 = 78,2 mg e 17/18 = 174 mg.

A fim de se avaliar as características dos eluatos obtidos, procedeu-se a realização de cromatografia em camada delgada dos mesmos, utilizando-se como fase estacionária uma placa de sílica gel 254 nm Merck® e, como fase móvel o sistema constituído pela proporção de 93:7 dos solventes - tolueno: acetato de etila. A detecção dos compostos foi realizada pela visualização com lâmpada ultravioleta (UV: 366 e 254nm) e posterior revelação com vanilina sulfúrica a 1% seguida de aquecimento por 10 minutos.

As subfrações 16-17-18 reunidas por similaridade denominadas como composto XC2 foram utilizadas nas análises de identificação e atividades biológicas.

4.4 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Porções das cascas das raízes secas e trituradas (10 g) foram extraídas em aparelho de Clevenger modificado (figura 4) utilizando-se o método de hidrodestilação durante 6 horas.

O óleo essencial obtido foi acondicionado em recipiente e armazenado em freezer por 24 h para a retirada de água e posterior análise.

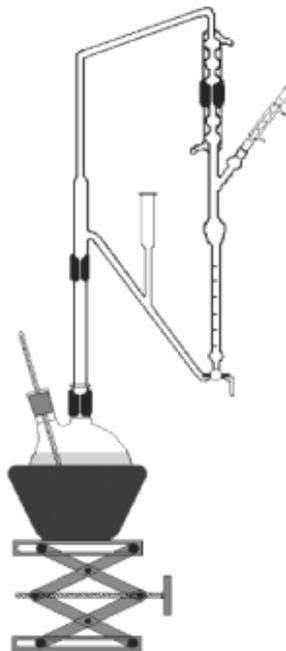


FIGURA 4 - ILUSTRAÇÃO DE UM APARELHO DE CLEVINGER MODIFICADO

Fonte: CUNICO, 2007.

4.5 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Os compostos isolados e o óleo essencial obtido a partir da espécie *X. ciliatifolium* foram identificados por métodos de caracterização e espectroscópicos de análise orgânica.

4.5.1 Faixa de fusão

Para determinar o ponto fusão dos isolados XC1 e XC2 foi utilizado o aparelho manual Wagner & Murs-8 München-2. Este equipamento é composto por um microscópio para a visualização do processo de fusão por meio do aquecimento de um bloco metálico na qual a amostra está colocada sob uma lâmina com recobrimento de uma lamínula.

4.5.2 Infravermelho (IV)

Os espectros de IV dos isolados XC1 e XC2 foram obtidos a partir da utilização do equipamento Bomen – Hartmann & Braum MB-Serie. As amostras analisadas foram incorporadas em pastilhas de KBr na proporção de 1% amostra/KBr na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} .

4.5.3 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN ^1H e ^{13}C)

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C para o isolado XC1 foram obtidos utilizando o equipamento AC 300 Bruker®, com sequências de pulso padronizadas nas frequências de 300 MHz e 75 MHz para ^1H e ^{13}C , respectivamente. Dimetilsulfóxido deuterado foi utilizado como solvente para a amostra.

Para obter os espectros de RMN ^1H e ^{13}C do isolado XC2 foi utilizado o equipamento AC 200 Bruker®, operando com pulsos sequenciais em 200 MHz e 50 MHz para ^1H e ^{13}C , respectivamente. A amostra foi dissolvida em clorofórmio deuterado. Tetrametilsilano foi utilizado como padrão interno nas análises em ambos os equipamentos.

4.5.4 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE/EM)

Os cromatogramas foram obtidos a partir do equipamento Shimadzu, composto de bomba LC-20AD, degaseificador de solventes DGU-20A₃, injetor SIL-LOAHT, forno CTO-20A e detector SPD-20A. Foi empregada coluna cromatográfica Agilent C₁₈ contendo fase reversa (3,0 µm) com dimensões 150 mm x 21 mm. O volume de injeção empregado foi de 4 µl na temperatura de 40 °C. A fase móvel utilizada para a análise do isolado XC1 foi água:metanol (50:50) e para XC2 foi ácido acético:água (50:50).

Os espectros de massa foram obtidos a partir de um detector de massa LCMS 202C por ionização a 70eV com eletrospray (ESI) no modo positivo e negativo e analisador de quadrupolo.

4.5.5 Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)

O óleo essencial obtido das cascas das raízes foi analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM) nas seguintes condições: coluna capilar Chrompack de sílica fundida CP-SIL 5 CB (30 m x 0,25 mm D.I. x 1,00 µm), He como gás de arraste, split 1:50, velocidade linear de 1,0 ml min⁻¹, intensidade de ionização de 70 eV por impacto de elétrons, modulação axial de 6 V, temperaturas de 300°C no injetor, 300°C no detector e na coluna, a temperatura programada de 200-300°C numa taxa de aquecimento de 20°C min⁻¹, permanecendo em 300°C por 10 minutos. Volume de injeção de 0,2-0,5 µl (CUNICO, 2007).

Os compostos foram identificados por meio de pesquisa computacional em biblioteca de substâncias SATURN 2000, índices de retenção, interpretação de espectros de massas e comparação com dados da literatura (ADAMS, 1995) e biblioteca eletrônica NIST (National Institute for Standard Technology – 62.235 compostos).

Para as amostras de *X. ciliatifolium*, obtidas das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila das folhas e cascas das raízes e, o isolado XC2, foram realizadas as seguintes atividades biológicas, conforme esquematizado na figura 5.

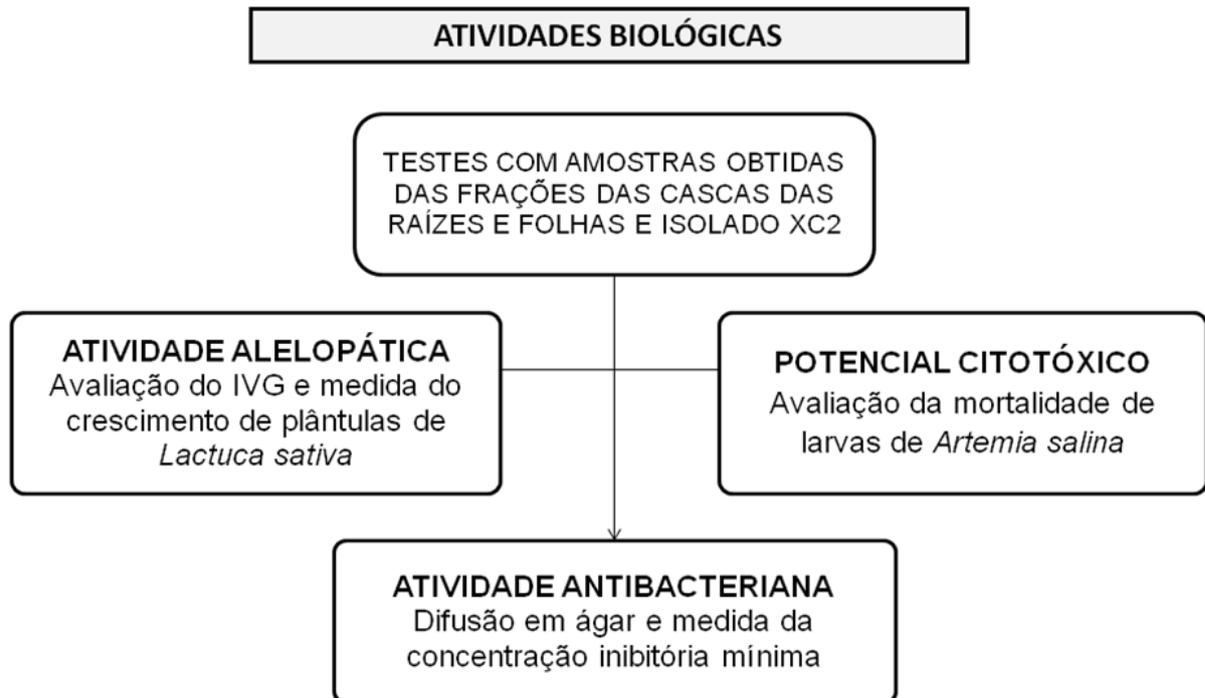


FIGURA 5 - FLUXOGRAMA ILUSTRATIVO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS REALIZADAS COM AS AMOSTRAS OBTIDAS DE *X. ciliatifolium*
 FONTE: O autor (2010)

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

Os ensaios que avaliaram a atividade alelopática das frações de *X. ciliatifolium* tiveram como base a metodologia descrita por Dias *et al.* (2005a).

As amostras das frações e o isolado XC2 foram testadas separadamente em diferentes concentrações para se obter a avaliação das mesmas sobre a inibição ou indução na germinação e no crescimento das sementes de *Lactuca sativa*, cultivar Baba de verão com 96% de germinação analisados através de teste padrão de germinação.

Cada teste foi realizado com quatro repetições de cinco sementes para cada tratamento, considerando-se que cada concentração é um tratamento diferente.

4.6.1 Preparo das amostras

As amostras foram preparadas a partir de uma solução-mãe das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila, obtidas das folhas e cascas das raízes e do isolado XC2, em metanol na concentração de 1mg/ml.

Alíquotas de 100, 200, 400 e 800 µl das amostras foram pipetadas e diluídas em metanol para se obter respectivamente as concentrações de 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8 mg. Fez-se a aplicação uniforme em papel filtro Whatman nº 6 e, após levaram-se os mesmos para a estufa e mantidos a temperatura média de 40 °C, durante 24 horas, para evaporação total do solvente. Todas as diluições foram preparadas em duplicata, para os testes de germinação e de crescimento.

A figura 6 representa resumidamente as etapas para o preparo das amostras acima descritas.



FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO DAS ETAPAS DE PREPARO DAS AMOSTRAS UTILIZADAS PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA
 FONTE: O autor (2010)

4.6.2 Preparo do material

As caixas Gerbox utilizadas nos testes foram previamente lavadas, passadas em solução de hipoclorito diluída e enxaguadas com água. Cada um dos papéis de filtro impregnados com as amostras na sua respectiva concentração foram posicionados nas caixas Gerbox, às quais se fez a adição de 6,5 ml de água destilada e na sequência foram distribuídas 20 sementes de *Lactuca sativa*, em

quatro repetições consecutivas de cinco sementes para cada caixa. A água destilada foi utilizada em quantidade de duas a três vezes o peso do papel. Os controles utilizados consistiram em uma caixa contendo apenas água destilada e sementes, e uma caixa contendo o solvente utilizado para as diluições das amostras nas mesmas condições do experimento.

Os procedimentos acima descritos foram realizados em câmara de fluxo laminar, utilizando-se luvas e máscara a fim de evitar contaminação pelos microrganismos presentes no ar e pela manipulação do operador.

O material preparado e os controles foram protegidos da luz com papel alumínio e colocados em germinador Mangelsdorf (Biomatic), com limites de temperatura entre 20 e 24 °C, conforme especificação do fabricante para esta variedade de *L. sativa*. Este material foi utilizado nos testes de germinação e de crescimento. Para análise estatística dos dados foi utilizado o programa SISVAR (FERREIRA, 2000). A verificação das diferenças das médias estatisticamente significantes foi realizada por meio do Teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade. O teste de Scott-Knott foi escolhido por ser claro, objetivo e isento de ambiguidades (presentes na maioria dos testes de comparações múltiplas). O tratamento é considerado efetivo quando todas as repetições estiveram no mesmo grupo de médias.

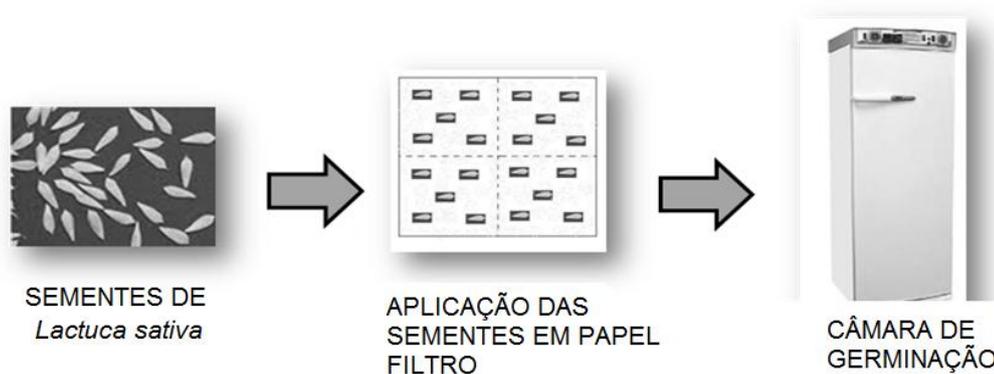


FIGURA 7 – ESQUEMA DE DISTRIBUIÇÃO DAS SEMENTES DE *L sativa* SOBRE O PAPEL FILTRO CONTENDO AS AMOSTRAS
FONTE: O autor (2010)

4.6.3 Teste de Germinação

Foi realizada a leitura diária, necessariamente no mesmo horário, fazendo-se a abertura das caixas em fluxo laminar. As sementes que germinaram foram retiradas diariamente até seis ou sete dias (germinação total). A contagem foi realizada por quadrantes, em sentido horário na caixa de germinação.

Com os dados das germinações obtidas foram calculados os índices de velocidade de germinação (IVG) para cada amostra utilizando-se a seguinte fórmula (Figura 8):

$$IVG = X_1/a + X_2/b + X_3/c + \dots$$

FIGURA 8 – FÓRMULA PARA DETERMINAÇÃO DO IVG
 FONTE: O autor (2009)

Onde: IVG = Índice de Velocidade de Germinação

X_1, X_2, X_3, \dots = Corresponde ao número de sementes germinadas

a, b, c,.. = Corresponde ao dia em que ocorreu a germinação

4.6.4 Teste de Crescimento

O crescimento foi visualizado no sétimo dia do experimento. As caixas Gerbox foram abertas e retiraram-se as plântulas uma a uma para a mensuração da radícula (que origina a raiz) e do hipocótilo (que origina o caule) em papel milimetrado. A figura 9 apresenta a ilustração de uma plântula com as porções do hipocótilo e da radícula em destaque.

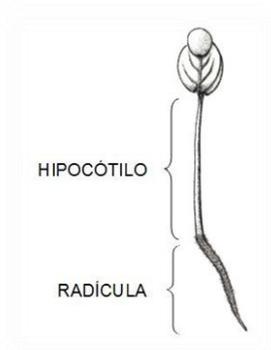


FIGURA 9 - ILUSTRAÇÃO DE UMA PLÂNTULA NO 7º DIA DE CRESCIMENTO
 FONTE: Adaptado de Castro *et al.* (2005).

O quadro 3 descreve a maneira como os tratamentos para o teste de crescimento foram avaliados estatisticamente.

CONCENTRAÇÃO	ORDEM	REPETIÇÃO	TRATAMENTOS
0,1 mg	1	1, 2, 3, 4	11, 12, 13, 14
0,2 mg	2	1, 2, 3, 4	21, 22, 23, 24
0,4 mg	3	1, 2, 3, 4	41, 42, 43, 44
0,8 mg	4	1, 2, 3, 4	81, 82, 83, 84
Controle com água (CA)	5	1, 2, 3, 4	1001, 1002, 1003, 1004
Controle com metanol (CM)	6	1, 2, 3, 4	2001, 2002, 2003, 2004

QUADRO 3 - DESCRIÇÃO DOS TRATAMENTOS PARA ANÁLISE ESTATÍSTICA DA ALELOPATIA
 FONTE: O autor (2009)

4.7 ENSAIO TOXICOLÓGICO SOBRE *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* foi realizado de acordo com a metodologia realizada por Dall'stella (2008).

4.7.1 Preparo da solução salina

A água do mar artificial foi preparada adicionando-se 14,31 g de sal marinho em 400 ml de água destilada (35,7 mg/ml).

O pH foi ajustado para 9,0 com carbonato de sódio para evitar o risco de morte das larvas por diminuição do pH durante a incubação. Um pH superior a 6 é essencial para o desenvolvimento de *A. salina*, e um pH superior a 10,5 deve ser evitado.

4.7.2 Preparo das amostras

O estudo foi realizado com as frações hexano, clorofórmio e acetato de etila de *X. ciliatifolium* obtidas das folhas e cascas das raízes e isolado XC2. As amostras foram obtidas pela diluição das frações em metanol a fim de se obter uma solução mãe com concentração inicial de 10 mg/ml. Desta solução fez-se a transferência de alíquotas de 2,5; 25 e 250 µl com pipeta automática para frascos, correspondendo respectivamente a 10, 100 e 1000 µg/ml, em triplicata. Quando necessário as concentrações teste foram modificadas para adequação ao método estatístico de análise. O solvente foi evaporado utilizando uma estufa em temperatura média de 40 °C pelo período de 24 horas.



FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO DAS ETAPAS DE PREPARO DAS AMOSTRAS UTILIZADAS PARA O ENSAIO TOXICOLÓGICO SOBRE *Artemia salina*
FONTE: O autor (2010)

4.7.3 Eclosão dos ovos

Os ovos de *A. salina* (200 mg) foram colocados em 400ml de solução salina para eclodir por 48 horas sob aeração contínua e expostos à luz diurna. A temperatura foi controlada entre 27 e 30 °C e o pH entre 8-9.



FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO DAS ETAPAS DE OBTENÇÃO DAS LARVAS DE *Artemia salina*
 FONTE: O autor (2010)

4.7.4 Avaliação da toxicidade

Após a eclosão dos ovos, foram transferidas dez larvas de *A. salina* para cada frasco contendo as amostras e para os recipientes controles. Os controles negativos consistiram de frascos com o solvente solubilizador das amostras, no qual foi evaporado em conjunto com os outros recipientes preparados para o teste. O controle positivo utilizado foi sulfato de quinidina. O volume de todos os frascos foi ajustado com solução salina para 2,5 ml.

A contagem das larvas mortas e vivas foi realizada após 24 horas, com auxílio de lupa e iluminação incandescente.

Os dados foram analisados pelo método estatístico Probitos e determinados os valores de DL₅₀ e 95% de intervalos de confiança. De acordo com Meyer *et al.* (1982), os extratos e as frações são considerados ativos quando os valores de DL₅₀ forem menores que 1000 µg/ml.



FIGURA 12 – REPRESENTAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DAS LARVAS DE *Artemia salina* NOS RECIPIENTES CONTENDO AS AMOSTRAS PARA O ENSAIO TOXICOLÓGICO
 FONTE: O autor (2010)

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Para a avaliação da atividade antibacteriana, das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila das folhas e cascas das raízes e do isolado XC2 de *X. ciliatifolium*, foram utilizados dois métodos: difusão em disco e medida da concentração inibitória mínima (CIM).

As cepas puras (*American Type Culture Collection* - ATCC) utilizadas para o estudo foram obtidas comercialmente da marca Newprov®: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

4.8.1 Método de difusão em ágar pela técnica do disco

A metodologia utilizada por Romeiro (2001) descreve o processo de avaliação da atividade antimicrobiana por difusão em ágar pela técnica do disco. Este ensaio avalia o resultado da atividade pela formação de um halo de inibição de crescimento ao redor do disco impregnado com a amostra.

4.8.1.1 Preparo das amostras

As frações e o isolado foram dissolvidos em metanol, obtendo-se uma solução de concentração de 50 mg/ml. A partir desta solução foram obtidas as concentrações teste de 250, 500 e 1000 µg, por disco.

4.8.1.2 Preparo dos discos de papel

Discos de papel estéreis de 6 mm de diâmetro foram impregnados com alíquotas das soluções das amostras obtidas das frações, bem como do isolado XC2. Os discos preparados foram colocados em placas de Petri esterilizadas e identificadas, e levadas à estufa a 40°C por 24 horas para eliminação do solvente residual.

Discos preparados somente com o solvente metanol foram utilizados como controle negativo para todos os microrganismos.

Como padrão de inibição de crescimento foi utilizado discos do antibiótico cloranfenicol 30 µg da marca Newprov®.



FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO DAS ETAPAS DE PREPARO DAS AMOSTRAS, EM DISCOS DE PAPEL, UTILIZADAS PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA
FONTE: O autor (2010)

4.8.1.3 Meio de cultura

O meio Mueller-Hinton (Merck®), utilizado nos ensaios, é considerado o melhor dentre os meios para testes rotineiros de sensibilidade contra bactérias não fastidiosas por permitir crescimento satisfatório de patógenos não fastidiosos e pela existência de um grande acervo de dados e experiência relativos a testes de sensibilidade realizados com esse meio.

O preparo do mesmo foi realizado conforme instruções do fabricante até total dissolução do mesmo sob aquecimento e esterilizado em autoclave a 120 °C por 15 minutos. Para as placas de Petri esterilizadas com dimensões de 25 x 150 mm foram adicionados cerca de 60 ml do meio Mueller-Hinton liquefeito a cerca de 50°C, atingindo uma espessura de aproximadamente 4 mm, após solidificação.

4.8.1.4 Preparo do inóculo

As culturas bacterianas puras foram reativadas caldo trípico de soja e incubadas a 35°C, 24 horas antes do teste de difusão. A suspensão bacteriana foi padronizada fazendo-se a adição de salina estéril em comparação ao padrão de turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland, que corresponde à concentração aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. A escala foi preparada, segundo Bier (1994) adicionando-se 0,5 ml de cloreto de bário a 1% em 99,5 ml de ácido sulfúrico a 1%.

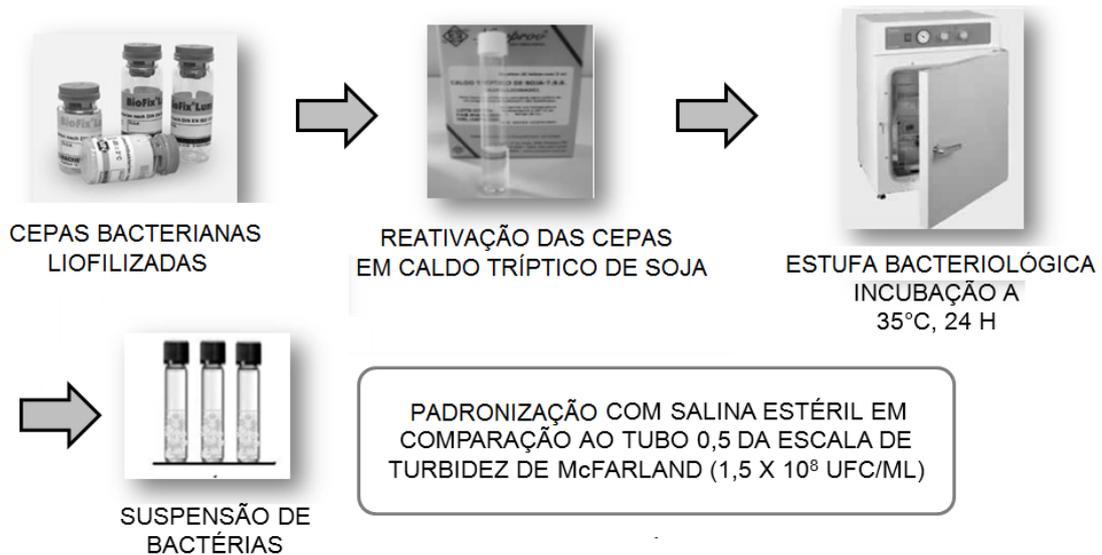


FIGURA 14 – ESQUEMA DE PREPARO DOS INÓCULOS PADRONIZADOS A PARTIR DE CEPAS BACTERIANAS LIOFILIZADAS
 FONTE: O autor (2010)

4.8.1.5 Teste de sensibilidade

Um swab estéril foi mergulhado no inóculo e este foi espalhado por toda a superfície do ágar Mueller-Hinton de maneira uniforme três vezes por rotação da placa a aproximadamente 60° (MAZA; PEZZLO; BARON, 1999). A placa semeada foi deixada em repouso por 3 minutos à temperatura ambiente. Os discos previamente preparados, contendo as amostras em diferentes concentrações das frações e isolado XC2 de *X. ciliatifolium*, foram depositados sobre a superfície do ágar, juntamente com os discos do controle negativo e controle positivo. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 24 horas. O teste foi realizado em triplicata.

Com o auxílio de uma régua milimetrada foi verificada a ausência ou presença de crescimento bacteriano pela formação de halos de inibição, incluindo o diâmetro do disco.

As amostras que apresentaram halos de inibição maiores ou iguais a 7 mm foram considerados ativos e submetidas ao ensaio da determinação da CIM.

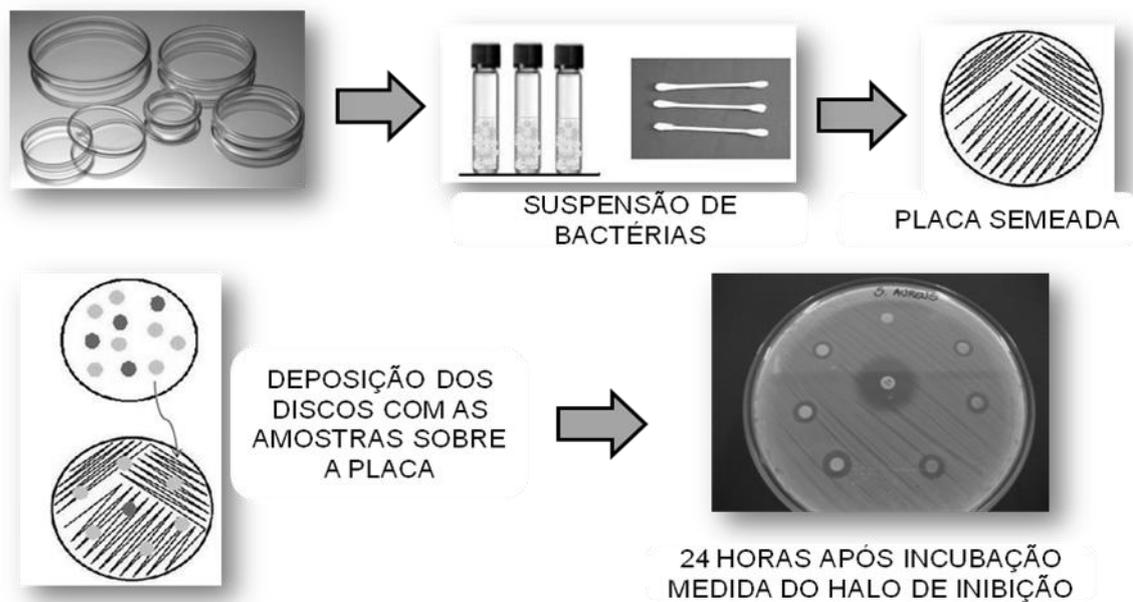


FIGURA 15 – REPRESENTAÇÃO DAS ETAPAS REALIZADAS PARA O TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR PELO MÉTODO DO DISCO
 FONTE: O autor (2010)

4.8.2 Concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM das amostras ativas na técnica da difusão em disco foi efetuada com base no método descrito em Konemann (1993) com algumas adaptações.

4.8.2.1 Preparo do inóculo

As cepas teste (*S. aureus* e *S. epidermidis*) foram repicadas em caldo triptico de soja e incubadas a 35° C, 24 horas anteriormente ao ensaio. Transcorrido o período, os tubos contendo os inóculos foram padronizados em comparação com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland.

Dos tubos contendo os microrganismos e o caldo triptico de soja, foram retirados 2 ml. Este volume foi transferido para um enlermeyer contendo 100 ml de uma solução estéril de Tween 80 a 2% em água destilada.

4.8.2.2 Preparo das amostras e teste da CIM

Para cada amostra foram preparados nove tubos: do primeiro ao sétimo foram realizadas diluições nas seguintes proporções: 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64 em concentrações que variaram de 500 a 7,8 µg/ml. Cada tubo recebeu 1 ml da suspensão de bactérias. O oitavo tubo foi usado como controle positivo em que foi colocado apenas a suspensão de bactérias e o caldo sem a amostra teste. O tubo nove foi usado como controle negativo na qual não foi colocado a suspensão de bactérias, apenas o caldo e a amostra. Este procedimento foi realizado em duplicata e em fluxo laminar. Os tubos foram incubados em estufa a 35°C durante 24 horas.

O último tubo em que a amostra inibe o crescimento de microrganismos, visualmente comparado ao controle negativo, é considerado a CIM (KONEMANN, 1993).

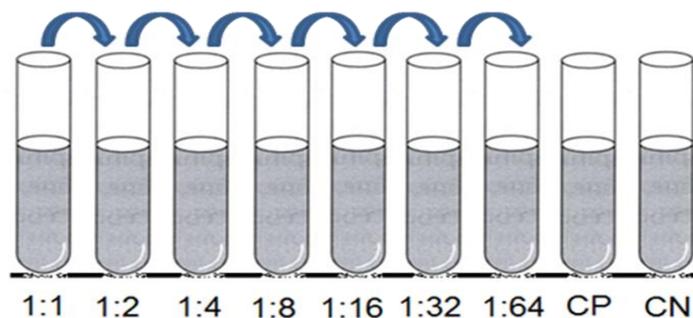


FIGURA 16 – REPRESENTAÇÃO DO PROCESSO DE DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS EM CALDO TRÍPTICO DE SOJA PARA A MEDIDA DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA
FONTE: O autor (2010)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIOS FITOQUÍMICOS

As tabelas 1 e 2 apresentam os resultados obtidos a partir dos ensaios fitoquímicos de carácter qualitativo para o material vegetal constituído das folhas de *X. ciliatifolium*.

TABELA 1 – RESULTADOS DOS ENSAIOS FITOQUÍMICOS PARA AS FRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *X. ciliatifolium*

ENSAIOS	FRAÇÃO			
	Fração Hexano	Fração Clorofórmio	Fração Acetato de Etila	Fração Hidroalcoólica
<i>Alcaloides</i>				
Mayer	-	-	-	-
Dragendorff	-	-	-	-
Burchardat	-	-	-	-
Bertrand	-	-	-	-
<i>Leucoantocianidinas</i>	-	-	+	-
<i>Flavonoides</i>				
Heterosídeos	-	-	+	-
Oxálico-Bórico	-	-	-	-
Ensaio de Pacheco	-	-	-	-
<i>Cumarinas</i>	-	-	-	-
<i>Antraquinonas</i>	-	-	-	-
<i>Esteroides/Triterpenos</i>				
Liebermann-Burchard	+	+	-	-
Keller-Keliani	+	+	-	-

FONTE: O autor (2009)

Legenda: (+) positivo; (-) negativo.

A visualização de cor vermelha foi detectada para a fração acetato de etila na pesquisa de leucoantocianidinas, sugerindo a presença de tais compostos nesta amostra.

A positividade da reação para heterosídeos flavônicos foi visualizada pela formação de cor marrom, característica da presença de compostos polifenólicos.

Na pesquisa de esteroides e triterpenos foi observada coloração verde após a realização da reação Liebermann-Burchard, que é indicativo da presença de esteróides.

TABELA 2 - RESULTADOS DOS ENSAIOS FITOQUÍMICOS COM O EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *X. ciliatifolium*

ENSAIOS	RESULTADOS
<i>Heterosídeos antociânicos</i>	-
<i>Heterosídeos saponínicos</i>	-
<i>Heterosídeos cianogenéticos</i>	-
<i>Pesquisa de taninos</i>	
Cloreto férrico a 1%	+
Gelatina 2,5%	-
Formol-clorídrico	-
<i>Aminogrupos</i>	+

FONTE: O autor (2009)

Legenda: (+) positivo; (-) negativo.

A obtenção de cor marrom na reação do extrato aquoso com solução de cloreto férrico a 1% indicou a presença de taninos polifenólicos.

O resultado positivo para o teste de aminogrupos foi confirmado a partir da detecção da coloração azul em cromatoplaça quando da realização do teste.

5.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

5.2.1 Rendimento do processo de extração e fracionamento

Do material vegetal constituído por folhas (720g) foram obtidos 485ml de EBEtOH.

Do fracionamento do EBEtOH das folhas foram obtidas as frações com os seguintes rendimentos: FHEX (2,350 g), FCLOR (10,075 g) e FACET (31,425 g).

A extração das cascas das raízes (290g) rendeu 230 ml de EBEtOH.

Do particionamento do EBEtOH das cascas das raízes (175ml) foram obtidos os seguintes rendimentos para as frações: FHEX (15,866 g), FCLOR (8,120 g) e FACET (3,180 g).

Amostras de cada uma das frações foram utilizadas para as avaliações biológicas.

5.3 PRODUTOS ISOLADOS E IDENTIFICAÇÃO

Dois compostos foram isolados por meio do processo extrativo e de particionamento das cascas das raízes de *X. ciliatifolium*. A massa obtida para ambos os compostos estão descritas na tabela 3.

TABELA 3 - SUBSTÂNCIAS OBTIDAS DAS CASCAS DAS RAIZES DE *X. ciliatifolium*

ISOLADOS	MASSA
XC1 Precipitado obtido no extrato bruto etanólico	4,166 g
XC2 Precipitado das subfrações 16/17/18 obtidas da fração hexano	252,2 mg

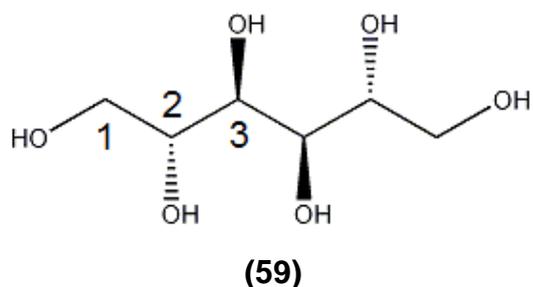
FONTE: O autor (2009)

5.3.1 Composto XC1

Este composto foi obtido na forma de um precipitado em formato de rosetas em etanol 96 °GL à quente, que após a filtração caracterizou-se por um pó branco amorfo. A faixa de fusão obtida foi de 164-167 °C.

A análise por CLAE/EM apresentou íon molecular m/z ($[M^{\bullet}]$ 181; ($[M^{\bullet+}]$ 183).

Comparando-se os dados de ponto de fusão (OLIVEIRA; FERREIRA; SOUZA, 2009), peso molecular (182 u.m.a) e espectros de massas obtidos neste estudo, com os descritos na literatura, propôs-se para o composto XC1 a estrutura do manitol (**59**).



O cromatograma e os espectros de massas do manitol estão ilustrados nas figuras 17 e 18. A sobreposição de sinais visualizados no perfil cromatográfico permite concluir que o manitol isolado a partir da espécie *X. ciliatifolium* apresenta pureza compatível ao padrão utilizado na análise.

