

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA COLOMBI CANSIAN

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE
***Tynanthus micranthus* CORR. MÉLLO (BIGNONIACEAE)**

CURITIBA
2010

FERNANDA COLOMBI CANSIAN

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE
Tynanthus micranthus CORR. MÉLLO (BIGNONIACEAE)**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a *Marilis Dallarmi Miguel*
Co-orientador: Prof^o Dr *Obdulio Gomes Miguel*

CURITIBA
2010

Cansian, Fernanda Colombi

Estudo Fitoquímico e Atividades Biológicas da Espécie *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo (Bignoniaceae) / Fernanda Colombi Cansian – Curitiba: UFPR, 2010.

[19], 101f.: il.; 31 cm.

Orientadores: Marilis Dallarmi Miguel e Obdulio Gomes Miguel

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, UFPR, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, 2010.

Referências bibliográficas: f. 97-101

1. *Tynanthus micranthus*. 2. Bignoniaceae. Atividade Antioxidante. 4. Alelopatia. 5. Atividade Antimicrobiana. 6. Toxicidade. 7. Tirosinase. 8. Espectroscopia. 9. Fitoquímica - Tese. I. Miguel, Marilis Dallarmi. II. Miguel, Obdulio Gomes. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”.*

(Chico Xavier)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à **Deus** pela minha existência e capacidade de realizar os meus objetivos.

Ao meu esposo **Cássio** e minha filha **Eduarda** pelo apoio, incentivo, compreensão, amor e paciência nos momentos desafiantes.

Aos meus **pais** que lapidaram minha personalidade e me oferecem todo seu amor incondicional.

À **Universidade Federal do Paraná** e ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas** pela oportunidade.

À minha orientadora **Prof^a Dr^a Marilis Dallarmi Miguel** e co-orientador **Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel** pelos ensinamentos, paciência, confiança e amizade.

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

Ao Sr. **Eugênio** e Sr^a **Sara** da Fazenda Água Azul e Sr^a **Simoni** da Prefeitura de Quinta do Sol/PR pela coleta e envio do material vegetal.

Ao **Departamento de Química e Bioquímica** da Universidade Federal do Paraná pelos espectros de ressonância magnética nuclear e CG-EM.

À **Angela**, microbiologista do Hospital de Clínicas e equipe do **Michel**, pelo auxílio nas análises microbiológicas e tirosinase, respectivamente.

Às amigas **Camila A. M. Marques** e **Viviane L. Busnardo**, pelo incentivo dado para a realização deste novo projeto de vida.

Às doutorandas **Cristina Mayumi S. Miyasaki**, **Cristina Peitz**, **Milena Kalegari** e **Josiane de Fátima G. Dias** pelas sugestões, compreensão e amizade.

À todos os **colegas** de mestrado e iniciação científica, pela amizade e companheirismo.

À todos os **professores** do programa e aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS	9
	LISTA DE GRÁFICOS	11
	LISTA DE TABELAS	12
	LISTA DE SIGLAS	14
	LISTA DE SÍMBOLOS	16
	RESUMO	18
	ABSTRACT	19
1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL.....	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	REVISÃO DA LITERATURA	23
3.1	ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO	23
3.2	SINONIMIA E NOMES POPULARES.....	23
3.3	DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA	24
3.4	USO POPULAR.....	25
3.5	FAMÍLIA BIGNONIACEAE	26
3.5.1	Aspectos Agronômicos	27
3.6	GÊNERO <i>Tynanthus</i>	28
3.7	ATIVIDADES BIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS DAS PLANTAS	30
3.7.1	Atividade Microbiológica	30
3.7.2	Ensaio Toxicológico.....	31
3.7.3	Alelopatia	31
3.7.4	Atividade Antioxidante	32
3.7.5	Ensaio <i>In Vitro</i> da Atividade da Enzima Tirosinase.....	33

3.7.6	Atividades Biológicas e Farmacológicas da Família	34
3.8	FITOQUÍMICA DA FAMÍLIA BIGNONIACEAE	35
3.9	β -SITOSTEROL	40
3.10	APIGENINA.....	40
4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	COLETA, IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA E EXSICATA.....	42
4.2	DETERMINAÇÃO DE UMIDADE	42
4.3	DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS.....	43
4.4	ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	43
4.4.1	Preparo do Extrato Hidroalcoólico a 20%	44
4.4.1.1	Partição do extrato hidroalcoólico.....	44
4.4.2	Pesquisa de Flavonóides.....	45
4.4.2.1	Teste do oxálico bórico ou reação de Taubock	46
4.4.2.2	Ensaio de Pacheco	46
4.4.2.3	Ensaio com Zn e HCl	46
4.4.2.4	Pesquisa de Leucoantocianidinas	47
4.4.3	Pesquisa de Alcalóides.....	47
4.4.4	Pesquisa de Cumarinas.....	48
4.4.5	Pesquisa de Antraquinonas e Naftoquinonas	49
4.4.6	Pesquisa de Esteróis e Triterpenos	50
4.5	FLUXOGRAMA	51
4.6	PREPARO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES.....	51
4.6.1	Extrato Bruto Etanólico.....	51
4.6.1.1	Determinação de cor, pH e teor de sólidos	52
4.6.2	Partição dos Extratos Brutos Etanólicos.....	53
4.7	OBTENÇÃO DE ÓLEOS VOLÁTEIS.....	53

4.8	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS	54
4.8.1	Isolamento de Constituintes Químicos.....	54
4.8.2	Caracterização dos Constituintes Químicos Isolados	55
4.9	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	56
4.9.1	Avaliação da Atividade Antimicrobiana	56
4.9.2	Ensaio de Toxicidade com <i>Artemia salina</i>	58
4.9.3	Estudo da Atividade Alelopática	58
4.9.3.1	Germinação.....	60
4.9.3.2	Crescimento	60
4.9.4	Atividade Antioxidante	61
4.9.4.1	Formação do complexo fosfomolibdênico.....	61
4.9.4.2	Redução do radical DPPH.....	62
4.9.5	Ensaio <i>In Vitro</i> da Atividade da Enzima Tirosinase.....	63
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1	UMIDADE E CINZAS TOTAIS.....	65
5.2	ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE FITOQUÍMICA	65
5.3	PREPARO DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS.....	67
5.4	PARTIÇÃO DOS EXTRATOS	67
5.5	CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO VOLÁTIL	68
5.6	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS QUÍMICOS ...	69
5.6.1	Identificação da Amostra FHC1	70
5.6.2	Identificação da Amostra FHF1	74
5.6.3	Identificação da Amostra FCC1	75
5.6.4	Análise das Frações Hidroalcoólicas Remanescentes do Caule e das Folhas	80

5.7	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE <i>Tynanthus micranthus</i> CORR. MÉLLO .	83
5.7.1	Atividade Microbiológica	83
5.7.2	Teste de Toxicidade Frente <i>Artemia salina</i>	83
5.7.3	Alelopatia	85
5.7.3.1	Avaliação da germinação	85
5.7.3.2	Avaliação do crescimento.....	86
5.7.4	Atividade Antioxidante	91
5.7.4.1	Ensaio pelo método da redução do complexo do fosfomolibdênio.....	91
5.7.4.2	Ensaio antioxidante pela redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)	92
5.7.5	Ensaio <i>In Vitro</i> da Atividade da Enzima Tirosinase.....	94
6	CONCLUSÃO	95
	REFERÊNCIAS	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– <i>Tynanthus micranthus</i> Corr. Mélo	25
Figura 2	– Mapa de localização de <i>Tynanthus micranthus</i> Corr. Mélo	29
Figura 3	– Estrutura do lapachol	35
Figura 4	– Estruturas de furanonaftoquinonas isoladas da casca de <i>Tabebuia incana</i>	36
Figura 5	– Estrutura química dos constituintes químicos de <i>Tabebuia heptaphylla</i>	37
Figura 6	– Constituintes químicos de <i>Arrabidaea samydoides</i>	38
Figura 7	– Compostos isolados da casca de <i>Tynanthus panurensis</i>	39
Figura 8	– Estrutura básica dos flavonóides	45
Figura 9	– Estrutura química do alcalóide cafeína	48
Figura 10	– Estrutura básica das cumarinas	49
Figura 11	– Estruturas básicas das quinonas	50
Figura 12	– Estrutura básica de esteróides e triterpenos	50
Figura 13	– Fluxograma	51
Figura 14	– Preparo dos extratos brutos em aparelho de Soxhlet	52
Figura 15	– Perfil cromatográfico do óleo extraído das folhas de <i>Tynanthus micranthus</i> Corr. Mélo obtido por CG-EM	68
Figura 16	– Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 Hz) da substância FHC1	71
Figura 17	– Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 50 Hz) da substância FHC1	72
Figura 18	– Espectro de RMN DEPT da substância FHC1	72
Figura 19	– Estrutura do β-sitosterol	73

Figura 20 – Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 200 Hz) da substância FHF1	74
Figura 21 – Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 50 Hz) da substância FHF1	75
Figura 22 – Espectro de RMN ^1H (DMSO-D_6 , 200 Hz) da substância FCC1	76
Figura 23 – Espectro de RMN ^{13}C (DMSO-D_6 , 50 Hz) da substância FCC1	77
Figura 24 – Estrutura química da apigenina	78
Figura 25 – Cromatograma obtido por CLAE da substância FCC1	79
Figura 26 – Espectro UV da substância FCC1	80
Figura 27 – Perfil cromatográfico obtido por CLAE da fração hidroalcoólica remanescente do caule.....	81
Figura 28 – Perfil cromatográfico obtido por CLAE da fração hidroalcoólica remanescente das folhas	82

