

CRISTINA MAYUMI SASAKI

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ALELOPÁTICAS E  
ANTIMICROBIANAS DAS PARTES AÉREAS DE *Pterocaulon lorentzii* Malme  
(ASTERACEAE)

CURITIBA

2008

CRISTINA MAYUMI SASAKI

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ALELOPÁTICAS E  
ANTIMICROBIANAS DAS PARTES AÉREAS DE *Pterocaulon lorentzii* Malme  
(ASTERACEAE)

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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marilis Dallarmi Miguel

CURITIBA

2008

"Nada assenta melhor ao corpo que o  
crescimento do espírito."  
(Provérbio Chinês)

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal do Paraná

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Ao Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel pela orientação, ensinamentos, confiança, constante presença e acima de tudo pela amizade.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilis Dallarmi Miguel, pela co-orientação, acompanhamento e revisão do trabalho.

Ao Botânico Gert Hatschbach e Biólogo Osmar do Santos Ribas pelas informações, identificação e depósito do exemplar da espécie em estudo.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Luísa Lacava Lordello, do Departamento de Química da UFPR, pela contribuição na obtenção dos espectros de RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C.

Ao Laboratório de RMN da Universidade Estadual de Maringá pelos espectros de ressonância magnética nuclear.

Ao Dr. João Luis de Souza Carvalho, pela trituração do material vegetal e pelo companheirismo.

Ao Laboratório de Controle de Qualidade II da UFPR, representado pela Prof<sup>a</sup>. Wanda N. Abrahão e Geni Peruzzo, pela cooperação na avaliação da atividade antimicrobiana.

Ao Laboratório de Farmacotécnica e à Msc. Josiane de Fátima Gaspari Dias pela orientação na avaliação da atividade alelopática.

Ao funcionário da UFPR Paulo Sérgio Diniz pela contribuição com o desenvolvimento do trabalho.

À Doutoranda Cláudia Alexandra Andrade pela amizade e companheirismo.

À Farmacêutica Karina Bora pela intensa contribuição a este trabalho.

A todos os funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, que de formas diversas contribuíram para este trabalho.

A todos os colegas do mestrado pela amizade, em especial à minha amiga Flávia Raphaela Nass pela amizade incondicional.

À minha família, pelo apoio, incentivo e suporte.

Ao meu noivo, Key, pelo companheirismo, compreensão e incessante apoio.

E à Deus.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	19
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	20
3.1 ASPECTOS BOTÂNICOS.....	20
3.1.1 Taxonomia.....	20
3.1.2 Morfologia.....	22
3.1.2.1 Gênero <i>Pterocaulon</i> .....	22
3.1.2.2 <i>Pterocaulon lorentzii</i> Malme .....	22
3.1.3 Aspectos Etnofarmacológicos.....	25
3.1.4 Atividade Antimicrobiana.....	25
3.1.5 Atividade Antiviral.....	26
3.1.6 Atividade Citotóxica.....	26
3.1.7 Atividade Inseticida.....	26
3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	27
3.2.1 Cumarinas.....	27
3.2.2 Flavonóides.....	30
3.2.3 Triterpenos.....	33
3.3 COMPOSTOS IDENTIFICADOS EM ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Pterocaulon</i> .....	34
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
4.1 MATERIAL VEGETAL.....	38
4.2 ESTUDOS FITOQUÍMICOS.....	38
4.2.1 Ensaio Sistemático de Análise em Fitoquímica.....	38
4.2.1.1. Preparo do extrato hidroalcoólico a 20%.....	39
4.2.1.2. Preparo do extrato aquoso a 20%.....	39
4.2.1.3. Pesquisa de alcalóides.....	39
4.2.1.4. Pesquisa de ácidos orgânicos.....	40
4.2.1.5. Pesquisa de fenóis.....	40
4.2.1.6. Pesquisa de flavonóides.....	40

4.2.1.7. Pesquisa de cumarinas.....	40
4.2.1.8. Pesquisa de antraquinonas.....	41
4.2.1.9. Pesquisa de esteróis e triterpenos.....	41
4.2.1.10. Pesquisa de heterosídeos antociânicos.....	41
4.2.1.11. Pesquisa de heterosídeos saponínicos.....	42
4.2.1.12. Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos.....	42
4.2.1.13. Pesquisa de gomas, taninos e mucilagens.....	42
4.2.1.14. Pesquisa de taninos.....	42
4.2.1.15. Pesquisa de aminogrupos.....	43
4.2.1.16. Pesquisa de ácidos voláteis.....	43
4.2.1.17. Pesquisa de ácidos fixos.....	43
4.2.2 Determinação do Teor de Sólidos.....	44
4.2.3 Extração de Óleo Essencial.....	45
4.2.4 Obtenção do Extrato em Aparelho de Soxhlet Modificado.....	45
4.2.5 Obtenção das Frações.....	46
4.2.6 Obtenção do Resíduo Seco.....	47
4.2.7 Isolamento das Substâncias.....	47
4.2.7.1 Cromatografia líquida em coluna.....	47
4.2.7.2 Cromatografia em camada delgada.....	48
4.2.8 Elucidação Estrutural.....	48
4.2.8.1 Espectroscopia de absorção no ultravioleta.....	48
4.2.8.2 Espectroscopia de absorção em infravermelho.....	48
4.2.8.3 Espectroscopia de ressonância nuclear magnética de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C.....	49
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	49
4.3.1 Método da Concentração Mínima Inibitória (CMI).....	49
4.3.1.1 Preparo do inoculo.....	50
4.3.1.2 Preparo das amostras e do teste.....	50
4.3.2 Método de Autobiografia.....	50
4.3.2.1 Preparo do inoculo.....	51
4.3.2.2 Preparo das amostras e do teste.....	51
4.4 ESTUDO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA.....	52
4.4.1 Germinação.....	53
4.4.2 Crescimento.....	55

<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	56
5.1 ESTUDO FITOQUÍMICO.....	56
5.1.1 Ensaio Sistemático de Análise em Fitoquímica.....	56
5.1.2 Determinação de Teor de Sólidos.....	57
5.1.3 Óleo Essencial.....	57
5.1.4 Análise Cromatográfica.....	57
5.1.4.1 Fração hexano.....	58
5.1.4.1.1 Análise dos cristais 3-o-acetil-pseudotaraxasterol.....	58
5.1.4.1.2 Análise dos cristais de taraxasterol e pseudotaraxasterol.....	66
5.1.4.1.3 Análise dos cristais de undecan-1-ol.....	72
5.1.4.1.4 Análise dos cristais do dodecilociclohexano.....	78
5.1.4.2 Fração clorofórmio.....	83
5.1.4.3 Fração acetato de etila.....	98
5.1.5 Atividade Antimicrobiana.....	101
5.1.5.1 Método da Concentração Mínima Inibitória (CMI).....	101
5.1.5.2 Método de Autobiografia.....	102
5.1.6 Atividade Alelopática .....	105
5.1.6.1 Avaliação da germinação.....	105
5.1.6.2 Avaliação do crescimento.....	106
<b>CONCLUSÃO</b> .....	110
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	111



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	REGIÕES ONDE SE ENCONTRA O GÊNERO <i>Pterocaulon</i> .....	21
FIGURA 2 -	REGIÕES ONDE SE ENCONTRA A ESPÉCIE <i>Pterocaulon lorentzii</i> MALME.....	23
FIGURA 3 -	FOTOGRAFIA DE <i>Pterocaulon lorentzii</i> Malme NO MUNICÍPIO DE PIÇARRAS, ESTADO DE SANTA CATARINA.....	24
FIGURA 4 -	FOTOGRAFIA DE DETALHE DA INFLORESCÊNCIA DE <i>Pterocaulon lorentzii</i> Malme .....	24
FIGURA 5 -	METABOLISMO DAS CUMARINAS.....	28
FIGURA 6 -	ESTRUTURA QUÍMICA DA ESCOPOLETINA.....	29
FIGURA 7 -	BIOSSÍNTESE DOS FLAVONÓIDES.....	31
FIGURA 8 -	ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS QUERCETINA E MEDICARPINA.....	32
FIGURA 9 -	BIOSSÍNTESE DE TRITERPENOS PENTACÍCLICOS.....	33
FIGURA 10 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO TARAXASTEROL.....	34
FIGURA 11 -	ESTRUTURAS QUÍMICAS DE PURPURENOL E PURPURASOL.....	35
FIGURA 12 -	ESTRUTURAS QUÍMICAS DE SABANDINOL E SABANDINONA.....	36
FIGURA 13 -	ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS (1) E (2).....	36
FIGURA 14 -	ESTRUTURAS QUÍMICAS DO CRISOSFENOL.....	37
FIGURA 15 -	ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS CUMARINAS (3), (4) E (5).....	37
FIGURA 16 -	APARELHO DE SOXHLET MODIFICADO.....	45
FIGURA 17 -	APARELHO DE SOXHLET ADAPTADO PARA PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	46
FIGURA 18 -	ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DO 3-O- ACETIL-PSEUDOTARAXASTEROL.....	59
FIGURA 19 -	ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DO 3-O-ACETIL- PSEUDOTARAXASTEROL.....	61
FIGURA 20 -	ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DO 3-O-ACETIL- PSEUDOTARAXASTEROL.....	63
FIGURA 21 -	ESPECTRO DE RMN DE DEPT E <sup>13</sup> C DO 3-O-ACETIL- PSEUDOTARAXASTEROL.....	64
FIGURA 22 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO 3-O-ACETIL-PSEUDOTARAXASTEROL	65
FIGURA 23 -	ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DA MISTURA DE TARAXASTEROL E PSEUDOTARAXASTEROL.....	67

FIGURA 24 -	ESPECTRO DE RMN DE DEPT E <sup>13</sup> C DA MISTURA DE TARAXASTEROL E PSEUDOTARAXASTEROL.....	69
FIGURA 25 -	ESPECTRO DEPT 135° DE RMN DA MISTURA DE TARAXASTEROL E PSEUDOTARAXASTEROL.....	70
FIGURA 26 -	EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DA MISTURA DE TARAXASTEROL E PSEUDOTARAXASTEROL.....	71
FIGURA 27 -	IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA COMPOSIÇÃO DE TRITERPENOS PRESENTES NOS CRISTAIS DE FH2.....	72
FIGURA 28 -	ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DO UNDECAN-1-OL.....	73
FIGURA 29 -	EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DO UNDECAN-1-OL	74
FIGURA 30 -	ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DO UNDECAN-1-OL.....	76
FIGURA 31 -	EXPANSÕES DO ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DO UNDECAN-1-OL DE δ 14 – δ 29 ppm E δ 29 – δ 33 ppm.....	77
FIGURA 32 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO PALMÍTICO E PROPOSTA PARA SUBSTÂNCIA FH3.....	78
FIGURA 33 -	ESPECTRO DE RMN DO DODECILCICLOHEXANO.....	79
FIGURA 34 -	EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H DO DODECILCICLOHEXANO.....	80
FIGURA 35 -	ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DO DODECILCICLOHEXANO.....	81
FIGURA 36 -	ESPECTROS DE EXPANSÃO DE RMN DE <sup>13</sup> C DO DODECILCICLOHEXANO DE δ14 – δ 25 ppm E δ 29 – δ 37 ppm..	82
FIGURA 37 -	ESTRUTURA QUÍMICA PROPOSTA PARA A SUBSTÂNCIA FH4.....	83
FIGURA 38 -	ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DO SABANDINOL.....	84
FIGURA 39 -	ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DO SABANDINOL.....	86
FIGURA 40 -	ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DO SABANDINOL.....	87
FIGURA 41 -	ESPECTRO DEPT 135° DE RMN DE <sup>13</sup> C DO SABANDINOL.....	89
FIGURA 42 -	MAPAS DE CONTORNO DO HMQC DO SABANDINOL.....	90
FIGURA 43 -	MAPAS DE CONTORNO DO HMQC DO SABANDINOL.....	91
FIGURA 44 -	MAPAS DE CONTORNO DO HMQC DO SABANDINOL.....	92
FIGURA 45 -	MAPAS DE CONTORNO DO HMQC DO SABANDINOL.....	93
FIGURA 46 -	ESPECTROS COSY DO SABANDINOL.....	94
FIGURA 47 -	EXPANSÕES DO ESPECTRO COSY DO SABANDINOL.....	95
FIGURA 48 -	EXPANSÕES DO ESPECTRO COSY DO SABANDINOL.....	96
FIGURA 49 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO SABANDINOL.....	97

FIGURA 50 -	ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DA QUERCETINA.....	98
FIGURA 51 -	ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DA QUERCETINA.....	99
FIGURA 52 -	ESTRUTURA QUÍMICA DA QUERCETINA.....	100
FIGURA 53 -	INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO EM BIOAUTOGRAFIA ADAPTADA DOS EXTRATOS TOTAL E HEXÂNICO E 3-O-ACETIL-PSEUDOTARAXASTEROL.....	101
FIGURA 54 -	INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO EM BIOAUTOGRAFIA ADAPTADA DO EXTRATO TOTAL, FRAÇÃO HEXÂNICA E 3-O-ACETIL-PSEUDOTARAXASTEROL.....	103
FIGURA 55 -	INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO EM BIOAUTOGRAFIA ADAPTADA DOS EXTRATOS TOTAL E HEXÂNICO E 3-O-ACETIL-PSEUDOTARAXASTEROL.....	104

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS APLICADAS NAS CROMATOPLACAS PARA ANÁLISE DE AUTOBIOGRAFIA.....	51
TABELA 2 -	MARCHA SISTEMÁTICA FITOQUÍMICA DE <i>Pterocaulon lorentzii</i> Malme.....	56
TABELA 3 -	RENDIMENTO DAS FRAÇÕES ESTRAÍDAS POR SOXHLET.....	58
TABELA 4 -	DADOS DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE <sup>13</sup> C (δ EM PPM, CDCL <sub>3</sub> ) PARA COMPARAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS 3-O-ACETIL-TARAXASTEROL (HEEMANN, 2002) E PSEUDOTARAXASTEROL (MAHATO <i>et al.</i> , 1994) ENCONTRADOS NA LITERATURA COM FH1.....	62
TABELA 5 -	DADOS DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE <sup>13</sup> C (δ EM PPM, CDCL <sub>3</sub> ) PARA PSEUDOTARAXASTEROL E TARAXASTEROL ISOLADOS COMPARADOS COM OS DA LITERATURA (MAHATO <i>et al.</i> , 1994).....	68
TABELA 6 -	DADOS DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE <sup>13</sup> C (δ EM PPM, CDCL <sub>3</sub> ) PARA A SUBSTÂNCIA FH3 COMPARADO COM O ÁCIDO PALMÍTICO DA LITERATURA (MONTRUCHIO, 2001).....	75
TABELA 7 -	DESLOCAMENTO QUÍMICO DE RMN <sup>13</sup> C DA SUBSTÂNCIA FC1 COMPARADO AOS DADOS DE SABANDINOL DA LITERATURA (HEEMANN, 2002).....	88
TABELA 8 -	RESULTADOS DO TESTE DE AUTOBIOGRAFIA.....	102
TABELA 9 -	TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NOS ÍNDICES DE GERMINAÇÃO DE <i>Lactuca sativa</i> NO ENSAIO ALELOPÁTICO COM EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DAS PARTES AÉREAS DE <i>Pterocaulon lorentzii</i> Malme.....	105
TABELA 10 -	TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE <i>Lactuca sativa</i> NO ENSAIO ALELOPÁTICO COM EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DAS PARTES AÉREAS DE <i>Pterocaulon lorentzii</i> Malme.....	107

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 -	MÉDIAS DE GERMINAÇÃO DE <i>Lactuca sativa</i> SUBMETIDA A ENSAIO ALELOPÁTICO COM OS EXTRATOS ET, EA, EH E AS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS FH1, FC1 E FC2.....	106
GRÁFICO 2 -	MÉDIAS DE CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE <i>Lactuca sativa</i> SUBMETIDA A ENSAIO ALELOPÁTICO COM OS EXTRATOS ET, EA, EH E AS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS FH1, FC1 E FC2.....	108
GRÁFICO 3 -	MÉDIAS DE CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE <i>Lactuca sativa</i> SUBMETIDA A ENSAIO ALELOPÁTICO COM OS EXTRATOS ET, EA, EH E AS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS FH1, FC1 E FC2.....	108

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Colection</i>
AlCl <sub>3</sub>	Cloreto de Alumínio
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio Deuterado
CG	Cromatografia gasosa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a Espectrofotômetro de Massa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
°C	Grau Celsius
D.C.	De Candolle
E M	Espectrômetro de Massa
HCl	Ácido Clorídrico
HPLC	High Performance Liquid Cromatography
IV	Infravermelho
µL	Microlitro
mmHg	Milímetros de Mercúrio
N	Normal
NEU	Reativo 2-aminoetilbutirato
nm	Nanômetros
P A	Para Análise
pH	Potencial Hidrogeniônico
RNM <sup>1</sup> H	Ressonância Nuclear Magnética de Hidrogênio
RNM <sup>13</sup> C	Ressonância Nuclear Magnética de Carbono 13
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
UV	Ultravioleta

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo contribuir para o estudo fitoquímico, alelopático e das propriedades antimicrobianas das partes aéreas de *Pterocaulon lorentzii* Malme. A extração e o particionamento foram realizados em aparelho de Soxhlet modificado. A análise dos extratos permitiu o isolamento das seguintes substâncias: 3-O-acetil-pseudotaraxasterol (triterpeno); mistura de taraxasterol e pseudotaraxasterol (triterpeno); sabandinol (cumarina); quercetina (flavonol); undecan-1-ol (álcool graxo) e tridecilociclohexano (hidrocarboneto). Composição esta reportada pela primeira vez na espécie. O estudo antimicrobiano revelou que os extratos da planta apresentam potencial inibitório para a germinação de *Lactuca sativa*, porém, suas substâncias isoladas não o possuem. As propriedades antimicrobianas da espécie em estudo concentram-se no extrato total, na fração hexano e na substância isolada 3-O-acetil-pseudotaraxastero, que inibem o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Palavras-chave: Asteraceae; *Pterocaulon*; Triterpenos; Cumarinas; Atividade Antimicrobiana; Atividade Alelopática.

## ABSTRACT

The objective of this project is to contribute to the studies of phytochemical, allelopathic and antimicrobial properties of this species' aerial part. The extraction and partition were accomplished by using a modified Soxhlet apparatus. The analysis of the extracts allowed the isolation of the following substances: 3-O-acetyl-pseudotaraxasterol (triterpene); mix of taraxasterol and pseudotaraxasterol (triterpene); sabandinol (coumarin); quercetin (flavonol); undecan-1-ol (fatty alcohol) and tridecylcyclohexane (hydrocarbon). For the first time this composition is reported scientifically in this species. The allelopathic study denoted that the extracts of the plant have potential to inhibit *Lactuca sativa* germination, however the isolated substances do not result in the same inhibition as well. The antibiotic properties of *P. lorentzii* Malme are concentrated on the total extract, hexane fraction and on the 3-O-acetyl-pseudotaraxasterol which inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords: Asteraceae; *Pterocaulon*; Triterpenes; Coumarins; Antibiotic Activities; Allelopathic Activities.



## 1 INTRODUÇÃO

A busca por novos medicamentos tem impulsionado a pesquisa científica de plantas medicinais para obtenção de novos fármacos. Isto tem motivado diversos grupos de pesquisa a direcionar esforços para o desenvolvimento de novas técnicas para identificação e purificação de compostos químicos.

Neste sentido, o estudo sistemático dos metabólitos secundários que ocorrem em determinada família ou gênero, conhecido como quimiotaxonomia, juntamente com as observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das propriedades terapêuticas dos vegetais. Isto mantém em voga a prática do consumo de fitoterápicos e torna válidas as informações que foram sendo acumuladas durante séculos (NUNES JUNIOR, 1988; STEIN, 2005).

A biodiversidade da pouco explorada flora brasileira mostra grandes fontes de obtenção de ativos, no que se trata de fitoterápicos. Essa realidade pode ser observada na cultura popular em que estas plantas são usadas para o tratamento das mais diversas enfermidades, principalmente nos países em ascensão sócio-econômica.

Os vegetais têm sido considerados reservatórios potenciais de fármacos e a partir do isolamento e da identificação estrutural das substâncias ativas vegetais, é possível recriá-los por síntese total em laboratório, ou utilizar a substância isolada como material de partida para a criação de estruturas químicas diferentes obtidas por procedimentos de modelagem molecular (HEEMANN, 2002).

As espécies da família Asteraceae produzem freqüentemente poliacetilenos, óleos essenciais e terpenos, sendo que a larga ocorrência de lactonas sesquiterpênicas é a característica química mais marcante da família. São conhecidas mais de 2500 (dois mil e quinhentos) lactonas, a maioria isolada de Asteraceae. Muitas apresentam atividade antitumoral, mas nenhuma com emprego clínico. Apresentam também atividades antibacteriana, antifúngica, anti-helmíntica, antiinflamatória e antipirética. Muitas são conhecidas por causarem dermatite, enquanto outras inibem a penetração da cercária de *Schistosoma mansoni*. A presença de óleos essenciais e lactonas sesquiterpênicas poderia ser responsável

pelo uso popular contra dores, febres, indigestão e doenças infecciosas (STEFANELLO, 1993).

As partes aéreas de *Pterocaulon purpurascens* Malme e de *Pterocaulon virgatum* (L.) DC. são utilizadas na medicina popular argentina devido suas propriedades digestivas, emenagogas, inseticidas e como agente contra picada de cobras. Além destas características, as partes aéreas do *Pterocaulon polystachium* são empregadas como repelentes de insetos e seu decocto é usado em casos de insolação (DEBENEDETTI, 1992; DEBENEDETTI, 1994a).

MONGELLI *et al.*, 2000 realizaram estudos sobre a citotoxicidade e atividades de interação com DNA de extratos de plantas medicinais utilizadas na Argentina. Os estudos demonstraram que o *Pterocaulon polystachium* possui atividade em células de carcinoma epidermóide oral humano e DNA, sugerindo a presença de compostos que interagem com o material genético.

No levantamento bibliográfico realizado até o momento, não foram encontradas descrições sobre a espécie *Pterocaulon lorentzii* Malme, planta encontrada na biodiversidade do território nacional, o que justifica a importância do trabalho proposto.

Considerando o estudo realizado sobre outras espécies deste gênero, verifica-se concentração significativa de alguns compostos químicos de grande interesse farmacológico e industrial. Dentre eles cumarinas, esteróides e flavonóides.

O estudo da espécie *Pterocaulon lorentzii* Malme visa à identificação e quantificação destas substâncias presentes e conseqüentemente sua ação farmacológica, tendo em vista ser uma espécie empregada na medicina popular.

A pesquisa científica de plantas medicinais empregadas na terapêutica possui caráter multi e interdisciplinar, sendo este aspecto fundamental para o desenvolvimento de estudos mais elaborados e de maior rigor técnico-científico, de modo a atender as exigências da legislação referente ao desenvolvimento e registro de fitoterápicos (HEEMANN, 2002).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para o conhecimento sistemático dos metabólitos secundários de *Pterocaulon lorentzii* Malme, Asteraceae.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Coletar e identificar botanicamente a espécie;
- ❖ Isolar e identificar os principais metabólitos de *P. lorentzii* por meio de técnicas cromatográficas e recristalização;
- ❖ Determinação da estrutura química de compostos isolados utilizando técnicas espectroscópicas em UV, IV, RMN H<sup>1</sup> e C<sup>13</sup>;
- ❖ Avaliar a atividade alelopática dos extrato, frações e substâncias isoladas;
- ❖ Avaliar a atividade antimicrobiana dos extrato, frações e substâncias isoladas.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

A principal contribuição da fitoquímica enquanto ciência, neste último século foi a orientação dos estudos para a determinação de novas estruturas dos metabólitos secundários e suas possíveis funções nas plantas, esclarecendo os mecanismos de biossíntese e desenvolvendo a quimiotaxonomia (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001).

Um importante método de pesquisa de fármacos é a química combinatória que se fundamentou teoricamente na síntese de proteínas com funções especiais a partir de alguns poucos aminoácidos. Entretanto, este método ainda está longe de alcançar as combinações químicas que a evolução biológica e a seleção natural realizaram durante milhões de anos de forma realmente inigualável (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001).

Os compostos oriundos de fontes vegetais estruturalmente definidos são facilmente identificados a partir de seus extratos por métodos de *screening* (análise detalhada e precisa). Alguns métodos exigem determinado grau de pureza dos compostos ou preparo prévio das amostras (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001). Entre eles podemos citar a análise por Ressonância Nuclear Magnética (RMN), Espectrometria de Massa e Cromatografia, métodos estes que procuram diminuir cada vez mais o tempo de isolamento e determinação estrutural dos compostos naturais ativos.

#### 3.1 ASPECTOS BOTÂNICOS

##### 3.1.1 Taxonomia

A família Compositae ou Asteraceae compreende cerca de 1.100 (mil e cem) gêneros, com aproximadamente 23.000 (vinte e três mil) espécies distribuídas em 03 (três) subfamílias: Barnadesioideae, Cichorioideae e Asteroideae, com ampla distribuição e bem representadas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (BARROSO, 1991; JOLY, 1991).

Esta família é cosmopolita e encontrada em grande concentração de espécies em regiões de climas variados. Também são abundantes em regiões montanhosas. Algumas espécies são verdadeiramente aquáticas, mas a maioria é encontrada mais em regiões áridas do que nas florestas tropicais úmidas.

A tribo Inuleae congrega 180 (cento e oitenta) gêneros, com cerca de 2100 (duas mil e cem) espécies, das quais poucas foram detalhadamente investigadas quanto à composição química. Sendo que os tipos de compostos mais encontrados são lactonas sesquiterpênicas, lactonas diterpênicas, flavonóides, poliacetilenos simples e acetilenos mono- e di-tiofênicos (FRIGHETTO, 1983).

Dentre os gêneros citados, o gênero *Pterocaulon* é constituído de 18 (dezoito) espécies, das quais 12 (doze) são americanas e encontram-se espalhadas desde o sul dos Estados Unidos até o centro da Argentina, sendo estas pouco exploradas quimicamente até o momento (CABRERA e RAGONESE, 1978).

MABBERLEY (1987), afirma que o gênero em estudo possui 18 (dezoito) espécies na América, sudeste da Ásia até Austrália (Figura 1).

FIGURA 1 – REGIÕES ONDE SE ENCONTRA O GÊNERO *Pterocaulon*



No estado do Paraná foram identificados na década de 60 quatro espécies de *Pterocaulon* como o *P. alopecuroideum* (Lamarck) DC., *P. angustifolium* DC., *P. interruptum* DC. e *P. rugosum* (Vahl.) Malme (ANGELY, 1965).

### 3.1.2 Morfologia

#### 3.1.2.1 Gênero *Pterocaulon*

O gênero *Pterocaulon* é constituído de ervas, arbustos, árvores baixas ou médias, não é raro trepadeiras perenes, com indumento variado, não secretor ou glanduloso, com abundantes princípios ativos muito diversificados, incluindo inulina, alcalóides, com ou sem sistema de canais lactíferos e condutos ou depósitos, esquizolisígenos de resina, freqüentemente com floema ou canais vasculares em uma medula (SALINAS, 1992).

As espécies apresentam involúcro comprimido, formado por poucas séries de brácteas linear-lanceoladas, sendo as exteriores gradualmente menores, caducas com as flores. Receptáculo pequeno, hisurto ou glabro. Flores dimorfas: as marginais pluriseriadas, femininas, com corolas filiformes truncadas ou com 2 a 3 dentes no ápice; as centrais são poucas, hermafroditas ou masculinas por esterilidade do gineceu, com corola tubulosa estreita, pentadenteada no limbo. Folhas alternadas inteiras ou dentadas, decurrentes resultando em caule alado. Capítulos pequenos sésseis, dispostos em glomérulos terminais ou em espigas mais ou menos densas (CABRERA, 1963).

#### 3.1.2.2 *Pterocaulon lorentzii* Malme

Pouco se sabe sobre a espécie *Pterocaulon lorentzii* Malme (Asteraceae). De acordo com o Missouri Botanical Garden, os primeiros registros da espécie datam de 1901. E, segundo esta mesma entidade, a espécie em estudo foi encontrada em diversas regiões da América do Sul como mostra figura 2.

FIGURA 2 – REGIÕES ONDE SE ENCONTRA A ESPÉCIE *Pterocaulon lorentzii* MALME



FONTE: MOBOT, 2006.

De acordo com informações da Secretaria de Minérios da Argentina, esta espécie em estudo é chamada popularmente como ‘Yerba infiel’ ou ‘Tuyá’. E de acordo com O Museu Botânico Municipal de Curitiba ‘Calção de Velho’ é o nome dado à espécie na região sul do Brasil, onde também seu decocto é popularmente utilizado em banhos de acento para aliviar os sintomas de hemorróidas.

Como descrito na morfologia do gênero, a espécie *Pterocaulon lorentzii* Malme segue as mesmas características morfoanatômicas (Figura 3 e 4).

FIGURA 3 – FOTOGRAFIA DE *Pterocaulon lorentzii* Malme NO MUNICÍPIO DE PIÇARRAS, ESTADO DE SANTA CATARINA



FONTE: MIGUEL, 2006.

FIGURA 4 – FOTOGRAFIA DE DETALHE DA INFLORESCÊNCIA DE *Pterocaulon lorentzii* Malme



FONTE: MIGUEL, 2006



### 3.1.3 Aspectos Etnofarmacológicos

Na Argentina, como em muitos países sulamericanos, as partes aéreas de *Pterocaulon purpurascens* Malme e de *Pterocaulon virgatum* (L.) DC. são utilizadas na medicina popular devido a suas propriedades digestivas, emenagogas, inseticidas e como agente contra picada de cobras. As partes aéreas do *Pterocaulon polystachium* são empregadas como repelentes de insetos e seu decocto é usado em casos de insolação (DEBENEDETTI, 1992; DEBENEDETTI, 1994a).

Estudos revelaram que as partes aéreas de *Pterocaulon sphacelatum* (JOHNS, 1968), *P. virgatum* (DEBENEDETTI, 1981; BOHLMANN, 1981), *P. lanatum* (MAGALHÃES, 1981), *P. balanseae* (MAGALHÃES, 1981), *P. allopecuroides* (NUNES Jr., 1988), *P. interruptum* (HEEMANN, 2002) são compostas por uma série de substâncias entre as quais várias cumarinas, flavonóides e terpenos, como o taraxasterol. Em *P. virgatum* (BOHLMANN, 1981) foram encontrados constituintes poliacetilênicos, compostos fisiologicamente ativos contra vários organismos, como algumas fitoalexinas, tóxicas a fungos (NUNES Jr., 1988).

Espécies como *P. sphacelatum* (Labill.) Benth e *P. serrulatum* (Montr.) Guillaumin têm sido usadas na medicina tradicional pelo povo nativo de diferentes partes da Austrália no tratamento de infecções respiratórias, resfriados, febres, dores de cabeça e doenças de pele (SEMPLE, 1999)

### 3.1.4 Atividade Antimicrobiana

A tradicional antibioticoterapia está caminhando para uma crise de ineficácia devido à resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos, o que aumenta consideravelmente a procura por novas e eficazes substâncias com esta atividade. A investigação química de extratos de plantas e produtos naturais para atividade antimicrobiana tem demonstrado que plantas superiores representam uma fonte potencial de novos agentes antinfeciosos (STEIN, 2005 ; HEEMANN, 2006).

Estudos preliminares revelaram que a espécie *Pterocaulon lorentzii* Malme apresenta atividade antibiótica. Entretanto, ensaios mais detalhados e estudos mais profundos deverão ser realizados para a verificação desta propriedade.

