

DANIELA SABOIA GRUBER DALL´STELLA

**ESTUDO FITOQUÍMICO APLICADO DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO EXTRATO
ETANÓLICO BRUTO DA *Dorstenia multiformis* Miquel (MORACEAE)**

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marilis Dallarmi Miguel

Co-orientador: Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel

**CURITIBA
2008**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas;

À Prof.^a Dr.^a Marilis Dalarmi Miguel, pelo dinamismo, entusiasmo e confiança;

Ao Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel, pelos ensinamentos e paciência ;

À Paula Zangaro dos Santos, do Departamento de Química da UFPR, pela obtenção dos espectros de RMN;

Aos farmacêuticos Jhonatan e Klesia, pelas análises de cromatografia gasosa e espectrometria de massas;

Ao botânico Gert Hatschbach, pela identificação e depósito do exemplar da espécie;

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas;

Aos técnicos dos laboratórios de fitoquímica e farmacotécnica, Paulo e Hilda, pelo auxílio;

Aos colegas da fitoquímica;

A todos os colegas de mestrado pela amizade, em especial à Ana Carolina C. Asbahr e Ana Carolina T. Quadrado;

A minha família, em especial meus irmãos, pelo apoio e carinho;

A minha mãe pelo exemplo, ensinamentos e amor;

Ao meu pai, que mesmo tendo partido, olha sempre por mim;

Ao meu marido e minha filha, pelo incentivo, companheirismo e amor;

À Deus pela vida e por tudo que nela existe.

RESUMO

O gênero *Dorstenia* (Moraceae) é representado por aproximadamente 170 espécies conhecidas mundialmente, das quais muitas possuem significativo valor medicinal na prática médica de muitos países da África, América Central e do Sul. No Brasil existem várias espécies conhecidas popularmente como “carapiás” ou “caiapiás” utilizadas popularmente para diminuição da febre, distúrbios intestinais, sintomas da menopausa, além de uso como antiofídico e para o tratamento do vitiligo. O estudo fitoquímico da fração solúvel do extrato etanólico bruto de *Dorstenia multiformis* Miquel levou a identificação de duas cumarinas (psoraleno e bergapteno), dois terpenos (acetato de α -amirina e β -amirina) e um esteróide (β -sitosterol). A estrutura destes compostos foi identificada por análise espectral de CG/MS, RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com os dados da literatura. Ao avaliar a atividade antibacteriana pelo método de difusão em gel, as frações hexano e clorofórmio inibiram o crescimento de *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. A mistura psoraleno e bergapteno, foi capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* na concentração de 204 μg . Na avaliação da concentração inibitória mínima pelo método da diluição em caldo, somente a fração hexano demonstrou atividade. Nos ensaios alelopáticos, o índice de velocidade de germinação das sementes de *Lactuca sativa* foi alterado pelas frações hexano e acetato de etila, além da mistura de psoraleno e bergapteno, acetato de α -amirina e β -amirina. O crescimento da radícula e do hipocótilo foi influenciado pelas cumarinas isoladas. Todas as amostras testadas foram consideradas bioativas frente à *Artemia salina*.

Palavras-chaves: *Dorstenia multiformis* Miquel; atividade antimicrobiana, alelopatia, *Artemia salina*, furanocumarinas, terpenos, esteróides.

ABSTRACT

The genus *Dorstenia* (Moraceae) is represented by about 170 known species worldwide and has significant medicinal values in many countries of Africa, Central and South America. In Brazil there are many popular species known as “carapiás” or “caiapiás”, used in local traditional medicines such as febrifuge, intestinal troubles, menopause disorders, as well as treatment of snake-bites and vitiligo. The phytochemical investigation of soluble fraction of extract of *Dorstenia multiformis* Miquel lead to the isolation of two coumarins (psoralen and bergapten), two terpenoids (α -amyrin acetate and β -amyrin acetate) and one steroid (β -sitosterol). The structure of these compounds was identified by CG/MS, ^1H and ^{13}C NMR spectral analysis and comparison with literature dates. The antimicrobial activity was determined by the Agar Hole Diffusion test, and hexane and cloroformic fractions inhibited the growth of *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermides*. The compounds psoralen and bergapten, in a concentration of 204 μg inhibited *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermides* growing. The liquid dilution method was used to determine the minimal inhibition concentrations, and only the hexane fraction showed activity. In allelopathic tests, the index of germination velocity for *Lactuca sativa* seeds was affected by hexane and etil acetate fractions, psoralen, bergapten, α -amyrin acetate and β -amyrin acetate. The isolated coumarins inhibited radicle and hypocotyls growing. All of samples tested were bioactive in Brine Shrimp Lethality test.

Palavras-chaves: *Dorstenia multiformis* Miquel; antimicrobial activity, allelopathy, *Artemia salina*, furanocoumarins, terpens, steroids.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - FURANOCUMARINA DE <i>Dorstenia brasiliensis</i>	07
FIGURA 02 - FURANOCUMARINA DE <i>Dorstenia contrajerva</i>	08
FIGURA 03 - DORSTENIOL.....	08
FIGURA 04 - FURANOCUMARINA GLICOSILADA DE <i>Dorstenia Contrajerva</i>	08
FIGURA 05 - CUMARINAS DE <i>Dorstenia bryoniifolia</i>	09
FIGURA 06 - DIASTEREISÔMERO DO ACETATO DE PRANDIOL.....	09
FIGURA 07 - POINSETTIFOLACTONA.....	10
FIGURA 08 - NOVOS COMPOSTOS DE <i>Dorstenia gigas</i> (extrato <i>n</i> -heptano).....	12
FIGURA 09 - CUMARINAS DE <i>Dorstenia elliptica</i>	13
FIGURA 10 - DORSMANINA A.....	14
FIGURA 11 - DORSMANINA B.....	14
FIGURA 12 - DORSMANINA C.....	15
FIGURA 13 - DORSMANINA D.....	15
FIGURA 14 - DORSMANINA E.....	16
FIGURA 15 - DORSMANINA F.....	16
FIGURA 16 - DORSMANINA G.....	16
FIGURA 17 - DORSMANINA H.....	17
FIGURA 18 - DORSILURINA A.....	17
FIGURA 19 - DORSILURINA B.....	18
FIGURA 20 - DORSILURINA C.....	18
FIGURA 21 - DORSILURINA D.....	19
FIGURA 22 - DORSILURINA E.....	19
FIGURA 23 - FLAVONÓIDES DE <i>Dorstenia kameruniana</i>	20
FIGURA 24 - POINSETTIFOLINA A.....	20
FIGURA 25 - POINSETTIFOLINA B.....	21
FIGURA 26 - DORSPOINSETTIFOLINA.....	21
FIGURA 27 - PROREPENSINA.....	22
FIGURA 28 - DINKLAGINA A.....	22
FIGURA 29 - DINKLAGINA B.....	23
FIGURA 30 - DINKLAGINA C.....	23
FIGURA 31 - REAÇÃO DE FORMAÇÃO DA DORSTENONA.....	24
FIGURA 32 - FIGURA 32 – BARTERICINA A.....	25
FIGURA 33 - BARTERICINA B.....	25
FIGURA 34 - BARTERICINA C.....	25
FIGURA 35 - BARTERICINA D.....	26
FIGURA 36 - NOVO FLAVONÓIDE DE <i>Dorstenia elliptica</i>	26
FIGURA 37 - ANGUSTICORNINA A.....	27

FIGURA 38 -	ANGUSTICORNINA B.....	27
FIGURA 39 -	ANGUSTOCORNINA C.....	28
FIGURA 40 -	ESTIRENOS DE <i>Dorstenia barnimiana</i>	28
FIGURA 41 -	DERIVADO BENZOFURANO DE <i>D. psilurus</i>	28
FIGURA 42 -	DITERPENÓIDE TIPO ISOPIMARANE ISOLADO EM <i>D. brasiliensis</i>	30
FIGURA 43 -	ÁCIDO DORSTÊNICO A.....	30
FIGURA 44 -	ÁCIDO DORSTÊNICO B.....	30
FIGURA 45 -	ILUSTRAÇÃO DE <i>Dorstenia multiformis</i> Miquel.....	39
FIGURA 46 -	<i>Dostenia multiformis</i> Miquel.....	43
FIGURA 47 -	PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO COM HEXANO APÓS 4 HORAS (A) E 8 HORAS (B).....	44
FIGURA 48 -	FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES.....	45
FIGURA 49 -	FÓRMULA DO ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO.....	54
FIGURA 50 -	EQUIPAMENTO PARA ECLOSÃO DOS OVOS DE <i>Artemia salina</i>	56
FIGURA 51 -	CCD DE FAC, FRASCOS Nº50 A Nº200, INTERVALOS DE 5. FASE MÓVEL TOLUENO : ACETATO DE ETILA : ÁCIDO FÓRMICO 60:40:3, SOB LUZ UV(365 nm).....	59
FIGURA 52 -	PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE DE H30 (a), H6(b), H11(c), C34(d) e AC108(e), COLUNA RP 18, FASE MÓVEL METANOL:ÁGUA (90:10), 1mL/min.....	60
FIGURA 53 -	PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CG DE H6, FASE MÓVEL METANOL : ÁGUA (90:10), COLUNA RP 18, 1 ml/min.....	61
FIGURA 54 -	ESPECTROSCOPIA DE MASSA DE H6.....	61
FIGURA 55 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO PSORALENO.....	62
FIGURA 56 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO BERGAPTENO.....	62
FIGURA 57 -	MECANISMO DE FRAGMENTAÇÃO DO BERGAPTENO.....	63
FIGURA 58 -	ESPECTRO DE RMN ¹ H (400MHz em CDCl ₃) DA AMOSTRA H6.....	64
FIGURA 59 -	ESPECTRO EXPANDIDO ENTRE 6.2 ppm e 8.2 ppm DE RMN ¹ H (400MHz em CDCl ₃) DA AMOSTRA H6.....	64
FIGURA 60 -	ESPECTRO DE RMN ¹³ C (100 MHZ EM CDCL ₃) DA AMOSTRA H6.....	66
FIGURA 61 -	ESPECTRO EXPANDIDO ENTRE 90 E 165 ppm DE RMN ¹³ C (100 MHZ EM CDCl ₃) DA AMOSTRA H6.....	66
FIGURA 62 -	ESPECTRO DE RMN ¹ H (400MHz em CDCl ₃) DE H1.....	68
FIGURA 63 -	ESPECTRO EXPANDIDO ENTRE 0.6 ppm E 1.75 ppm DE RMN ¹ H (400 MHZ EM CDCL ₃) DA AMOSTRA H1.....	68
FIGURA 64 -	ESPECTRO DE RMN ¹³ C (100 MHZ EM CDCL ₃) DE H1.....	69
FIGURA 65 -	ESPECTRO EXPANDIDO DE 14 ppm A 60 ppm DE RMN ¹³ C (100 MHZ EM CDCL ₃) DE H1.....	69
FIGURA 66 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO 3 α -O-ACETATO DE α AMIRINA.....	71
FIGURA 67 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO 3 β -O-ACETATO DE β AMIRINA.....	71

FIGURA 68 - MAPA DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAL ^1H - ^{13}C (HMQC) DA AMOSTRA H1.....	72
FIGURA 69 - ESPECTRO DE RMN ^1H (400MHz em CDCl_3) DE H5.....	73
FIGURA 70 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C (100 MHZ EM CDCl_3) DA AMOSTRA H5.....	73
FIGURA 71 - ESPECTRO EXPANDIDO ENTRE 10 ppm E 62 ppm DE RMN ^{13}C (100 MHZ EM CDCl_3) DA AMOSTRA H5.....	74
FIGURA 72 - ESTRUTURA QUÍMICA DO β -SITOSTEROL.....	74
FIGURA 73 - ESPECTRO DE DE RMN ^{13}C /DEPT (CDCl_3) PARA A AMOSTRA H5.....	76
FIGURA 74 - ESPECTRO EXPANDIDO ENTRE 10 ppm E 46 ppm DE RMN ^{13}C /DEPT (CDCl_3) PARA A AMOSTRA H5.....	76
FIGURA 75 - MAPA DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAL ^1H - ^{13}C (HMQC) DA AMOSTRA H5.....	77
FIGURA 76 - CRESCIMENTO DE SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i> SOB TRATAMENTO COM 0,4 mg DE FC 34, EM COMPARAÇÃO COM O CONTROLE.....	84

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 01	MASSA DAS DAS PLÂNTULAS SOB TRATAMENTO COM FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS PARA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO, APÓS 7 DIAS DA SEMEADURA.....	87
GRÁFICO 02	PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DA HIPOCÓTILO DE <i>Lactuca sativa</i> FRENTE A FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS OBTIDAS DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Dorstenia multiformis</i> Miquel.....	88
GRÁFICO 03	PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE <i>Lactuca sativa</i> FRENTE A FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS OBTIDAS DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Dorstenia multiformis</i> Miquel.....	88

LISTA DE QUADROS

QUADRO 01	ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE <i>Dorstenia multiformis</i>	05
QUADRO 02	SUBSTÂNCIAS DE DORSTENIA GIGAS (EXTRATO ACETATO DE ETILA...	11
QUADRO 03	SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS EM ESPÉCIES DE <i>Dorstenia</i>	29

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 -	MASSA DAS FRAÇÕES APÓS PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO, CONTROLE DE pH E TEOR DE SÓLIDOS (mg/mL).....	58
TABELA 02 -	QUANTIDADE DE SUBSTÂNCIAS OBTIDAS APÓS A CROMATOGRAFIA EM COLUNA DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO EXTRATO ETANÓLICO.....	59
TABELA 03 -	DESLOCAMENTOS, EM ppm, DE RMN de ¹ H PARA AS SUBSTÂNCIAS PSORALENO E BERGAPTENO, ISOLADAS DA AMOSTRA H6.....	65
TABELA 04 -	DESLOCAMENTOS, EM ppm, DE RMN ¹³ C PARA AS SUBSTÂNCIAS PSORALENO E BERGAPTENO, ISOLADAS DA AMOSTRA H6.....	67
TABELA 05 -	DESLOCAMENTOS, EM ppm, DE RMN ¹³ C e ¹ H PARA A AMOSTRA H1.....	70
TABELA 06 -	DESLOCAMENTOS, EM ppm, DE RMN ¹³ C DE H5.....	75
TABELA 07 -	CONCENTRAÇÕES DAS AMOSTRAS IMPREGNADOS NOS DISCOS DE PAPEL.....	79
TABELA 08 -	MÉDIAS DOS HALOS DE INIBIÇÃO (mm) DOS CONTROLES UTILIZADOS NO ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA COM DIFUSÃO EM GEL...	79
TABELA 09 -	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE <i>Dorstenia multiformis</i> , POR DIFUSÃO EM AGAR.....	80
TABELA 10 -	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (µg/mL) DAS AMOSTRAS OBTIDAS DE <i>Dorstenia multiformis</i>	81
TABELA 11 -	TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NOS ÍNDICES DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i> COM FRAÇÕES OBTIDAS DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Dorstenia multiformis</i> Miquel.....	82
TABELA 12 -	TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NOS ÍNDICES DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i> COM AMOSTRAS OBTIDAS DAS FRAÇÕES OBTIDAS DE EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Dorstenia multiformis</i> Miquel.....	83
TABELA 13 -	TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA E DO HIPOCÓTILO COM FRAÇÃO CLOROFÓRMIO E SUBSTÂNCIAS C34 E C47.....	85
TABELA 14 -	TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA E DO HIPOCÓTILO COM FRAÇÃO HEXANO E SUBSTÂNCIAS H1 E H6	86
TABELA 15 -	MORTALIDADE DE <i>Artemia salina</i> E ESTIMATIVA DE LC50	89

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS, FÓRMULAS E ABREVIATURAS

%	- Percentagem
µg	- Micrograma
®	- Marca registrada
°C	- Graus Celsius
µL	- Microlitro
¹³ C RNM	- Ressonância nuclear magnética de carbono
¹ H RNM	- Ressonância nuclear magnética de próton
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
BaCl ₂	- Cloreto de bário
C	- Carbono
C34	- Substância isolada da fração clorofórmio nº 34
C47	- Substância isolada da fração clorofórmio nº 47
CaCl ₂ ·2H ₂ O	- Cloreto de cálcio biidratado
CaCl ₂ ·6H ₂ O	- Cloreto de cálcio hexaidratado
CCD	- Cromatografia em Camada Delgada
CDCl ₃	- Clorofórmio deuterado
CG/EM	- Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm	- Centímetro
DEPT	- <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
FAE	- Fração acetato de etila
FC	- Fração clorofórmio
FH	- Fração hexano
FHA	- Fração hidroalcoólica remanescente
FID	- Detector de ionização de chama
g	- Grama
H1	- Substância isolada da fração hexano nº 1
H ₂ SO ₄	- Ácido sulfúrico
H30	- Substância isolada da fração hexano nº 30
H6	- Substância isolada da fração hexano nº 6
HP-5MS	- 5% Fenilmetil siloxano
IVG	- Índice de Velocidade de Germinação
KCl	- Cloreto de potássio
kDa	- Quilo-Dalton
LC50	- Concentração média letal
m	- Metro
M	- Molar

m/e	- Relação massa carga
mg/mL	- Miligrama por mililitro
MgCl ₂ ·6H ₂ O	- Cloreto de magnésio hexaidratado
MHz	- Mega-Hertz
mL	- Mililitro
mL/min	- Mililitro por minuto
mm	- Milímetro
N	- Normal
Na ₂ CO ₃	- Carbonato de sódio
Na ₂ SO ₄	- Sulfato de sódio
NaCl	- Cloreto de sódio
nm	- Nanômetro
p/v	- Peso/volume
pH	- Potencial hidrogeniônico
ppm	- Parte por milhão
RP18	- Fase reversa com 18 carbonos
TAS	- Teste de <i>Artemia salina</i>
TMS	- Tetrametilsilano
UFC/mL	- Unidade formadora de colônia por mililitro
UV	- Ultravioleta
v/v	- Volume/volume
W	- Watts
µg/ML	- Micrograma por mililitro
µL	- Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	04
2.1. Objetivo Geral	04
2.2 Objetivos Secundários	04
3 REVISÃO DA LITERATURA	05
3.1 ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO	05
3.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA Moraceae	05
3.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO <i>Dorstenia</i>	06
3.3.1 Cumarinas	07
3.3.2 Flavonóides	14
3.3.3 Benzofuranos e derivados fenilpropanóides	28
3.3.4 Esteróides e triterpenos	29
3.3.5 Aspectos farmacológicos do gênero <i>Dorstenia</i>	31
3.3.5.1 Atividades antinoceptiva, analgésica e anti-inflamatória	31
3.3.5.2 Atividade antihipertensiva	32
3.3.5.3 Peptídeos anti Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)	32
3.3.5.4 Atividade contra células leucêmicas	33
3.3.5.5 Tratamento de doenças de pele	33
3.3.6 Aspectos toxicológicos do gênero <i>Dorstenia</i>	34
3.3.7 Aspectos antimicrobianos do gênero <i>Dorstenia</i>	35
3.3.7.1 Atividade contra <i>Leishmania sp.</i>	35
3.3.7.2 Atividade contra <i>Aedes aegypti</i>	36
3.3.7.3 Atividade contra <i>Trichomonas sp.</i>	36
3.3.7.4 Atividade contra <i>Giardia lamblia</i>	36
3.3.7.5 Atividade contra <i>Bacillus sp.</i>	37
3.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE <i>Dorstenia Multiformis</i> Miquel	37
3.4.1 Sinonímia vulgar	37
3.4.2 Sinonímia científica	37
3.4.3 Distribuição geográfica	38
3.4.4 Usos populares	38
3.4.5 Descrição botânica	38
3.4.6 Aspectos fitoquímicos	39
3.5 Considerações Sobre Alelopatia	40
3.6 Considerações Sobre <i>Artemia salina</i>	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 POPULAÇÃO E AMOSTRA DA PESQUISA	43
4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES	44
4.2.1 Determinação do teor de sólidos	45
4.3 ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS	46
4.3.1 Cromatografia em Camada Delgada	46
4.3.2 Cromatografia em Coluna	46
4.3.2.1 Preparo das Pastilhas	46
4.3.2.2 Preparo da Coluna	46
4.3.2.3 Procedimento para a Cromatografia em Coluna	46
4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS	47
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	48
4.5.1 Difusão em gel	48

4.5.1.1 Preparo das amostras	48
4.5.1.2 Preparo dos discos de papel	49
4.5.1.3 Meio de cultura	49
4.5.1.4 Preparo do inóculo	49
4.5.1.5 Teste da atividade antibacteriana com difusão em gel.....	50
4.5.2 Concentração Inibitória Mínima.....	50
4.5.2.1 Preparo do inóculo	50
4.5.2.2 Preparo das amostras	51
4.5.2.3 Teste da concentração inibitória mínima.....	51
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA.....	52
4.6.1 Preparo das amostras	52
4.6.2 Preparo do material	53
4.6.3 Teste de germinação.....	53
4.6.4 Teste de crescimento	54
4.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE A <i>Artemia salina</i>	55
4.7.1 Preparo da solução salina	55
4.7.2 Preparo das amostras	55
4.7.3 Eclosão dos ovos	55
4.7.4 Avaliação da toxicidade.....	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES.....	58
5.2 ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS.....	58
5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS	60
5.3.1 Amostra H6	60
5.3.2 Amostra H1	67
5.3.3 Amostra H5	72
5.3.4 Amostras H11, H30, C34, C47, AC108, AC160	78
5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	78
5.4.1 Difusão em gel	78
5.4.2 Concentração Inibitória Mínima.....	81
5.5 ATIVIDADE ALELOPÁTICA	82
5.5.1 Avaliação da germinação	82
5.5.2 Avaliação do crescimento.....	83
5.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE A <i>Artemia salina</i>	89
6 CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

Ao longo do tempo a humanidade tem recorrido à natureza para sanar suas necessidades básicas como alimentação, abrigo, vestuário, meios de transporte, fertilizantes, fragrâncias e aromatizantes, além de medicamentos. As plantas têm formado a base para os sofisticados sistemas da medicina moderna e desde sua existência, por milhares de anos continuam dando origem a novos medicamentos. Os primeiros relatos de uso de plantas medicinais são da Mesopotâmia e datam de 2600 a.C. As espécies relatadas ainda são utilizadas atualmente para tosse, febre e inflamações (GURIB-FAKIM, 2006).

Um dos assuntos mais intrigantes e fascinantes da pesquisa com plantas medicinais reside na origem desse conhecimento, nas formas e nos procedimentos que o homem utilizou para descobrir as virtudes terapêuticas das espécies vegetais (DISTASI, 1995). O homem primitivo, ao procurar plantas para seu sustento, com observação constante e sistemática dos fenômenos e características da natureza, foi descobrindo algumas com ação tóxica ou medicinal, dando início a uma sistematização empírica dos seres vivos (DISTASI, 1995; POSER et al., 2000).

As estimativas são que o Brasil tenha entre 15 e 20% de toda a diversidade biológica mundial e o maior número de espécies endêmicas do globo, um importante recurso, seja pelos serviços ambientais mantidos por esta biodiversidade, seja pelas oportunidades de desenvolvimento e uso sustentável gerados por ela (LEWINSON; PRADO, 2002).

O contexto social e econômico moderno visualizando os serviços de saúde, percebe a necessidade do mercado farmacêutico e o reconhecimento da pesquisa de plantas medicinais utilizadas na medicina tradicional para o desenvolvimento de novas drogas. Para isso tem-se necessidade do aumento de publicações científicas nesta área, com programas de financiamento privado e governamental (RATES, 2001).

Os tratamentos com plantas medicinais têm aumentado em âmbito global. Na China, 30-50% do consumo total de medicamentos corresponde a plantas. Na Europa, América do Norte e outros países industrializados mais de 50% da população já utilizou pelo menos uma vez um fitoterápico. Em São Francisco, Londres e África do Sul 75% dos portadores de AIDS usam terapias alternativas.

Cerca de 90% da população alemã já utilizou algum medicamento de origem natural (WHO, 2003).

O mercado europeu e americano faturou respectivamente em torno de US \$ 7 bilhões e US \$5 bilhões em 1999, concomitante ao aumento do interesse das indústrias farmacêuticas pela área (CALIXTO, 2000). Segundo a Organização Mundial da Saúde (2003) o mercado global de plantas medicinais fatura mais de US \$ 60 bilhões anualmente (WHO, 2003).

Entre as várias razões que propiciam o rápido crescimento do mercado internacional, pode-se citar a preferência dos consumidores pelas terapias naturais, a crença errônea de que os fitoterápicos não possuem efeitos colaterais, além da idéia que os medicamentos fitoterápicos podem ser efetivos nos tratamentos quando os medicamentos sintéticos falham. A tendência cultural para a automedicação e os tratamentos preventivos, aliado aos menores custos para o consumidor dos medicamentos fitoterápicos, também são fatores associados (CALIXTO, 2001).

Pouco tempo após a humanidade descobrir a existência dos microorganismos surgiu a idéia que certas plantas tinham potencial de cura. Desde a antiguidade, o homem tem usado as plantas para tratamento de infecções comuns e alguns destes ainda estão inclusos como parte do tratamento habitual de várias enfermidades (RIOS; RECIO, 2005).

O aumento do número de investigações das interações químicas plantas-insetos nas últimas décadas desvendou o potencial da utilização dos metabólitos secundários como agentes de controle de pragas. O interesse por inseticidas botânicos resulta da necessidade da substituição dos inseticidas sintéticos, cujos efeitos adversos em sistemas agro-ecológicos são bastante conhecidos (PAVELA, 2004).

A química de produtos naturais é um campo de pesquisa imenso, sendo especialmente importante em países de grande biodiversidade como o Brasil (WILLCOX; ASH; CATIGNANI, 2004). Apesar da existência de centenas de milhares de espécies de plantas, somente uma fração destas têm sido investigada. O Brasil, que possui aproximadamente 55.000 espécies de plantas, tem estudado somente 0,4% de sua flora (GURIB-FAKIM, 2006).

O gênero *Dorstenia* é representado por aproximadamente 170 espécies conhecidas mundialmente, das quais muitas possuem significativo valor medicinal na prática médica de muitos países da África, Oriente Médio, América Central e do Sul.

Os estudos científicos desse gênero são restritos e recentes, tendo como foco a análise fitoquímica (ABEGAZ *et al.*, 2000; DUFALL *et al.*, 2003).

No Brasil existem várias espécies conhecidas popularmente como “carapiás” ou “caiapiás”, porém não há análises fitoquímicas específicas para a *Dorstenia multiformis* Miquel, que é amplamente utilizada. As indicações populares para o uso desta planta relacionam diminuição da febre, distúrbios intestinais, sintomas da menopausa, além de uso como antiofídico e para o tratamento do vitiligo.

A referida pesquisa se justifica a medida que se propõe elucidar os componentes presentes na espécie *Dorstenia multiformis* Miquel, por meio da fitoquímica aplicada, com a identificação de seus compostos, além da pesquisa de algumas atividades biológicas *in vitro* como atividade alelopática, antimicrobiana e toxicidade frente a *Artemia salina*,

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar estudo fitoquímico aplicado da fração solúvel obtida a partir do extrato etanólico bruto dos rizomas de *Dorstenia multiformis* Miquel, visando identificar a atividade antimicrobiana, alelopática e toxicológica.

2.2 Objetivos Específicos

Detectar e isolar compostos químicos presentes nas frações obtidas a partir da fração solúvel do extrato etanólico bruto.

Identificar os constituintes químicos isolados a partir da análise dos dados de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C .

Avaliar atividade antibacteriana das frações obtidas a partir da fração solúvel do extrato etanólico e substâncias isoladas.

Avaliar atividade alelopática das frações obtidas a partir da fração solúvel do extrato etanólico.

Avaliar a bioatividade das frações obtidas a partir da fração solúvel do extrato etanólico e substâncias isoladas frente a *Artemia salina*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Enquadramento Taxonômico

O enquadramento taxonômico de *Dorstenia multiformis* Miquel, Moraceae, segundo CRONQUIST (1981) e JOLY (1998), está apresentado no Quadro 1.

QUADRO 1 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE *Dorstenia multiformis*

TAXONOMIA	JOLY (1998)	CRONQUIST (1981)
Divisão	Angiospermae	Magnoliophyta
Classe	Dicotyledoneae	Magnoliopsida
Subclasse	Archichlamydeae	Hamamelidae
Ordem	Urticales	Urticales
Família	Moraceae	Moraceae
Gênero	<i>Dorstenia</i>	<i>Dorstenia</i>
Espécie	<i>Dorstenia multiformis</i> Miquel	<i>Dorstenia multiformis</i> Miquel

Fonte: CRONQUIST, 1981; JOLY, 1998

3.2 Considerações Sobre a Família Moraceae

Os representantes da família Moraceae são predominantemente arbóreos ou arbustivos, sendo raros os herbáceos. Quase sem exceção todos têm látex e folhas inteiras, dispostas alternadamente, simples ou, raramente, compostas, sempre protegidas no botão por duas estípulas (JOLY, 1998). Frequentemente, apresentam as paredes celulares, especialmente da epiderme ou tricomas, mineralizadas com carbonato de cálcio ou sílica; estômatos anomocíticos; presença de estípulas, porém, em número reduzido, como ocorre no gênero *Dorstenia* (CRONQUIST, 1981).

As flores são muito pequenas, de sexo separado, reunidas em densas inflorescências, protegidas por séries de elementos do perianto (em número de 2 a 6). Flores masculinas com estames isômeros e opostos aos segmentos do perianto. Flores femininas com perianto rudimentar ou ausente, constituídas por um ovário súpero composto de 2 carpelos e um só lóculo (dos 2 carpelos, muitas vezes só um se desenvolve) com um só óvulo. Estigmas 2, estiletos 2 (JOLY, 1998).

Fruto drupáceo, com exocarpo descendente, com sementes perenes, o receptáculo comum freqüentemente amadurece com os ovários, formando um sicônio carnudo. As sementes possuem embrião reto ou curvado, os cotilédones freqüentemente desiguais, algumas vezes um dos cotilédones encontra-se totalmente suprimido; endosperma carnudo e oleoso (CRONQUIST, 1981).

A família é composta por 61 gêneros, encontrada freqüentemente nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, sendo menos comum em climas temperados (JOLY, 1998). Os maiores gêneros da família são *Ficus*, com cerca de 600 espécies; *Dorstenia*, com aproximadamente 125 espécies, e *Cecropia*, com cerca de 50 espécies (CRONQUIST, 1981).

No Brasil, entre os gêneros nativos, destacam-se *Ficus*, *Brosimum*, *Dorstenia* e *Cecropia* (JOLY, 1998).

3.3 Considerações Sobre o Gênero *Dorstenia*

Segundo JOLY (1985), o gênero *Dorstenia* é caracterizado por inflorescências disciformes resultantes da fusão dos pedúnculos, com flores sésseis inseridas no lado superior.

Este gênero é representado por aproximadamente 170 espécies. Muitas espécies possuem significativo valor medicinal na prática médica de muitos países e curiosamente, diferentes espécies deste gênero são utilizadas para tratar mordidas de cobras em muitas comunidades (ABEGAZ *et al.*, 2000).

Muitas espécies do gênero *Dorstenia* são utilizadas na África, Oriente Médio, América Central e do Sul (DUFALL *et al.*, 2003). As indicações populares das espécies de *Dorstenia* são: artrite, reumatismo, gota, desordens estomacais, tosse, dor de cabeça, doenças de pele, febre tifóide, dentre outros (ABEGAZ *et al.*, 1998).

Além de ácidos graxos e esteróis, este gênero é reconhecido como uma rica fonte de derivados benzofuranos, cumarinas preniladas e geraniladas, flavonóides C-prenilados e C-geranilados, estirenos e triterpenóides (ABEGAZ *et al.*, 2000).

3.3.1 Cumarinas

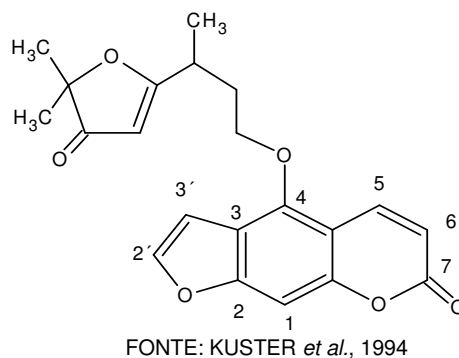
Dorstenia brasiliensis Lam. é uma espécie brasileira utilizada popularmente para tratamento de malária, mordidas de cobra (ABEGAZ *et al.*, 2000), febre tifóide e distúrbios digestivos (UCHIYAMA *et al.*, 2002).

Psoraleno foi encontrado em *D. brasiliensis* (KUSTER *et al.*, 1994), *Dorstenia psilurus* Velw. (NGADJUI *et al.*, 1998b) e *D. lindeniana* Bureau, *D. excentrica* Moric. (ROJAS-LIMA *et al.*, 1999), *D. prorepens* Engler (ABEGAZ *et al.*, 2002) e *D. elliptica* Bureau (ABEGAZ *et al.*, 2004).

Bergapteno foi isolado em *D. brasiliensis* (KUSTER *et al.*, 1994), *D. contraverja* (CACERES *et al.*, 2001), *D. prorepens* (ABEGAZ *et al.*, 2002) e *D. elliptica* (ABEGAZ *et al.*, 2004)

A furanocumarina 5-[3-(4,5-dihidro-5,5-dimetil-4-oxo-2-furanil)butoxi]-7H-furo[3-2-g][1]benzopiran-7-ona foi detectada nesta espécie e sua estrutura química proposta está representada na Figura 01 (KUSTER *et al.*, 1994).

FIGURA 01 – FURANOCUMARINA DE *Dorstenia brasiliensis*

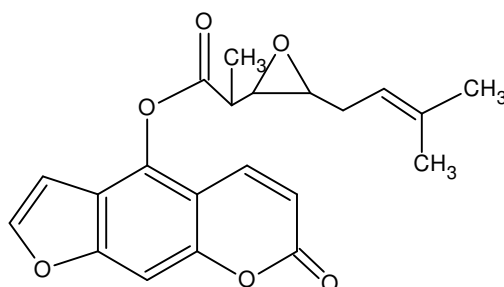


Esta furanocumarina também foi encontrada em *Dorstenia contrajerva*, *Dorstenia cayapiaa* Vell. , *Dorstenia bahiensis* Klotzsch (VILEGAS *et al.*, 1997), *D. excentrica* e *D. drakena* (ROJAS-LIMA *et al.*, 1999).

Dorstenia contrajerva é uma planta herbácea utilizada pelos índios do Panamá como antitérmico, antiofídico e para tratamento de dores musculares (TERREAUX *et al.*, 1995), além de tratamento específico para mordidas de cobra cascavel no México (ABEGAZ *et al.*, 2000).

Ao estudar esta planta, SWAIN *et al.* (1991) isolaram e identificaram o 5-[3,4-epoxi-2,7-dimetil-6,7-octenoil]psoraleno, o qual está representado na Figura 02.

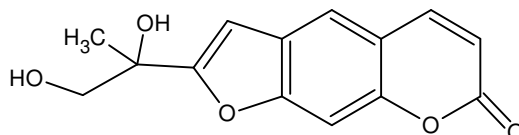
FIGURA 02 – FURANOCUMARINA DE *Dorstenia contrajerva*



FONTE: SWAIN *et al.*, 1991

Pesquisas posteriores de *D. contrajerva* levaram a uma nova estrutura, uma diidrofuranocumarina denominada dorsteniol (Figura 03). Neste trabalho a estrutura e relativa estereoquímica do dorsteniol foram confirmadas por síntese total e dados de raio-X da forma acetato (TOVAR-MIRANDA *et al.*, 1998).