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Resultados dos Índices de Velocidade de Germinação (IVG) em Ensaio Alelopático das Amostras CC e HAF.	86
Gráfico 2 – Resultados Percentuais do Crescimento do Hipocótilo em Ensaio Alelopático da Amostra CC.	87
Gráfico 3 – Porcentagem de Inibição do Complexo Fosfomolibdênio das amostras CF, HC, EBF e HR.....	92
Gráfico 4 – Curva da Vitamina C pela Redução do DPPH.....	92
Gráfico 5 – Curva da Rutina pela Redução do DPPH.....	93
Gráfico 6 – Atividade frente à Enzima Tirosinase da Fração Hidroalcoólica da Folha.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Enquadramento Taxonômico de <i>Tynanthus micranthus</i> Corr. Mélo	23
Tabela 2 – Locais de Coleta de <i>Tynanthus micranthus</i> Corr. Mélo Registradas no Missouri Botanical Garden.....	29
Tabela 3 – Equações para Determinação da Atividade Antioxidante Relativa ..	62
Tabela 4 – Fórmula para Determinação de Porcentagem da Atividade Antioxidante	63
Tabela 5 – Resultados da Determinação de Umidade e Cinzas Totais.....	65
Tabela 6 – Resultados do Ensaio Sistemático de Análise Fitoquímica	65
Tabela 7 – Resultados Obtidos com os Extratos Brutos	67
Tabela 8 – Rendimento das Frações Extraídas por Soxhlet.....	67
Tabela 9 – Componentes Identificados no Óleo Volátil Extraído das Folhas de <i>Tynanthus micranthus</i> Corr. Mélo.....	69
Tabela 10 – Isolamento e Caracterização de Compostos Químicos	70
Tabela 11 – Valores de Deslocamentos Químicos (δ) de RMN 13C/DEPT para FCC1 e Dados da Literatura para o β -Sitosterol.....	73
Tabela 12 – Valores de Deslocamentos Químicos (δ) de RMN 1H e 13C para FCC1 e Dados da Literatura para Apigenina.....	78
Tabela 13 – Metodologia Utilizada para CLAE da Substância FCC1.	79
Tabela 14 – Metodologia Utilizada para CLAE das Frações HAC e HAF.....	82
Tabela 15 – Concentração Inibitória Mínima dos Extratos Brutos de <i>Tynanthus miranthus</i> Corr. Mélo	83
Tabela 16 – Resultados de DL ₅₀ no Teste de Toxicidade Frente à <i>Artemia salina</i>	84

Tabela 17 – Teste de Scott-Knott realizado para avaliar os Índices de Velocidade de Germinação de <i>Lactuca sativa</i> no Ensaio Alelopático com Extrato Bruto e Frações de <i>Tynanthus micranthus</i> Corr. Mélo	85
Tabela 18 – Teste de Scott-Knott para Avaliação do Crescimento no Ensaio Alelopático com as Raízes de <i>Tynanthus micranthus</i> Corr. Mélo ...	88
Tabela 19 – Teste de Scott-Knott para Avaliação do Crescimento no Ensaio Alelopático com o Caule de <i>Tynanthus micranthus</i> Corr. Mélo	89
Tabela 20 – Teste de Scott-Knott para Avaliação do Crescimento no Ensaio Alelopático com as Folhas de <i>Tynanthus micranthus</i> Corr. Mélo....	90
Tabela 21 – Resultados da Atividade Antioxidante pela Redução do Complexo do Fosfomolibdênio	91
Tabela 22 - Resultados de IC ₅₀ e Teste de Tukey para Redução do DPPH	93

LISTA DE SIGLAS

ABIFISA	– Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção Da Saúde
AEC	– Fração acetato de etila caule
AEF	– Fração acetato de etila folha
AER	– Fração acetato de etila raiz
APG	– Angiosperm Phylogeny Group
ATCC	– American Type Culture Collection
CC	– Fração clorofórmio caule
CCD	– Cromatografia em Camada Delgada
CF	– Fração clorofórmio folha
CG-EM	– Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE	– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	– Clinical and Laboratory Standards Institute
CIM	– Concentração Inibitória Mínima
CR	– Fração clorofórmio raiz
EBC	– Extrato bruto do caule
EBF	– Extrato bruto da folha
EBR	– Extrato bruto da raiz
<i>et al.</i>	– E Colaboradores
HAC	– Fração hidroalcoólica caule
HAF	– Fração hidroalcoólica folha
HAR	– Fração hidroalcoólica raiz
HC	– Fração hexano caule
HDL	– High Density Lipoprotein
HF	– Fração hexano folha

HR	– Fração hexano raiz
IV	– Infravermelho
IVG	– Índice de Velocidade de Germinação
LDL	– Low Density lipoprotein
MBM	– Museu Botânico Municipal
PA	– Puro para Análise
PM	– Peso Molecular
PPM	– Parte por Milhão
PR	– Paraná
RMN ¹³ C	– Ressonância Magnética Nuclear de Carbono -13
RMN ¹ H	– Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RPM	– Rotações por Minuto
s/	– Singleto Largo
TSA	– Tryptic Soy Agar
UFC	– Unidades Formadoras de Colônia
UI	– Unidade Internacional
UV	– Ultravioleta
UV	– Ultra-Violeta

LISTA DE SÍMBOLOS

%	– Por cento
>	– Maior que
<	– Menor que
µg	– Micrograma
µg/mL	– Micrograma por mililitro
µL	– Microlitro
1/3	– Um terço
β	– Beta
C	– Carbono
CD ₃ OD	– Metanol deuterado
CDCl ₃	– Clorofórmio deuterado
CH ₂	– Grupo Metileno
CH ₃	– Grupo Metil
cm	– Centímetro
d	– Dupleto
dd	– Duplo dupleto
DL ₅₀	– Dose letal média
DMSO	– Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	– Dimetilsulfóxido deuterado
DPPH	– 2,2- difenil-1-picril-hidrazila
g	– Grama
g/L	– Gramas por Litro
H ₂ SO ₄	– Ácido sulfúrico
H ₃ BO ₃	– Ácido bórico
HCl	– Ácido clorídrico

Hz	– Hertz
IC ₅₀	– Concentração inibitória média
J	– Constante de Acoplamento
mDO	– Mili Densidade Óptica
mg	– Miligramas
mg/mL	– Miligrama por mililitro
mL	– Mililitro
mm	– Milímetros
mm ²	– Milímetros Quadrados
M	– Molar
N	– Normal
Na ₂ SO ₄	– Sulfato de sódio
NaCl	– Cloreto de Sódio
NaOH	– Hidróxido de sódio
NH ₄ OH	– Hidróxido de amônio
nm	– Nanômetro
°C	– Graus Celsius
pH	– Potencial hidrogeniônico
v/v	– Volume/volume

RESUMO

A espécie *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo, pertencente à família Bignoniaceae, é popularmente conhecida como “Cipó Cravo” ou “Craveiro”, sendo usualmente utilizada como estimulante e afrodisíaca, comumente encontrada no norte do Paraná. A falta de estudos sobre esta espécie motivou o desenvolvimento deste trabalho que tem como objetivo geral, a avaliação fitoquímica da planta e de suas atividades biológicas. Estudos realizados com outras espécies de *Tynanthus* indicam a presença de alguns compostos como cumarinas, fenilpropanóides e esteróides nos ramos, folhas e raízes. As partes da planta utilizadas para o estudo desta espécie foram folhas, caules e raízes. As atividades biológicas avaliadas foram: alelopatia, toxicidade frente à *Artemia salina*, atividade antibacteriana, atividade antioxidante e teste *in vitro* de inibição da tirosinase. Resultados indicaram a presença do β -sitosterol na fração hexânica do caule, um hidrocarboneto de cadeia longa na fração hexânica da folha e a flavona apigenina na fração clorofórmio do caule. Na atividade alelopática foi verificada a influência da fração clorofórmio do caule na germinação e crescimento do hipocótilo das sementes de *Lactuca sativa*. Algumas frações desenvolveram toxicidade frente à *Artemia salina* em determinadas concentrações além de exercer atividade antioxidante similar à rutina. Na avaliação antibacteriana os extratos brutos demonstraram atividade sobre algumas bactérias analisadas e a fração hidroalcoólica remanescente da folha apresentou atividade frente à tirosinase na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Palavras chave: Cipó Cravo, *Tynanthus micranthus*, Bignoniaceae.

ABSTRACT

The species *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo, belonging to the Bignoniaceae family, is popularly known as "Clove Vine" or "Craveiro" and is usually used as a stimulant and aphrodisiac, commonly found in northern Paraná. The lack of studies of this species motivated the development of this work which has the general objective, the assessment of plant phytochemistry and biological activities. Studies with other species of *Tynanthus* indicate the presence of some compounds such as coumarins, phenylpropanoids and steroids in the branches, leaves and roots. The plant parts used for the study of this species were leaves, stems and roots. The biological activities were evaluated: allelopathy, toxicity on *Artemia salina*, antibacterial activity, antioxidant activity and *in vitro* test of inhibition of tyrosinase. Results indicate the presence of the β -sitosterol in the hexane fraction of the stem, a long chain hydrocarbon in the hexane fraction of the leaf and the flavone apigenin in the chloroform fraction of the stem. Allelopathic activity was observed influence of fraction chloroform of the stem on germination and growth of the hypocotyls of the seeds of *Lactuca sativa*. Some fractions developed in the *brine shrimp* toxicity at certain concentrations in addition to exerting antioxidant activity similar to rutin. The crude extracts showed bacterial activity on the strains analyzed and the remaining fraction hydroalcoholic leaf showed activity against the tyrosinase concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$.