### 3.1.5 Atividade Antiviral

O extrato etanólico bruto das partes aéreas verdes da espécie *Pterocaulon sphacelatum* (Labill.) Benth. & Hook f. ex F. Muell, indicadas na medicina tradicional australiana para uso em resfriados, infecções respiratórias, feridas de pele e doenças oculares, apresentou um flavonóide (crisosfenol) com alta capacidade de inibição do polivírus tipo 1, representante da família Picornaviridae, família de RNA vírus, nos quais são incluídos os rinovírus, principal causa de resfriados (SEMPLE et al., 1999).

### 3.1.6 Atividade Citotóxica

Por meio de ensaio biológico com extrato diclorometano das partes aéreas de *P. polystachyum*, MONGELLI (2000) e colaboradores detectaram atividade citotóxica desta espécie pela inibição do crescimento de células tumorais. Fator este que indica a presença de compostos que apresentam interação com o citoesqueleto das células em estudo.

### 3.1.7 Atividade Inseticida

O uso popular de plantas aromáticas para afastar insetos vem de longa data. Assim como, o uso de extratos vegetais no controle de insetos em hortas domésticas. Estes métodos alternativos significam redução do uso de agrotóxicos, menor agressão ao meio ambiente e conseqüente melhor equilíbrio do ecossistema. Estudos relatados por CICCIA, COUSSIO e MONGELLI em 2000, mostram que espécies do gênero *Pterocaulon*, como *P. polystachyum*, apresentam constituição fitoquímica capaz de inibir a multiplicação das larvas do mosquito *Aedes aegypti*, justificando o uso popular destas plantas.

## 3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A constituição química das espécies vegetais são sintetizadas e degradadas por inúmeras reações anabólicas e catabólicas que compõem o metabolismo vegetal. Este por sua vez pode ser dividido em primário, que reúne os processos de formação de constituintes essenciais à vida e comuns aos vegetais em geral, e o secundário, que se caracteriza pela produção e acumulação de substâncias não comuns a todas as espécies, mas que são específicas formando elementos diferenciados de um determinado metabolismo.

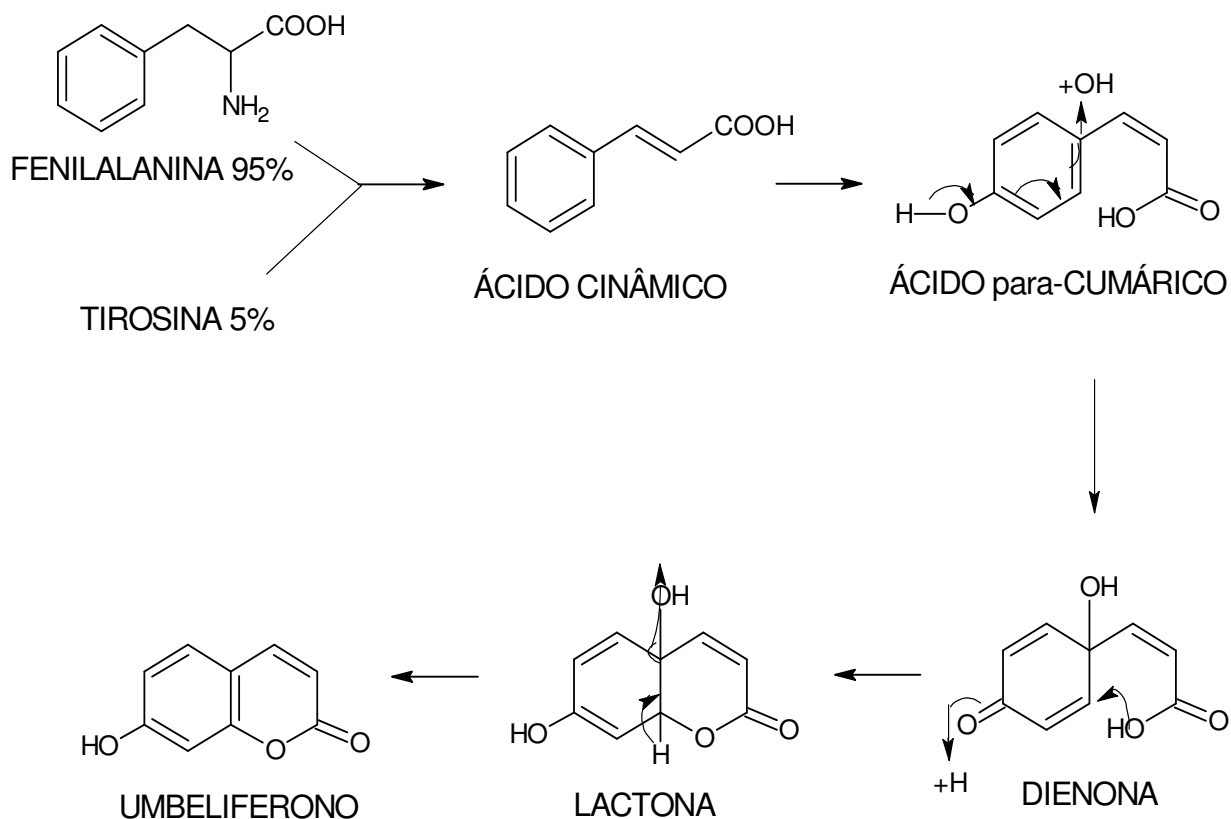
Neste conjunto de substâncias, os metabólitos secundários mais conhecidos e estudados são os alcalóides, terpenos, flavonóides, cumarinas, lactonas, entre outras (DI STASI, 1995).

### 3.2.1 Cumarinas

As cumarinas são moléculas simples que constituem uma importante classe de substâncias naturais com expressiva atividade farmacológica (ASIRI, 2003). Constituem uma classe de metabólitos secundários derivados do ácido cinâmico, amplamente distribuídos no reino vegetal, podendo também ser encontrados em fungos e bactérias.

A partir do ácido cinâmico, o ácido *p*-cumárico sofre um ataque na hidroxila na posição *para* formando uma dienona. Em seguida ocorre uma lactonização na posição *b* da dienona e subsequente desidratação da lactona produzindo o umbeliferono, conforme a figura seguinte (Figura 5).

FIGURA 5 – BIOSÍNTESE DAS CUMARINAS

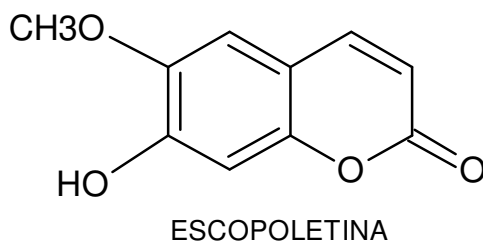


FONTE: SILVA, 1978

A esses compostos atribui-se uma grande variedade de atividades biológicas, como a antimicrobiana, antiviral, antiinflamatória, antiespasmódica, antitumoral e antioxidante, as quais podem estar relacionadas com a inibição da atividade de enzimas, por exemplo, daquelas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico.

São amplamente distribuídas no reino vegetal e representam uma classe de lactonas, com ação antipirética e inibidora da carcinogênese. Algumas cumarinas como a escopoletina (Figura 6) são antiarrítmicas, vasodilatadoras, hipotensoras, espasmolíticas e simpatolíticas (DI STASI, 1995).

FIGURA 6 – ESTRUTURA QUÍMICA DA ESCOPOLETINA



Mais de 1.300 (mil e trezentas) cumarinas já foram isoladas de fontes naturais, sendo que suas propriedades farmacológicas, bioquímicas e aplicações terapêuticas dependem de seus padrões de substituição (EVANS, 1996).

As cumarinas livres, solúveis em álcool, são extraídas com solventes orgânicos como o éter. As formas heterosídicas são ligeiramente solúveis em água. Numerosas cumarinas são arrastadas por vapor d'água. Para sua purificação pode-se atuar sobre as propriedades da lactona, como abertura e solubilização em meio alcalino, fechamento do ciclo em meio ácido.

As cumarinas apresentam espectro UV característico, influído fortemente pela natureza e posição dos substituintes, que se modificam profundamente em meio alcalino. Sob a ação da luz UV, as cumarinas apresentam fluorescência variável, de azul a amarela e a púrpura, ressaltada em presença de amoníaco.

O reconhecimento destes compostos é feito facilmente pelo método de CCD, revelado sob luz UV e reativos como NEU (2-aminoetilbutirato). Podem ser avaliadas por CLAE, CG-EM, e RMN de  $H^1$  e  $C^{13}$ . É possível ainda visualizar as manchas da CCD por densitometria (BRUNETON, 1991).

### 3.2.2 Flavonóides

São, entre os compostos naturais, os mais disseminados em plantas, registrando-se mais de 2000 (dois mil), tanto em estado livre como na forma de glicosídeos. Os flavonóides têm por função descrita na medicina humana, serem compostos antimicrobianos, inseticidas, antioxidantes, agentes alelopáticos e inibidores de enzimas, largamente empregados na medicina atual. Além disso, são produtos do estresse metabólico e muitos desses compostos estão envolvidos principalmente na proteção contra UV e na sinalização entre plantas e seus agentes polinizadores, sendo a coloração das flores um dos principais atrativos.

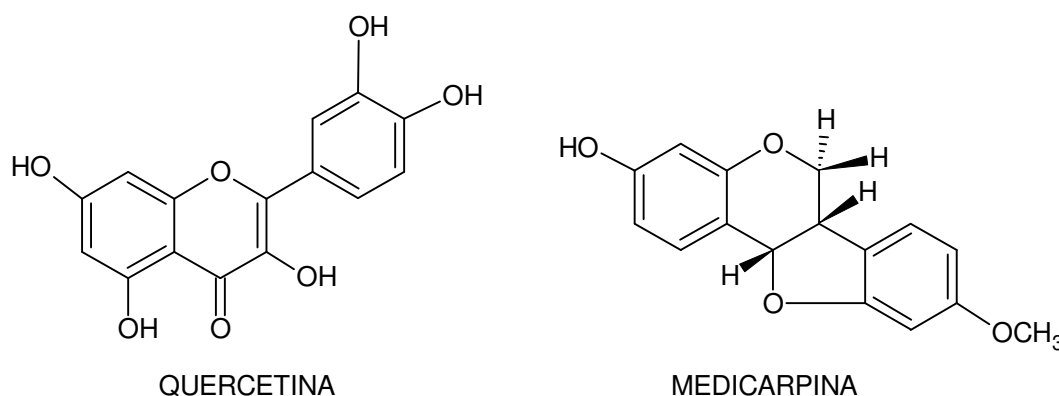
Como marcadores taxonômicos são abundantes, apresentam especificidade em algumas espécies e são de fácil identificação. Economicamente são interessantes na indústria de corantes, tanagem de couro, além do seu valor nutricional.

Também denominados de pigmentos, os flavonóides possuem uma unidade básica de 15 (quinze) carbonos, que inclui dois anéis aromáticos hidroxilados, ligados entre si por um fragmento de 3 (três) carbonos (DI STASI, 1995). Na rota biossintética dos flavonóides participam como intermediários fundamentais a *p*-cumaroil-Coa e 03 (três) unidades de malonil-CoA para alongar a cadeia lateral da unidade fenilpropanoídica original (ROBBERS, SPEEDIE e TYLER, 1997) (Figura 7).

Os flavonóis, por si só, já desempenham um importante papel absorvendo a radiação UVB (280-320 nm) para proteção das plantas. Um conhecido exemplo de flavonol é a quercetina. Os isoflavonóides são também conhecidos como fitoalexinas, ou seja, uma classe de compostos com ação antipatógenos, como por exemplo, a medicarpina, ou inseticida como os rotenóides (Figura 8).



FIGURA 8 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS QUERCETINA E MEDICARPINA



Junto com a vitamina C, a quercetina demonstrou efeitos sinérgicos na função antioxidativa. O ácido ascórbico age como um redutor da oxidação da quercetina, de maneira que combinados, a vitamina C permite uma sobrevivência maior do flavonóide para cumprir suas funções antioxidativas. Por outro lado, a quercetina protege a vitamina E da oxidação, com a qual também apresenta efeitos sinérgicos.

A ação antiinflamatória de muitos flavonóides está no seu mecanismo antioxidante, como o da quercetina sobre a peroxidação lipídica, as enzimas implicadas no metabolismo do ácido araquidônico. No mecanismo antioxidante sobre a da quercetina, está envolvida a via do ácido araquidônico o qual implica uma atividade antiinflamatória paralela (SILVA, 2002).

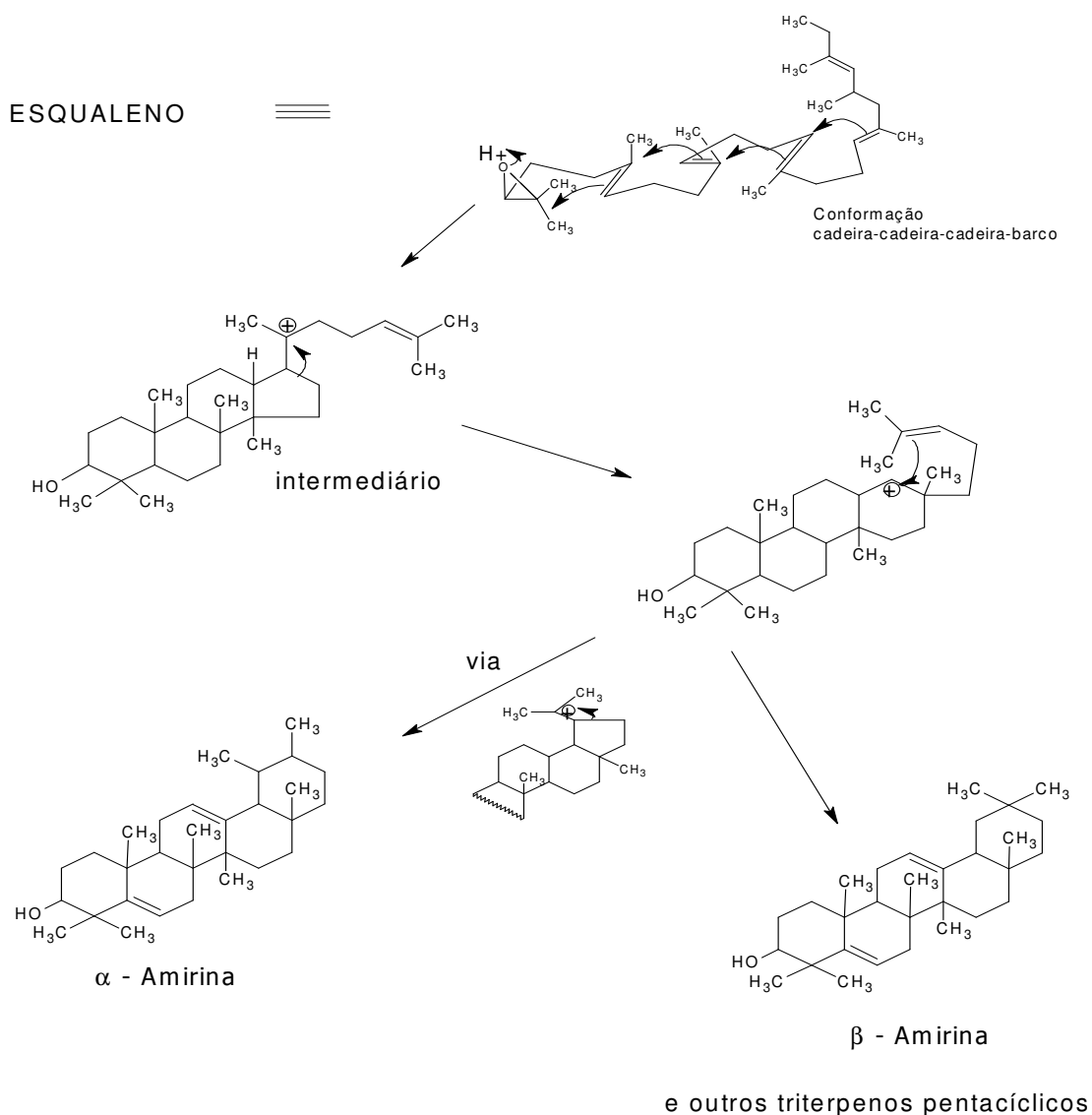
Além das atividades farmacológicas destacadas, os flavonóides são usados também na produção de odores e sabores de alimentos e bebidas de origem vegetal (DI STASI, 1995).



### 3.2.3 Triterpenos

Os triterpenos ocorrem significativamente no reino vegetal. Apresentam uma grande diversidade quanto ao esqueleto e funcionalização que é predominantemente oxigenada (Figura 9). Consistem grandemente de compostos cuja estrutura é policíclica podendo ser tetracíclicos ou pentacíclicos que contém no máximo um ou duas ligações duplas respectivamente. Exemplo dessas substâncias são o Lupeol, a  $\alpha$ -amirina, a  $\beta$ -amirina e a fridolina (OLEA; ROQUE, 1990).

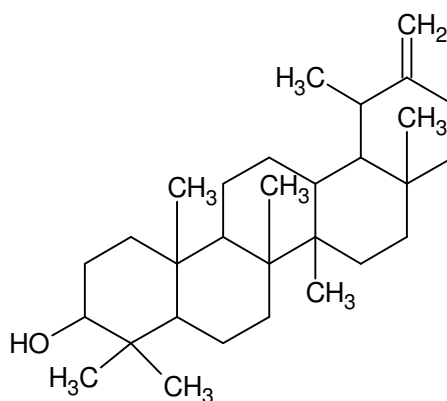
FIGURA 9 – BIOSÍNTESE DE TRITERPENOS PENTACÍCLICOS



FONTE: MANN, 1995

O taraxasterol (Figura 10) é um monoidroxi triterpeno encontrado em raízes de *Cynara cardunculus* L.. Sua distribuição nas plantas não é muito expressiva, mas possui atividade biológica muito interessante, valioso agente preventivo contra a carcinogênese. Além disso, possui atividade antiinflamatória, antimicrobiana e antilipidêmica (GALLOVÁ, 2005).

FIGURA 10 – ESTRUTURA QUÍMICA DO TARAXASTEROL



TARAXASTEROL

### 3.3 COMPOSTOS IDENTIFICADOS EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Pterocaulon*

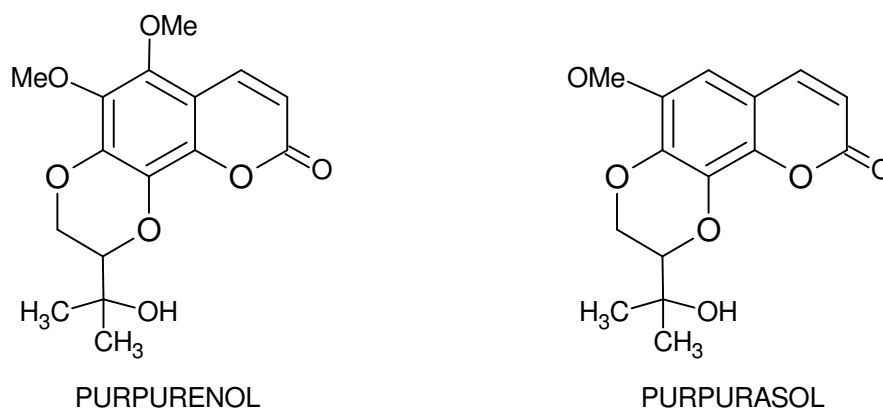
Estudos realizados por diversos autores revelam que grande parte das espécies do gênero em questão apresenta em sua composição cumarinas, flavonóides, terpenos e poliacetilenos.

Em 1968, JOHNS e colaboradores, isolaram a 6,7-dimetoxi-cumarina de *Pterocaulon sphacelatum*. MARTINO e colaboradores, 1979, isolaram ácidos cafeoilquínicos do extrato metanólico a 25% (vinte e cinco por cento) particionado com éter de petróleo, clorofórmio e éter etílico de *Pterocaulon virgatum* e *Pluchea sagittalis*.

Em 1999, DEBENEDETTI e colaboradores isolaram de espécies do gênero *Pterocaulon* substâncias como ácido caféico, ácido clorogênico, ácido isoclorogênico e ácido 3,4-dicafeoilquínico.

No estudo de *P. purpurascens* foram isoladas 02 (duas) cumarinas, a 4,6,7,8-tetraoxigenada, denominada purpurenol e a trioxigenada denominada purpurasol (DEBENEDETTI, 1992) (Figura 11).

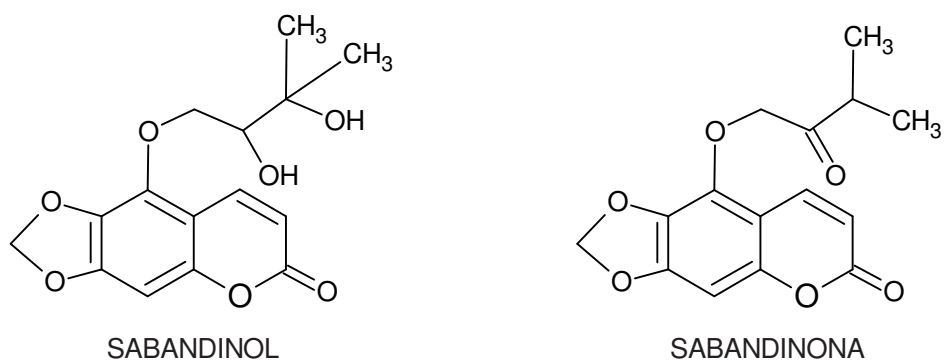
FIGURA 11 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DE PURPURENOL E PURPURASOL



Em MAGALHÃES et al. (1981), apresenta-se o isolamento de 08 (oito) cumarinas do extrato etéreo das partes aéreas das espécies *Pterocaulon balansae* e *Pterocaulon lanatum*. Foram isoladas, do extrato clorofórmico, 02 (duas) cumarinas denominadas sabandinol e sabandinona por DEBENEDETTI et al., em 1981 (Figura 12).

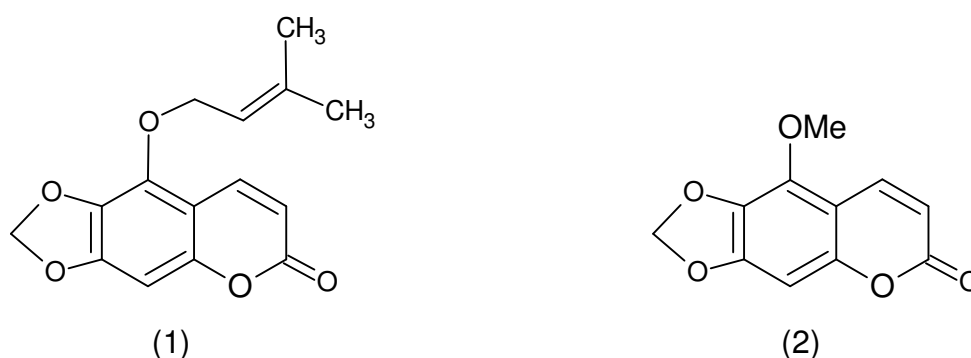
A cumarina sabandinol, havia sido anteriormente isolada e caracterizada da espécie *Ruta pinnata* (Rutaceae) em 1973 por GONZÁLEZ et al. apud HEEMANN, 2002. Estas mesmas estruturas identificadas na espécie *P. virgatum* por DEBENEDETTI et al., em 1981, foram corrigidas por estes mesmos pesquisadores em 1997.

FIGURA 12 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DE SABANDINOL E SABANDINONA



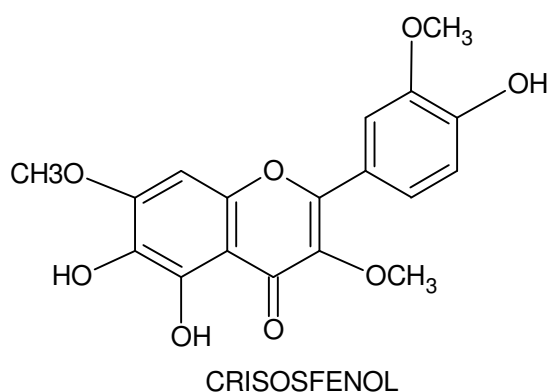
Em 1997, DEBENEDETTI e colaboradores isolaram e identificaram da espécie *Pterocaulon virgatum* (L.) DC. 02 (duas) novas cumarinas 5,6,7-trioxigenadas a 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilenodioxicumarina (1) e 5-metoxi-6,7-metilenodioxicumarina (2) (Figura 13).

FIGURA 13 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS (1) E (2)



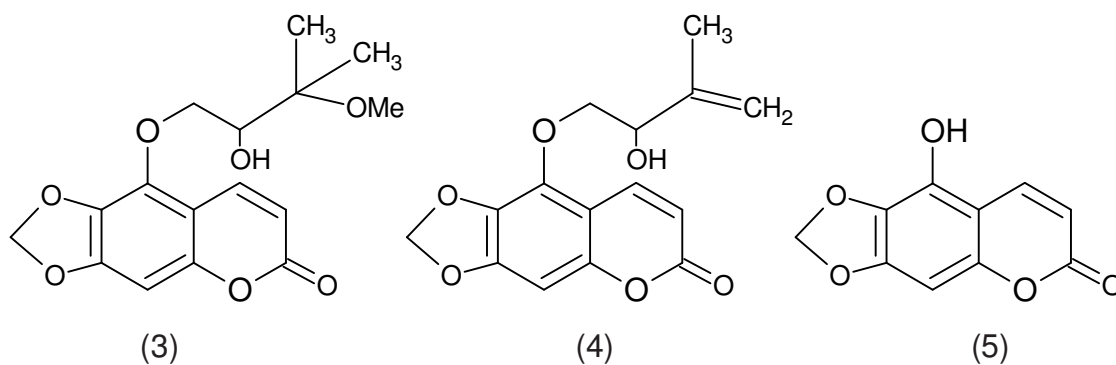
No estudo do extrato bruto das partes aéreas verdes de *P. sphacelatum*, SEMPLE (1999) e colaboradores isolaram e elucidaram a estrutura do flavonóide crisosfenol, responsável pela atividade antiviral (Figura 14). Além disso, isolaram a cumarina 6,7,8-trimetoxicumarina.

FIGURA 14 - ESTRUTURA QUÍMICA DO CRISOSFENOL



Em 2006, DOMINICK e colaboradores isolaram outros 03 (três) novas trioxicumarinas (5-(2-hidroxi-3-metoxi-3-metilbutoxi)-6,7-metilenodioxicumarina (3); 5-(2-hidroxi-3-metil-3-buteniloxi)-6,7-metilenodioxicumarina (4); e 5-hidroxi-6,7-metilenodioxicumarina) (5) (Figura 15).

FIGURA 15 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS CUMARINAS (3), (4) E (5)



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL VEGETAL

As partes aéreas de *Pterocaulon lorentzii* Malme foram coletadas nos meses de janeiro de 2005, 2006 e 2007 no município de Piçarras, litoral de Santa Catarina. A determinação botânica foi feita no herbário do Museu Botânico Municipal da cidade de Curitiba, Estado do Paraná pelo biólogo Osmar do Santos Ribas. As exsiccatas depositadas neste local estão registradas sob o número 323448.

### 4.2 ESTUDOS FITOQUÍMICOS

Na investigação fitoquímica, as partes aéreas coletadas são submetidas à seleção visual, excluindo-se material orgânico estranho e partes não sadias, atacadas por insetos, fungos ou oxidadas. Em seguida fragmentadas e secas em temperatura ambiente e à sombra. Após a secagem o material é armazenado em recipiente apropriado e protegido da luz e umidade.

#### 4.2.1 Ensaio Sistemático de Análise em Fitoquímica

Este ensaio analisa todas as características qualitativas dos principais grupos químicos que constituem os princípios ativos das drogas vegetais, utilizando em cada caso reações de coloração e ou precipitação.

O ensaio sistemático de análise em fitoquímica foi realizado de acordo com MOREIRA (1979) pelo método de maceração, extrato aquoso a 20% (vinte por cento) e extrato hidroalcoólico a 20% (vinte por cento) do vegetal em estudo. A partir desses extratos foi determinado o resíduo seco e a presença dos seguintes grupos químicos:

- Extrato hidroalcoólico: glicosídeos flavônicos, alcalóides, esteróides e/ou triterpenos, aminogrupos, glicosídeos cumarínicos e glicosídeos antraquinônicos.

- Extrato aquoso: glicosídeos antociânicos, saponinas, glicosídeos cianogênicos taninos condensados e hidrolisáveis, aminogrupos e flavonóides.

#### 4.2.1.1. Preparo do extrato hidroalcoólico a 20%

A extração foi realizada por maceração de 40 g das partes aéreas de *Pterocaulon lorentzii* Malme seco e triturado em 200 mL de álcool etílico a 70% (setenta por cento) em banho-maria a 70° C por 90 minutos. Após 24 (vinte e quatro) horas o macerado foi filtrado por meio de papel de filtro e volume completado com o mesmo solvente até 200 mL. O extrato foi mantido sob refrigeração até a realização dos ensaios fitoquímicos.

#### 4.2.1.2. Preparo do extrato aquoso a 20%

Extração realizada em banho-maria a 70°C por 90 minutos de 40 g das partes aéreas de *Pterocaulon lorentzii* Malme seco e triturado em 200 mL de água destilada. Após 24 (vinte e quatro) horas o macerado foi filtrado por meio de papel de filtro e volume completado com água destilada até 200 mL e mantido sob refrigeração até a realização dos ensaios fitoquímicos.

#### 4.2.1.3. Pesquisa de alcalóides

Esta pesquisa foi realizada utilizando-se os reativos gerais de alcalóides (Mayer, Dragendorff, Bouchardart e Berthrand) da seguinte forma: levar à secura 50 mL de extrato hidroalcoólico em banho-maria a 70%, seguido de dissolução do resíduo em 1 mL de etanol e 20 mL de ácido clorídrico a 1%. Transferir o extrato clorídrico em 5 tubos de ensaio (1 mL em cada tubo) e adicionar em cada um os reativos mantendo o quinto tubo como branco. O aparecimento de precipitado indica reação positiva. Para contra-prova, 15 mL do extrato hidroalcoólico devem ser transferidos para um funil de separação e alcalinizados com hidróxido de amônio até

pH 10. Efetuar extração com a mistura éter/clorofórmio (3:1) e submeter o extrato às mesmas reações de alcalóides.

#### 4.2.1.4. Pesquisa de ácidos orgânicos

O excedente da solução etérea da pesquisa de alcalóides foi levado à secura e redissolvido em 5 mL de água destilada. O pH ácido desta solução indica a presença de ácidos orgânicos.

#### 4.2.1.5. Pesquisa de fenóis

Utilizar 2 mL da solução obtida na pesquisa de ácidos orgânicos adicionando 2 gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1%. O desenvolvimento de coloração confirma a presença de fenóis.

#### 4.2.1.6. Pesquisa de flavonóides

Os flavonóides foram pesquisados pela reação de Shinoda, ou reação de cianidina, com o extrato alcoólico total e com os extratos seletivos.

Em um tubo de ensaio transferir 5 mL de extrato hidroalcoólico e adicionar 200 mg de limalha de magnésio e 1 mL de ácido clorídrico fumegante pelas paredes do tubo. A formação de cor alaranjada indica presença de flavonóis.

#### 4.2.1.7. Pesquisa de cumarinas

Transferir para um béquer 30 mL de extrato hidroalcoólico e acidificar até pH 1, concentrar em banho-maria a 60 °C até 10 mL. Adicionar ao resíduo 5 mL de água deionizada e extrair em funil de separação com éter etílico em 3 porções de 10 mL. Reduzir o volume do extrato orgânico para 5 mL em banho-maria a 60 °C. Colocar 3 gotas do extrato etéreo em 2 pontos de um papel de filtro previamente marcado, deixar secar e adicionar 1 gota de hidróxido de sódio 1N em cada mancha. Cobrir



uma das manchas com moeda e observar sob luz UV de ondas longas. A fluorescência azul ou verde-amarelada indica reação positiva.