Além disso, pode ser observado que os dados espectrais de massas para o composto (manitol) apresenta valores de picos de íon molecular bem definidos, tanto no modo positivo quanto no negativo, pela análise realizada em eletrospray, o que corrobora com o seu peso molecular de 182 unidades de massa atômica.

A presença de outras absorções no espectro de massas auxiliou na identificação do composto manitol e, os mesmos são classificados como adultos obtidos do somatório das massas com átomos como de sódio e potássio, por exemplo.

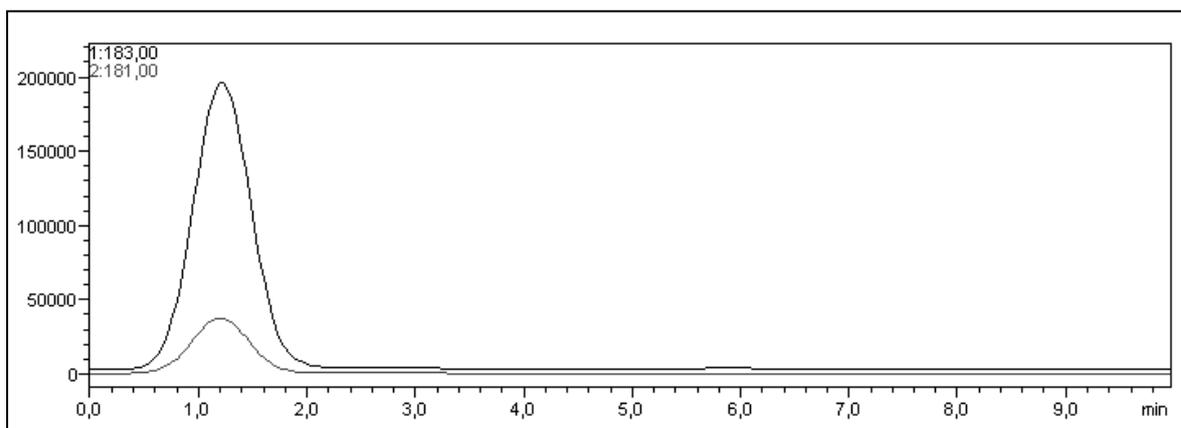
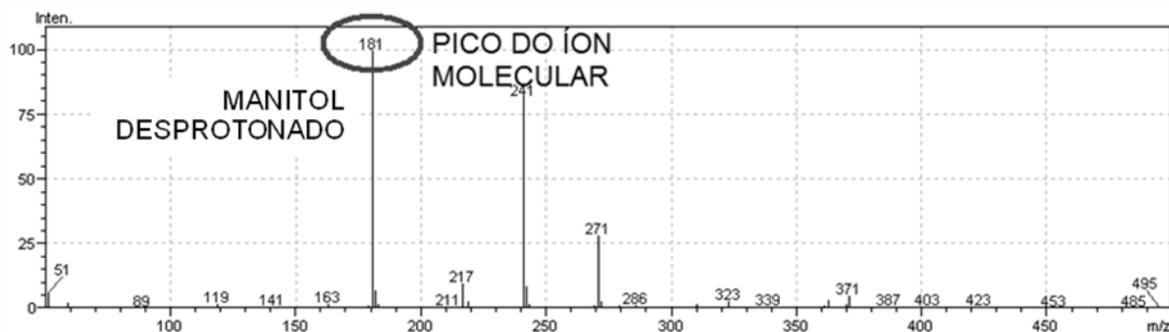
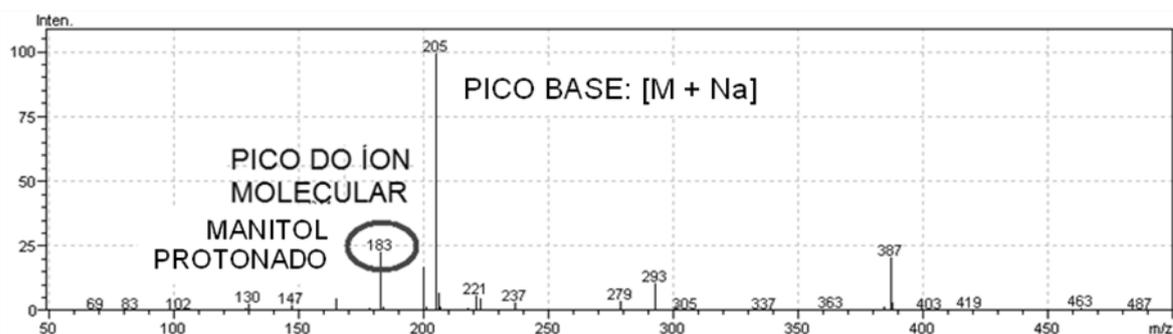


FIGURA 17 - CROMATOGRAMA DO MANITOL
 FONTE: O autor (2010)



(A)



(B)

FIGURA 18 - ESPECTRO DE MASSAS DO MANITOL OBTIDO POR ELETROSPRAY. (A) MODO NEGATIVO m/z 181 = $[M-H]$ (manitol desprotonado); m/z 241 = $[M+CH_3-COO]$ (adulto com acetato). (B) MODO POSITIVO (m/z 183 = $[M+H]$ (manitol protonado); m/z 205 = $[M+Na]$ (adulto com sódio); m/z 221 = $[M+K]$ (adulto com potássio); m/z 387 = $[M+2 Na]$ (adulto com 2 sódios). FONTE: O autor (2010)

A estrutura do composto foi confirmada adicionalmente por meio da análise dos espectros de IV (figura 19) e RMN ^{13}C (figura 20) com dados descritos na literatura (PAULA *et al.*, 1998).

O espectro de IV apresentou absorção axial intensa de O-H em 3396 e 3286 cm^{-1} indicando um composto polidroxilado. As absorções em número de onda de 2900 cm^{-1} são referentes a deformação axial de C-H e, em 1080 e 1020 cm^{-1} a deformação axial característica de C-O.

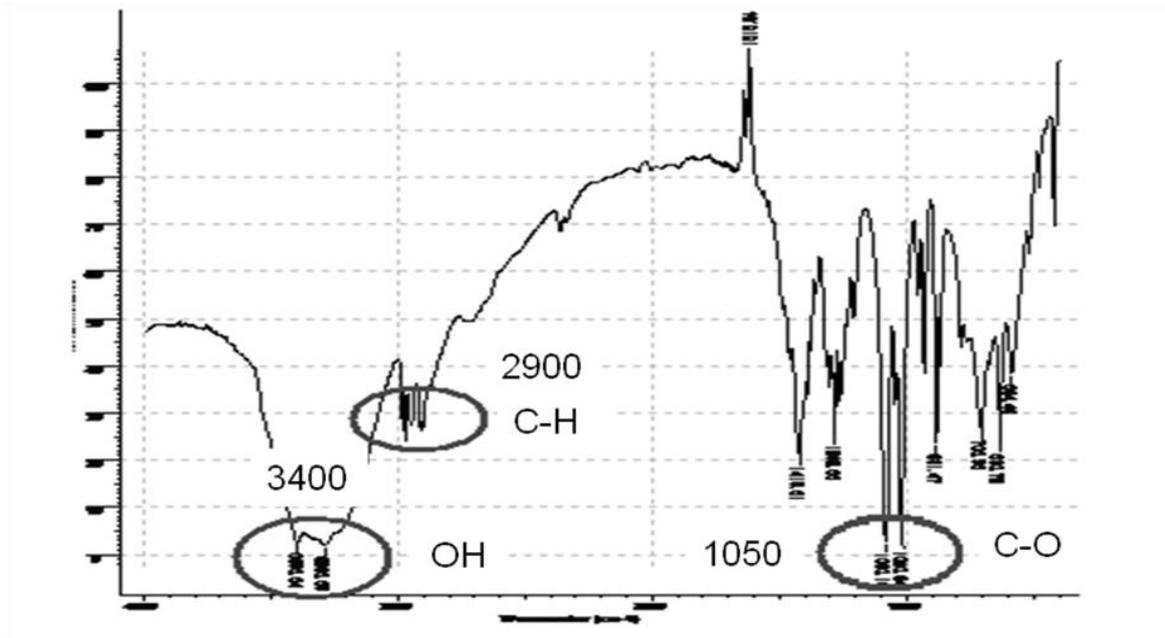


FIGURA 19 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO COMPOSTO XC1

O espectro de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75 MHz, DMSO-d_6 , ppm) para o mesmo composto apresentou apenas 3 sinais de carbonos com os seguintes deslocamentos químicos: δ 63,917 (CH_2 , C-1), δ 69,487 (CH, C-2) e δ 71,336 (CH, C-3). Estes sinais foram compatíveis com os descritos na literatura (PAULA *et al.*, 1998).

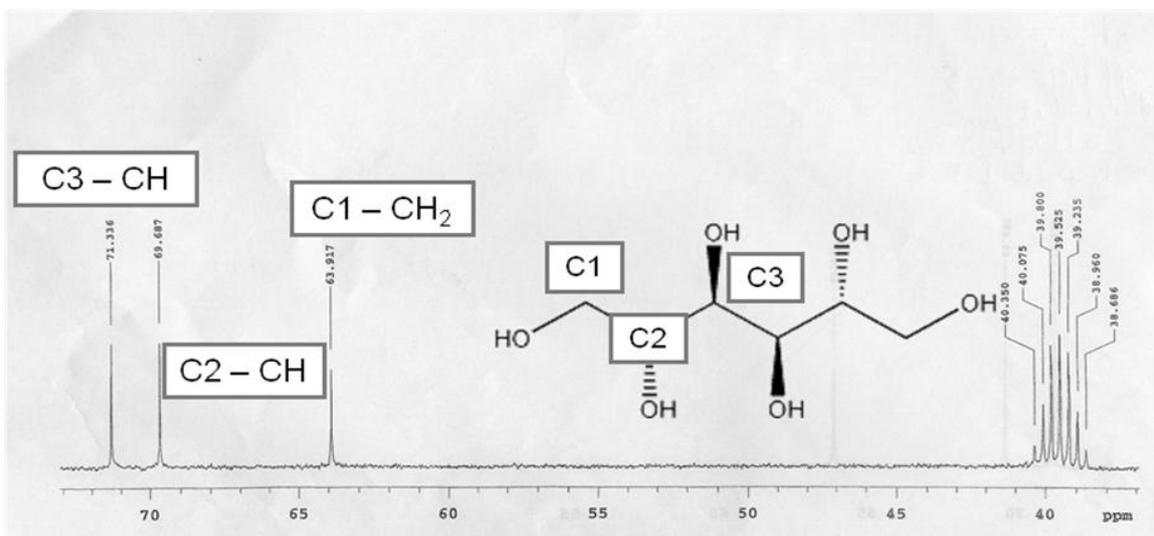


FIGURA 20 – ESPECTRO DE RMN ^{13}C PARA O COMPOSTO XC1 (75 MHz, DMSO-d_6)

Os polióis, como o manitol, são considerados compostos de reserva formados durante o processo fotossintético e transportados pelo floema em plantas superiores

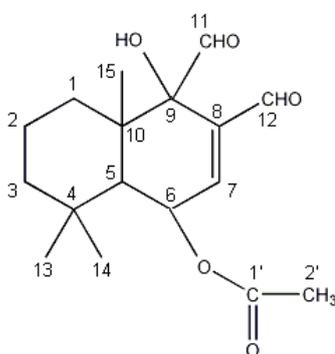
tendo a função de agente osmorregulador (LEITE *et al.*, 2008) quando as mesmas estão expostas a situações de estresse (WISSELINK *et al.*, 2002).

O manitol é encontrado em cerca de 50 famílias e é provavelmente o poliol mais amplamente distribuído na natureza (SEIGLER, 2002). Apresenta diferentes aplicações gerais para fins comerciais e científicos como na síntese orgânica de substâncias biologicamente ativas, utilização na medicina como diurético osmótico e como insumo para a indústria farmacêutica e alimentícia (OLIVEIRA; FERREIRA; SOUZA, 2009).

5.3.2 Composto XC2

O isolado XC2 foi obtido na forma de um pó branco cristalino da reunião das sub-frações 16/17/18. Solúvel em clorofórmio e acetato de etila. A faixa de fusão encontrada foi de 136-140°C.

A estrutura do composto foi sugerida com base nas informações obtidas dos espectros de IV, EM, RMN ^1H e ^{13}C e RMN 2D (HBMC) em comparação com dados espectroscópicos de substâncias estruturalmente semelhantes aos sesquiterpenos dialdeídos da classe dos drimanos. Propôs-se, desta maneira, para o composto XC2 a estrutura do ugandensidial ou cinamodial (PM 308), com a denominação genérica de 6-acetoxi-9-alfa-hidroxdrim-7-eno-11,12-dial **(60)**.



(60)

O espectro de IV (Figura 21) apresentou bandas de absorção de deformação axial de O-H em 3431 cm^{-1} , estiramento de grupos metila em 2947 , absorção de

deformação axial C-H de grupamento aldeído em 2873 e 2748, deformação axial de C=O de carboxila em 1745 e 1718, deformação axial de C=C em 1693, deformação axial de C-O em 1462, deformação angular fora do plano de O-H em 945.

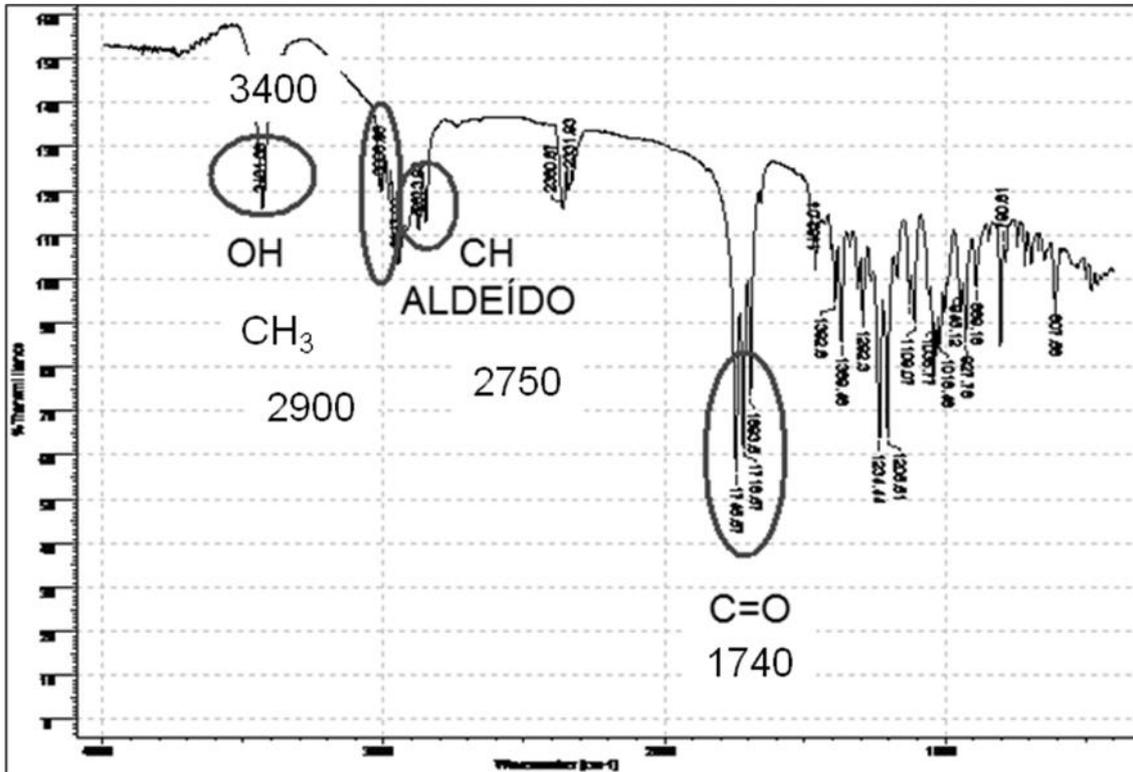


FIGURA 21 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO COMPOSTO XC2

No modo positivo, o espectro de massas (Figura 22) para o isolado XC2 exibiu o pico base em m/z 279, resultante da perda de 29 unidades de massa, relacionado a um dos grupamentos aldeído presentes na molécula.

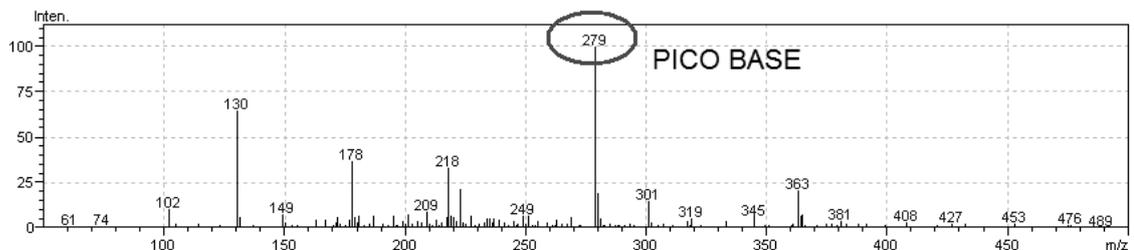


FIGURA 22 - ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO XC2 OBTIDO POR ELETROSPRAY. MODO POSITIVO m/z 279 = $[M-CHO]$

As informações espectrais de RMN ^1H e RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ 135 (Figuras 23, 24 e 25) estão dispostas na tabela 4. A completa atribuição dos sinais de RMN foi baseada nas correlações a longa distância entre hidrogênios e carbonos: HMBC (correlação heteronuclear $^1\text{H}-^{13}\text{C}$) (tabela 5).