Key words: *Cipó Cravo*, *Tynanthus micranthus*, *Bignoniaceae*.

1 INTRODUÇÃO

A cultura da utilização de plantas medicinais no Brasil partiu das inúmeras tribos que aqui viviam, aliado ao conhecimento trazido pelos europeus na época de colonização. Os escravos africanos também contribuíram com a utilização de plantas trazidas da África. Estes conhecimentos foram transmitidos e aprimorados de geração em geração e tornaram-se a base da tradição no uso de plantas medicinais no Brasil (LORENZI, MATOS, 2002).

Atualmente, a utilização de plantas medicinais em muitas localidades do Brasil, ainda é a única alternativa de tratamento para recuperação e manutenção da saúde. Além disto, muitas pessoas optam por tratamentos à base de produtos naturais imaginando que a utilização de medicamentos sintéticos possa vir acompanhada de algum efeito indesejado.

A Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde, estima que 82 % da população brasileira utilize produtos a base de ervas, o que movimenta anualmente um bilhão em toda sua cadeia produtiva empregando mais de cem mil pessoas no Brasil (ABIFISA, 2009).

A diversidade biológica brasileira é vasta, sendo esta magnitude pouco conhecida tamanha a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microorganismos, sendo que 55.000 espécies vegetais estão catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (SIMÕES *et al.*, 2007).

A terapia com plantas medicinais e fitoterápicos deixou de ser fundamentada apenas pelo uso tradicional e passou a ser apoiada por estudos científicos envolvendo os aspectos de qualidade, eficácia e segurança. Por isso, a Organização Mundial da Saúde (OMS), tem promovido vários encontros internacionais para desenvolver critérios que garantam a qualidade do tratamento com produtos naturais, considerando efeitos tóxicos e adversos que os mesmos possam causar ao usuário (CUNHA, SILVA e ROQUE, 2003).

A ANVISA, por meio da Resolução nº 48, de 16 de março de 2004, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, tenta através desta, garantir a qualidade, eficiência e segurança dos medicamentos fitoterápicos comercializados no Brasil (ANVISA, 2009).

O estudo fitoquímico da riqueza vegetal brasileira ainda pouco explorada torna-se um tema importante e decisivo para o Brasil, num futuro próximo, pelas possibilidades que oferecem para o desenvolvimento de novos medicamentos (YUNES, CALIXTO, 2001).

Diante desta constatação, a falta de estudos sobre a espécie *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo vinculada à falta de insumos existentes no mercado para diversas patologias possibilita o desenvolvimento deste trabalho, que tem como objetivo a elucidação de alguns componentes químicos da planta além da avaliação de suas atividades biológicas.

Toda a revisão feita juntamente com os resultados obtidos servirá para ajudar a esclarecer os possíveis componentes responsáveis pela ação terapêutica desta espécie, além de avaliar outras características que possam determinar uma melhor utilização desta planta.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os constituintes químicos de *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo e suas possíveis atividades biológicas para uma prévia avaliação do potencial desta espécie.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Promover a extração, isolamento e identificação de compostos químicos presentes no vegetal;
- Estudar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos;
- Avaliar a toxicidade dos extratos brutos e frações frente à *Artemia salina*;
- Analisar a atividade alelopática dos extratos brutos e frações sobre as sementes de *Lactuca sativa*;
- Verificar a atividade antioxidante dos extratos brutos e frações com DPPH e Fosfomolibdênio;
- Avaliar a atividade *in vitro* dos extratos e frações frente à enzima tirosinase.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO

Tynanthus micranthus Corr. Mélo constitui os seguintes níveis de organização, conforme tabela 1.

Tabela 1 – Enquadramento Taxonômico de *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo

Enquadramento Taxonômico	CRONQUIST (1981)	ENGLER (JOLY, 1998)
Reino	Plantae	Plantae
Divisão	Magnoliophyta	Angiospermae (Anthophyta)
Classe	Magnoliopsida	Dicotyledoneae
Subclasse	Asteridae	Sympetalae (Gamopetalae)
Ordem	Scrophulariales	Tubiflorae
Família	Bignoniaceae	Bignoniaceae
Gênero	<i>Tynanthus</i>	<i>Tynanthus</i>
Espécie	<i>micranthus</i>	<i>Micranthus</i>
Nome	<i>Tynanthus micranthus</i>	<i>Tynanthus micranthus</i>

Fonte: a autora, 2010.

O APG III é um outro sistema de taxonomia vegetal moderno utilizado na classificação de plantas com flor. De acordo com este sistema, a espécie *micranthus*, do gênero *Tynanthus*, pertence ao clado das Angiospermas, divisão Eudicotiledônea Núcleo, grupo Asterideas, sub grupo Euasterideas I, ordem Lamiales e família Bignoniaceae (CHASE e REVEAL, 2009).

3.2 SINONÍMIA E NOMES POPULARES

A palavra *Tynanthus* deriva do grego: *tynnos*=pequeno; *anthos*=flor, com referência às suas flores muito pequenas (SANDWICH e HUNT, 1974).

Espécies do gênero *Tynanthus* são lianas conhecidas popularmente como cipó-cravo, devido ao forte odor de cravo que exala dos caules, quando cortados ou macerados (LOPES *et al.*, 2008).

A espécie *Tynanthus micranthus* Corr. Méllö é conhecida popularmente como Cipó-Cravo ou Craveiro, não possuindo sinonímia para esta espécie em levantamentos feitos no Missouri Botanical Garden e no Museu Botânico de Curitiba.

3.3 DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA

As plantas da família *Bignoniaceae* são lenhosas, arbustivas ou arbóreas e também trepadeiras. Estas possuem frequentemente gavinhas foliares, às vezes modificadas em fixadores com unhas (*Bignonia*). Folhas compostas raramente simples (*Crescentia*), de disposição oposta. Flores grandes e vistosas, diclamídeas, hermafroditas, pentâmeras, de simetria zigomorfa. Corola ligeiramente bilabiada. Androceu formado por 4 estames didínamos e 1 estaminódio, às vezes muito desenvolvido e glandular (*Jacaranda*). Uma teca de cada um dos estames férteis às vezes não desenvolvida (*Jacaranda*). Ovário sempre súpero, bicarpelar, bilocular com 2 lóculos e muitos óvulos. Placenta sempre bipartida. Fruto capsular seco, loculicida ou septicida, às vezes cápsula septífraga, sempre com sementes aladas; raramente indeiscente com sementes não aladas (*Crescentia*) (JOLY, 1985).

O Gênero *Tynanthus* caracteriza-se por ter fluorescência um tirso axilar ou terminal, quando axilar comumente mais curto do que a folha oposta. Flores muito pequenas, brancas, palidamente amarelas ou palidamente lilases; cálice muito pequeno, campanulado, cada um truncado e denticulado ou muito curtamente ou conspicuamente dentado, às vezes bilabiadamente fendido; corola muito curtamente campanulada – afunilada com tubo curvado e limbo profundamente bilabiado; anteras glabras com teças curvadas para cima separadas por um conectivo conspícuo; disco muito incospícuo em forma de prato; ovário ovóide oblongo; óvulos 4 – seriados em cada lóculo, cerca de 7 – 8 em cada série. O fruto é uma cápsula linear achatada – tetrágona; valvas paralelas ao septo com suas margens levantadas ou aladas e irregularmente rugosas ou despedaçadas quando madura e

suas superfícies quase lisas com a nervura central não ou apenas salientes; Sementes transversalmente oblongas com asas hialinas, membranáceas, largas. As Lianas, trepadeiras por gavinhas trífidas; raminhos cilíndricos ou mais ou menos tetrágonos, sem áreas glandulares nos nós. Folhas 2-3 foliadas; pseudoestípulas às vezes foliáceas (SANDWICH e HUNT, 1974).

Por falta de informações em literatura sobre a espécie em estudo, utiliza-se a descrição feita pelo Museu do Jardim botânico, aonde o coletor descreve *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo como uma trepadeira lenhosa com flores alvas e pequenas e folhas com sabor de cravo.

Algumas das características citadas na descrição macroscópica e microscópica das espécies da família e do gênero desta planta podem ser observadas na figura 1.



Figura 1 – *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo
Fonte: UDULUTSCH, 2004.

3.4 USO POPULAR

As espécies do gênero *Tynanthus* são usadas na medicina popular para diversas finalidades.

Correa e Penna (1984) comentaram sobre a utilização de *Tynanthus fasciculatus* como planta ornamental, afirmando que seu caule exsuda água potável.

A casca da raiz de *Tynanthus fasciculatus* é a parte preferida na composição das “garrafadas” e considerada estimulante, afrodisíaca e estomáquica. É usada no tratamento da dispepsia, e também indicada como carminativa, antidiarréica e no combate a vermes intestinais (LOPES *et al.*, 2008).

Na Amazonia Peruana, a espécie *Tynanthus panurensis* tem sido tradicionalmente usada como afrodisíaca, tônica e energizante, bem como analgésica e no tratamento de reumatismo e diabetes (PLAZA *et al.*, 2005).