#### 4.2.1.8. Pesquisa de antraquinonas

Foi levado à fervura 20 mL do extrato alcoólico por 15 minutos sob refluxo adicionando 3 mL de ácido sulfúrico 10%. Após o resfriamento transferir para um funil de separação junto com 30 mL de água destilada e extrair 3 (três) vezes com 10 mL de tolueno. O extrato toluênico é concentrado a 10 mL e transferido para um tubo de ensaio. Agitar com 10 mL de solução reagente de hidróxido de sódio. O aparecimento de coloração rósea ou avermelhada indica a presença de hidroxiantraquinonas e naftoquinonas

#### 4.2.1.9. Pesquisa de esteróis e triterpenos

Foram evaporados 20 mL do extrato alcoólico e extrair com 3 (três) vezes sucessivas de 5 mL de diclorometano. Concentrar os extratos obtidos a um volume de 3 mL e transferir para um tubo de ensaio, onde foram adicionados 2 mL de anidrido acético. Cautelosamente adicionar 3 gotas de ácido sulfúrico. O desenvolvimento de coloração azul passando a verde demonstra a presença de esteróides e /ou triterpenos

#### 4.2.1.10. Pesquisa de heterosídeos antociânicos

Foram separados 3 porções de 5 mL do extrato aquoso em 3 tubos de ensaio e neutralizá-los com solução de hidróxido de potássio 5% até obter os pHs 5,5 (pH do extrato aquoso), 7,0 (neutro) e 9,5 (básico). Mudança na coloração das porções neutralizadas indica presença de heterosídeos antociânicos.

#### 4.2.1.11. Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Agitar os 3 tubos obtidos no ensaio de heterosídeos antociânicos energicamente durante 5 minutos. Espuma persistente em um dos tubos indica a presença de saponinas, confirmada pela adição de solução aquosa de ácido clorídrico 1%).

#### 4.2.1.12. Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos

Transferir 15 mL do extrato aquoso para um tubo de ensaio, com o cuidado de não umedecer as paredes superiores. Adicionar 1 mL de ácido sulfúrico 1N e então prender com auxílio de uma rolha uma tira de papel picro-sódico dentro do tubo. Levar o tubo de ensaio ao banho Maria em temperatura de 60°C por 30 minutos. A formação de cor vermelha no papel indica a presença de heterosídeos cianogenéticos.

#### 4.2.1.13. Pesquisa de gomas, taninos e mucilagens

A 2 porções de 5 mL do extrato aquoso adicionar 5 gotas de solução de acetato básico e acetato neutro de chumbo 10%. A formação de precipitado é indicativo da presença de gomas, taninos e mucilagens.

#### 4.2.1.14. Pesquisa de taninos

Adicionar a 5 mL de extrato aquoso, 5 gotas de cloreto férrico 1%. Na formação de precipitado escuro, transferir 5 mL do extrato aquoso para um balão de fundo chato de 100 mL e nele acrescentar 5 gotas de formaldeído a 37% e 4 mL de ácido clorídrico. Levar a mistura para o refluxo por 1 hora. Após seu resfriamento, filtrar a solução e lavar o material retido com água destilada e álcool. Se no material retido no filtro houver a formação de coloração pela adição de algumas gotas de solução aquosa de hidróxido de potássio 5%, indica a formação de taninos condensados. Se no filtrado, pelo excesso de acetato de sódio e a adição de 10

gotas de cloreto férrico 1%, houver formação de precipitado escuro ou azul, indica a presença de taninos hidrolisáveis.

#### 4.2.1.15. Pesquisa de aminogrupos

Concentrar 10 mL de extrato aquoso à metade sob temperatura de 50°C. Em um papel de filtro, depositar 5 gotas deste extrato concentrado e após secas, nebulizar com solução butanólica de ninhidrina. Aquecer em estufa a 90-100°C por 15 minutos. Se houver o aparecimento de cor azul-violácea indica a presença de aminogrupos.

#### 4.2.1.16. Pesquisa de ácidos voláteis

Acidificar 10 mL do extrato aquoso com ácido sulfúrico 1N e ferver em um tubo de ensaio em banho-maria. Com papel indicativo de pH medir a acidez dos vapores. A coloração ácida indica a presença de ácidos voláteis.

#### 4.2.1.17. Pesquisa de ácidos fixos

Transferir 20 mL de extrato para um balão de destilação juntamente com 2 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio 1N. Levar o conteúdo ao refluxo por 30 minutos, resfriar e acidular com ácido sulfúrico 1N e extrair 3 vezes com 10 mL de éter etílico. Reunir os extratos etéreos, filtrar e levar à secura. Aquecer o resíduo durante 10 minutos a 100°C e após, adicionar 5 mL de solução de hidróxido de amônio 1N, filtrar novamente e transferir para um papel de filtro 3 gotas de modo a obter uma mancha de 1 cm de diâmetro. Secar o papel em estufa a 100°C por 10 minutos e então tratá-lo com o Reagente de Nessler. O desenvolvimento de coloração indica a presença de ácidos fixos.

#### 4.2.2 Determinação do Teor de Sólidos

A partir da concentração do extrato total 1 mL deste foi colocado em placa de petri para determinação do teor de sólidos. Foram feitas cinco repetições levando as placas previamente pesadas à estufa. O teor foi determinado quando a massa da placa passou a ser constante nas pesagens. Com estes valores foi calculado teor de sólidos em relação à quantidade de material vegetal utilizado.

#### 4.2.3 Extração de Óleo Essencial

Foram submetidos à hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger, modificado por WASICKY (1963) 150 g de material seco, fragmentado e estabilizado, e anotado o rendimento bruto de óleo extraído após o funcionamento ininterrupto do aparelho por um período de 6 horas.

#### 4.2.4 Obtenção do Extrato em Aparelho de Soxhlet Modificado

As amostras de planta seca, estabilizada e moída foram pesadas e extraídas em aparelho de Soxhlet modificado segundo CARVALHO, 2001 (Figura 16).

A um aparelho de Soxhlet são conectados a um condensador de bolas e a um balão de fundo chato com capacidade de 3 L contendo pérolas de vidro. A este sistema é adicionado álcool etílico 96°GL até aproximadamente 1500 mL. Todo o sistema é levado ao aquecimento em manta aquecedora e deixado em refluxo por 6 horas, de modo que o extrato alcoólico seja obtido por extração a frio em meio solvatado (CARVALHO, 2001).

Para a utilização deste equipamento, procedeu-se da seguinte forma: a placa porosa foi cuidadosamente posicionada sobre os suportes de vidro do aparelho e sobre ela foi colocado algodão para conter o material vegetal. Sobre este foi colocado cerca de 2 kg de material vegetal seco, estabilizado e fragmentado e 1000 mL de etanol 96°GL para maceração. O líquido extrator contido no balão era aquecido e evaporava, condensando a 60°C no condensador de bolas. Desta maneira, o solvente condensado atravessa a massa vegetal, permitindo a extração.

No momento em que o menisco do extrato no canal lateral do Soxhlet atingisse o ponto de refluxo, o extrato era descarregado no balão por sifonamento e o processo era repetido até inúmeras vezes até se completarem as 6 horas.

Este procedimento previne a degradação térmica de substâncias no balão, uma vez que a quantidade de líquido extrator é constante no sistema e é capaz de solvatar os compostos presentes.

FIGURA 16 – APARELHO DE SOXHLET MODIFICADO



FONTE: MIGUEL, 2006

As porções foram reunidas e concentradas em evaporador rotativo até 300 mL, formando assim o extrato bruto usado para a obtenção das frações por partição líquido-líquido com solventes de diferentes polaridades, na seguinte ordem: n-hexano, clorofórmio e acetato de etila. Todos os solventes usados foram de padrões analíticos (PA).

#### 4.2.5 Obtenção das Frações

A partição líquido-líquido deu-se em ordem crescente de polaridade (do solvente menos polar para o mais polar) utilizando aparelho de Soxhlet modificado, segundo CARVALHO, 2001 (Figura 17). O aparelho foi conectado a um condensador de bolas e a um balão de fundo chato de capacidade para 150 mL, com pérolas de vidro. Todo o sistema foi levado ao aquecimento em chapa aquecedora e deixado em refluxo contínuo por 6 horas.

FIGURA 17 – APARELHO DE SOXHLET ADAPTADO PARA PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO



FONTE: DAVET, 2005.

Para a extração com solventes mais densos que o extrato bruto foi necessário utilizar cartucho de vidro e funil adaptado até a base do cartucho em aparelho de Soxhlet convencional. Neste caso, o solvente contido no balão é aquecido e evaporado e, após condensação, goteja dentro do funil, passando por dentro do cartucho. Assim, o extrato particionado de baixo para cima, promove o arraste de substâncias por afinidade. Duas aberturas na parte superior do cartucho permitem a saída do solvente (depois da extração), que irá preencher o espaço entre o cartucho e as paredes do Soxhlet até que o menisco alcance o ponto de refluxo do canal lateral do aparelho e o solvente com as substâncias extraídas sejam descarregadas

sobre o conteúdo do balão. Dessa forma, todo o extrato é concentrado no balão, visto que o líquido extrator evapora puro para ser condensado e repetir a extração.

Cada processo de partição dura 6 horas. Em casos de solventes mais densos, o aparelho de Soxhlet é modificado de modo a impedir o refluxo do solvente para o balão. A dilatação do canal lateral do Soxhlet é retirada e o canal é alargado na porção superior. Desta forma, quando o menisco atinge a curva do canal, não há refluxo, mas gotejamento constante. Nas duas situações, a partição se dá lentamente, com o máximo de contato possível.

Todas as frações são levadas à secura em evaporador rotativo a 40°C e 600 mmHg e os resíduos solubilizados em 100 mL de metanol tendo em vista sua grande capacidade de solvatação e por permitir a precipitação de diversas substâncias. É realizado o resíduo seco para cada fração.

#### 4.2.6 Obtenção do Resíduo Seco

Os resíduos secos das frações e do extrato bruto são obtidos da seguinte forma: 10 mL de cada fração e do extrato bruto são pipetados em pipeta volumétrica e transferidos para placas de Petri previamente taradas. A placa é deixada em estufa a 105°C até peso constante (aproximadamente 1,5 horas). A diferença de massa entre a placa cheia e vazia fornece a quantidade de resíduo em 10 mL de fração.

#### 4.2.7 Isolamento das Substâncias

##### 4.2.7.1 Cromatografia Líquida em coluna

O processamento das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica é feito pela redissolução de cada fração concentrada em metanol e incorporada a 6 g de Sílica-gel 60 - Merck<sup>®</sup>- Art. 7734 – com tamanho de partícula 0,063-0,2mm, 70-230 mesh ASTM (cerca de uma vez o seu peso seco) para a formação da pastilha de sílica. Essa pastilha é submetida à cromatografia líquida em coluna de 30cm de altura por 3 cm de diâmetro, empacotada com 30 g de Sílica-gel

60 (0,063-0,200mm) Merck®. A amostra é eluída em sistema de solventes com gradiente de polaridade crescente, sendo utilizados hexano, acetato de etila e metanol. O controle de eluição é feito com lâmpada de luz UV à 360 nm. As características das frações recolhidas são observadas por cromatografia em camada delgada, utilizando-se cromatoplasmas de Sílica-gel 60 F<sub>254</sub> Merck® e visualizadas com lâmpada UV nos comprimentos de onda de 360 nm. As frações semelhantes são reunidas redissolvendo-as em clorofórmio e metanol.

#### 4.2.7.2 Cromatografia em camada delgada

Para as análises por cromatografia em camada delgada são utilizadas placas de Sílica-gel 60 F<sub>254</sub> Merck® e a visualização em lâmpada UV nos comprimentos de onda de 360 nm.

As fases móveis ainda estão sendo testadas para melhor visualização dos compostos, como flavonóides, cumarinas e esteróides. O principal reativo utilizado na revelação de flavonóides é o Reativo de NEU (2-aminoetilbutirato).

#### 4.2.8 Elucidação Estrutural

##### 4.2.8.1 Espectroscopia de absorção no ultravioleta

As substâncias isoladas são submetidas à análise de luz ultravioleta próximo e os espectros registrados em espectrofotômetro Shimadzu UV 1601 no intervalo de 200 a 500 nm.

##### 4.2.8.2 Espectroscopia de absorção em infravermelho

Os espectros de infravermelho são obtidos com amostras preparadas em pastilhas de brometo de potássio anidro (KBr) comprimidas em equipamento Bomem



– Hartmann & Braum MB-Serie do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná.

#### 4.2.8.3 Espectroscopia de ressonância nuclear magnética de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$

A espectrometria de RMN  $^1\text{H}$  em equipamento AC 300 Bruker® a 300 MHz, a espectroscopias de RMN  $^{13}\text{C}$  e 175 MHz DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer ou Intensificação do Sinal sem Distorção por Transferência de Polarização) foram realizado no Laboratório de RMN do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá.

### 4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

No teste para o potencial antimicrobiano são empregados os Métodos de Bioautografia, adaptado das modificações propostas por Romeiro (2001), e Método da Concentração Mínima Inibitória (CMI), de acordo com KONEMAN et al. (1993) buscando-se detectar e identificar substâncias bioativas.

Para ambos os testes são utilizadas cepas comerciais dos microorganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Escherichia coli* (ATCC 8739) todas da marca NewProve®.

As amostras utilizadas foram o Extrato Total (ET), Fração Acetato de Etila (FA), Fração Clorofórmio (FC), Fração Hexânico (FH), Substâncias isoladas FH1, FC1 e FC2.

#### 4.3.1 Método da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Utilizou-se o método de diluição em caldo para a determinação da CMI dos extratos e das substâncias isoladas das partes aéreas de *Pterocaulon lorentzii* Malme. Para este estudo foram inoculados microorganismos em meios de cultura com amostras a serem testadas em diversas diluições. Após tempo necessário para incubação em temperatura adequada, foram efetuadas as leituras das

concentrações inibitórias mínimas procurando o primeiro tubo sem crescimento do microorganismo.

#### 4.3.1.1 Prepado do inoculo

As cepas bacterianas em teste foram repicadas em caldo trípico de soja (Casoy) e incubadas à 35°C por 24 horas. Após este período os tubos os microorganismos contidos em 10 mL de caldo foram comparados à turbidez do tubo 0,5 da escala Mac Farland.

Em seguida 2 mL deste caldo foram diluídos em 100 mL de solução estéril de Tween 80 a 2% em água destilada.

#### 4.3.1.2 Preparo das amostras e do teste

Para cada amostra foram preparados nove tubos, do primeiro ao sétimo foram feitas diluições nas seguintes proporções: 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64. 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 meio sem a amostra teste. E o tubo nove foi usado pra controle negativo em que não foi colocado a suspensão de bactérias, apenas o meio e a amostra. Este procedimento foi realizado em duplicata e em fluxo laminar. Os tubos foram incubados em estufa à 35°C durante 24 horas. Decorrido este período procedeu-se a leitura dos tubos.

#### 4.3.2 Método de Autobiografia

O método de autobiografia consiste em fundir meio semi-sólido de cultura, adicionando a ele células de um organismo-teste e, antes da solidificação, atomizar a superfície de um cromatograma, incubando-o a seguir em câmara úmida, previamente esterilizada por autoclave. O organismo crescerá em toda superfície do meio, menos nos locais onde existir uma mancha correspondente a uma substância com atividade antimicrobiana (ROMEIRO, 2001).

#### 4.3.2.1 Preparo do inóculo

As suspensões bacterianas são padronizadas em solução salina segundo a escala 0,5 de MacFarland, (Bier, 1994).

#### 4.3.2.2 Preparo das amostras e do teste

Em câmara de fluxo laminar, aplica-se 15 µL da amostra em placa de Sílica-gel 60 F<sub>254</sub> Merck® utilizada em CCD de dimensões 2,5 x 5,0 cm. Realiza-se a cromatografia com fase móvel Acetato de Etila/ Acetona/ Água (25/8/2) específica para as amostras. As cromatoplasmas são secas em estufa a 70°C por 20 (vinte) minutos e então colocadas em placas de Petri previamente esterilizadas onde são mantidas fechadas até o momento da incubação com os microorganismos.

As amostras foram preparadas em diferentes concentrações como mostra a tabela 1:

TABELA 1 - CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS APLICADAS NAS CROMATOPLACAS PARA ANÁLISE DE AUTOBIOGRAFIA

Amostra	Quantidade em µL	Concentração em µg
ET	15	750
FA	15	750
FC	15	750
FH	15	750
FH1	15	500
FC1	15	150
FC2	15	500

Para o preparo do meio, são utilizados 0,2 mL do revelador trifeniltetrazolina 1%, 0,2 mL do inóculo e 20 mL de meio Mueller-Hinton à 35°C, previamente preparado e esterilizado. Este é, então, vertido sobre as cromatoplasmas contidas nas placas de Petri.

Como controles positivos de inibição do crescimento bacteriano são utilizados discos de gentamicina 10 µg e, como controle negativo foram incubadas placas corridas em branco, sem amostra. Para o controle da esterilidade do meio e das placas foi incubada uma cromatoplaça e o meio Mueller-Hinton sem o inóculo).

Todas as placas são incubadas a 35°C e analisadas após 24 horas. As substâncias cromatograficamente separadas que exibirem atividade antibacteriana serão reconhecidas nos bioautogramas por meio da formação dos halos de inibição ao redor de suas bandas. O teste é realizado em duplicata.

#### 4.4 ESTUDO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

A alelopatia procura determinar o efeito de uma planta doadora sobre uma planta receptora (MALHEIROS; PERES, 2001). No presente trabalho, buscou-se determinar possível atividade alelopática do Extrato Total (ET), Fração Acetato de Etila (FA), Fração Hexânica (FH), as substâncias Taraxasterol (T), Quercetina (Q) e Sabandinol (S) isoladas das partes aéreas de *P. lorentzii* sobre sementes de *Lactuca sativa* (conhecida como alface, cultivar Babá de verão, da empresa Isla sob código 026, com 99% de germinação detectada através de teste padrão de germinação). Paralelamente ao ensaio da atividade alelopática da espécie em estudo, fez-se ensaio utilizando água destilada e metanol, para posterior verificação de possível influência do solvente (metanol) empregado no preparo e na diluição das amostras utilizadas no ensaio alelopático (DIAS, 2005).

A escolha da semente de *L. sativa* foi feita por apresentar germinação rápida e uniforme (DIETZ; WINTERHALTER, 1996), ser pequena, possuir grande superfície de contato, sendo sensível ao meio que a rodeia e não requerer nenhuma manipulação além do contato no meio (MALHEIROS; PERES, 2001).

Foram preparadas 7 soluções dos extratos brutos etanólicos e respectivas frações citadas anteriormente em concentrações decrescentes (0,8 mg, 0,4 mg, 0,2 mg, 0,1 mg, em 2 mL de metanol) em duplicata. Para o preparo destas soluções utilizou-se uma solução-mãe preparada com extratos e frações secas a 50 °C em banho-maria e diluídas em metanol na proporção 1 mg/mL. Com intuito de obter dissolução completa da amostra a ser analisada, escolheu-se metanol como

solvente.

Para as caixas gerbox foram recortados papel de filtro (Whatman nº. 6) e embebidos com as soluções preparadas com as devidas concentrações e colocados em estufa a 60°C por 24 horas para total evaporação do solvente. Em câmara de fluxo laminar, os papéis de filtro previamente secos foram colocados nos gerbox e umedecidos com 3 mL de água destilada. A água destilada foi utilizada em quantidade segundo KRZYZANOWSKI, VIEIRA, FRANÇA NETO (1999), ou seja, de duas a três vezes o peso do papel. Após preparo das caixas gerbox, colocou-se 10 sementes de *Lactuca sativa* em cada caixa em quatro repetições.

Os gerbox foram protegidos da luz com papel alumínio e colocados em germinador de câmara à temperatura de 20 °C.

Para cada concentração prepararam-se duas caixas, uma para estudo da germinação e outra para estudo do crescimento. O ensaio de crescimento é utilizado por ser geralmente mais sensível ao ensaio de germinação (MALHEIROS; PERES, 2001).

Para controle utilizou-se água destilada sob as mesmas condições do ensaio.

Para análise estatística empregou-se o programa SISVAR (FERREIRA, 2000). A verificação das diferenças de 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 ambigüidades (presentes na maioria dos testes de comparações múltiplas). O tratamento foi considerado efetivo quando todas as repetições estiveram no mesmo grupo de médias (DIAS, 2005)

#### 4.4.1 Germinação

Na análise da germinação é necessário observar não somente as condições adequadas do desenvolvimento do eixo embrionário, mas deve-se ter em mente as fases que ocorrem antes da retomada do desenvolvimento, que se iniciam com a colocação da semente em substrato adequado e absorção de umidade (CARVALHO e NAKAGAWA, 1988). A primeira fase se caracteriza pelo aumento da taxa de respiração, início da degradação de substâncias de reserva como carboidratos,

proteínas e lipídios e a transformação destas substâncias em outras de menor tamanho para facilitar o transporte. Num segundo momento ocorre o transporte das substâncias transformadas, diminuição da absorção de água e crescimento lento da intensidade respiratória. A partir de um teor de umidade (50 a 60% para as cotiledonares), a semente retorna à intensa absorção de água e respiração, iniciando-se crescimento visível do eixo embrionário e a terceira fase. Substâncias desdobradas na primeira fase e transportadas na segunda fase são reorganizadas em substâncias complexas que, na terceira fase permitem o crescimento do eixo embrionário.

Desta forma, qualquer alteração ocorrida na germinação influenciada por uma outra planta, pode ser decorrente da interferência em todas as fases da germinação ou especificamente em uma fase.

Durante a germinação fez-se leitura diária no mesmo horário abrindo as caixas em fluxo laminar. As sementes que germinaram foram retiradas diariamente até o sétimo dia. As sementes foram consideradas germinadas conforme descrito por DE FEO, DE SIMONE e SENATORE (2002) e ADEGAS, VOLL e PRETE (2003), ou seja, quando se tornou visível a protrusão da radícula através do tegumento.

Calculou-se o índice de velocidade de germinação (IVG) segundo MAGUIRE (1962) para cada repetição de cada tratamento (KRZYZANOWSKI; VIEIRA; FRANÇA NETO). O referido índice é calculado utilizando-se a quantidade de sementes germinadas, dividindo-a pelo dia da germinação e somando-se até o último dia de germinação. Tomando-se como exemplo a germinação de uma repetição com 10 sementes, que ao primeiro dia germinaram 4 sementes, o número 4 é dividido por 1; ao segundo dia germinaram 2 sementes, o número 2 é dividido por 2; ao terceiro dia germinaram 3 sementes, o número 3 é dividido por 3 e ao quarto dia germinou 1 semente, o número 1 é dividido por 4. Somando-se os resultados das divisões anteriores obtém-se o índice de velocidade de germinação 6,25.

As médias dos índices de velocidade de germinação foram submetidas ao Teste Scott-Knott.

#### 4.4.2 Crescimento

A avaliação do crescimento é feita pela mensuração das radículas e dos hipocótilos de *Lactuca sativa*, verificação da presença de folíolos após tratamento com diferentes amostras e comparar os resultados aos obtidos com controle. O hipocótilo e a radícula são originados a partir do eixo embrionário que é a parte vital da semente, este contém tecido meristemático em suas duas extremidades, apresentando condições de crescimento para dois sentidos, o das raízes (radícula) e o do caule (hipocótilo), originando plântula com condições de fixação ao solo e de fotossintetizar substâncias necessárias (CARVALHO; NAKAGAWA, 1983).

A mitose e o crescimento das células dá seguimento ao crescimento do eixo embrionário. Aumentando-se inicialmente o teor de água, as células sofrem certa expansão com posterior formação de novas células. Os processos de divisão celular e de expansão dependem da energia de moléculas simples (resultantes da degradação), de substâncias complexas armazenadas nos tecidos de sustentação, de substâncias estruturais e das novas células. Estes processos envolvem sínteses, tais como de enzimas, lipídios, proteínas e componentes das paredes celulares (CARVALHO; NAKAGAWA, 1988).

Alterações ocorridas no crescimento da radícula e do hipocótilo de *Lactuca sativa* podem ser oriundas do processo de germinação ou dos processos envolvidos na fase do crescimento do eixo embrionário. A leitura do crescimento foi realizada apenas ao último dia de experimento com abertura das caixas e retirada das plântulas uma a uma (com auxílio de uma pinça) para medir em papel milimetrado o comprimento da radícula e do hipocótilo.

Os resultados das leituras de crescimento foram submetidos ao Teste de Scott-Knott para comparação das médias que também foram comparadas em porcentagem, considerando-se o tratamento controle com água destilada 100%.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se pelas análises cromatográficas preliminares que as frações da espécie em estudo apresentam substâncias com perfil cromatográfico de esteróides, cumarinas e flavonóides, característica observada nas demais espécies do gênero *Pterocaulon*.

### 5.1 ESTUDOS FITOQUÍMICOS

#### 5.1.1 Ensaio Sistemático de Análise em Fitoquímica

Os resultados do Ensaio Sistemático de Análise em Fitoquímica podem ser observados no Tabela 2:

TABELA 2 – ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE EM FITOQUÍMICA DE *Pterocaulon lorentzii* MALME

PESQUISA	EXTRATO ALCOÓLICO 20%	EXTRATO AQUOSO 20%	REAÇÃO					
			(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
			1		2		3	
ÁCIDOS ORGÂNICOS	X		+		+		+	
ALCALÓIDES	X			-		-		-
FENÓIS	X		+		+		+	
FLAVONÓIDES	X		++		+++		++	
CUMARINAS	X		+++		+++		+++	
ANTRAQUINONAS	X			-		-		
ESTERÓIS E TRITERPENOS	X		++		++		++	
HETEROSÍDEOS ANTOCIÂNICOS		X	+		+		+	
HETEROSÍDEOS SAPONÍNICOS		X	+		++		++	
HETEROSÍDEOS CIANOGENÉTICOS		X		-		-		-
GOMAS, TANINOS E MUCILAGENS		X		-		-		-
TANINOS		X	+		++		+	
AMINOGRUPOS		X	+		+		+	
ÁCIDOS VOLÁTEIS		X		-		-		-
ÁCIDOS FIXOS		X	+		-			+
Observações		- Resultado Negativo	+ Resultado Fracamente Positivo ++ Resultado Positivo +++ Resultado Fortemente Positivo					



### 5.1.2 Determinação de Teor de Sólidos

O teor de sólidos obtido para o extrato total foi de 30, 25%.

### 5.1.3 Óleo Essencial

Pelo processo de hidrodestilação da espécie *Pterocaulon lorentzii* Malme, não foi recolhido material suficiente para sua análise. Observa-se desse modo que a espécie não apresenta como característica a presença de óleo essencial, sendo necessária uma quantidade grande de material para possibilitar sua extração.

### 5.1.4 Análise Cromatográfica

Conforme os resultados da análise preliminar, as partes aéreas de *Pterocaulon lorentzii* Malme apresentam uma variedade de substâncias, mas são mais expressivas as cumarinas, os flavonóides e os esteróides, o que confirma os dados indicativos apresentados na literatura para o gênero *Pterocaulon*. Estes resultados também conferem com as razões pelas quais a espécie é utilizada na medicina popular, no uso antiinflamatório e antimicrobiano.

O extrato bruto das partes aéreas de *Pterocaulon lorentzii* Malme, foi obtido a partir de 2263 g de material estabilizado e moído. Após a filtração, obteve-se a porção sólida (sedimentada) e a porção solúvel. Da porção sólida foram obtidas as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanol. O rendimento é mostrado na tabela 3.

TABELA 3 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS POR SOXHLET

FRAÇÕES EXTRAÍDAS	RENDIMENTO EM (g)	RENDIMENTO EM (%)
Hexânica	0,89	0,28
Clorofórmica	5,49	6,54
Acetato de Etila	13,05	6,10
Alcoólica	125,46	23,67
Total	144,89	36,59

#### 5.1.4.1 Fração hexano

A partir da fração hexano da porção sedimentada foi realizada a cromatografia líquida em coluna com eluente hexano/acetato de etila com um gradiente de 5% (cinco por cento). Foram recolhidas 29 frações de aproximadamente 15 mL cada. Estas foram reunidas de acordo com semelhanças observadas na análise em CCD.

Com a concentração destas frações, houve a aparecimento de cristalizações entre as frações recolhidas. A averiguação destes cristais por CCD mostrou a presença de quatro substâncias que, após purificação por lavagem com solvente clorofórmio foram identificadas inicialmente como FH1 (125 mg) , FH2 (96,3 mg) FH3 (37,9 mg) e FH4 (74,5mg), posteriormente identificados como 3-O-Acetil-pseudotaraxasterol, mistura de taraxasterol e pseudotaraxasterol, undecan-1-ol e dodecilciclohexano respectivamente.