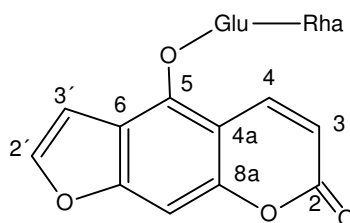
FIGURA 03 – DORSTENIOL



FONTE: TOVAR-MIRANDA *et al.*, 1998

Na Figura 04 está representada a furanocumarina glicosilada isolada do extrato metanólico das partes aéreas da *D. contrajerva*, que foi denominada α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil-bergaptol (CACERES *et al.*, 2001).

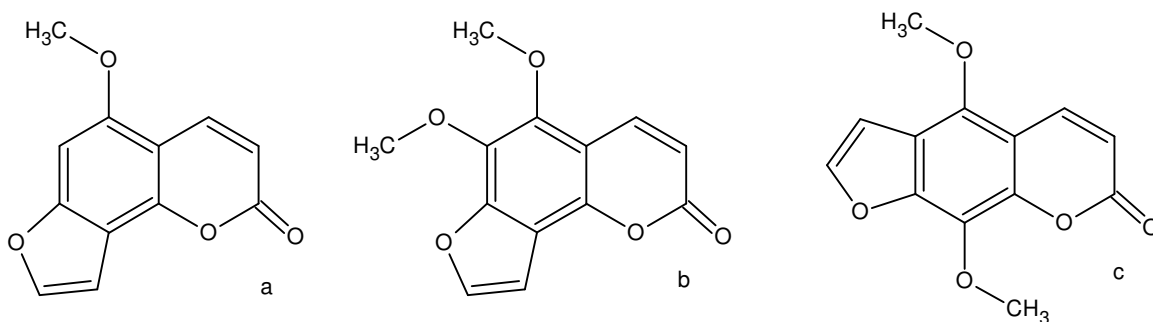
FIGURA 04 – FURANOCUMARINA GLICOSILADA DE *Dorstenia contrajerva*



FONTE: CACERES *et al.*, 2001

Na espécie brasileira *Dorstenia bryoniifolia* foram isoladas quatro furanocumarinas, sendo bergapteno anteriormente descrita, isobergapteno (Figura 05a), pimpinelina (Figura 05b) e isopimpinelina (Figura 05c) (VILEGAS *et al.*, 1997).

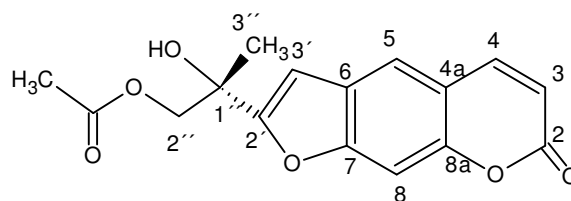
FIGURA 05 – CUMARINAS DE *Dorstenia bryoniifolia*



FONTE: VILEGAS *et al.*, 1997

Três espécies de *Dorstenia* de origem mexicana foram estudadas por ROJAS-LIMA *et al.*(1999). A partir dos rizomas de *Dorstenia excentrica* foram isolados psoraleno, 7-hidroxycumarina e uma diidrofuranocumarina. Esta foi obtida após acetilação do extrato clorofórmico, sendo identificado como um novo diastereoisômero do acetato de prandiol, com a configuração (2'S,1'S)-2,3-diidro-2(2-acetoxi-1-hidroxi-metiletil)-7H-furo[3,2-g][1]benzopirano-7-ona, representada na Figura 06.

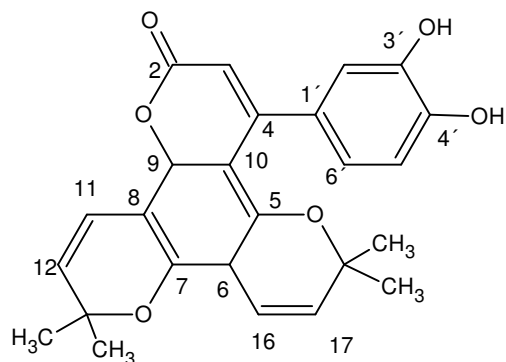
FIGURA 06 – DIASTEREISÔMERO DO ACETATO DE PRANDIOL



FONTE: ROJAS-LIMA *et al.*, 1999

Dorstenia poinsettifolia Engler é uma pequena erva rasteira da floresta tropical da África ocidental, utilizada para tratamento de feridas infectadas, de onde uma nova diidro-4-fenilcumarina foi obtida, a Poinsettifolactona (Figura 07) (NGADJUI *et al.*, 1999b).

FIGURA 07 - POINSETTIFOLACTONA



FONTE: NGADJUI *et al.*, 1999B

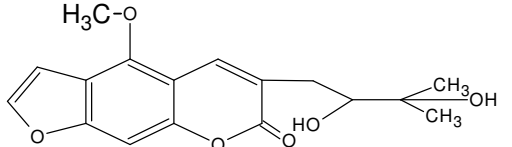
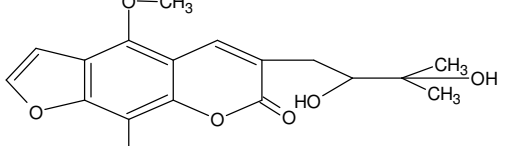
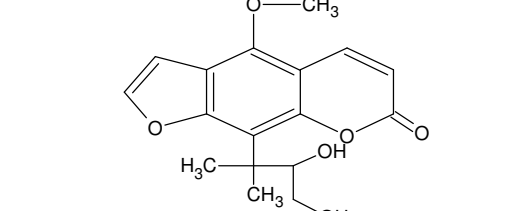
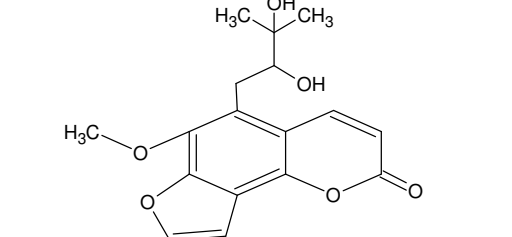
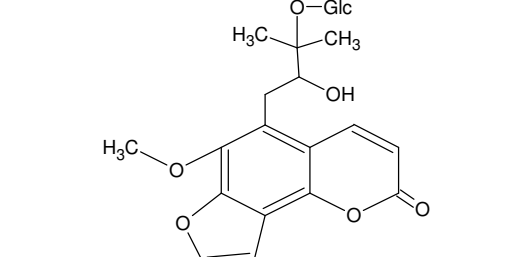
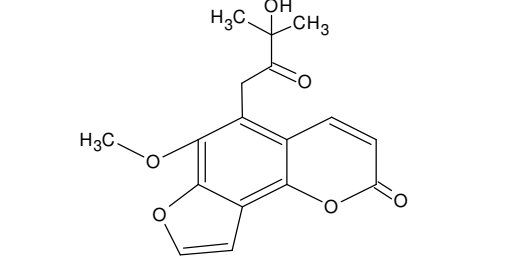
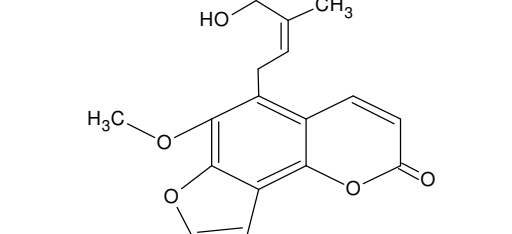
Dorstenia gigas Schweinfurth é um arbusto de crescimento endêmico em pedras calcáreas íngremes e penhascos de granito do arquipélago de Socotra. No extrato etilacetato de *Dorstenia gigas* foram identificados as já conhecidas oxipeucedaninhidrato, byakangelicina, swietenocumarina F e sete novas substâncias incluindo três isômeros estruturais da swietenocumarina F (FRANKE *et al.*, 2001).

A absorção no UV e a análise dos prótons de oxipeucedaninhidrato indicam uma relação estrutural com a isoimperatorina, encontrada no extrato n-heptano (FRANKE *et al.*, 2001).

Os espectros de massa e RMN de ^1H da byakangelina revelaram a ocorrência de um grupo metoxi adicional, sendo esta estrutura já descrita anteriormente em espécies de Apiaceae e Rutaceae (FRANKE *et al.*, 2001).

As novas substâncias encontradas por Franke *et al.* (2001) no extrato acetato de etila *Dorstenia gigas* estão representados no Quadro 2.

QUADRO 2 – SUBSTÂNCIAS DE *Dorstenia gigas* (EXTRATO ACETATO DE ETILA)

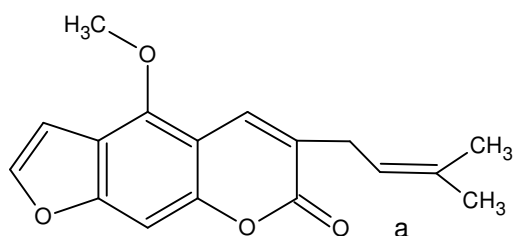
DENOMINAÇÃO QUÍMICA	ESTRUTURA MOLECULAR
5-Metóxi-3-(3-metil-2,3-dihidróxibutil)-psoraleno	 <p>The structure shows a psoralen core with a methoxy group at position 5 and a 3-methyl-2,3-dihydroxybutyl side chain at position 3.</p>
2,8-Dimetóxi-3-(3-metil-2,3-dihidróxibutil)-psoraleno	 <p>The structure shows a psoralen core with methoxy groups at positions 2 and 8, and a 3-methyl-2,3-dihydroxybutyl side chain at position 3.</p>
5-Metóxi-8-(1,1-dimetil-2,3-dihidróxipropil)psoraleno	 <p>The structure shows a psoralen core with a methoxy group at position 5 and a 1,1-dimethyl-2,3-dihydroxypropyl side chain at position 8.</p>
6-Metóxi-5-(3-metil-2,3-dihidróxibutil)-angelicina	 <p>The structure shows an angelicin core with a methoxy group at position 6 and a 3-methyl-2,3-dihydroxybutyl side chain at position 5.</p>
6-Metóxi-5-[3-βglucopiranosilóxi)-2-hidróxi-3-metil-butil]angelicina	 <p>The structure shows an angelicin core with a methoxy group at position 6 and a 3-methyl-2-hydroxybutyl side chain at position 5, where the hydroxyl group is glycosylated with a glucose moiety.</p>
3-Metóxi-5-(3-hidróxi-2-oxo-3-metil-butil)-angelicina	 <p>The structure shows an angelicin core with a methoxy group at position 3 and a 3-hydroxy-2-oxo-3-methylbutyl side chain at position 5.</p>
6-Metóxi-5-(4-hidróxi-3-metil-but-2-enil)-angelicina	 <p>The structure shows an angelicin core with a methoxy group at position 6 and a 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl side chain at position 5.</p>

FONTE: FRANKE *et al.*, 2001

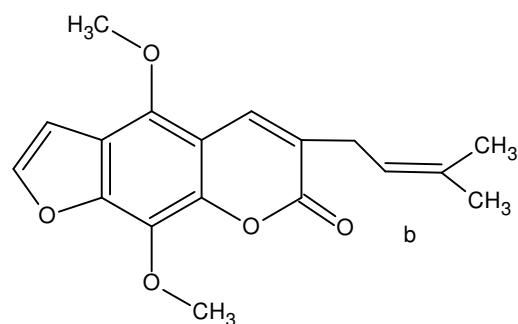
A separação cromatográfica do extrato *n*-heptano originou as furanocumarinas lineares anteriormente descritas dimetoxichalepensina, isoimperatorina, furopinnarina, swietenocumarina B, 5-metoxi-8-geraniloxipsoraleno e cnidilina (FRANKE *et al.*, 2001).

As novas substâncias encontradas no extrato *n*-heptano de *Dorstenia gigas* foram 5-metoxi-3-(3-metil-but-2-enil)-psoraleno (Figura 08a), 5,8-dimetoxi-3-(3-metil-but-2-enil)-psoraleno (Figura 08b), 6-metoxi-5-(3-metil-but-2-enil)-angelicina (Figura 08c), dorstegina (Figura 08d) e 2-(*p*-hidroxi-benzil)-6-metoxi-benzofurano (Figura 08e) (FRANKE *et al.*, 2001).

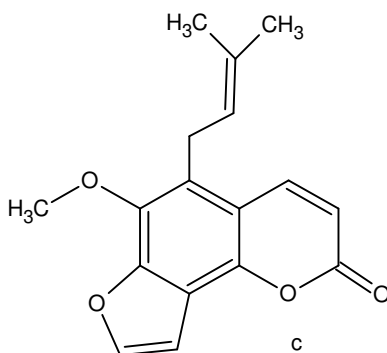
FIGURA 08 – NOVAS SUBSTÂNCIAS DE *Dorstenia gigas* (extrato *n*-heptano)



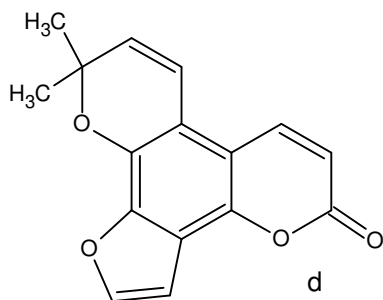
FONTE: FRANKE *et al.*, 2001



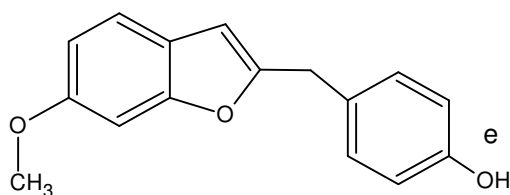
FONTE: FRANKE *et al.*, 2001



FONTE: FRANKE *et al.*, 2001



FONTE: FRANKE *et al.*, 2001



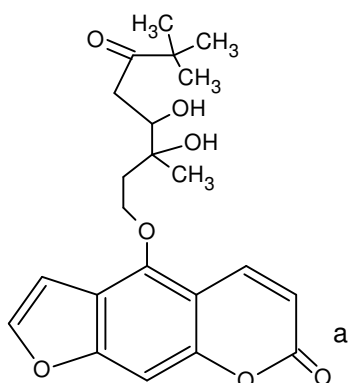
FONTE: FRANKE *et al.*, 2001

A atividade biológica da dorstenina, 5-[3-(4,5-diidro-5,5-dimetil-4-oxo-2-furanil)-butoxi]-7H-furo[3, 2-g] [1] benzopirano-7-ona, análogo do psoraleno, isolada de *Dorstenia braziliensis* foi avaliada. A foto-sensibilização e propriedades mutacionais foram testadas frente a *E. coli* e *S. cerevisiae* e comparada a alta atividade do psoraleno e bergapteno, e a dorstenina demonstrou menor efeito genotóxico (LOPES *et al.*, 2001).

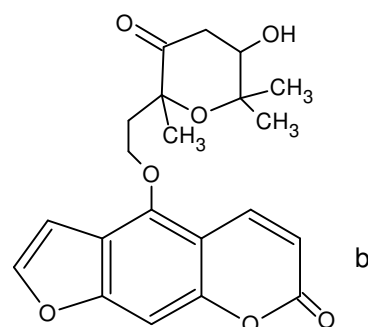
CARDOSO *et al.* (2002) realizaram determinação simultânea de furanocumarinas de infusões e decocções das espécies encontradas no Brasil *Dorstenia tubicina*, *D. asaroides* Gardner e *D. vitifolia* Gardner. As composições químicas de *D. tubicina* e *D. asaroides* são similares, revelando psoraleno e bergapteno somente nos rizomas. Em *D. vitifolia* foi encontrado somente isopimpinellina em rizomas e partes aéreas.

A espécie africana *Dorstenia elliptica* é utilizada para muitas doenças, especialmente para infecções oculares. As folhas desta planta originaram duas novas furanocumarinas, O-[3-(2,2-dimetil-3-oxo-2H-furan-5-il)-3-hidroxitil]-bergaptol (Figura 09a) e O-[2-(5-hidroxi-2,6,6-trimetil-3-oxo-2H-piran-2-il)etil]bergaptol (Figura 09b) (ABEGAZ *et al.*, 2004).

FIGURA 09 – CUMARINAS DE *Dorstenia elliptica*



FONTE: ABEGAZ *et al.*, 2004



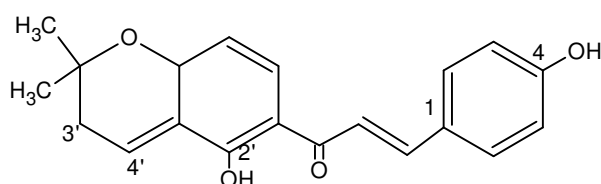
FONTE: ABEGAZ *et al.*, 2004

3.3.2 Flavonóides

Dorstenia manni Hooker é um planta herbácea com altura de até 2 metros de altura e que cresce na floresta úmida tropical da África Ocidental. A decoção de suas folhas é utilizada para o tratamento de diversas doenças, principalmente reumatismo e dores estomacais (NGADJUI *et al.*, 1998a; NGADJUI *et al.*, 1999b).

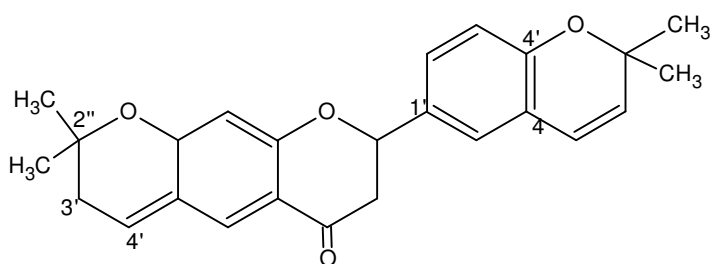
Dos ramos desta planta foram isolados os flavonóides anteriormente descritos 3'-4'-(2,2-dimetilcromeno)2',4'-dihidroxichalcona; 6-(3,3-dimetilalil)-5,7,4'-triidroxi-3'-metoxiflavona e 3,8-bis-(3,3-dimetilalil)-5,7,3',4'-tetraidroxiflavanona. Também foram identificadas as novas estruturas: três flavonóides prenilados e um flavonóide geranilado, denominadas dorsmanina A, B, C e D e estão representadas nas Figuras 10, 11, 12 e 13 respectivamente (NGADJUI *et al.*, 1998a).

FIGURA 10 – DORSMANINA A



FONTE: NGADJUI *et al.*, 1998a

FIGURA 11 - DORSMANINA B



FONTE: NGADJUI *et al.*, 1998a

FIGURA 12 - DORSMANINA C

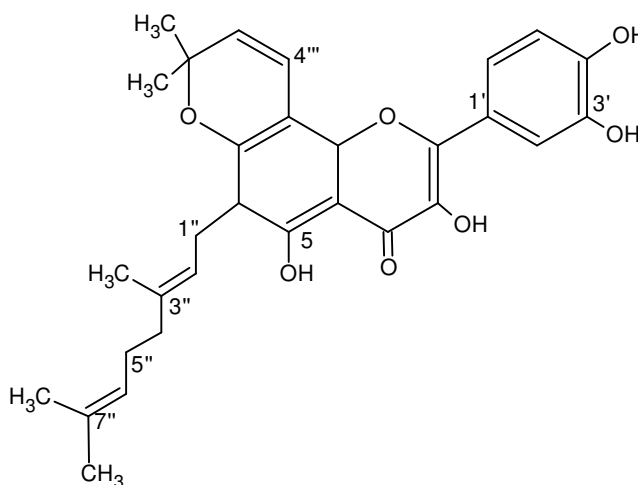
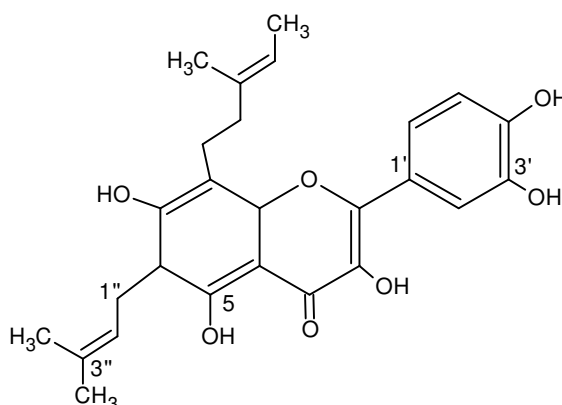
FONTE: NGADJUI *et al.*, 1998a

FIGURA 13 – DORSMANINA D

FONTE: NGADJUI *et al.*, 1998a

Posteriormente, ao continuar pesquisando a *D. mannii* foram isoladas quatro novas flavanonas preniladas e a já conhecida 6,8-diprenil-5,7,3',4'-tetraidroxiflavanona. As novas estruturas foram denominadas dorsmaninas E, F, G e H; sendo caracterizadas como 5,6-7,8-bis-(2,2-dimetilcromano)-3',4'-diidroxiflavanona; 7,8-[2''-1-hidroxi-1-metiletil]-diidrofurano]-6-prenil-5,3',4'-triidroxiflavanona; 6,7-[2''-(1-hidroxi-1-metiletil)diidrofurano]-8-prenil-5,3',4'-triidroxiflavano e 6-prenil-8-(2-hidroxi-3-metilbut-3-enil)-5,7,3',4'-tetraidroxiflavanona, respectivamente e representadas nas Figuras 14 a 17 (NGADJUI *et al.*, 1999a).

FIGURA 14 – DORSMANINA E

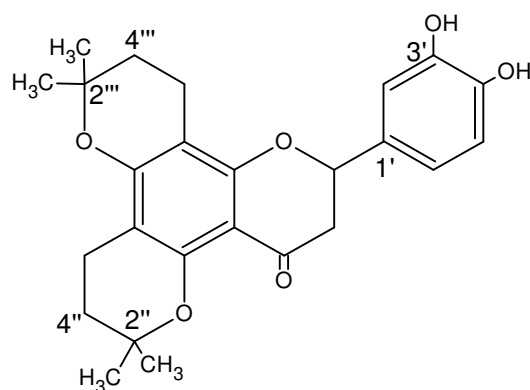
FONTE: NGADJUI *et al.*, 1999a

FIGURA 15 – DORSMANINA F

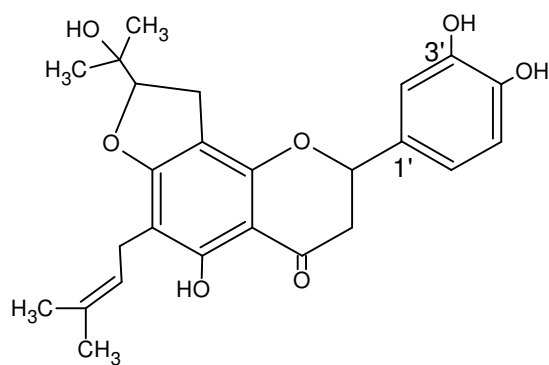
FONTE: NGADJUI *et al.*, 1999a

FIGURA 16 – DORSMANINA G

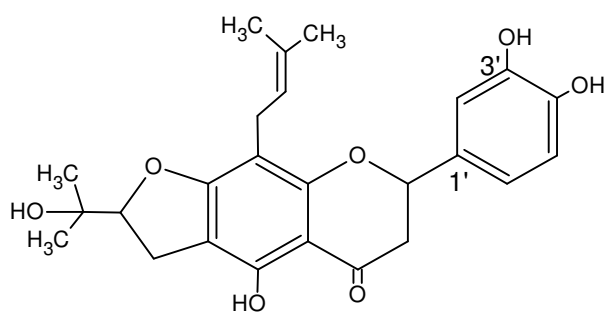
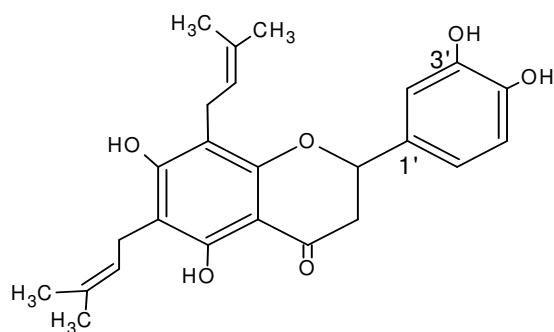
FONTE: NGADJUI *et al.*, 1999a

FIGURA 17 – DORSMANINA H



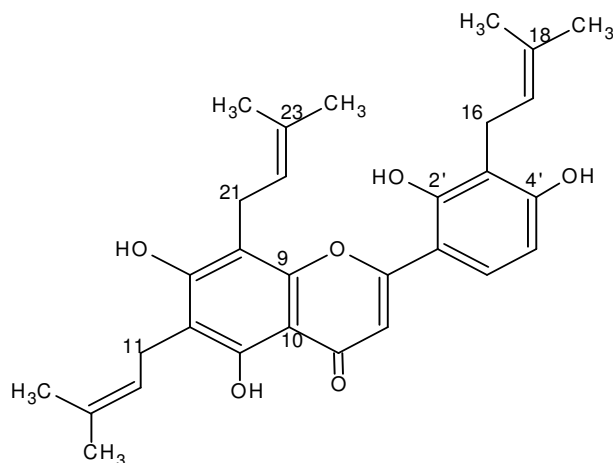
FONTE: NGADJUI *et al.*, 1999a

Em estudos posteriores desta espécie, foram identificadas quatro novas flavanonas preniladas denominadas dorsmaninas I, J e epi-dorsmaninas F,G. A estrutura dorsmanina I foi caracterizada como 6,7-(2,2-dimetilpirano)-8-prenil-5',3',4'-triidroxiflavanona e a dorsmanina J como 6,7-(2,2-dimetildiidropirano)-8-prenil-5',3',4'-triidroxiflavanona (NGADJUI *et al.*, 2000).

Detalhes da análise de RMN indicaram que as dorsmaninas F e G consistem de dois pares de diastereoisômeros resultantes da epimerização do centro assimétrico no ataque da cadeia lateral cíclica (NGADJUI *et al.*, 2000).

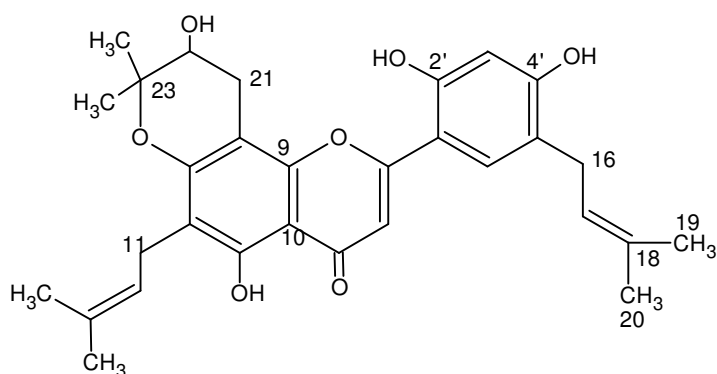
Dorstenia psilurus é uma planta herbácea de até 80 cm de altura, encontrada na floresta úmida tropical africana. Foram isoladas duas novas flavonas em suas raízes, denominadas como dorsilurina A e B e visualizadas respectivamente nas Figuras 18 e 19 (NGADJUI *et al.*, 1998b)

FIGURA 18 – DORSILURINA A



FONTE: NGADJUI *et al.*, 1998b

FIGURA 19 – DORSILURINA B

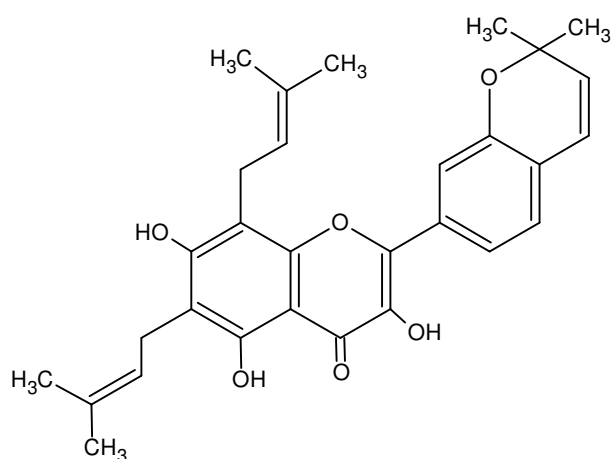


FONTA: NGADJUI *et al.*, 1998b

As dorsilurinas A e B são substâncias lábeis. A análise da dorsilurina A por RMN de sua solução clorofórmica após poucos dias mostrou pelo menos quatro compostos, presumindo-se serem produtos ciclizados (NGADJUI *et al.*, 1998b).

Em estudo posterior foram isolados mais três flavonóides triprenilados de *D. psilurus*; 6,8-diprenil-3'[O],4'-(2,2-dimetilpirano)-3,5,7-triidroxiflavona; 3,6-diprenil-8-(2-hidroxi-3-metilbut-3-emil)-5,7,2',4'-tetraidroxiflavona e derivados flavonóides modificados denominados dorsilurinas C, D e E (Figuras 20 a 22 respectivamente) (NGADJUI *et al.*, 1999c).

FIGURA 20 – DORSILURINA C



FONTA: NGADJUI *et al.*, 1999c

FIGURA 21 – DORSILURINA D

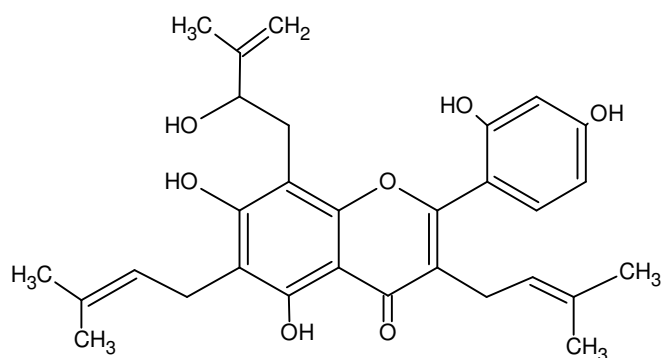
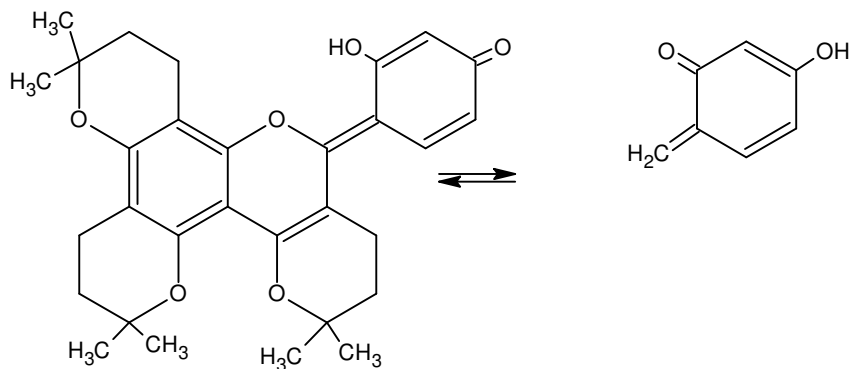
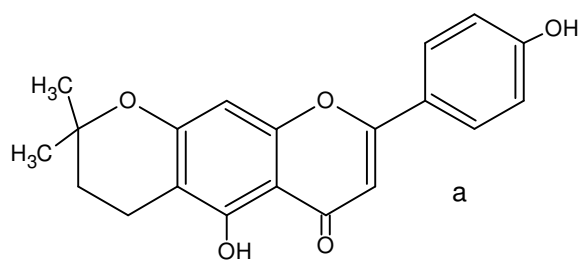
FONTE: NGADJUI *et al.*, 1999c

FIGURA 22 – DORSILURINA E

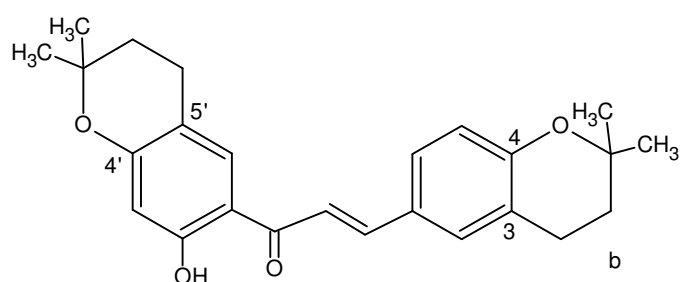
FONTE: NGADJUI *et al.*, 1999c

Dorstenia kameruniana Engler é uma pequena planta herbácea na qual foram identificados dois novos flavonóides: 6,7-(2,2-dimetilcromano)-5,4'-hidroxiflavona (Figura 23a) e 3,4-4',5'-bis-(2,2-dimetilcromano)-2'-hidroxichalcona (Figura 23b) (ABEGAZ *et al.*, 1998).

FIGURA 23 – FLAVONÓIDES DE *Dorstenia kameruniana*



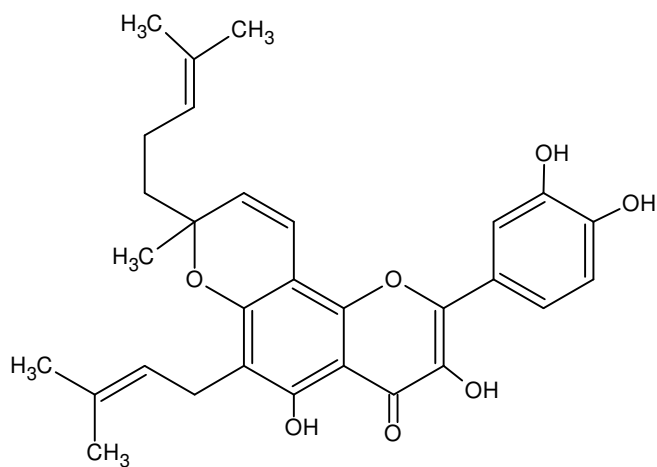
FONTE: ABEGAZ *et al.*, 1998



FONTE: ABEGAZ *et al.*, 1998

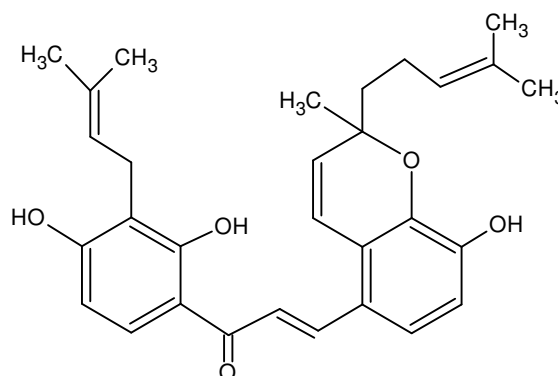
Estudos de ramos de *Dorstenia poinsettifolia* Engler levaram a estrutura de dois novos flavonóides, poinsettifolina A (Figura 24) e poinsettifolina B (Figura 25). Estes compostos pertencem ao pequeno grupo de flavonóides cíclicos C-geranilados reportados em espécies da família Moraceae (TSOPMO *et al.*, 1998)

FIGURA 24 – POINSETTIFOLINA A



FONTE: TSOPMO *et al.*, 1998

FIGURA 25 – POINSETTIFOLINA B

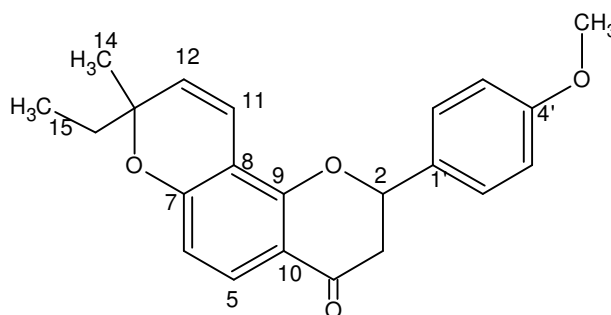


FONTE: TSOPMO *et al.*, 1998

Além destes dois compostos foi isolada a flavona licoflavona C e as chalconas isobavachalcona e isobavacromena (TSOPMO *et al.*, 1998).