A espécie em estudo *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo é utilizada popularmente como estimulante e afrodisíaca pelos integrantes da comunidade local.

3.5 FAMÍLIA BIGNONIACEAE

A família Bignoniaceae possui ampla distribuição nas regiões tropicais de todo o mundo, especialmente freqüente nos trópicos americanos (JOLY, 1985) e reúne 120 gêneros, com aproximadamente 750 espécies, geralmente tropicais espontâneas na América do Sul, incluindo árvores, lianas, arbustos e raramente ervas (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002).

Esta família possui grande variedade de usos etnobotânicos e econômicos. São importantes para a indústria madeireira e são utilizadas como planta ornamental, além do seu grande potencial medicinal. Há relatos de 36 gêneros de Bignoniaceae que são utilizados na medicina popular, sendo 27 gêneros de lianas e nove de árvores (LOPES *et al.*, 2008).

No Brasil, os gêneros mais comuns são *Tabebuia*, que inclui os Ipês e o Pau-d’arco; *Pyrostegia*, Flor-de-São-João; a medicinal Unha-de-Gato do gênero *Bignonia*, e as várias espécies do gênero *Zeyhera* (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002).

Dentre os gêneros introduzidos e cultivados pelas lindas flores destacam-se: *Tecomaria*, a falsa-flor-de-são-joão; *Podranea* (*Pandorea*), linda trepadeira de flores cor-de-rosa; *Spathodea*, originária da África, com lindas e enormes flores vermelhas,

é uma árvore grande com botões florais, como se fossem pequenas bisnagas cheias de líquido (JOLY, 1985).

Nos cerrados é relativamente comum um arbusto de flores amarelas, conhecido pelo nome popular de bolsa de pastor (*Zeyheria Montana*) (SOUZA e LORENZI, 2005).

3.5.1 Aspectos Agronômicos

Os estudos agronômicos devem comportar algumas etapas as quais inclui observar os aspectos fenológicos, forma de propagação, época de plantio, época de coleta, necessidades nutricionais, ocorrência de pragas e enfermidades, densidade das plantas, interações específicas das plantas, secagem, beneficiamento e armazenagem. Além disto, é de grande importância a identificação botânica correta, as variedades e a forma de cultivo que estão diretamente relacionados à quantificação das substâncias ativas (MIGUEL e MIGUEL, 1999).

Poucas informações foram encontradas a respeito dos aspectos citados acima para a espécie em estudo.

Na coleta é importante a observação do terreno. Uma espécie que cresce em um ambiente hostil, como as florestas tropicais, onde a presença de insetos, fungos, vírus e bactérias é abundante, terá que se proteger e para isso, sintetiza compostos inseticidas, antifúngicos e/ou antivirais (HOSTETTMANN, QUEIROZ e VIEIRA, 2003).

As diferentes espécies de Bignoniaceae ocorrem em habitats florestais seco, úmido ou molhado se desenvolvendo em qualquer várzea tropical. Isto marca uma forte oposição à tendência geral mostrada pela maior parte das famílias. Porém, as Bignoniaceae são muito mais freqüentes em floresta seca do que em floresta úmida (GENTRY, 1980).

O Brasil é considerado o centro de dispersão da família Bignoniaceae que tem distribuição predominantemente tropical, compreendendo muitas lianas e alguns representantes arbóreos, arbustivos e mais raramente herbáceos (GENTRY, 1980).

As lianas em geral, são plantas heliófilas, e se desenvolvem melhor em ambientes com muita luminosidade, como clareiras e bordas (LOPES *et al.*, 2008).

Muitas espécies da Mata Atlântica possuem risco de extinção, e isso leva a necessidades de políticas e ações de conservação, aliando a importância de se obter grandes quantidades de matéria prima vegetal para a obtenção de substâncias dela derivadas (SIMÕES *et al.*, 2007).

O manejo apropriado, assim como a domesticação e o cultivo, são opções para obtenção de matéria-prima de origem natural, sendo a maneira mais adequada para conciliar as questões ecológicas, sociais e de saúde (SIMÕES *et al.*, 2007).

A casca do ipê roxo, a *Tabebuia heptaphylla*, uma bignoniaceae, possuía a fama de curar todos os males, tornando seu uso descontrolado. Os catadores retiravam a casca ao redor de todo o tronco o que causava a morte da árvore, assim a mesma tornou-se extinta ou muito rara em várias regiões (SEMA, 1995).

A maioria dos produtos florestais não madeireiros da Mata Atlântica e que inclui as espécies de Cipó Cravo, são coletados sem plano de manejo, portanto sem preocupação com a sustentabilidade da espécie. A falta de informações ecológicas sobre espécies de liana é um dos principais impedimentos para o uso sustentável de produtos florestais não-madeireiros. O fato de algumas espécies de lianas possuírem propriedades farmacêuticas extraordinárias tem resultado em uma colheita descontrolada, e isso, aliado à ausência de cultivo, pode ameaçar a sobrevivência dessas espécies (LOPES *et al.*, 2008).

3.6 GÊNERO *Tynanthus*

As espécies do gênero *Tynanthus* são lianas conhecidas popularmente como cipó-cravo e são utilizadas na medicina popular para os mais diversos fins (LOPES *et al.*, 2008).

Cerca de 12 espécies do gênero *Tynanthus* são conhecidas na América Tropical, desde o sudeste do México até Bolívia e Brasil, estendendo-se até o sul do Rio Grande do Sul (SANDWICH e HUNT, 1974).

A espécie *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo é encontrada no norte do Paraná e outras localidades, segundo o mapa de localização extraído do Missouri Botanical Garden (figura 2) e mais detalhadamente demonstrado na tabela 2.



Figura 2 – Mapa de localização de *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo

Fonte: MOBOT, 2009

Legenda: ■ Localização de *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo

Tabela 2 – Locais de Coleta de *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo Registradas no Missouri Botanical Garden

PAIS	ESTADO	DATA	COLETOR
Brasil	Mato Grosso Sul	21/10/1987	G. Hatschbach & Silva, J.M.
Brasil	Paraná	24/10/1985	Vieira, A.O.S. <i>et al.</i>
Brasil	Paraná	27/09/1985	Ejasuta, H.
Brasil	Paraná	16/05/2003	O. S. Ribas
Brasil	Paraná	13/10/1962	Gert Hatschbach
Brasil	Paraná	14/10/1965	Gert Hatschbach
Brasil	Paraná	10/1969	Gert Hatschbach
Brasil	Paraná	11/1966	Lindeman, J.C. & Haas
Brasil	Paraná	24/11/1966	Lindeman, J.C. & Haas
Brasil	Paraná	02/10/1985	Chagas, F. & Silva, J.F.
Brasil	Rondônia	18/11/1949	Silva, A. da
Brasil	São Paulo	30/09/1867	Mélo, J.C. de
Paraguai		27/10/1978	Bernardi, A.L.
Argentina	Missões	22/11/1994	Rivera, G. L., Prieto & P.
Argentina	Missões	09/12/1988	Guaglianone, E. R.
Argentina	Missões	11/08/1995	Vanni, R. O. & et al.
Brasil	Paraná	22/10/1969	Gert Hatschbach
Paraguai	Alto Paraná	14/10/1996	Schinini, A., Dematteis, M.

Fonte: MOBOT, 2009

As espécies mais conhecidas deste gênero, já possuindo alguns estudos científicos realizados com as mesmas, são *Tynanthus fasciculatus* e *paruniensis*.

A espécie *Tynanthus fasciculatus*, também conhecida como cipó-cravo, apresenta distribuição relativamente restrita, ocorrendo no Sudeste brasileiro, em Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro (LOPES *et al.* 2008).

Tynanthus paruniensis, também conhecida como "Clavo huasca" está presente na Floresta Amazônica e em outras partes tropicais da América do Sul (PLAZA *et al.*, 2005).

3.7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS DAS PLANTAS

A detecção das atividades biológicas dos metabólitos de determinada planta tem sido considerada o ponto de partida para auxiliar na detecção da utilidade de cada composto (COLEGATE e MOLINEUX, 1993).

Uma planta é uma verdadeira usina química capaz de produzir milhares de substâncias diferentes, onde apenas uma ou algumas são responsáveis pela atividade terapêutica ou tóxica. Os testes biológicos e farmacológicos simples são importantes para localizar a atividade procurada no extrato da planta e nas numerosas frações obtidas nas diferentes etapas de purificação e separação (HOSTETTMANN, QUEIROZ e VIEIRA, 2003).

A atividade farmacológica de uma dada espécie geralmente está associada à presença de metabólitos secundários como, compostos fenólicos, alcalóides, terpenóides, entre outros, e esses metabólitos podem ser restritos a determinados taxons podendo caracterizar quimicamente grandes grupos vegetais (JUDD, 1999).

3.7.1 Atividade Microbiológica

Na procura de produtos naturais bioativos é comum a utilização de técnicas que monitorem a atividade biológica em direção à um problema de interesse atual.

Depois da publicação sobre os dados positivos da penicilina, entre 1942 e 1944, muito esforço foi concentrado em descobrir novos antibióticos e foi o que aconteceu nos anos que se sucederam, tendo origem nos metabólitos de plantas (COLEGATE e MOLINEUX, 1993).

Tendo em vista o surgimento de muitos microorganismos multi-resistentes provocando diversas infecções oportunistas fatais, a pesquisa de novos agentes antimicrobianos se faz necessária no âmbito farmacêutico e cosmético.