##### 5.1.4.1.1 Análise dos cristais de 3-O-Acetil-pseudotaraxasterol

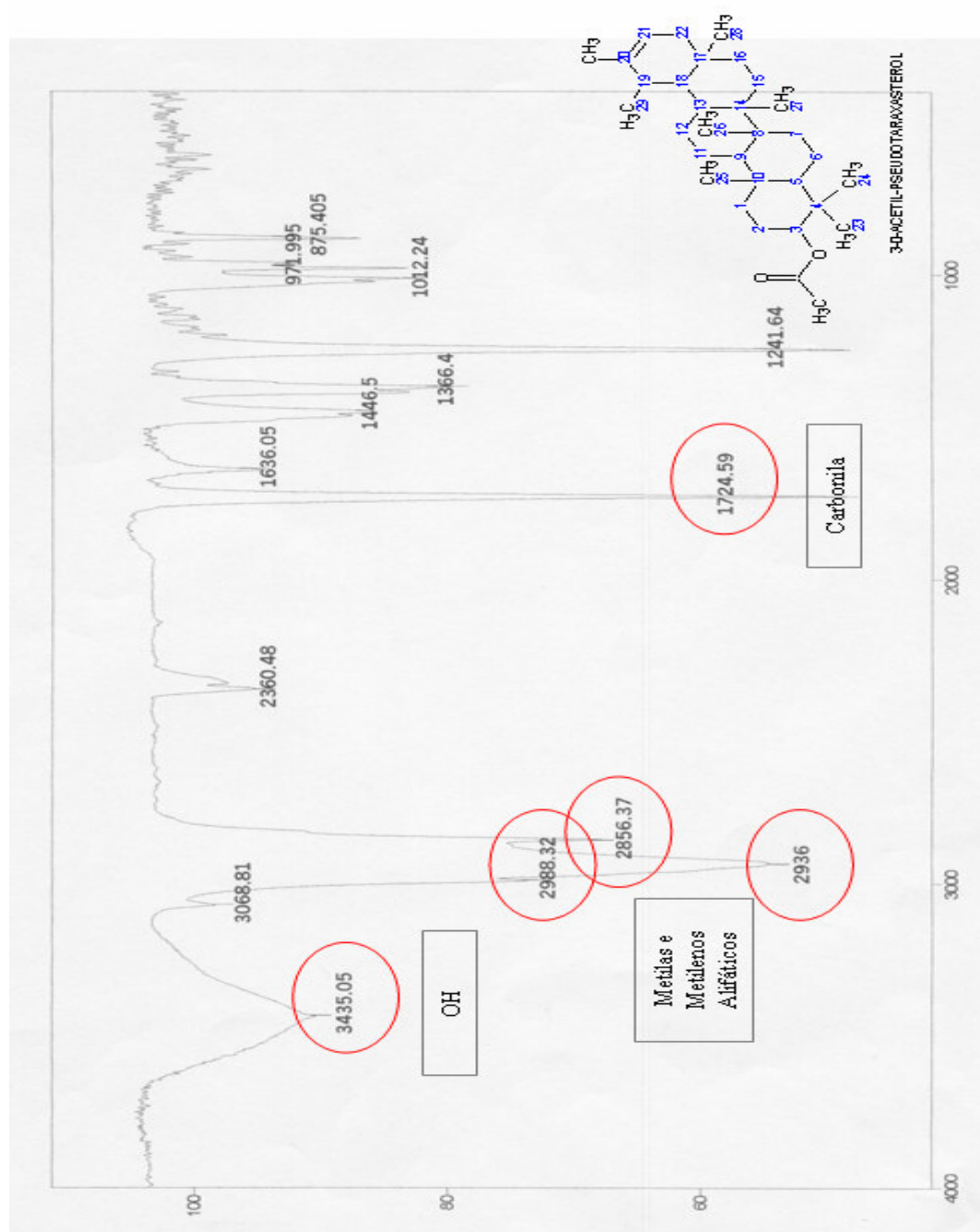
A análise dos cristais de 3-O-Acetil-pseudotaraxasterol mostrou os seguintes espectros:

#### a) Espectro de absorção no infravermelho

O espectro de absorção na região do infravermelho apresentou absorção em banda larga em  $3435\text{ cm}^{-1}$  característico de hidroxila, bandas de grande intensidade

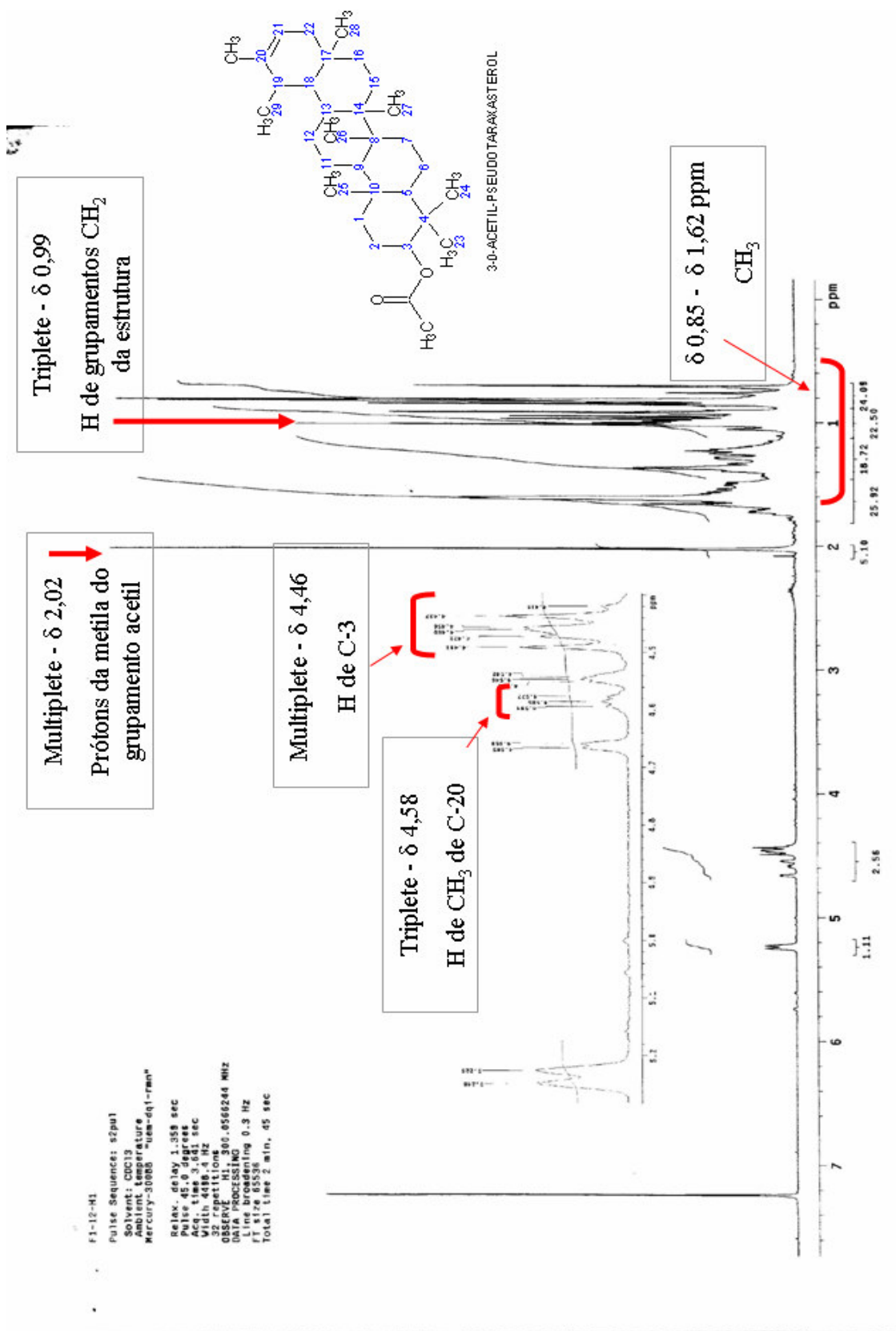
em 2988; 2936 e 2856  $\text{cm}^{-1}$  características de metilas e metilenos alifáticos. E outra absorção muito intensa em 1724  $\text{cm}^{-1}$  que caracteriza a presença de carbonila (Figura 18).

FIGURA 18 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DO 3-O-ACETIL-PSEUDOTARAXASTEROL



b) Espectro de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  3-O-Acetil-pseudotaraxasterol

Os espectros de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  foram obtidos a uma frequência de 300 MHz em  $\text{CDCl}_3$ . As absorções na região de  $\delta$  0,85 e  $\delta$  1,62 são referentes aos grupos metila. O triplete centrado em  $\delta$  0,99 se refere aos hidrogênios de grupamentos  $\text{CH}_2$  presentes na estrutura. O multiplete centrado em  $\delta$  2,02 é atribuído aos prótons da metila do grupamento acetil no carbono 3 e multiplete centrado a  $\delta$  4,46 atribuído a H-3. O triplete centrado em  $\delta$  4,58 corresponde aos hidrogênios de  $\text{CH}_2$  no carbono 20 (Figura 19).

FIGURA 19 – ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO 3-O-ACETIL-PSEUDOTARAXASTEROL

c) Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do 3-O-Acetil-pseudotaraxasterol

Os deslocamentos químicos atribuídos pelos espectros de  $^{13}\text{C}$  na frequência de 75 MHz em  $\text{CDCl}_3$ , estão indicados na Tabela 4 e Figura 20 e 21.

TABELA 4 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RNM DE  $^{13}\text{C}$  PARA COMPARAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS 3-O-ACETIL-TARAXASTEROL (HEEMANN, 2002) E PSEUDOTARAXASTEROL (MAHATO *et al.*, 1994) COM O 3-O-ACETIL-PSEUDOTARAXASTEROL

Carbonos	3-O-acetil-taraxasterol	Pseudotaraxasterol	FH1
	<i>literatura</i>	<i>literatura</i>	<i>experimental</i>
1	38.4	38,8	38,6
2	23.7	27,4	23,9
3	80.9	79,0	81,2
4	37.8	38,8	38,0
5	55.4	55,3	55,6
6	18.2	18,3	18,3
7	34.0	34,3	34,5
8	40.6	41,1	41,3
9	50.4	50,4	50,5
10	37.0	37,1	37,2
11	21.4	21,6	21,5
12	26.1	27,6	27,9
13	39.1	39,2	39,4
14	42.3	42,3	42,4
15	26.6	27,0	27,2
16	38.3	36,6	36,9
17	34.5	34,4	34,4
18	48.6	48,8	48,9
19	39.3	36,6	36,5
20	154.6	138,8	140,1
21	25.6	118,9	119,1
22	38.8	42,2	42,5
23	27.9	28,8	28,2
24	16.3	15,4	16,5
25	16.5	16,3	16,7
26	15.9	16,1	16,2
27	14.7	14,8	14,9
28	19.5	17,7	17,9
29	25.5	22,5	22,7
30	107.1	21,7	21,8
O-CO-CH <sub>3</sub>	171.0	-	171,3

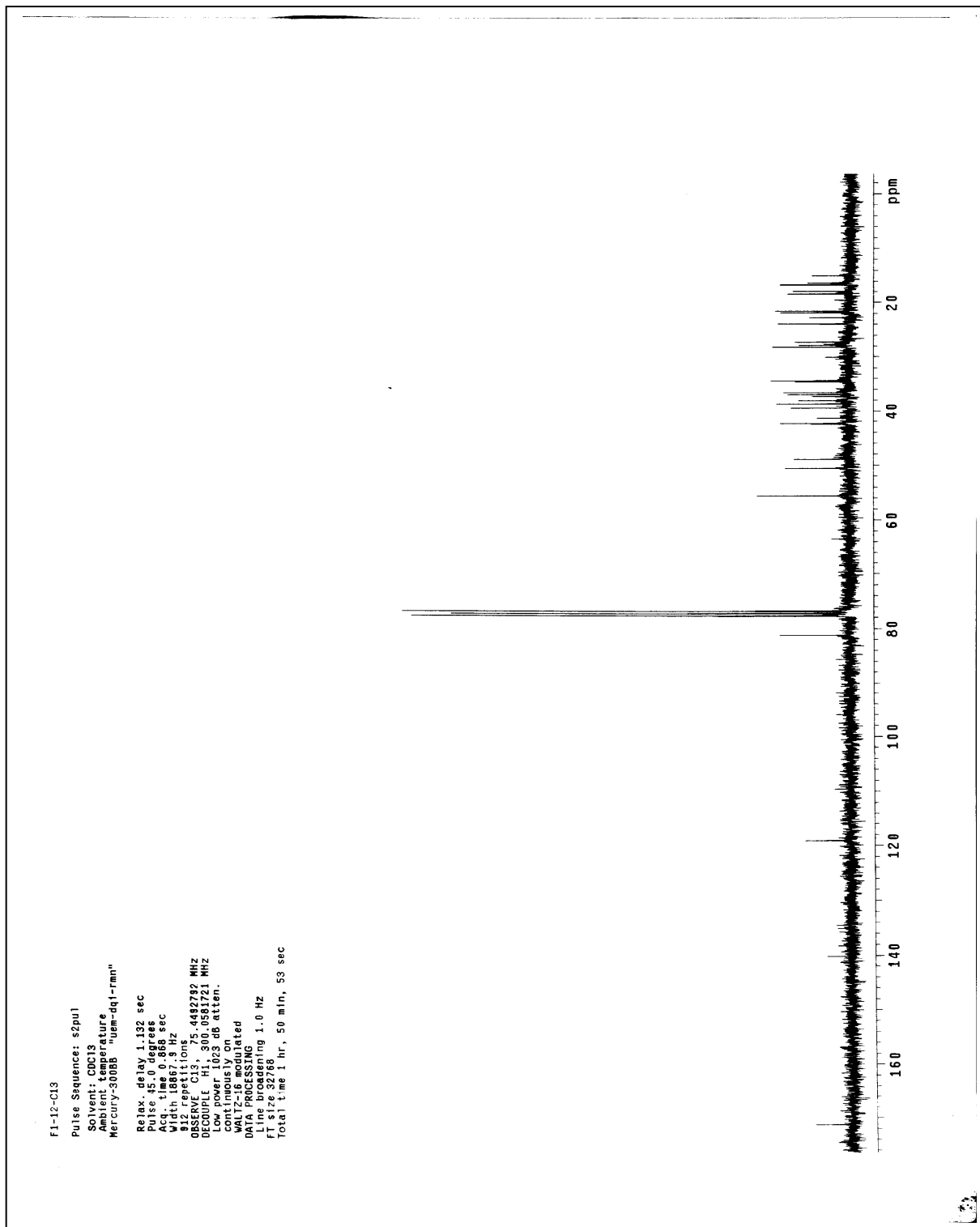
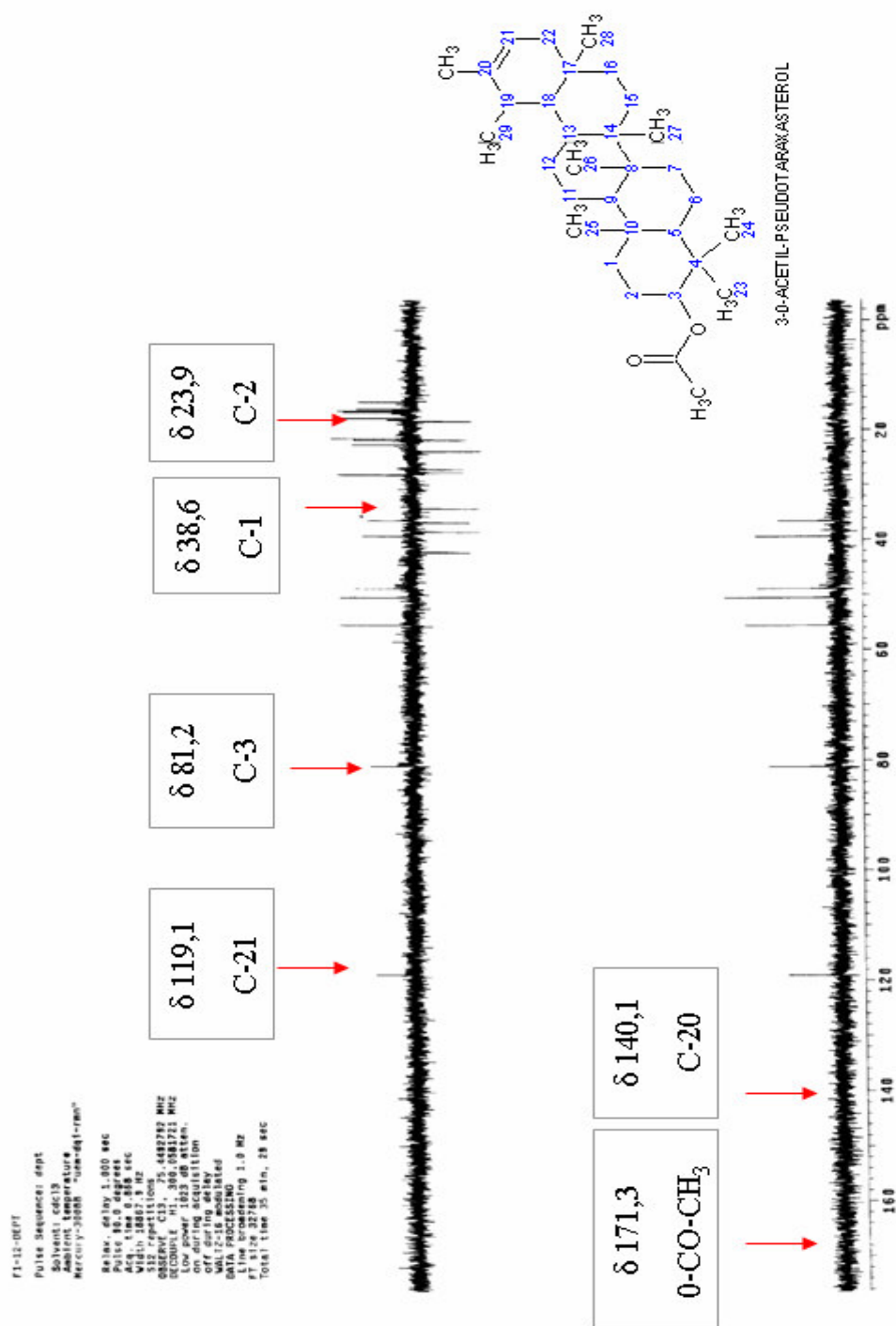
FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DO 3-O-ACETIL-PSEUDOTARAXASTEROL

FIGURA 21 - ESPECTRO DE RMN DE DEPT E  $^{13}\text{C}$  DO 3-O-ACETIL-PSEUDOTARAXASTEROL

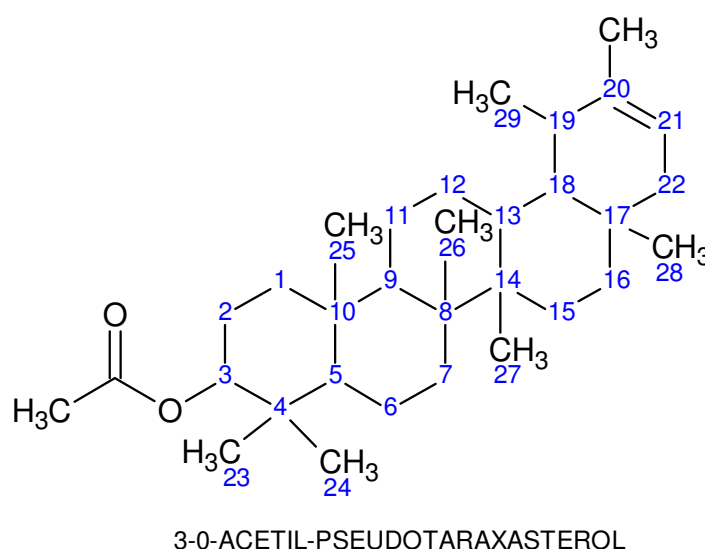




Os dados comparativos entre o 3-O-acetil-taraxasterol, o pseudotaraxasterol e a substância FH1 mostra que na substância isolada os deslocamentos químicos dos carbonos 1 ao 3 são correspondentes aos mesmos carbonos do 3-O-acetil-taraxasterol, somando a este fato,  $\delta$  171,3 evidencia a presença de um grupamento éster. A presença dos carbonos olefínicos com sinais  $\delta$  140,1 (C20) e  $\delta$  119,1 (C21) são compatíveis com o esqueleto do pseudotaraxasterol.

As observações espectrais e as referências da literatura (MAHATO *et al.*, 1994) mostram que a substância FH1 corresponde ao triterpeno 3-O-Acetil-pseudotaraxasterol (Figura 22).

FIGURA 22 – ESTRUTURA QUÍMICA DO 3-O-ACETIL-PSEUDOTARAXASTEROL



#### 5.1.4.1.2 Análise dos cristais de taraxasterol e pseudotaraxasterol

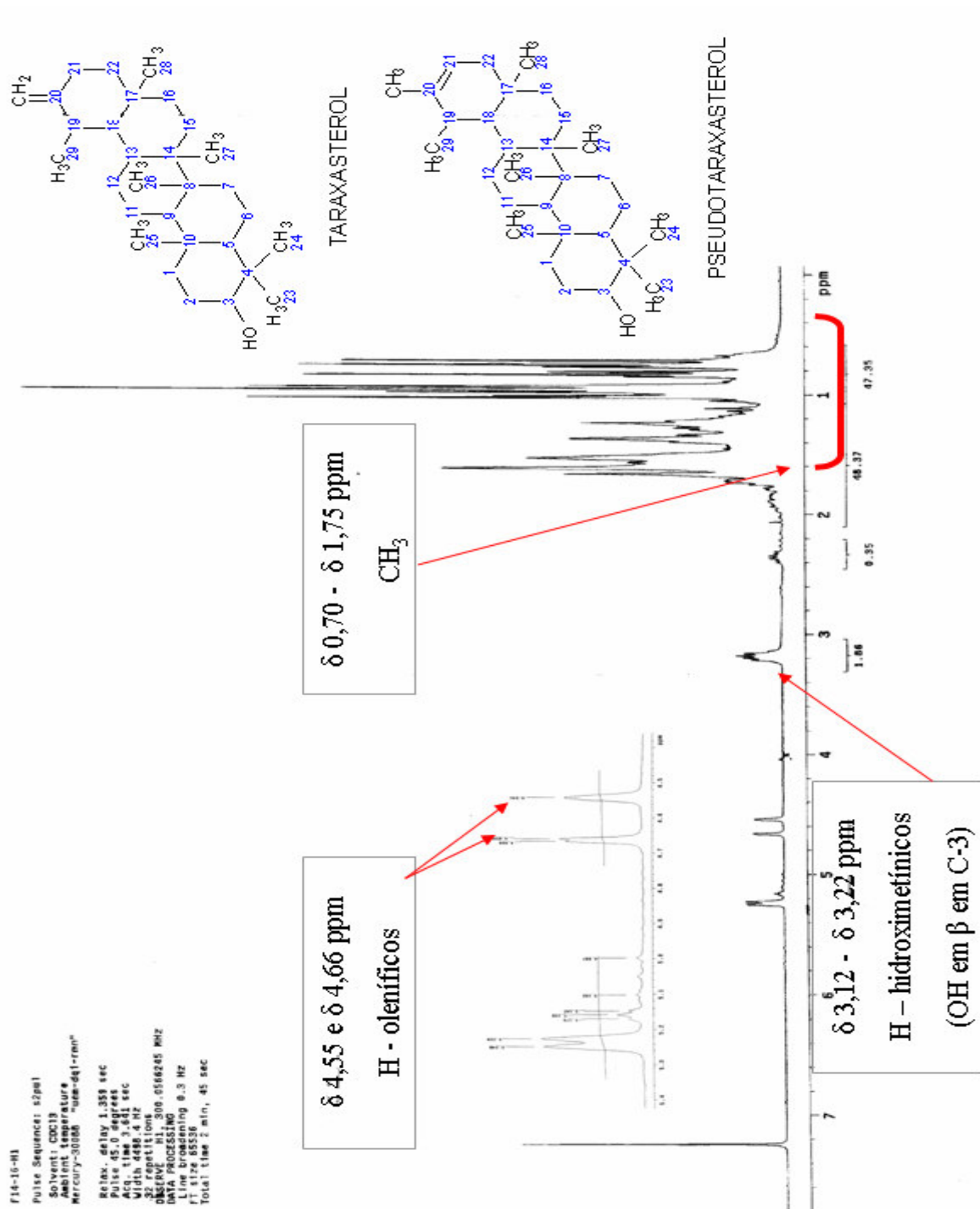
A análise dos cristais da mistura de taraxasterol e pseudotaraxasterol revelou a presença de dois triterpenos.

##### a) Espectro de RMN de $^1\text{H}$

A mistura de taraxasterol e pseudotaraxasterol apresentou em seu espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) uma grande quantidade de sinais entre  $\delta$  0,70 e  $\delta$  1,75, referentes a grupos metílicos e um multiplete entre  $\delta$  3,12 e  $\delta$  3,22 referentes aos hidrogênios hidroximetínicos, considerando que o triterpeno pseudotaraxasterol tem uma hidroxila em  $\beta$  na posição 3. Os hidrogênios olefínicos também são observados, aparecendo como dubleto entre  $\delta$  4,55 e  $\delta$  4,66. A frequência utilizada foi de 300 MHz em  $\text{CDCl}_3$ . (Figura 23).

Os hidrogênios olefínicos também são observados, aparecendo como dubleto entre  $\delta$  4,55 e  $\delta$  4,66.

FIGURA 23 – ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA MISTURA DE TARAXASTEROL E PSEUDOTARAXASTEROL



b) Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ 

Os deslocamentos químicos atribuídos pelos espectros de  $^{13}\text{C}$  na frequência de 300 MHz em  $\text{CDCl}_3$ , estão indicados na Tabela 5 e Figura 24 e 25.

TABELA 5 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  PARA PSEUDOTARAXASTEROL E TARAXASTEROL ISOLADOS COMPARADOS COM OS DA LITERATURA (MAHATO *et al.*, 1994)

Carbonos	Pseudotaraxasterol		Taraxasterol	
	<i>literatura</i>	<i>experimental</i>	<i>literatura</i>	<i>experimental</i>
1	38,8	38,9	38,8	38,9
2	27,4	27,6	27,4	27,6
3	79,0	79,2	79,0	79,2
4	38,8	38,9	38,8	38,9
5	55,3	55,4	55,4	55,4
6	18,3	19,5	18,3	19,5
7	34,3	34,4	34,1	34,4
8	41,1	41,2	40,9	40,2
9	50,4	50,6	50,5	50,6
10	37,1	37,3	37,1	37,3
11	21,6	21,8	21,4	21,8
12	27,6	27,8	26,6	27,8
13	39,2	39,4	39,2	39,4
14	42,3	42,3	42,0	42,3
15	27,0	27,2	26,6	27,2
16	36,6	36,5	38,3	38,9
17	34,4	34,4	34,5	34,6
18	48,8	48,8	48,7	48,5
19	36,6	36,9	39,4	39,4
20	138,8	140,1	154,6	151,2
21	118,9	119,1	25,6	22,7
22	42,2	42,4	38,9	38,9
23	28,8	29,9	28,8	29,9
24	15,4	15,6	15,4	15,6
25	16,3	16,6	16,8	16,5
26	16,1	16,2	15,9	15,7
27	14,8	14,9	14,8	14,9
28	17,7	17,9	19,5	19,5
29	22,5	22,7	25,5	25,3
30	21,7	21,8	107,7	109,5

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  a presença dos carbonos olefínicos foi facilmente identificada com os sinais  $\delta$  140,1 (C20) e  $\delta$  119,1 (C21) para o pseudotaraxasterol e  $\delta$  151,2 (C20) e  $\delta$  22,7 (C21) para o taraxasterol (MAHATO *et al.*, 1994).

FIGURA 24 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA MISTURA DE TARAXASTEROL E PSEUDOTARAXASTEROL

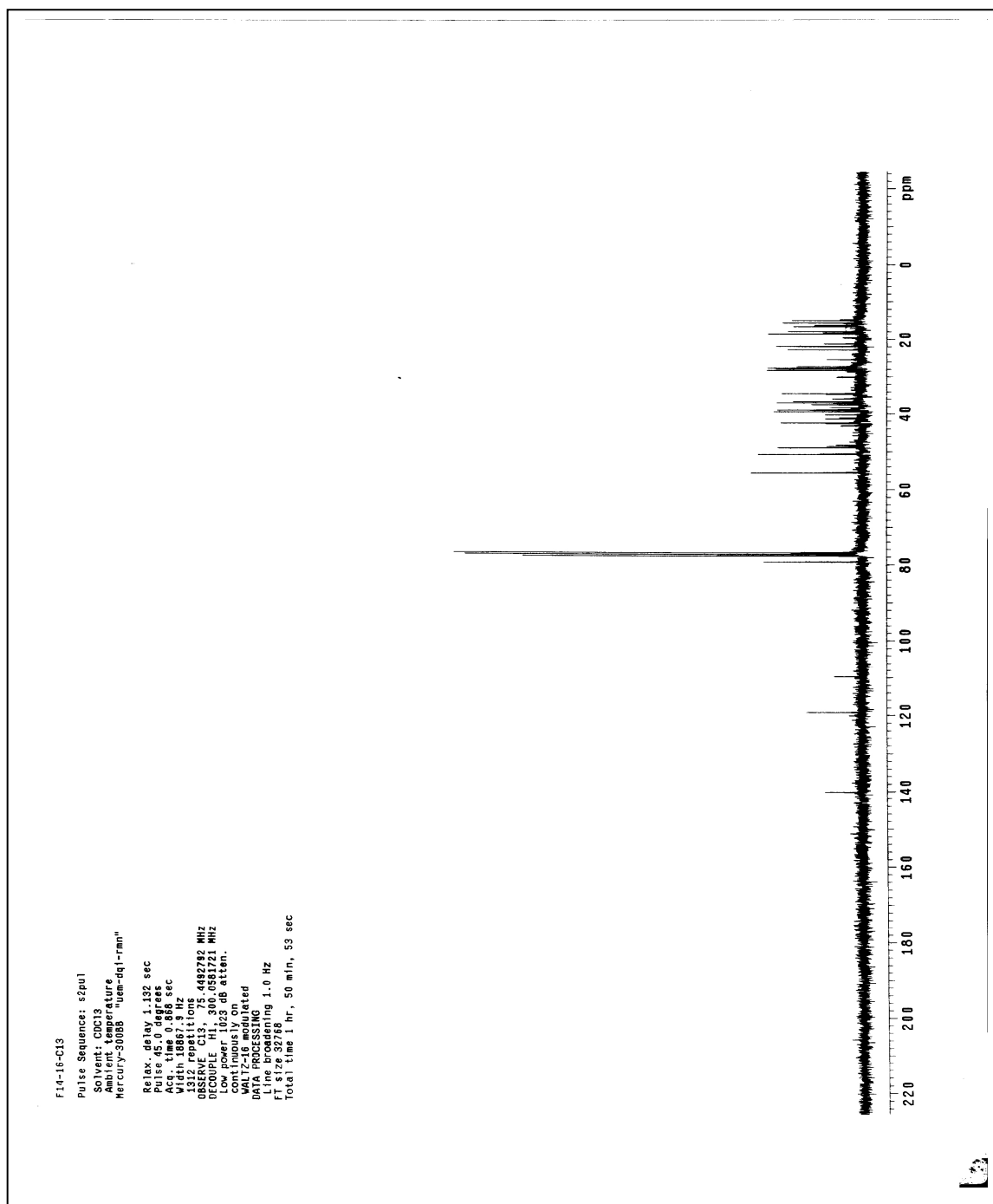
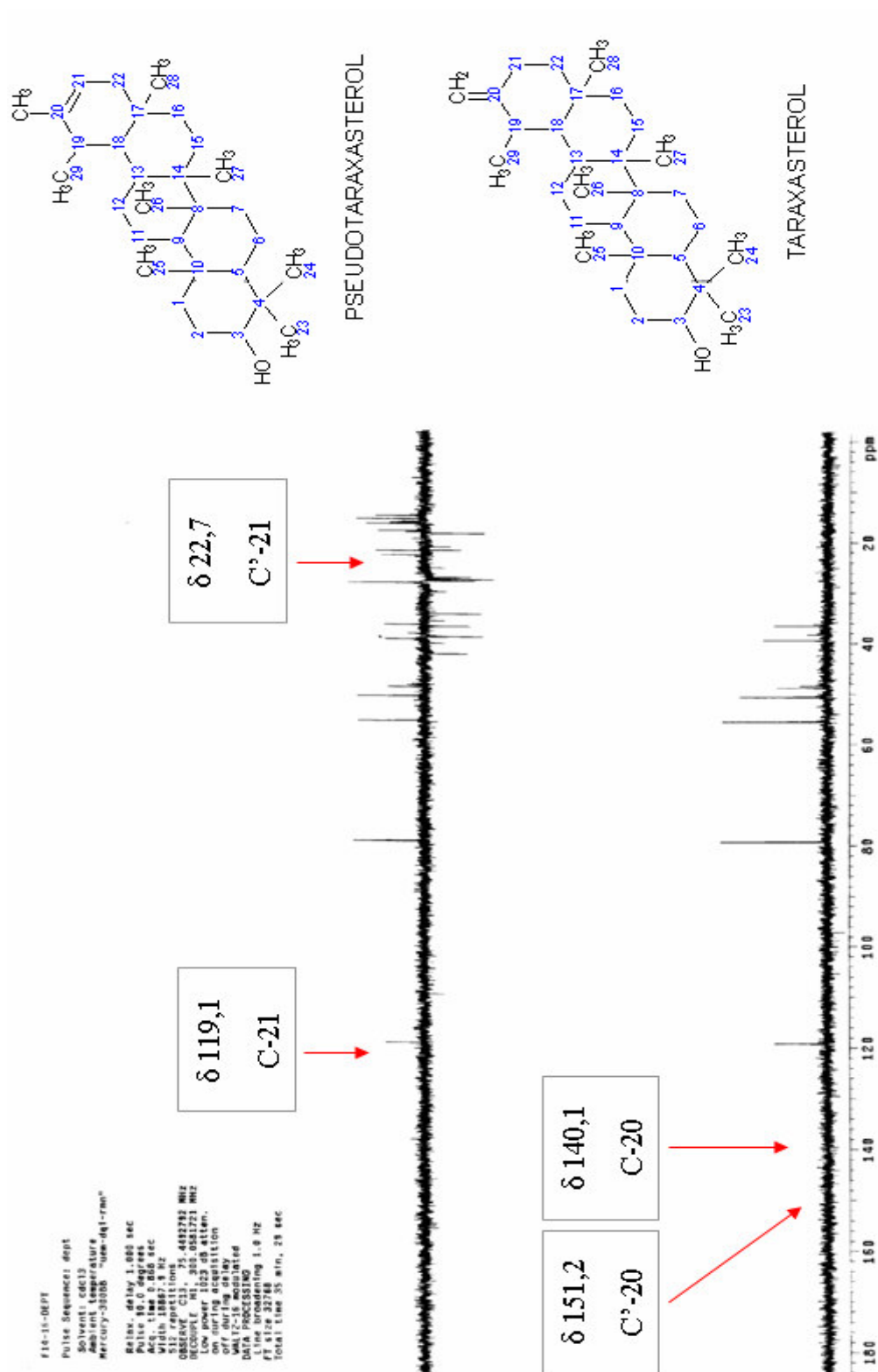
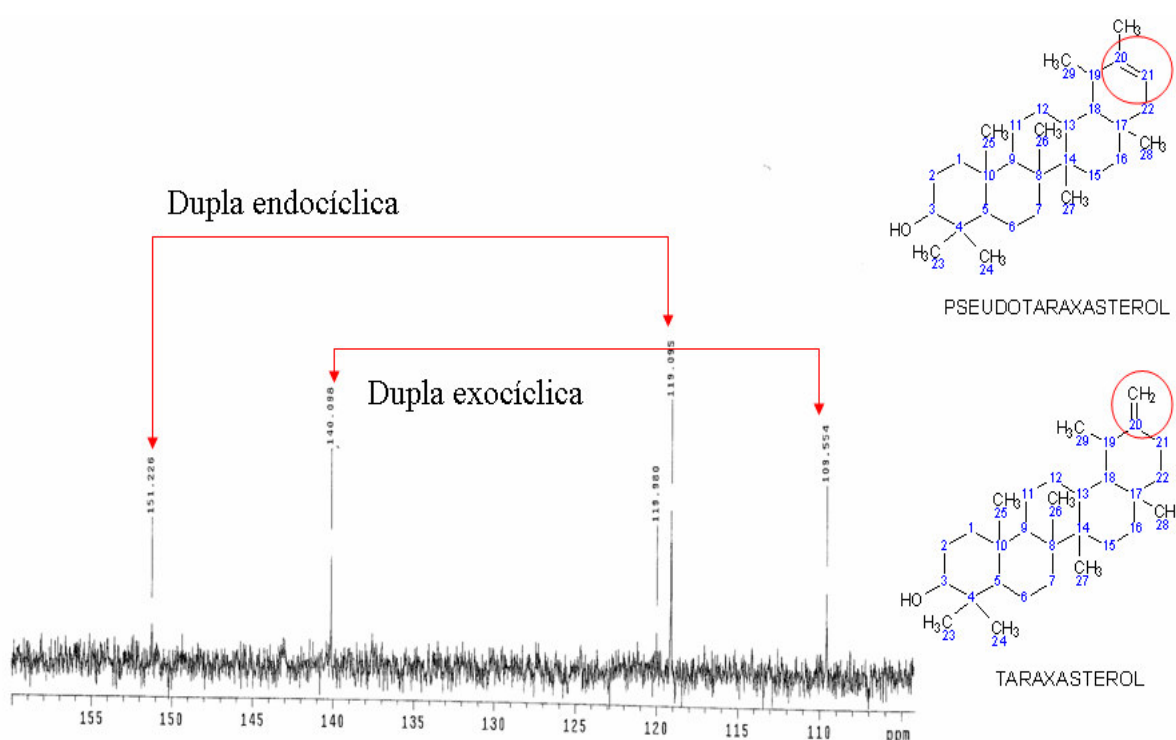