A dorspoinsettifolina, representada na Figura 26 foi isolada nos ramos de *Dorstenia poinsettifolia* (NGADJUI *et al.*, 1999b).

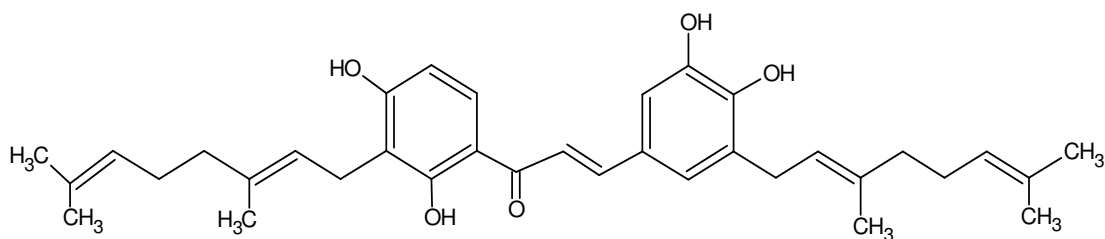
FIGURA 26 – DORSPOINSETTIFOLINA



FONTE: NGADJUI *et al.*, 1999b

Uma nova chalcona bis-geranilada, prorepensina (5,3'-digeranil-3,4,2',4'-tetraidroxilchalcona), estrutura representada na Figura 27, foi isolada em ramos de *D. prorepens*, além da conhecida 4-hidroxilonchocarpina (ABEGAZ *et al.*, 2002).

FIGURA 27 – PROREPENSINA



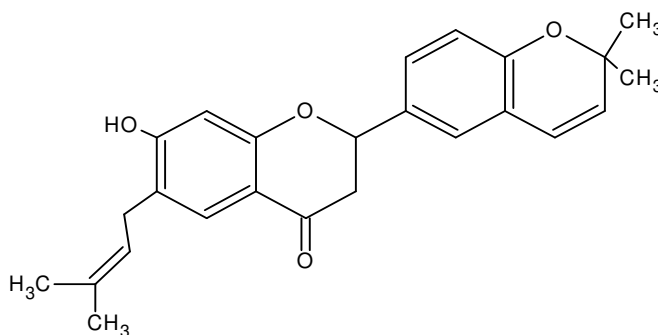
FONTE: ABEGAZ *et al.*, 2002

No extrato de folhas de *D. kenkeri* foram descobertos um derivado Diels-Alder e um derivado hidroxidimetildiidropirano; além dos conhecidos 4,2',4'-triidroxichalcona e a 4,2',4'-triidroxi-3'-prenilchalcona (ABEGAZ *et al.*, 2002).

NGADJUI *et al.* (2002) indicam que as espécies africanas do gênero *Dorstenia* produzem uma variedade de chalconas, flavanonas e flavonas mono, di e tripreniladas; além de geraniladas com modificações nos grupos prenil e geranil. Sugerem que em espécies da América Central e do Sul estes compostos ainda não foram isolados.

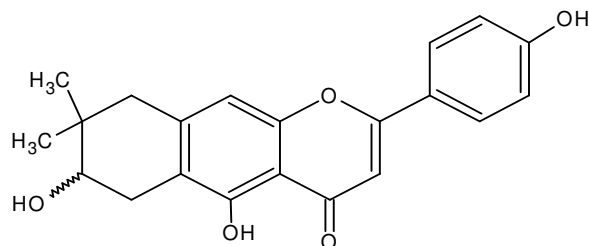
O estudo do extrato diclorometano/metanol das folhas de *Dorstenia dinklagei* Engler gerou os compostos já conhecidos 6-prenil-apigenina, 4-hidroxilonchocarpina, stipulina e 5,4'-diidroxi-6'',6''-dimetilcromano-(7,6,2'',3'')-flavona. Além destes, 3 novos flavonóides prenilados foram identificados: Dinklagina A, B e C; cujas estruturas estão representadas respectivamente nas Figuras 28, 29 e 30 (NGADJUI *et al.*, 2002).

FIGURA 28 – DINKLAGINA A



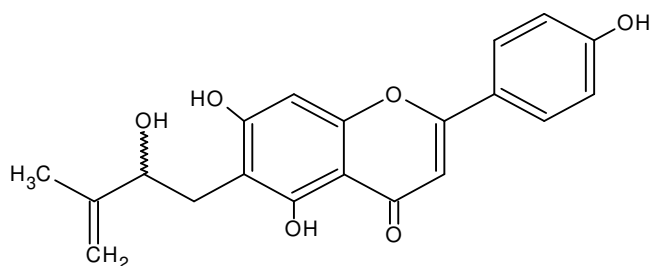
FONTE: NGADJUI *et al.*, 2002

FIGURA 29 – DINKLAGINA B



FONTE: NGADJUI *et al.*, 2002

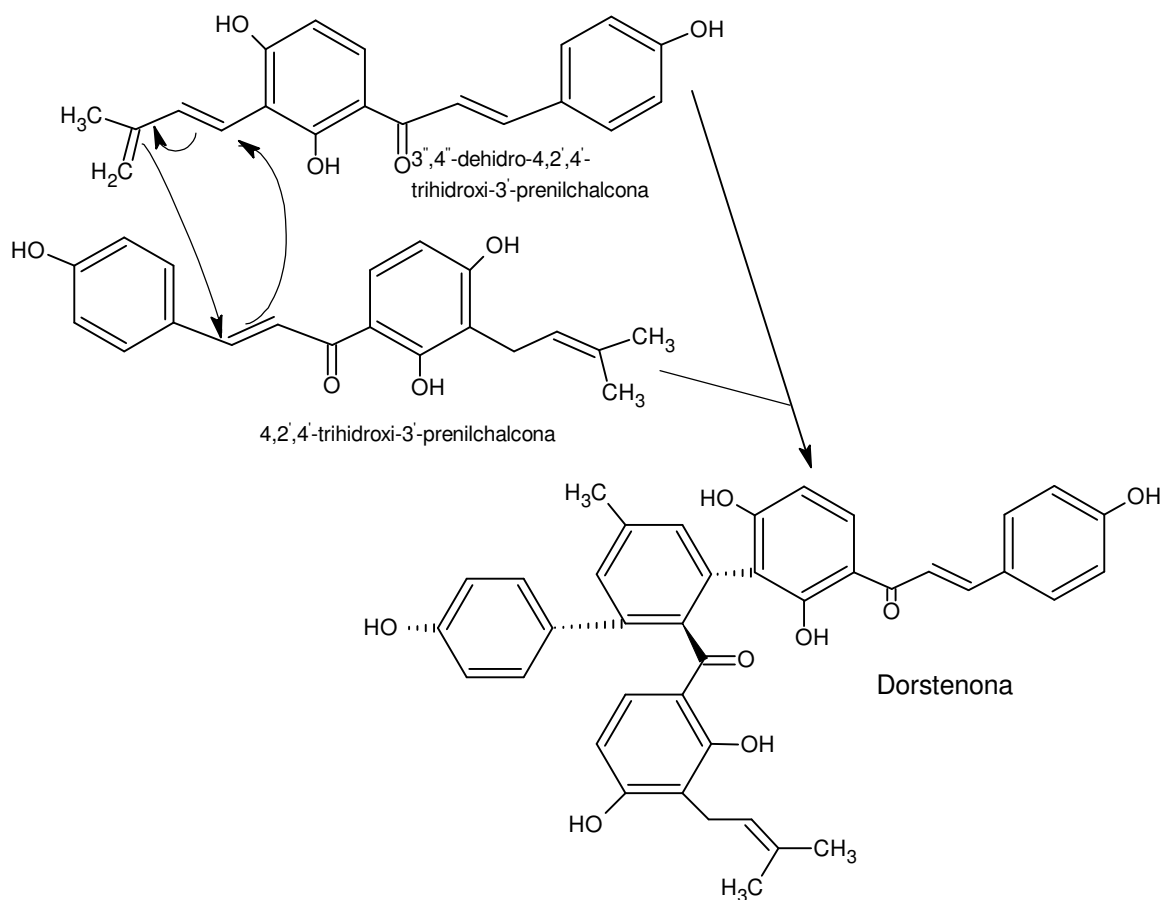
FIGURA 30 – DINKLAGINA C



FONTE: NGADJUI *et al.*, 2002

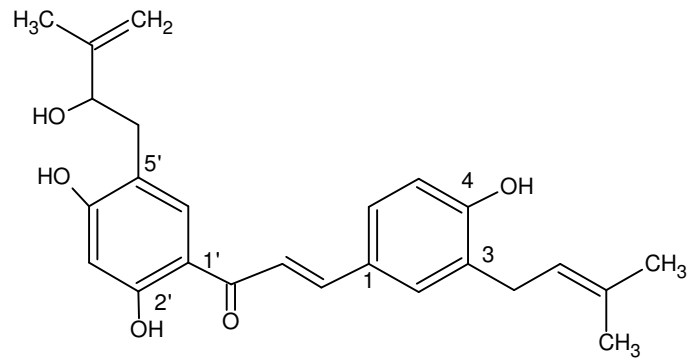
Os ramos de *Dorstenia barteri* Bureau são utilizados na medicina popular para tratamento de doenças de pele e feridas infectadas. O extrato metanol-diclorometano (1:1) foi submetido à partição seqüencial em *n*-hexano e diclorometano e após purificação resultou no isolamento de quatro compostos, sendo 4,2',4'-triidroxi-3'-prenilchalcona; 4,2',4'-triidroxi-3,3'-diprenilchalcona; 5,7, 4'-triidroxi-8-prenilflavona e um novo flavonóide Diels-Alder, o qual foi denominado dorstenona. A formação da dorstenona ocorre entre a chalcona 4,2',4'-triidroxi-3'-prenilchalcona e seu derivado deidro com três centros quirais no anel metilciclohexeno. A reação de formação da dorstenona está demonstrada na Figura 31 (TSOPMO *et al.*, 1999).

FIGURA 31 – REAÇÃO DE FORMAÇÃO DA DORSTENONA

FONTE: TSOPMO *et al.*, 1999

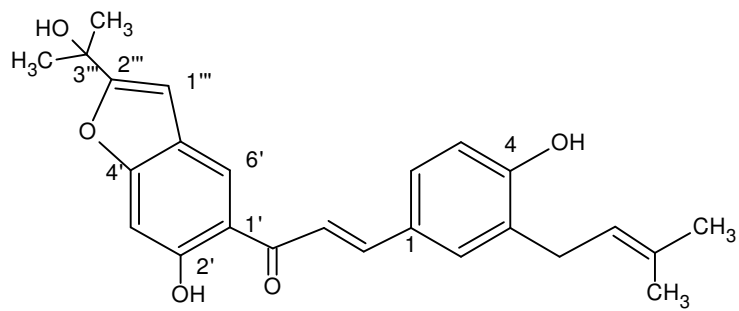
O estudo dos ramos de *Dorstenia barteri* var. *subtriangularis* levou ao isolamento de três chalconas dipreniladas: Bartericina A, (-)-3-(3,3-dimetilalil)-5'-(2-hidroxi-3-metilbut-3-enil)-4,2',4'-trihidroxi-chalcona (Figura 32); Bactericina B, (+)-3-(3,3-dimetilalil)-4',5'-[2''-(1-hidroxi-1-metiletil)-diidrofurano]-4,2'-diidroxi-chalcona (Figura 33) e Bactericina C, 3,4-(6'',6''-dimetildiidropirano)-4',5'-[2''-(1-hidroxi-1-metiletil)-diidrofurano]-2'-hidroxi-chalcona (Figura 34) (NGAMENI *et al.*, 2004).

FIGURA 32 – BARTERICINA A



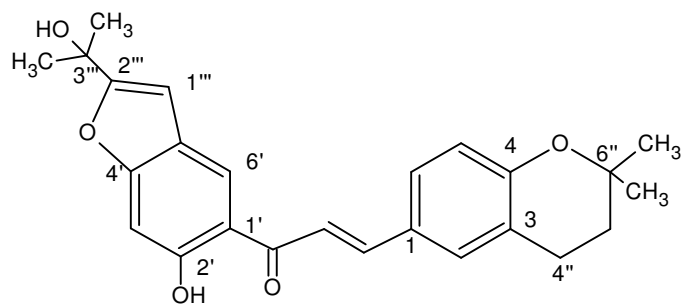
FONTE: NGAMENI *et al.*, 2004

FIGURA 33 – BARTERICINA B



FONTE: NGAMENI *et al.*, 2004

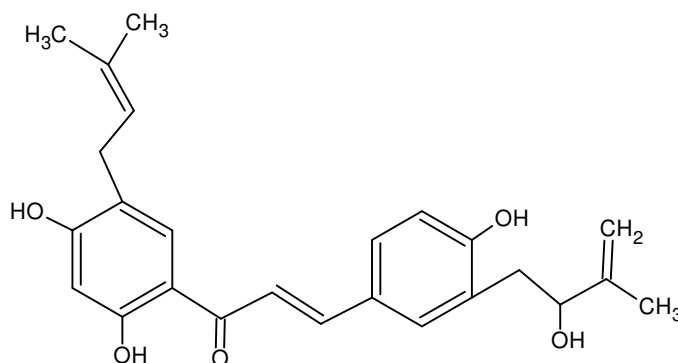
FIGURA 34 – BARTERICINA C



FONTE: NGAMENI *et al.*, 2004

Em estudo posterior desta mesma planta, foi isolada a estrutura considerada inicialmente como isômero da bartericina A, segundo dados de RMN de ^1H e ^{13}C . Comparando os pontos de fusão das duas substâncias a bartericina A apresentou valores de 138-140°C e a nova estrutura isolada, 169-170°C. A estrutura deste novo composto foi estabelecida como 3-(2-hidroxi-3-metil-but-3-enil)-5'-(3,3-dimetilalil)-4,2',4'-triidroxichalcona, denominada bartericina D, representada na Figura 35 (NGADJUI *et al.*, 2005).

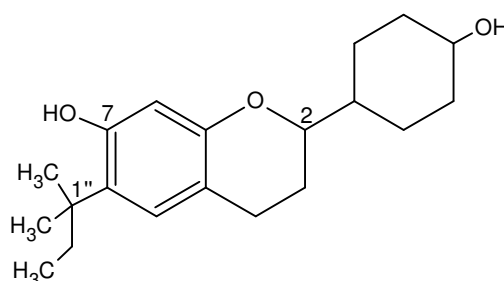
FIGURA 35 - BARTERICINA D



FONTE: NGADJUI *et al.*, 2005

Em folhas de *Dorstenia elliptica* foi identificada uma nova estrutura, 6-(1,1-dimetilalil)-7,4'-diidroxiflavano, representada na Figura 36; assim como a já conhecida 3-(3,3-dimetilalil)-4,2',4'-triidroxichalcona (ABEGAZ *et al.*, 2004).

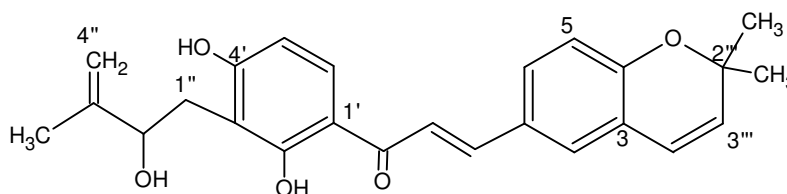
FIGURA 36 – NOVO FLAVONÓIDE DE *Dorstenia elliptica*



FONTE: ABEGAZ *et al.*, 2004

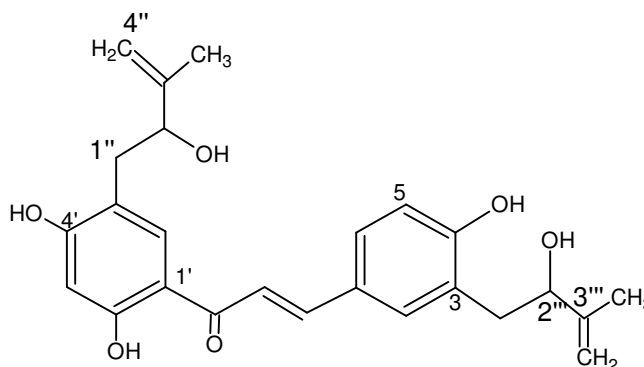
Na análise dos ramos de *Dorstenia angusticornis* Engler, foram identificadas as novas estruturas: angusticornina A (3,4-(2,2-dimetilpirano)-3'-(2-hidroxi-3-metilbut-3-enil)-2',4'-diidroxichalcona), representada na Figura 37 e angusticornina B (5'-di-(2-hidroxi-3-metilbut-3-enil)4,2',4'-triidroxichalcona), representada na Figura 38 (NGADJUI *et al.*, 2005).

FIGURA 37 – ANGUSTICORNINA A



FONTE: NGADJUI *et al.*, 2005

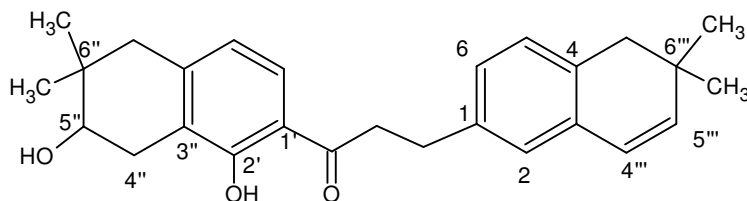
FIGURA 38 – ANGUSTICORNINA B



FONTE: NGADJUI *et al.*, 2005

Estudo posterior desta mesma espécie levou ao isolamento da angusticornina C, a qual foi caracterizada como 6''',6'''-dimetilpirano[2''',3''':3,4]-6'',6''-dimetildiidropirano[2'',3'':3',4']-2',5''-diidroxichalcona (Figura 39) (SIMO; NGADJUI; ABEGAZ, 2005).

FIGURA 39 – ANGUSTOCORNINA C

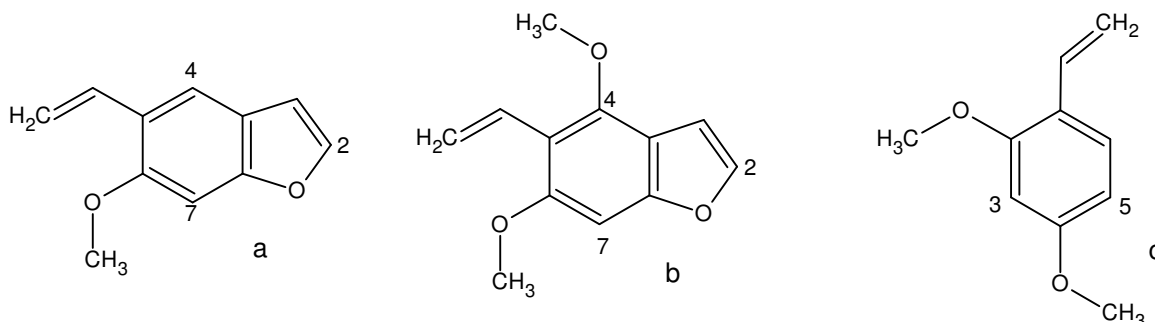


FONTE: SIMO; NGADJUI & ABEGAZ , 2005

3.3.3 Benzofuranos e derivados fenilpropanóides

No trabalho de WOLDU *et al.* (1988) foram isolados 3 novos compostos, 6-metoxi-5-vinilbenzofurano (Figura 40a), 4,6-dimetoxi-5-vinilbenzofurano (Figura 40b) e 2,4-dimetoxiestireno (Figura 40c).

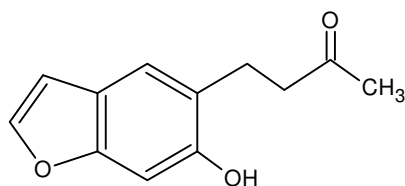
FIGURA 40 – ESTIRENOS DE *Dorstenia barnimiana*



FONTE: WOLDU *et al.*, 1988

Em *D. psilurus*, foram identificados os derivados fenilpropanóides: estearil-*p*-cumarato[octadecanil 3-(4-hidroxifenil)prop-2-enoato], estearil ferulato[octadecanil 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-enoato]; além de novo derivado benzofurano, representado na Figura 41 (NGADJUI *et al.*, 1998b).

FIGURA 41 – DERIVADO BENZOFURANO DE *D. psilurus*



FONTE: NGADJUI *et al.*, 1998b

3.3.4 Esteróides e triterpenos

A utilização de algumas plantas medicinais brasileiras como antiofídicas pode estar associada à presença de terpenóides (triterpenóides e fitoesteróis) com a inativação do veneno (PEREIRA *et al.*, 1994)

As frações solúveis em hexano dos rizomas ou das folhas de cinco espécies do gênero *Dorstenia* coletados no Brasil foram analisadas por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada a Espectrometria de Massa (CGAR-EM). As substâncias identificadas estão listadas no Quadro 3 (VILEGAS *et al.*, 1997).

QUADRO 03 – SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS EM ESPÉCIES DE *Dorstenia*

ESPÉCIES	TRITERPENOS	ESTERÓIDES	OUTROS
<i>D. bahiensis</i>	α -Am, β -Am, α -Ac, β -Ac, GIAC	Sitosterona	
<i>D. bryoniifolia</i>	α -Am, β -Am		
<i>D. carautae</i>	α -Am, β -Am		
<i>D. cayapiaa</i>	α -Am, β -Am, α -Ac, β -Ac, TxAc, β -Ar	Sitosterol	Ácidos graxos
<i>D. heringerii</i>	α -Ac, β -Ac, LpAc, GIAC	Não identificado	α -tocoferol

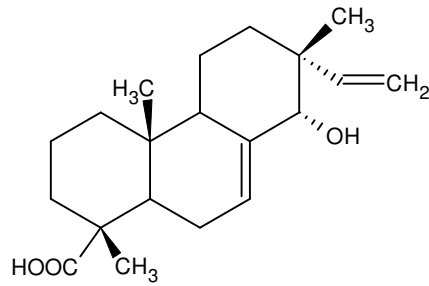
FONTE: VILEGAS *et al.*, 1997

NOTA: α -Am: α -amirina, β -Am: β -amirina, α -Ac: acetato de α -amirina, β -Ac: acetato de β -amirina, β -Ar: β -amirona, GIAC: acetato de glutinol; TxAc: acetato de taraxerol, LpAc: acetato de lupeol

β -sitosterol e seu D-glucopiranosídeo foram encontrados em *D. prorepens* (ABEGAZ *et al.*, 2002), *D. barteri var. subtriangularis* (NGAMENI *et al.*, 2004), *D. elliptica* (ABEGAZ *et al.*, 2004), *D. angusticornis* (NGADJUI *et al.*, 2005; SIMO *et al.*, 2005) Em *D. excentrica*, foram isolados acetato de β -amirina, acetato de sitosterol e acetato de 3-O- β -glucosilsitosterol. Em *D. drakena* foi isolado sitosterol (ROJAS-LIMA *et al.*, 1999)

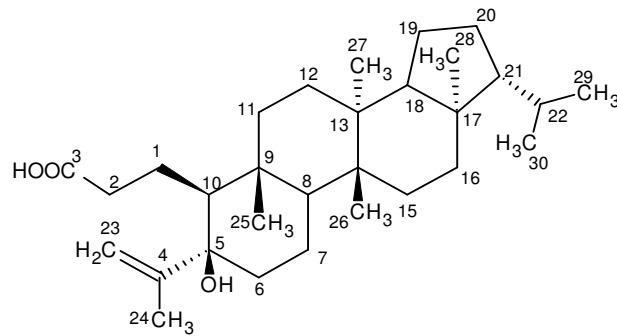
O triterpeno butirospermol e o carotenóide luteína foram isolados em *D. poinsettifolia* (TSOPMO *et al.*, 1998).

Em *Dorstenia brasiliensis*, foram isolados dois triterpenóides tipo seco-adianane, os quais foram denominados ácidos dorstênico A e B e um diterpenóide tipo isopimarane. A denominação química do diterpenóide adotada foi ácido 14a-hidroxi-7,15-isopimaradien-18-óico (UCHIYAMA *et al.*, 2002), e já havia sido isolada em *Salvia greggii* (BRUNO *et al.*, 1986). A representação de sua estrutura está demonstrada na Figura 42.

FIGURA 42 - DITERPENÓIDE TIPO ISOPIMARANE ISOLADO EM *D. brasiliensis*FONTE: UCHIYAMA *et al.*, 2002

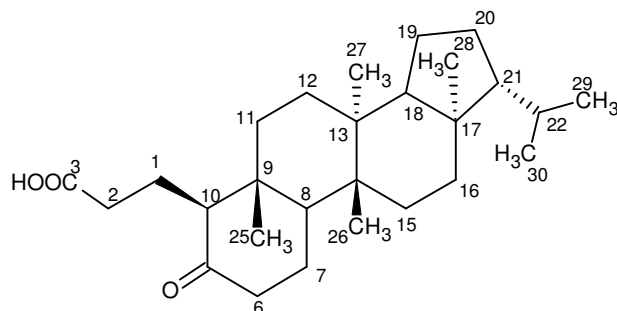
O ácido dorstênico A (Figura 43) foi confirmado como um triterpenóide tipo 3,4-*seco*-adnanane, com um grupo carboxil no C2 (UCHIYAMA *et al.*, 2002).

FIGURA 43 – ÁCIDO DORSTÊNICO A

FONTE: UCHIYAMA *et al.*, 2002

O ácido dorstênico B (Figura 44) foi considerado como um derivado de isopropenil do ácido dorstênico A, apresentando o grupo carbonil no C5 (UCHIYAMA *et al.*, 2002).

FIGURA 44– ÁCIDO DORSTÊNICO B

FONTE: UCHIYAMA *et al.*, 2002

3.3.5 Aspectos farmacológicos do gênero *Dorstenia*

3.3.5.1 Atividades antinoceptiva, analgésica e antiinflamatória

De acordo com RUPPELT *et al.* (1991), *Dorstenia brasiliensis* demonstrou atividade analgésica e/ou antiinflamatória na forma de infusão da planta seca a 10% e 20% da planta fresca.

Foram avaliados os efeitos antinoceptivos e antiinflamatórios de *Dorstenia barteri* em ratos. Os efeitos antinoceptivos dos extratos de folhas e ramos desta espécie foram dose-dependente e significativos, considerando modelos de dor induzidos quimicamente, mecanicamente e termicamente. Nos modelos para avaliar analgesia e inflamação, o extrato dos ramos apresentou potência superior ao extrato das folhas. No modelo de imersão da cauda, os resultados sugerem similaridade da atividade analgésica com o medicamento de referência, ácido acetilsalicílico, com ausência de efeitos via mecanismos centrais. Nos modelos de inflamação aguda, o extrato de ramos foi mais ativo que a fenilbutazona; mas o extrato das folhas apresentou baixa significância em todos os testes (OMISORE *et al.*, 2005).

Bergapteno e os triterpenos β -amirina e sitosterol têm sido associados com a inativação de veneno de cobras de algumas plantas medicinais brasileiras (PEREIRA *et al.*, 1994). A utilização das plantas do gênero *Dorstenia* como antiofídicas pode estar relacionada com a inativação do veneno em função das propriedades analgésicas e antiinflamatórias de vários terpenos (VILEGAS *et al.*, 1997).

Sugere-se que as atividades antiinflamatórias das plantas podem ser explicadas pelo menos em parte por suas atividades antioxidantes (MONGELLI *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 1999; MONTORO *et al.*, 2005); parecem inibir a ação de alguns dos oxidantes gerados na inflamação (AMES; SHIGENARA; HAGEN, 1993).

A atividade anti-radicaís livres de *Dorstenia psilurus*, *D. ciliata* e um composto fenólico, 6-fenilapigenina de *D. ciliata* foram avaliados com o teste do DPPH. Os extratos clorofórmio de *D. psilurus* e acetato de etila de *D. ciliata* Engler demonstraram exibir atividade anti-radicaís livres, enquanto a atividade da 6-fenilapigenina foi considerada fraca em comparação com os extratos (KANSCI *et al.*, 2003).

Os flavonóides prenilados 6,8-diprenileriodictiol, dormanina C e F isolados de *Dorstenia manni* tiveram a capacidade antioxidante avaliada. Todos os compostos atuaram com eficiência frente a radicais livres, mas a atividade foi similar ao flavonóide não prenilado quercitina. Os resultados também indicam que somente o composto com grupo hidroxila no anel C (dorsmanina C) demonstrou alguma interação com íons cobre (DUFALL *et al.*, 2003).

Ao avaliar a atividade antioxidante de *Dorstenia multiformis*, foi observada atividade antioxidante da fração clorofórmio superior ao padrão rutina. O extrato bruto e as frações hexano e acetato de etila também demonstraram possuir esta atividade (BALESTRIN, 2006).

3.3.5.2 Atividade anti-hipertensiva

O extrato de folhas de *D. psilurus* é largamente utilizado na região de savana da República de Camarões para tratamento de artralgia e desordens cardiovasculares, principalmente hipertensão. Após extração em metanol-diclorometano (1:1) e remoção dos solventes, foi preparado um extrato de concentração de 50 mg/mL em água destilada e administrada por entubação gástrica em ratos que tiveram hipertensão induzida por frutose. O tratamento com *D. psilurus* reduziu significativamente a pressão sanguínea sistólica e os níveis plasmáticos de insulina e colesterol, mas não preveniu o desenvolvimento de hipertrigliceridemia (DIMO *et al.*, 2001).

3.3.5.3 Peptídeos anti-vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

A partir de *Dorstenia contrajerva* foi isolado um novo peptídeo que inibe a ligação da proteína Cyanovirina-N (CV-N) ao gp41 e gp120, inibindo efeitos citopáticos, com conseqüentemente atividade anti-HIV. O peptídeo de 5 kDa foi denominado Contrajervina e os dados do estudo sugerem que este composto atua por dois mecanismos o que contribui com a atividade de citoproteção (BOKESCH *et al.*, 2004).

3.3.5.4 Atividade contra células leucêmicas

O extrato metanólico de *Dorstenia brasiliensis* inibiu em 79% o crescimento de células leucêmicas (L-1210), na concentração de 50 µg/mL. Os compostos isolados desta planta, ácido dorstênico A e B na concentração de 40 µM, demonstraram moderada citotoxicidade. O valor de IC 50 para células L-1210 na presença de ácido dorstênico A foi de 5 e para células HL-60, na presença de ácido dorstênico B, 10 (UCHIYAMA *et al.*, 2002).

A inibição da secreção de matriz metaloprotease 2 (MMP-2) por células de tumores cerebrais pela ação de uma furanocumarina glicosilada denominada turbinatocumarina isolada de folhas de *Dorstenia turbinata* sugerem propriedades quimiopreventivas (NGAMENI *et al.*, 2006). Em estudo posterior, chalconas isoladas de folhas de *Dorstenia barteri* apresentaram atividade semelhante (NGAMENI *et al.*, 2007).

3.3.5.5 Tratamento de doenças de pele

O relato do uso de plantas com propriedades estimulantes da pigmentação para tratamento do vitiligo data desde o período histórico (2000 a.C.). A partir de 1930, com estudos direcionados para elucidação das estruturas que tinham a atividade farmacológica o uso dos psoralenos foi difundido. Em meados de 1970, foi iniciado o período da fotoquimioterapia, onde se utiliza a combinação de psoralenos, com administração oral ou tópica, e irradiação UVA; tratamento este denominado PUVA (psoraleno+UVA) (HOLMES-Jr. *et al.*, 1992).

PUVA está indicado para tratamento de um número grande de doenças como psoríases, micoses, urticária pigmentosa, erupções, alopecia, vitiligo, dentre outros (MARZANO *et al.*, 2002; LLANO *et al.*, 2003). Os compostos correntemente utilizados na PUVA são 8-metoxipsoraleno (8-MOP), 5-metoxipsoraleno (5-MOP) e 4,5',8-trimetilpsoraleno (TMP) (MARZANO *et al.*, 2002); sendo que após irradiação com raios UVA, as furanocumarinas ligam-se ao DNA por meio de duplas ligações carbono-carbono (KITAMURA *et al.*, 2005).

Em várias espécies do gênero *Dorstenia* as furanocumarinas são os componentes mais abundantes, dando suporte a sua utilização para as doenças de pele (VILEGAS *et al.*, 1997).

No trabalho de CARDOSO *et al.* (2002) foi realizada análise qualitativa e quantitativa de infusões e decocções de espécies brasileiras de *Dorstenia*. Sugere-se que os rizomas de *Dorstenia tubicina* e *Dorstenia asaroides* possam ser utilizados como alternativa para o tratamento de psoríase e vitiligo, uma vez que foram encontradas as furanocumarinas psoraleno e bergapteno.

3.3.6 Aspectos toxicológicos do gênero *Dorstenia*

A aplicação ou ingestão de furanocumarinas pode causar inchaço, vermelhidão, queimaduras e lesões na epiderme, ou em alguns casos carcinoma cutâneo. A reação fototóxica aparece como eritemas, usualmente manifestada após um intervalo latente de várias horas após exposição a raios UV (TUREGUN *et al.*, 1999; AL-QATTAN *et al.*, 2000).

Das furanocumarinas utilizadas no tratamento de doenças de pele, o TMP é considerado o mais fototóxico, seguido pela xantotoxina, psoraleno e bergapteno (TRUMBLE *et al.*, 1992), enquanto que a isopimpinellina não é considerada tóxica, mas também possui menor bioatividade (CHAUDHARY *et al.*, 1985). Usualmente a quantidade de psoraleno e bergapteno é utilizada como um índice da atividade fototóxica da planta (TRUMBLE *et al.*, 1992; DIAWARA *et al.*, 1995).

Extratos de 87 espécies, pertencentes a 8 gêneros da família Moraceae, foram avaliados para constituintes fototóxicos, utilizando *E. coli*. As 5 espécies testadas do gênero *Dorstenia* apresentaram graus variados de atividade antimicrobiana ativada pela luz. Extratos das raízes apresentaram compostos fotossensibilizantes mais potentes, ou maiores concentrações de fototoxinas, em comparação aos extratos de folhas ou flores. Furanocumarinas (5-metoxipsoraleno e psoraleno) foram identificados nos extratos de todas as espécies que apresentaram fototoxicidade (SWAIN; DOWNUM, 1990).

A falta de conhecimento da presença de psoralenos em fitofármacos oferece risco a saúde pública, uma vez que existe o risco da potencialização dos efeitos carcinogênicos, mutagênicos e fototóxicos sob exposição solar (CARDOSO *et al.*, 2002; PIRES *et al.*, 2004).

3.3.7 Aspectos antimicrobianos do gênero *Dorstenia*

O extrato metanólico, frações e quatro flavonóides denominados gancaonina, steipulina, angusticornina B e bartericina A, isolados de folhas de *Dorstenia angusticornis*, foram testados para avaliar a atividade antimicrobiana. Um total de 22 culturas incluindo três espécies de *Candida*, seis espécies de bactérias Gram-positivas e treze espécies de bactérias Gram-negativas foram utilizadas no estudo. O extrato metanólico e os flavonóides angusticornina B e bartericina A inibiram o crescimento de todos os patógenos testados, apresentando atividade antibacteriana e anticandida (KUETE *et al.*, 2007b).