3.7.2 Ensaio Toxicológico

Dentre os bioensaios utilizados de forma a complementar os estudos fitoquímicos, cita-se a toxicidade sobre *Artemia salina*, que é um microcrustáceo de água salgada comumente usada como alimento para peixes. Estes ensaios de letalidade são muito utilizados em análises preliminares de toxicidade geral (NASCIMENTO *et al.*, 2008).

Este ensaio parece capaz de detectar um amplo espectro de bioatividades presentes nos extratos brutos de plantas. A técnica é simples, de baixo custo, e utiliza pequenas quantidades de material para o ensaio (COLEGATE e MOLINEUX, 1993).

Os ovos deste crustáceo podem ser facilmente adquiridos em lojas de animais, e as larvas desenvolvem-se rapidamente em água salgada artificial (HOSTETTMANN, QUEIROZ e VIEIRA, 2003).

3.7.3 Alelopatia

Em 1937, o alemão Hans Molish conceituou pela primeira vez alelopatia, sendo este termo citado por diversos autores ao longo dos anos. Atualmente a alelopatia é definida pela *International Allelopathy Society* como sendo os processos que envolvem a produção de metabólitos secundários por plantas e

microorganismos que influenciam no crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos com efeitos positivos e negativos (DIAS *et al.*, 2005).

Os agentes alelopáticos, ou aleloquímicos, podem apresentar ação direta sobre a planta alvo alterando as propriedades e características nutricionais do solo ou indireta quando interferem nas populações e/ou atividade de organismos que habitam o solo. Os efeitos diretos são mais estudados e compreendem alterações celulares e metabólicas, incluindo modificações no funcionamento de membranas, na absorção de nutrientes e de água, na atividade fotossintética e respiratória, entre outras (MARASCHIN-SILVA e AQUILA, 2006).

Os produtos químicos alelopáticos pertencem a vários grupos de substâncias possuindo aproximadamente dez mil produtos conhecidos. A interferência alelopática dificilmente é provocada por um único fator isolado, mas à união e ação sinérgica conjunta de várias destas substâncias somadas às condições ambientais. Os compostos que mais comumente causam efeitos alelopáticos pertencem aos grupos dos ácidos fenólicos, cumarinas, terpenóides, flavonóides, alcalóides, glicosídeos, cianogênicos, derivados do ácido benzóico, taninos e quinonas complexas (PIÑA-RODRIGUES e LOPES, 2001).

3.7.4 Atividade Antioxidante

Várias doenças são originadas por espécies reativas do oxigênio inclusive o processo de envelhecimento. Diante disto, novas drogas contra os radicais livres são de grande interesse, inclusive os antioxidantes de origem natural. Estes compostos possuem mecanismos de ação diversos, incluindo-se a captura de oxigênio singlete, a desativação de radicais por reação de adição covalente, a redução de radicais peróxidos e a complexação de metais de transição (HOSTETTMANN, QUEIROZ e VIEIRA, 2003).

Nos processos metabólicos normais, a geração de espécies reativas de oxigênio e de espécies reativas de nitrogênio é compensada por um complexo sistema antioxidante endógeno, e o excesso destas espécies é que favorece a situação de *stress* oxidativo (YUNES, FILHO, 2007).

Com isto, torna-se interessante a avaliação da capacidade antioxidante das espécies vegetais, já que pode determinar uma característica importante para a descoberta de novas drogas.

3.7.5 Ensaio *In Vitro* da Atividade da Enzima Tirosinase

A tirosinase (fenol oxidase) é conhecida por ser uma enzima essencial para a biossíntese de melanina nas plantas, microorganismos e de células de mamíferos (MIYAZAWA *et al.*, 2003).

Muitos inibidores desta enzima são utilizados em produtos farmacêuticos e cosméticos com o objetivo de diminuir a produção excessiva de melanina nas camadas epidérmicas, assim como produtos estimulantes da tirosinase podem ser utilizados para doenças de hipopigmentação, como por exemplo, o vitiligo.

Considerando que algumas substâncias isoladas de plantas apresentam atividade sobre a tirosinase, principalmente as que possuem estrutura fenólica, tais como flavonóides, taninos, tocoferóis e derivados do ácido cinâmico, a flora brasileira constitui uma fonte potencial na descoberta de novos agentes (MACRINI *et al.*, 2009).

Um grande número de inibidores naturais e sintéticos da tirosinase vem sendo identificados. Eles podem ser classificados de acordo com a interferência causada nas etapas da melanogênese, tais como (CHANG, 2009):

- agentes redutores (que causam redução da *o*-dopaquinona à L-DOPA);
- sequestrantes da *o*-dopaquinona;
- substratos enzimáticos alternativos (compostos fenólicos, cujos produtos quinóides de reação absorvem numa diferente faixa espectral que o dopacromo);
- inativadores não-específicos enzimáticos (como alguns ácidos e bases que desnaturam a enzima);
- inativadores específicos da tirosinase (também chamados de substratos suicidas, já que se ligam irreversivelmente à enzima) e;

- inibidores específicos da tirosinase (se ligam reversivelmente à tirosinase reduzindo sua capacidade catalítica). Somente os inibidores específicos da enzima são considerados inibidores verdadeiros.

3.7.6 Atividades Biológicas e Farmacológicas da Família

Para a espécie *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo ainda não foram relatados estudos farmacológicos e de suas atividades biológicas.

As atividades farmacológicas de fenilpropanóides, como os obtidos de *Tynanthus panurensis*, já foram extensivamente analisadas. O verbascosídeo demonstrou possuir uma interessante atividade analgésica e um efeito de proteção contra a redução de comportamentos sexuais e de aprendizagem em camundongos, o que pode servir de evidência para o uso popular de *Tynanthus panurensis* como afrodisíaco (PLAZA *et al.*, 2005).

Importantes compostos já foram isolados de integrantes da família Bignoniaceae como o lapachol, que é uma substância de grande ocorrência na família, particularmente no gênero *Tabebuia* (*Tecoma*), juntamente com outras quinonas heterocíclicas não menos importantes do grupo (SILVA, FERREIRA e SOUZA, 2003).

As diversas atividades biológicas do lapachol, como atividade citostática, bacteriostática, antifúngica, cercaricida, tripanossomicida e antitérmica e de seus produtos de transformações biossintéticas ou químicas despertou o maior interesse pela química das plantas da família das Bignoniaceae nas duas últimas décadas (OLIVEIRA *et al.*, 1990).

A *Arrabidaea samydoides* apresenta atividade antitumoral, antifúngica e antioxidante. O estudo de Pauletti e Bolzani (2003) demonstrou ainda que a atividade no reparo do DNA apresentada pelo extrato bruto desta espécie manteve-se até frações semi purificadas. No entanto, as substâncias isoladas mostraram-se inativas.

No trabalho de Lima, Amorim e Fonseca (2003) a atividade antimicrobiana de uma mistura de dois isômeros de glicosídeos fenilpropanóides, o verbascosídeo e isoverbascosídeo da *Arrabidaea harleyi*, uma espécie integrante da família das

Bignoniaceae, mostrou-se ativa frente *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* e *Candida albicans*.

3.8 FITOQUÍMICA DA FAMÍLIA BIGNONIACEAE

A família Bignoniaceae destaca-se entre as famílias botânicas onde os metabólitos secundários são de ocorrência comum, como por exemplo, glicosídeos iridóides e alcalóides iridóides, naftoquinonas e antraquinonas, complexos ésteres e glicosídeos de *O*-difenólico, taninos, flavonóides, antocianinas e carotenóides (GENTRY, 1980).

As naftoquinonas constituem o grupo mais freqüente, do qual se destaca o metabólito lapachol (figura 3), isolado pela primeira vez no final do século passado por Paternó, teve sua química amplamente investigada por Hooker (OLIVEIRA *et al.*, 1990).

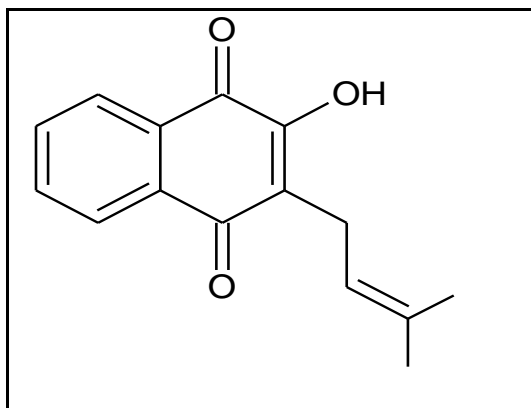


Figura 3 – Estrutura do lapachol
Fonte: OLIVEIRA *et al.*, 1990

Os gêneros mais estudados da família são *Jacaranda* e *Tabebuia*. Estudos indicam na prospecção fitoquímica de espécies de *Jacaranda*, a presença de esteróides e/ou triterpenos, açúcares redutores, amido, mucilagem e saponinas. Na espécie *Jacaranda mimosaeifolia* foi constatada a presença de hidroquinonas nas

folhas. No extrato metanólico de folhas e gravetos da espécie *Jacaranda caucana* foi isolado e elucidado estruturalmente um fitoquinóide chamado jacaranona, sendo posteriormente isolados os ácidos jacourâmico, jacarádico, jacarândico e o ácido 2 α -hidroxiursólico das folhas de *Jacaranda caucana* (MARTINS, CASTRO e CAVALHEIRO, 2008).