FIGURA 25 - ESPECTRO DEPT 135° DE RMN DA MISTURA DE TARAXASTEROL E PSEUDOTARAXASTEROL



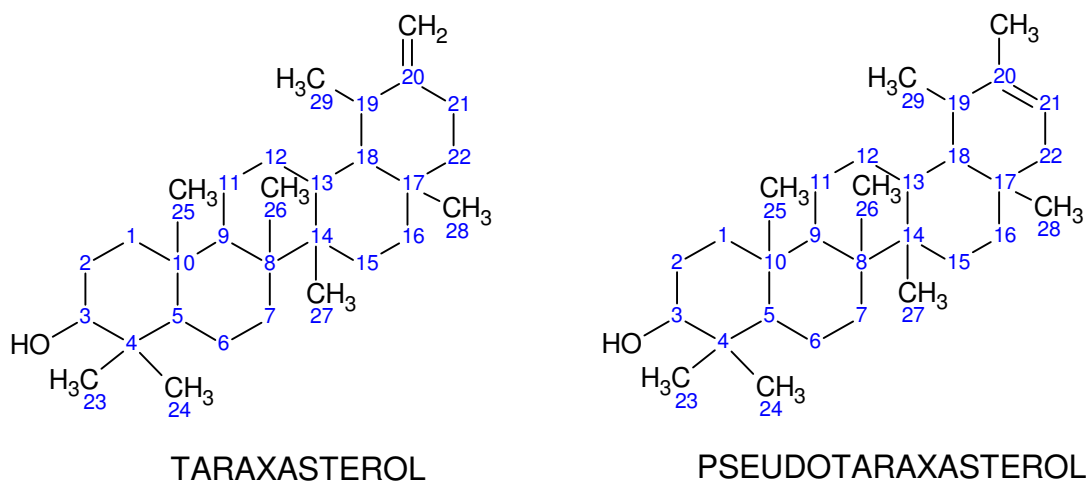
A presença dos sinais  $\delta$  140,1 (C20) e  $\delta$  119,1 (C21), e  $\delta$  151,2 (C20) e  $\delta$  109,1 (C30) mostra claramente a mistura entre dois triterpenos distintos, um com a dupla endocíclica (pseudotaraxasterol) e outro com a dupla exocíclica (taraxasterol) (Figura 26).

FIGURA 26 - EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE  $^{13}\text{C}$  DA MISTURA DE TARAXASTEROL E PSEUDOTARAXASTEROL



Com as evidências mostradas pode-se atribuir à mistura de triterpenos de FH2 como sendo as substâncias Taraxasterol e Pseudotaraxasterol (Figura 27).

FIGURA 27 – IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA COMPOSIÇÃO DE TRITERPENOS PRESENTES NOS CRISTAIS DE FH2



#### 5.1.4.1.3 Análise dos cristais de undecan-1-ol

A análise dos cristais de undecan-1-ol mostrou os seguintes dados:

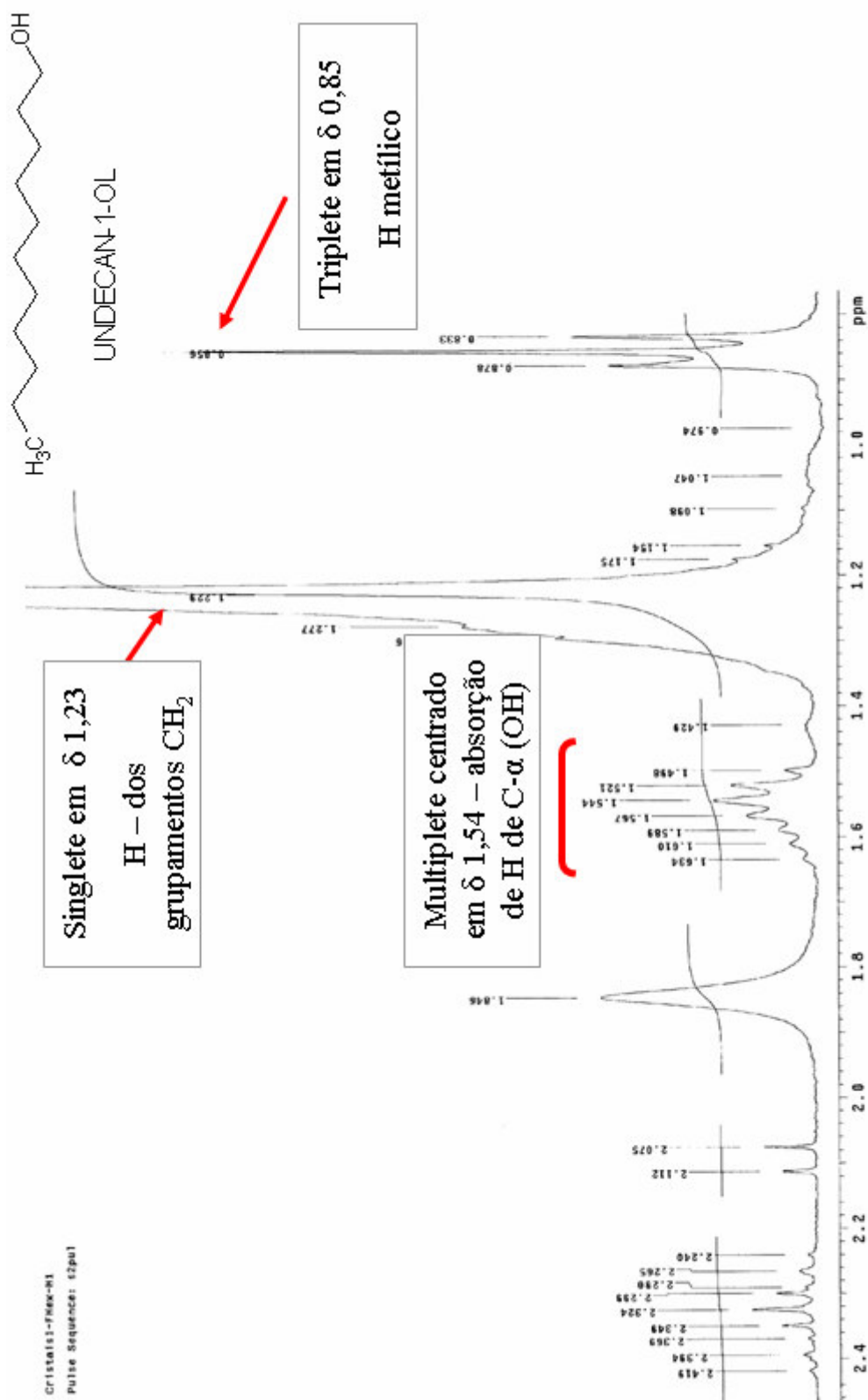
##### a) Espectro de RMN de $^1\text{H}$

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foi obtido em  $\text{CDCl}_3$  a 300 MHz. Este registrou deslocamentos apenas na região compreendida entre 0,8 e 2,4 ppm. Um triplete centrado em 0,85 ppm indica a absorção de um próton metílico e um sinal de alta intensidade em 1,23 ppm indica a absorção de prótons de (n) grupamentos  $\text{CH}_2$ , formando uma cadeia saturada.

A presença de um multiplete centrado em 1,54 ppm indica a absorção de um hidrogênio situado no carbono  $\alpha$  em relação ao grupo OH (Figura 28 e 29).





FIGURA 29 – EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO UNDECAN-1-OL

b) Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ 

Os deslocamentos químicos atribuídos pelos espectros de  $^{13}\text{C}$  na frequência de 75 MHz em  $\text{CDCl}_3$ , estão indicados na Tabela 6 e Figura 30 e 31. A proposta para esta estrutura é de um álcool graxo de cadeia saturada. Para fins comparativos foi utilizada a referência de MONTRUCHIO (2001) que isolou o ácido palmítico (Figura 32) que se assemelha à substância FH3 pela longa cadeia saturada com adição de um grupamento no carbono  $\alpha$ .

TABELA 6 – DADOS DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RNM DE  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$  EM PPM,  $\text{CDCl}_3$ ) PARA O UNDECAN-1-OL COMPARADO COM O ÁCIDO PALMÍTICO DA LITERATURA (MONTRUCHIO, 2001)

Tipo	C	Ácido Palmítico	Undecan-1-ol	C	Tipo
$\text{CH}_3$	1	14,13	14,35	1	$\text{CH}_3$
$\text{CH}_2$ – posição $\alpha$ em relação ao $\text{CH}_3$	2	22,70	22,93	2	$\text{CH}_2$ – posição $\alpha$ em relação ao $\text{CH}_3$
$\text{CH}_3$ - posição $\beta$ em relação ao $\text{CH}_3$	3	31,92	32,17	3	$\text{CH}_3$ - posição $\beta$ em relação ao $\text{CH}_3$
$\text{CH}_2$	4 – 13	29,05 – 29,68	29,60 – 29,93	4 – 8	$\text{CH}_2$
$\text{CH}_3$ - posição $\beta$ em relação ao $\text{COOH}$	14	24,66	25,97	9	$\text{CH}_3$ - posição $\beta$ em relação ao $\text{OH}$
$\text{CH}_3$ - posição $\alpha$ em relação ao $\text{COOH}$	15	34,05	33,04	10	$\text{CH}_3$ - posição $\alpha$ em relação ao $\text{OH}$
$\text{C} = \text{O}$	16	180,17	63,7	11	$\text{C} - \text{OH}$

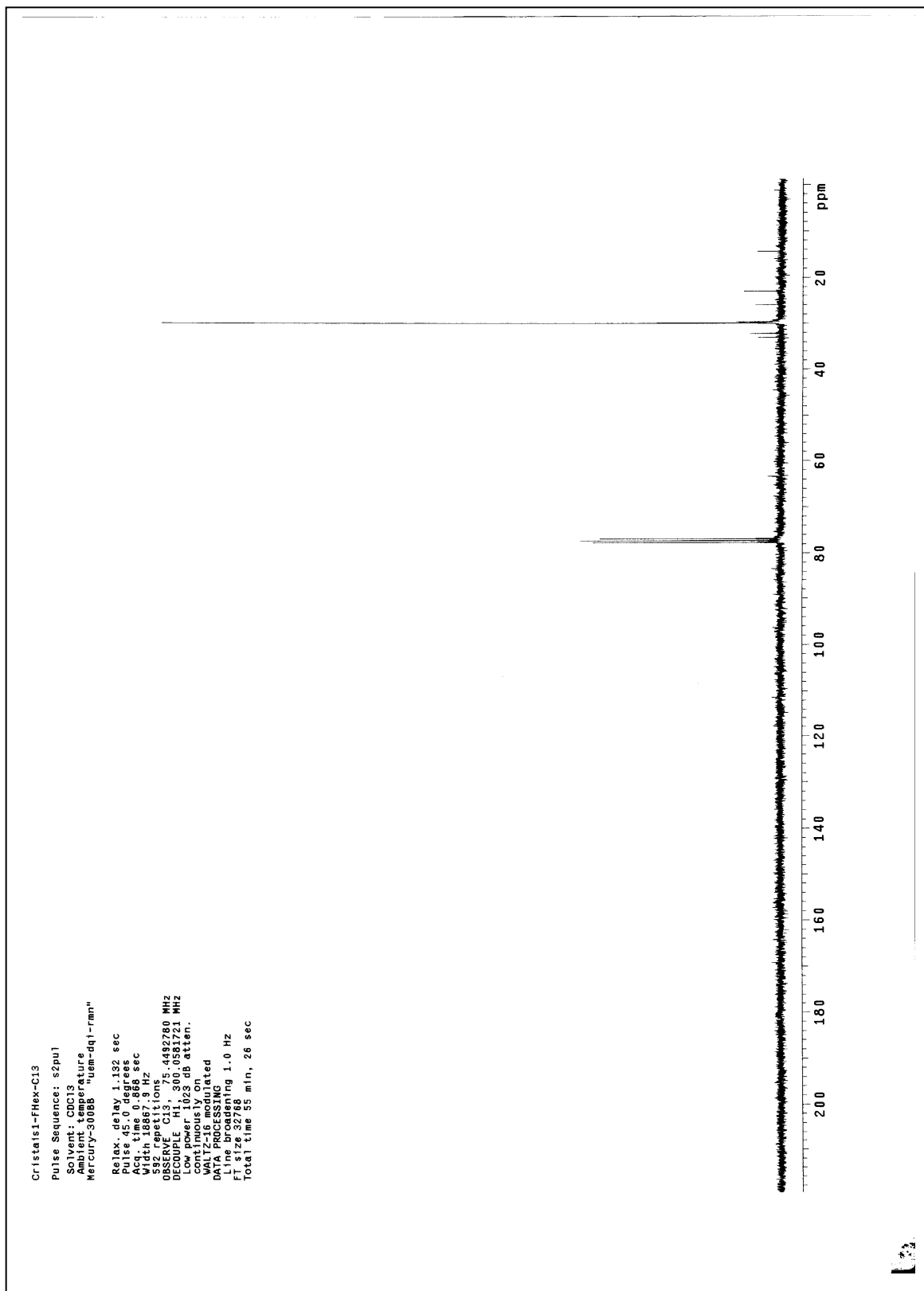
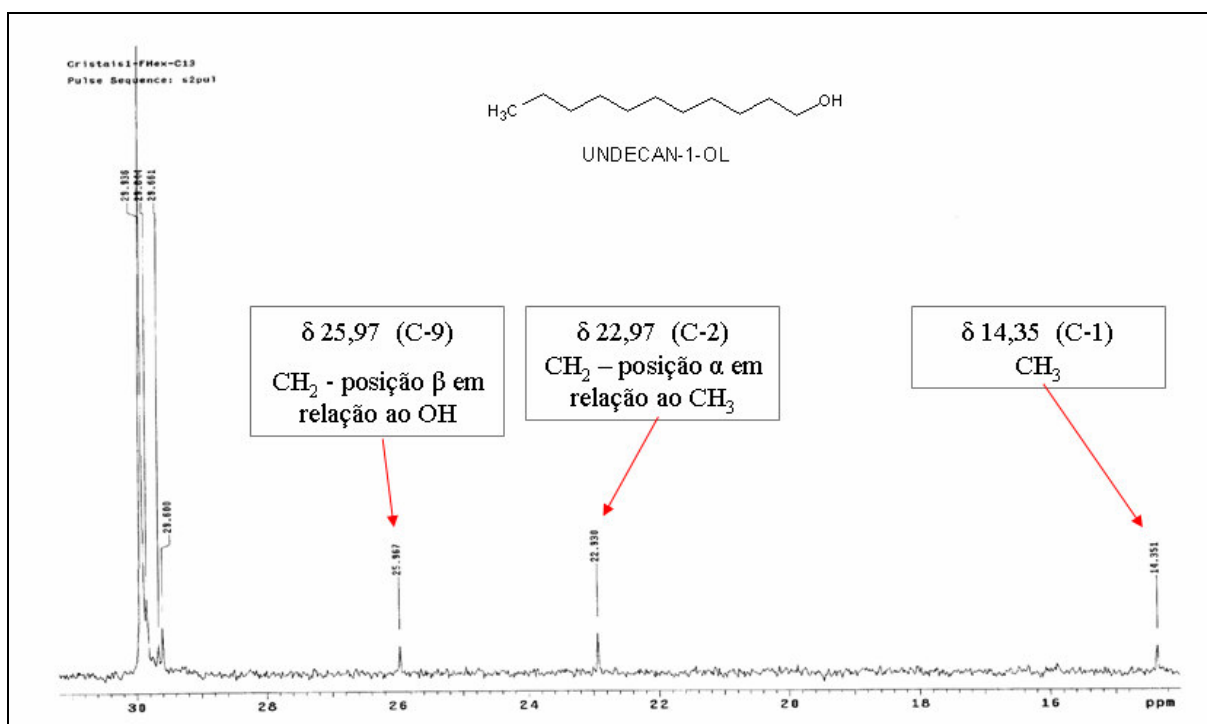
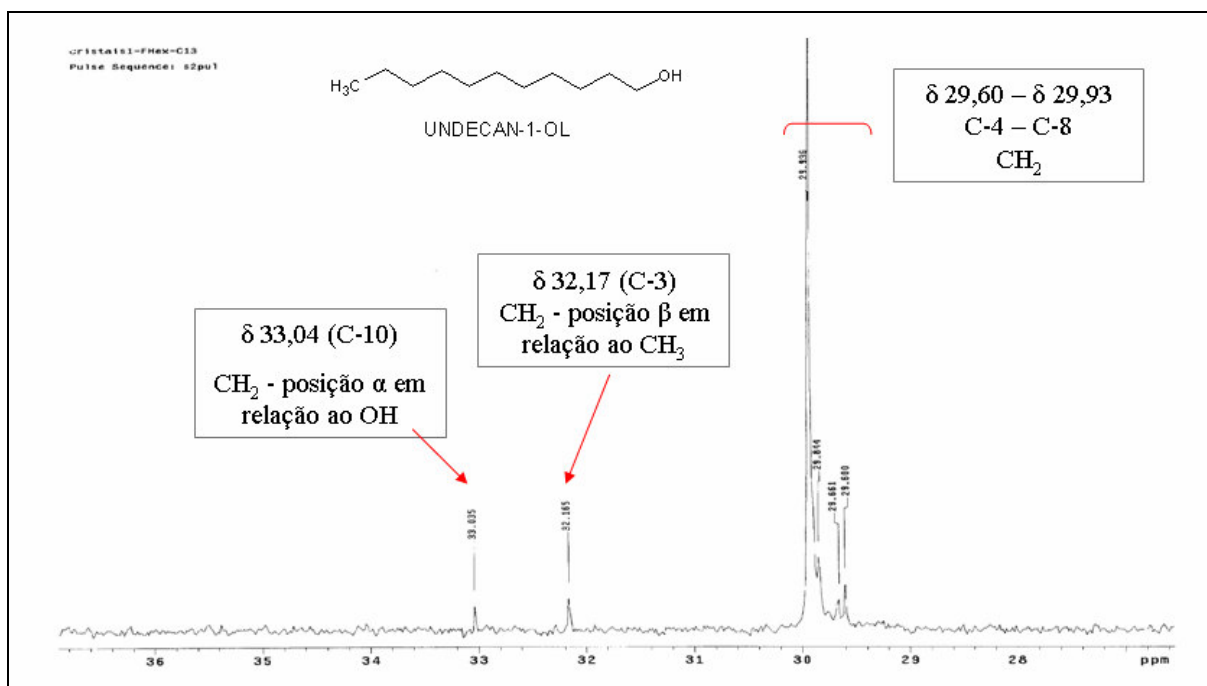
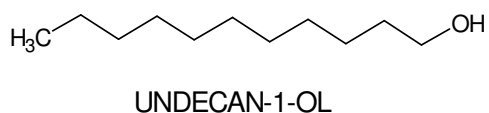
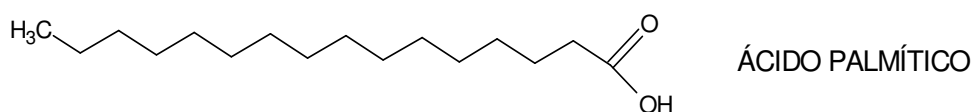
FIGURA 30 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DO UNDECAN-1-OL

FIGURA 31 – EXPANSÕES DO ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DO UNDECAN-1-OL DE  $\delta$  14 -  $\delta$  29 ppm E  $\delta$  29 –  $\delta$  33 ppm



Para confirmação da estrutura química da substância FH3 ainda será feita a análise em CG. Para o momento propomos a estrutura do undecan-1-ol com cadeia linear saturada com grupamento hidroxila em C  $\alpha$ .

FIGURA 32 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO PALMÍTICO E PROPOSTA PARA SUBSTÂNCIA FH3



#### 5.1.4.1.4 Análise dos cristais do dodecilciclohexano

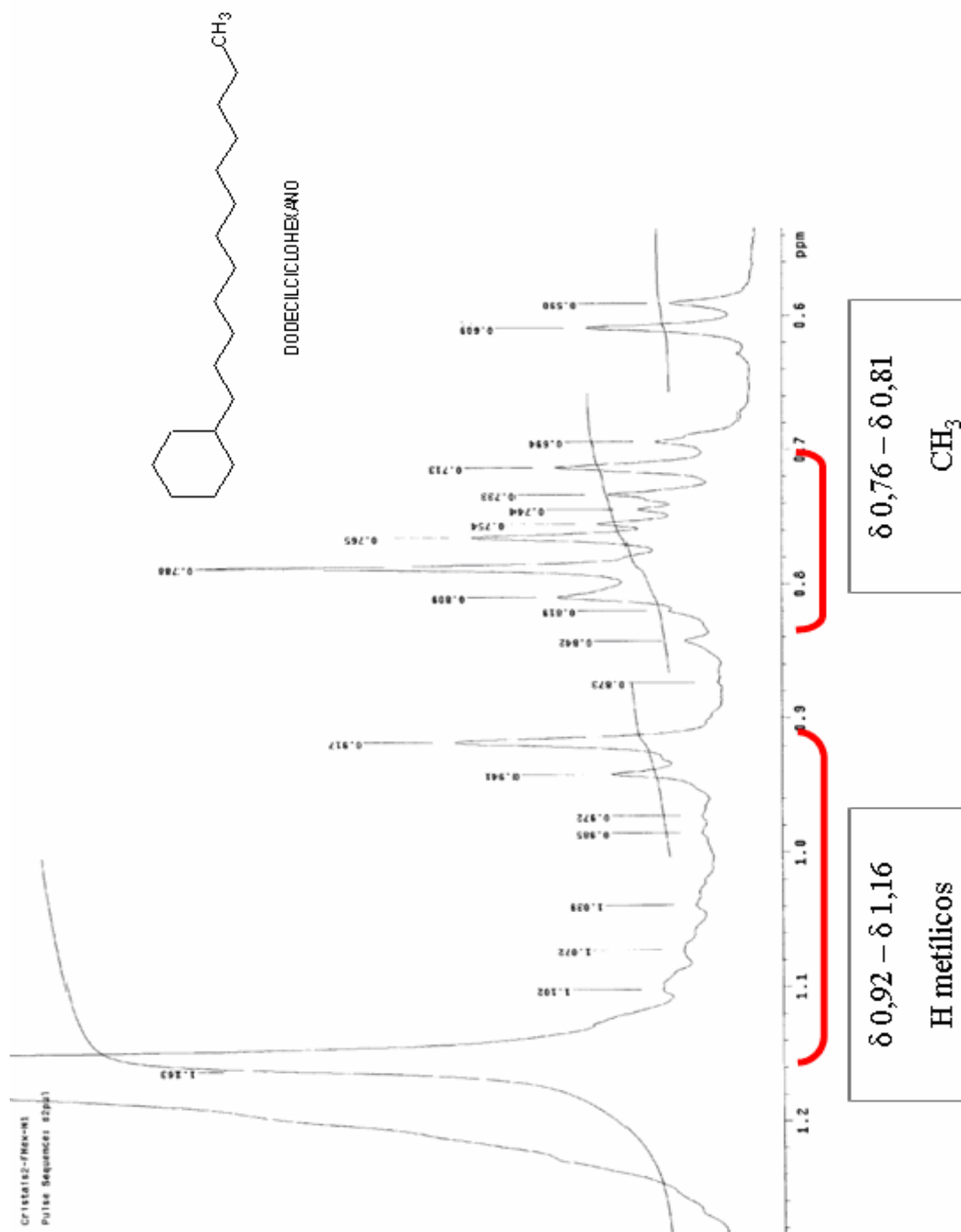
A análise dos cristais do dodecilciclohexano mostrou os seguintes dados:

##### a) Espectro de RMN de <sup>1</sup>H

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H foi obtido em CDCl<sub>3</sub> a 300 MHz. Este registrou deslocamentos entre  $\delta$  0,76 e  $\delta$  0,81 indicando a presença de CH<sub>3</sub>, e deslocamentos de  $\delta$  0,92 a  $\delta$  1,16 indicando absorção de hidrogênios metílicos. (Figuras 33 e 34)



FIGURA 34 – EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  DO DODECILCICLOHEXANO





b) Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ 

Analisando os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do dodecilciclohexano podemos observar o sinal de  $\text{CH}_3$  em  $\delta$  14,2, uma série de sinais de  $\text{CH}_2$  entre  $\delta$  29,2 e  $\delta$  29,8 correspondendo aos carbonos metilênicos (Figuras 35 e 36)