3.3.7.1 Atividade contra *Leishmania sp.*

Leishmanioses é um grupo de doenças causadas por diferentes espécies do protozoário *Leishmania*, que afetam mais de 12 milhões de pessoas ao redor do mundo, sendo endêmica em 88 países em 4 continentes (WHO, 1997).

As chalconas possuem um amplo espectro de atividades biológicas como antiviral, antibacteriana, antiprotozoário, amebicida, antiúlcera, antiviral, inseticida, anticâncer, citotóxica e imunossupressiva (DIMMOCK *et al.*, 1999). A partir dos anos 90, as chalconas emergiram como uma nova classe de agentes antileishmaniose e resultados promissores têm sido obtidos com chalconas substituídas (LUNARDI *et al.*, 2003; BOECK *et al.*, 2006).

O extrato metanólico de *D. barteri* var. *multiradiata* foi considerado ativo contra *Leishmania* no estágio amastigoto (NGAMENI *et al.*, 2004).

No trabalho de IWU *et al.* (1992) foram avaliados extratos de 11 plantas utilizados na Nigéria como antiparasitários, dentre elas *Dorstenia multiradiata*. Na concentração de 50 µg/mL, 5 das 11 plantas inibiram o catabolismo de dois ou mais substratos a CO₂. Das plantas que foram consideradas ativas contra *Leishmania chagasi*, *Dorstenia multiradiata* foi a única que exibiu atividade na concentração de 5 µg/ml, inibindo fortemente o catabolismo de L-ornitina, ácido butírico e L-prolina e apresentando elevado potencial como antileishmania.

3.3.7.2 Atividade contra *Aedes aegypti*

A prevalência global da dengue tem crescido dramaticamente nas últimas décadas. A doença é endêmica em mais de 100 países da África, Américas, Mediterrâneo oriental, sudeste da Ásia e oeste do Pacífico (WHO, 2002).

Aedes aegypti foi reintroduzido no Brasil aproximadamente no final da década de 70, sendo que mais de 2 milhões de casos de dengue foram reportados entre 1987 e 2003 (FIGUEIREDO, 2003).

O extrato diclorometano de *Dorstenia contraverja* exibiu atividade contra larvas de *Aedes aegypti*. Na concentração deste extrato de 125 ppm, 100% das larvas morreram em 24 horas. As frações obtidas a partir deste extrato também foram ativas, mas em menor proporção. As furanocumarinas isoladas foram inativas (TERREAUX *et al.*, 1995).

3.3.7.3 Atividade contra *Trichomonas sp.*

Tricomoníase é a mais comum das doenças sexualmente transmitidas, mas dados sobre prevalência e incidência são limitados. A tricomoníase manifesta sintomas em aproximadamente 50% das mulheres infectadas e tem sido associada com aumento da soroconversão do vírus HIV em mulheres (WHO, 2001).

Os extratos de *Dorstenia barteri* e *Dorstenia convexa* foram testados frente a *Trichomonas gallinarum*, espécie esta que causa alta morbidade e mortalidade principalmente em pássaros jovens. A atividade antitrichomonas do extrato de *D. barteri* mostrou-se mais ativo que de *D. convexa* (OMISORE *et al.*, 2005).

Alguns compostos isolados de *D. barteri*, *D. manni*, *D. convexa*, *D. kameruniana* foram avaliados. Bartericina B (*D. barteri*) apresentou atividade superior ao metronidazol. Bartericina A, isobavachalcona e stigmasterol (isolados de *D. barteri*); 6,8-diprenileridictiol e dorsmanina F (isolados de *D. manni*) também demonstraram atividade antitrichomonas (OMISORE *et al.*, 2005).

3.3.7.4 Atividade contra *Giardia lamblia*

O extrato metanólico de *Dorstenia contraverja* foi ativo frente a trofozoítos de *Giardia lamblia* com inibição de concentração de 50% (IC₅₀) de 23,3µg/mL. Dentre

os extratos de 26 plantas coletadas, utilizadas na medicina tradicional mexicana, foi uma das três plantas com maior atividade, em comparação com emetina (0,42 µg/mL) e metronidazol (0,21 µg/mL) (CALZADA *et al.*, 2006).

3.3.7.5 Atividade contra *Bacillus sp.*

No trabalho de TERREAUX *et al.* (1995), o ensaio para verificação da atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis* foi realizado por bioautografia. O extrato diclorometano de *Dorstenia contraverja* foi ativo com 30 µg de amostra depositada em placa de Cromatografia de Camada Delgada (CCD).

3.4 Considerações Sobre *Dorstenia Multiformis* Miquel

3.4.1 Sinonímia vulgar

Os sinônimos citados por SILVA (1926) são carapiá, caapiá e contra-erva.

Caiapiá, carapá, conta-de-cobra, liga-osso, taporé e tiú são sinônimos utilizados no Brasil. Sinônimos estrangeiros: Em espanhol, contrayerba; em italiano, contraierva; em francês, contrayerve e em alemão, widergift, peruvianische e gilfwurzel (COIMBRA, 1942).

Os nomes vulgares carapá e capiá são descritos por CRUZ (1985).

3.4.2 Sinonímia científica

BUREAU (1873) descreveu os sinônimos *Dorstenia multiformis* var. *arifolia* (Lam.), *Dorstenia multiformis* var. *ceratosanthes* (Lodd.), *Dorstenia multiformis* var. *ficifolia* (Fisch. & C.A. Mey.) e *Dorstenia multiformis* var. *ramosa* (Desv.). PECKOLT (1890) denominou *Dorstenia multiformis* var. *pinnatifida* (Miq.) (MISSOURI BOTANIC GARDEN, 2006).

3.4.3 Distribuição geográfica

Segundo CRUZ (1985), é uma espécie originária do Brasil, habitando em São Paulo, Goiás, Mato Grosso, Bahia, Pernambuco e Minas Gerais.

3.4.4 Usos populares

As principais indicações dos rizomas da *Dorstenia multiformis* são: tônico, antifebril, antianêmico, anti-diarréico, tratamento da febre tifóide e atonia do aparelho digestivo (COIMBRA, 1942; CRUZ, 1985). Outros usos farmacoterapêuticos citados são: estimulante, diaforético, diurético, emenagogo, (COIMBRA, 1942), perturbações do estômago, gastrite, clorose, desarranjos do útero, supressão das regras, afecções do aparelho respiratório, cistites (CRUZ, 1985).

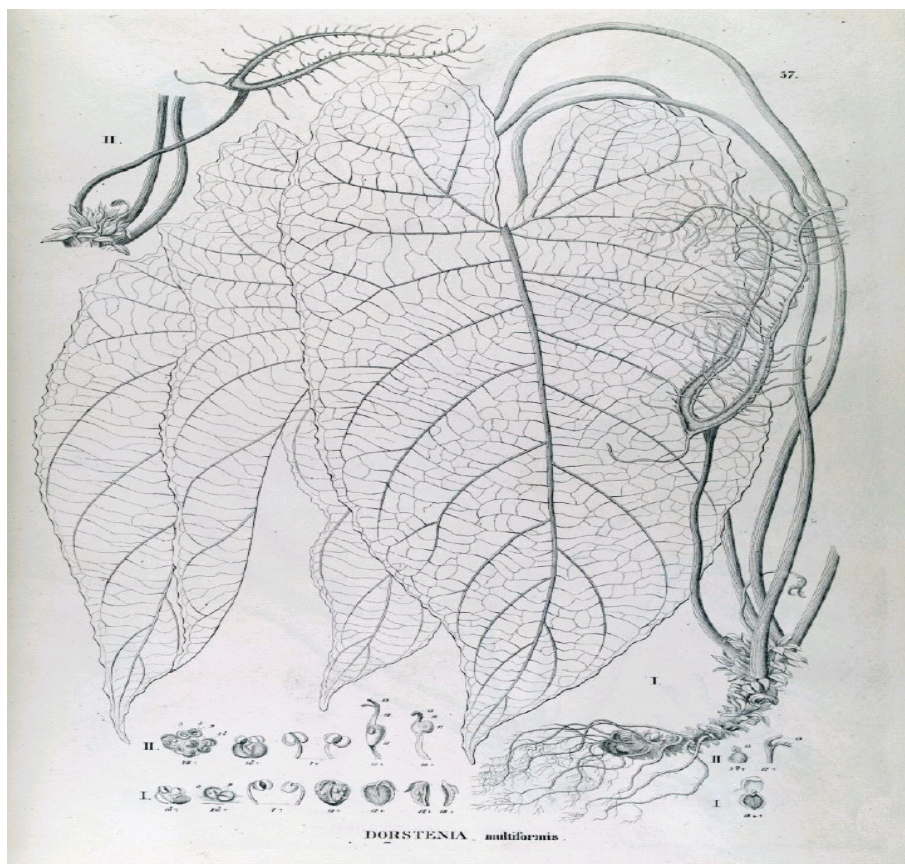
Também é indicada nas menstruações doloridas e tardias, para aumentar o volume da urina, tornando-a clara e como antídoto contra o veneno de cobras (COIMBRA, 1942). Os rizomas de *Dorstenia multiformis*, associados ao taiuiá, são usados empiricamente, com a denominação de “liga-osso”, para a reparação de fraturas, na forma de cozimento e tintura (CRUZ, 1985). Cataplasmas preparados a partir dos rizomas, são indicados também para apressar a solidificação de ossos fraturados (COIMBRA, 1942).

As formas farmacêuticas habituais são: infuso, decocto, extrato fluido, pó, tintura, elixir, vinho, xarope (COIMBRA, 1942) e cápsulas.

3.4.5 Descrição botânica

Segundo SILVA (1926), o rizoma de *Dorstenia multiformis* apresenta forma cilíndrica, irregular, tortuoso, mais dilatado na parte inferior e medindo de 5 a 10cm de comprimento por 10 a 20mm de largura na sua parte mais dilatada.

A superfície externa é de cor pardo-esverdeada, apresentando brácteas carnosas foliáceas lanceoladas em quase toda a extensão, de 4 a 6 mm de comprimento, e algumas cicatrizes oval-triangulares, salientes, produzidas pela queda dos pecíolos; bem como numerosas radículas delgadas e longas. A seção transversal apresenta uma zona externa de cor esbranquiçada, zona média descontínua e zona interna de cor rosa (SILVA, 1926).

FIGURA 45 – ILUSTRAÇÃO DE *Dorstenia multiformis* Miquel

FONTE: FLORA BRASILIENSIS, 1853

A espécie *Dorstenia multiformis* Miquel, cuja ilustração encontra-se na Figura 45, apresenta-se como uma planta herbácea, sem caule, com folhas pecioladas, compridas, sem brilho, com recortes arredondados nas bordas. Esta planta nasce próximo ao solo, suas flores são pequenas, situadas num receptáculo e dispendo-se em forma de pendão. A raiz não é muito grossa, aromática e de gosto amargo, ostentando na extremidade inferior, numerosos filamentos ou radículas (CRUZ, 1985).

3.4.6 Aspectos fitoquímicos

Segundo COIMBRA (1942), os principais constituintes químicos encontrados em *Dorstenia multiformis* são dorstenina, ácido dorstênico, óleo essencial, sais, matérias gordurosas e pépticas.

PIRES *et al.* (2004) desenvolveram um método que foi considerado sensível, rápido e reprodutível para determinação de psoralenos em soluções orais de fitofármacos utilizando cromatografia líquida. A *Dorstenia multiformis* era uma das plantas que continha nas formulações, e foram detectados psoraleno e bergapteno em todas as amostras analisadas.

BALESTRIN (2006), em pesquisa fitoquímica preliminar evidenciou no extrato alcoólico a presença de cumarinas, flavonóides da classe dos flavonóis, triterpenos, esteróides. No extrato aquoso foram encontrados taninos condensados, aminogrupos e ácidos fixos. Foram identificados dois compostos cumarínicos, psoraleno e bergapteno, e dois compostos terpenóides, acetato de α -amirina e acetato de β -amirina, a partir do resíduo do extrato bruto.

3.5 Considerações Sobre Alelopatia

O termo alelopatia foi cunhado por MOLISCH (1937) e significa do grego *allelon* (mútuo) e *pathos* (prejuízo). Descreve a influência de um indivíduo sobre o outro através de interações bioquímicas benéficas ou maléficas entre todas as classes de plantas, incluindo os microorganismos. Sugere-se que o efeito seja realizado por biomoléculas, denominadas aleloquímicos, produzidas por uma planta e lançadas no ambiente influenciando no crescimento e desenvolvimento de plantas vizinhas (RIZVI *et al.*, 1992).

Posteriormente, em 1974, RICE redefiniu o termo em seu livro "Allelopathy" e considerou somente os aspectos deletérios da interação. Na segunda edição do livro em 1984 ele retornou à definição original (MACÍAS; GALINDO; MOLINILLO, 1999).

Em 1977, SZCZEPANSKI diferenciou as interferências entre os indivíduos em alelospolia, alelopatia e alelomeiação. Alelospolia ou competição foi definida como a interferência causada pelos organismos ao retirarem do ambiente água, nutrientes e luz, o que provocaria um prejuízo no desenvolvimento normal de outros elementos. A introdução de substâncias químicas novas foi denominada alelopatia. Alelomeiação, as que alteram o ambiente físico ou biológico com reflexo nos seres vizinhos (ALMEIDA, 1988).

O significado de alelopatia foi expresso no Regulamento da Sociedade Internacional de Alelopatia, em 1996 como: “É a ciência que estuda qualquer processo envolvendo, principalmente, metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos e agrícolas, incluindo efeitos positivos e negativos” (MACÍAS; GALINDO; MOLINILLO, 1999).

Conforme RIZVI *et al.* (1992), os aleloquímicos podem influenciar: citologia e ultraestruturas, fitohormônios, membranas e sua permeabilidade, absorção de minerais, movimento de estômatos, síntese de pigmentos e proteínas, fotossíntese, respiração, fixação de nitrogênio, atividades enzimáticas específicas, relações hídricas e condução, material genético, induzindo alterações no DNA e RNA.

Os aleloquímicos pertencem a várias classes de metabólitos secundários, na maioria das vezes derivados da rota do acetato ou da rota chiquimato ou da combinação das duas origens (MALHEIROS; PERES, 2001).

As substâncias alelopáticas podem ser: ácidos orgânicos, aldeídos, lactonas simples insaturadas, poliacetilenos, naftoquinonas, antraquinonas, quinonas, fenóis simples, flavonóides, taninos, terpenóides, esteroides, alcalóides, cumarinas, ácidos graxos de cadeia longa, aminoácidos e polipeptídeos, purinas, álcoois, nucleosídeos, outros (RICE, 1984).

Geralmente as influências entre os sistemas biológicos resultam da atuação de um conjunto de substâncias e observa-se também que um mesmo composto pode influenciar várias funções biológicas e a mesma função poder ser influenciada por mais de um composto (MALHEIROS; PERES, 2001).

3.6 Considerações Sobre *Artemia salina*

Muitos laboratórios de produtos naturais têm inserido nas rotinas de pesquisa diversos ensaios biológicos simples, com o objetivo de monitorar o estudo fitoquímico de extratos de plantas na procura de substâncias bioativas (MCLAUGHLIN; CHANG; SMITH, 1991)

O ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* (TAS) foi proposto por MICHAEL; THOMPSON; ABRAMOVITZ (1956) e modificado por MEYER *et al.* (1982). É um ensaio biológico rápido, de baixo custo e não requer ambiente

asséptico. Utiliza um grande número de organismos para validação estatística, não requer equipamentos especiais e a quantidade de amostra é relativamente pequena (2-20 mg) (MCLAUGHLIN; CHANG; SMITH, 1991).

Este ensaio tem sido utilizado para estudo biológico inicial de um grande número de amostras para detecção simultânea de toxicidade e fototoxicidade (OJALA *et al.*, 1999; MOREIRA *et al.*, 2003; PIMENTA *et al.*, 2003).

Artemia salina é um microcrustáceo de água salgada utilizado como alimento vivo para peixes, facilmente encontrado em lojas especializadas em aquários e pode ser utilizado para estimar a toxicidade através da concentração média letal (LC50) (MEYER *et al.*, 1982)

Vários trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades como antifúngica, viruscida, antimicrobiana, tripanossomicida (MACRAE *et al.*, 1988; CÁCERES *et al.*, 1998) e parasiticida (CHAN-BACAB *et al.*, 2003). Este bioensaio também tem sido citado na avaliação prévia de extratos de plantas com possível atividade antitumoral (RUPPRECHT *et al.*, 1990; SIQUEIRA *et al.*, 2001)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO E AMOSTRA DE PESQUISA

A população foi coletada no município de Jataí, estado de Goiás, em janeiro de 2004. Os rizomas ilustrados na Figura 46 foram fornecidos pela indústria farmacêutica "As Ervas Curam", em março de 2004. O material enviado consistia de todas as partes da planta, secas, estabilizadas e moídas. A identificação botânica foi realizada pelo Museu Botânico Municipal de Curitiba pelo botânico Gert Hatschbach, e a esxicata encontra-se registrada neste museu sob o número MBM-37440. A planta foi mantida em saco de papel, fechado e identificado, ao abrigo da luz e da umidade á temperatura de 15°C até o momento do uso.

FIGURA 46 - *Dostenia multiformis* Miquel



FONTE: MIGUEL, 2006.

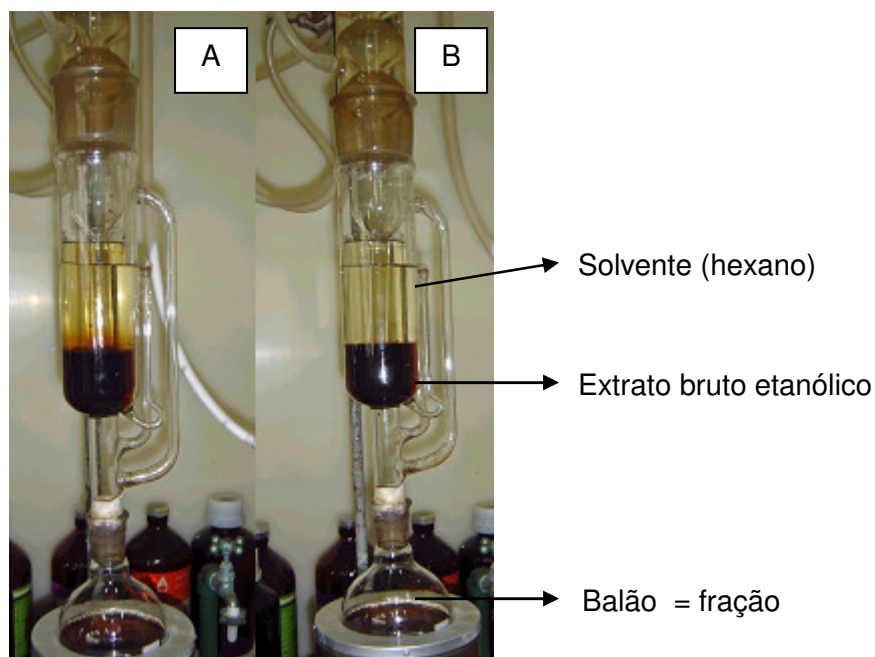
Partindo de 5 kg de material vegetal seco, BALESTRIN (2006) obteve o extrato bruto etanólico. O material vegetal foi submetido à extração por refluxo em aparelho de soxhlet com etanol absoluto. O extrato obtido foi filtrado em algodão e

concentrado em evaporador rotatório Laborota[®], sob pressão reduzida, com aquecimento em banho-maria a temperatura de aproximadamente 40 °C. O extrato concentrado foi filtrado a vácuo e foram obtidos a fração solúvel do extrato etanólico bruto e o resíduo correspondente, sendo armazenados separadamente em frascos de vidro âmbar. O resíduo foi estudado por BALESTRIN (2006) e o volume de 350mL da porção solúvel do extrato consistiu da amostra de trabalho.

4.2 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES

Partindo-se de 350 mL da fração solúvel do extrato etanólico bruto, foi realizada a partição em aparelho de soxhlet modificado (CARVALHO, 2001), no qual o sifão possui um alargamento em sua base, que evita o sifonamento do extrato e permite que a extração seja contínua, conforme ilustrado na Figura 47. Observa-se na porção superior do soxhlet o solvente utilizado na partição, na inferior; encontra-se o extrato bruto a ser particionado. No balão, o resultado do processo, ou seja a fração obtida, no exemplo fração hexano.

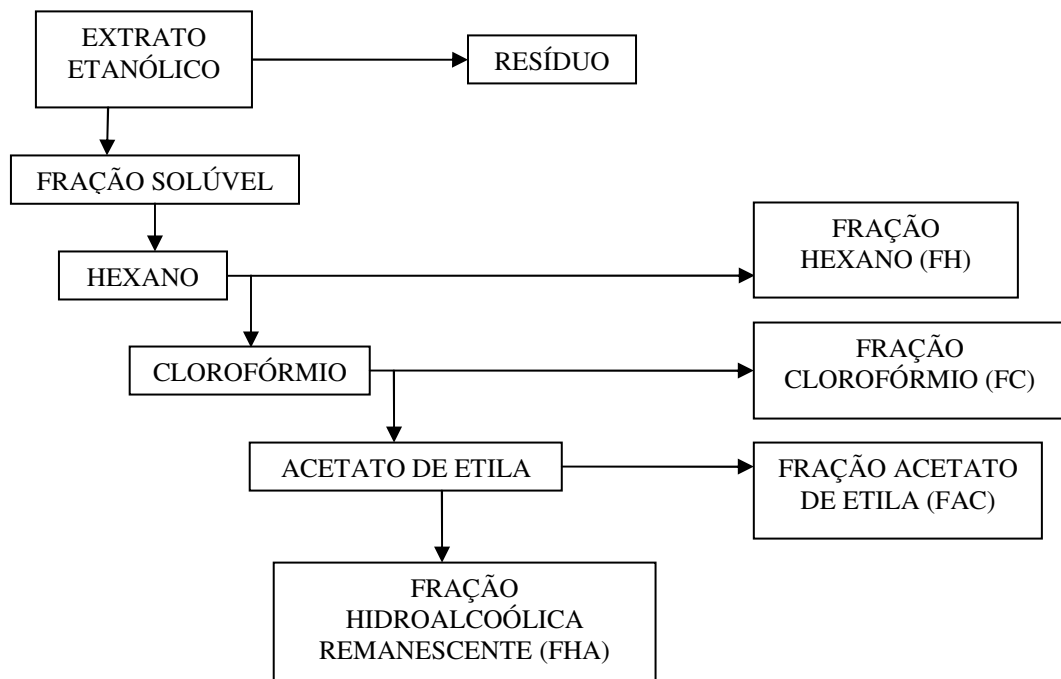
FIGURA 47 – PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO COM HEXANO APÓS 4 HORAS (A) E 8 HORAS (B)



FONTE: MIGUEL, 2006

Foram utilizados solventes de polaridade crescente, ou seja hexano, clorofórmio e acetato de etila, por cerca de 8 horas cada. O volume utilizado de solvente foi de aproximadamente 200mL no cartucho e 300mL no balão. Foram obtidas as frações hexano (FH), clorofórmio (FC), acetato de etila (FAC) e hidroalcoólica remanescente (FHA), conforme demonstrado na Figura 48.

FIGURA 48 – FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES



Após a obtenção das frações, estas foram concentradas em evaporador rotatório Laborota[®], pressão reduzida, com aquecimento em banho-maria à temperatura de aproximadamente 40 °C. O resíduo correspondente foi transferido para um recipiente, levado ao banho-maria até a secura em temperatura de aproximadamente 40 °C e em seguida pesado.

A determinação do pH foi realizada, utilizando-se fitas reativas Merck[®] e a determinação do teor de sólidos, conforme MIGUEL, 2003.

4.2.1 Determinação do teor de sólidos

Utilizando-se a técnica adaptada de MIGUEL (2003), foi adicionado 1 mL das frações em cadinho pesado, levado a estufa sob temperatura de 100°C até peso

constante e foram realizados os cálculos, onde o resultado é apresentado em quantidade de sólidos, em mg/mL de cada fração.

4.3. ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS

4.3.1 Cromatografia em Camada Delgada

As frações obtidas foram analisadas por CCD analítica em placas de sílica gel Merck®. As fases móveis utilizadas foram tolueno:acetato de etila: ácido fórmico (60:40:3) para todas as amostras, hexano:acetato de etila (93:7) para a fração hexano e tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (70:30:3), para fração acetato de etila .

As placas foram observadas sob luz ultravioleta (UV), em ondas curtas (254nm) e longas (365nm). Os reveladores utilizados foram solução alcoólica de hidróxido de potássio a 5% e solução de vanilina sulfúrica.

4.3.2 Cromatografia em Coluna

4.3.2.1 Preparo das Pastilhas

A pastilha foi preparada com sílica-gel 60 (70-230 mesh) e material correspondente às frações, consistindo de 2 partes de sílica-gel para cada parte de amostra. A fração inicialmente foi totalmente solubilizada com clorofórmio com adição posterior de sílica-gel. Sob constante homogeneização, o solvente foi evaporado em banho-maria a 50°C.

4.3.2.2 Preparo da Coluna

Foram utilizadas colunas de vidro (16cm x 4,5cm) onde foi depositada a sílica-gel, na proporção de 5 partes em relação a quantidade da pastilha.

4.3.2.3 Procedimento para a Cromatografia em Coluna

Após o preparo da coluna foi colocado um papel de filtro, a pastilha, novo papel de filtro e início da eluição. O sistema eluente utilizado consistiu inicialmente de 100% de hexano, tendo acetato de etila como gradiente de polaridade, com variação de 5% em 5%, até 100% de acetato de etila. A fim de aumentar a polaridade e possibilitar a separação dos compostos que não foram separados com o sistema hexano e acetato de etila, foi utilizado um novo gradiente, iniciando com 100% de acetato de etila, com variação de 5% em 5% de metanol. Foram coletadas porções de aproximadamente 10ml em frascos de vidro.

O material correspondente a cada porção foi analisado por CCD, conforme item 4.3.1 e as porções semelhantes foram reunidas e quantificadas. Este procedimento foi realizado para FH, FAC e FC.

4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS

Os compostos isolados foram analisados por cromatografia gasosa/espectrometria de massa (CG/EM) e ressonância magnética nuclear (RMN de ^{13}C e ^1H).

Após visualização preliminar dos cristais isolados por CCD foi realizada análise cromatográfica preliminar por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com coluna preparativa de fase reversa (RP18), a fim de obter o perfil das amostras e posterior encaminhamento dos cristais para identificação. O aparelho utilizado foi da marca Merck-Hitachi Lacrom Elite, com detector DAD L-2450, bomba quaternária L-2130. A fase móvel empregada foi metanol:água (90:10), sob temperatura ambiente, fluxo 1mL/min. O programa para processamento dos dados foi o EZChrom.

Para CG/EM foi utilizado o cromatógrafo gasoso Shimadzu 14-B com detector de ionização de chama (FID) e forno de colunas com rampas de aquecimento programáveis e interface CBM-101. A coluna utilizada foi 5% fenilmetil siloxano, 0,25 μm de filme, 250 μm de diâmetro interno e 30 m de comprimento. O fluxo inicial utilizado foi de 1,0 mL/min e pressão de 10.45 psi.

Para RMN, foi utilizado o aparelho Bruker Avance 400 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz), tendo como solvente clorofórmio deuterado e padrão interno o

tetrametilsilano (TMS). A análise dos dados obtidos foi realizada com auxílio do programa Mestre C.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Foi testada *in vitro* a susceptibilidade de cepas frente a diversas concentrações das frações hexano e clorofórmio obtidas a partir do extrato bruto etanólico, além da amostra H6, utilizando-se as metodologias de difusão em gel e método de diluição em caldo, ambas adaptadas de KONEMAN *et al.*, (1993).

As bactérias utilizadas nos testes foram *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella thyphimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus pyogenes*; levando-se em consideração a disponibilidade de cepas padrão.

Todos os ensaios foram realizados em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas. O material utilizado (vidrarias, pinças e os discos) foi esterilizado em autoclave a 120°C, por 15 minutos.

4.5.1 Difusão em gel

Este teste baseia-se na inoculação de um microorganismo no meio de cultura e acréscimo de discos de papel impregnados com as amostras. As substâncias impregnadas nos discos difundem-se no meio de cultura e microorganismos desenvolvem-se após incubação em temperatura adequada.

A comprovação da atividade antibacteriana ocorre pela formação de halo de inibição ao redor do disco de papel impregnado com a amostra em estudo.

4.5.1.1 Preparo das amostras

As frações FH e FC que anteriormente haviam sido conduzidas à secura em evaporador rotatório foram diluídas com metanol, a fim de obter as concentrações desejadas de 100%, 50%, 25% e 12,5%.

Para a associação amostra H6, provável associação de psoraleno e bergapteno foi preparada uma solução mãe de 10,2mg em 500 µL de metanol, ou

seja 20,4 mg/mL, a qual foi considerada concentração 100%. A concentração 50% foi obtida através da transferência de 200 µL da solução mãe para um tubo de ensaio estéril e adicionado 200 µL de metanol. Este procedimento foi realizado sucessivamente para as concentrações 25% e 12,5%.

4.5.1.2 Preparo dos discos de papel

Os discos de papel filtro esterilizado de 6mm foram espalhados em placas de Petri esterilizadas e devidamente identificadas, e impregnados com 10 µL das amostras previamente preparadas. Para controle, foram utilizados discos impregnados com metanol, solvente foi utilizado para solubilização das frações.

As placas de Petri fechadas foram levadas à estufa, a 40°C por 24 horas.

4.5.1.3 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi o ágar Müller-Hinton adquirido comercialmente, e foi escolhido por ser um meio, embora não enriquecido, suficientemente nutritivo para permitir o desenvolvimento de colônias bacterianas (KONEMAN *et al.*, 1993).

4.5.1.4 Preparo do inóculo

As culturas puras dos microrganismos foram adquiridas comercialmente, e foram repicadas em ágar Mueller-Hinton e incubadas a 35°C, 24 horas antes do teste.

As culturas assim obtidas, para cada bactéria, foram diluídas em 5 mL de salina estéril, e padronizadas conforme a turbidez do tubo número 5 da escala de Mac Farland (0,5ml de BaCl₂. 2H₂O 0,048M – 1,75% p/v em 99,5mL de H₂SO₄ 0,36N – 1% v/v), para obtenção de concentração aproximada de $1,5 \cdot 10^9$ UFC/mL. A turbidez foi comparada utilizando um espectrofotômetro de UV da marca Shimadzu, modelo UV-1601 PC, em 650 nm, e as absorvâncias das suspensões bacterianas apresentaram o mesmo valor do tubo 5.

4.5.1.5 Teste de atividade antibacteriana com difusão em gel

Inicialmente foi realizada a avaliação dos controles. Em placa de Petri somente foram distribuídos os controles, sendo controle negativo disco de papel com metanol e os positivos, discos dos antimicrobianos gentamicina e cefazolina.

A escolha dos antimicrobianos utilizados como controle foi baseada na disponibilidade, e ampla utilização na terapêutica para o medicamento cefazolina e possibilidade de comparação com KUETE (2007a); que realizou análises antimicrobianas com psoraleno e bergapteno isolados de *Treculia obovoidea* (Moraceae) e utilizou gentamicina como controle.

Para a avaliação das amostras foram distribuídos setes discos de papel, impregnados com a amostra pura, diluída a 50%, 25% e 12,5%, além de um disco impregnado apenas com metanol e os discos controle com os antimicrobianos cefazolina e gentamicina.

As placas foram incubadas em estufa, a 35°C, durante 24 horas. Após esse período, foram retiradas da estufa e com auxílio de régua os halos de inibição foram medidos. O teste foi realizado em triplicata.

4.5.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Segundo este método os microrganismos são adicionados a meio de cultura líquido, contendo as amostras a serem testadas em várias concentrações. Após incubação, foi efetuada a leitura da concentração mínima que inibiu o crescimento bacteriano, ou seja, que não foi observada turvação.

4.5.2.1 Preparo do inóculo

As cepas das bactérias em teste foram repicadas em 10 mL de caldo trípico de soja e incubadas a 35°C, 24 horas antes do teste.

Após as 24 horas de incubação, os tubos contendo o caldo e os microrganismos foram comparados com a turbidez do tubo 0,5 da escala de MacFarland, por meio de espectrofotometria de UV.

Do caldo tríptico de soja contendo os microrganismos, foram retirados 2mL e transferidos para 100mL (2%) de solução estéril de Tween 80 a 2% em água destilada e posteriormente esterilizado..

4.5.2.2 Preparo das amostras

As frações FH e FC que anteriormente haviam sido levadas à secura foram ressolubilizadas em metanol, de acordo com o valor de teor de sólidos obtido para cada amostra. Estas foram adicionadas a tubos de ensaio contendo caldo tríptico de soja, nas proporções de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64.

A avaliação da CIM da amostra H6 (provável mistura psoraleno e bergapteno) foi realizada a partir de uma solução mãe de 1,0 mg/mL. O ensaio foi realizado de forma similar às frações, sendo que as concentrações de H6/inóculo 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64, correspondem a 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 e 15,625 µg/mL da amostra H6, respectivamente.

4.5.2.3 Teste da concentração inibitória mínima

Para cada fração (hexano e clorofórmio) e os compostos H6 foram preparados nove tubos para cada microorganismo (em duplicata):

1º tubo (1:1) = 1 mL da fração/composto;

2º tubo (1:2) = 1 mL da fração/composto e 1 mL de caldo tríptico de soja;

3º tubo (1:4) = 1 mL do 2º tubo e 1 mL de caldo tríptico de soja;

4º tubo (1:8) = 1 mL do 3º tubo e 1 mL de caldo tríptico de soja;

5º tubo (1:16) = 1 mL do 4º tubo e 1 mL de caldo tríptico de soja;

6º tubo (1:32) = 1 mL do 5º tubo e 1 mL de caldo tríptico de soja;

7º tubo (1:64) = 1 mL do 6º tubo e 1 mL de caldo tríptico de soja;

8º tubo = 1 mL do 7º tubo

9º tubo = 1 mL de caldo tríptico de soja

Após preparo das diluições, os tubos receberam 1 ml de suspensão de microrganismos, com exceção do 8º tubo que contém somente 1 mL do 7º tubo. O controle negativo, representado no 8º tubo elimina a possibilidade de resultados

falso positivos em virtude da turbidez da amostra. O 9º tubo foi considerado tratamento controle positivo, evidenciando o crescimento dos microorganismos, sem a influência das amostras, nas mesmas condições do ensaio.

A incubação dos tubos foi efetuada a 35°C por 24 horas.

A leitura do resultado foi realizada por comparação de cada tubo com o controle negativo, sendo considerado como CIM a menor concentração da amostra em que não houve crescimento bacteriano.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

O fenômeno da alelopatia pode ser considerado como a interação bioquímica entre as plantas. Sugere-se que biomoléculas produzidas pelas plantas influenciem no crescimento e desenvolvimento de outras (RIZVI *et al.*, 1992).

Foi realizado estudo da atividade alelopática, visando avaliar a influência das frações obtidas a partir da fração solúvel do extrato bruto etanólico de rizomas de *Dorstenia multiformis* e das substâncias isoladas, em diferentes concentrações, sobre a germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* conforme DIAS (2005).

4.6.1 Preparo das amostras

Para os ensaios alelopáticos foram utilizadas sementes de *Lactuca sativa*, fornecedor ISLA, lote 18634, pureza 98%, cultivar maravilha de inverno.