A análise dos espectros de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ 135 revelaram 17 sinais de carbono, sendo 4 sinais atribuídos a grupos metila (δ 19,93, δ 21,46, δ 24,74, δ 32,57), 3 a grupos metileno (δ 17,67, δ 31,80, δ 44,00), 5 a grupos metino (δ 44,93, δ 66,05, δ 148,66, δ 193,06, δ 201,15) e 5 a carbonos quaternários (δ 34,00, δ 41,63, δ 77,33, δ 140,94, δ 170,07).

Os sinais em δ_{H} 9,5 e δ_{H} 9,78 foram atribuídos a dois grupamentos aldeído que também foram confirmados pelos sinais das carbonilas em δ_{C} 193,06 e δ_{C} 201,15, no espectro de RMN ^{13}C .

A informação de que a absorção de H-6 em δ 5,91 (triplete) mostrou conectividade com C-5, C-7, C-8, C-10 e C-1', juntamente com os dados dos deslocamentos em δ_{C} 21,43 ($-\text{CH}_3$) e δ_{C} 170,07 ($-\text{COO}$) sugeriu a presença de um grupamento acetato localizado na posição C-6.

Os sinais em δ 148,66 e δ 140,94 característicos de ligação dupla, constituem os carbonos C-7 e C-8, respectivamente. As correlações a longa distância suportadas por H-7 permitem afirmar que a molécula apresenta a função dialdeído α , β insaturada, característica de esqueletos drimânicos.

Além disso, foi possível atribuir mais uma função oxigenada (hidroxila) para o carbono quaternário em C-9 com sinal em δ 77,33 (WUBE *et al.*, 2005).

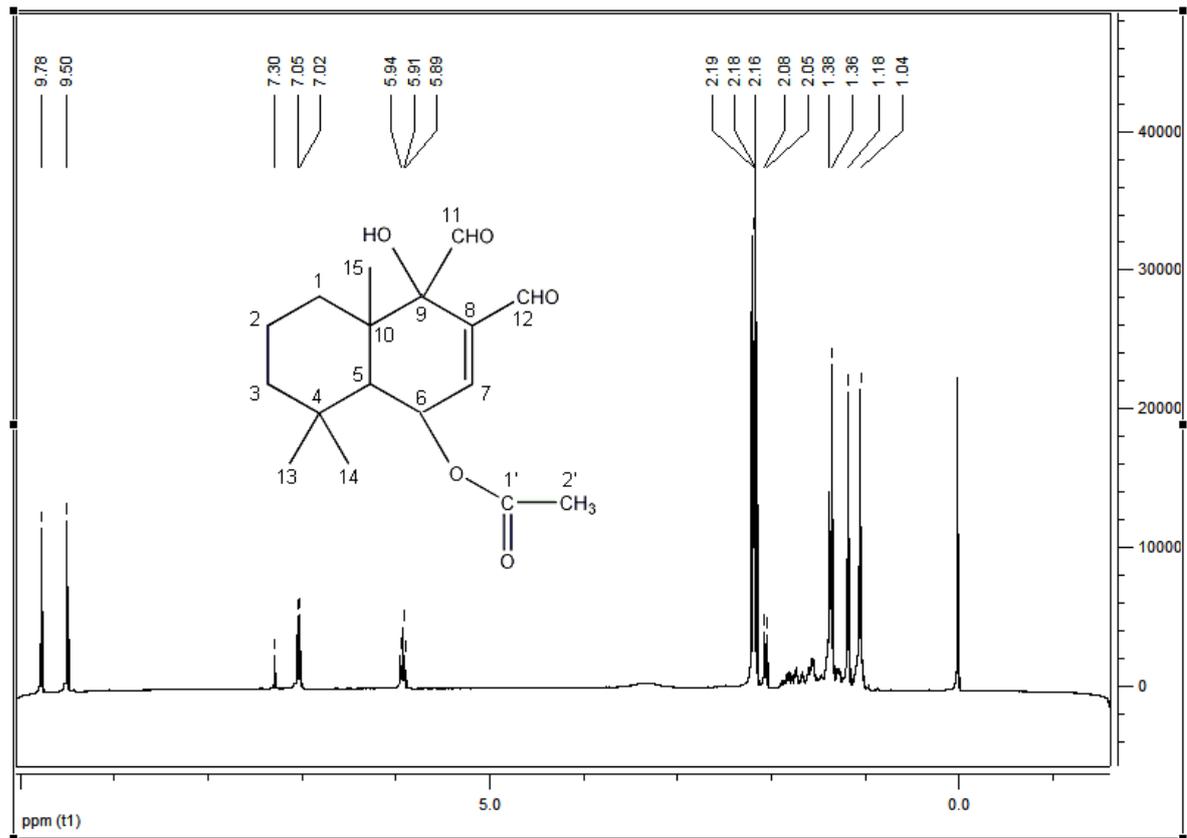


FIGURA 23 – ESPECTRO DE RMN ^1H DO COMPOSTO XC2 (200 MHz, CDCl_3)

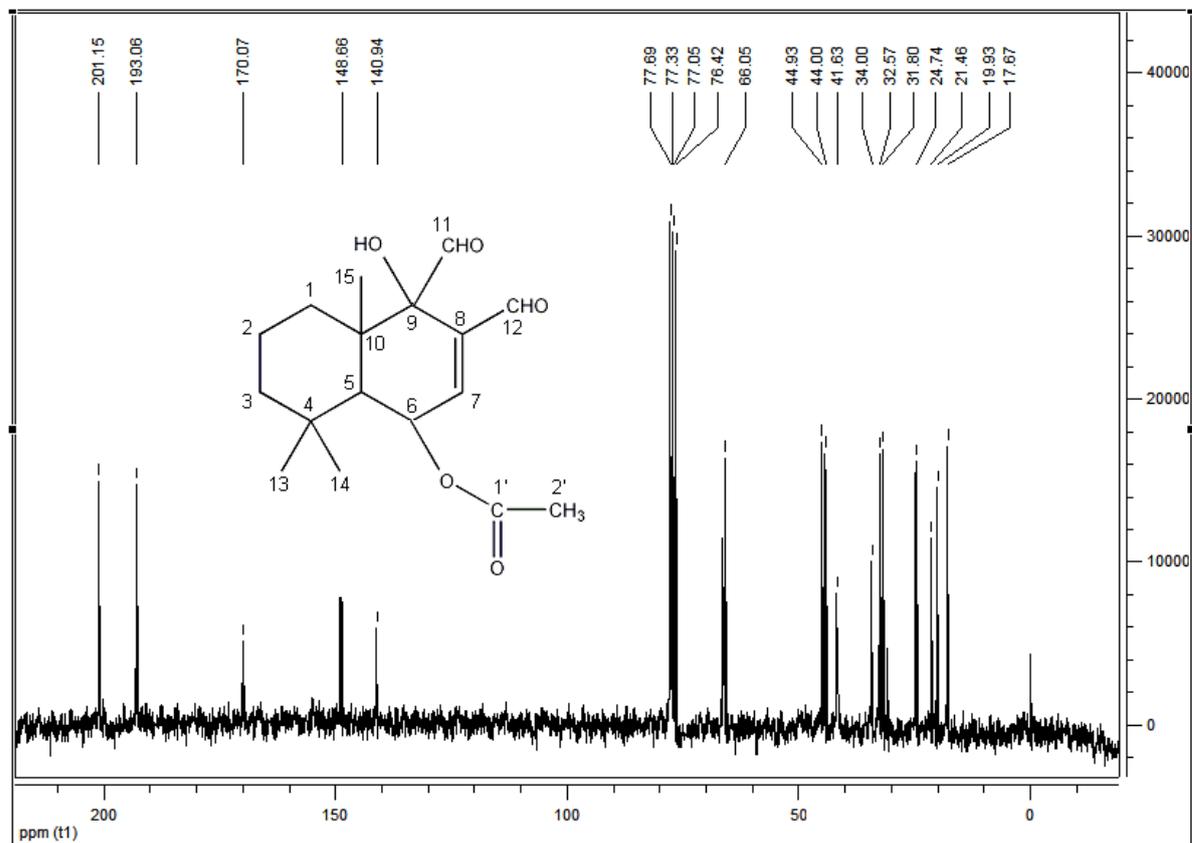


FIGURA 24 – ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO COMPOSTO XC2 (50 MHz, CDCl_3)

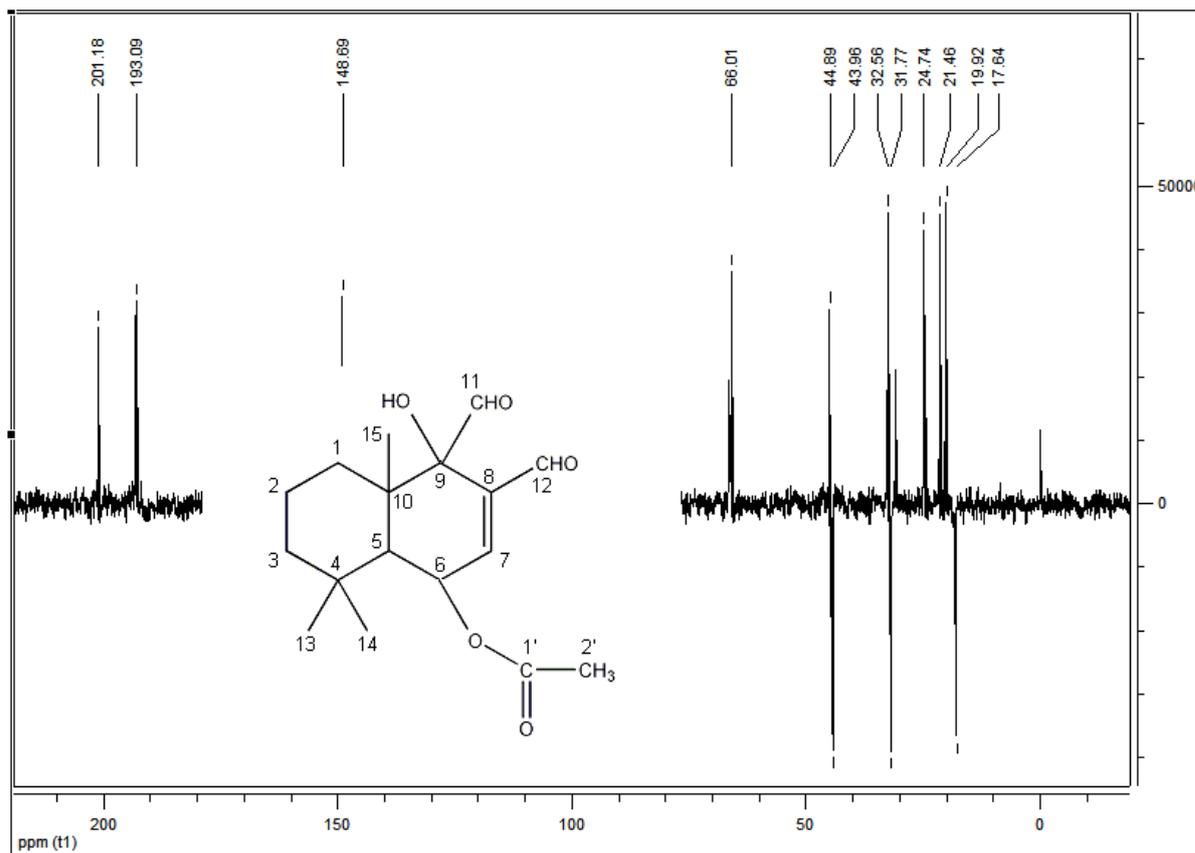


FIGURA 25 – ESPECTRO DE RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (CDCl_3) PARA O COMPOSTO XC2

TABELA 4 - VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) de RMN ^1H e ^{13}C PARA XC2 EM CDCl_3 (200 MHz)

Posição	Sinais de XC2	
	^1H δ mult. (J Hz)	^{13}C δ
1		17,67 / CH_2
2	1,38	31,80 / CH_2
3	2,08	44 / CH_2
4		34 / Cq
5	2,05	44,93 / CH
6	5,9 t $J=2,4$	66,05 / CH
7	7,0 d $J=2,4$	148,63 / CH
8		140,91 / Cq
9		77 / Cq
10		41,63 / Cq
11	9,78 s	201,12 / CH
12	9,5 s	193,03 / CH
13	1,36 s	32,57 / CH_3
14	1,18	24,74 / CH_3
15	1,04	19,93 / CH_3
1'		170 / Cq
2'	2,15	21,43 / CH_3

TABELA 5- CONECTIVIDADES A LONGA DISTÂNCIA PARA O COMPOSTO XC2

H	C
1,04	24,74 (C-14); 34,00 (C-4); 44,00 (C-3); 44,93 (C-5)
1,18	19,93 (C-15); 32,57 (C-13); 34,00 (C-4); 44,00 (C-3); 44,93 (C-5)
1,36	24,74 (C-14); 31,80 (C-2); 41,63 (C-10); 44,93 (C-5); 77,33 (C-9)
2,05	19,93 (C-15); 24,74 (C-14); 34,00 (C-4); 41,63 (C-10)
2,15	170,07 (C-1')
5,91	41,63 (C-10); 44,93 (C-5); 140,94 (C-8); 148,66 (C-7); 170,07 (C-1')
7,02	44,93 (C-5); 77,33 (C-9); 193,06 (C-12)
9,50	77,33 (C-9); 140,94 (C-8)
9,78	77,33 (C-9)

Os dados comparativos de RMN ^1H para o composto XC2 e ugandensidial estão demonstrados na tabela 6.

TABELA 6 - VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) de RMN ^1H PARA XC2 EM CDCl_3 (200 MHz) EM COMPARAÇÃO COM UGANDENSIDIAL EM CDCl_3 (100 MHz)

Posição	Sinais de XC2 (CDCl_3 , 200MHz)	Sinais da literatura para UGANDENSIDIAL segundo Cortez <i>et al.</i> (1990) (CDCl_3 , 100MHz)
	^1H δ mult. (J Hz)	^1H δ mult. (J Hz)
1		*
2	1,38	*
3	2,08	*
4		
5	2,05	*
6	5,9 t $J=2,4$	5,92 dd, $J=4$ e 5
7	7,0 d $J=2,4$	7,02 d, $J=5$
8		
9		
10		
11 (CHO)	9,78 s	9,78 d, $J=1$
12 (CHO)	9,5 s	9,5 s
13 (3H)	1,18 s	1,17 s
14 (3H)	1,36 s	1,34 s
15 (3H)	1,04 s	1,02 s
1'		
2' (3H, s, COMe)	2,15	2,14 s
OH		4,1 d, $J=1$

FONTE: O autor (2010) * Dados não fornecidos pelo autor no artigo.

A análise dos dados de RMN ^1H do composto XC2 e da substância ugandensidial (CORTES; RAZMILIC; LOPEZ, 1990) apresentam sinais com deslocamentos químicos semelhantes apenas diferindo nas constantes de acoplamento dos hidrogênios H-6 e H-7.

As diferenças encontradas nas constantes de acoplamento destes sinais podem ser atribuídas à instabilidade e reatividade da molécula. De acordo com Jonassohn (1996) tais fatores podem resultar em diferentes formas de acoplamento entre os hidrogênios. Mesmo com essas características distintas, a análise dos dados obtidos para o composto XC2 na sua totalidade corrobora com as informações para a molécula do ugandensidial. Cabe aqui salientar que está em andamento a obtenção do espectro de NOE diferencial para a atribuição correta da estereoquímica do isolado obtido neste estudo.

Apesar de a presença de sesquiterpenos drimanos ter sido relatada em inúmeras espécies vegetais das famílias Winteraceae, Cannellaceae e Polygonaceae, o isolamento do composto XC2 a partir da fração hexano das cascas das raízes de *X. ciliatifolium* é inédito.

Em uma revisão detalhada sobre a ocorrência, atividades biológicas e síntese de sesquiterpenos drimanos no jornal Natural Product Research, os autores Jansen e Groot (2004) compilaram informações publicadas sobre esta classe de compostos em cerca de 350 literaturas científicas. No elenco das atividades biológicas promissoras obtidas a partir de estudos laboratoriais para os sesquiterpenos drimanos ressaltam-se as seguintes: antibacteriana, antifúngica e antiviral; inseticida e antialimentadora; citotóxica e tóxica; reguladora do crescimento de plantas; piscicida, moluscida e antihelmintica; neurotransmissora, bem como, vascular, antialérgica, antiinflamatória e antinociceptiva. De acordo com Jonassohn (1996) a porção da molécula dos sesquiterpenos formada pelo grupamento aldeído α , β -insaturado está fortemente ligada às atividades biológicas reportadas.

Ugandensidial foi isolado das cascas das espécies medicinais africanas de *Warburgia stuhlmanii* e *Warburgia ugandensis* (Canelaceae) (CORTES; RAZMILIC; LOPEZ, 1990). Esta última é utilizada para tratamento de dores de estômago, constipação, dores de dente, febre e dores musculares (WUBE *et al.*, 2005).