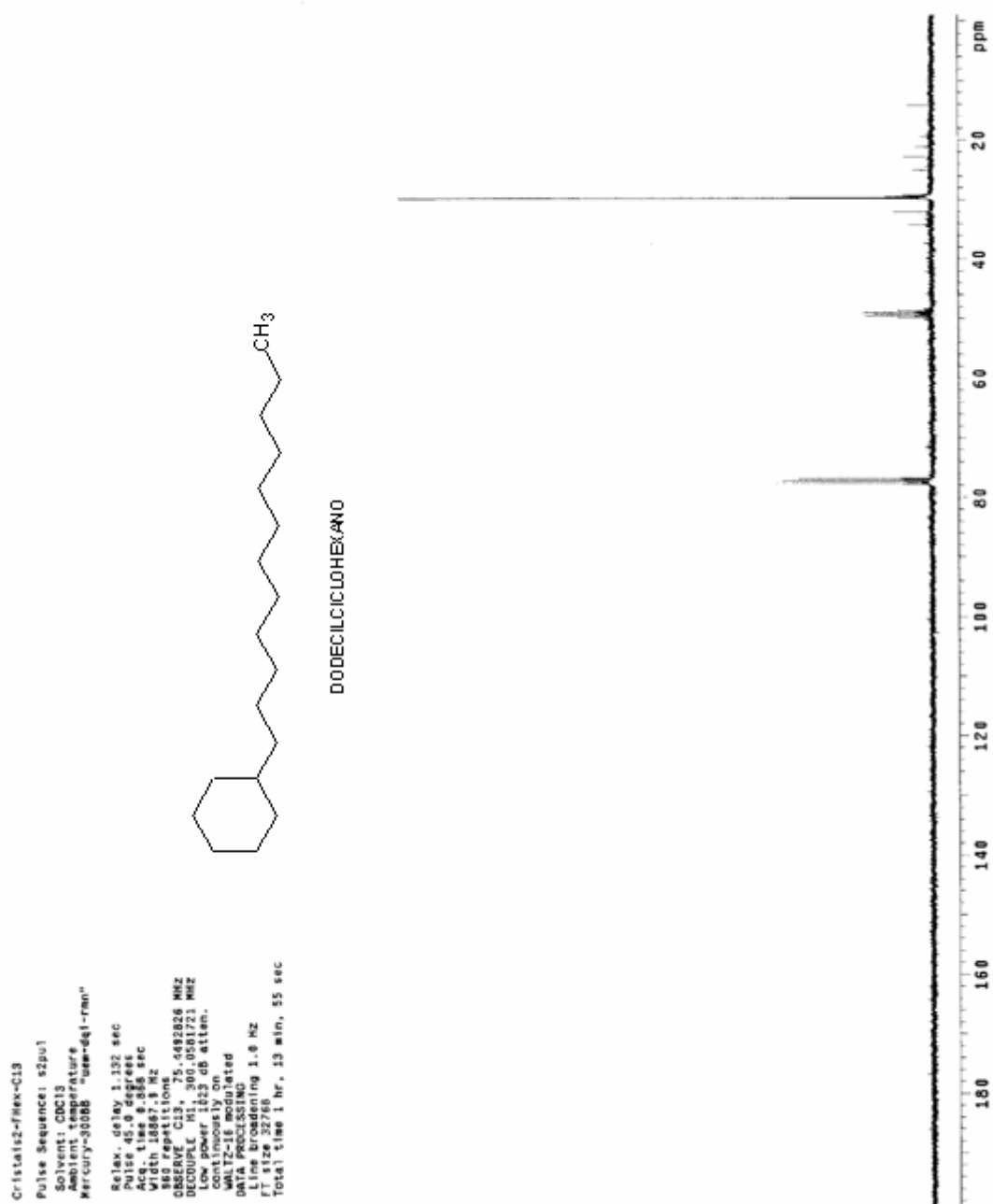
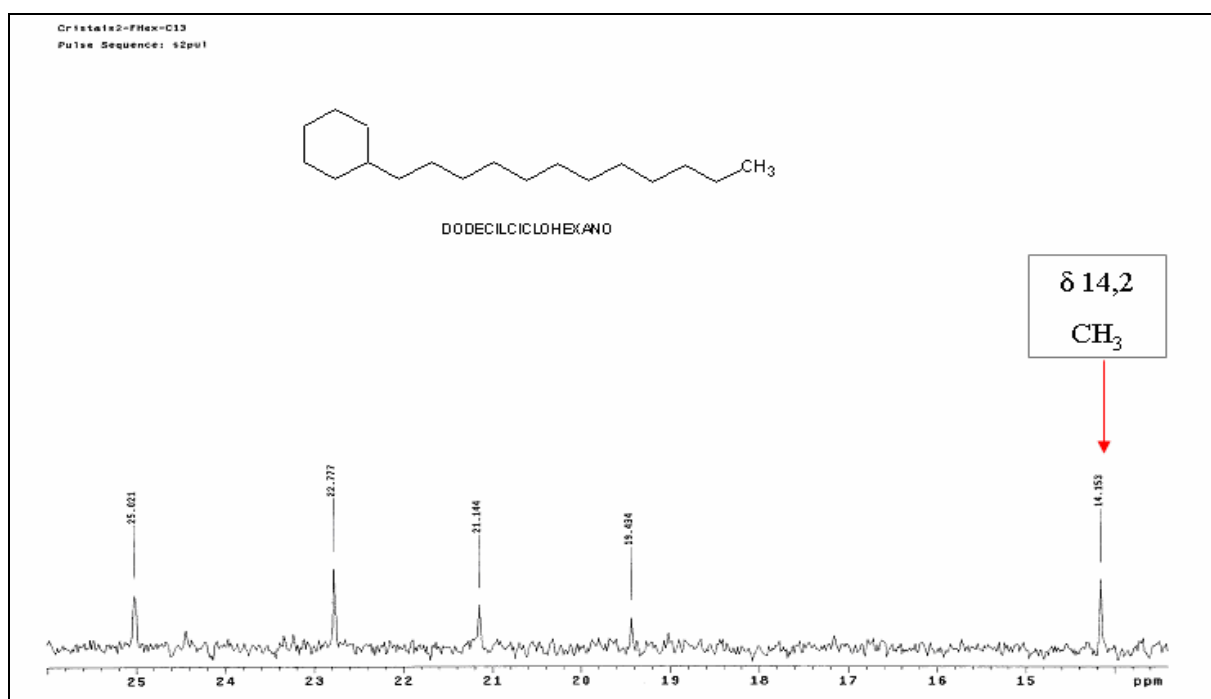
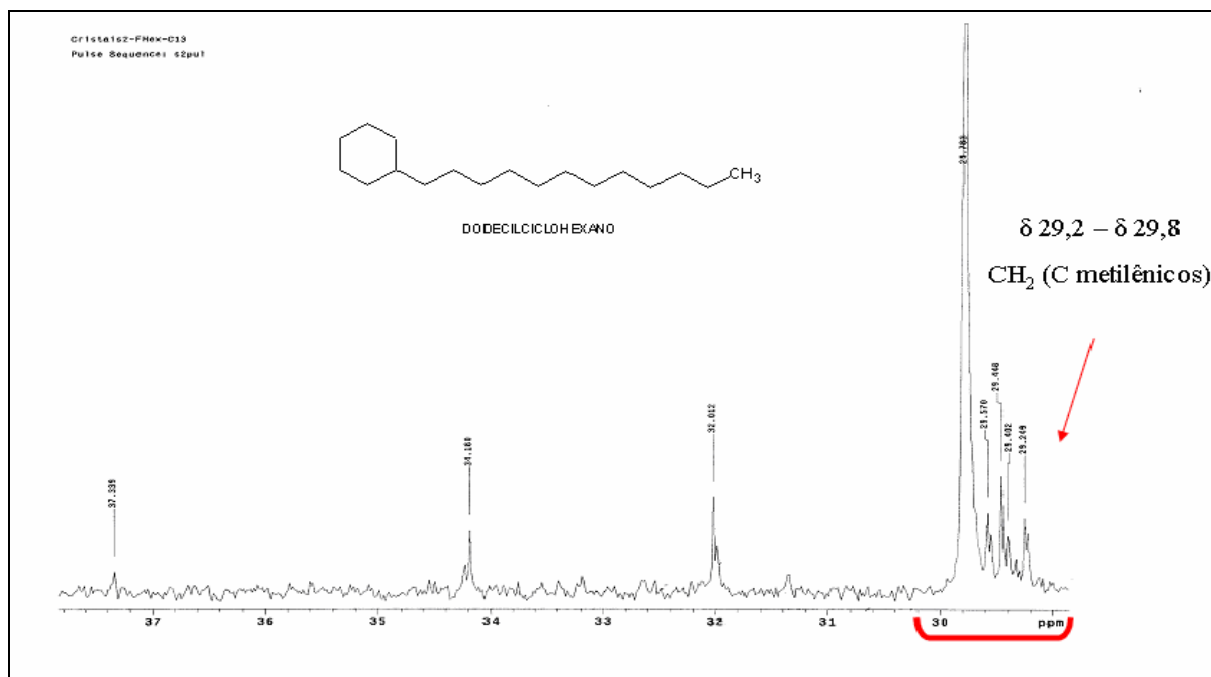
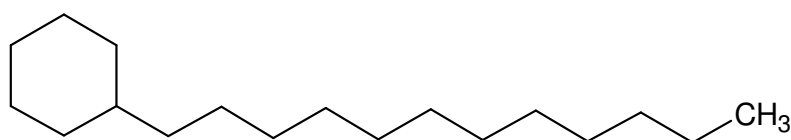
FIGURA 35 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DO DODECILCICLOHEXANO

FIGURA 36 – ESPECTROS DE EXPANSÃO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DO DODECILCICLOHEXANO DE  $\delta 14 - \delta 25$  ppm E  $\delta 29 - \delta 37$  ppm



Com os dados observados nos espectros, podemos propor a seguinte estrutura química pra a substância FH4 (Figura 37).

FIGURA 37 – ESTRUTURA QUÍMICA PROPOSTA PARA A SUBSTÂNCIA FH4



DODECILCICLOHEXANO

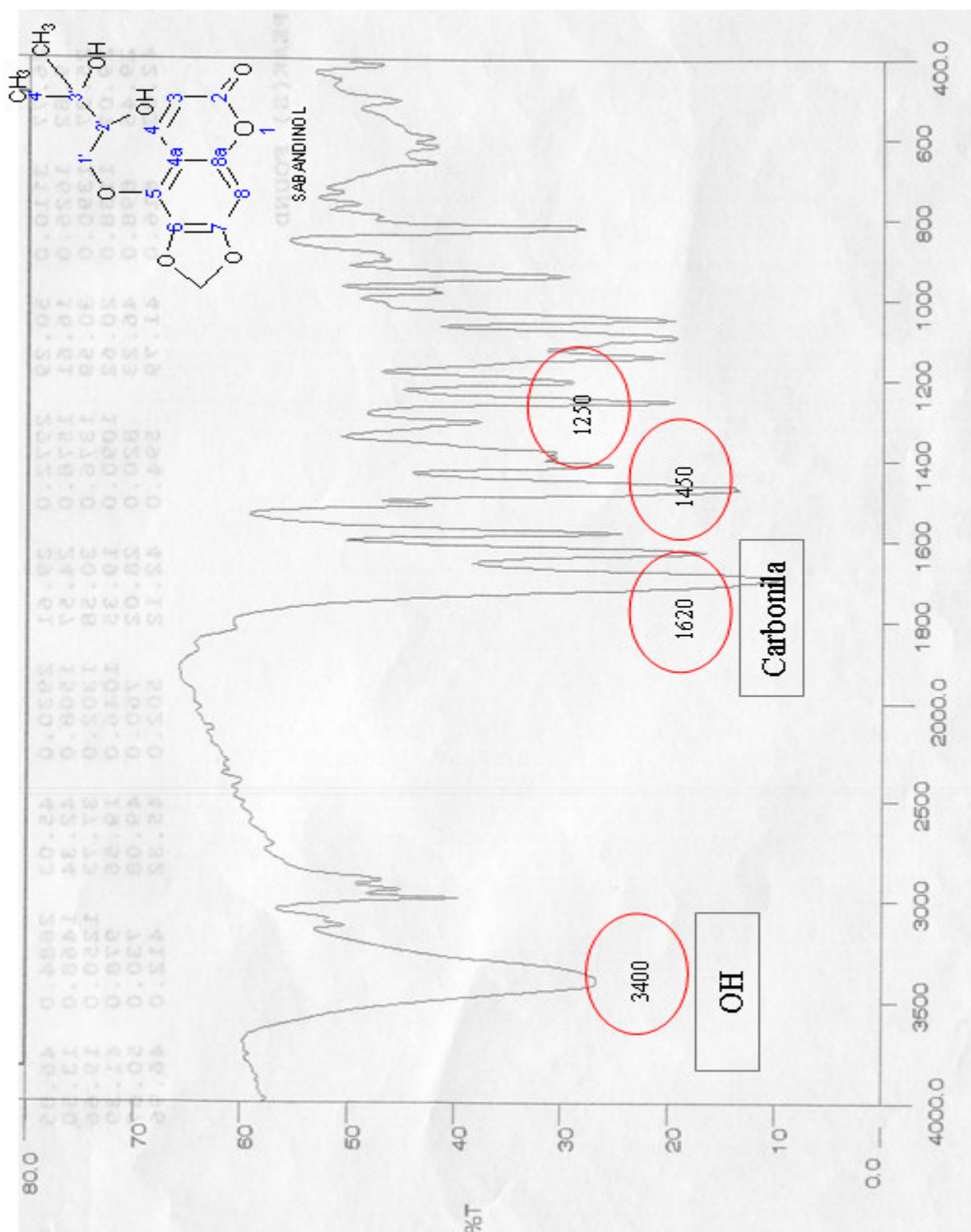
#### 5.1.4.2 Fração clorofórmio

Da cromatografia líquida em coluna realizada com esta fração foram recolhidas 167 subfrações de aproximadamente 15 mL cada. Características semelhantes visualizadas através da cromatografia em camada delgada (CCD) levou à reunião das subfrações 50 a 80, de cuja posterior cristalização foram isolados 1,4332 g de um cristal branco identificado como sabandinol.

##### a) Espectro de absorção no infravermelho do sabandinol

De acordo com SILVERSTEIN; BASSLER e MORRIL (1994), O espectro mostra absorção característica de hidroxila em  $3400\text{ cm}^{-1}$ ; características de carbonila em  $1620\text{ cm}^{-1}$ ,  $1450\text{ cm}^{-1}$ ,  $1250\text{ cm}^{-1}$  e outras absorções em  $2990\text{ cm}^{-1}$  e  $1700\text{ cm}^{-1}$  (Figura 38).

FIGURA 38 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DO SABANDINOL

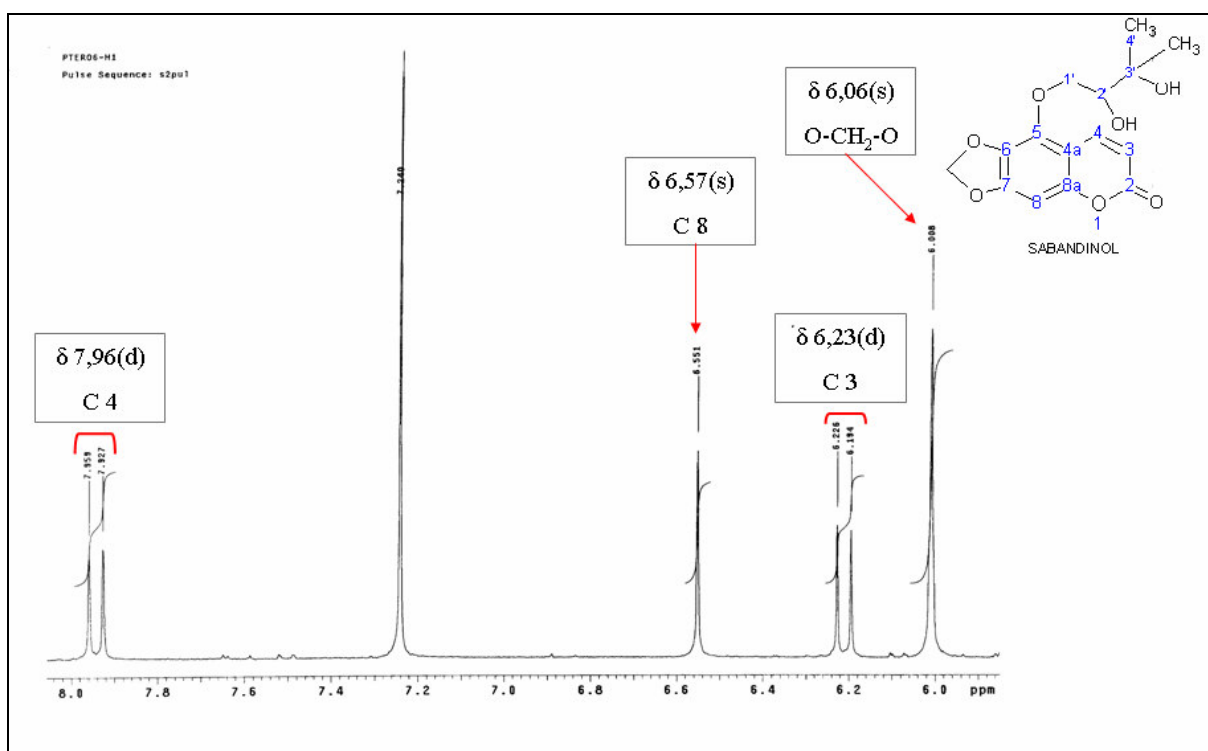
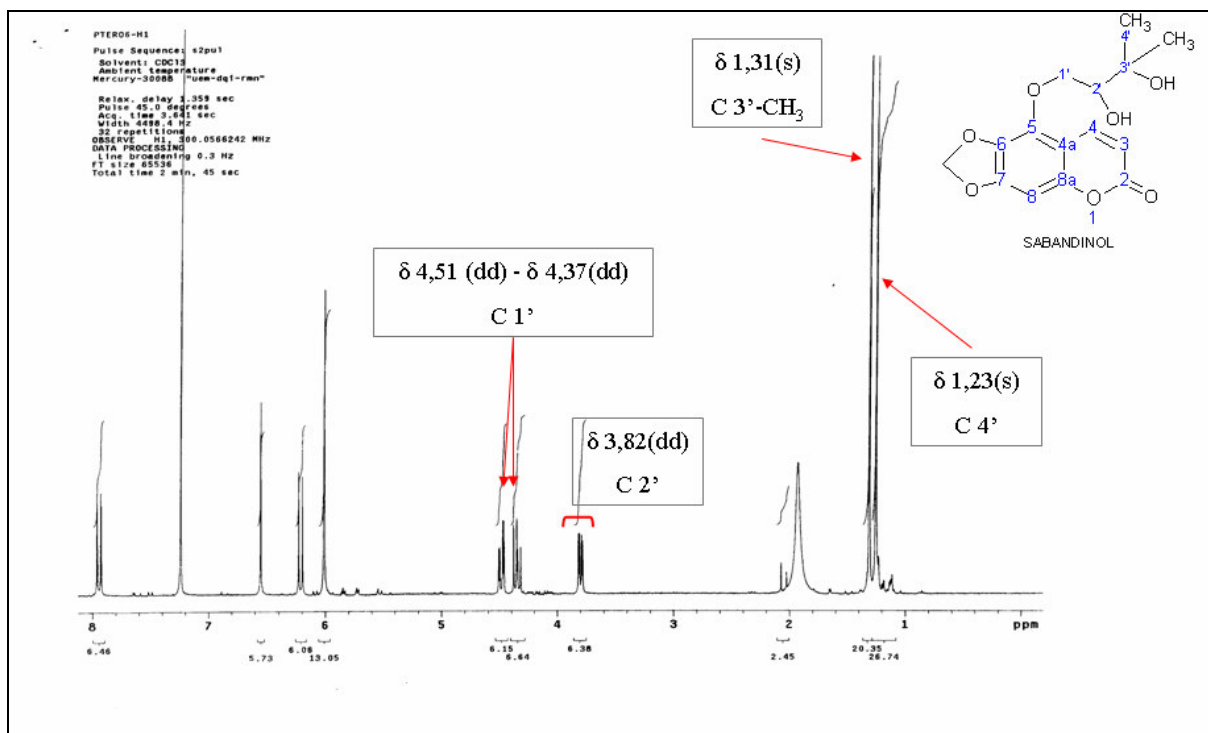


b) Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do sabandinol

O espectro de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  foi obtido a uma frequência de 300MHz em  $\text{CDCl}_3$  e apresenta  $\delta$ , em ppm, 7,96 (1H, d), 6,57 (1H, s), 6,23 (1H, d) 6,06 (2H, s), 4,51 (1H, dd), 4,37(1H, dd), 3,82 (1H, dd), 1,31 (3H, s), 1,23 (3H, s) (Figura 39).



FIGURA 40 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO SABANDINOL EXPANDIDO DE  $\delta$  1 –  $\delta$  8 ppm E  $\delta$  6 –  $\delta$  8 ppm



c) Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do sabandinol

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (PND, DEPT) (Figuras 40 e 41), os deslocamentos químicos obtidos na frequência de 75 MHz em  $\text{CDCl}_3$  apresentaram-se da seguinte forma (Tabela 7):

TABELA 7 – DESLOCAMENTO QUÍMICO DE RMN  $^{13}\text{C}$  DO SABANDINOL COMPARADO AOS DADOS DA LITERATURA (HEEMANN, 2002 E DEBENEDETTI, 1997)

CARBONO	SABANDINOL		
	HEEMANN, 2002	DEBENEDETTI, 1997	Experimental
2	160,70	161,18	161,7
3	111,47	112,14	112,3
4	139,18	138,58	139,8
4a	107,15	106,97	107,2
5	135,28	136,77	136,9
6	132,41	132,23	132,6
7	151,73	151,52	151,8
8	92,22	93,14	93,3
8a	152,81	152,43	152,7
O-CH <sub>2</sub> -O	102,32	102,06	102,3
1'	75,15	73,76	73,9
2'	77,37	71,61	77,2
3'	71,35	76,46	71,8
4'	27,31	26,72	27,0
3'-CH <sub>3</sub>	25,56	24,82	25,0

Os espectros de HMQC (Figuras 42 a 45) mostram os acoplamentos entre carbonos e hidrogênicos da estrutura do Sabandinol. Nos espectros de COSY



(Figuras 46 a 48) temos os acoplamentos entre hidrogênio da estrutura do sabandinol.

FIGURA 41 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DO SABANDINOL

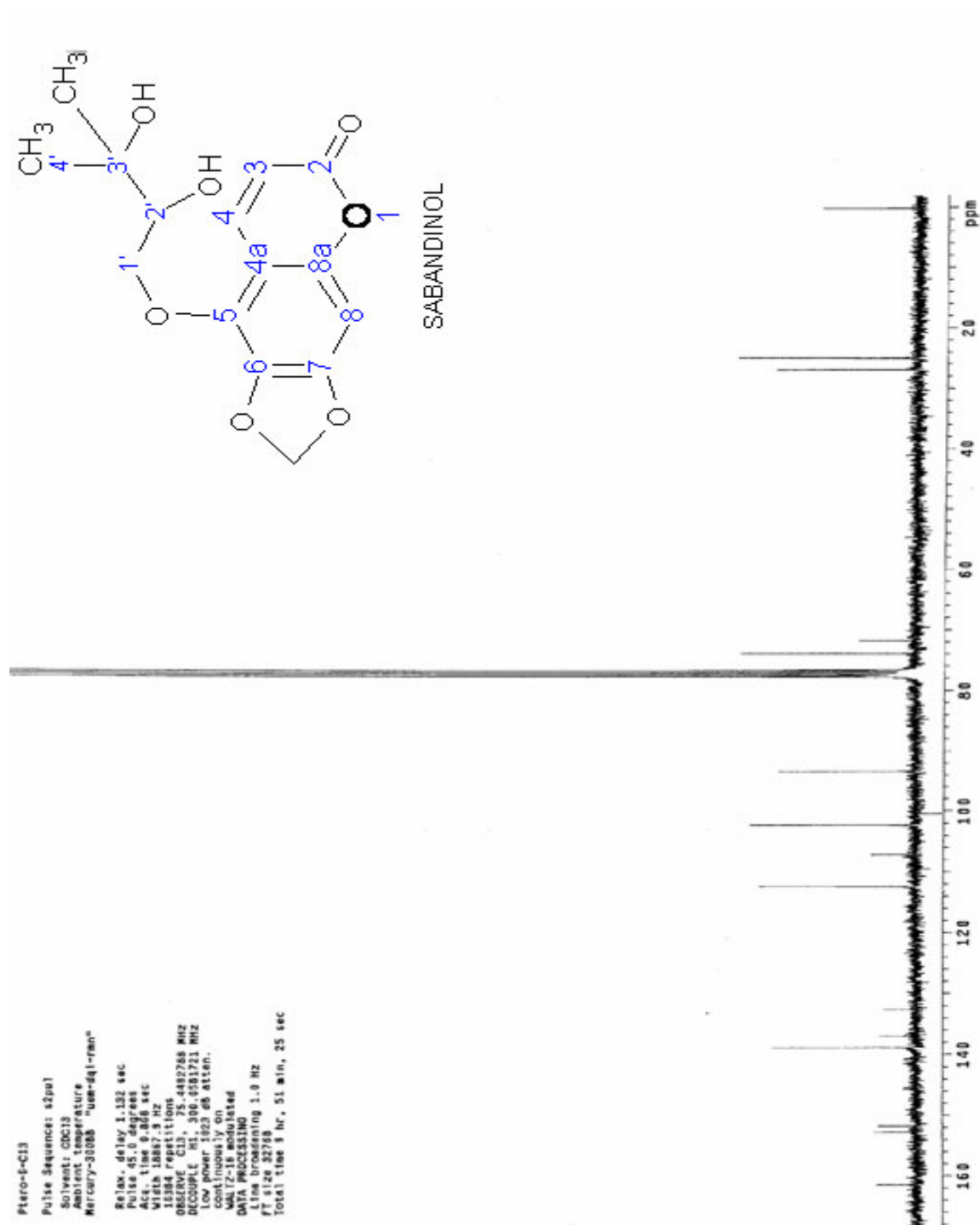


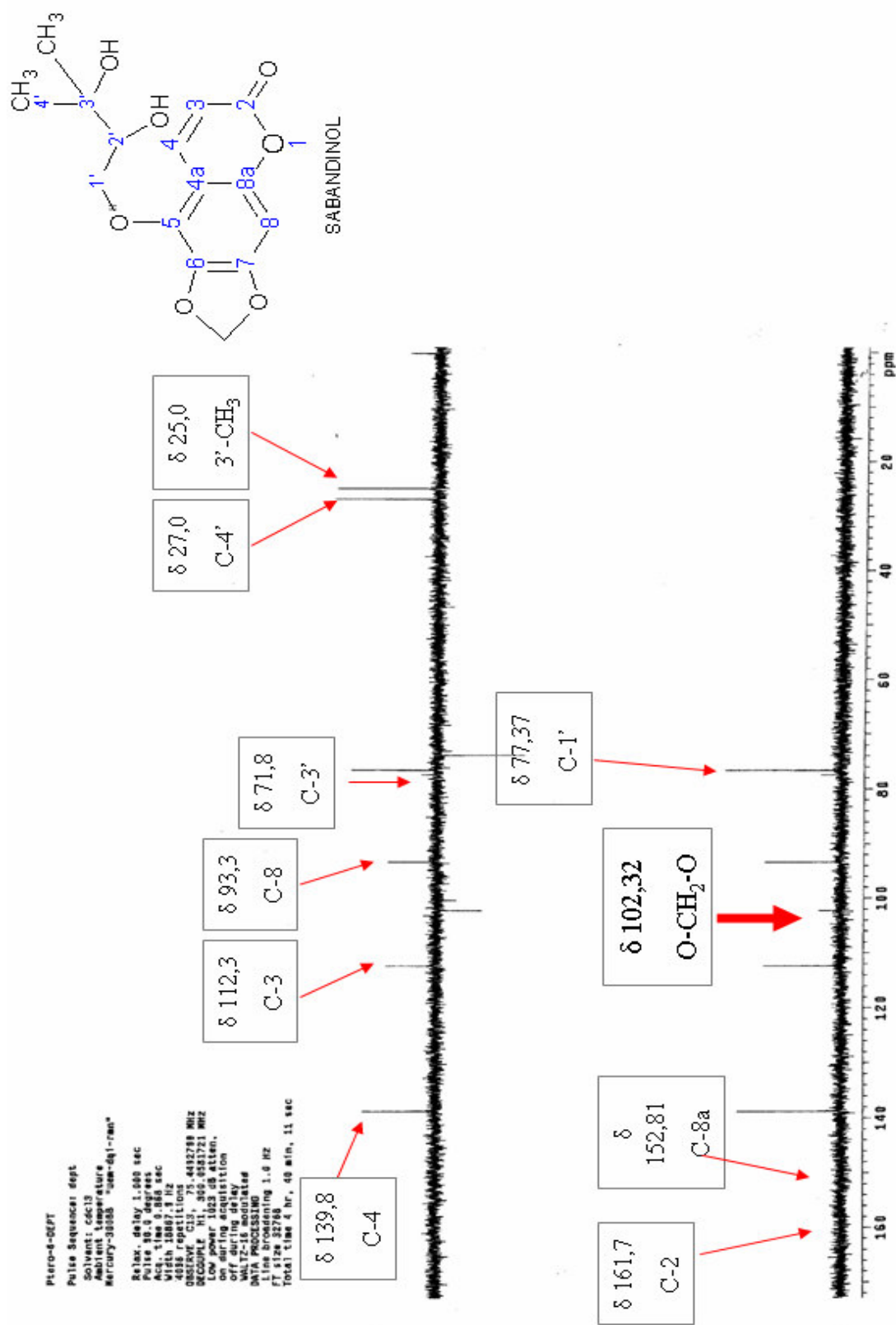
FIGURA 42 - DEPT DO ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DO SABANDINOL