Os fatores que determinaram a escolha da espécie podem ser citados: sementes pequenas, mas com grande superfície de contato, alta sensibilidade ao meio que as rodeia e aos aleloquímicos, não requerendo nenhuma manipulação além do contato no meio, requer pouco tempo para sua germinação (24 a 48 horas) e para o crescimento e apresenta germinação uniforme (DIETZ; WINTERHALTES, 1996; FERREIRA; AQUILA, 2000; MALHEIROS; PERES, 2001). A *Lactuca sativa* não precisa de foto-período e a radícula da plântula apresenta um eixo único, o que facilita a leitura do crescimento (FERREIRA; AQUILA, 2000).

Foram preparadas soluções em concentrações decrescentes de 0,60; 0,40; 0,30; 0,20; 0,10; 0,05 e 0,025 mg em 3 mL de metanol de todas as amostras testadas. As diluições foram obtidas em duplicata, para os testes de germinação e

de crescimento, a partir de uma solução-mãe obtida com as frações secas a 50°C em banho-maria ou cristais das substâncias isoladas, diluídas em clorofórmio e metanol, conforme polaridade da fração ou substância, na concentração de 1 mg/mL. Como controle foi utilizado o solvente empregado para solubilizar cada amostra.

4.6.2 Preparo do material

As caixas Gerbox utilizadas nos testes foram previamente lavadas e higienizadas com hipoclorito de sódio 10% e posteriormente, com álcool 70°GL.

Os papéis de filtro Whatman nº. 6 foram recortados no tamanho das caixas Gerbox e embebidos com as soluções preparadas anteriormente, assim como os controles e levados à estufa a 40°C, durante 24 horas, para evaporação total do solvente.

Após 24 horas, sob fluxo laminar, os papéis de filtro secos foram acondicionados nas caixas Gerbox e umedecidos com aproximadamente 9 mL de água destilada. A água destilada foi utilizada conforme KRZYZANOWSKI; VIEIRA; NETO (1999), ou seja, de duas a três vezes o peso do papel. Foram distribuídas alinhadamente 5 sementes de *Lactuca sativa* em 4 repetições, ou seja 20 sementes por caixa Gerbox.

As caixas foram fechadas e envoltas com papel alumínio para proteção da luz separadamente (testes de germinação e de crescimento) e colocadas em germinador Mangelsdorf (Biomatic), com limites de temperatura entre 20 e 22°C.

Para análise estatística foi utilizado o programa SISVAR (FERREIRA, 2000). A verificação das diferenças das médias estatisticamente significativas foi realizada por meio do teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

4.6.3 Teste de germinação

A germinação é menos sensível aos aleloquímicos que o crescimento da plântula, porém a quantificação experimental é muito mais simples. As substâncias alelopáticas podem induzir o aparecimento de plântulas anormais, sendo a necrose da radícula um dos sintomas mais comuns. Assim, a avaliação da normalidade das plântulas é um instrumento valioso (FERREIRA; AQUILA, 2000).

Foram realizadas leituras diárias das caixas Gerbox do estudo da germinação, sempre no mesmo horário, com a abertura das mesmas sob fluxo laminar, posterior contagem e retirada das sementes germinadas. Este procedimento foi realizado até que todas as sementes tenham germinado. O critério utilizado para a germinação foi o aparecimento da curvatura geotrópica da radícula. Para ser considerada germinada, a radícula deveria ter no mínimo 50% do tamanho da semente, para evitar falsa germinação por expansão do embrião com a embebição (LABOURIAU, 1983).

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado segundo (MAGUIRE, 1962) para cada repetição de cada tratamento, utilizando-se a quantidade de sementes germinadas, dividindo-se pelo número de dias da germinação e somando-se até o último dia de germinação, conforme demonstrado na Figura 49 Os índices de velocidade de germinação também foram submetidos ao teste de Scott-Knott.

FIGURA 49 – FÓRMULA DO ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO

$$IVG = \frac{\text{n}^\circ \text{ sementes germinadas}}{1^\circ \text{ dia da germinação}} + \frac{\text{n}^\circ \text{ sementes germinadas}}{2^\circ \text{ dia da germinação}} + \frac{\text{n}^\circ \text{ sementes germinadas}}{3^\circ \text{ dia da germinação}} + \dots$$

4.6.4 Teste de crescimento

As caixas Gerbox separadas para a leitura do crescimento foram mantidas no germinador durante 7 dias. Após esse período, as plântulas de cada caixa foram retiradas e medidas; comprimento da radícula (que origina a raiz) e do hipocótilo (que origina o caule), com auxílio de papel milimetrado. Também foi realizada a verificação do desenvolvimento ou não da plúmula, constituída pela gema apical e pelos primórdios foliares.

Após medir os comprimentos da radícula e do hipocótilo, as plântulas de cada tratamento foram reunidas para verificação da massa e posterior comparação com a massa do tratamento controle.

Para comparação das médias, os resultados das leituras de crescimento foram submetidos ao teste de Scott-Knott, considerando-se o tratamento controle como 100%.

4.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina*

4.7.1 Preparo da solução salina

A água do mar artificial foi preparada adicionando 41 g de sal marinho (23 g NaCl; 11 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 4 g Na_2SO_4 ; 1,3 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ou $CaCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,7 g KCl) em 1000 mL de água purificada.

O pH foi ajustado para 9,0 com Na_2CO_3 para evitar o risco de morte das larvas por diminuição do pH durante a incubação. Segundo LEWAN *et al.* (1992), um pH superior a 6 é essencial para o desenvolvimento de *Artemia Salina*, e um pH superior a 10,5 deve ser evitado.

4.7.2 Preparo das amostras

O estudo foi realizado com as frações FH, FC e FAC, além das substâncias H6, C34 e C2. As amostras foram levadas à secura em banho-maria (40°C), foram pesados aproximadamente 20mg e foi adicionado solvente em quantidade suficiente para obter a concentração inicial da solução de 10 mg/mL.

Os solventes utilizados foram metanol para FC e FAC, metanol/clorofórmio (1:2) para H6 e C34 e clorofórmio para FH e C2, de acordo com a solubilização das amostras.

Desta solução foram transferidos 5, 50 e 500 μ L com pipeta automática para tubos de ensaio correspondendo respectivamente a 10, 100 e 1000 μ g/mL, em triplicata. O solvente foi evaporado por 12 horas (MCLAUGHLIN; CHANG; SMITH, 1991).

4.7.3 Eclosão dos ovos

Na Figura 50 demonstra-se o equipamento utilizado para eclosão dos ovos de *Artemia salina*.

FIGURA 50 – EQUIPAMENTO PARA ECLOSÃO DOS OVOS DE *Artemia salina*

FONTE: A AUTORA

Os ovos de *Artemia salina* (200 mg/400 mL) foram colocados para eclodir em água salgada por 48 horas, sob aeração contínua e expostos à luz diurna. A temperatura foi controlada entre 27 e 30°C e o pH entre 8-9. Na primeira hora do processo foi mantida iluminação (20W) sobre o recipiente (UTYAMA, 2003).

4.7.4 Avaliação da toxicidade

Após a eclosão dos ovos, foram transferidas 10 náuplios de *Artemia salina* para cada tubo de ensaio contendo as frações e para os tubos controles. Os controles negativos consistiram de tubos com o solvente solubilizador da fração, o qual foi evaporado juntamente com as amostras, além de tubos vazios. O controle positivo foi sulfato de quinidina. O volume de todos os tubos foi ajustado com água do mar artificial para 5 mL.

Foi realizada a contagem dos náuplios mortos e vivos após 24 horas, com auxílio de lupa e iluminação incandescente.

Os dados foram analisados com o método estatístico Probitos (FINNEY, 1956) e determinados os valores de LC50 e 95% de intervalos de confiança. As frações foram consideradas ativas quando LC50 foi menor que 1000 ppm (MEYER *et al.*, 1982).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES

Os controles da partição líquido-líquido do extrato etanólico bruto com solventes de polaridade crescente, o pH e o teor de sólidos (mg/mL) das frações obtidas estão demonstrados na Tabela 01.

TABELA 01 – MASSA DAS FRAÇÕES APÓS PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO, CONTROLE DE pH E TEOR DE SÓLIDOS (mg/mL)

SOLVENTE UTILIZADO	TEMPERATURA (°C)			MASSA OBTIDA (g)	pH	TEOR DE SÓLIDOS (mg/mL)
	BALÃO	PORÇÃO SUPERIOR DO SOXHLET	PORÇÃO INFERIOR DO SOXHLET			
Hexano	52	49	39	25,22	6,0	37,5
Clorofórmio	36	34	27	18,30	6,0	45,2
Acetato de Etila	69	66	45	7,16	6,0	12,8

As diferenças de temperaturas são atribuídas aos pontos de ebulição dos solventes. A determinação do pH foi realizada em função da realização posterior dos ensaios biológicos, onde valores extremos de pH poderiam interferir nos resultados. Os valores obtidos de teor de sólidos foram empregados para os cálculos na determinação da atividade antimicrobiana.

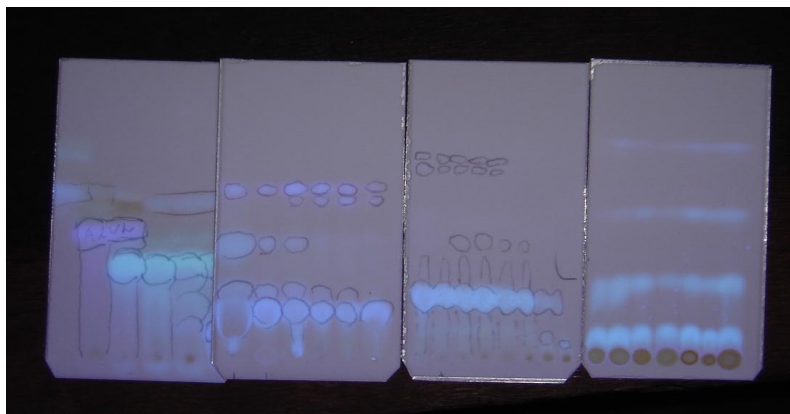
5.2 ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS

Após secagem, cada fração foi submetida à cromatografia em coluna, tendo como fase estacionária sílica-gel 60 e fase móvel hexano, acetato de etila e metanol, sob gradiente de polaridade conforme item 4.3.2.3. Foram coletados 197 frascos da FH, 298 da FC e 241 da FAC.

As subfrações que apresentaram perfil cromatográfico semelhante na CCD foram reunidas, com objetivo de obter maior massa de amostra, com maior probabilidade de precipitação na forma de cristais. Na Figura 51 encontra-se um exemplo de CCD para controle da CC da FAC onde foram aplicados os frascos 50

até 200, com intervalos de 5 em 5 frascos. A fase móvel empregada foi tolueno:acetato de etila:ácido fórmico 60:40:3 e a visualização da placa foi realizada sob luz ultravioleta em ondas curtas (254 nm) e longas (365 nm).

FIGURA 51 – CCD DE FAC FRASCOS Nº50 A Nº200, EM INTERVALOS DE 5. FASE MÓVEL TOLUENO:ACETATO DE ETILA:ÁCIDO FÓRMICO 60:40:3, SOB LUZ UV (365 nm)



FONTE: MIGUEL, 2006

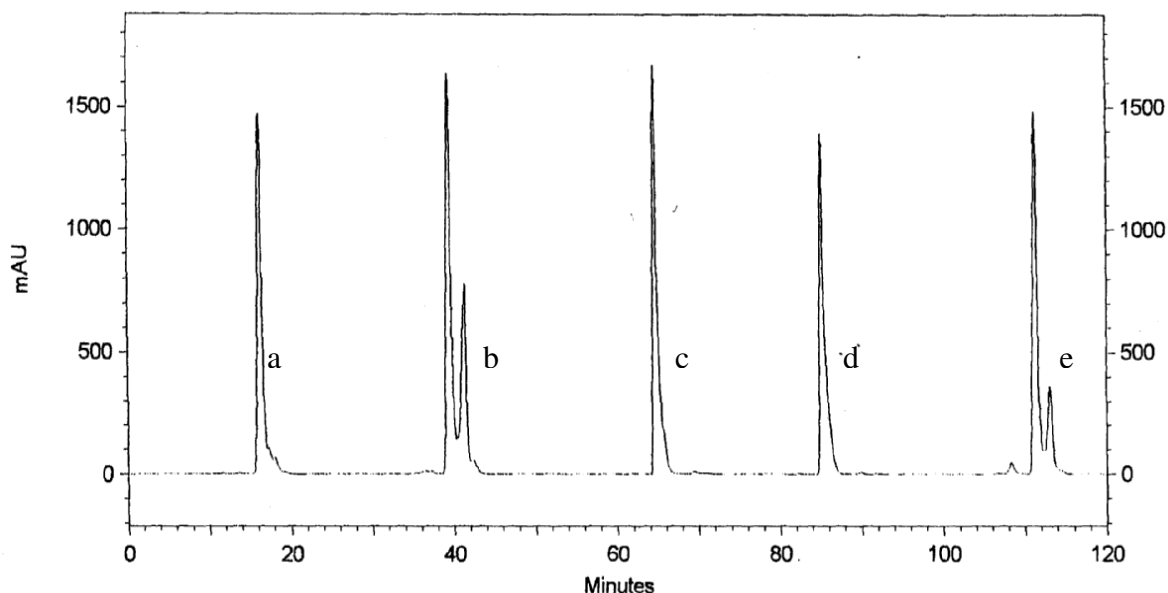
TABELA 02 – QUANTIDADE DE SUBSTÂNCIAS OBTIDAS APÓS A CROMATOGRAFIA EM COLUNA DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO EXTRATO ETANÓLICO

FRAÇÃO	CRISTAIS	MASSA (mg)
Hexano	H1	23,8
	H5	35,2
	H6	68,4
	H7	76,3
	H8	21,8
	H9	136,8
	H10	154,4
	H11	188,3
	H12	34,7
	H13	88,8
	H30	13,9
	H100-110	4,9
	H131-140	9,9
Clorofórmio	C2	25,2
	C20-23	20,0
	C29	177,5
	C30-33	43,2
	C34	60,1
	C38-40	34,2
	C43	153,2
	C47	245,8
Acetato de etila	AC68	3,2
	AC108	18,1
	AC160	30,2

Após a realização das CCDs as frações que apresentaram perfil semelhante foram reunidas e o solvente evaporado, as quantidades de substâncias obtidas estão listadas, cujos dados encontram-se na Tabela 02. Por outro lado, as frações sem importância fitoquímica foram descartadas.

A avaliação do perfil das amostras na CCD e CLAE auxiliou na escolha dos cristais para a identificação, além da disponibilidade de material para realização das técnicas de identificação. Como ilustração, na Figura 52 demonstra-se o perfil cromatográfico dos cristais H30, H6, H11, C34 e AC108.

FIGURA 52 – PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE DOS CRISTAIS H30 (a), H6(b), H11(c), C34(d) e AC108(e), COLUNA RP 18, FASE MÓVEL METANOL:ÁGUA (90:10), 1mL/min



5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS

5.3.1 Amostra H6

O perfil da amostra H6 na CLAE indicou a presença de dois picos. Na Figura 53 demonstra-se o cromatograma por CG, também com a visualização de dois picos e a espectrometria de massa referente aos picos está demonstrada na Figura 54.

FIGURA 53 – PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CG DE H6, COLUNA HP-5MS, 30 m x 250 μ m, 1mL/min

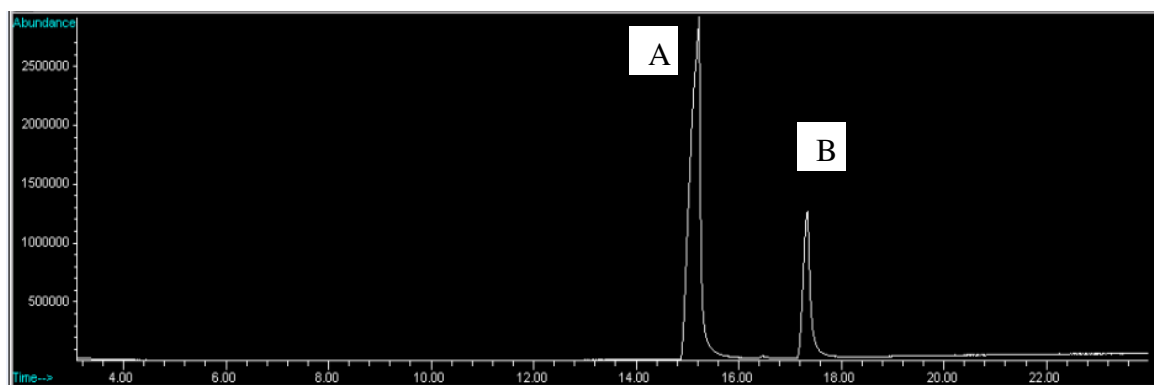
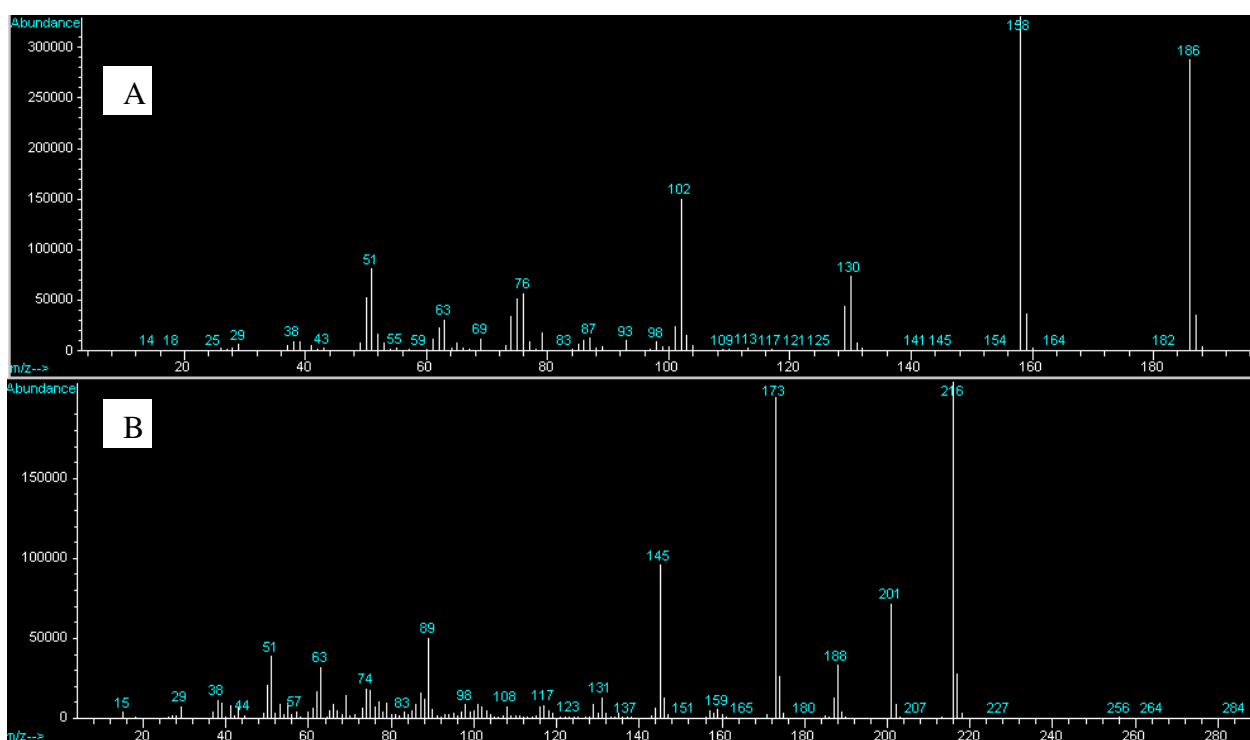


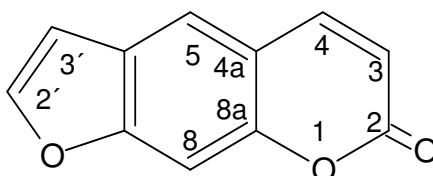
FIGURA 54 – ESPECTROSCÓPIA DE MASSA DE H6



Em relação ao pico A, conforme pesquisa na biblioteca Nist 98, o composto analisado apresenta 95% de semelhança com 7H-Furo [2,3,g]-1-benzopiran-7-ona, ou seja psoraleno, demonstrado na Figura 55. O mecanismo de fragmentação do psoraleno consiste em perdas sucessivas de carbonilas, originando respectivamente os fragmentos $m/e = 158$ (100%), $m/e = 130$ (20%), $m/e = 102$ (45%). A perda do radical etila a partir do fragmento $m/e = 102$ origina o fragmento $m/e = 76$, e a partir

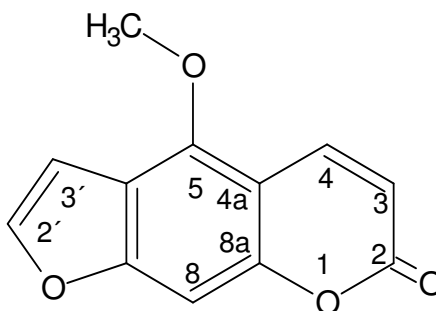
deste origina $m/e = 51$ (30%). A fragmentação apresentada foi descrita por KUSTER *et al.* (1994) na espécie *Dorstenia brasiliensis*.

FIGURA 55 – ESTRUTURA QUÍMICA DO PSORALENO



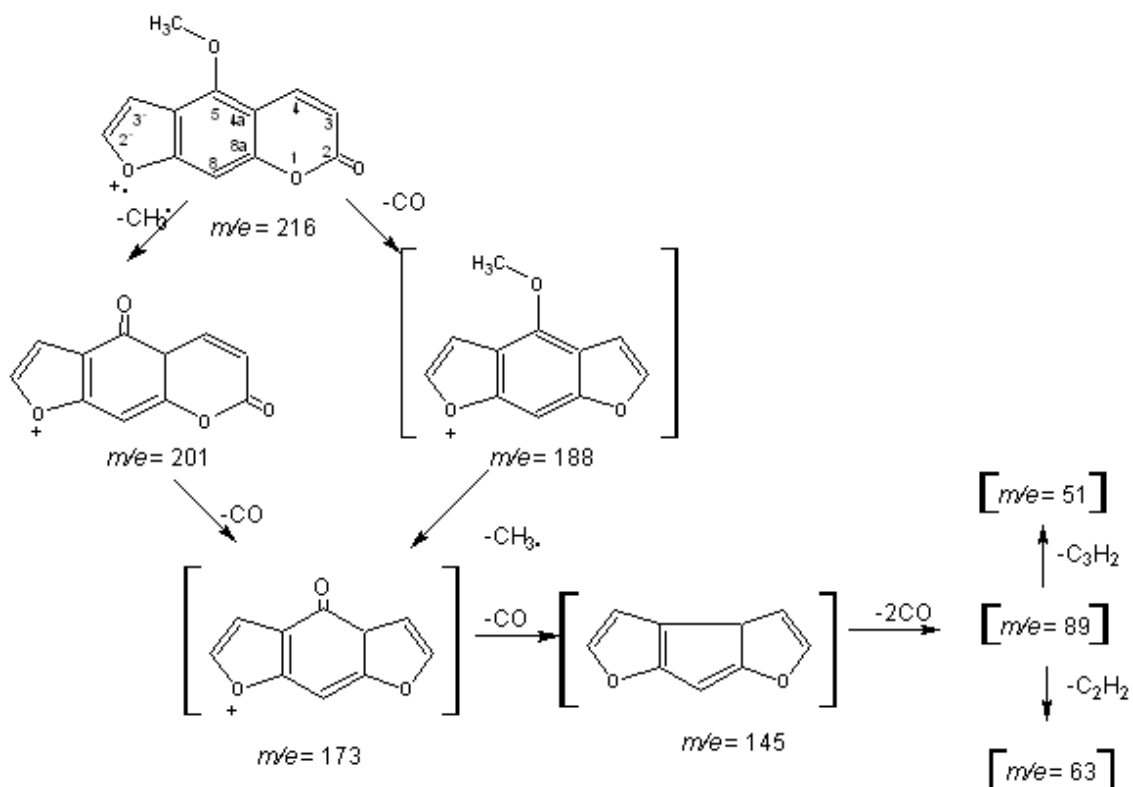
Conforme a biblioteca Nist 98, o pico b apresentou 94% de semelhança com 7H-Furo [2,3-g] [1] benzopiran-7-ona, 4-metoxila, também conhecido como bergapteno, cuja estrutura química está demonstrada na Figura 56.

FIGURA 56 – ESTRUTURA QUÍMICA DO BERGAPTENO



Os fragmentos encontrados na amostra H6 também foram comparáveis ao que foi descrito por KUSTER *et al.* (1994). O mecanismo de fragmentação do bergapteno está representado na Figura 57.

FIGURA 57 – MECANISMO DE FRAGMENTAÇÃO DO BERGAPTENO

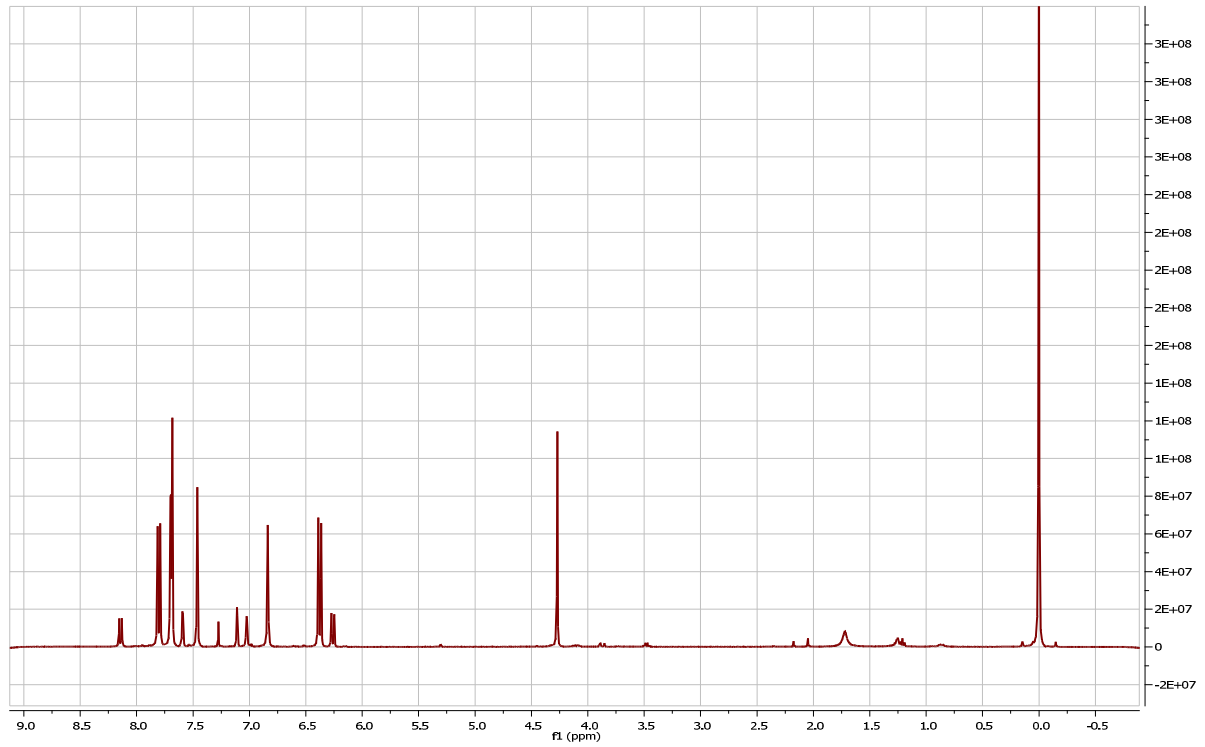
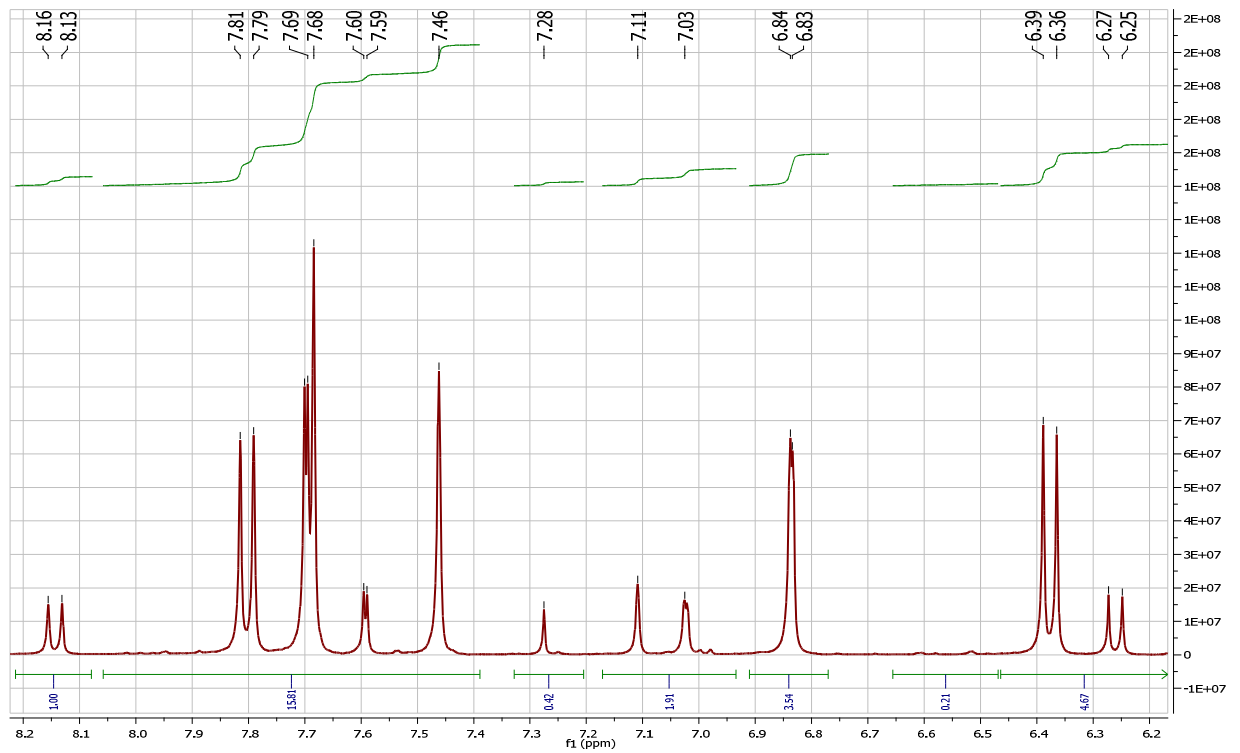


Fonte: TANG *et al.*, 1979

A análise por CG-EM do resíduo do extrato bruto etanólico por BALESTRIN (2006) também indicou a presença de psoraleno e bergapteno.

Os espectros de RMN da amostra H6 também indicaram a presença da mistura psoraleno e bergapteno. Na Figura 58 demonstra-se o espectro de ^1H da amostra H6. Como pode ser observado, o espectro mostra sinais na região de 7,0 a 7,8 ppm indicando características de anel aromático. O sinal apresentado em 4,27 ppm indica a presença da metoxila, encontrado na estrutura do bergapteno.

O espectro expandido de próton entre 6,2 e 8,2 ppm está ilustrado na Figura 59. Os hidrogênios ligados aos carbonos C3, C4, C2' e C3' são visualizados respectivamente pelos sinais de dupletes em 6,37, 7,80, 7,70 e 6,84 ppm para o psoraleno e 6,26, 8,15, 7,60 e 7,03 ppm para o bergapteno. Os singletes em 7,68 e 7,46 ppm indicam os hidrogênios de C5 e C8 do psoraleno. O sinal em 7,11 ppm refere-se ao C8 do psoraleno.

FIGURA 58 - ESPECTRO DE RMN ^1H (400MHz em CDCl_3) DA AMOSTRA H6FIGURA 59 - ESPECTRO EXPANDIDO ENTRE 6.2 ppm e 8.2 ppm DE RMN ^1H (400MHz em CDCl_3) DA AMOSTRAS H6

Na Tabela 03 estão apresentados os valores de ^1H obtidos na análise de RMN da amostra H6. Os valores obtidos indicam a mistura de furanocumarinas psoraleno e bergapteno, uma vez que são similares aos encontrados por KUSTER *et al.*(1994) na espécie *Dorstenia brasiliensis*, cujos valores de ^1H estão listados na coluna a e por MASUDA, *et al.* (1998) em *Glehnia littorali*, com valores de ^1H na coluna b.

TABELA 03 – DESLOCAMENTOS, EM ppm, DE RMN de ^1H PARA AS SUBSTÂNCIAS PSORALENO E BERGAPTENO, ISOLADAS DA AMOSTRA H6

CARBONO	PSORALENO			BERGAPTENO		
	^1H	a	b	^1H	a	b
1						
2						
3	d, 6.37	6.34	6.38	d, 6,26	6.75	6.26
4	d, 7.80	7.78	7.80	d, 8.15	8.06	8.15
4 ^a						
5	s, 7.68	7.64	7.68			
6						
7						
8	s, 7.46	7.47	7.46	s, 7.11	7.16	7.12
8 ^a						
2'	d, 7.70	7.65	7.70	d, 7.60	7.50	7.59
3'	d, 6.84	6.84	6.83	d, 7.03	6.92	7.02
OCH ₃				s, 4.27	4.17	4.27

a = KUSTER *et al.* (1994)
b = MASUDA, *et al.* (1998)

Os espectros de RMN ^{13}C (100 MHz em CDCl_3) da amostra H6 estão ilustrados nas Figura 60 e 61(expandido). O sinal que caracteriza o carbono da metoxila, presente no bergapteno pode ser observado em 60.08 ppm.