As espécies da família Bignoniaceae pertencentes ao gênero *Tabebuia*, conhecidas popularmente como “ipês”, apresentam uma grande diversidade de constituintes químicos, destacando-se as naftoquinonas e seus derivados, além de iridóides e antraquinonas (GARCEZ *et al.*, 2007).

O trabalho de Moraes *et al* (2007) destaca duas estruturas de furanonaftoquinonas (**1**: Dehidro-5-hidroxi-iso-a-lapachona e **2**: Dehidro-iso-a-lapachona), isoladas da casca de *Tabebuia incana*, conforme mostra figura 4.

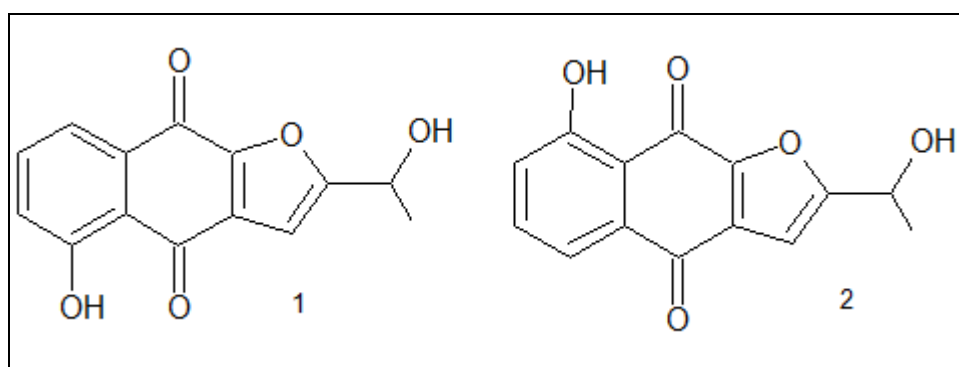


Figura 4 – Estruturas de furanonaftoquinonas isoladas da casca de *Tabebuia incana*

Fonte: MORAIS *et al.*, 2007

O estudo químico das cascas do caule de um exemplar de *Tabebuia heptaphylla*, também conhecida como ipê-roxo, coletado no Pantanal de Mato Grosso do Sul resultou no isolamento de quatorze substâncias, compreendendo dois triterpenos (**1**: 3 β , 6 β , 21 β -triidroxiolean-12-eno; **2**: Esqualeno); cinco iridóides (**3**: 6-O-*p*-hidroxibenzoilajugol; **4**: 6-O-*p*-metoxibenzoilajugol; **5**: 6-O-3',4'-dimetoxibenzoilajugol; **6**: 8 α -metil-8 β -hidróxi-6 β -(4'-hidróxi)benzoilóxi-1 α ,3 α -dimetóxi-octaidro-ciclopenta [c] pirano); **7**: 8 α -metil-8 β -hidróxi-6 β -(3',4'-dimetóxi)benzoilóxi-1 α ,3 α -dimetóxi-octaidro-ciclopenta [c] pirano); um dialdeído ciclopentênico (**8**: 2-formil-5-(3',4'-dimetoxibenzoilóxi)-3-metil-2-ciclopenteno-1-acetaldeído); um

glicosídeo feniletanóide (**9**: β -(3,4-diidroxifenil)-etil-O- α -L-ramnopiranosil-(1''-3')- β -D-(4'-D-cafeoil)-glucopiranosídeo); e três derivados do ácido benzóico (**10**: Ácido *p*-hidroxibenzóico; **11**: Ácido *p*-metoxibenzóico; **12**: Ácido 3,4-dimetoxibenzóico); além de dois esteróides (Figura 5) (GARCEZ *et al.*, 2007).

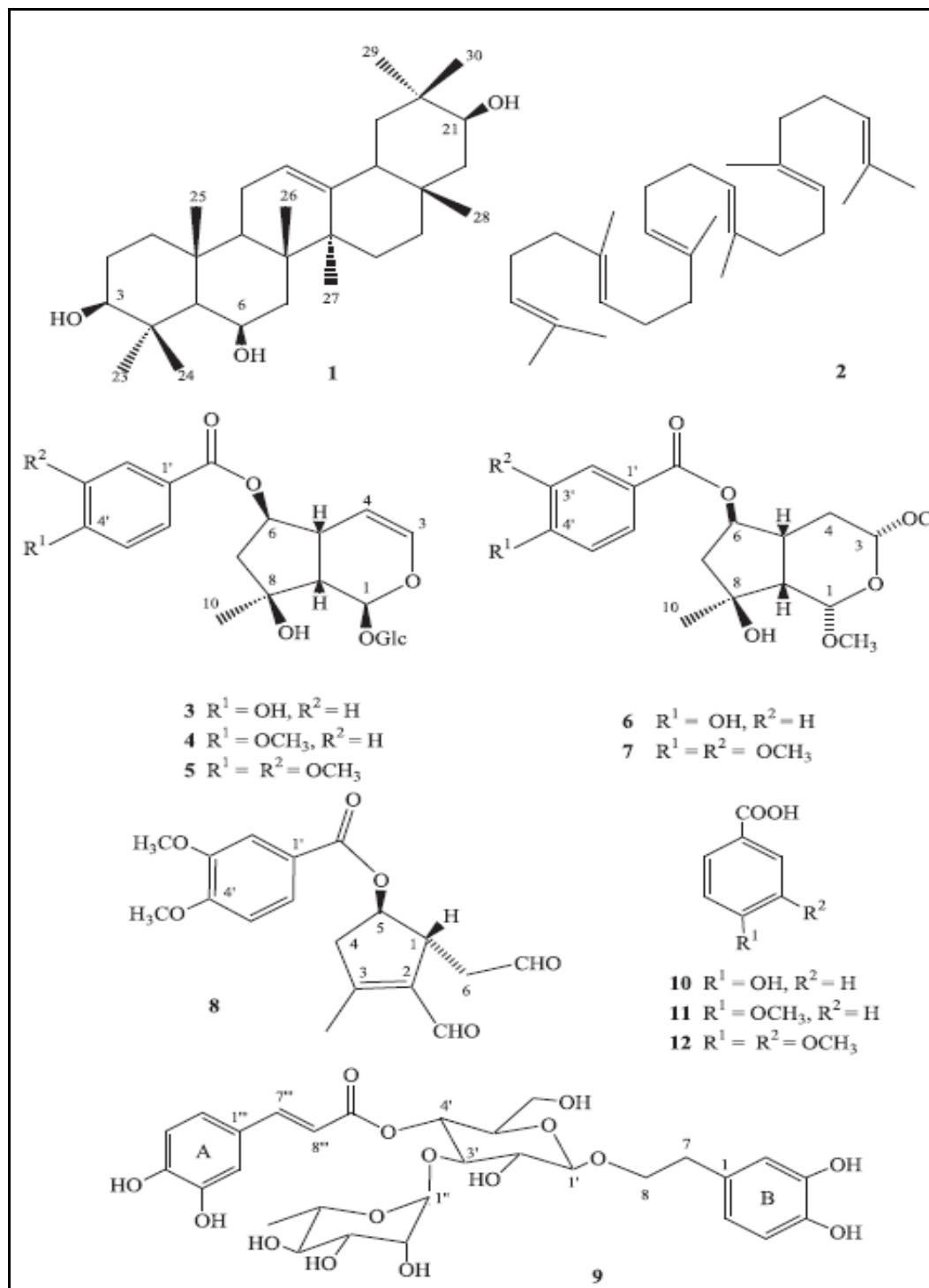


Figura 5 – Estrutura química dos constituintes químicos de *Tabebuia heptaphylla*.
 Fonte: GARCEZ *et al.*, 2007

A investigação fitoquímica de *Arrabidaea samydoides* resultou, conforme figura 6, no isolamento do lupeol (1), sitosterol (2), estigmasterol (3), crisina (4), $3\beta,16\alpha$ -diidroxiolean-12-eno (5), eritrodíol (6), uvaol (7) e ácido ursólico (8). Os triterpenos 6-7 foram identificados neste estudo como uma mistura na proporção de 2:1, respectivamente (PAULETTI e BOLZANI, 2003).