FIGURA 44 – EXPANSÃO DO HMQC DO SABANDINOL

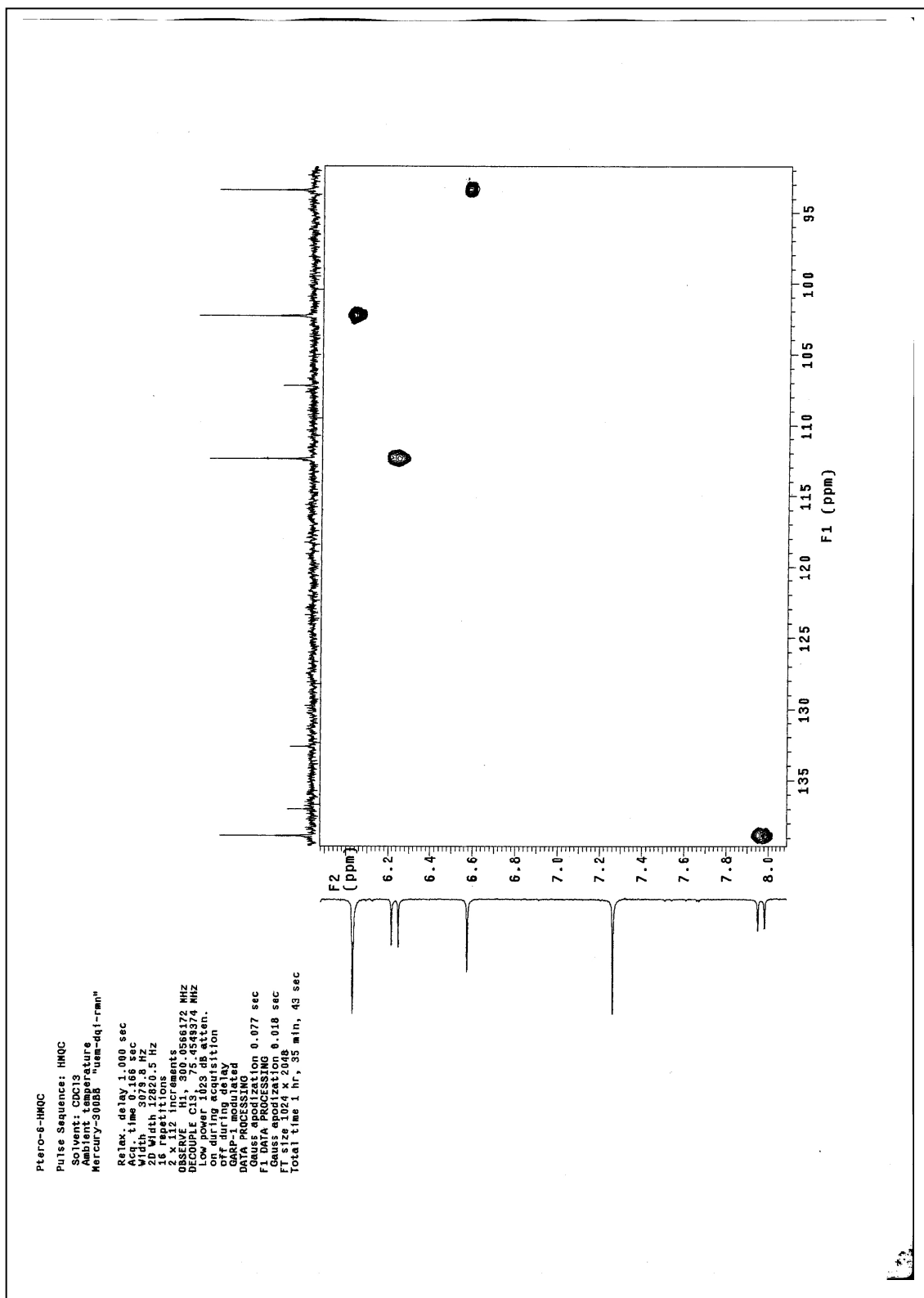


FIGURA 45 – EXPANSÃO DO HMQC DO SABANDINOL

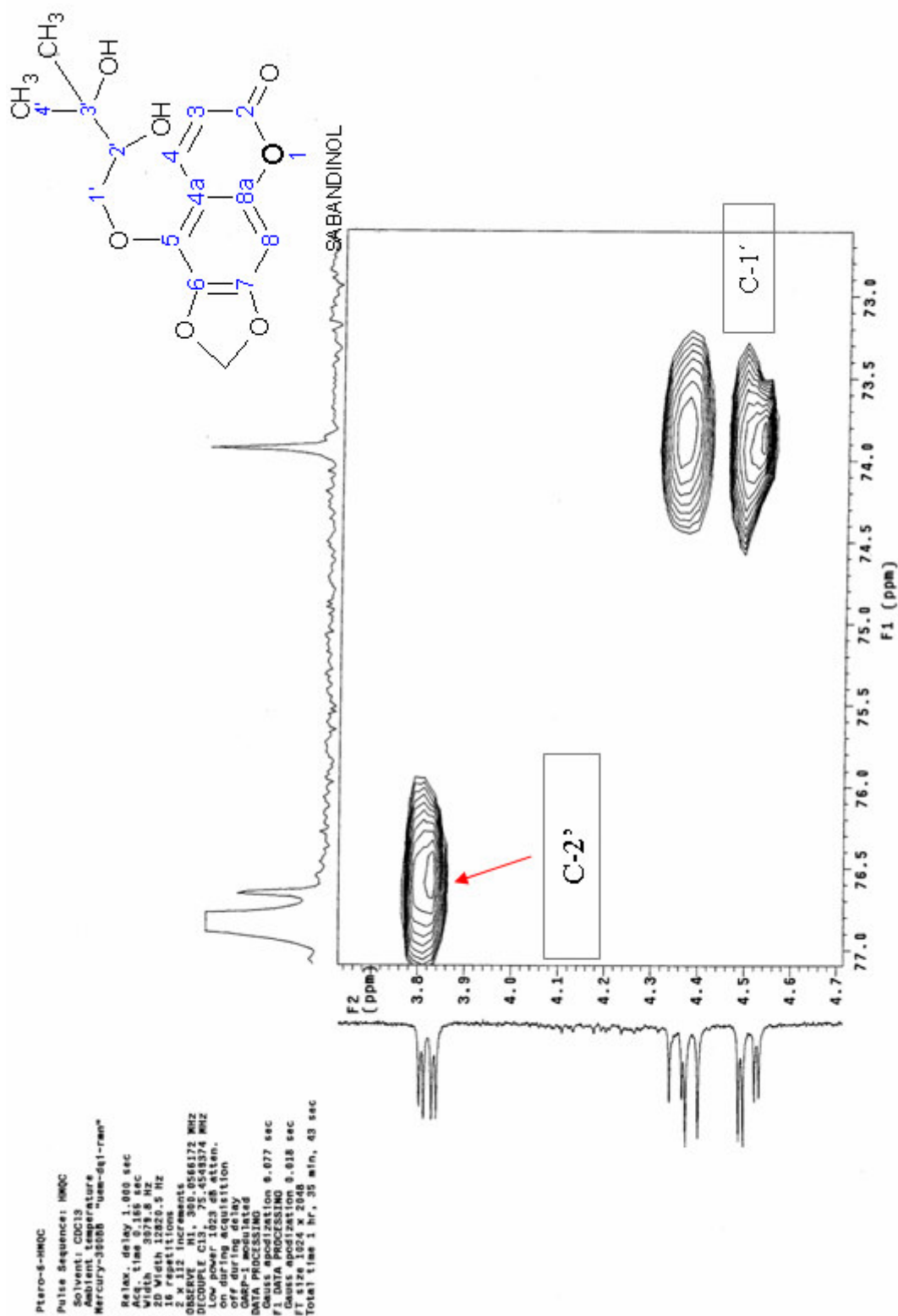


FIGURA 46- EXPANSÃO DO HMQC DO SABANDINOL

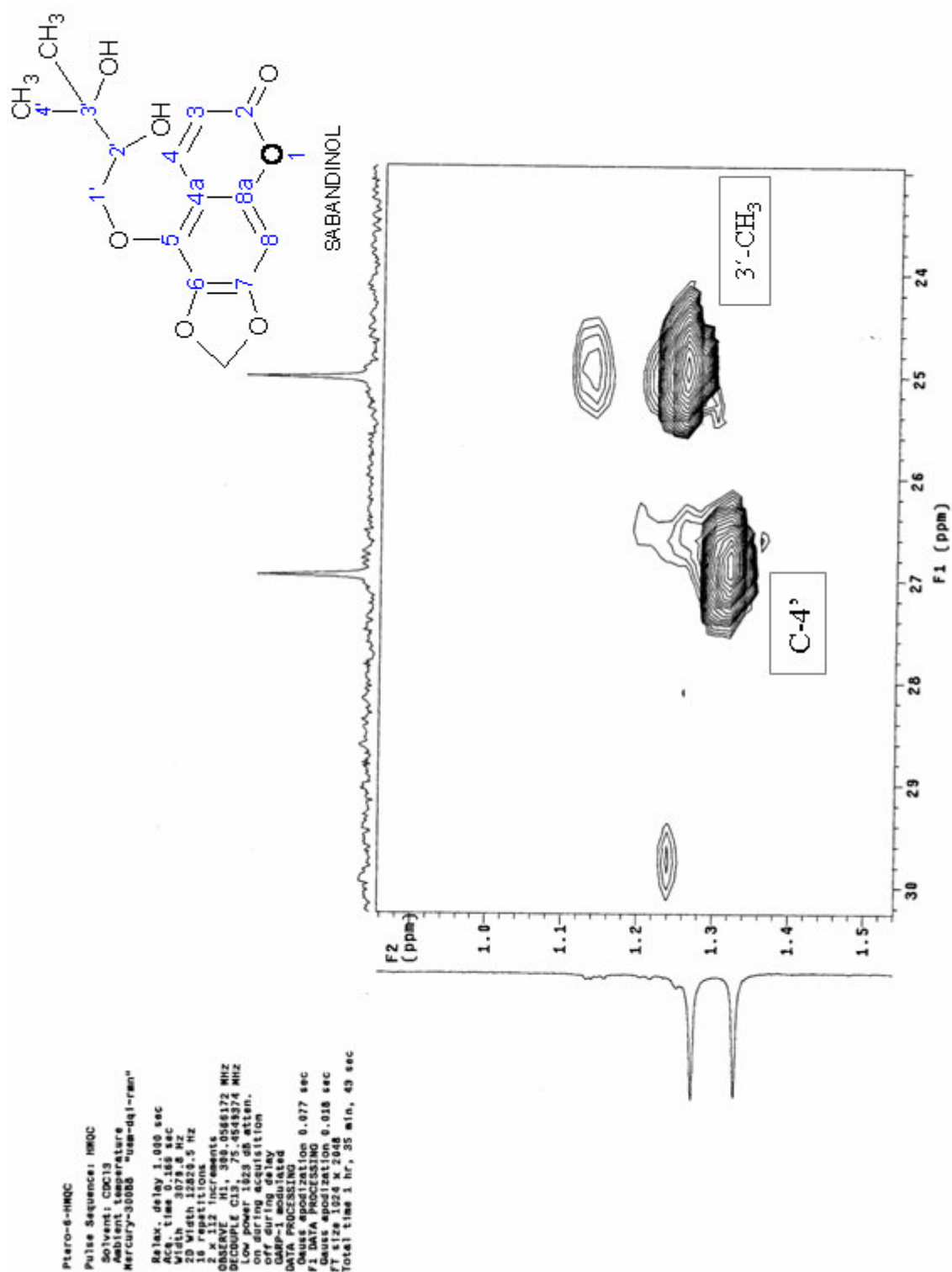


FIGURA 47 – EXPECTROS COSY DO SABANDINOL

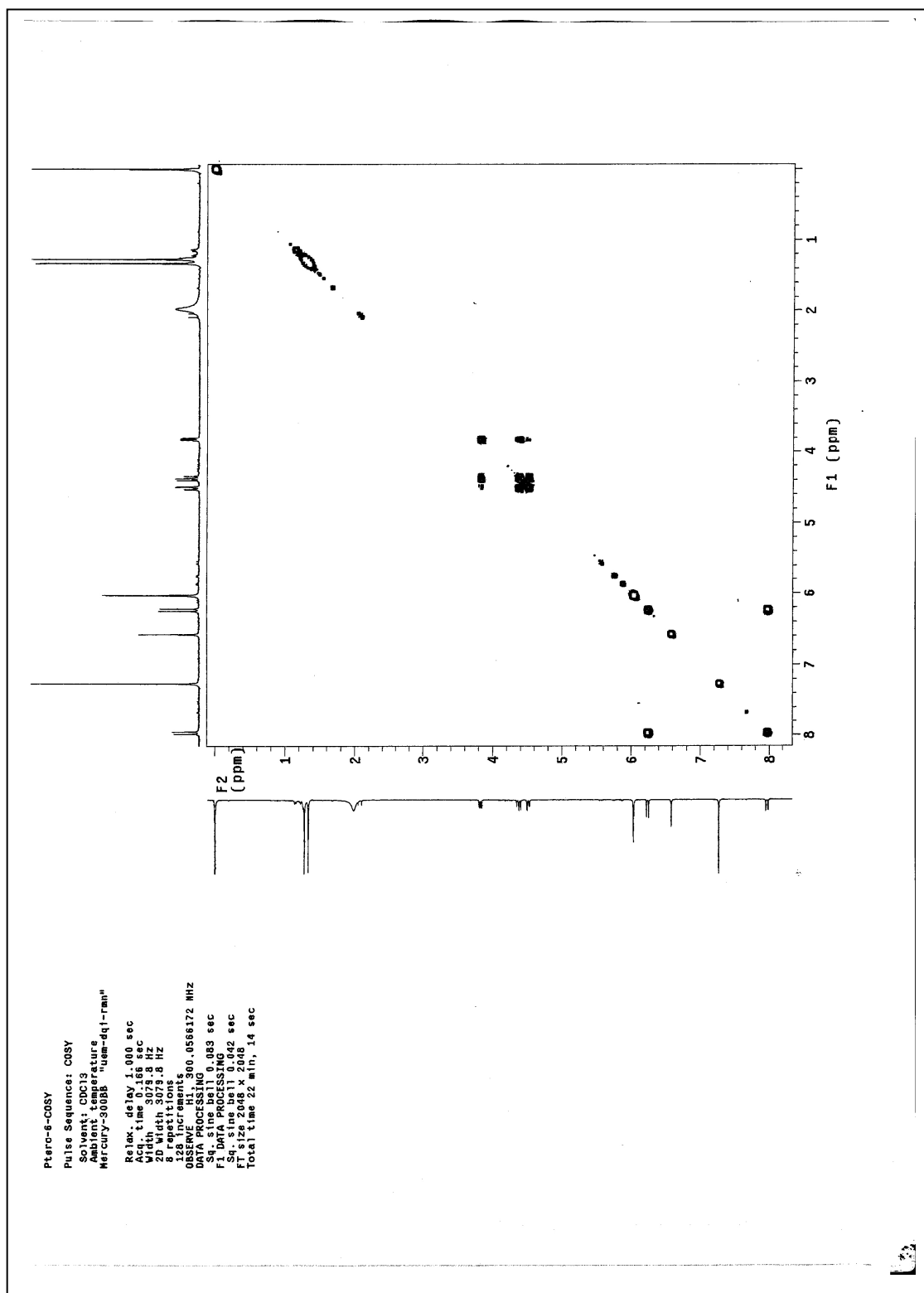


FIGURA 48 – EXPANSÕES DO EXPECTRO COSY DO SABANDINOL

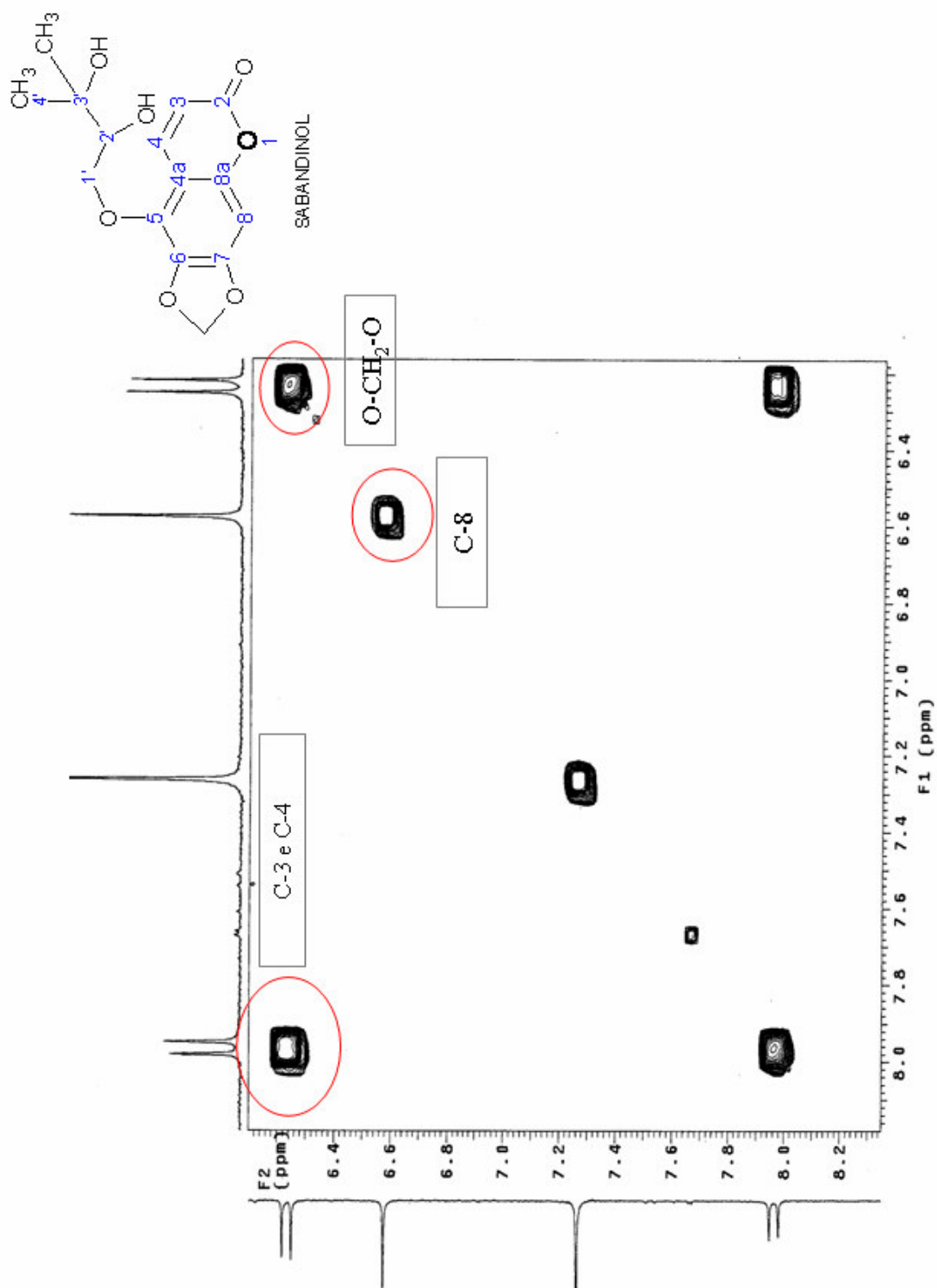
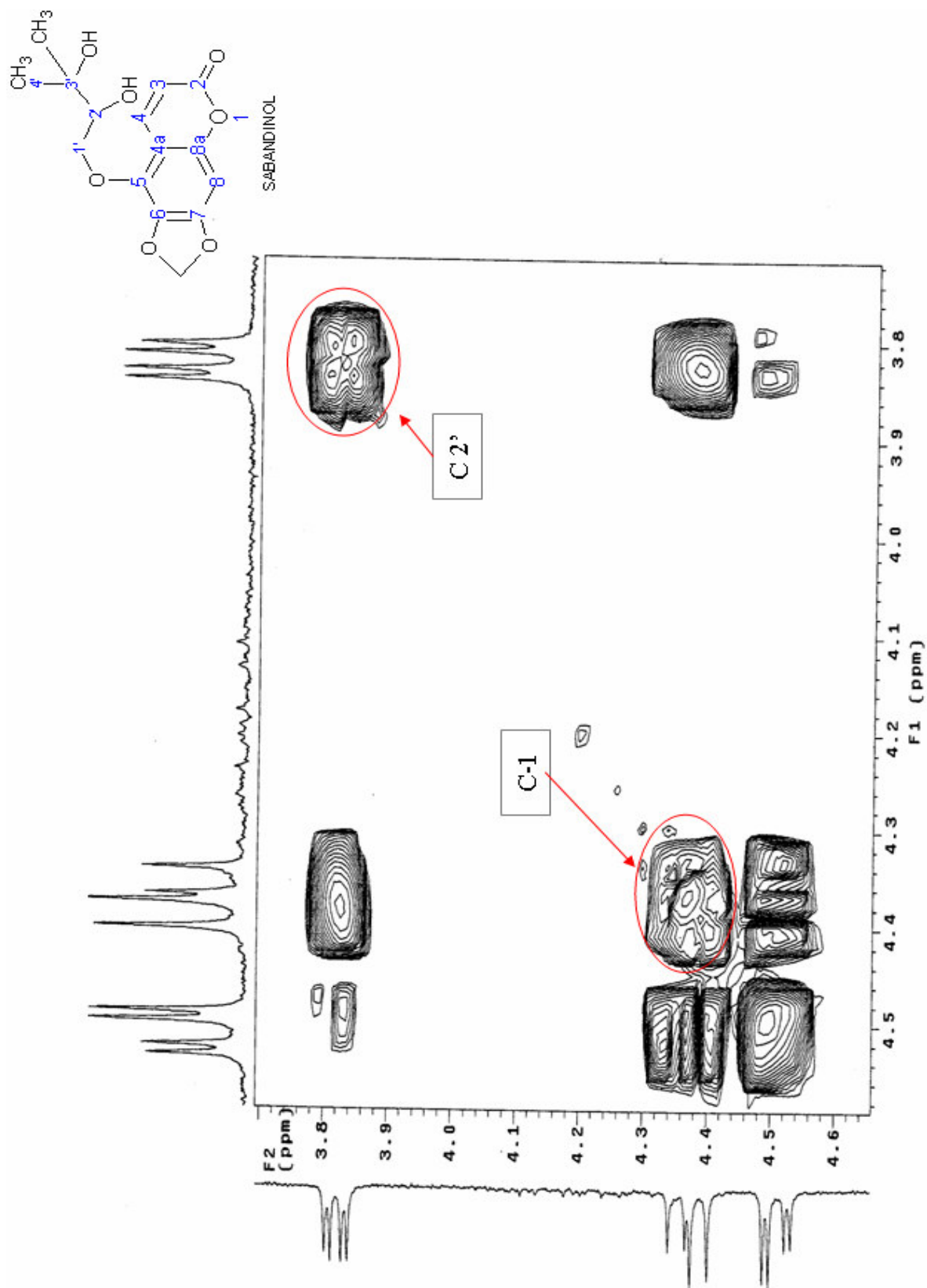


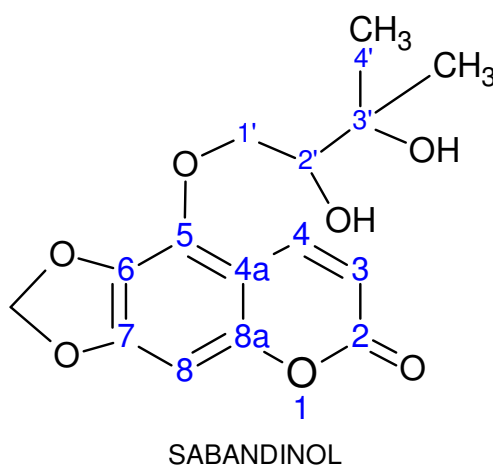


FIGURA 49 – EXPANSÕES DO EXPECTRO COSY DO SABANDINOL



De acordo com os estudos feitos por DEBENEDETTI *et al* em 1997 e os espectros obtidos pela análise do composto FC, propõem-se a estrutura da cumarina Sabandinol (Figura 50).

FIGURA 50 – ESTRUTURA QUÍMICA DO SABANDINOL



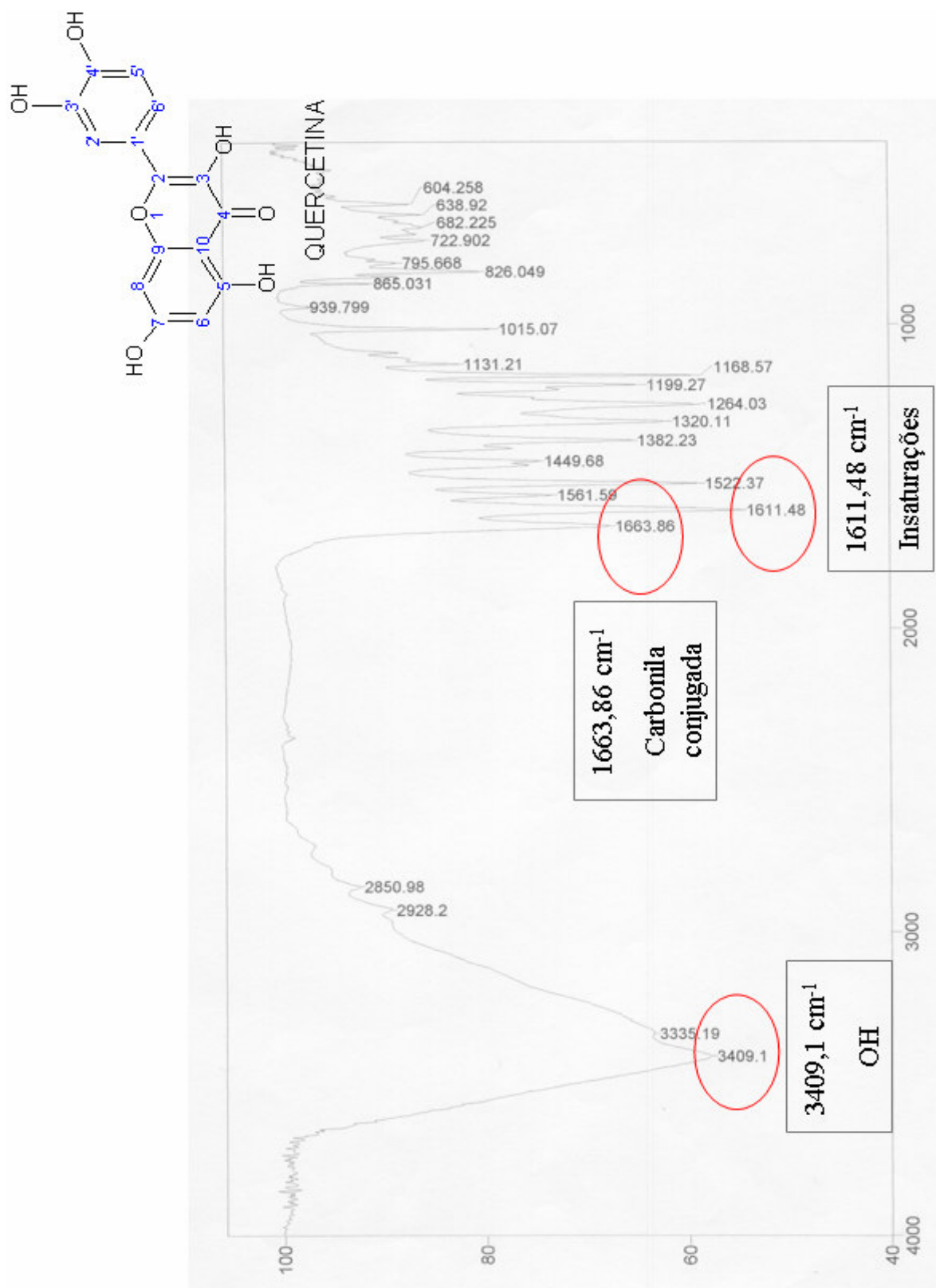
#### 5.1.4.3 Fração acetato de etila

Das 138 subfrações recolhidas na cromatografia líquida realizada com esta fração, foram reunidas as de número 81 à 112, e destas foi feita uma coluna de Sephadex com eluição de fase móvel metanol e água numa proporção de 70:30. Das frações recolhidas foram isolados 0,4783 g de um precipitado amarelo chamado inicialmente de FA1 identificada então como quercetina.

##### a) Espectro de absorção no infravermelho da quercetina

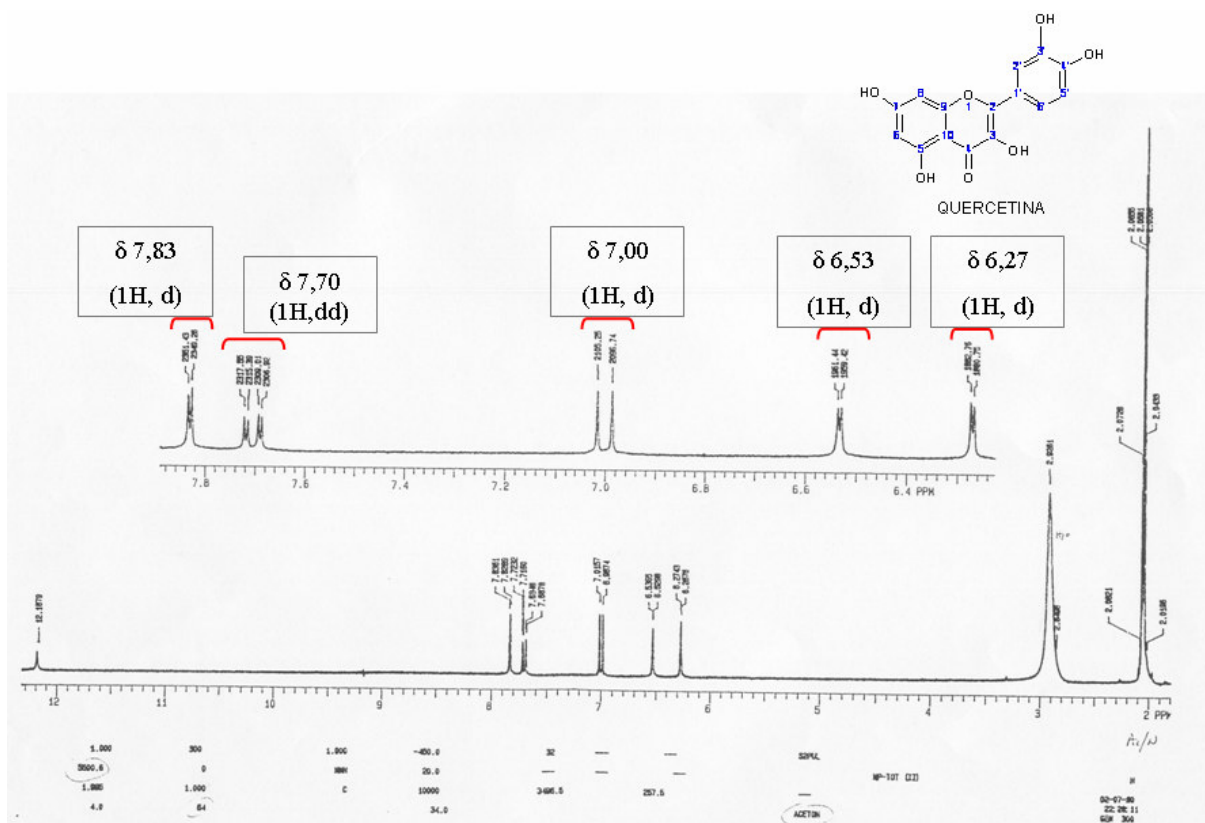
De acordo com SILVERSTEIN; BASSLER; e MORRIL (1994), O espectro apresentou uma banda larga de absorção em  $3409\text{ cm}^{-1}$  relativo à presença de hidroxila, outra banda larga de absorção em  $1663\text{ cm}^{-1}$ , indicativo da presença de carbonila conjugada e em  $1611\text{ cm}^{-1}$  característica de insaturação (Figura 51).

FIGURA 51 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DA QUERCETINA



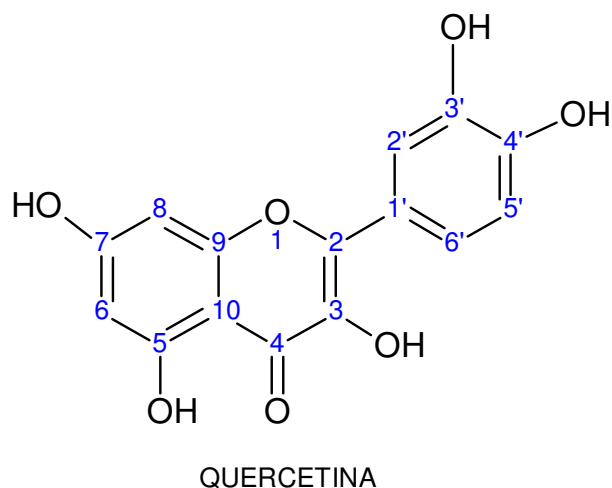
b) Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da quercetina

Os espectros de RMN da quercetina foram obtidos a uma frequência de 75 MHz em acetona. É possível observar que há várias absorções na região do próton aromático, em 6,27 (1H, d), 6,53 (1H, d), 7,00 (1H, d), 7,70 (1H, dd), 7,83 (1H, d) (Figura 51).

FIGURA 52 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA QUERCETINA

De acordo análises de CCD da quercetina com padrões e com os dados espectrais e literários, como MIGUEL, 1996, propõem-se a estrutura do flavonóide quercetina (Figura 53) para a substância FC2.

FIGURA 53 – ESTRUTURA QUÍMICA DA QUERCETINA



#### 5.1.5 Atividade Antimicrobiana

##### 5.1.5.1 Método da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Neste método o conteúdo de todos os tubos, exceto os controles negativos, turvaram, indicando que nas concentrações testadas os extratos e substâncias aplicadas não inibiram o crescimento bacteriano. Esta técnica foi realizada duas vezes e em duplicata.

## 5.1.5.2 Método de Autobiografia

Os resultados da atividade antimicrobiana pelo método de autobiografia estão representados na tabela 8.

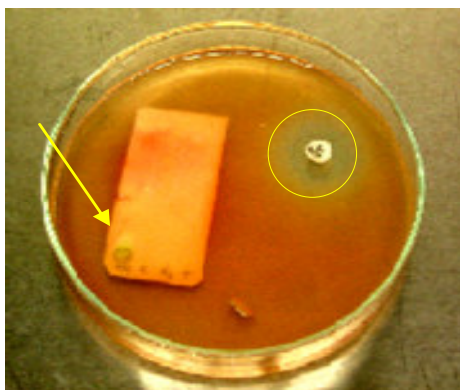
TABELA 8 – RESULTADOS DO TESTE DE AUTOBIOGRAFIA

Amostra	Microrganismo			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>
	(ATCC 6538)	(ATCC 12228)	(ATCC 9027)	(ATCC 8739)
ET	X	-	X	-
FA	-	-	-	-
FH	X	-	X	-
FC	-	-	-	-
3-o-acetil-pseudotaraxasterol	X	-	X	-
Sabandinol	-	-	-	-
Quercetina	-	-	-	-

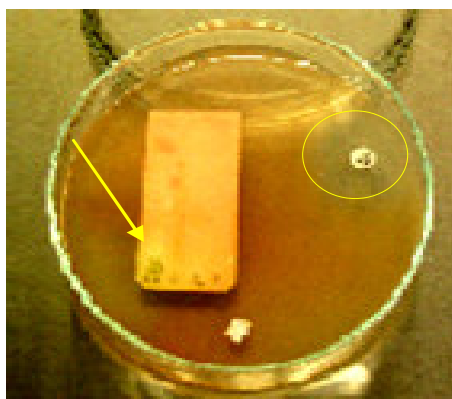
O teste foi positivo para os microrganismos *S. aureus* e *P. aeruginosa* frente aos extratos ET e FH e ao 3-o-acetil-pseudotaraxasterol . A concentração das substâncias em pontos específicos da cromatoplaça permite a visualização dos halos de inibição formados. Podemos dizer assim que estes microrganismos têm seu crescimento influenciado pela presença de tais amostras. As demais bactérias testadas neste método não são sensíveis a estas amostras nas concentrações aplicadas.

Os halos de inibição formados estão indicados na figura 54. Os controles positivos (Gentamicina 10 µg) estão evidenciados por um círculo.