FIGURA 60 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C (100 MHz EM CDCl_3) DA AMOSTRA H6

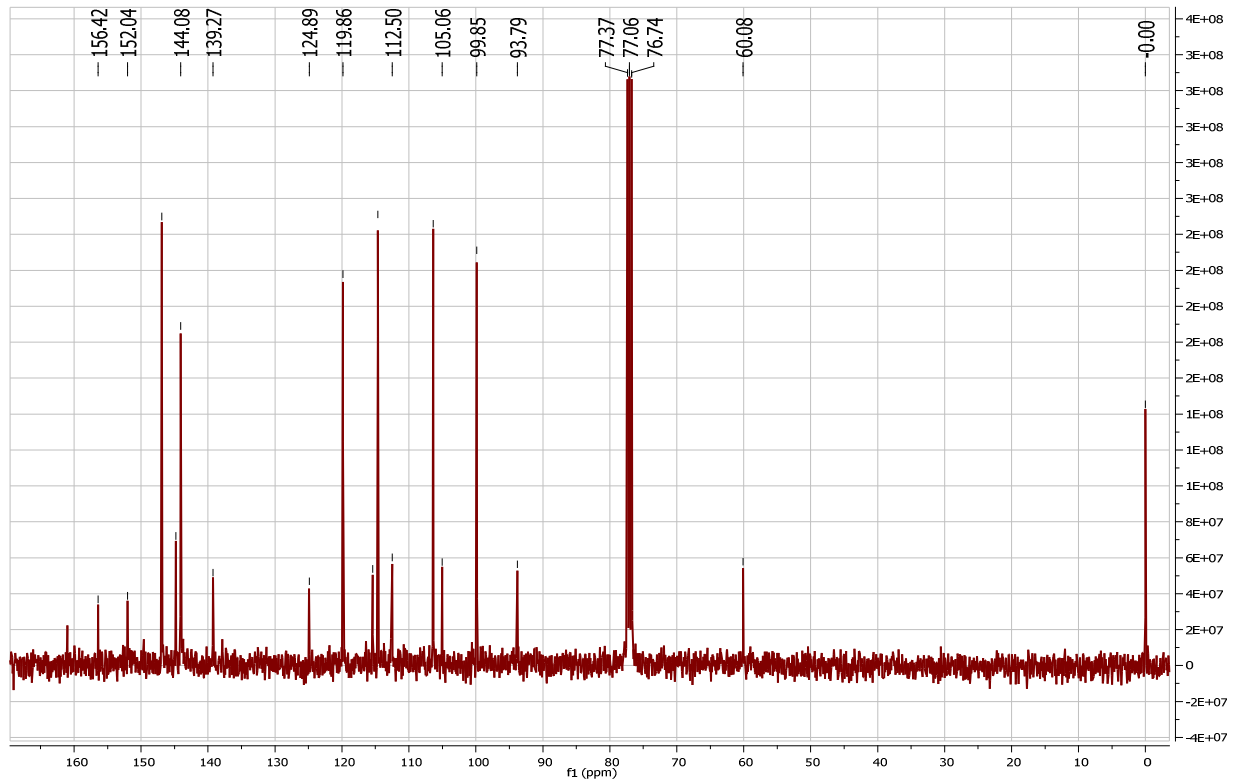
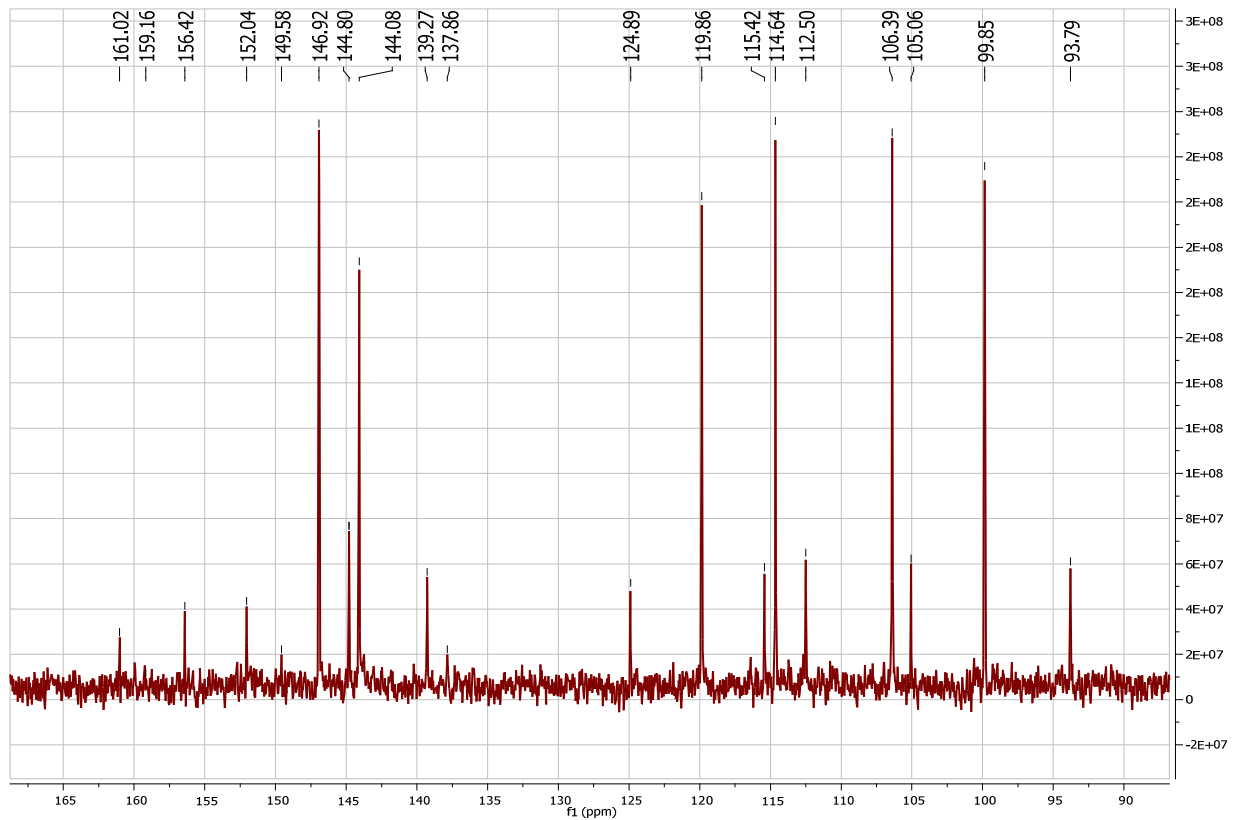


FIGURA 61 - ESPECTRO EXPANDIDO ENTRE 90 E 165 ppm DE RMN ^{13}C (100 MHz EM CDCl_3) DA AMOSTRA H6



Na Tabela 04 estão apresentados os valores de ^{13}C obtidos na análise de RMN da amostra H6 e os encontrados por BALESTRIN (2006) ao estudar o resíduo do extrato etanólico bruto. Pode-se observar que existe grande semelhança entre os valores.

TABELA 04 – DESLOCAMENTOS, EM ppm, DE RMN ^{13}C PARA AS SUBSTÂNCIAS PSORALENO E BERGAPTENO, ISOLADAS DA AMOSTRA H6

CARBONO	^{13}C	PSORALENO (a)	^{13}C	BERGAPTENO (a)
1				
2	161.02	160.86	161.02	160.86
3	114.64	112.18	114.64	112.18
4	139.27	139.15	139.27	139.15
4 ^a	112.50	112.18	112.50	112.18
5	144.08	144.62	149.58	144.62
6	106.39	104.90	105.06	104.90
7	156.42	156.19	156.42	156.19
8	99.85	93.46	93.79	93.46
8 ^a	152.04	151.79	152.04	151.79
2'	144.80	143.90	144.80	143.90
3'	105.06	104.90	105.06	104.90
OCH ₃			60.08	59.88

a = BALESTRIN (2006)

5.3.2 Amostra H1

O espectro de RMN ^1H da amostra H1 está apresentado na Figura 62. Os sinais representados no espectro são característicos da classe dos terpenos, com a presença de vários simpletos na região mais blindada entre 0.80 ppm e 1.25 ppm, característicos de grupos metila. O espectro expandido está demonstrado na Figura 63. Os sinais visualizados entre 0.80 ppm e 1.30 ppm referem-se aos prótons metílicos dos carbonos 23 a 30.

O espectro de RMN ^{13}C da amostra H1 está demonstrado na Figura 64. Como pode ser observado, os sinais indicam a presença um esqueleto carbônico bastante extenso, sugerindo a presença de terpenos. O espectro expandido de RMN ^{13}C está demonstrado na Figura 65.

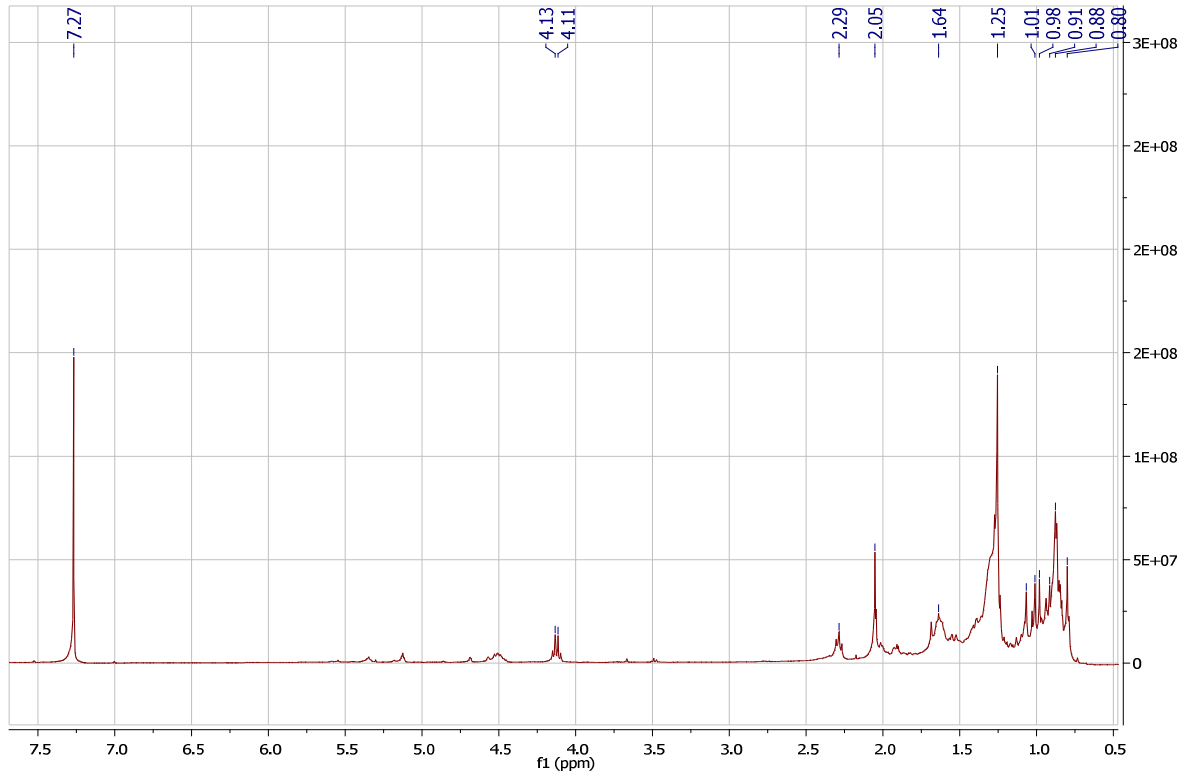
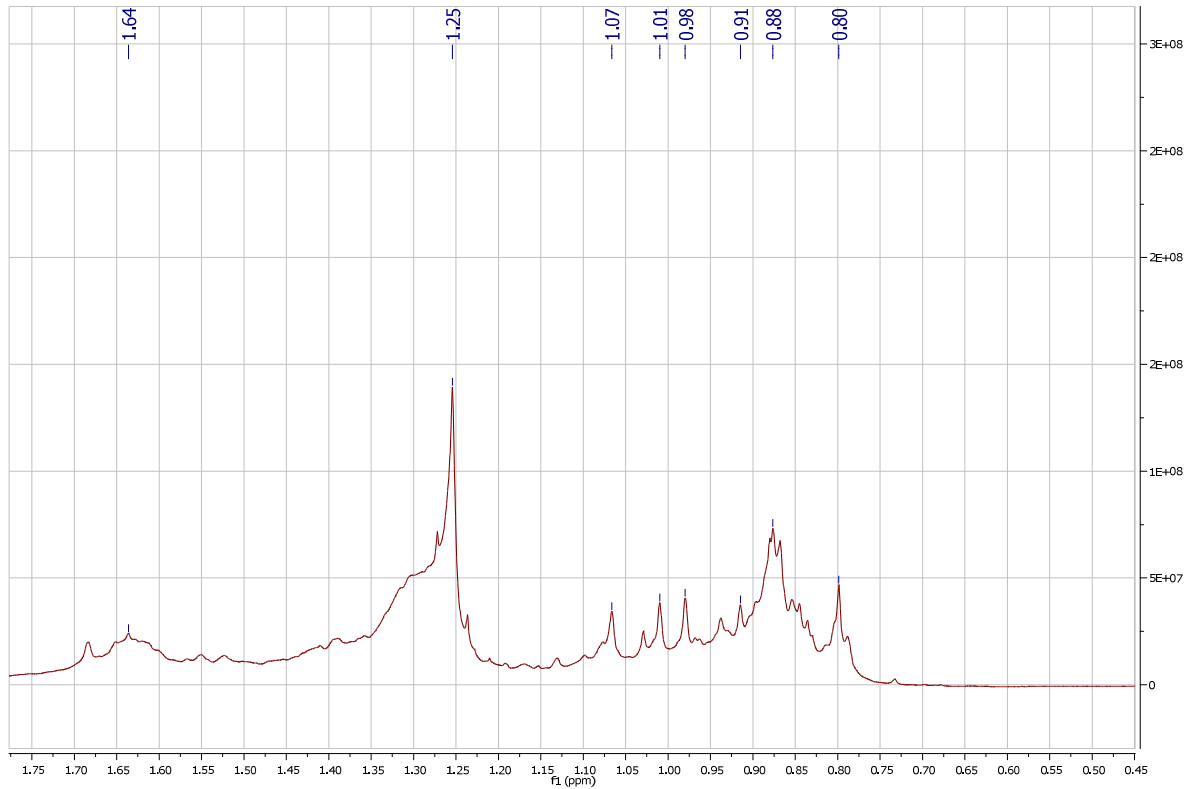
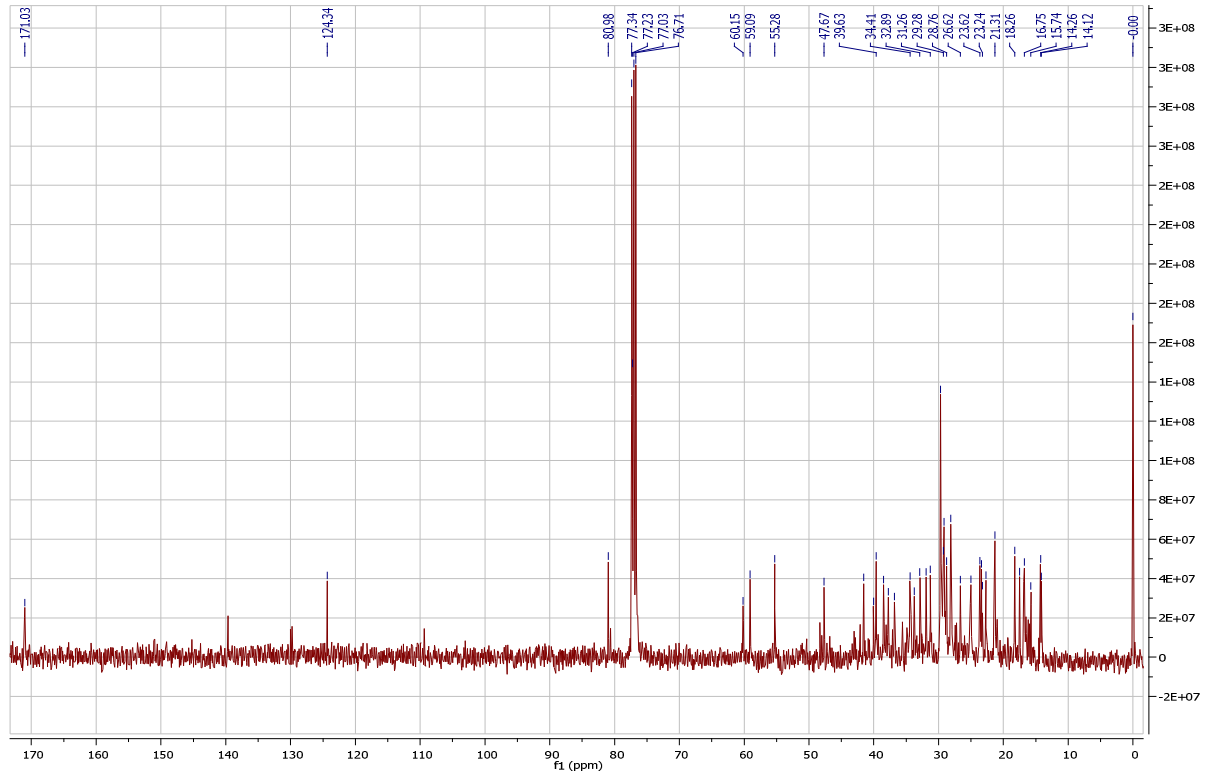
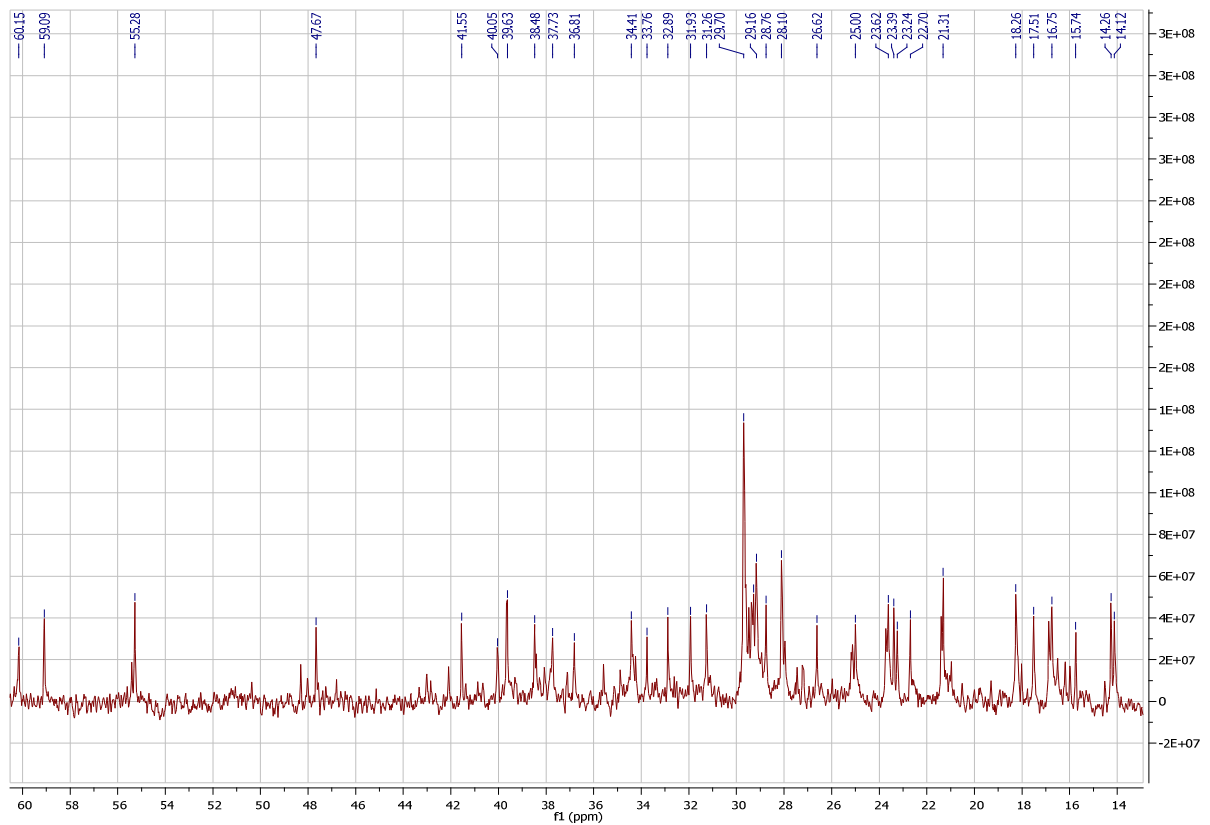
FIGURA 62 - ESPECTRO DE RMN ^1H (400MHz em CDCl_3) DE H1FIGURA 63 - ESPECTRO EXPANDIDO ENTRE 0.6 ppm E 1.75 ppm DE RMN ^1H (400 MHz EM CDCl_3) DA AMOSTRA H1

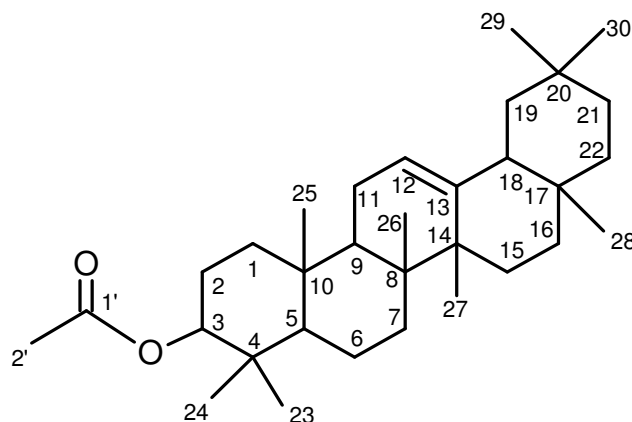
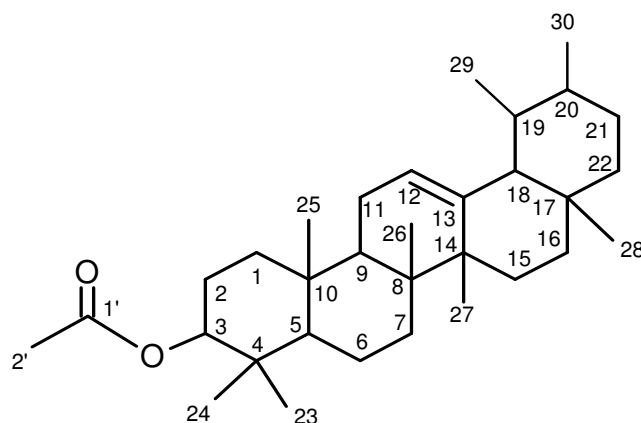
FIGURA 64 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C (100 MHz EM CDCl_3) DE H1FIGURA 65 – ESPECTRO EXPANDIDO DE 14 ppm A 60 ppm RMN ^{13}C (100 MHz EM CDCl_3) DE H1

Os valores visualizados na Figura 64 estão listados na Tabela 05, sendo comparados com os resultados de LIMA *et al.*, 2004 para os triterpenos 3 α -O-acetato de α amirina e 3 β -O-acetato de β amirina, cujas estruturas estão ilustradas nas figuras 66 e 67 respectivamente.

TABELA 05 – DESLOCAMENTOS, EM ppm, DE RMN ^{13}C e ^1H PARA A AMOSTRA H1

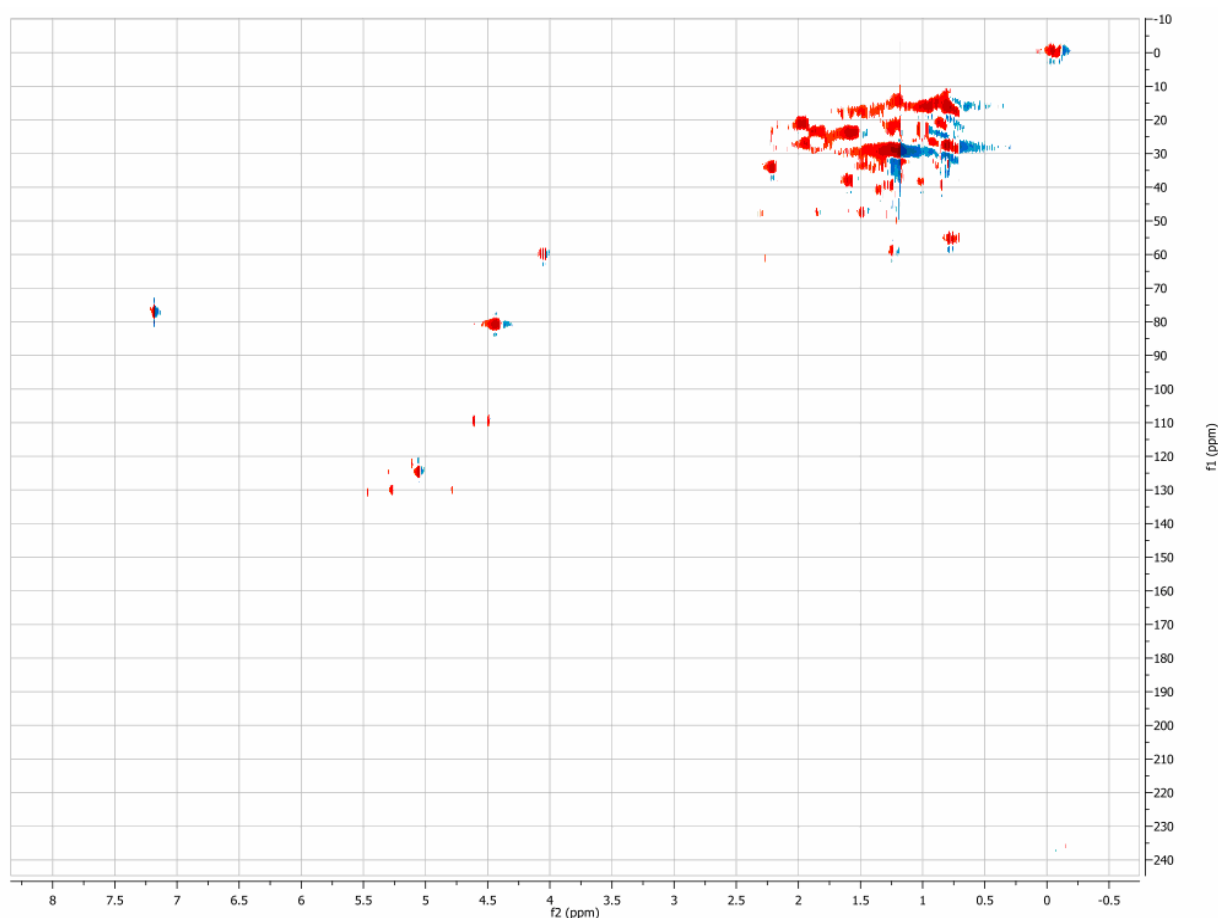
C	AMOSTRA H1		(ACETATO DE α -AMIRINA) (a)	AMOSTRA H1		(ACETATO DE β -AMIRINA) (a)
	^{13}C	^1H		^{13}C	^1H	
1	38.48		38.70	38.48		38.70
2	27.19		27.20	27.44		27.30
3	80.61	4.49(dd,H)	78.30	79.30	4.49 (dd,H)	79.00
4	38.04		38.70	38.25		38.80
5	55.28		55.20	55.38		55.30
6	18.26		18.30	18.26		18.50
7	32.89		32.90	32.79		32.80
8	40.05		40.00	38.48		38.80
9	47.67		47.70	47.67		47.70
10	36.81		36.90	37.73		37.60
11	23.39		23.30	23.62		23.60
12	124.34	5.13 (dd,H)	124.30	121.63	5.13 (dd,H)	121.80
13	139.63		139.30	145.23		145.10
14	42.05		42.00	42.05		41.80
15	28.76		28.70	26.44		26.20
16	26.62		26.60	27.40		27.00
17	33.76		33.70	32.50		32.50
18	59.09		58.90	47.40		47.40
19	39.63		39.60	46.80		46.90
20	39.63		39.60	31.09		31.10
21	31.26		31.20	34.87		34.80
22	41.55		41.50	37.10		37.20
23	27.96	1.01 (d, CH ₃)	28.10	28.10	1.01 (d, CH ₃)	28.20
24	15.74	1.13 (d, CH ₃)	15.60	15.74	1.13 (d, CH ₃)	15.50
25	15.74	0.91 (s, CH ₃)	15.60	15.98	0.91 (s, CH ₃)	15.60
26	16.75	1.07 (s, CH ₃)	16.80	16.87	0.91 (s, CH ₃)	15.60
27	23.39	1.25 (s, CH ₃)	23.30	25.96	0.91 (s, CH ₃)	26.00
28	28.10	0.80 (s, CH ₃)	28.10	28.40	0.91 (s, CH ₃)	28.40
29	17.51	0.98 (s, CH ₃)	17.40	33.35	0.91 (d, CH ₃)	33.30
30	21.31	0.80 (s, CH ₃)	21.30	23.71	0.91 (d, CH ₃)	23.70
1'	171.03		170.99	171.03		170.99
2'	21.40	2.05 (s, H ₃ CCO)	21.39	21.40	2.05 (s, H ₃ CCO)	21.39

a = LIMA *et al.*, 2004

FIGURA 66 – ESTRUTURA QUÍMICA DO 3 α -O-ACETATO DE α AMIRINAFIGURA 67 – ESTRUTURA QUÍMICA DO 3 β -O-ACETATO DE β AMIRINA

Os triterpenos identificados na amostra H1 foram também detectados em outras espécies brasileiras do gênero *Dorstenia* por VILEGAS *et al.* (1997).

A presença de um esqueleto pentacíclico derivado do ursano e lanostano pode ser relatada, com a presença da ligação dupla entre os carbonos 12 e 13, que pode ser visualizada por RMN bidimensional HMQC, representado na Figura 68. Pode-se observar que o sinal do próton em 5.13 ppm, correlacionando com os sinais do carbono 124.34 ppm e 121.63 ppm evidencia a ligação carbono-hidrogênio do C12. A ausência do sinal do próton no espectro em 139.63 e 145.23 ppm confirma a trissubstituição do carbono 13. O sinal do próton carbinólico em 4.49 ppm que está correlacionado com o CH em 80.61 e 79.30 ppm sugere a presença do 3 β -acetato.

FIGURA 68 – MAPA DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAL ^1H - ^{13}C (HMQC) DA AMOSTRA H1

5.3.3 Amostra H5

A identificação desta amostra foi realizada baseada nos dados espectrais e comparação com a literatura, sendo identificada a substância β -sitosterol. O espectro RMN de ^1H (400 MHz em CDCl_3) da amostra H5 está demonstrado na Figura 69, com área de intensa absorção entre 0,5 e 1,4 ppm, sugerindo um esqueleto esteroidal. Os singletes, em 0,68 ppm e 0,93 ppm referem-se aos prótons dos grupos metila dos carbonos 18 e 19, respectivamente. Por outro lado, os grupamentos metila dos carbonos 26, 27, 21 e 29 estão representados pelos sinais 0,85, 0,91, 1,01 e 0,86 ppm, respectivamente. O multiplete centrado em 3,52 ppm, refere-se ao próton do carbono 3.

Os espectros de RMN ^{13}C da amostra H5 estão ilustrados nas Figuras 70 e 71 (expandido). O espectro da amostra H5 também sugere uma estrutura com um esqueleto carbônico bastante extenso, mas com características diferentes da amostra H1.

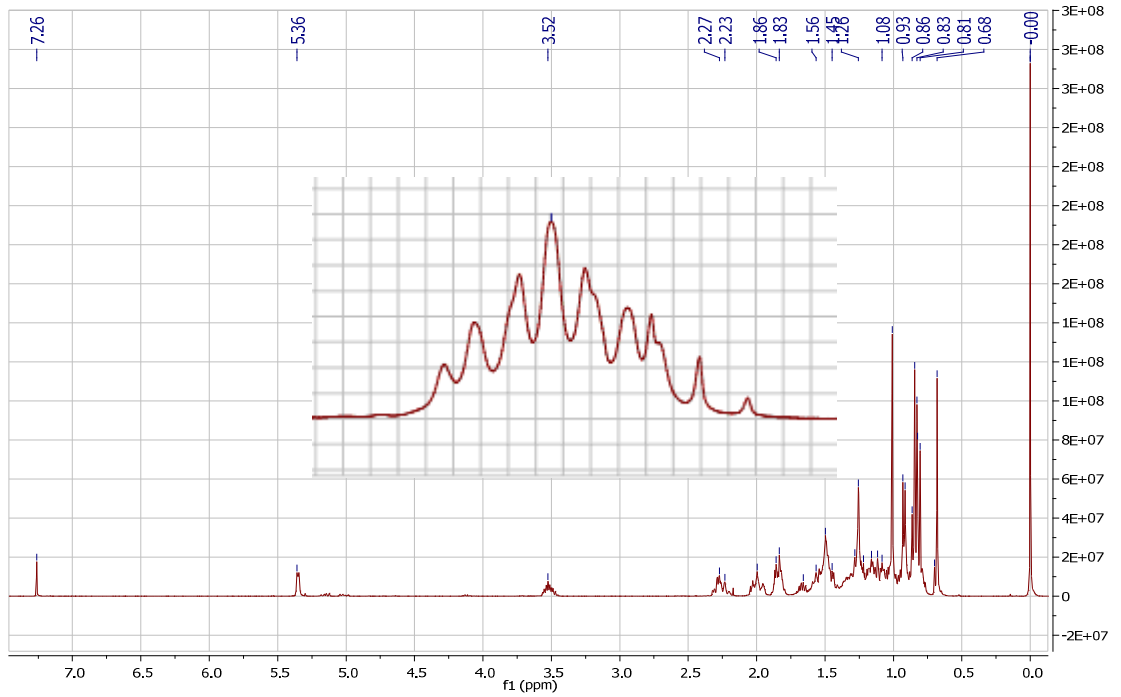
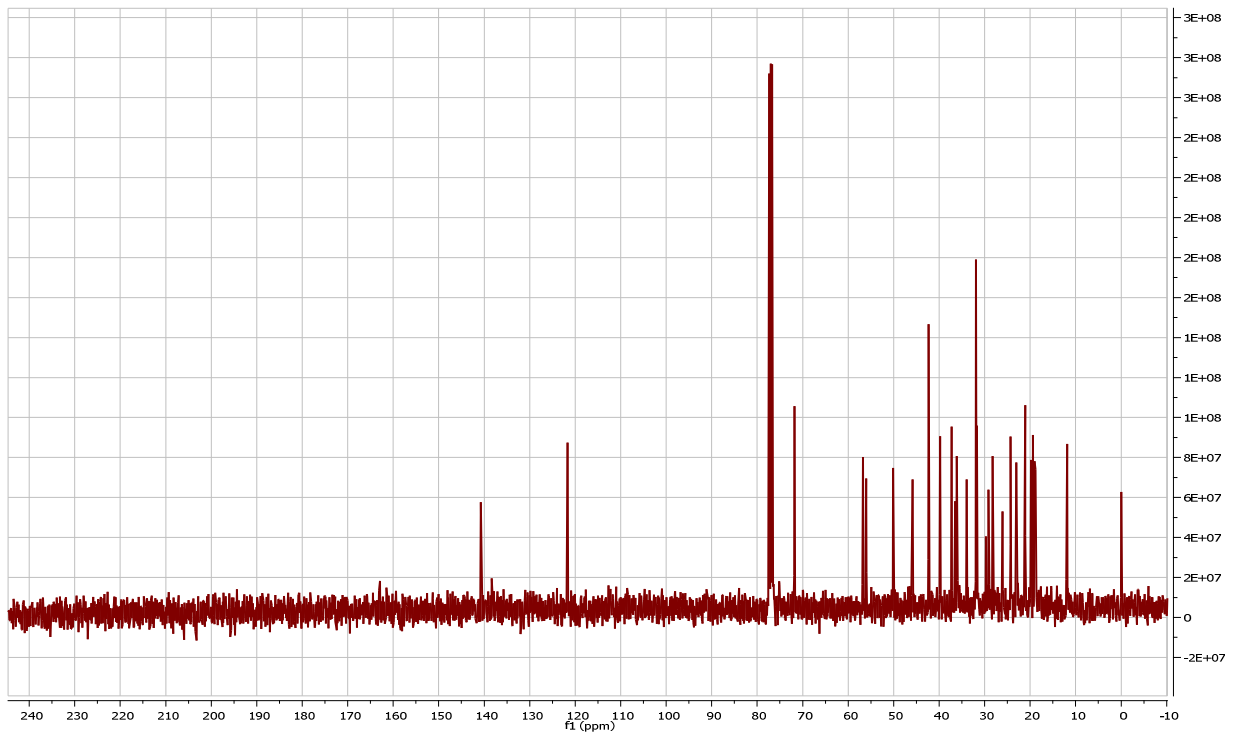
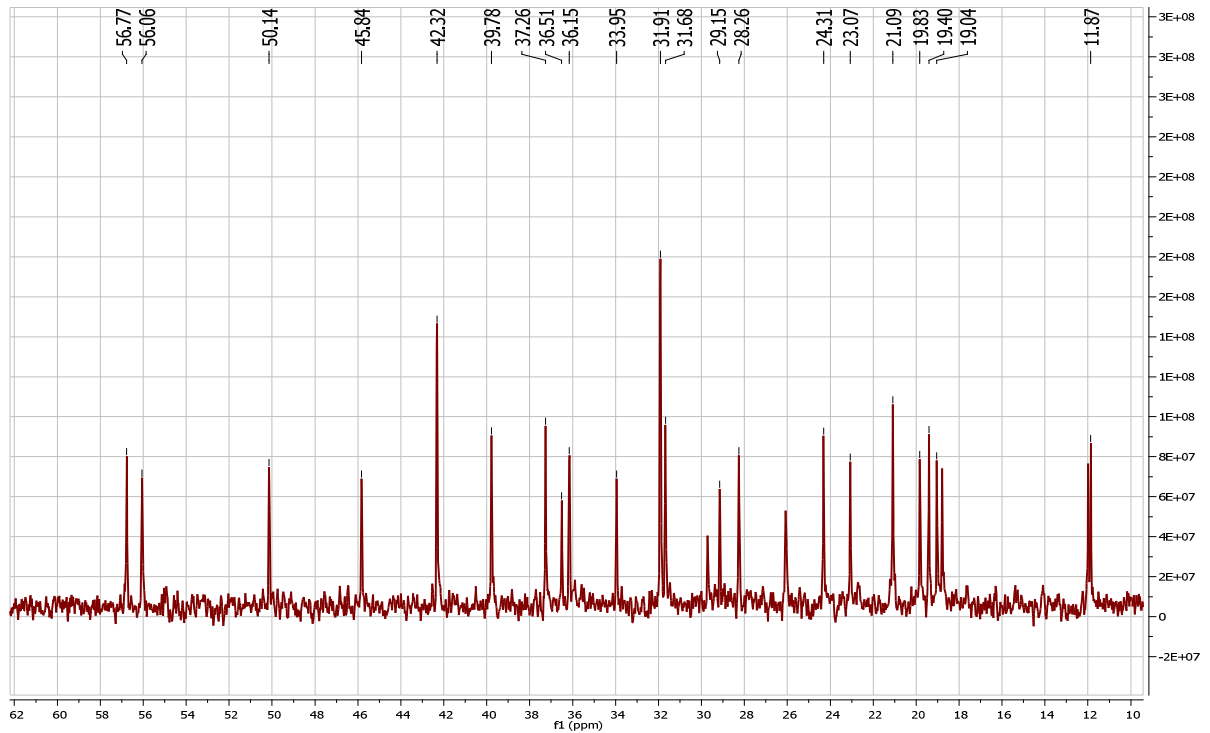
FIGURA 69 – ESPECTRO DE RMN ^1H (400MHz em CDCl_3) DE H5FIGURA 70 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C (100 MHz EM CDCl_3) DA AMOSTRA H5

FIGURA 71 - ESPECTRO EXPANDIDO ENTRE 10 ppm E 62 ppm DE RMN ^{13}C (100 MHz EM CDCl_3) DA AMOSTRA H5



Os deslocamentos encontrados para ^{13}C estão demonstrados na Tabela 06. Os valores obtidos são similares aos encontrados por DE-EKNAMKUL E POTDUANG (2003), na espécie *Croton sublyratus*, representado pela letra a, para a substância β -sitosterol, (Figura 72).