5.4 ÓLEO ESSENCIAL DAS CASCAS DAS RAÍZES

Na análise do óleo essencial das cascas das raízes de *X. ciliatifolium* 33 compostos foram identificados. A quantidade relativa de cada componente é apresentada na tabela 7.

TABELA 7 – COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS CASCAS DAS RAÍZES DE *Xylosma ciliatifolium*

	COMPOSTOS	FÓRMULA	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	ÍNDICE DE RETENÇÃO	ÁREA (%)	ADAMS (KI)
01	Triciclono	C ₁₀ H ₁₆	6.286	925	0.04	926
02	α-Pineno	C ₁₀ H ₁₆	6.541	934	0.92	939
03	Canfeno	C ₁₀ H ₁₆	7.048	952	0.20	954
04	β-Pineno	C ₁₀ H ₁₆	7.893	983	0.34	979
05	β-Mirceno	C ₁₀ H ₁₆	8.123	991	0.05	990
06	α-Terpineno	C ₁₀ H ₁₆	9.165	1021	0.06	1017
07	o-Cimeno	C ₁₀ H ₁₄	9.443	1028	0.51	1026
08	Limoneno	C ₁₀ H ₁₆	9.615	1032	5.73	1029
09	β-Felandreno	C ₁₀ H ₁₆	9.690	1034	0.06	1029
10	Eucaliptol	C ₁₀ H ₁₈ O	9.758	1036	0.50	1031
11	γ-Terpineno	C ₁₀ H ₁₆	10.681	1060	0.42	1059
12	Terpinoleno	C ₁₀ H ₁₆	11.745	1088	0.16	1088
13	Linalol	C ₁₀ H ₁₈ O	12.264	1102	0.23	1096
14	Camfor	C ₁₀ H ₁₆ O	14.395	1152	0.16	1146
15	Borneol	C ₁₀ H ₁₈ O	15.404	1176	0.62	1169
16	Terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	15.737	1183	1.63	1177
17	α-Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	16.363	1198	2.94	1188
18	Trans carveol	C ₁₀ H ₁₆ O	17.371	1222	0.21	1216
19	Metil acetato timol	C ₁₁ H ₁₆ O	17.760	1231	0.10	1235
20	Metil eter carvacrol	C ₁₁ H ₁₆ O	18.162	1240	0.27	1244
21	3,5 dimetoxi tolueno	C ₈ H ₈ O ₃	19.375	1268	26.37	NIST
22	Trans carvil acetato	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	22.157	1334	0.93	1342
23	α-Copaeno	C ₁₅ H ₂₄	23.991	1377	0.10	1376
24	α-Muroleno	C ₁₅ H ₂₄	29.757	1500	0.22	1500
25	δ-Cadineno	C ₁₅ H ₂₄	31.355	1520	1.31	1523
26	E-Nerolidol	C ₁₅ H ₂₆ O	32.062	1561	3.82	1563
27	Espatuleno	C ₁₅ H ₂₄ O	32.257	1579	1.15	1578
28	Globulol	C ₁₅ H ₂₆ O	34.173	1584	1.63	1590
29	β- atlantol	C ₁₅ H ₂₄ O	35.268	1635	1.05	1608
30	Cedranol <5-iso->	C ₁₅ H ₂₆ O	36.450	1664	4.37	1673
31	Drimenol	C ₁₅ H ₂₆ O	39.258	1772	2.74	1767
32	Muroleno 14-hidroxi- α	C ₁₅ H ₂₄ O	40.093	1776	0.01	1780
33	Drimenin	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	45.105	1952	3.18	1942
	Total				62.03	

A substância que apresentou maior porcentagem no óleo foi 3,5 dimetoxi tolueno (DMT) (26,37%) que é um éter metil fenólico. O espectro de massas do composto está demonstrado na Figura 26. O mesmo exibe pico do íon molecular em m/z 152.

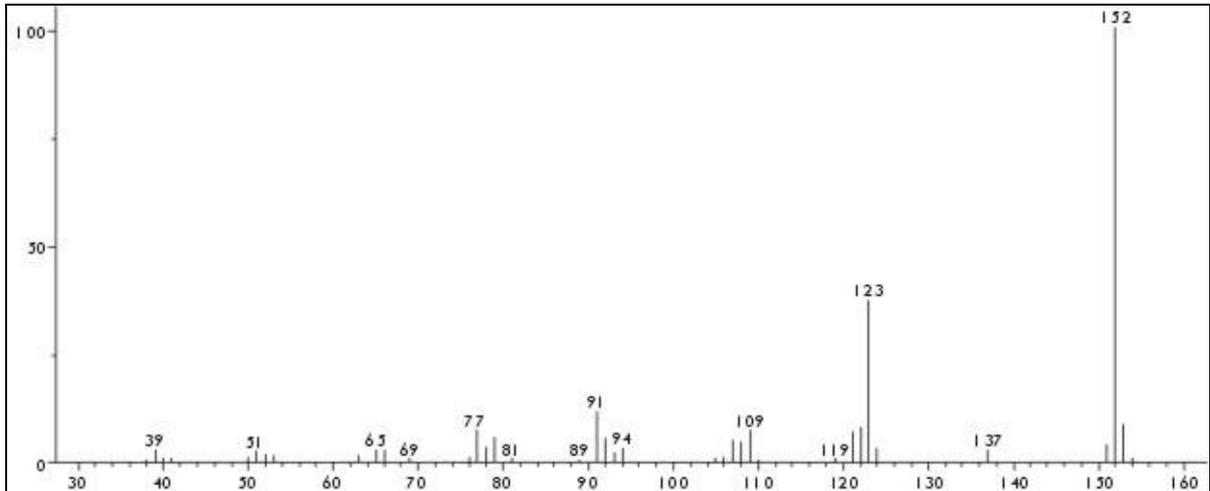


FIGURA 26 – ESPECTRO DE MASSAS DO 3,5-DIMETÓXI TOLUENO

DMT foi identificado em espécies das famílias Amaryliidaceae, Orchidaceae, Brassicaceae, Lecythidaceae, Theophrastaceae, Berberidaceae, Solanaceae e Rosaceae (El-Sayed, 2009). Na família Flacourtiaceae o composto é relatado pela primeira vez.

DMT é o principal composto aromático de muitas de modernas variedades de rosas. Em estudos realizados por Scalliet *et al.* (2008) a provável biossíntese de DMT em diferentes espécies de rosas envolve a metilação da molécula do orcinol em duas etapas, catalisadas pelas enzimas orcinol O-metiltransferases 1 e 2 (OOMT1 e OOMT2) (Figura 27).

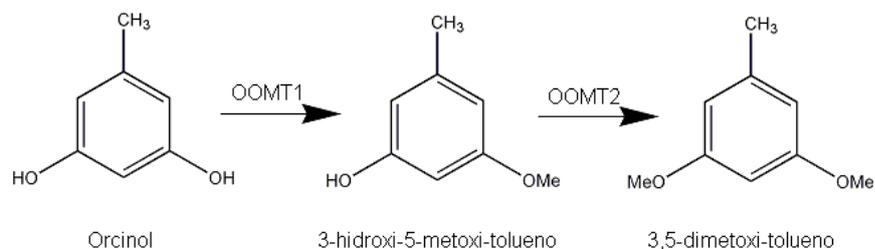


FIGURA 27 – ROTA PROPOSTA PARA A SÍNTESE DE 3,5-DIMETOXI TOLUENO (OOMT1 – orcinol O-metiltransferase 1; OOMT2 – orcinol O-metiltransferase 2)
 FONTE: SCALLIET *et al.* (2008).

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

5.5.1 Frações das folhas

5.5.1.1 Avaliação da germinação

As médias referentes aos valores de IVG dos tratamentos das frações das folhas estão descritos na Tabela 8. Observa-se que não houve deficiência na germinação das sementes de *L. sativa* pelos resultados do teste estatístico para as frações hexano e clorofórmio. No entanto, pode ser observado que no tratamento de 0,4 mg da fração acetato de etila ocorreu inibição sobre a germinação das sementes.

TABELA 8 – TESTE DE SCOTT-KNOTT ($P < 0,05$) PARA OS ÍNDICES DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE *Lactuca sativa* FRENTE ÀS FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *Xylosma ciliatifolium*

Concentração (mg)	Índice de velocidade de germinação		
	FHEX	FCLOR	FACET
0,1	5,000 a	4,5825 a	4,625 a
0,2	5,000 a	4,6250 a	4,875 a
0,4	5,000 a	4,3750 a	3,500 b
0,8	4,875 a	4,7500 a	4,500 a
Controle água	4,875 a	4,3750 a	4,375 a
Controle metanol	5,000 a	4,6250 a	4,625 a

FONTE: O autor (2009)

Nota: Médias seguidas com a mesma letra na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si.

5.5.1.2 Avaliação do crescimento

A partir da análise dos dados da tabela 9, observou-se que não foram obtidos dados significativamente estatísticos pelo teste de Scott-Knott, na avaliação do crescimento do hipocótilo e radícula para as frações hexano, clorofórmio e acetato de etila das folhas.

TABELA 9 – TESTE DE SCOTT-KNOTT ($P < 0,05$) PARA O CRESCIMENTO DE *Lactuca sativa* FRENTE ÀS FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *Xylosma ciliatifolium*.

Tratamento	Concentração (mg)	Hipocótilo (mm)			Radícula (mm)		
		FHEX	FCLOR	FACET	FHEX	FCLOR	FACET
11	0,1	30,60 a	33,00 a	38,80 a	33,60 a	30,50 a	30,80 a
12		39,40 b	36,20 a	29,80 a	28,80 a	28,60 a	28,80 a
13		35,60 b	32,80 a	24,80 a	32,80 a	29,60 a	27,20 a
14		35,50 b	20,40 a	29,40 a	31,50 a	24,00 a	30,60 a
21	0,2	35,75 b	30,80 a	27,40 a	33,40 a	26,00 a	27,40 a
22		34,20 b	32,60 a	34,60 a	30,60 a	31,00 a	30,40 a
23		32,00 b	33,40 a	35,40 a	30,20 a	27,80 a	29,00 a
24		32,20 b	25,60 a	36,50 a	30,80 a	32,60 a	29,80 a
41	0,4	23,40 a	32,75 a	30,20 a	23,60 a	30,50 a	30,20 a
42		34,60 b	27,00 a	28,00 a	27,00 a	24,50 a	15,80 a
43		27,25 a	19,25 a	33,30 a	29,50 a	18,25 a	23,30 a
44		28,80 a	21,60 a	35,50 a	21,80 a	25,00 a	25,50 a
81	0,8	31,80 b	29,40 a	27,80 a	30,00 a	25,80 a	28,60 a
82		23,40 a	19,80 a	29,00 a	32,40 a	23,60 a	27,50 a
83		27,80 a	28,00 a	25,00 a	30,40 a	23,50 a	21,80 a
84		34,40 b	33,75 a	30,00 a	30,00 a	27,75 a	26,40 a
1001	Controle água	37,80 b	25,50 a	25,50 a	30,00 a	29,60 a	29,60 a
1002		37,00 b	35,80 a	35,80 a	30,25 a	28,40 a	28,40 a
1003		38,20 b	32,40 a	32,40 a	31,40 a	25,80 a	25,80 a
1004		33,00 b	37,60 a	37,60 a	31,20 a	28,80 a	28,80 a
2001	Controle metanol	36,00 b	33,80 a	33,80 a	31,20 a	30,80 a	30,80 a
2002		38,50 b	31,20 a	31,20 a	30,25 a	28,00 a	28,00 a
2003		35,80 b	27,60 a	27,60 a	34,60 a	28,60 a	28,60 a
2004		37,50 b	30,20 a	30,20 a	31,00 a	26,80 a	26,80 a

FONTE: O autor (2009)

Nota: Médias seguidas com a mesma letra na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si.

5.5.1.3 Avaliação da porcentagem de crescimento de *Lactuca sativa*

Os gráficos 1 e 2 demonstram o percentual de crescimento do hipocótilo e radícula frente às amostras das frações das folhas. É visível uma leve inibição do crescimento a partir do tratamento de 0,1 mg, no entanto, como observado no item 5.5.1.2 os dados não foram estatisticamente significativos quando comparados aos controles.

GRÁFICO 1 – PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa* SUBMETIDA A ENSAIO ALELOPÁTICO FRENTE ÀS FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *Xylosma ciliatifolium*

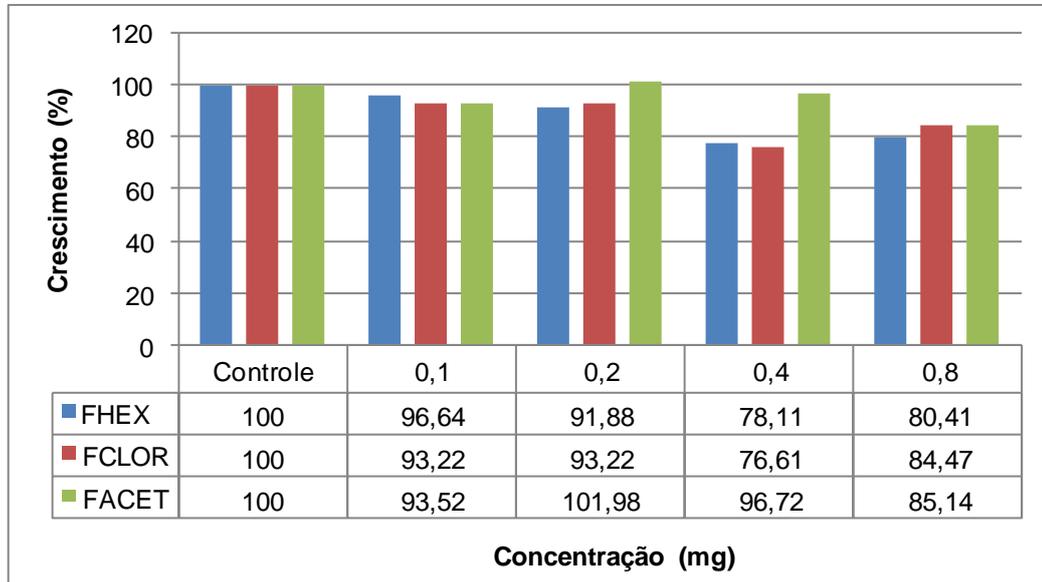
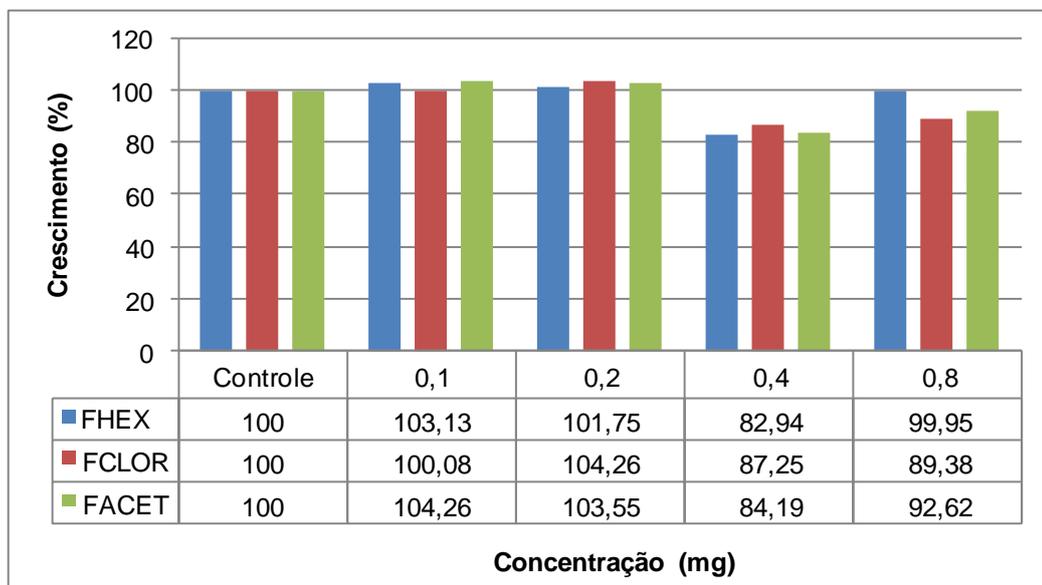


GRÁFICO 2 – PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE *Lactuca sativa* SUBMETIDA A ENSAIO ALELOPÁTICO FRENTE ÀS FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *Xylosma ciliatifolium*



5.5.2 Frações das cascas das raízes

5.5.2.1 Avaliação da germinação

A tabela 10 apresenta os resultados de IVG para as frações das cascas das raízes de *X. ciliatifolium*. Como pode ser observado, não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos amostrais e controles.

TABELA 10 – TESTE DE SCOTT-KNOTT ($P < 0,05$) PARA OS ÍNDICES DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE *L. sativa* FRENTE ÀS FRAÇÕES DAS CASCAS DAS RAÍZES DE *X. ciliatifolium*.

Concentração (mg)	Índice de velocidade de germinação		
	FHEX	FCLOR	FACET
0,1	5,000 a	4,500 a	4,875 a
0,2	5,000 a	4,500 a	4,750 a
0,4	5,000 a	4,250 a	5,000 a
0,8	5,000 a	4,375 a	4,665 a
Controle água	4,875 a	4,875 a	4,875 a
Controle metanol	5,000 a	4,750 a	4,750 a

FONTE: O autor (2009)

Nota: Médias seguidas com a mesma letra na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si.