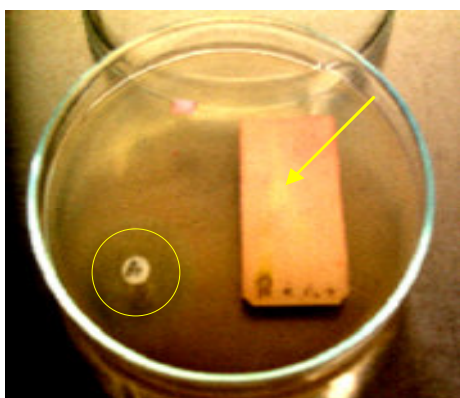
FIGURA 54 - INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO EM BIOAUTOGRAFIA ADAPTADA DOS EXTRATOS TOTAL E HEXÂNICO E 3-O-ACETIL-PSEUDOTARAXASTEROL



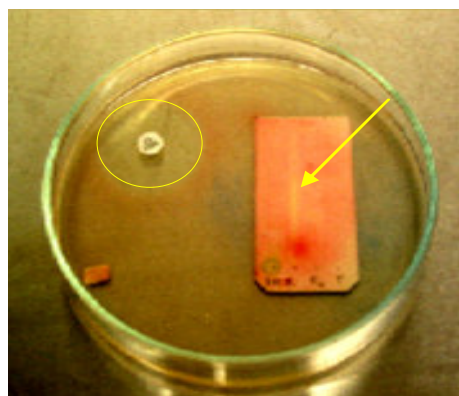
*Staphylococcus aureus* - Halo de inibição formado pelo controle positivo (círculo) e pelo ET (seta)



*Pseudomonas aeruginosa* - Halo de inibição formado pelo controle positivo (círculo) e pelo ET (seta)



*Staphylococcus aureus* - Halo de inibição formado pelo controle positivo (círculo) e pelo FH1 (seta)

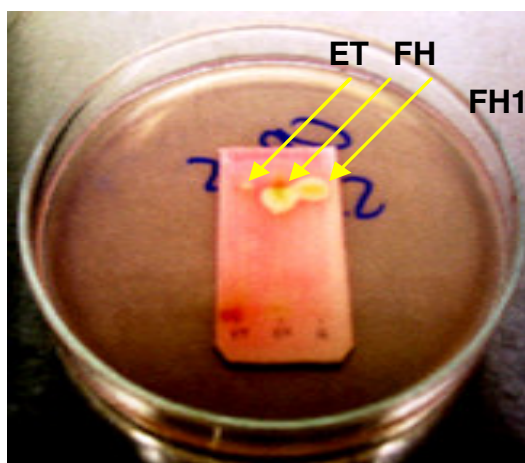


*Pseudomonas aeruginosa* - Halo de inibição formado pelo controle positivo (círculo) e pelo FH1 (seta)

Nesta técnica os discos de antibiótico foram utilizados apenas como controle positivo de inibição do crescimento dos microorganismos. Os halos de inibição formados pelas substâncias testadas são irregulares, o que não permite a mensuração quantitativa da inibição promovida.

Segue abaixo a figura 55 mostrando o halo de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* causada pelos extratos total (ET), fração hexânica (FH) e pela 3-O-acetil-pseudotaraxasterol.

FIGURA 55 - INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO EM BIOAUTOGRAFIA ADAPTADA DOS EXTRATOS TOTAL E HEXÂNICO E 3-O-ACETIL-PSEUDOTARAXASTEROL



*Staphylococcus aureus* - Halo de inibição pelo ET, EH e FH1 (setas)



### 5.1.6 Atividade Alelopática

#### 5.1.6.1 Avaliação da germinação

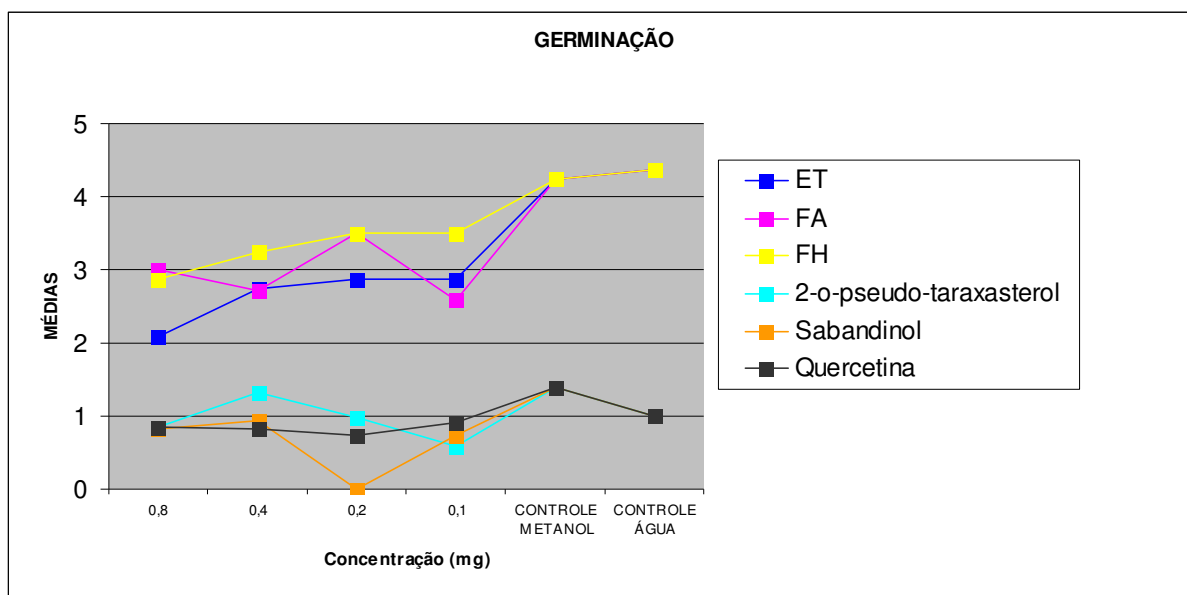
As diferenças estatísticas mostradas na Tabela 9 e Gráfico 1 revelam influência significativa do extrato ET, fração acetato de etila FA e hexânica FH sobre a germinação das sementes de *Lactuca sativa* em relação aos controles água e metanol. Nos extratos ET e EH pode-se observar que a inibição aumenta com a maior concentração de extrato aplicado. Já as substâncias isoladas não apresentaram inibição à germinação. Este fato pode ser devido à associação de todas as substâncias presentes nos extratos que podem sinergicamente promover essa inibição.

TABELA 9 – TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NOS ÍNDICES DE GERMINAÇÃO DE *Lactuca sativa* NO ENSAIO ALELOPÁTICO COM EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DAS PARTES AÉREAS DE *Pterocaulon lorentzii* Malme

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO				CONTROLE METANOL	CONTROLE ÁGUA
	0,8 mg	0,4 mg	0,2 mg	0,1 mg		
EXT. TOTAL	2,080 a1	2,750 a1	2,875 a1	2,875 a1	4,250 a3	4,375 a3
EXT. ACET. DE ETILA	3,000 a1	2,707 a1	3,500 a2	2,582 a2	4,250 a3	4,375 a3
EXT. HEXÂNICO	2,875 a1	3,250 a1	3,500 a2	3,500 a2	4,250 a3	4,375 a3
FH1	0,854 a1	1,332 a1	0,978 a1	0,583 a1	1,395 a1	1 a1
FC1	0,833 a1	0,937 a1	0 a1	0,750 a1	1,395 a1	1 a1
FC2	0,854 a1	0,833 a1	0,750 a1	0,916 a1	1,395 a1	1 a1

Pode se observar que há diferenças estatísticas pela variação da letra (a1), (a2) e (a3). Esta variação pode ser melhor observada pelo gráfico 1.

GRÁFICO 1 – MÉDIAS DE GERMINAÇÃO DE *Lactuca sativa* SUBMETIDA A ENSAIO ALELOPÁTICO COM O EXTRATO ET, FRAÇÕES FA, FH E AS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS 3-O-ACETIL-PSEUDOTARAXASTEROL, SABANDINOL E QUERCETINA



#### 5.1.6.2 Avaliação do crescimento

De acordo com a tabela 10, estatisticamente, não ocorreu inibição do crescimento da radícula nem hipocótilo de *Lactuca sativa* ao utilizarmos os Extratos Total, Acetato de Etila, Hexânico, e as substâncias isoladas FH1, FC1 e FC2. A espécie em teste teve crescimento muito semelhante aos controles água e metanol que apresentaram crescimento considerado normal para a espécie.

Podemos concluir desta forma que os extratos ET, FA e FH exercem influência somente sobre a germinação de *Lactuca sativa*, porém não as substâncias isoladas.

TABELA 10 – TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa* NO ENSAIO ALELOPÁTICO COM EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DAS PARTES AÉREAS DE *Pterocaulon lorentzii* Malme

Tratamento	Repetição	Radícula Média (mm)						Hipocótilo Média (mm)					
		ET	EA	EH	FH1	FC1	FC2	ET	EA	EH	FH1	FC1	FC2
0,8 mg	1	37,8 a1	29,8 a1	26,4 a1	2,6 a1	3,6 a2	3,8 a2	38,0 a1	49,4 a1	32,4 a1	2,4 a1	1,2 a1	0,6 a1
	2	24,4 a1	29,0 a1	28,8 a1	2,6 a1	2,6 a1	3,8 a2	27,6 a1	44,4 a1	34,0 a1	1,8 a1	2,0 a1	2,2 a1
	3	27,2 a1	27,2 a1	27,4 a1	3,2 a2	2,6 a1	3,0 a2	33,0 a1	35,4 a1	38,8 a1	2,2 a1	0,8 a1	2,0 a1
	4	36,6 a1	27,8 a1	31,2 a1	2,4 a1	3,6 a2	3,4 a2	41,0 a1	44,4 a1	35,6 a1	2,8 a1	2,4 a1	2,6 a1
0,4	1	24,4 a1	21,0 a1	29,4 a1	3,2 a2	2,6 a1	2,6 a1	35,6 a1	32,6 a1	32,2 a1	1,2 a1	2,2 a1	1,8 a1
	2	22,4 a1	32,4 a1	30,4 a1	2,2 a1	2,8 a2	1,2 a1	36,0 a1	33,6 a1	36,3 a1	1,2 a1	2,2 a1	1,2 a1
	3	25,6 a1	35,6 a1	22,0 a1	2,0 a1	2,6 a1	2,0 a1	39,0 a1	37,0 a1	31,4 a1	4,2 a1	1,0 a1	1,8 a1
	4	32,6 a1	35,2 a1	32,6 a1	2,8 a2	3,0 a2	2,4 a1	41,6 a1	38,6 a1	32,2 a1	0,6 a1	0,8 a1	2,0 a1
0,2	1	27,4 a1	30,8 a1	29,6 a1	2,4 a1	3,4 a2	3,8 a2	41,4 a1	42,6 a1	38,6 a1	1,2 a1	1,0 a1	2,4 a1
	2	16,8 a1	26,4 a1	35,2 a1	1,6 a1	3,2 a2	2,8 a2	29,2 a1	45,4 a1	41,4 a1	2,0 a1	1,0 a1	2,2 a1
	3	22,4 a1	28,4 a1	27,4 a1	1,6 a1	2,8 a2	3,0 a2	39,0 a1	43,2 a1	32,2 a1	3,6 a1	2,4 a1	1,2 a1
	4	19,2 a1	28,6 a1	18,0 a1	3,4 a2	4,0 a2	3,8 a2	34,4 a1	34,0 a1	32,8 a1	3,2 a1	1,2 a1	2,0 a1
0,1	1	37,0 a1	30,8 a1	32,0 a1	3,8 a2	3,6 a2	3,5 a2	33,8 a1	41,2 a1	45,2 a1	1,6 a1	1,8 a1	1,8 a1
	2	24,2 a1	26,4 a1	26,2 a1	0,8 a1	2,8 a2	3,2 a2	37,8 a1	35,6 a1	40,1 a1	1,2 a1	2,0 a1	1,4 a1
	3	30,2 a1	28,4 a1	28,8 a1	1,0 a1	3,0 a2	2,8 a2	34,8 a1	40,6 a1	40,8 a1	1,6 a1	4,0 a1	3,8 a1
	4	26,4 a1	28,6 a1	25,0 a1	3,0 a2	3,2 a2	3,2 a2	34,0 a1	29,2	36,2 a1	7,0 a1	2,4 a1	2,4 a1
Controle água	1	23,8 a1	23,8 a1	23,8 a1	3,0 a2	3,0 a2	3,0 a2	44,8 a1	44,8 a1	44,8 a1	0,8 a1	0,8 a1	0,8 a1
	2	26,6 a1	26,6 a1	26,6 a1	3,4 a2	3,4 a2	3,4 a2	40,2 a1	40,2 a1	40,2 a1	2,8 a1	2,8 a1	2,8 a1
	3	27,0 a1	27,0 a1	27,0 a1	4,6 a2	4,6 a2	4,6 a2	43,0 a1	43,0 a1	43,0 a1	4,4 a1	4,4 a1	4,4 a1
	4	30,0 a1	30,0 a1	30,0 a1	3,8 a2	3,8 a2	3,8 a2	45,6 a1	45,6 a1	45,6 a1	3,2 a1	3,2 a1	3,2 a1
Controle Metanol	1	20,8 a1	20,8 a1	20,8 a1	3,8 a2	3,8 a2	3,8 a2	33,4 a1	33,4 a1	33,4 a1	2,0 a1	2,0 a1	2,0 a1
	2	31,8 a1	31,8 a1	31,8 a1	3,6 a2	3,6 a2	3,6 a2	42,2 a1	42,2 a1	42,2 a1	2,2 a1	2,2 a1	2,2 a1
	3	25,8 a1	25,8 a1	25,8 a1	3,2 a2	3,2 a2	3,2 a2	36,0 a1	36,0 a1	36,0 a1	2,2 a1	2,2 a1	2,2 a1
	4	31,8 a1	31,8 a1	31,8 a1	3,4 a2	3,4 a2	3,4 a2	33,6 a1	33,6 a1	33,6 a1	4,2 a1	4,2 a1	4,2 a1

(1) Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não diferem estatisticamente entre si.

A relação estatística pode ser observada no gráfico 2 e 3 que mostra ausência de variação significativa dos valores obtidos.

GRÁFICO 2 – MÉDIAS DE CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE *Lactuca sativa* SUBMETIDA A ENSAIO ALELOPÁTICO COM OS EXTRATOS ET, EA, EH E AS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS 3-O-ACETIL-PSEUDOTARAXASTEROL, SABANDINOL E QUERCETINA

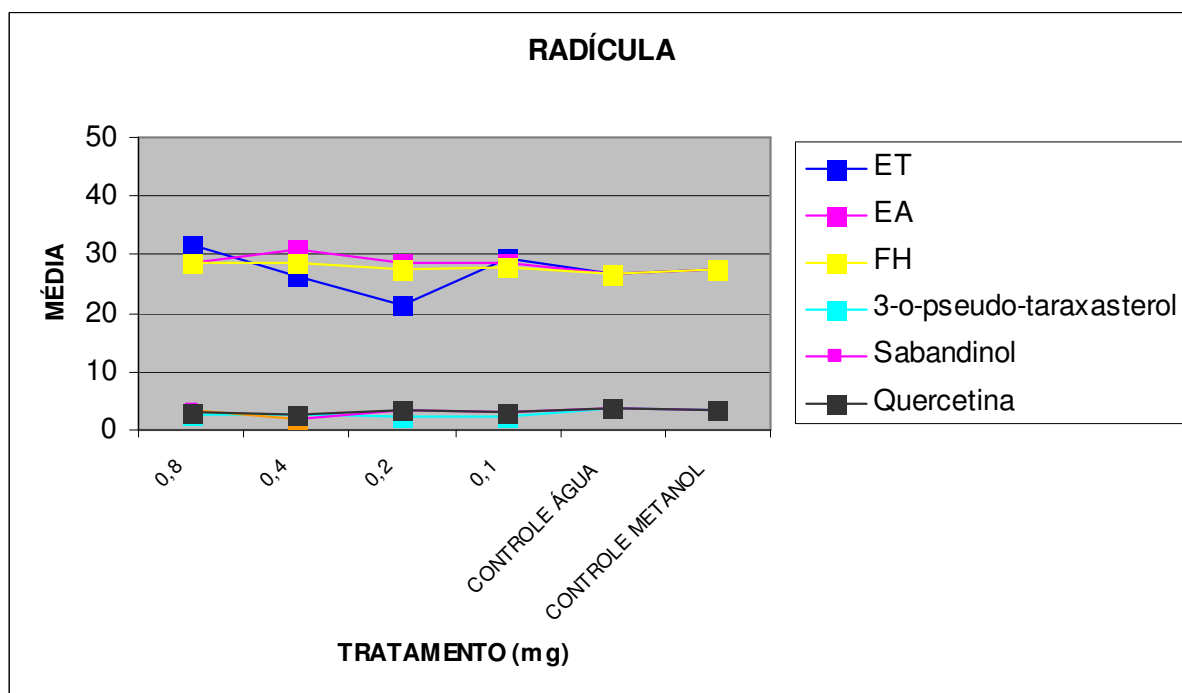
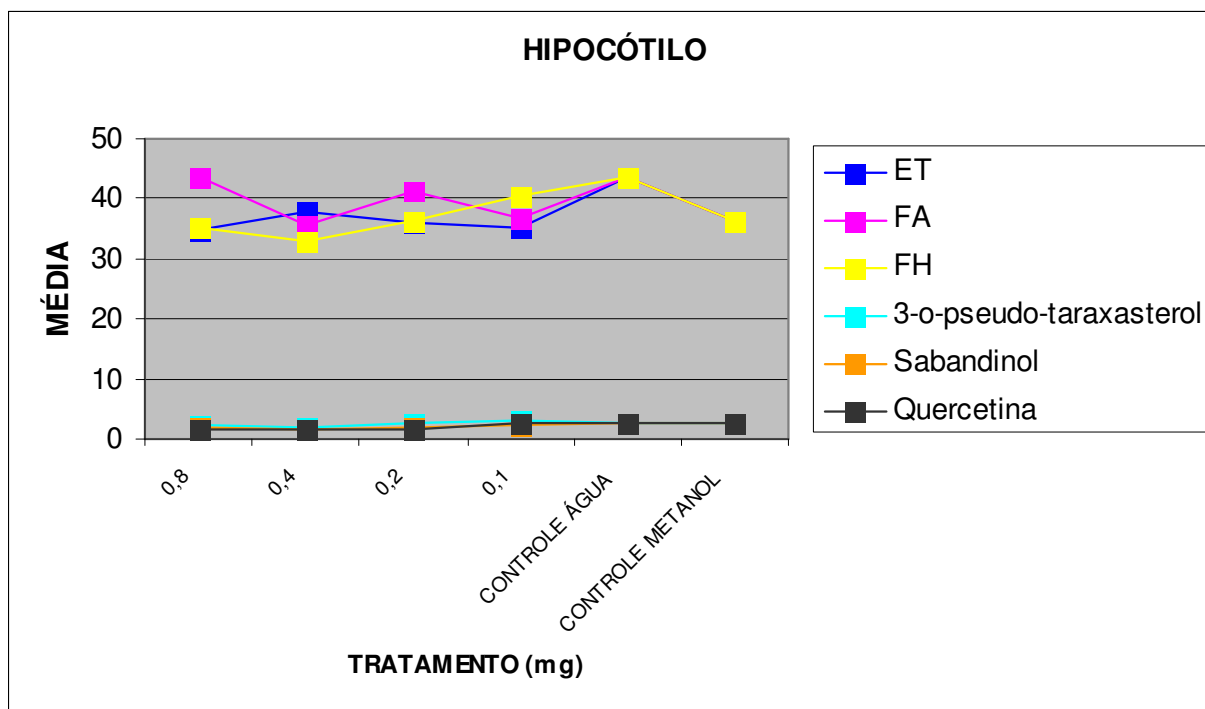


GRÁFICO 2 – MÉDIAS DE CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa* SUBMETIDA A ENSAIO ALELOPÁTICO COM OS EXTRATOS ET, EA, EH E AS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS 3-O-ACETIL-PSEUDOTARAXASTEROL, SABANDINOL E QUERCETINA



## CONCLUSÃO

Considerando os objetivos propostos no trabalho que propunham o estudo fitoquímico, alelopático e das propriedades antimicrobianas de *Pterocaulon lorentzii* Malme, é possível fazer as seguintes considerações:

1 – A análise fitoquímica preliminar apontou a presença de cumarinas, flavonóides e triterpenos comum entre espécies de *Pterocaulon*. Foram isoladas e identificadas sete substâncias: 3-O-acetil-pseudotaraxasterol (triterpeno); mistura de taraxasterol e pseudotaraxasterol (triterpeno); sabandinol (cumarina); quercetina (flavonol); undecan-1-ol (álcool graxo) e um hidrocarboneto. Composição esta primeiramente relatada para a espécie *Pterocaulon lorentzii* Malme.

2 – A atividade antimicrobiana foi identificada apenas pelo método de autobiografia. Os extratos total e hexânico assim como o 3-O-acetil-pseudotaraxasterol isolado inibiram o crescimento dos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Este estudo pode ser continuado com outras técnicas e outras concentrações das demais amostras testadas.

3 - O ensaio alelopático revelou significativa influência dos extratos ET, EA, EH, EC sobre a germinação de *Lactuca sativa*, porém após a germinação não houve influência dos extratos sobre o crescimento. Entretanto não se pode afirmar que as sementes germinadas seriam plantas adultas saudáveis. As substâncias isoladas não influenciaram na germinação nem no crescimento de *Lactuca sativa*. Para este comportamento pode-se levar em consideração a complexa composição dos extratos vegetais e o sinergismo que as substâncias em conjunto podem exercer.

A soma destes resultados obtidos abre espaço para a continuação deste trabalho em busca da farmacologia das substâncias identificadas e suas aplicações tendo em vista o seu uso popular e o fato de ser uma espécie medicinal sem estudo

**REFERÊNCIAS**

ADEGAS, F.S.; VOLL, E.; PRETE, C.E.C. **Embebição e germinação de sementes de picão-preto (*Bidens pilosa*)**. V. 21, n. 1, p. 21-25, 2003.

ANGELY, J. **Flora Analítica do Paraná**. 1. ed. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1965.

ASIRI, A.M. **Synthesis and characterisation of new coumarin derivatives as ultraviolet absorbers**. Pigment & resin Technology. v. 32, n. 5, pp. 326-330, 2003.

BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. v. 3. Viçosa: Imprensa Universitária, 1991.

BIER, O.; **Microbiologia e Imunologia**, 30 ed., Ed. Melhoramentos: São Paulo, 1994.

BOHLMANN, F.; ABRAHAM, W.R.; KING, R.M.; ROBINSON, H. **Thiophene acetylenes and flavonols from *Pterocaulon virgatum* (ompositae)**. Phytochemistry n. 20, p. 825-827, 1981.

BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. 1.ed. Espanha: Acribia, 1991.

CABRERA, A. L. **Flora de la provincia de Buenos Aires – Compositae**. Parte IV – Compuestas Coleccion Cientifica del I.N.T.A., Buenos Aires, 1963. 139-140.

CABRERA, A. L.; RAGONESE, A.M. **Revision del género *Pterocaulon* (Compositae)**. Darwiniana. n. 21, p. 185-257, 1978.

CARVALHO, J. L. de C. **Contribuição ao estudo fitoquímica e analítico do *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae**. Curitiba, 2001. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Paraná.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes ciência, tecnologia e produção**. Campinas: Fundação Cargill, 1983. p. 49.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes ciência, tecnologia e produção**. Campinas: Fundação Cargill, 1988. p. 97-101, 127.

CICCIA, G.; COUSSIO, J.; MONGELLI, E. **Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants**. Journal of Ethnopharmacology. V. 72. p. 185-189, 2000.

CRONQUIST, A. J. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. New York: Columbia University, 1981.

DAVET, A. Fotografia de Aparelho de Soxhlet Adaptado para Partição Líquido-Líquido. In: **Estudo Fitoquímico e Biológico do Cacto – *Cresu jamacaru* De Candolle, Cactaceae**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

DEBENEDETTI, S. L.; FERRARO, G.E.; COUSSIO, J.D. **Coumarins from *Pterocaulon virgatum***. *Planta medica*. v. 42, p.97-98, 1981.

DEBENEDETTI, S. L., NADINIC, E. L.; GOMES, M. A.; COUSSIO, J. D.; DE KIMPE, N.; BOEYKENS, M. **Purpurasol, a highly oxygenated coumarin from *Pterocaulon purpurascens***. *Phytochemistry*. v. 31, p. 3284-3285, 1992.

DEBENEDETTI, S. L., PALACIOS, P. S.; WILSON, E. G.; COUSSIO, J. D. **Polyphenols of *Pterocaulon polystachium***. *Fitoterapia*, v. LXV. n.2, 1994a.

DEBENEDETTI, S. L., DE KIMPE, N.; BOEYKENS, M.; COUSSIO, J. D.; KESTELEYN, B. **Structural revision of four coumarins from *Pterocaulon* species**. *Phytochemistry*. v. 45, n. 7, pp. 1515-1517, 1997.

DEBENEDETTI, S. L.; TEHRANI, K. A.; PUYVELDE, L. V.; DE KIMPE, N. **Isopurpurasol, a cumarin from *Pterocaulon virgatum***. *Phytochemistry*, v. 51, p. 701-703, 1999.

DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; SENATORE, F. **Pottencial allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens***. *Phytochemistry*, v. 61, n. 5, p. 573-578, 2002.

DIAS, J. F. G, **Estudo Alelopático Aplicado de *Aster lenceolatus*, Willd.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

DIETZ, H.; WINTERHALTER, P.; **Phytotoxic constituents from *Bunias orientalis* leaves**. *Phytochemistry*, v. 42, n. 4, p. 1005-1010, 1996.

DI STASI, L. C. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. In: DI STASI, L. C. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência: Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, p. 125. São Paulo, 1995.

DOMINICK, M.; DEBENEDETTI, S. L.; KIMPE, N. D. **New coumarins from *Pterocaulon virgatum* (L.) DC**. *Biochemical Systematics and Ecology*. n. 34, pp. 165-169, 2006.

EVANS, W. C. **Trease and Evan's Pharmacognosy**. 14. ed. London: WB Saunders, 1996.

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



FRIGHETTO, R. T. S., **As cumarinas do *Pterocaulon lanatum* O. Kuntze e síntese de cumarinas trioxigenadas.** Tese de Doutorado. Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1983.

GALLOVÁ, J.; BALGARÝ, P.; UHRIKOVÁ, D.; GRANCAI, D.; MUCAJI, P.; FUNARI, S. S. **The effect of triterpene taraxasterolon the phase behaviour of dipalmitoylphosphatidilcoline.** Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae v. 52, p. 108-115, 2005.

GONZÁLES, A. G.; ESTEVES, R.; BAEZ ARENCIBIA, J.; PÉREZ, T. R. **Anales de Química.** v. 69, p. 1141, 1973.

HEEMANN, A.C.W. **Estudo Fitoquímico, Botânico e das propriedades antimicrobianas de *Pterocaulon interruptum* DC. (Asteraceae).** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2002.

HEEMANN, A. C. W. ; MIGUEL, O. G. ; MIGUEL, M. D. ; SASAKI, C. M. ; MONACHE, F. D. . **Estudo fitoquímico da espécie *Pterocaulon interruptum*.** RBCF. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 42, p. 585-588, 2006.

JOHNS, S.R.; LAMBERTON, J.A.; PRICE, J.R.; SIOUMIS, A. **A Identification of Coumarins Isolated from *Lepiniopsis ternatenis* (Apocynaceae), *Pterocaulon sphacelatum* (Compositae) and *Melicope melanophloia* (Rutaceae).** Australian Journal of Chemistry. v. 21, p. 3079, 1968.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal.** 10. ed. São Paulo: Nacional, 1991.

KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceitos e testes.** Londrina: Abrates, p. 210, 1999.

KONEMMAN E. W.; ALLEN, S. D.; DOWWEL JR, V. R.; SOMMERS, H. M. **Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido.** 2 ed. São Paulo: Medicina Panamericana Editora do Brasil LTda, 1993. p. 458-479.

MABBERLEY, D.J. **The Plant Book – A Portable Dictionary of the Higher Plants.** Cambridge University, p. 486, Londres: 1987.

MAGALHÃES, A. F.; MAGALHÃES, E. G.; LEITÃO FILHO, H. F.; FRIGHETTO, R. T. S.; BARROS, S. M. G. **Coumarins from *Pterocaulon balansae* and *P. Lanatum*.** Phytochemistry. V. 20, n. 6, p. 1369-1371, 1981.

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

MAHATO, S. B.; KUNDU, A.P.  **$^{13}\text{C}$  NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – A compilation and some salient features.** *Phytochemistry*. v. 37. n. 6. p. 1517-1575, 1994.

MALHEIROS, A.; PERES, M. T. L. P. **Alelopatia: interações químicas entre espécies.** In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna.** Chapecó: Argos, 2001. p. 503-523.

MANN, J. **Secondary metabolism** 2. ed. Oxford: Clarendon Press, 1995. p. 141.

MARTINO, V. S.; DEBENEDETTI, S. L.; COUSSIO, J. D. **Caffeoylquinic Acids from *Pterocaulon virgatum* and *Pluchea sagittalis*.** *Phytochemistry* v.18, p. 2052, 1979.

MIGUEL, O. G. **Fotografias de *Pterocaulon lorentzii* Malme no município de Piçarras – SC, 2006.**

MONGELLI, E., PAMPURO, S.; COUSSIO, J.; SALOMON, H.; CICCIA, G. **Cytotoxic and DNA interaction activities of extracts from medicinal plants used in Argentina.** *Journal of Ethnopharmacology* v. 71. p. 145-151, 2000.

MOBOT – **Missouri Botanical Garden.** Disponível em <file:///C:/Documents%20and%20Settings/CMS/Desktop/Pterocaulon/Map%20of%20Pterocaulon%20lorentzii%20-%20Missouri%20Botanical%20Garden3.htm> acesso em : 10 out. 2006.

MOREIRA, E. A. **Marcha sistemática de análise em fitoquímica.** *Tribuna farmacêutica*. V. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

NUNES JUNIOR, V. **Poliacetilenos do gênero *Pterocaulon*.** Tese de Mestrado. Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, 1988.

OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F. **Análise de misturas de triterpenos por RMN de  $^{13}\text{C}$ .** *Química Nova*. v. 13, p. 278-281, 1990.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia.** São Paulo: Premier, 1997.

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

SALINAS, M. H. R. **Famílias de Dicotiledoneas Venezolanas II. Subclases Rosidae y Asteridae – Evolucion, Filogenia, Generos.** Centro Jardín Botánico: Venezuela. p. 108-109 e 173-180, 1992.

SEMPLE, S. J., NOBBS, S. F.; PYKE, S. M.; REYNOLDS, G. D. FLOWER, R. L. P. **Antiviral flavonoid from *Pterocaulon sphacelatum*,** an Australian Aboriginal medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 68 p. 283-288, 1999.

SILVA, M. R. G.F., **Métodos quimiossisteméticos – aplicação a famílias vegetais caracterizadas por cumrinas**. 1978. 373p. Tese de doutoramento – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1978.

SILVA, R. R.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. L.; LEÃO, M. A. **Efeito de flavonóides no metabolismo de flavonóides do ácido araquidônico**, Medicina Ribeirão Preto, 35: 127-133, abr./jun. 2002.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

STEFANELLO, M. E. A. **Avaliação estatística de plantas medicinais: química, farmacologia e sistemática**. Tese de Doutorado em Química. Universidade de São Paulo. São Paulo, 1993.

STEIN, A. C. **Análise química de espécies de *Pterocaulon* (Asteraceae) e determinação da atividade antifúngica**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2005.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001 p. 16-44.

WASICKY, R. **Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleos essenciais**. Rev. Farm. Bioq. v.1, n.1, p. 77-81, 1963.