FIGURA 72 – ESTRUTURA QUÍMICA DO β -SITOSTEROL

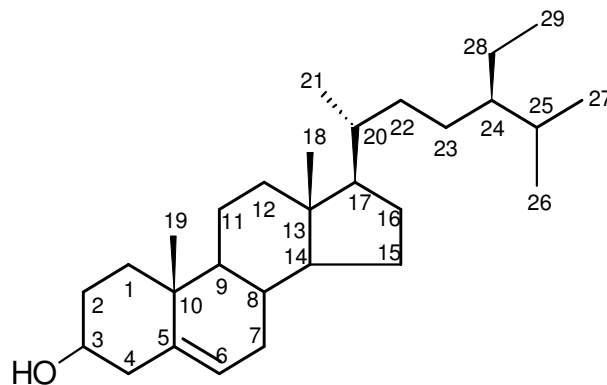
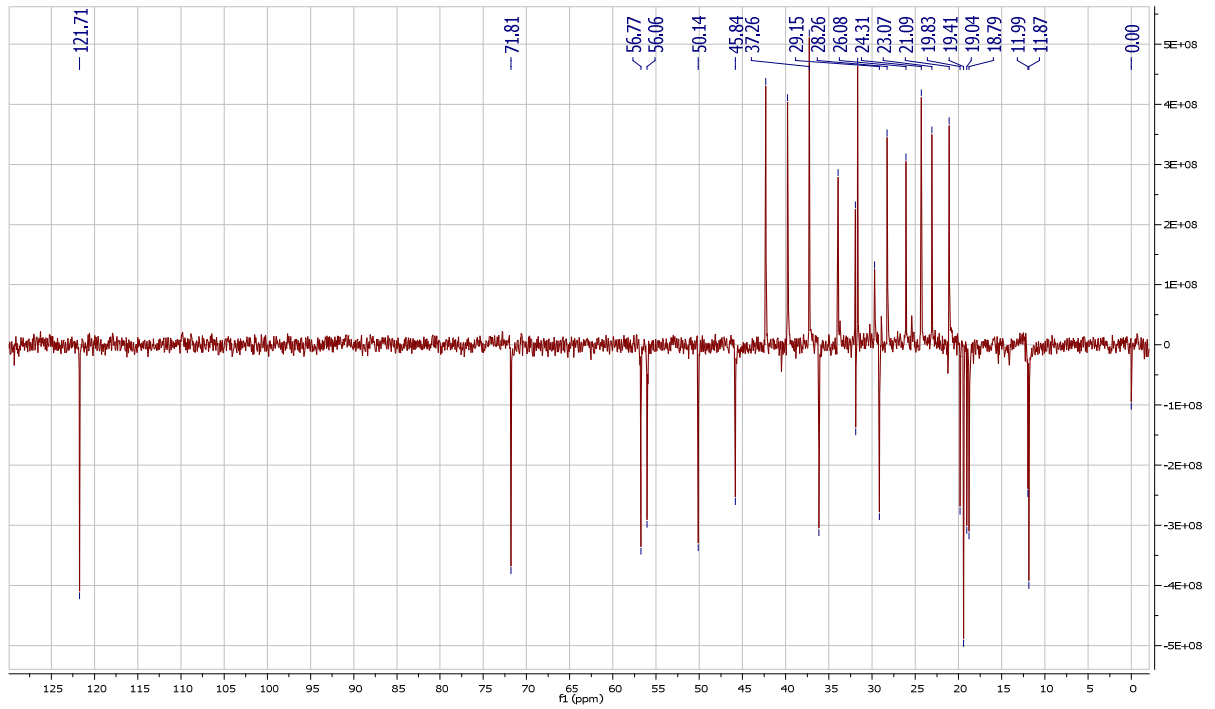
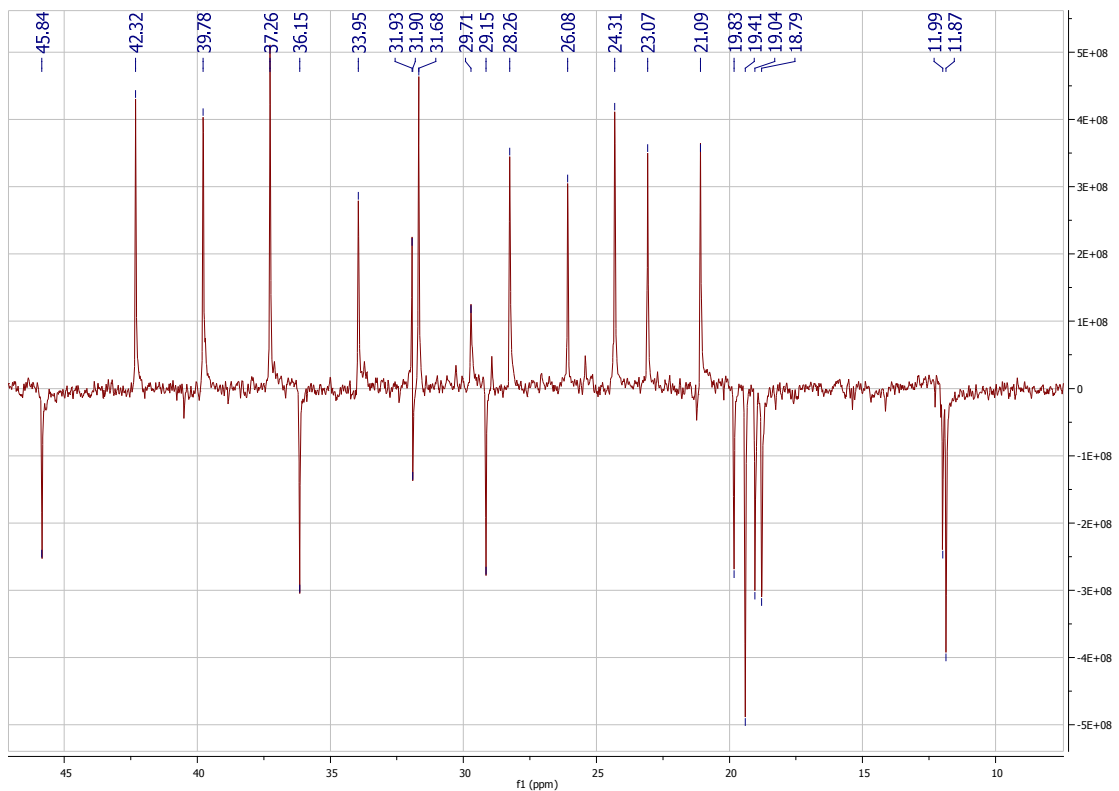


TABELA 06 – DESLOCAMENTOS, EM ppm, DE RMN ^{13}C DE H5

C	TIPO	AMOSTRA H5	β -SITOSTEROL (a)
1	CH ₂	37.26	37.22
2	CH ₂	31.68	31.63
3	CH	71.81	71.80
4	CH ₂	42.21	42.19
5	C	140.75	140.72
6	CH	121.71	121.71
7	CH ₂	31.92	31.87
8	CH	31.92	31.87
9	CH	50.14	50.10
10	C	36.51	36.48
11	CH ₂	21.09	21.07
12	CH ₂	39.78	39.74
13	C	42.32	42.26
14	CH	56.78	56.73
15	CH ₂	24.31	24.29
16	CH ₂	28.26	28.22
17	CH	56.06	56.02
18	CH ₃	11.87	11.84
19	CH ₃	19.40	19.39
20	CH	36.15	36.12
21	CH ₃	18.79	18.76
22	CH ₂	33.95	33.91
23	CH ₂	26.08	26.02
24	CH	45.84	45.81
25	CH	29.15	29.11
26	CH ₃	19.83	19.80
27	CH ₃	19.04	19.01
28	CH ₂	23.07	23.04
29	CH ₃	11.99	11.97

a = DE-EKNAMKUL E POTDUANG (2003)

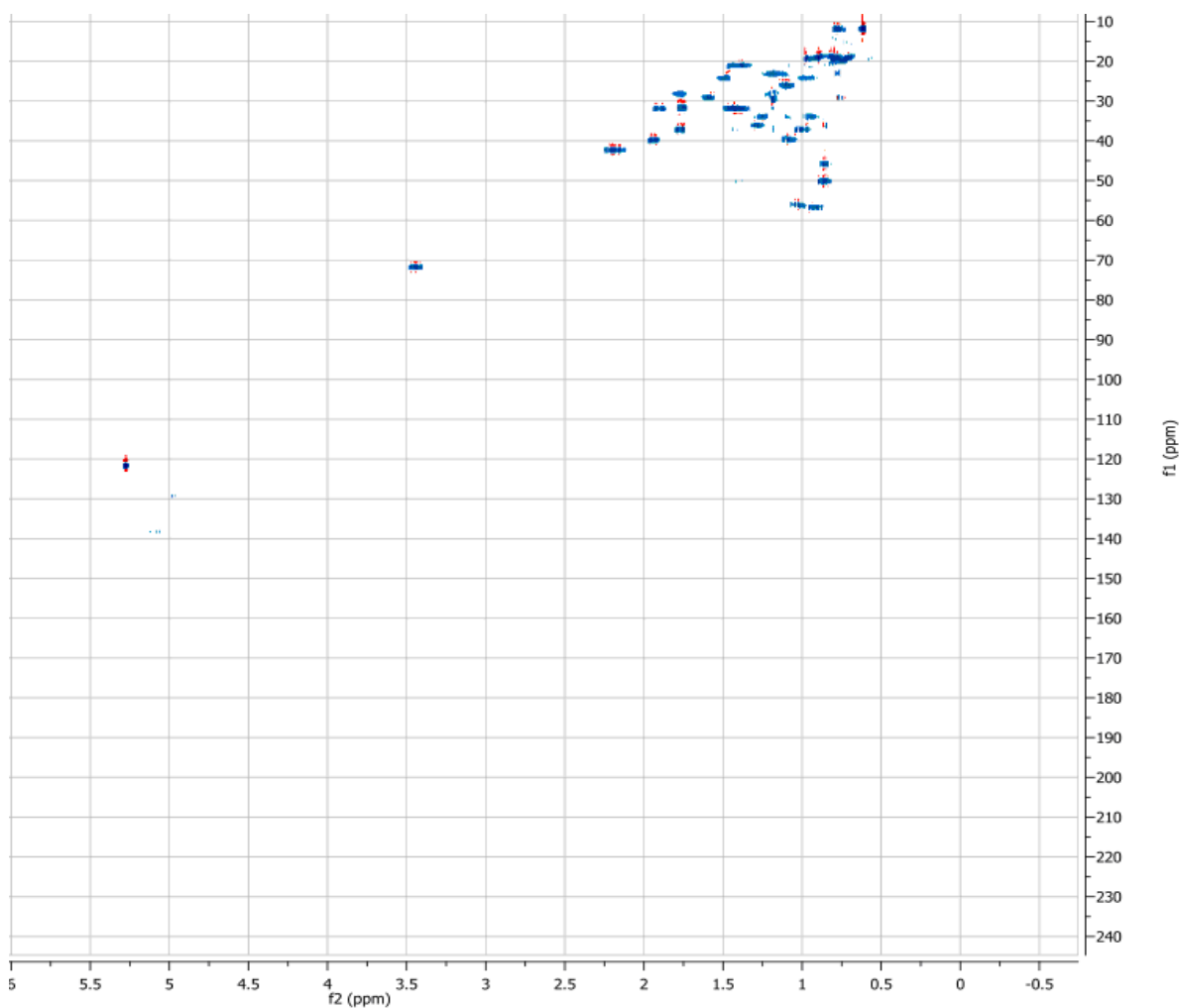
Através do espectro RMN ^{13}C /DEPT é possível evidenciar a ligação dos carbonos presentes na molécula. Nas Figuras 73 e 74 (expandido) pode-se visualizar os carbonos C-H, na porção inferior do espectro. Os sinais em 29.11, 36.15, 56.06, 56.78, 50.14, 31.92, 121.71 e 71.81 ppm indicam respectivamente os carbonos C25, C20, C17, C14, C9, C8, C6 e C3.

FIGURA 73 – ESPECTRO DE RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (CDCl_3) PARA A AMOSTRA H5FIGURA 74 – ESPECTRO EXPANDIDO ENTRE 10 ppm E 46 ppm DE RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (CDCl_3) PARA A AMOSTRA H5

As substâncias β -sitosterol e estigmasterol geralmente são encontradas como mistura e são diferenciadas apenas pelos carbonos 22 e 23. No estigmasterol, há uma dupla ligação, evidenciada pelos sinais de 138.31 ppm (C22) e 129.25 (C23) (DE-EKNAMKUL e POTDUANG, 2003). Na amostra H5 não foram visualizados estes sinais, indicando a presença apenas do β -sitosterol.

A correlação carbono – hidrogênio da amostra H5 está demonstrada no mapa de correlação bidimensional $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HMQC) (Figura 75). Pode-se observar a correlação entre H (3,53 ppm) e C (71,81 ppm), relacionada ao C3 e a correlação entre H (5,36 ppm) e C (121,71 ppm) do C6.

FIGURA 75 - MAPA DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAL $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HMQC) DA AMOSTRA H5



A detecção de β -sitosterol nesta espécie pode estar relacionada a ampla utilização popular como planta antiofídica. No trabalho de GOMES *et al.* (2007) a

mistura β -sitosterol e estigmasterol (3:1) extraída das raízes de *Pluchea indica* Less. (Asteraceae) foi avaliada para verificação da neutralização do veneno de cobra. A letalidade, neurotoxicidade e cardiotoxicidade induzida pelo veneno de cobra foi efetivamente antagonizadas por esta mistura.

5.3.4 Amostras H11, H30, C34, C47, AC108, AC160

Foram realizadas as análises de CG-EM das amostras H11 e H30 isolados da fração hexano; C34 e C47 isolados da fração clorofórmio e AC68, AC108 e AC160 isolados da fração acetato de etila.

As amostras H11 e C34 indicam a presença da mistura psoraleno e bergapteno e na amostra H30, apenas psoraleno. Os resultados de CG-EM obtidos nas demais amostras foram inconsistentes, com provável ausência de pureza relacionada ao processo de separação.

Em relação às análises de RMN ^1H e ^{13}C , os espectros das H30, C34 E C47 foram semelhantes à amostra H6, com a provável presença das furanocumarinas psoraleno e bergapteno.

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

5.4.1 Difusão em Gel

Foi realizada a avaliação da atividade antibacteriana para as frações hexano e clorofórmio, além da amostra H6, obtida a partir da FH.

Na Tabela 07 estão listadas as concentrações utilizadas no ensaio de difusão em gel, conforme resultados do teor de sólidos, demonstrados na Tabela 03. Para H6 as concentrações foram calculadas a partir da solução mãe de 10,2 mg em 500 μL de metanol, ou seja 20,4 mg/mL.

TABELA 07 - CONCENTRAÇÕES DAS AMOSTRAS IMPREGNADOS NOS DISCOS DE PAPEL

DILUIÇÃO DA AMOSTRA	FH	FC	H6
100%	375,00 µg/10µL	452,00 µg/10µL	204,00 µg/10µL
50%	187,50 µg/10µL	226,00 µg/10µL	102,00 µg/10µL
25%	93,75 µg/10µL	113,00 µg/10µL	51,00 µg/10µL
12,5%	46,90 µg/10µL	56,50 µg/10µL	24,50 µg/10µL

A fim de avaliar os controles empregados na avaliação da atividade antibacteriana pela metodologia de difusão em gel, foram avaliadas as médias dos halos de inibição dos controles (metanol, cefazolina e gentamicina), cujos resultados estão apresentados na Tabela 08.

A ausência de atividade, visualizada pela ausência do halo de inibição, apresentada pela cefazolina frente a *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* era esperada, em função da característica da molécula, a qual apresenta atividade acentuada para bactérias Gram positivas e em menor proporção para Gram negativas (FUCHS, 2004).

Em relação à gentamicina, a resistência de *Streptococcus pneumoniae* a este medicamento é amplamente descrita (MACHADO, 2004)

Pode-se afirmar que o solvente (metanol) não interfere no crescimento das cepas testadas, uma vez que não foram visualizados halos de inibição.

TABELA 08 – MÉDIAS DOS HALOS DE INIBIÇÃO (mm) DOS CONTROLES UTILIZADOS NO ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA COM DIFUSÃO EM GEL

MICROORGANISMOS	ATCC	CONTROLES		
		CEFAZOLINA (30µg)	GENTAMICINA (10µg)	METANOL
<i>Escherichia coli</i>	25922	0	35,5	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883	24,5	32,0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	25933	10,5	26,5	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27857	0	28,5	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	14028	27,0	34,5	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	46,5	32,5	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	39,0	29,0	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	19615	44,0	0	0

Na Tabela 09 estão apresentados os resultados da atividade da atividade antibacteriana com difusão em gel .

TABELA 09 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE *Dorstenia multiformis*, POR DIFUSÃO EM AGAR

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO	Ec	Kp	Pa	Pm	Sa	Se	Sp	St
FH	100%	0	6,0	0	0	6,0	6,0	0	7,0
	50%	0	6,0	0	0	6,0	6,0	0	7,0
	25%	0	0	0	0	6,0	6,0	0	0
	12,5%	0	0	0	0	6,0	6,0	0	0
Controle cefazolina (30µg)		0	20,0	0	12,0	40,0	33,0	37,0	22,0
Controle gentamicina (10µg)		30,0	26,0	23,0	28,0	26,5	23,0	0	28,0
Controle metanol		0	0	0	0	0	0	0	0
FC	100%	0	7,0	0	0	6,0	5,5	0	6,0
	50%	0	7,0	0	0	6,0	0	0	6,0
	25%	0	7,0	0	0	6,0	0	0	6,0
	12,5%	0	4,0	0	0	0	0	0	6,0
Controle cefazolina (30µg)		0	19,0	0	11,0	38,5	31,0	36,0	21,5
Controle gentamicina (10µg)		29,0	25,5	22,0	26,0	25,5	22,0	0	26,5
Controle metanol		0	0	0	0	0	0	0	0
H6	100%	0	0	0	0	3,0	3,5	0	0
	50%	0	0	0	0	0	0	0	0
	25%	0	0	0	0	0	0	0	0
	12,5%	0	0	0	0	0	0	0	0
Controle cefazolina (30µg)		0	20,0	0	12,0	39,5	32,5	37,0	21,5
Controle gentamicina (10µg)		31,0	27,5	23,0	27,0	27,0	21,0	0	28,5
Controle metanol		0	0	0	0	0	0	0	0

NOTA: FH = Fração hexano; FC = Fração clorofórmio; H6 = amostra H6; Ec = *Escherichia coli*; Kp = *Klebsiella pneumoniae*; Pa = *Pseudomonas aeruginosa* ; Pm = *Proteus mirabilis*; Sa = *Staphylococcus aureus*; Se = *Staphylococcus epidermidis*; Sp = *Streptococcus pyogenes*; St = *Salmonella typhimurium*.

Observa-se que as frações FH e FC foram ativos frente à *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Estes resultados foram similares aos obtidos por BALESTRIN, 2006.

O crescimento de *Staphylococcus aureus* foi influenciado pelas três amostras testadas. Em relação à FC, foi observado que na concentração 56,50 µg/10µL não houve crescimento bacteriano. A amostra H6, na concentração 100% influenciou de forma superficial no crescimento bacteriano.

Apenas a FH apresentou atividade sobre *Staphylococcus epidermidis* em todas as concentrações testadas. FC e H6 foram ativas somente na concentração 100%.

Klebsiella pneumoniae e *Salmonella typhimurium* foram influenciadas quanto ao seu crescimento de forma similar por FH e FC. A atividade de H6 foi considerada nula.

A amostra H6, provável mistura de psoraleno e bergapteno apresentou pequena atividade antibacteriana, em comparação com as frações FH e FC. Este resultado corrobora com BISIGNANO (2000), que cita baixa atividade do psoraleno (500 µg/mL) sobre *Staphylococcus aureus*. Resultados semelhantes foram obtidos por KUETE (2007A), onde psoraleno e bergapteno não demonstraram nenhuma atividade frente à *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus*.

5.4.2 Concentração Inibitória Mínima

Os resultados das análises da concentração inibitória mínima estão apresentados na Tabela 10.

TABELA 10 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DAS AMOSTRAS OBTIDAS DE *Dorstenia multiformis*

MICROORGANISMOS	ATCC	Amostras		
		FH	FC	H6
<i>Escherichia coli</i>	25922	1:2	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27857	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	25933	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	1:1	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	1:1	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	14028	0	0	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	19615	0	0	0

Apenas a fração hexano interferiu no desenvolvimento bacteriano, sendo que a concentração de 18,75 mg (1:2) interferiu sobre *Escherichia coli* e de 37,5 mg (1:1) sobre *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. No trabalho de BALESTRIN (2006), apenas a fração hexano foi testada e esta interferiu apenas sobre o crescimento de *Escherichia coli*. A diferença entre os resultados pode ter ocorrido em função de que BALESTRIN (2006) obteve as frações a partir do resíduo

do extrato bruto etanólico de *Dorstenia multiformis*, onde possivelmente houvesse uma concentração superior de cumarinas, as quais apresentam pequena atividade antibacteriana.

A amostra H6 não interferiu no crescimento de nenhum microorganismo testado, portanto pode-se inferir que a atividade antibacteriana apresentada pela fração hexano obtida do extrato etanólico bruto da fração solúvel esteja relacionada a presença de compostos com menor polaridade, como triterpenos e esteróides.

5.5 ATIVIDADE ALELOPÁTICA

Foram submetidas a este estudo as frações hexano, acetato de etila, clorofórmio e hidroalcoólica obtidas da fração solúvel do extrato etanólico bruto; bem como substâncias isoladas das frações hexano e clorofórmio.

5.5.1 Avaliação da germinação

TABELA 11 – TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NOS ÍNDICES DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *Lactuca sativa* COM FRAÇÕES OBTIDAS DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Dorstenia multiformis* Miquel

CONCENTRAÇÃO	FH	FC	FAC	FHA
0,60 mg	3.62 a	3.87 a	3.75 a	3.87 a
0,40 mg	3.62 a	4.37 a	4.00 a	4.50 b
0,30 mg	3.87 a	4.12 a	4.12 a	4.25 b
0,20 mg	3.75 a	4.25 a	4.38 a	3.75 a
0,10 mg	4.00 a	4.62 a	4.12 a	4.25 b
0,050 mg	4.12 b	4.75 a	4.00 a	3.50 a
0,025 mg	4.50 b	4.62 a	4.25 a	3.75 a
Controle	4.75 b	4.62 a	4.75 a	4.38 b

NOTA Valores seguidos de letras semelhantes não diferem estatisticamente entre si.

Observa-se na Tabela 11 o teste de Scott-Knott realizado sobre os índices de velocidade de germinação frente às frações obtidas a partir do extrato etanólico. Conforme os dados, FC e FAC não demonstraram apresentar influência estatisticamente significativa no IVG estatística frente ao controle. Os valores dos IVG das frações FH e FHA foram diferentes do controle, sendo que a FH influenciou

sobre a germinação das sementes em todas as concentrações testadas acima de 0,1mg. A influência exercida por FHA ocorreu em concentrações aleatórias.

Quando foram testadas as amostras isoladas, na Tabela 12 verifica-se que todas as substâncias testadas demonstraram influência sobre o IVG em comparação com o controle. Conforme os resultados de RMN, as amostras C34, C47 e H6 consistem da mistura de cumarinas psoraleno e bergapteno. Os resultados dos testes das substâncias C34 e H6 foram semelhantes, com diferença estatística sobre o IVG, nas concentrações superiores a 0,050 mg para C34 e 0,10 mg para H6. A análise por CG-EM de C47 demonstrou a presença de psoraleno e bergapteno, além de substância minoritária que não foi possível ser identificada. Esta amostra demonstrou influência significativamente superior sobre o IVG, em comparação a influência de C34 e H6, devendo-se possivelmente a presença de substâncias presentes na amostra e que atuaram sinergicamente com o psoraleno e bergapteno. A substância H1, provável mistura de terpenos, acetato de α -amirina e acetato de β -amirina, demonstrou diferença em relação ao controle apenas em concentrações superiores a 0,30 mg.

TABELA 12 – TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NOS ÍNDICES DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *Lactuca sativa* COM AMOSTRAS OBTIDAS DAS FRAÇÕES OBTIDAS DE EXTRATO ETANÓLICO DE *Dorstenia multiformis* Miquel

CONCENTRAÇÃO	C34		C47		H1		H6	
0,60 mg	2.45	a	2.41	a	3.12	a	2.70	a
0,40 mg	3.04	a	2.41	a	3.12	a	2.96	a
0,30 mg	2.70	a	2.87	b	3.37	a	2.87	a
0,20 mg	2.96	a	3.00	b	4.12	b	3.29	a
0,10 mg	2.87	a	3.50	c	3.62	b	3.21	a
0,050 mg	3.16	a	4.12	d	3.75	b	3.46	b
0,025 mg	4.00	b	4.25	d	4.00	b	4.00	b
Controle	4.00	b	3.62	c	3.87	b	3.50	b

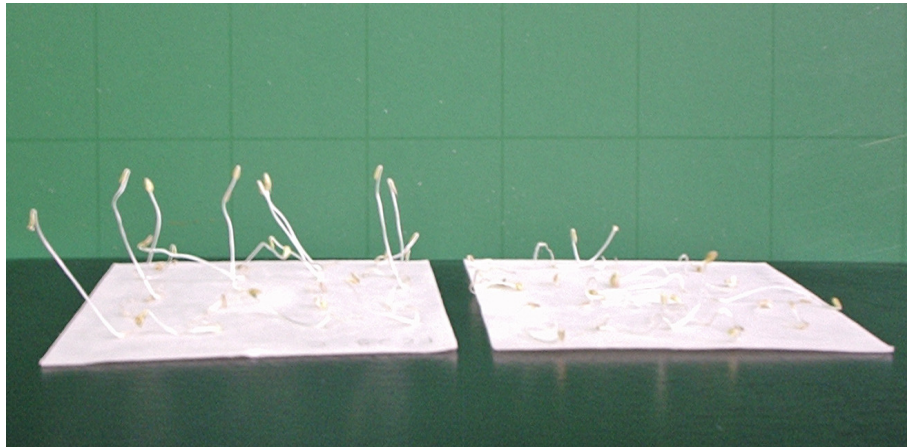
NOTA Valores seguidos de letras semelhantes não diferem estatisticamente entre si.

5.5.2 Avaliação do crescimento

A avaliação do crescimento das plântulas foi realizada, uma vez que os testes que avaliam o desenvolvimento geralmente são mais sensíveis que os testes de germinação (FERREIRA; AQUILA, 2000).

Ilustra-se na Figura 76 a influência da amostra C34 na concentração de 0,4mg sobre o crescimento de *Lactuca sativa*, em relação ao controle. O tratamento controle encontra-se no lado esquerdo, enquanto o tratamento com C34, no lado direito da fotografia. A diferença entre o tratamento e controle é evidenciada pelo desenvolvimento irregular da plântula, com formação curvelínea ou em espiral do hipocótilo no tratamento. Também pela alongação anormal da radícula, ausência de pelos absorventes e coloração marrom no tratamento, diferente do controle que apresenta coloração branca.

FIGURA 76 – CRESCIMENTO DE SEMENTES DE *Lactuca sativa* SOB TRATAMENTO COM 0,4mg DE C34, EM COMPARAÇÃO COM O CONTROLE



FONTE: A AUTORA

Na Tabela 13 demonstra-se os resultados da influência da fração clorofórmio e substâncias C34 e C47 sobre o crescimento da radícula e do hipocótilo de *Lactuca sativa*, através do teste de Scott-Knott.

Conforme o teste, apenas a substância C34 na concentração de 0,6 mg apresentou influência sobre o crescimento da radícula. As concentrações inferiores não demonstraram influência no crescimento.

Em relação ao hipocótilo, as substâncias C34 e C47 influenciaram no crescimento nas concentrações de 0,2, 0,3, 0,4 e 0,6 mg. No teste aplicado, apenas são considerados estatisticamente significativos quando as quatro repetições apresentam letras iguais como resultado. As concentrações de 0,025, 0,05 e 0,1 mg

apresentaram diferença estatística em relação ao controle, mas somente foram consideradas significativas quando esta diferença ocorreu nas quatro repetições.

Sugere-se portanto que o mecanismo de influência no crescimento das amostras seja diretamente relacionado à formação do hipocótilo.

TABELA 13 – TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA E DO HIPOCÓTILO COM FRAÇÃO CLOROFÓRMIO E SUBSTÂNCIAS C34 E C47

TRATAMENTO	REPETIÇÃO	RADÍCULA (mm)				HIPOCÓTILO (mm)							
		FC	C34	C47		FC	C34	C47					
0,60 mg	1	21.6	a	16.5	a	20.4	a	41.0	a	11.6	a	16.0	a
	2	28.0	a	13.8	a	20.8	a	42.4	a	7.8	a	14.6	a
	3	24.2	a	9.8	a	20.0	a	44.2	a	6.0	a	18.0	a
	4	24.6	a	16.5	a	20.0	a	44.4	a	9.8	a	19.2	a
0,40 mg	1	16.8	a	21.2	b	22.4	a	34.8	a	15.6	b	22.2	b
	2	21.6	a	23.4	b	22.6	a	46.8	a	17.2	b	21.8	b
	3	24.6	a	23.2	b	23.4	a	39.4	a	17.8	b	23.0	b
	4	22.8	a	22.0	b	24.6	a	41.6	a	17.4	b	22.8	b
0,30 mg	1	22.8	a	23.2	b	24.4	a	39.4	a	24.6	c	27.6	b
	2	29.0	a	22.4	b	23.4	a	42.2	a	22.0	c	27.6	b
	3	23.4	a	25.8	b	21.2	a	46.2	a	21.2	c	26.6	b
	4	23.6	a	19.4	b	21.8	a	33.2	a	19.8	c	24.4	b
0,20 mg	1	31.2	a	20.6	b	22.4	a	40.4	a	28.8	d	37.6	c
	2	21.6	a	24.4	b	21.2	a	42.2	a	30.2	d	34.6	c
	3	21.6	a	21.0	b	20.8	a	39.6	a	30.4	d	37.8	c
	4	23.8	a	22.0	b	23.2	a	47.8	a	28.0	d	37.6	c
0,10 mg	1	25.0	a	22.0	b	21.2	a	46.2	a	40.8	e	42.0	c
	2	24.2	a	20.4	b	20.2	a	43.8	a	41.2	e	43.8	d
	3	24.4	a	22.8	b	19.6	a	42.4	a	38.0	e	40.6	c
	4	23.8	a	26.4	b	20.6	a	44.0	a	39.6	e	48.2	d
0,05 mg	1	24.0	a	25.2	b	19.6	a	46.8	a	43.6	e	41.6	c
	2	25.8	a	24.0	b	21.8	a	47.0	a	44.2	e	46.8	d
	3	23.4	a	21.2	b	23.2	a	47.2	a	46.2	e	44.6	d
	4	23.8	a	20.8	b	17.2	a	44.8	a	42.4	e	38.2	c
0,025 mg	1	24.0	a	25.2	b	20.0	a	39.2	a	46.2	e	43.0	c
	2	25.8	a	24.0	b	19.2	a	43.2	a	48.6	e	44.2	d
	3	23.4	a	21.2	b	19.0	a	32.2	a	49.0	e	46.6	d
	4	23.8	a	20.8	b	19.8	a	43.2	a	47.6	e	44.8	d
Controle	1	30.4	a	24.8	b	15.8	a	43.0	a	45.8	e	51.0	d
	2	29.2	a	22.4	b	19.2	a	41.0	a	44.4	e	47.8	d
	3	23.8	a	26.0	b	19.4	a	41.4	a	45.2	e	50.6	d
	4	24.6	a	23.6	b	13.8	a	38.6	a	45.2	e	52.8	d

NOTA Valores seguidos de letras semelhantes não diferem estatisticamente entre si.