5.5.2.2 Avaliação do crescimento

Efeitos inibitórios significativos sobre o crescimento das plântulas de *L. sativa* nos tratamentos de 0,2; 0,4 e 0,8 mg (hipocótilo) e 0,8 mg (radícula) foram evidenciados pelo teste estatístico Scott-Knott para a fração hexano das cascas das raízes (Tabela 11).

Para a fração clorofórmio, visualiza-se que somente os tratamentos correspondentes às concentrações de 0,4 e 0,8 mg apresentaram diferença estatística significativa quando comparados aos controles, para o crescimento do hipocótilo.

A fração acetato de etila não evidenciou inibição no crescimento das plântulas de alface em todos os tratamentos testados.

TABELA 11 – TESTE DE SCOTT-KNOTT ($P < 0,05$) PARA O CRESCIMENTO DE *L. sativa* FRENTE ÀS FRAÇÕES DAS CASCAS DAS RAÍZES DE *X. ciliatifolium*.

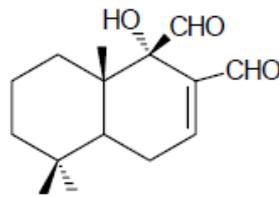
Tratamento	Concentração (mg)	Hipocótilo (mm)			Radícula (mm)		
		FHEX	FCLOR	FACET	FHEX	FCLOR	FACET
11	0,1	27,00 b	19,20 a	25,60 a	31,20 b	25,00 b	30,00 a
12		28,20 b	25,50 b	25,80 a	34,00 b	26,00 b	28,80 a
13		35,00 c	24,20 a	21,80 a	33,80 b	26,80 b	24,80 a
14		30,50 c	22,75 a	29,25 a	34,00 b	19,75 a	28,40 a
21	0,2	24,60 b	28,00 b	25,00 a	26,20 b	29,60 b	24,00 a
22		22,60 b	23,80 a	27,20 a	28,60 b	26,60 b	27,40 a
23		24,60 b	18,30 a	26,00 a	30,60 b	19,00 a	24,20 a
24		26,80 b	22,25 a	25,20 a	33,40 b	31,50 b	27,80 a
41	0,4	19,25 a	19,60 a	26,80 a	25,75 b	21,25 a	28,40 a
42		20,60 a	22,60 a	28,40 a	27,20 b	26,20 b	30,40 a
43		21,40 a	20,00 a	21,80 a	23,80 a	20,75 a	27,60 a
44		21,00 a	21,60 a	28,80 a	21,20 a	29,60 b	30,40 a
81	0,8	15,60 a	21,75 a	26,50 a	21,60 a	13,50 a	24,20 a
82		19,40 a	21,25 a	28,20 a	14,00 a	19,25 a	27,20 a
83		17,60 a	18,00 a	22,50 a	18,80 a	23,50 a	25,80 a
84		17,20 a	20,25 a	27,80 a	17,00 a	28,75 b	26,60 a
1001	Controle água	37,80 c	24,80 b	24,80 a	30,00 b	27,80 b	27,80 a
1002		37,00 c	27,75 b	27,75 a	30,25 b	30,00 b	30,00 a
1003		38,20 c	28,50 b	28,50 a	31,40 b	28,25 b	28,25 a
1004		33,00 c	26,00 b	26,00 a	31,20 b	21,50 b	26,33 a
2001	Controle metanol	36,00 c	29,50 b	29,50 a	31,20 b	28,75 b	28,75 a
2002		38,50 c	26,60 b	26,60 a	30,25 b	29,40 b	29,40 a
2003		35,80 c	29,60 b	29,60 a	34,60 b	32,80 b	32,40 a
2004		37,50 c	31,00 b	31,00 a	31,00 b	28,00 b	28,00 a

FONTE: O autor (2009)

Nota: Médias seguidas com a mesma letra na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si.

A influência inibitória expressiva da fração hexano sobre o crescimento das plântulas da espécie teste está relacionada, provavelmente, a ação de substâncias, tais como os sesquiterpenos da classe dos drimanos. Isto porque, o composto XC2 – ugandensidial isolado por cromatografia em coluna desta mesma fração apresenta semelhança estrutural a outros compostos naturais com atividades biológicas importantes. Warburganal (**61**) um sesquiterpeno dialdeído apresentou ação anti-alimentora sobre insetos, o que desta forma evidencia potencial bioativo considerável (JANSEN E GROOT, 2004).

Diante de tais achados, destaca-se que os bio-ensaios realizados com amostras de vegetais permitem demonstrar a existência de potencial alelopático como as que foram obtidas para as frações hexano e clorofórmio das cascas das raízes de *X. ciliatifolium*. A pesquisa em alelopatia está estritamente relacionada com a busca de agentes herbicidas alternativos que contribuam para o manejo da agricultura de uma forma mais sustentável e ecológica.



(61)

5.5.2.3 Avaliação da porcentagem de crescimento de *Lactuca sativa*

No gráfico 3 pode-se visualizar que para a concentração de 0,8 mg obteve-se a maior inibição para o crescimento do hipocótilo: 52,77%. Na avaliação do crescimento da radícula na mesma concentração testada obteve-se o valor de 43,8% de inibição, quando comparado ao controle (Gráfico 4).

GRÁFICO 3 – PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE *L. sativa* SUBMETIDA A ENSAIO ALELOPÁTICO FRENTE ÀS FRAÇÕES DAS CASCAS DAS RAÍZES DE *X. ciliatifolium*

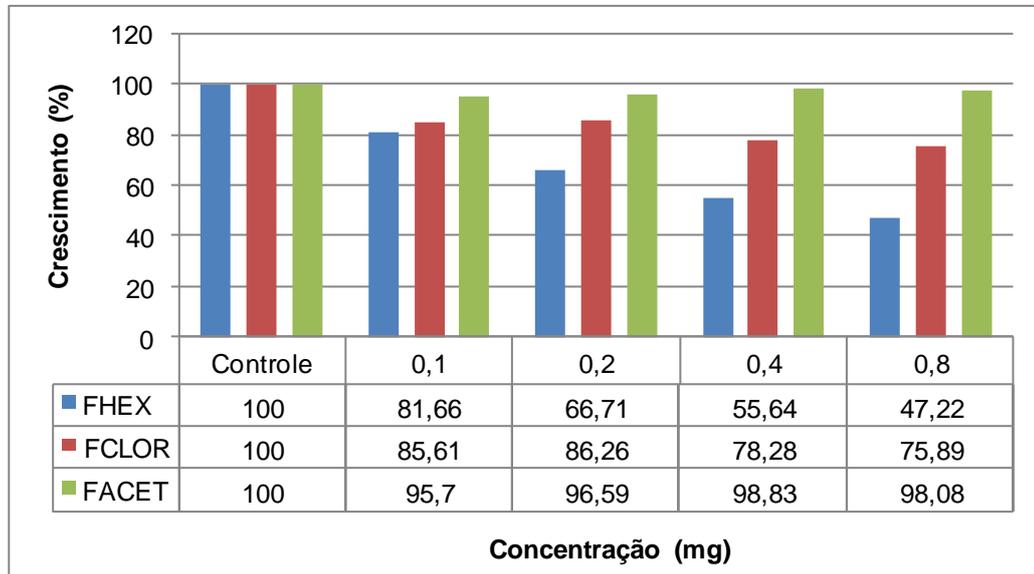
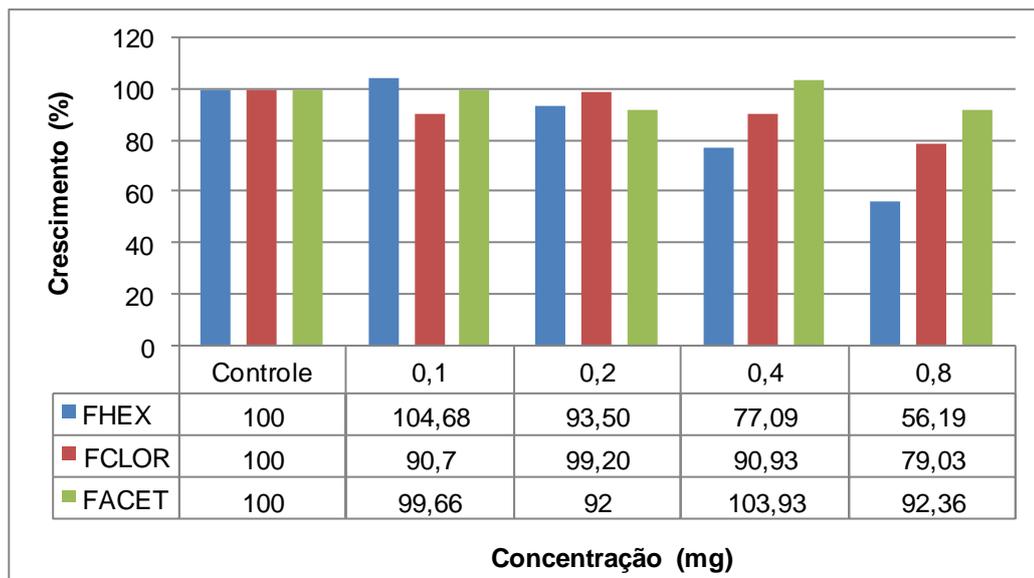


GRÁFICO 4 – PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE *L. sativa* SUBMETIDA A ENSAIO ALELOPÁTICO FRENTE ÀS FRAÇÕES DAS CASCAS DAS RAÍZES DE *X. ciliatifolium*



5.5.3 Composto XC2

5.5.3.1 Avaliação da germinação

O IVG obtido nas concentrações teste para o isolado XC2 não foram estatisticamente diferentes dos controles quando da aplicação do teste de Scott-Knott (Tabela 12).

TABELA 12 – TESTE DE SCOTT-KNOTT ($P < 0,05$) PARA OS ÍNDICES DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE *L. sativa* FRENTE AO ISOLADO XC2 DE *X. ciliatifolium*.

Concentração (mg)	Índice de Velocidade de Germinação
0,1	4,5000 a
0,2	4,5825 a
0,4	4,0000 a
0,8	3,6250 a
Controle água	4,5000 a
Controle metanol	4,6250 a

FONTE: O autor (2009)

Nota: Médias seguidas com a mesma letra na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si.

5.5.3.2 Avaliação do crescimento

A inibição do crescimento do hipocótilo foi visualizada nos tratamentos correspondentes às concentrações de 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8 mg. Dessa maneira, todos os dados amostrais foram estatisticamente diferentes dos controles conforme está descrito na tabela 13.

O crescimento da radícula foi influenciado negativamente somente para as plântulas de *L. sativa* expostas à concentração de 0,8 mg. Este dado foi confirmado pela significância estatística quando comparado aos grupos de tratamento controle.

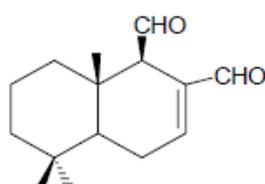
TABELA 13 – TESTE DE SCOTT-KNOTT ($P < 0,05$) PARA O CRESCIMENTO DE *L. sativa* FRENTE AO ISOLADO XC2 DE *X. ciliatifolium*.

Tratamento	Concentração (mg)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)
11	0,1	21,80 b	33,60 b
12		22,60 b	41,80 b
13		30,40 c	36,00 b
14		32,80 c	39,20 b
21	0,2	15,33 a	31,33 b
22		17,40 a	28,00 b
23		16,40 a	36,00 b
24		24,20 b	35,80 b
41	0,4	17,60 a	29,40 b
42		17,40 a	28,60 b
43		15,33 a	14,66 a
44		17,60 a	17,20 a
81	0,8	16,00 a	13,75 a
82		14,33 a	9,75 a
83		20,60 b	13,60 a
84		13,66 a	11,00 a
1001	Controle água	38,40 d	34,80 b
1002		40,00 d	33,00 b
1003		38,00 d	30,75 b
1004		37,60 d	33,40 b
2001	Controle metanol	36,25 d	38,40 b
2002		39,20 d	34,80 b
2003		39,20 d	31,80 b
2004		41,00 d	31,20 b

FONTE: O autor (2009)

Nota: Médias seguidas com a mesma letra na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si.

Embora não tenham sido encontrados na literatura estudos da avaliação da atividade alelopática para o composto XC2 (ugandensidial), classificado como um sesquiterpeno dialdeído, a ação é coerente com a da substância conhecida como poligodial (**62**), igualmente da mesma classe, e isolada de *Drimys brasiliensis*, na qual demonstrou atividade inibitória sobre as plântulas de *L. sativa* na concentração de 10^{-3} M (MALHEIROS; PERES, 2001).



(62)

O efeito alelopático verificado para o composto XC2 – ugandensidial nos ensaios frente às sementes de *L. sativa* constitui o primeiro passo na verificação da potencialidade inibidora do crescimento de plantas. Cabe aqui ressaltar que a bio-atividade expressiva utilizando-se concentrações baixas do agente químico é relevante, quando comparada com as altas dosagens dos herbicidas sintéticos comumente usados para promover o mesmo efeito inibidor. Além disso, a possibilidade de se obter um biocida semissintético é reforçada pelas modernas técnicas da química medicinal, que reproduzem a partir de um protótipo, desenhos racionais de substâncias como tentativa de se obter avanços para uma agricultura mais sustentável (YUNES; CECHINEL FILHO, 2007).

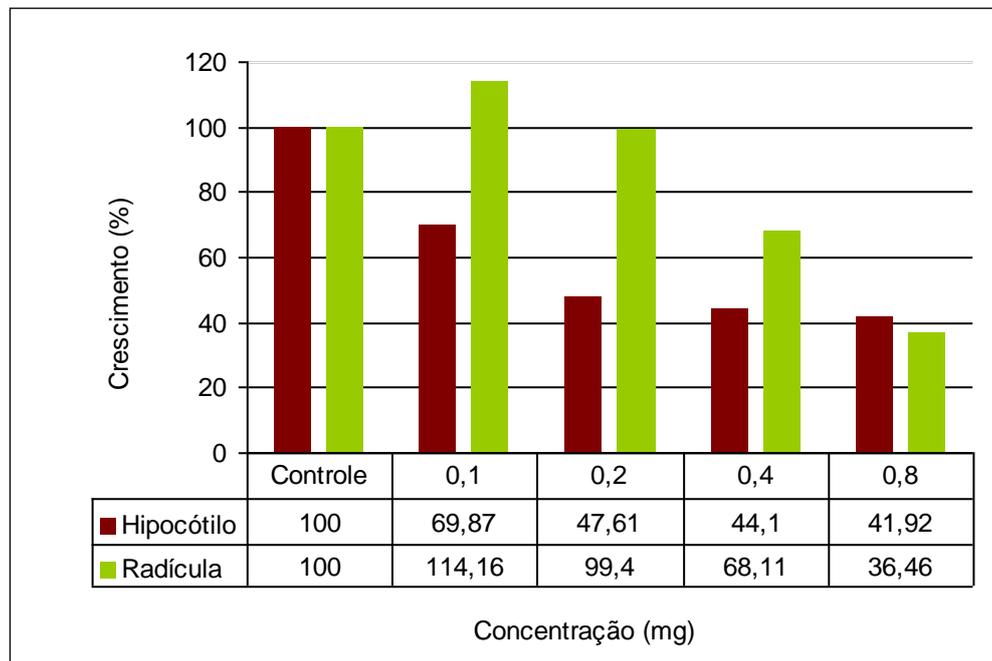
5.5.3.3 Avaliação da porcentagem de crescimento de *Lactuca sativa*

Um menor percentual de crescimento (41,92% para o hipocótilo e 36,46% para a radícula) na concentração de 0,8 mg para o isolado XC2 foi observado quando comparado ao tratamento controle (Gráfico 5).

De acordo com Krzyzanowski, Vieira e França Neto (1999), citado por Dias (2005) uma menor incorporação dos suprimentos de reserva dos tecidos pelo eixo embrionário das sementes resulta em plântulas com menores taxas de crescimento devido a atenuação da capacidade de transformação e de suprimento de reserva.

A ação biocida de moléculas orgânicas, a partir de plantas como o composto isolado ugandensidial, pode ser uma alternativa na substituição ou associação aos agroquímicos convencionais e, desta forma, resultar em técnicas menos agressivas à natureza.

GRÁFICO 5 – PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO E DA RADÍCULA DE *L. sativa* SUBMETIDA A ENSAIO ALELOPÁTICO FRENTE AO ISOLADO XC2 DE *X. ciliatifolium*



Por outro lado, visualiza-se que na concentração teste de 0,1mg para a radícula, ocorreu a indução do crescimento desta quando comparado ao grupo controle. Este fenômeno pode ser atribuído ao fato de que em baixas concentrações o isolado XC2 pode ter atuado como regulador de crescimento positivo sendo, desta forma, semelhantemente a atuação de hormônios.