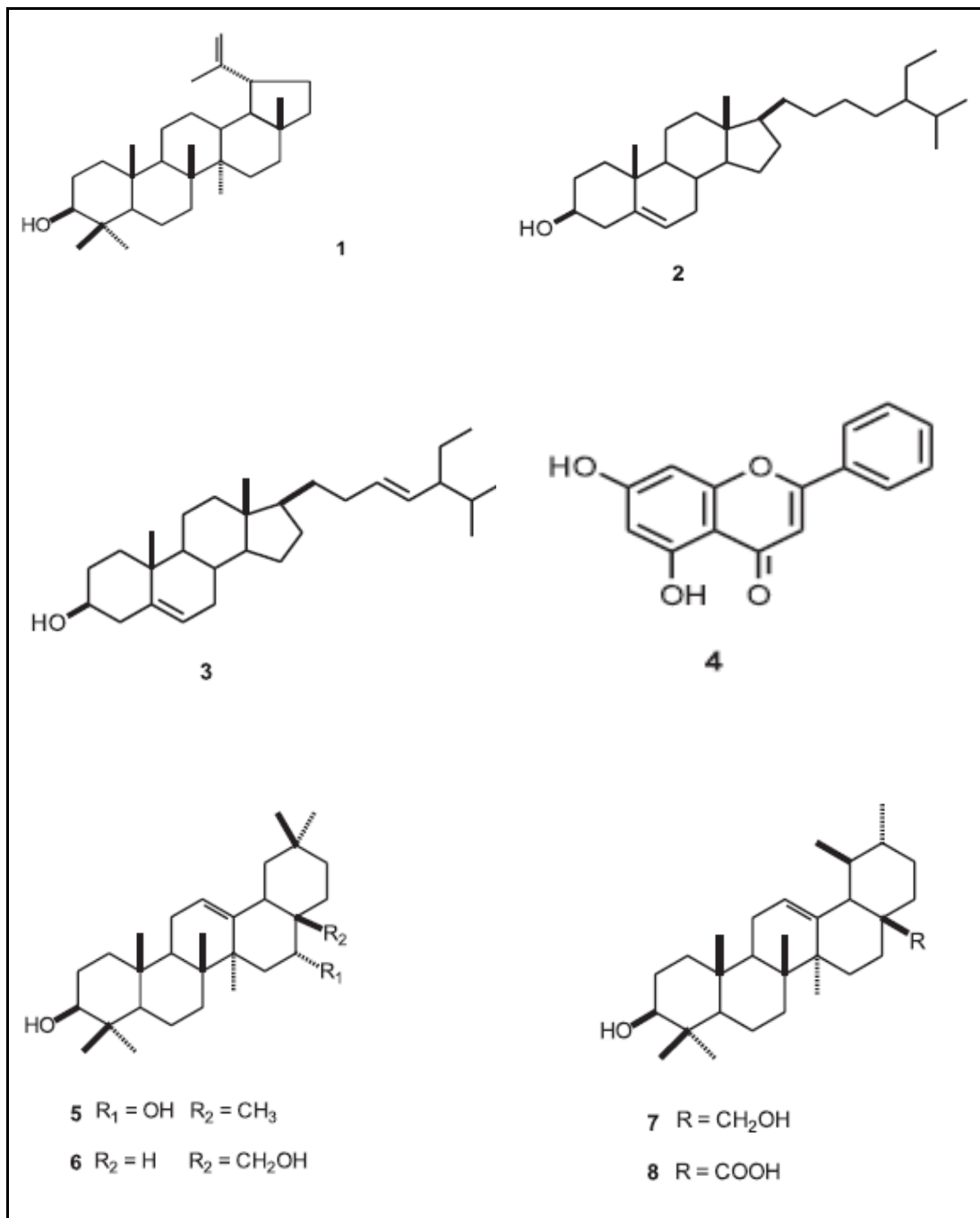


Figura 6 – Constituintes químicos de *Arrabidaea samydoides*
 Fonte: PAULETTI e BOLZANI, 2003

A espécie *Tynanthus fasciculatus* apresentou, conforme trabalho de Vilegas *et al* (1993), cumarinas, fenilpropanoides e esteróides nos ramos, folhas, raízes e casca da raiz, sendo que um novo constituinte foi isolado, o β -sitosterol- β -D-glucoside. As cumarinas estão presentes em todas as partes de *Tynanthus fasciculatus* e o ácido melilótico e seus derivados, que também estão presentes na planta, podem surgir das cumarinas ou vice versa (VILEGAS *et al.*, 1994).

A análise fitoquímica do extrato metanólico da casca de *Tynanthus panurensis*, conforme ilustra a figura 7, levou ao isolamento de um novo glicosídeo fenilpropanóide, o eugenol-O- β -D-xylopyranosyl-(1f5)-O- β -D-apiofuranosyl-(1f6)-O- β -D-glucopyranoside] (1), aos conhecidos verbascoside (2), leucosceptoside (3) e isoverbascoside (4) e ao flavonóide katchimoside (apigenin 8-C- β -D-xylopyranosyl-(1f6)- β -D-glucopyranoside) (5). O derivado eugenol foi o glicosídeo fenilpropanoide mais abundantemente encontrado (PLAZA *et al.*, 2005).

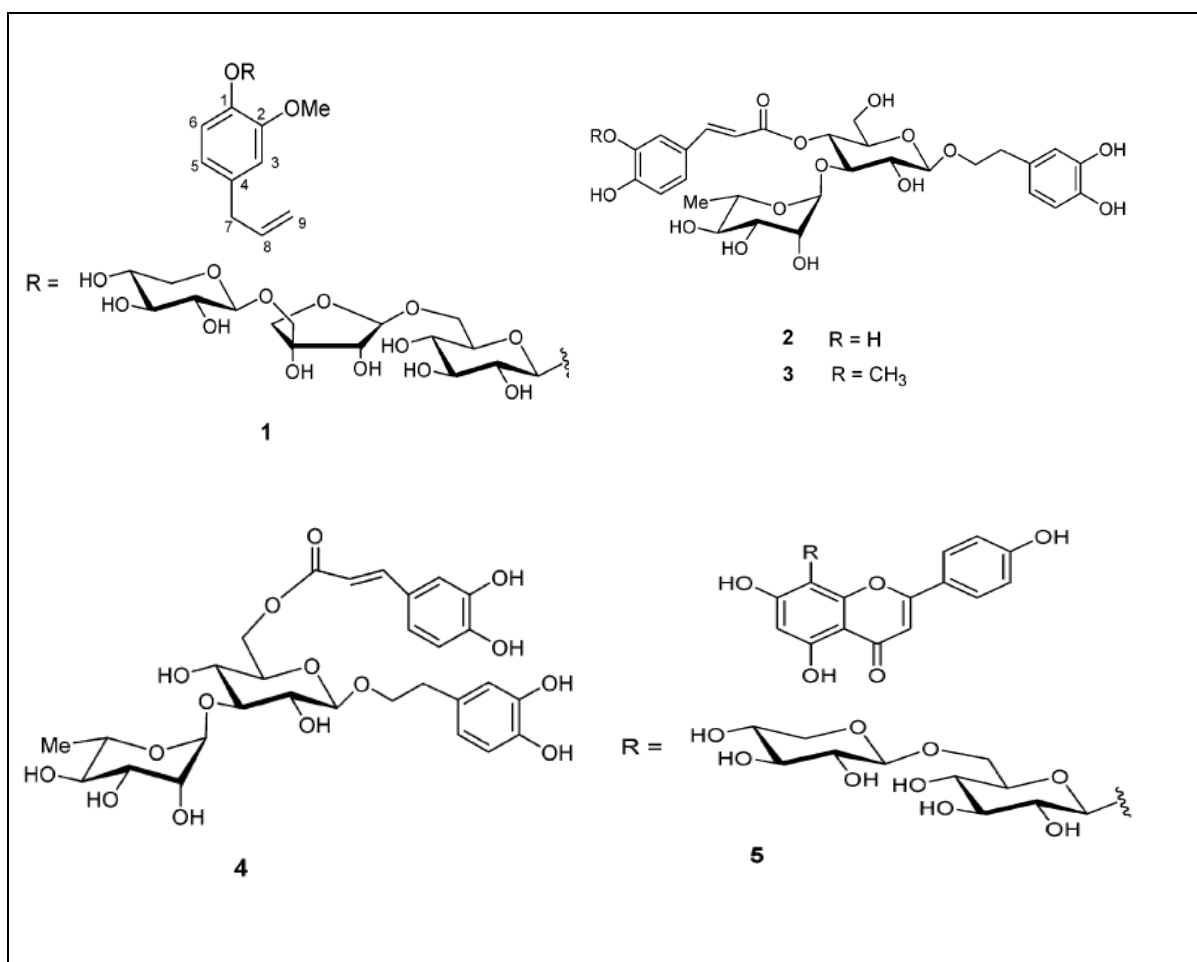


Figura 7 – Compostos isolados da casca de *Tynanthus panurensis*
Fonte: PLAZA *et al.*, 2005

3.9 β -SITOSTEROL

O β -sitosterol é um fitoesteróide com estrutura química semelhante à do colesterol. Sua biossíntese segue a via do mevalonato e cicloartenol.

A atividade antiinflamatória do β -sitosterol foi comprovada nos trabalhos de Gupta *et al* (1980) mostrando efeito similar à hidrocortisona em edema induzido por carragenina. O mesmo menciona ainda a atividade antipirética do β -sitosterol similar ao ácido acetil salicílico.

Substâncias como o β -sitosterol, o α -amirina e lupeol presentes na *Arnebia hispidissima* (Lehm.) DC demonstraram atividade contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, em ensaios de difusão em ágar e CIM realizados por Virtuoso, *et al* (2005).

De acordo com Galotta e Boaventura (2005), o β -Sitosterol não possui atividade tóxica frente à *Artemia salina*.

Estudos epidemiológicos e experimentais têm sugerido um papel protetor do β -sitosterol no desenvolvimento de alguns tipos de câncer como de mama, cólon e próstata. Estudos *in vivo* mostraram que esta substância induz a apoptose em tumores sólidos humanos, como câncer de cólon e de mama (PARK *et al.*, 2007).

Salgado *et al* (2008) utilizou o abacate nos seus estudos, fruta com alto teor de ácido oléico e β -sitosterol, e mostrou que uma suplementação da dieta com farinha de abacate reduziu os níveis de colesterol sanguíneo, hepático e LDL, aumentou o colesterol excretado e manteve os níveis de HDL e triglicérides em ratos hipercolesterolêmicos.

3.10 APIGENINA

Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural, e são biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides. A apigenina pertence à classe das flavonas, com substituintes 5,7,4'-tri-OH, e são derivadas da 2-fenilcromona (SIMÕES *et al.* 2007).