A influência da FH e amostras H1 e H6 no crescimento da radícula e do hipocótilo estão relacionadas da Tabela 14.

TABELA 14 – TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA E DO HIPOCÓTILO COM FRAÇÃO HEXANO E SUBSTÂNCIAS H1 E H6

TRATAMENTO	REPETIÇÃO	RADÍCULA (mm)			HIPOCÓTILO (mm)								
		FH	H1	H6	FH	H1	H6						
0,60 mg	1	29.0	a	21.6	a	19.0	a	47.2	a	47.8	a	9.8	a
	2	27.0	a	23.0	a	18.8	a	48.0	a	44.4	a	10.2	a
	3	23.2	a	19.8	a	17.8	a	45.6	a	44.6	a	12.2	a
	4	26.8	a	24.4	a	19.8	a	41.6	a	47.2	a	8.4	a
0,40 mg	1	19.4	a	20.0	a	24.4	b	44.2	a	49.8	a	25.4	b
	2	27.4	a	21.2	a	23.6	b	50.2	a	50.0	a	19.8	b
	3	30.6	a	18.4	a	20.2	a	45.8	a	47.4	a	19.2	b
	4	32.4	a	19.6	a	17.8	a	45.8	a	43.8	a	13.6	a
0,30 mg	1	25.0	a	20.0	a	18.4	a	44.0	a	51.6	a	22.4	b
	2	28.6	a	22.2	a	22.2	b	45.8	a	50.0	a	30.2	b
	3	24.0	a	23.8	a	21.8	b	46.8	a	45.8	a	27.0	b
	4	24.8	a	23.0	a	21.2	b	44.8	a	49.8	a	23.6	b
0,20 mg	1	25.4	a	18.0	a	21.6	b	42.6	a	54.2	a	38.8	c
	2	22.8	a	18.0	a	21.6	b	45.8	a	46.2	a	34.4	c
	3	24.6	a	17.6	a	15.6	a	51.0	a	48.4	a	25.4	b
	4	23.8	a	20.0	a	18.0	a	46.2	a	45.2	a	25.0	b
0,10 mg	1	23.0	a	20.4	a	21.8	b	42.8	a	47.8	a	39.4	c
	2	20.4	a	18.2	a	22.6	b	43.6	a	51.6	a	45.6	d
	3	22.8	a	18.0	a	21.6	b	42.2	a	47.6	a	39.4	c
	4	19.2	a	19.6	a	23.2	b	35.4	a	44.0	a	37.0	c
0,05 mg	1	21.2	a	23.6	a	22.8	b	49.6	a	49.8	a	40.8	c
	2	27.0	a	26.4	a	25.8	b	42.8	a	51.6	a	47.4	d
	3	25.8	a	19.8	a	29.0	b	45.4	a	46.6	a	46.8	d
	4	26.2	a	20.6	a	22.4	b	48.0	a	48.0	a	41.6	c
0,025 mg	1	23.8	a	17.4	a	24.6	b	33.8	a	45.6	a	45.6	d
	2	27.0	a	19.8	a	25.2	b	42.4	a	49.2	a	49.0	d
	3	24.2	a	18.2	a	22.8	b	40.4	a	46.6	a	46.6	d
	4	20.2	a	20.8	a	21.6	b	37.0	a	53.6	a	43.4	d
Controle	1	20.4	a	27.2	a	21.8	b	39.2	a	51.4	a	42.8	d
	2	24.0	a	19.2	a	22.2	b	41.6	a	49.8	a	43.6	d
	3	20.6	a	19.6	a	22.4	b	36.2	a	52.4	a	42.6	d
	4	24.4	a	18.6	a	26.2	b	43.2	a	44.2	a	44.8	d

NOTA Valores seguidos de letras semelhantes não diferem estatisticamente entre si.

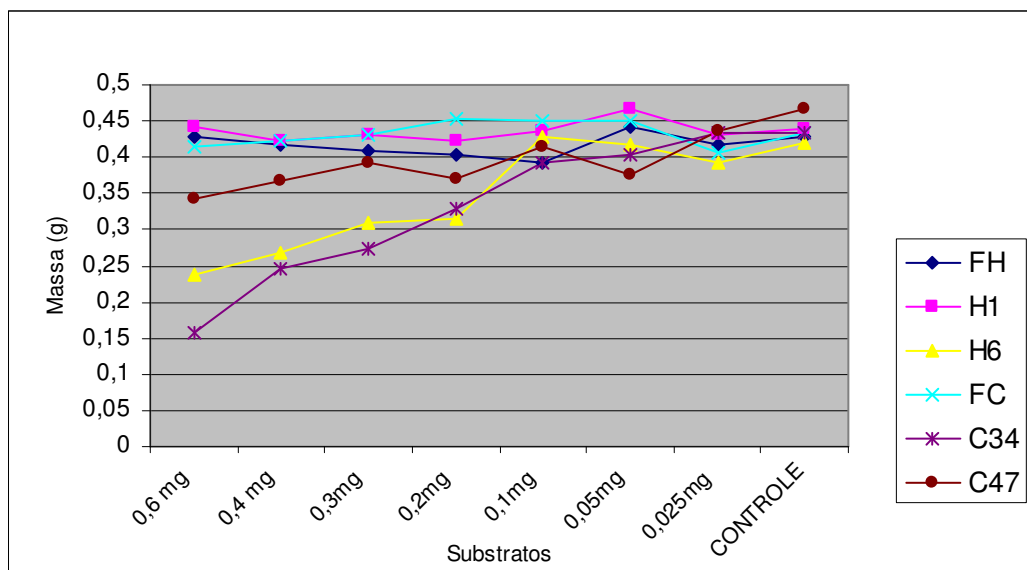
A inibição do crescimento da radícula foi estatisticamente significativa apenas pela substância H6 na concentração de 0,6 mg.

Em relação ao hipocótilo, a substância H6 influenciou no crescimento nas concentrações de 0,2, 0,3, 0,4 e 0,6 mg.

A influência da substância H1 não foi estatisticamente significativa em relação ao controle, assim como a fração H. Segundo as análises de RMN, esta amostra é composta pela mistura acetato de α -amirina e acetato de β -amirina; e parece não apresentar atividade alelopática.

Após medição de radícula e hipocótilo, foi realizada a pesagem das plântulas. Os dados obtidos, em comparação com o controle estão representados no Gráfico 01.

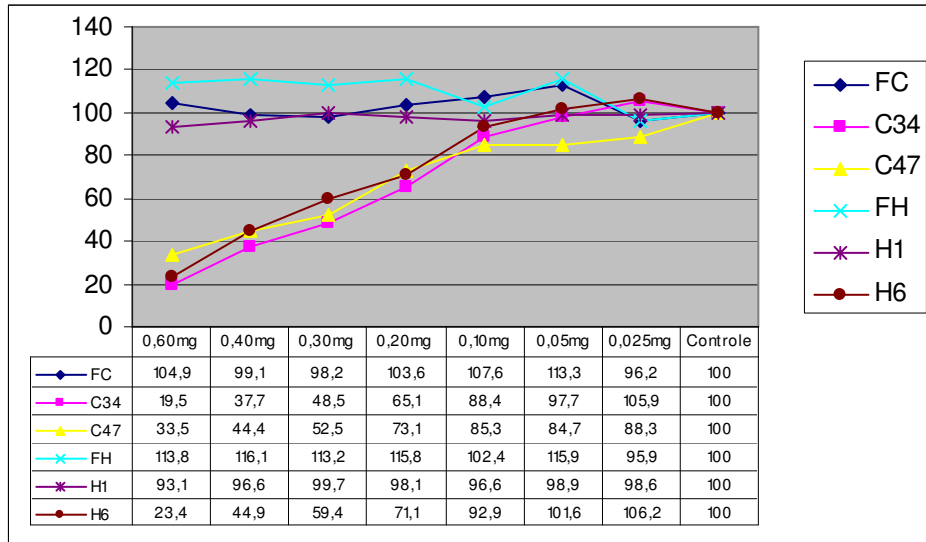
GRÁFICO 01 – MASSA DAS PLÂNTULAS SOB TRATAMENTO COM AS FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS PARA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO, APÓS 7 DIAS DA SEMEADURA



Observa-se que as substâncias C34 e H6 induziram a redução considerável de massa nas concentrações de 0,2 a 0,6 mg, dados estes que parecem ter relação direta com a porcentagem de crescimento do hipocótilo, em maior proporção e da radícula, em menor.

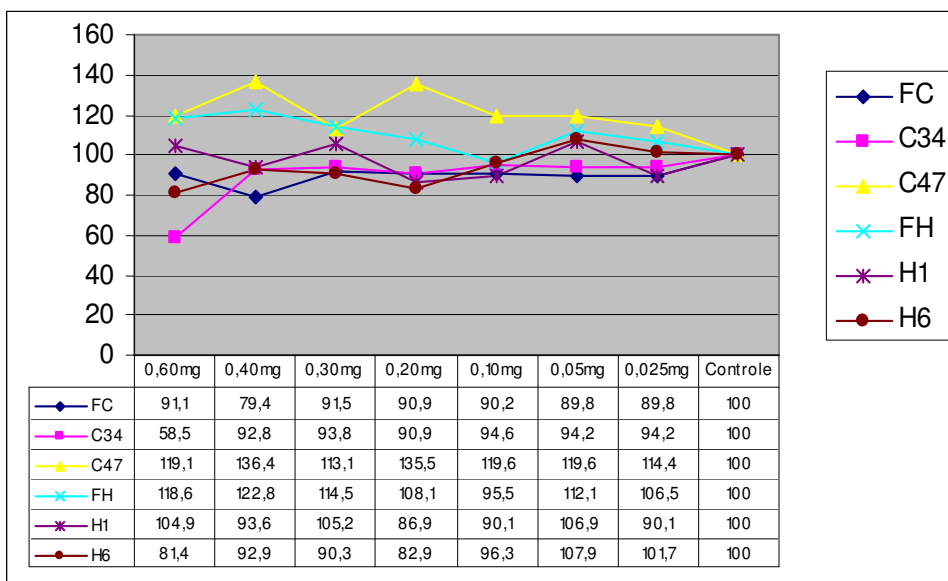
No Gráfico 02 demonstra-se que o crescimento do hipocótilo foi influenciado de forma semelhante pelas substâncias C34, C47 e H6, com visível inibição do crescimento. A substância H1 e as frações FC e FH demonstraram pouca influência do crescimento do hipocótilo.

GRÁFICO 02 – PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DA HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa* FRENTE A FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS OBTIDAS DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Dorstenia multiformis* Miquel



Da mesma forma, observa-se no Gráfico 03 que o crescimento da radícula foi inibido de forma significativa pelo composto C34 na concentração de 0,6 mg. Por outro lado, o composto C47 influenciou positivamente no crescimento e os demais compostos e frações não demonstraram influência sobre o desenvolvimento da radícula.

GRÁFICO 03 – PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE *Lactuca sativa* FRENTE A FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS OBTIDAS DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Dorstenia multiformis* Miquel



Apesar da obtenção da mistura psoraleno e bergapteno nos compostos C34, C47 e H6, pode-se observar que a influência sobre as sementes ocorreu de forma diferente, sugerindo a presença de outros compostos minoritários que agem de forma sinérgica em cada amostra, ou mesmo impurezas.

Foi observado que o desenvolvimento da plúmula ocorreu normalmente em todos os tratamentos.

5.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE A *Artemia salina*

Neste ensaio, foram submetidas amostras das frações hexano, acetato de etila e clorofórmio, além das substâncias C2, C34 e H6.

TABELA 15 – MORTALIDADE DE *Artemia salina* E ESTIMATIVA DE LC50

A	REPETIÇÃO	MORTALIDADE/CONCENTRAÇÃO					LC50	INTERVALO DE CONFIANÇA 95%
		C 1	C2	10 (µg/mL)	100 (µg/mL)	1000 (µg/mL)		
FH	1	0	3	5	7	9	56,23	10,63 -297,58
	2	0	2	5	6	10	64,94	5,20 – 810,32
	3	0	2	5	6	9	68,13	4,72 – 982,24
FC	1	0	0	1	8	10	39,24	19,62 – 78,49
	2	0	2	3	9	10	31,62	20,08 – 49,80
	3	0	2	3	9	10	31,62	20,08 – 49,80
FAC	1	0	1	1	4	7	316,23	25,38-399,54
	2	0	2	2	4	7	446,16	117,59 – 1832,11
	3	0	2	2	5	7	316,23	43,05 – 2322,87
C2	1	0	3	5	8	10	31,62	10,68 – 93,63
	2	0	3	6	8	10	17,78	2,46 – 128,46
	3	0	2	5	7	10	31,62	4,32 – 232,29
C34	1	0	1	5	9	10	13,34	3,19 – 55,75
	2	0	2	5	8	10	21,54	5,46 – 85,04
	3	0	2	5	9	10	17,78	6,01 – 52,61
H6	1	0	1	5	8	10	14,68	2,34 – 91,89
	2	0	2	5	9	10	17,78	6,01 – 52,61
	3	0	2	5	8	10	21,54	5,46 – 85,04

Nota : A = amostra, LC50 = concentração média letal, C1 = controle 1, tubos tratados com água salgada, C 2 = controle 2, tubos tratados com solvente do teste

Segundo MEYER *et al.* (1982), extratos com valores de LC50 inferiores a 1000 µg/mL são considerados bioativos. Conforme os resultados que estão demonstrados na Tabela 15, pode-se observar que as amostras testadas apresentam considerável bioatividade frente à *Artemia salina*, indicando que podem ser prosseguidos os estudos biológicos com esta espécie, uma vez que este ensaio tem sido utilizado como estudo inicial para detecção simultânea de toxicidade e fototoxicidade (OJALA *et al.*, 1999; MOREIRA *et al.*, 2003; PIMENTA *et al.*, 2003).

Foi observado que o solvente utilizado nos experimentos exerce influência sobre os resultados. Nos tubos controle 1 em que foi adicionada somente água salgada, todos os náuplios continuaram viáveis após 24 horas, ao contrário dos tubos controle 2, tratados com o solvente empregado na solubilização das amostras. Os solventes utilizados foram metanol para FC e FA, metanol/clorofórmio (1:2) para H6 e C34 e clorofórmio para FH e C2. O clorofórmio mostrou apresentar maior toxicidade sobre *Artemia salina*, em comparação com metanol e a mistura metanol/clorofórmio (1:2).

Exceto para FAC, as amostras testadas apresentaram valores de LC50 consideravelmente inferiores ao controle positivo, Sulfato de Quinidina. A LC50 do controle positivo foi de 166,81 ppm (intervalo de confiança 95% = 43,01 – 649,94ppm). No trabalho de SIQUEIRA *et al.*(1998) o valor de LC50 para este controle foi de 211,00 ppm. Tais resultados reforçam a biotividade das frações testadas frente a *Artemia salina*

6 CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico da fração solúvel do extrato etanólico bruto de *Dorstenia multiformis* Miquel levou ao isolamento de cinco substâncias, sendo empregadas técnicas de Cromatografia em Coluna, Cromatografia em Camada Delgada, Cromatografia Gasosa, Espectrometria de Massa e Ressonância Magnética Nuclear (^1H e ^{13}C). Foram identificadas duas cumarinas, psoraleno e bergapteno (amostras H6, H30, C34 e C47), dois compostos terpenóides, acetato de α -amirina e acetato de β -amirina (amostra H1) e um esteróide, β -sitosterol (amostra H5).

Ao avaliar a atividade antibacteriana, utilizando o método de difusão em gel, evidenciou-se que 187,50 μg da fração hexano inibiu o crescimento de *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella typhimurium*. O crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* foi inibido por 46,90 μg desta mesma fração. A fração clorofórmio inibiu o crescimento de *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella typhimurium* na concentração 56,50 μg , de *Staphylococcus aureus* por 113,00 μg e *Staphylococcus epidermidis* por 452,00 μg . A mistura psoraleno e bergapteno, identificado na amostra H6 foi capaz de inibir somente o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* na concentração de 204 μg .

Ao avaliar a concentração inibitória mínima pelo método da diluição em caldo, somente a fração hexano demonstrou alguma atividade. Foi observado que a concentração de 18,75 mg (1:2) interferiu sobre *Escherichia coli* e que a concentração de 37,5 mg (1:1) atuou sobre *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.

Em relação à alelopatia, o índice de velocidade de germinação das sementes de *Lactuca sativa* foi alterado pelas frações FH e FHA, além das amostras H1, H6, C34 e C47. O crescimento da radícula foi influenciado pelas amostras H6 e C34 apenas na concentração de 0,6 mg. Em relação ao hipocótilo, a mistura psoraleno e bergapteno, testado como as amostras H6, C34 e C47 influenciou o crescimento nas concentrações de 0,2 mg a 0,6 mg. A amostra H1 (acetato de α -amirina e acetato de β -amirina) não foi estatisticamente significativa quanto à influência sobre o crescimento do hipocótilo em relação ao controle, assim como a fração H. As substâncias C34 e H6 apresentaram redução de massa considerável nas concentrações de 0,2 mg a 0,6 mg, dados estes que parecem ter relação direta

com a porcentagem de crescimento do hipocótilo, em maior proporção e da radícula, em menor.

Ao avaliar a bioatividade frente à *Artemia salina*, todas as amostras testadas foram consideradas bioativas segundo MEYER *et al.*, 1982, uma vez que apresentaram valores de LC50 inferiores a 1000 µg/mL.

REFERÊNCIAS

- ABEGAZ, B.M. *et al.* Prenylated chalcones and flavones from the leaves of *Dorstenia kameruniana*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 1147-1150, 1998.
- ABEGAZ, B.M. *et al.* Chemistry of the Genus *Dorstenia*. **Current Organic Chemistry**, v. 4, n. 1079-1090, 2000.
- ABEGAZ, B.M. *et al.* Chalcones and other constituents of *Dorstenia prorepens* and *Dorstenia zenkeri*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 877-883, 2002.
- ABEGAZ, B.M. *et al.* Prenylated flavonoids, monoterpeneoid furanocoumarins and other constituents from the twigs of *Dorstenia elliptica* (Moraceae). **Phytochemistry**, v. 65, p. 221-226, 2004.
- ALMEIDA, F.S. **A alelopatia e as plantas**. Londrina: IAPAR, 1988.
- AL-QATTAN, M.M. Pediatric burns induced by psoralens in Saudi Arabia. **Burns**, v. 26, p. 653-655, 2000.
- AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings National Academy of Sciences USA.**, v. 90, p. 7915-7922, 1993.
- BALESTRIN, L. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopáticas, antimicrobianas e antioxidante da *Dorstenia multiformis* Miquel, Moraceae**. Curitiba, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- BOECK, P. *et al.* Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1538-1545, 2006.
- BOKESCH, H.R. *et al.* Isolation and characterization of anti-HIV peptides from *Dorstenia contrajerva* and *Treculia obovoidea*. **Federation of European Biochemical Society Letters**, v. 567, p. 287-290, 2004.
- BRUNO, M. *et al.* Diterpenoids from *Salvia gregii*. **Phytochemistry**, v. 25, p. 475-477, 1986.
- CÁCERES, A. *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 195-202, 1998.
- CACERES, A. *et al.* Furanocoumarins from the aerial parts of *Dorstenia contrajerva*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 376-381, 2001.
- CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.
- CALIXTO, J.B. Medicamentos Fitoterápicos. In: YUNES, R.A & CALIXTO, J.B. (Ed) **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: ARGOS. 2001. p. 297-315
- CALZADA, F. *et al.* *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 367-370, 2006.
- CARDOSO, C.L. *et al.* Simultaneous determination of furanocoumarins in infusions and decoctions from "carapia" (*Dorstenia* Species) by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1465-1469, 2002.

- CARVALHO, J. L. de S. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico de *Nasturtium officinal* R. BR., Brassicaceae.** Curitiba, 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- CASTRO, M.S. *et al.* Tendências na utilização de antimicrobianos em um hospital universitário, 1990-1996. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, p. 553-558, 2002.
- CHAN-BACAB, M.J. *et al.* Variation of leishmanicidal activity in four populations of *Urechites andrieuxii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, p. 243-247, 2003.
- CHAUDHARY, S.K. *et al.* Increased furocoumarin content of celery during storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, p. 1153-1157, 1985.
- COIMBRA, R. **Notas de fitoterapia catálogo dos dados principais sobre plantas utilizadas em medicina e farmácia.** Rio de Janeiro: Carlos da Silva Araujo S. A, 1942, p. 64.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classifications of flowering plants.** New York: Columbia University Press, 1981, p. 198-199.
- CRUZ, G.L. **Dicionário das plantas úteis no Brasil.** São Paulo: Ed. Civilização Brasileira S.A, 1985.
- DE-EKNAMKUL, W; POTDUANG, B. Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. **Phytochemistry**, v. 62, p. 389-398, 2003
- DIAS, J.F.G. **Estudo alelopático aplicado de *Aster lanceolatus*, Willd.** Curitiba, 2005. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- DIAWARA, M.M. *et al.* Implications of distribution of linear furanocoumarins within celery. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 723-727. 1995.
- DIETZ, H.; WINTERHALTER, P. Phytotoxic constituents from *Bunias orientalis* leaves. **Phytochemistry**, v. 42, p. 1005-1010, 1996.
- DIMMOCK, J.R. *et al.* Bioactivities of chalcones. **Current Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 1125-1149, 1999.
- DIMO, T. *et al.* Antihypertensive effects of *Dorstenia psilurus* extract in fructose-fed hyperinsulinemic, hypertensive rats. **Phytomedicine**, v.8, p.101-106, 2001.
- DISTASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência: Um guia de estudo interdisciplinar.** São Paulo: UNESP, 1995.
- DUFALL, K.G. *et al.* Antioxidant activity of prenylated flavonoids from the West African medicinal plant *Dorstenia mannii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 67-72, 2003.
- FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 175-204, 2000.
- FERREIRA, D.F. **Sistema de análise de variância de dados balanceados (SISVAR).** Lavras: UFLA, 2000.
- FIGUEIREDO, L.T.M. Dengue in Brazil: Past, Present and Future Perspective. **WHO-Dengue Bulletin**, v. 27, p. 25-33, 2003.
- FINNEY, D.J. **Probit Analysis.** Cambridge: Cambridge University Press, 1956.
- FLORA BRASILIENSIS. ***Dorstenia multiformis* Miquel.** v. IV, part I, fasc. 12, prancha 57, 1853. Disponível em: <http://florabrasiliensis.cria.org.br/search?taxon_id=27872> Acesso em 15 set. 2006.
- FRANKE, K. *et al.* Furanocoumarins from *Dorstenia gigas*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 611-621, 2001.

FUCHS, F.D. Antibióticos Betalactâmicos. In: FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M.B.C. (Ed.) **Farmacologia Clínica - Fundamentos da Terapêutica Racional**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p-361-372, 2004.

GOMES, A. *et al.* F Viper and cobra venom neutralization by b-sitosterol and stigmasterol isolated from the root extract of *Pluchea indica* Less. (Asteraceae) **Phytomedicine**, v. 14, p. 637-643, 2007.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

HOLMES JR., O.W.; PATHAK, M.A.; FITZPATRICK, T.B. The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 14, p. 3-22, 1992.

IWU, M.M. *et al.* Evaluation of plant extracts for antileishmanial activity using a mechanism-based radiorespirometric Microtechnique (RAM). **Planta medica**, v. 58, p. 436-41, 1992.

JOLY, A.B. **Introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998

KANSCI, G.; DONGO, E; GENOT, C. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) test demonstrates antiradical activity of *Dorstenia psilurus* and *Dorstenia ciliata* plant extracts. **Nahrung**, v. 47, p. 434-7, 2003.

KITAMURA, N., KOHTANI, S. & NAKAGAKI, R. Molecular aspects of furocoumarin reactions: photophysics, photochemistry, photobiology, and structural analysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 6, p. 165-195, 2005.

KONEMAN, E.W. *et al.* **Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido**. São Paulo: Medicina Panamericana Editora do Brasil LTDA., 1993.

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

KUETE, V. *et al.* Antimicrobial activity of the methanolic extract and compounds from *Treculia obovoidea* (Moraceae) **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 531–536, 2007a.

KUETE, V. *et al.* Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and four flavonoids from the twigs of *Dorstenia angusticornis* Engl. (Moraceae) **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 271–277, 2007b.

KUSTER, R.M. *et al.* Furocoumarins from the rhizomes of *Dorstenia brasiliensis*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 221-223, 1994.

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

LEWAN, L.; ANDERSON, M.; MORALES-GOMEZ, P. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 20, p. 297-301, 1992.

LEWINSOHN, T.M. & PRADO, P.I. **Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento**. São Paulo: Contexto, 2002.

LIMA, M.P. *et al.* Phytochemistry of *trattinnickia burserifolia*, *t. rhoifolia*, and *Dacryodes hopkinsii*: Chemosystematic Implications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.15, p.385-394, 2004.

LLANO, J.; RABER, J.; ERIKSSON, L.A. Theoretical study of phototoxic reactions of psoralens. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 154, p. 235–243, 2003.

LOPES, D. *et al.* Photosensitization and mutation induced in *escherichia coli* and *saccharomyces cerevisiae* strains by dorstenin, a psoralen analog isolated from *Dorstenia bahiensis*. **Planta medica**, v. 67, p. 820-824, 2001.

LUNARDI, F. *et al.* Trypanocidal and leishmanicidal properties of substitution-containing chalcones. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 47, p. 1449–1451, 2003.

MACHADO, A.R.L. Aminoglicosídeos. In: FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M.B.C. (Ed.) **Farmacologia Clínica - Fundamentos da Terapêutica Racional**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p-377-381, 2004.

MACÍAS, F.A.; GALINDO, J.C.G.; M.G.MOLINILLO, J. Plant biocommunicators: application of allelopathic studies. In: LUIJENDIJK, T.J.C (Ed.). **2000 Years of Natural Products Research: Past, Present and Future**. Amsterdam: Phytoconsult, p. 137-161, 1999.

MACRAE, W.D.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G.H. Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 143-72, 1988.

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

MALHEIROS, A. & PERES, M.T.L.P. Alelopatia: Interações Químicas entre espécies. In: YUNES, R.A. & CALIXTO, J.B (Ed.). **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, p. 503-523, 2001.

MARZANO, C. *et al.* DNA damage and biological effects induced by photosensitization with new N1-Unsubstituted Furo[2,3-h]quinolin-2(1H)-ones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 2835–2844, 2002.

MASUDA, T.; TAKASUG, M.; ANETAI, M. Psoralen and other linear furanocoumarins as phytoalexins in *Glehnia littoralis*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 13-16, 1998.

MCLAUGHLIN, J.L.; CHANG, C.J.; SMITH, D.L. "Bendh-Top" bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. In: RAHMAN, A.R. (Ed.) **Studies in Natural Products Chemistry**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., p. 383-409, 1991.

MEYER, B.N. *et al.* Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, p. 31, 1982.

MICHAEL, A.; THOMPSON, C.G.; ABRAMOVITZ, M. *Artemia salina* as a test organism for bioassay. **Science**, v. 123, p. 464, 1956.

MIGUEL, O.G. Ensaio sistemático de análise fitoquímica. Apostila da disciplina de fitoquímica - Curso de Farmácia UFPR, Curitiba, 2003.

MISSOURI BOTANIC GARDEN. ***Dorstenia multiformis* Miquel**. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/Research/sitemap.shtml>> Acesso em 20 jun. 2006.

MONGELLI, E. *et al.* In vitro antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *Baccharis coridifolia* DC. **J Ethnopharmacol**, v. 58, p. 157- 163, 1997.

MONTORO, P. *et al.* Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. **Food Chemistry**, v. 92, p.349–355, 2005.

MOREIRA, F.D.P.M. *et al.* Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – bioatividade sobre *Artemia salina*. **Química Nova**, v. 26, p. 309-311, 2003.

NGADJUI, B.T. *et al.* Geranylated and prenylated flavonoids from the twigs of *Dorstenia mannii*. **Phytochemistry**, v. 48, p. 349-354, 1998a.

NGADJUI, B.T. *et al.* Prenylated flavones and phenylpropanid derivatives from roots of *Dorstenia psilurus*. **Phytochemistry**, v. 48, p. 733-737, 1998b.

- NGADJUI, B.T. *et al.* Prenylated flavanones from the twigs of *Dorstenia mannii*. **Phytochemistry** v. 50, p. 1401-1406, 1999a.
- NGADJUI, B.T. *et al.* Prenylated flavonoids and a dihydro-4-phenylcoumarin from *Dorstenia poinsettifolia*. **Phytochemistry** v. 51, p. 119-123, 1999b.
- NGADJUI, B.T. *et al.* Dorsilurins C, D and E, three prenylated flavonoids from the roots of *Dorstenia psilurus*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 731±735, 1999c.
- NGADJUI, B.T. *et al.* Prenylated flavonoids from the aerial parts of *Dorstenia mannii*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 915-919, 2000.
- NGADJUI, B.T. *et al.* Dinklagins A, B and C: three prenylated flavonoids and other constituents from the twigs of *Dorstenia dinklagei*. **Phytochemistry** v. 61, p. 99-104, 2002.
- NGADJUI, B.T. *et al.* Prenylated chalcones, flavone and other constituents of the twigs of *Dorstenia angusticornis* and *Dorstenia barteri* var. *subtriangularis*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 687–692, 2005.
- NGAMENI, B. *et al.* Diprenylated chalcones and other constituents from the twigs of *Dorstenia barteri* var. *subtriangularis*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 427–432, 2004.
- NGAMENI, B. *et al.* Inhibition of MMP-2 secretion from brain tumor cells suggests chemopreventive properties of a furanocoumarin glycoside and of chalcones isolated from the twigs of *Dorstenia turbinata*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2573-2579, 2006.
- NGAMENI, B. *et al.* Inhibition of matrix metalloproteinase-2 secretion by chalcones from the twigs of *Dorstenia barteri* Bureau. **Arkivoc**, v. 9, p. 91-103, 2007.
- OJALA, T. *et al.* A bioassay using *Artemia salina* for detecting phototoxicity of plant coumarins. **Planta medica**, v. 65, p. 715-8, 1999.
- OMISORE, N.O.A. *et al.* Antitrichomonal and antioxidant activities of *Dorstenia barteri* and *Dorstenia convexa*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 1087-1094, 2005.
- PAVELA, R. Insecticidal activity of certain medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 75, p. 745– 749, 2004.
- PEREIRA, N.A. *et al.* Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antidotes; IV. Protection against jararaca venom by isolated constituents. **Planta medica**, v. 60, p. 99-100, 1994.
- PIMENTA, L.P.S. *et al.* Biological screening of Annonaceous brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). **Phytomedicine**, v. 10, p. 209–212, 2003.
- PIRES, A.E.; HONDA, N.K.; CARDOSO, C.A.L. A method for fast determination of psoralens in oral solutions of phytomedicines using liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 415–420, 2004.
- POSER, G.L.V.; MENTZ, L.A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P.D., MENTZ, L.A. & PETROVICK, P.R. (Ed.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC e Editora da Universidade(UFRGS), p. 61-74, 2000.
- RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.
- RICE, E.L. **Allelopathy**. New York: Academic Press, 1984.
- RIOS, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80-84, 2005.

RIZVI, S.J.H. *et al.* A discipline called allelopathy. In: RIZVI, S.J.H. & RIZVI, V. (Ed.) **Allelopathy. Basic and applied aspects**. London: Chapman & Hall, p. 1-8, 1992.

ROJAS-LIMA, S. *et al.* Furocoumarins of three species of the genus *Dorstenia*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 863-868, 1999.

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

RUPPELT, B.M. *et al.* Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom--I. Analgesic and anti-inflammatory activities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 203-5, 1991.

RUPPRECHT, J.K.; HUI, Y.H.; MCLAUGHLIN, J.L. Annonaceous acetogenins: a review. **Journal of Natural Products**, v. 53, p. 237-278, 1990.

SILVA, R.A.D. **Pharmacopeia Dos Estados Unidos Do Brasil**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1926. p. 168.

SIMO, I.K.; NGADJUI, B.T.; ABEGAZ, B.M. Prenylated flavonoids and other constituents from the twigs of *Dorstenia angusticornis* (Moraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, 1283-1287, 2005.

SIQUEIRA, J.M.D. *et al.* Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriuscula* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Quimica Nova**, v. 24, p. 185-187, 2001.

SIQUEIRA, J.M.D. *et al.* Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanni* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Quimica Nova**, v. 21, p. 557-559, 1998.

SWAIN, L.A.; DOWNUM, K.R. Light-activated toxins of the Moraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 18, p. 153-156, 1990.

SWAIN, L.A. *et al.* A furanocoumarin from *Dorstenia contrajerva*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 4196-4197, 1991.

TANG, S. *et al.* Mass spectrometry of some furanocoumarins. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 57, p. 1995-2003, 1979.

TERREAUX, C. *et al.* Structure revision of a furanocoumarin from *Dorstenia contrajerva*. **Phytochemistry**, v. 39, p. 645-647, 1995.

TOVAR-MIRANDA, R. *et al.* Isolation, total synthesis, and relative stereochemistry of a dihydrofurocoumarin from *Dorstenia contrajerva*. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1216-1220, 1998.

TRUMBLE, J.T. *et al.* Seasonal patterns and pesticidal effects on the phototoxic linear furanocoumarins in celery, *Apium graveolens* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 1501-1506, 1992.

TSOPMO, A. *et al.* Geranylated flavonoids from *Dorstenia poinsettifolia*. **Phytochemistry**, v. 48, p. 345-348, 1998.

_____. A new Fiels-Alder-Type Adduct Flavonoid from *Dorstenia barteri*. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 1432-1434, 1999.

TUREGUN, M.; OZTURK, S.; SELMANPAKOGLU, N. An unusual cause of burn injury: unsupervised use of drugs that contain psoralens. **Journal of Burn Care and Rehabilitation**, v. 20, p. 50-52, 1999.

UCHIYAMA, T. *et al.* seco-Adianane-type triterpenoids from *Dorstenia brasiliensis* (Moraceae). **Phytochemistry**, v. 60, p. 761-764, 2002.

UTYAMA, I.K.A. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica *in vitro* do vinagre e ácido acético: perspectiva na terapêutica de feridas.** Ribeirão Preto, 2003. pp. 148. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) - Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

VILEGAS, J.H.Y. *et al.* Further triterpenes, steroids and furocoumarins from brazilian medicinal plants of *Dorstenia* genus (Moraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 8, p. 529-535, 1997.

WANG, H. *et al.* Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 294-296, 1999.

WHO. **Leishmaniasis.** TDR: Tropical Diseases Research, 1997. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/default.htm>> Acesso em 31 ago. 2006.

_____. **Global prevalence and incidence of selected curable Sexually Transmitted Infections. Overview and estimates.** Genebra, 2001. Disponível em:<http://www.who.int/hiv/pub/sti/who_hiv_aids_2001.02.pdf> Acesso em: 28 ago. 2006.

_____. **Dengue and dengue haemorrhagic fever.** v. 117, 2002. Disponível em:<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/print.html>> Acesso em: 31 ago. 2006.

_____. **Traditional medicine.** v. 134, 2003 Disponível em:<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>> Acesso em: 09 maio 2006.

WILLCOX, J.K., ASH, S.L. & CATIGNANI, G.L. Antioxidants and prevention of chronic disease. **Critical Reviews in food science and nutrition**, v. 44, p. 275-95, 2004.

WOLDU, Y. *et al.* Styrenes from *Dorstenia barnimiana*. **Phytochemistry** , v.27, p. 1227-1228, 1988.