A espécie *L. sativa* foi escolhida por ser amplamente citada na literatura e apresentar características apropriadas para os testes: maior sensibilidade aos efeitos alelopáticos das plantas, requererem pequeno período para a germinação e para o crescimento, não precisar de foto-período, possuir umidade e temperatura de germinação e crescimento bem definidas, a radícula da plântula apresentar um eixo único, o que facilita a leitura do crescimento, além do tamanho da semente ser considerado mais uniforme. Além disso, a semente de *Lactuca sativa* é empregada em ensaios por apresentar germinação uniforme, ser pequena, porém com grande superfície de contato, tornando-a bastante sensível ao meio que a rodeia e não requerer nenhuma manipulação além do contato do meio (BALESTRIN, 2006).

5.6 ENSAIO DE TOXICIDADE SOBRE *Artemia salina*

5.6.1 Frações das folhas

No ensaio de toxicidade sobre as larvas do microcrustáceo *Artemia salina* realizada com as amostras obtidas das folhas, os valores de DL₅₀ para as frações hexano, clorofórmio e acetato de etila foram maiores que 1000 µg/ml. Portanto, de acordo Meyer *et al.* (1982) todas as frações apresentaram baixa citotoxicidade sobre as larvas. Os solventes utilizados não mostraram interferência na mortalidade dos microcrustáceos.

5.6.2 Frações das cascas das raízes

A tabela 14 mostra os valores de DL₅₀ para as diferentes frações das cascas das raízes de *X. ciliatifolium*. Observa-se que para as frações hexano e clorofórmio a mortalidade é proporcional ao aumento da concentração, sendo que as mesmas mostraram-se citotóxicas com valores de DL₅₀ de 21,22 e 9,55 µg/ml, respectivamente e, inferiores ao controle positivo – sulfato de quinidina (DL₅₀ = 50, 12 µg/ml).

A fração acetato de etila mostrou-se inativa nas concentrações testadas não apresentando toxicidade sobre a mortalidade das larvas (DL₅₀ > 1000 µg/ml).

Os solventes utilizados para a solubilização das amostras (controles negativos) não influenciaram na mortalidade das larvas.

TABELA 14 – TESTE DE TOXICIDADE SOBRE *A. salina* DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS CASCAS DAS RAÍZES DE *X. ciliatifolium*

AMOSTRA	Concentração (µg/mL)	DL ₅₀ (µg/mL)	INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (µg/mL)
Fração Hexano	5	21,22	13,61 – 33,09
	10		
	50		
	100		
Fração Clorofórmio	5	9,55	5,54 – 16,47
	10		
	100		
Fração Acetato de Etila	10	> 1000	-
	100		
	1000		
Sulfato de quinidina (Controle positivo)	10	50,12	35,80-70,16
	100		
	1000		

FONTE: O autor (2009)

Nota: DL₅₀ (dose letal média).

De acordo com Siqueira *et al.* (1998) diversos trabalhos que utilizam *A. salina* tentam correlacionar a toxicidade sobre o microcrustáceo, com atividades como antifúngica, viruscida, antimicrobiana, parasiticida, entre outras. Sabendo-se que é grande o leque de amostras a partir de produtos naturais, testes simples e de baixo custo devem ser incluídos como ferramenta inicial para o *screening* fitoquímico e biológico.

Nos resultados obtidos neste trabalho, a ação tóxica da fração clorofórmio foi cerca de cinco vezes maior quando comparada ao controle sulfato de quinidina. Esta amostra será alvo de estudos mais aprofundados acerca da sua constituição química para obter dados dos mecanismos de ação envolvidos nestes ensaios.

5.6.3 Composto XC2

O resultado do teste de citotoxicidade do isolado XC2 sobre as larvas de *A. salina* está descrito na tabela 15. A aplicação do teste estatístico evidenciou a atividade citotóxica do composto, cujo valor de DL₅₀ foi de 56,12 µg/ml. Segundo

Meyer *et al.* (1982), valores de DL₅₀ menores que 1000 µg/ml são considerados ativos.

A equivalência tóxica do composto XC2 – ugandensidial em relação ao controle positivo nos testes realizados sugere a exploração de atividades mais específicas neste âmbito, como em culturas de células mais especializadas. Estes estudos são reforçados pelo rendimento satisfatório de amostra obtido por isolamento cromatográfico, pela facilidade de obtenção da espécie e pelas numerosas possibilidades de modificações estruturais que podem ser desenvolvidas.

TABELA 15 – TESTE DE TOXICIDADE SOBRE *A. salina* DO ISOLADO XC2 DAS CASCAS DAS RAÍZES DE *X. ciliatifolium*

AMOSTRA	Concentração (µg/mL)	DL ₅₀ (µg/mL)	INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (µg/mL)
Isolado XC2	50		
	100	56,12	46,55-67,67
	1000		
Sulfato de quinidina (Controle positivo)	10		
	100	50,12	35,80-70,16
	1000		

FONTE: O autor (2009)

Nota: DL₅₀ (dose letal média).

No trabalho desenvolvido por Lewan, Andersson e Morales-Gomez (1992) foi verificado o uso de *A. salina* em testes de citotoxicidade com diferentes substâncias incluindo os sesquiterpenos drimanos: epi-poligodial e poligodial. Este último composto apresentou toxicidade sobre as larvas do microcrustáceo em concentração de 5 µg/ml em meio salino tamponado. Uvidin A, sesquiterpeno obtido da extração de *Lactarius uvidus*, também apresentou atividade tóxica sobre *A. salina* com valor de DL₅₀ de 48,8 ppm (GARLASCHELLI *et al.*, 1994).

XC2 (Ugandensidial), composto isolado da fração hexano é um sesquiterpeno dialdeído da mesma classe do poligodial e uvidin A com grande potencial farmacológico, visto que, muitos autores sugerem a eficiência deste ensaio para a triagem inicial de substâncias antitumorais.

5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

5.7.1 Frações das folhas

Os resultados obtidos com as frações hexano, clorofórmio e acetato de etila das folhas após o ensaio de difusão em disco demonstraram que houve inibição do crescimento bacteriano para as cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*, pela formação de halos de inibição ao redor dos discos das amostras testadas (Tabela 16).

O solvente (metanol) não interferiu no crescimento das cepas testadas, uma vez que não foram visualizados halos de inibição.

TABELA 16 – DIÂMETROS MÉDIOS DOS HALOS DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO (MM) FRENTE ÀS FRAÇÕES OBTIDAS DAS FOLHAS DE *X. ciliatifolium*

AMOSTRAS	CONCENTRAÇÃO (µg)	MICRORGANISMOS				
		S.a	S.e	E.c	S.t	P.a
Fração hexano	250	9,5	0			
	500	11,5	8,25	0	0	0
	1000	13,75	8,5	0	0	0
Fração clorofórmio	250	0	0			
	500	8	9	0	0	0
	1000	9,5	13	0	0	0
Fração acetato de etila	250	0	11			
	500	8,25	14	0	0	0
	1000	11,5	17,5	0	0	0
Cloranfenicol	30	28,33	43,66	28,33	28,66	12,5
Metanol	-	0	0	0	0	0

FONTE: O autor (2009)

Legenda: S.a (*Staphylococcus aureus*); S.e (*Staphylococcus epidermidis*); E.c (*Escherichia coli*); S.t (*Salmonella tiphyurium*); P.a (*Pseudomonas aeruginosa*).

No método da medida da CIM para as frações das folhas testadas, todos os tubos amostrais apresentaram turvação compatível ao observado no tubo do controle positivo de crescimento bacteriano. Desta maneira, considerou-se que os valores de concentração para a ocorrência da inibição das cepas no meio testado, situam-se acima de 1000 µg/mL.

Sugere-se que as frações das folhas de *X. ciliatifolium* apresentem atividade bacteriostática sobre as cepas testadas em virtude dos diferentes resultados observados nas técnicas realizadas.

5.7.2 Frações das cascas das raízes

Os resultados obtidos com as frações das cascas das raízes sobre os microrganismos teste estão demonstrados na tabela 17. As frações hexano e clorofórmio mostraram-se ativas frente às cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* em todas as concentrações testadas pela formação de um halo de inibição ao redor dos discos das amostras. A fração acetato de etila não apresentou inibição sobre o crescimento das cepas teste.

TABELA 17 – DIÂMETROS MÉDIOS DOS HALOS DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO (MM) FRENTE ÀS FRAÇÕES OBTIDAS DAS CASCAS DAS RAÍZES DE *X. ciliatifolium*

AMOSTRAS	CONCENTRAÇÃO (µg)	MICRORGANISMOS				
		S.a	S.e	E.c	S.t	P.a
Fração hexano	250	9,16	10	0	0	0
	500	11,00	11,33	0	0	0
	1000	13,00	13,33	0	0	0
Fração clorofórmio	250	9,33	9,66	0	0	0
	500	10,83	11,66	0	0	0
	1000	12,33	14,33	0	0	0
Fração acetato de etila	250	0	0	0	0	0
	500	0	0	0	0	0
	1000	0	0	0	0	0
Cloranfenicol	30	28,33	43,66	28,33	28,66	12,5
Metanol	-	0	0	0	0	0

FONTE: O autor (2009)

Legenda: S.a (*Staphylococcus aureus*); S.e (*Staphylococcus epidermidis*); E.c (*Escherichia coli*); S.t (*Salmonella typhimurium*); P.a (*Pseudomonas aeruginosa*).

A tabela 18 apresenta as CIM das frações hexano e clorofórmio das cascas das raízes de *X. ciliatifolium*. Os valores obtidos variaram de 250 a 500 µg/mL frente aos microrganismos *S. aureus* e *S. epidermidis*. Ao lado de cada concentração na

tabela está destacado em parênteses a diluição correspondente na qual foi verificada a inibição do crescimento bacteriano.

TABELA 18 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DAS FRAÇÕES HEXANO E CLOROFÓRMIO DAS CASCAS DAS RAÍZES DE *X. ciliatifolium*

AMOSTRAS	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (µg/mL)	
	Microorganismos	
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Fração hexano	250 (1:2)	500 (1:1)
Fração clorofórmio	250 (1:2)	250 (1:2)

FONTE: O autor (2009)

Na pesquisa etnobotânica desenvolvida Holetz *et al.* (2002) com 13 plantas contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos foi considerado que extratos com CIM menor do que 100 µg/mL, apresentavam boa atividade antimicrobiana; de 100 a 500 µg/mL, a atividade foi moderada; de 500 a 1000 µg/mL foi fraca e, em concentrações maiores que 1000 µg/mL foram caracterizados como inativos.

Efetuando-se a comparação das informações da literatura com os dados obtidos no ensaio realizado, a fração hexano apresentou moderada e fraca atividade sobre as cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*, respectivamente. Para a fração clorofórmio, classifica-se a mesma como sendo de moderada atividade para ambas as bactérias gram-positivas testadas.

5.7.3 Composto XC2

O isolado XC2 apresentou atividade inibidora sobre o crescimento de duas cepas bacterianas: *S. aureus* e *S. epidermidis* no método da difusão em disco, conforme está descrito na tabela 19.

TABELA 19 – DIÂMETROS MÉDIOS DOS HALOS DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO (MM) FRENTE AO ISOLADO XC2 OBTIDO DAS CASCAS DAS RAÍZES DE *X. ciliatifolium*

AMOSTRAS	CONCENTRAÇÃO (µg)	MICROORGANISMOS				
		S.a	S.e	E.c	S.t	P.a
Composto XC2	250	15	16,5	0	0	0
	500	16	19	0	0	0
Cloranfenicol	30	30,66	36,5	32,5	27	12,5
Metanol	-	0	0	0	0	0

FONTE: O autor (2009)

Legenda: S.a (*Staphylococcus aureus*); S.e (*Staphylococcus epidermidis*); E.c (*Escherichia coli*); S.t (*Salmonella tiphymurium*); P.a (*Pseudomonas aeruginosa*).

Para as duas bactérias gram-positivas que foram inibidas pelo isolado XC2 na técnica de difusão em disco, foi realizado o método quantitativo da CIM. Os resultados obtidos, descritos na tabela 20 e demonstrados pela figura 28, afirmam a atividade expressiva sobre a inibição do crescimento daquelas bactérias, cujos valores de CIM foram de 62,5 µg/mL. Este dado é promissor considerando-se o fenômeno da resistência bacteriana frente ao arsenal antibiótico atual e, atentando-se ao fato de que *S. aureus* e *S. epidermidis* são microrganismos causadores de diversas patologias em humanos.

TABELA 20 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO ISOLADO XC2 DAS CASCAS DAS RAÍZES DE *X. ciliatifolium*

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (µg/mL)	
	Microrganismos	
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Isolado XC2	62,5 (1:8)	62,5 (1:8)

FONTE: O autor (2009).

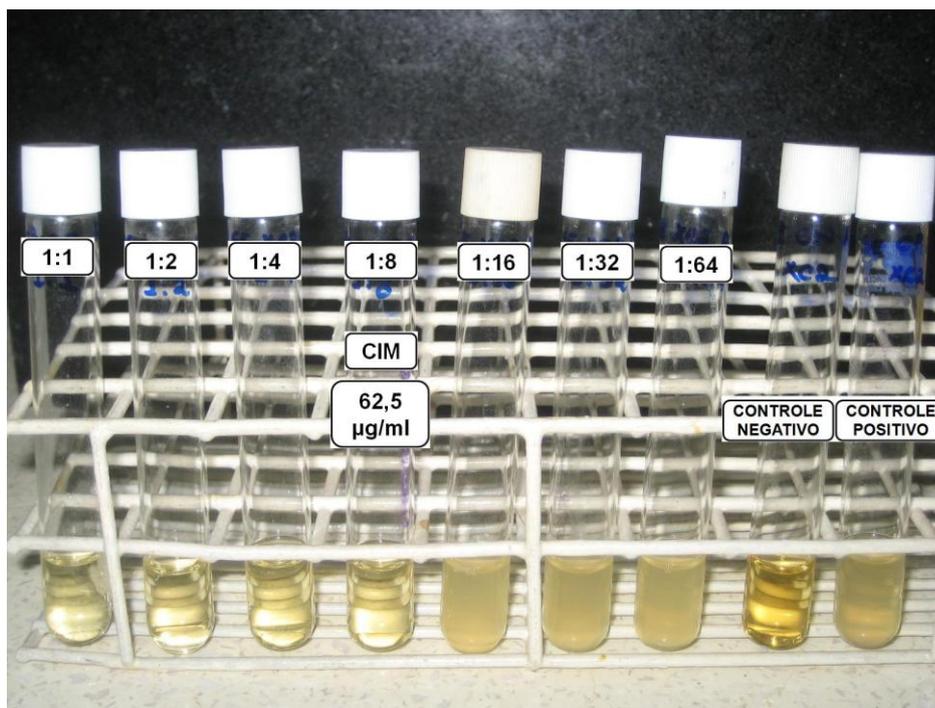


FIGURA 28 – INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO DE *S. epidermidis* PELO MÉTODO DA MEDIDA DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA O ISOLADO XC2
FONTE: O autor (2009)

Dentre os compostos conhecidos das diferentes classes de sesquiterpenos, muitos apresentam atividade antimicrobiana comprovada. Poligodial, um dos prováveis precursores do isolado XC2 (ugandensidial) apresentou atividade inibidora do crescimento bacteriano sobre 7 diferentes cepas de *S. aureus* com valores de CIM de 100 µg/ml (KUBO *et al.*, 2005). Os mesmos autores relatam que o mecanismo da ação antibacteriana do poligodial pode estar relacionado ao efeito surfactante da molécula que promove, por sua vez, o rompimento das proteínas integrais na camada lipo-protéica das membranas com a consequente desnaturação da configuração das proteínas e inibição de várias funções celulares.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir do estudo da espécie *Xylosma ciliatifolium* permitiram concluir que:

- ✓ Do extrato etanólico bruto e da fração hexano das cascas das raízes foram isolados dois compostos. Estes foram identificados por métodos espectroscópicos como sendo o manitol e um sesquiterpeno dialdeído sugerido como ugandensidial, respectivamente.
- ✓ A caracterização do óleo essencial das cascas das raízes apresentou como composto majoritário o 3,5-dimetoxi tolueno, dentre as 33 substâncias identificadas.
- ✓ Para as frações hexano e clorofórmio das cascas das raízes e para o isolado XC2 foram evidenciados efeitos inibitórios significativos sobre o crescimento das plântulas de *L. sativa* quando realizado o ensaio alelopático.
- ✓ No ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* as frações hexano e clorofórmio das cascas das raízes mostraram-se ativas, com valores de DL₅₀ inferiores ao controle positivo. O isolado XC2 também apresentou citotoxicidade sobre as larvas com valor de DL₅₀ de 56,12 µg/mL.
- ✓ Ao avaliar a atividade antibacteriana pelo método da difusão em disco, foram verificados efeitos de inibição sobre o crescimento de *S. aureus* e *S. epidermidis* para as frações hexano, clorofórmio e acetato de etila das folhas.
- ✓ O ensaio antibacteriano realizado para as frações hexano e clorofórmio das cascas das raízes apresentou atividade inibidora do crescimento das bactérias gram positivas testadas tanto no método da difusão em disco quanto na medida da concentração inibitória mínima.
- ✓ O isolado XC2 evidenciou a inibição do crescimento bacteriano para as cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* testadas na metodologia da difusão em disco e na medida da concentração inibitória mínima, com valor de 62,5 µg/mL, neste último ensaio, para ambas as bactérias.

A continuidade dos estudos químicos e biológicos com a espécie *Xylosma ciliatifolium* são reforçados pelos resultados ora obtidos e, adicionalmente pelos

inúmeros relatos na literatura sobre as propriedades farmacológicas de diversos gêneros da família Flacourtiaceae.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. Carol Stream: Allured Publ. Corp., 1995.

BALESTRIN, L. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopática, antibacteriana e antioxidante de *Dorstenia multiformis* MIQUEL, MORACEAE**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

BARROSO, G. M.; GUIMARAES, E. F.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; PEIXOTO, A. L. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. v.1. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1978.

BEUTLER, J. A.; McCALL, K. L.; HEBERT, K.; JOHNSON, T.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Cytotoxic clerodane diterpene esters from *Laetia corymbulosa*. **Phytochemistry**, New York, v.55, p. 233-236, 2000a.

BEUTLER, J. A.; McCALL, K. L.; HEBERT, K.; HERALD, D. L.; PETTIT, G. R.; HEBERT, K.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Novel cytotoxic diterpenes from *Casearia arborea*. **J. Nat. Prod.**, v. 63, p. 657-661, 2000b.

BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**. São Paulo: Editora Melhoramentos, 1994.

BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; OLIVEIRA, F.; FRANSCHESCHI, A. M.; RUCAVADO, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon**, v. 39, p. 1863-1869, 2001.

CARVALHO, J.L.S. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico do *Nasturtium officinale* R. BR., BRASSICACEAE**. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

CASTRO, T. C.; BARBOSA, K. C.; ALBARELLO, N.; FIGUEIREDO, S. F. L. Caracterização de pseudofrutos, frutos, sementes e plântulas obtidas a partir de germinação *in vivo* e *in vitro* da espécie medicinal *Hovenia dulcis* (Rhamnaceae). **Revista Cubana de Plantas Mediciniais**, v. 10, n. 1, 2005.

CASTRO, S. B. R.; LEAL, C. A. G.; FREIRE, F. R.; CARVALHO, D. A.; OLIVEIRA, D. F.; FIGUEIREDO, H. C. P. Antibacterial activity of plant extracts from Brazil against fish pathogenic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, p. 756-760, 2008.

CHAI, X.; XU, Z.; REN, H.; SHI, H.; LU, Y.; LI, F.; TU, P. Itosides A-I, New phenolic glycosides from *Itoa orientalis*. **Helvetica chimica acta**, Zürich, v. 90, p. 2176-2185, 2007.

CHANG, P. T. O.; GEOFFREY, A. C.; HARRY, H. S. F.; FARNSWORTH, N. R. Velutinic acid, a new friedelane derivative from *Xylosma velutina* (FLACOURTIACEAE). **Phytochemistry**, New York, v. 16, p.1443-1445, 1977a.

CHANG, P. T. O.; GEOFFREY, A. C.; HARRY, H. S. F.; FARNSWORTH, N. R. Xylosmacin, a new phenolic glucoside ester from *Xylosma velutina* (Flacourtiaceae). **Lloydia**, Cincinatti, v. 40, n. 4, p. 340-343, 1977b.

CORTES, M.; RAZMILIC, I.; LOPEZ, J. Synthesis of (-)-ugandensidial. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 53, n. 5, p. 1369-1371, 1990.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

CUNICO, M. M. **Ottonia martiana** Miq., PIPERACEAE: UM ESTUDO FITOQUÍMICO COM ENFOQUE MULTIDISCIPLINAR. 176 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

DALL' STELLA, D.S.G. **Estudo fitoquímico aplicada da fração solúvel do extrato etanólico bruto da *Dorstenia multiformis* Miquel (MORACEAE)**. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

DIAS, J. F. G. *et al.* Contribuição ao estudo alelopático de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss., Celastraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 15, n. 3, p. 220-223, Jul/Set, 2005.

DIAS, J. F. G. **Estudo alelopático aplicado a *Aster lanceolatus* Willd.** 129 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

EL-SAYED, A.M. The Pherobase: Database of Insect Pheromones and Semiochemicals, 2009.

Disponível em: <<http://www.pherobase.com/database/floral-taxa-compounds-detail-3,5-dimethoxytoluene.php>> Acesso em: 01/10/2009

ESTEVEES, I.; SOUZA, I. R.; RODRIGUES, M.; CARDOSO, L. G. V.; SANTOS, L. S.; SERTIE, J. A. A.; PERAZZO, F. F.; LIMA, L. M.; SCHNEEDORF, J. M.; BASTOS, J. K.; CARVALHO, J. C. T. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 191-196, 2005.

Estratégias da OMS para a medicina tradicional 2002-2005. Documento publicado em 2002.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análise de variância de dados balanceados (SISVAR).** Pacote computacional. Lavras: UFLA, 2000.

FERREIRA, P. M. P. **Determinação do potencial antitumoral de diterpenos isolados de *Casearia sylvestris* Swartz.** 116 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

FLORA BRASILIENSIS. *Xylosma ciliatifolium* Clos (Eichler). V. XIII, parte I, fasc. 55, prancha 90, 1871.

Disponível em: <http://florabrasiliensis.cria.org.br/search?taxon_id=7014>

Acesso em: 22 de agosto 2009.

GARLASCHELLI, L.; MELLERIO, G.; VIDARI, G.; VITA-FINZI, P. New fatty acid esters of drimane sesquiterpenes from *Lactarius uvidus*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 57, n. 7, p. 905-910, 1994.

GIBBONS, S.; GRAY, A.; WATERMAN, P. Clerodane diterpenes from the leaves of *Laetia procera*. **Phytochemistry**, New York, v. 43, n. 3, p. 635-638, 1996a.

GIBBONS, S.; GRAY, A. I.; WATERMAN, P. G. Clerodane diterpenes from the bark of *Casearia tremula*. **Phytochemistry**, New York, v. 41, n. 2, p. 565-570, 1996b.

GUNASEKERA, S. P.; SULTANBAWA, M. U. S.; BALASUBRAMANIAM, S. Triterpenes of some species of Flacourtiaceae. **Phytochemistry**, New York, v. 16, p. 788-789, 1977.

HENRY, G. E.; ADAMS, L. S.; ROSALES, J. C.; JACOBS, H.; HEBER, D.; SEERAM, N. P. Kaurene diterpenes from *Laetia thamnia* inhibit the growth of human cancer cells in vitro. **Cancer Letters**, v. 244, p. 190–194, 2006.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 7, p.1027-1031, 2002.

HUNTER, M. S.; CORLEY, D. G.; CARRON, C. P.; ROWOLD, E.; KILPATRICK, B. F.; DURLEY, R. C. Four new clerodane diterpenes from the leaves of *Casearia guianensis* Which inhibit the interaction of leukocyte function antigen 1 with intercellular adhesion molecule 1. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 60, p. 894-899, 1997.

IZIDORO, L. F. M.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES, R. S.; FERRO, E. V.; HAMAGUCHI, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae). **Biochimie**, v. 85, p. 669-675, 2003.

JANSEN, B. J. M.; GROOT, A. de. Occurrence, biological activity and synthesis of drimane sesquiterpenoids. **Natural Product Research**, v. 21, p. 449-447, 2004.

JASZCZERSKI, J. C. **FLACOURTIACEAE D.C. DO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1987.

JIANG, Z. **Using cortex xylosmae japonici for the treatment of diseases due to enterovirus**. Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu (2000), CODEN: CNXXEV CN 1253001 A 20000517 Patent written in Chinese.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 12 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998.

JONASSON, M. **Sesquiterpenoid unsaturated dialdehyde**. Sweden: Lund University, 1996.

KHARE, C.P (Ed). **Indian Medicinal Plants: An illustrated dictionary**. New Deelhi: Springer Science, p.725, 2007.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; DOWWEL J. R. V. R.; SOMMERS, H. M.
Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido. 2 ed. São Paulo: Medicina Panamericana Editora do Brasil, 1993.

KUBO, I.; FUJITA, K.; LEE, S. H.; HÁ, T. J. Antibacterial activity of polygodial.
Phytotherapy Research, v. 19, p. 1013-1017, 2005.

KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

LEITE, S. M. M.; VALLE, C. F.; BONINE, C. A. V; MARINO, C. L. Boron influence on concentration of polyols and other sugars in *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 5, p. 815-820, 2008.

LEWAN, L.; ANDERSSON, M.; MORALES-GOMES, P. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. **ATLA**, v.20, p. 297-301, 1992.

LIMA, E. de. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. p.484. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos – Editora Universitária, 2001.

MALHEIROS, A.; PERES, M. T. L. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Ed.) **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia das Angiospermas – Das Magnoliáceas às Flacurtiáceas**. Santa Maria: UFSM, 1997.

MARQUETE, R. Reserva Ecológica do IBGE (Brasília - DF): Flacourtiaceae.
Rodriguésia, Rio de Janeiro, v. 52, n. 80, p.5-16, 2001.

MAZA, L. M. de la; PEZZLO, M. T.; BARON, E. J. **Atlas Diagnóstico em Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 1999.

MEYER, B. N.; FERRIGIN N. R. I; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; HICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, Stuttgart, v. 45, n. 31, 1982.

MIGUEL, O. G. ***Xylosma ciliatifolium* (Clos) Eichler, FLACOURTIACEAE (SALICACEAE sensu lato)**. Fotografias dos exemplares, 2008.

MIGUEL, O.G. **Ensaio sistemático de análise fitoquímica**. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2003.

MOREIRA, E.A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna Farmacêutica**, Curitiba, v. 47, n. 1, p. 03-19, 1979.

MOSADDIK, M. A.; BANBURY, L.; FORSTER, P.; BOOTH, R.; MARKHAM, J.; LEACH, D.; WATERMAN, P. G. Screening of some Australian Flacourtiaceae species for in vitro antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity. **Phytomedicine**, LOCAL, v. 11, p. 461-466, 2004.

MOSADDIK, M.A.; FORSTER, P.I.; BOOTH, R.; WATERMAN, P.G. Phenolic glycosides from some Australian species of Flacourtiaceae (*Salicaceae sensu lato*). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 166-168, 2007a.

MOSADDIK, M. A.; FORSTER, P. I.; BOOTH, R.; WATERMAN, P. G. Clerodane diterpenes from the stems of *Casearia grewiifolia* var. *gelonioides* (Flacourtiaceae/Salicaceae *sensu lato*). **Biochemical systematic and ecology**, v. 35, p. 631-633, 2007b.

NEVES, M. C. M. **Plantas medicinais: diagnóstico e gestão**. Brasília: Ed. IBAMA, 2001.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K. M. Natural products as a source of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 66, p. 1002-1037, 2003.

OBERLIES, N. H.; BURGESS, J. P.; NAVARRO, H. A.; PINOS, R. E.; FAIRCHILD, C. R.; PETERSON, R. W.; SOEJARTO, D. D.; FARNSWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D.; WANI, M. C.; WALL, M. E. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 65, n. 2, p. 95-99, 2002.

OLIVEIRA, P. S. M.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. V. N. Utilização do D-manitol em síntese orgânica. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 441-452, 2009.

PAULA, V. F.; BARBOSA, L. C. A.; PILÓ-VELOSO, D.; DEMUNER, A. J.; HOWARTH, O. Constituintes químicos da casca de *Ochroma lagopus* swartz (Bombacaceae). **Eclética Química**, Araraquara, v. 23, 1998.

PRAKASH, C. V. S.; HOCH, J. M.; KINGSTON, D. G. I. Structure and Stereochemistry of New Cytotoxic Clerodane Diterpenoids from the Bark of *Casearia lucida* from the Madagascar Rainforest. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 65, p. 100-107, 2002.

RECIO, M. del C.; GINER, R. M.; MÁÑEZ, S.; TALENS, A.; CUBELLS, L.; GUENO, J.; JULIEN, H. R.; HOSTETTMANN, K.; RIOS, J. L. Anti-inflammatory activity of flavonol glycosides from *Erythrospermum monticolum* depending on single or repeat local TPA administration. **Planta medica**, Stuttgart, v. 61, p. 502-504, 1995.

ROMEIRO, R. de S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: Ed. UFV, 2001.

SANTOS, A. G. dos.; PEREZ, C. A.; TININIS, A. G.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J. Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1100-1103, 2007.

SCALLIET, G.; PIOLA, F.; DOUADY, C.J.; RÉTY, S.; RAYMOND, O.; BAUDINO, S.; BORDJI, K.; BENDAHMANE, M.; DUMAS, C.; COCK, J.M.; HUGUENEY, P. Scent Evolution in Chenese roses. **PNAS**, Washington, v. 105, n. 15, p. 5927-5932, 2008. Disponível em <<http://www.pnas.org>> Acesso em: 29/09/2009

SEIGLER, D. S. **Plant secondary metabolism**. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers, 759p, 2002.

SHAARI, K.; WATERMAN, P. G. Glucosides of 2,5-dihidroxibenzil alcohol from *Homalium longifolium*. **Phytochemistry**, New York, v. 39, n. 6, p. 1415-1421, 1995.

SHAARI, K.; WATERMAN, P. G. D:A-Friedo-oleanane triterpenes from the stem of *Homalium longifolium*. **Phytochemistry**, New York, v. 41, n. 3, p. 867-869, 1996.

SILVA, S. L. da.; CHAAR, J. da S.; FIGUEIREDO, P. de M. S.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cell and erythrocytes. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 38, n. 1, p.107-112, 2008.

SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G.; GARCEZ, W. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanni* – ANNONACEAE, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 5, p. 557-559, 1998.

SOBRAL, M.; JARENKOW, J. A.; BRACK, P.; IRGANG, B.; LAROCCA, J.; RODRIGUES, R. S. **Flora arbórea e arborescente do Rio Grande do Sul**. Novo Ambiente Editora: Porto Alegre, 2006.

TANG, W.; WEI, X.; XU, H.; ZENG, D.; LONG, L. 13-Deoxytol A, a new insecticidal isoryanodane diterpene from the seeds of *Itoa orientalis*. **Fitoterapia**, v. 80, p. 286-289, 2009.

THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Londres, v. 141, p. 399-436, 2003.

VIEIRA JUNIOR, G. M.; GONCALVES, T. O DE.; REGASINI, L. O.; FERREIRA, P. M. P.; PESSOA, C. DO O.; LOTUFO, L. V. C.; TORRES, R. B.; BORALLE, N.; BOLZANI, V. DA S.; CAVALHEIRO A. J. Cytotoxic Clerodane Diterpenoids from *Casearia obliqua*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 72, p. 1847–1850, 2009.

WANG, W.; ALI, Z.; LI, X.; SMILLIE, T. A.; GUO, D.; KHAN, I. A. New clerodane diterpenoids from *Casearia sylvestris*. **Fitoterapia**, v. 80, p. 404-407, 2009a.

WANG, W.; ALI, Z.; LI, X.; KHAN, I. A. Clerodane and *ent*-kaurane diterpene glycosyl and glycoside derivatives from leaves of *Casearia sylvestris*. **Helvetica Chimica Acta**, Zürich, v. 92, p. 1829-1839, 2009b.

WILLIAMS, R. B.; NORRIS, A.; MILLER, J. S.; BIRKINSHAW, C.; RATOVOSON, F.; ANDRIANTSIFERANA, R.; RASAMISON, V. E.; KINGSTON, D. G. I. Cytotoxic clerodane diterpenoids and their hydrolysis products from *Casearia nigrescens* from the rainforest of Madagascar. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 70, p. 206-209, 2007.

WISSELINK, H. A., WEUSTHUIS, G., EGGINK, G., HUGENHOLTZ, J.; GROBBEN, G. J. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 151-161, 2002.

WUBE, A. A.; BUCAR, F.; GIBBONS, S.; ASRES, K. Sesquiterpenes from *Warburgia ugandensis* and their antimycobacterial activity. **Phytochemistry**, New York, v. 66, p. 2309-2315, 2005.

XING-YUN, C.; YA-NAN, L.; HONG-YAN, R.; PENG-FEI, T. Advances in studies on chemical constituents and bioactivities of plants from Flacourtiaceae. **China journal of Chinese materia medica**, v. 31, n. 4, p. 269-79, 2006.

XU, Z. R.; YA-NAN, C.; XING-YUN; HONG-YAN, R.; PENG-FEI, P. Chemical constituents from *Xylosma controversum*. **Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 3, p. 218-222, 2007.

XU, Z.; CHAI, X.; BAI, C.; REN, H.; LU, Y.; SHI, H.; TU, P. Xylocosides A-G, phenolic glucosides from the stems of *Xylosma controversum*. **Helvetica chimica acta**, Zürich, v. 91, p. 1346-1354, 2008.

YU, F. **A chinese medicinal pill for treating cancer, and preparation method thereof.** Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu (1995), CODEN: CNXXEV CN 1107067 A 19950823 Patent written in Chinese

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Novas perspectivas dos produtos naturais na química medicinal moderna. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. (Orgs.) **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia.** Itajaí: Editora Univali, 2007.

ZENG, X. **Chinese medicine for treatment of abdominal pain and diarrhea.** (Peop. Rep. China). Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu (2008), 33pp. CODEN: CNXXEV CN 101152307 A 20080402 Patent written in Chinese

ZIEGLER, H. L.; STAERK, D.; CHRISTENSEN, J.; OLSEN, C. E.; SITTIE, A. A.; JAROSZEWSKI, J. W. New Dammarane and Malabaricane Triterpenes from *Caloncoba echinata*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 65, p. 1764-1768, 2002.