Pesquisadores testaram a ação antiinflamatória da dimetil-éter apigenina, mostrando que este composto apresentou na dose de 75 mg/kg de peso uma percentagem de inibição em processos inflamatórios. A apigenina e outros flavonóides têm atividade antiviral e esta ação é importante nas miocardites, uma vez que é um processo de infiltração inflamatória do miocárdio em que ocorre degeneração e necrose dos miócitos (LIMA *et al.*, 2001).

Para o flavonóide apigenina, são relatadas várias atividades biológicas, entre elas a atividade antimicrobiana. O extrato alcoólico dos frutos de *Schinus terebenthifolius*, com grande quantidade de apigenina, apresentou atividade frente cepas de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (DEGÁSPARI, WASZCZYNSKYJ e PRADO, 2005).

Os trabalhos de Silva *et al* (2006) e Peres *et al* (2009), citam a apigenina como sendo inativa frente a redução do radical DPPH.

Do extrato clorofórmico de *Moquinia kingii* foi obtida a apigenina que apresentou atividade anti-*Trypanosoma cruzi in vitro*, conforme descrito por Saúde-Guimarães e Faria (2007). O valor da IC₅₀ desta substância foi 181,6 µg/mL e da violeta genciana, usado como controle positivo, foi de 31 µg/mL.

Em estudos utilizando-se tipos celulares diversos como de câncer de cólon, mama, próstata e pele a apigenina tem demonstrado promover a inibição do crescimento celular, atraso do ciclo celular e indução de apoptose. Com base nas conclusões do trabalho de Shukla e Gupta (2010) a apigenina possui grande potencial e precisa ser melhor investigada para o desenvolvimento de quimiopreventivos do câncer e agentes terapêuticos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA, IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA E EXSICATA

A espécie *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo foi coletada no mês de abril de 2009 na Fazenda Água Azul localizada no município de Quinta do Sol no Estado do Paraná.

A identificação da espécie vegetal foi realizada pelo Botânico Dr. Gerdt Hatschbach e pelo Biólogo Osmar do S. Ribas, do Museu Botânico Municipal (MBM) de Curitiba-PR, onde existe a exsicata depositada registrada sob número 231.071.

As partes da planta coletadas foram a raiz, caule e folhas e foram secas e estabilizadas na estufa por quatro horas a uma temperatura de 70° C.

A estabilização tem por objetivo, impedir a ação de algumas enzimas evitando a alteração dos compostos químicos originalmente presentes no vegetal e pode ser realizada pela ação de agentes desidratantes, como o etanol, ou por ação do calor (SIMÕES *et al.*, 2007).

4.2 DETERMINAÇÃO DE UMIDADE

Utilizou-se o método gravimétrico da Farmacopéia (1988) para a determinação de umidade dos três materiais vegetais obtidos da planta: raiz, caule e folhas.

Pesou-se aproximadamente um grama de cada material com três amostras cada, feito em cadinho previamente secado, resfriado em dessecador e pesado. O material foi submetido à estufa a 100-105°C durante 3 horas e, após resfriado à temperatura ambiente, em dessecador, foi novamente pesado. O cadinho com o material foi colocado novamente na estufa e depois de uma hora, foi pesado após resfriamento, observando-se peso constante, ou não diferindo por mais de 5mg entre as duas últimas pesagens.

O resultado é dado pela porcentagem de água em relação ao material vegetal seco ao ar.

De acordo com a Farmacopéia (1988), a quantidade excessiva de água em material vegetal propicia desenvolvimento de insetos, microorganismos e hidrólise, resultando em deterioração do material e dos constituintes do mesmo.

4.3 DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS

Para a determinação de cinzas totais na raíz, caule e folha de *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo utilizou-se o método descrito na Farmacopéia (1988), e destina-se a estabelecer a quantidade de substância residual não volátil no processo de incineração.

Pesou-se o material vegetal em cadinho previamente calcinado, resfriado e pesado e procedeu-se a incineração, em mufla, até eliminação do carvão. Após, resfriou-se em dessecador até temperatura ambiente e pesou-se.

Calculou-se a porcentagem de cinzas em relação à droga seca.

4.4 ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE FITOQUÍMICA

Estes ensaios se utilizam de reações de coloração e/ou precipitação para mostrar as características qualitativas dos principais grupos químicos dos componentes ativos das drogas vegetais.

Os compostos pesquisados no extrato hidroalcoólico foram: flavonóides, alcalóides, esteróides e/ou triterpenos, cumarinas e antraquinonas.

O ensaio sistemático de análise fitoquímica foi realizado de acordo com Moreira (1979), com adaptações feitas por MIGUEL (2003), pelo método de maceração a quente, partindo de um extrato hidroalcoólico a 20% do vegetal em estudo.

Foram preparados três extratos hidroalcoólicos uma vez que o objetivo foi analisar separadamente os componentes da raiz, do caule e da folha.

A partir de cada extrato foram verificados pH, teor de sólidos e outros caracteres como cor, odor e sabor.

4.4.1 Preparo do Extrato Hidroalcoólico a 20%

Pesou-se 40 g de cada parte da planta fragmentada e fez-se uma maceração em 200 mL de álcool etílico a 70% em banho-maria a 70° C por 1 hora. Após, o macerado foi filtrado por meio de papel de filtro e lavado com o líquido extrator até completar o volume de 200 mL. Até que todos os ensaios fossem realizados o extrato foi mantido sob refrigeração.

4.4.1.1 Partição do extrato hidroalcoólico

Serviu para extrair os componentes do extrato seguindo um gradiente de polaridade aonde foram utilizados os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila, os quais serviram para orientar, por solubilidade, os grupos químicos a serem pesquisados.

Concentrou-se o extrato hidroalcoólico até adquirir 1/3 do seu volume para retirar o excesso de álcool etílico colocando-o posteriormente em um funil de separação para dar seqüência ao particionamento.

Adicionou-se 20 mL do primeiro solvente e separou-se, após agitação, a fração dissolvida no mesmo. Repetiu-se este procedimento por 10 vezes. O procedimento foi repetido com os demais solventes chegando-se a 4 frações de 200 mL cada (frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente).

4.4.2 Pesquisa de Flavonóides

Esta pesquisa baseia-se na modificação da estrutura do flavonóide em presença de ácido, como na reação de Shinoda ou cianidina, com HCL concentrado e magnésio em pó. Com esta reação podemos caracterizar compostos contendo um núcleo α -benzopirona, pelo desenvolvimento de cor laranja a vermelha. A estrutura básica dos flavonóides está representada na figura 8.

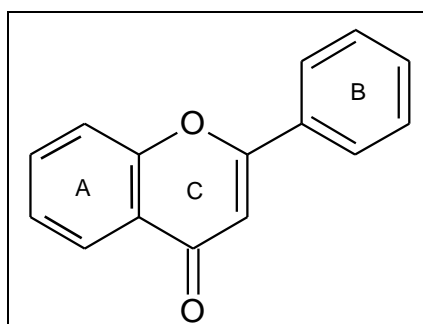


Figura 8: Estrutura básica dos flavonóides
Fonte: SIMÕES *et al.*, 2007

Levou-se à secura em banho-maria 10 mL das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila. A fração hidroalcoólica não houve necessidade de secar. Adicionou-se 10 mL de etanol nas cápsulas com resíduo já seco e transferiu-se 5 mL para cada tubo de ensaio, inclusive 5 mL da fração hidroalcoólica. A cada tubo de ensaio adicionou-se 200 mg de limalha e ácido clorídrico fumegante (lentamente) com ocorrência de reação exotérmica (esta pesquisa deve ser realizada com os tubos de ensaio dentro de um copo de béquer com gelo, dentro da capela).

A reação positiva desenvolve coloração conforme as estruturas químicas presentes: flavonas com coloração amarela a vermelho; flavonol e dihidroflavonol com coloração vermelho a vermelho sangue; flavononas com coloração vermelha a violeta; derivados antociânicos com coloração vermelha tornando-se rosa e chalconas, auronas, dihidrochalconas, isoflavonas e isoflavononas não apresentam coloração.

4.4.2.1 Teste do oxálico bórico ou reação de Taubock

Esta reação é explicada pela formação de quelatos, que, em particular nos flavonóides, desenvolvem o aparecimento de fluorescência amarela esverdeada, enquanto que as flavonas e isoflavonas não apresentam esta propriedade. Os antociânicos coram-se, porém não produzem fluorescência.

Levou-se à secura em banho-maria 10 mL de cada fração. Ao resíduo foi adicionado 5 gotas de acetona e 30 mg de ácido bórico misturado com ácido oxálico na proporção 1:1, agitou-se e levou-se novamente à secura. Ao resíduo adicionou-se 5 mL de éter etílico e transferiram-se os respectivos resíduos para tubos de ensaio para verificação de fluorescência.

4.4.2.2 Ensaio de Pacheco

Levou-se à secura em banho-maria 10 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica. Adicionaram-se alguns cristais de acetato de sódio e 0,1 mL de anidrido acético e aqueceu-se em fogareiro. Em seguida, adicionou-se 0,1 mL de HCl concentrado.

Os diidroflavonóis produzem um efeito batocrômico das bandas I e II, apresentando uma coloração roxa característica.

As flavonas, chalconas, auronas e os flavonóis, dão resposta negativa.

4.4.2.3 Ensaio com Zn e HCl

Levou-se à secura em banho-maria 10 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila. Dissolveu-se o resíduo com 10 mL de etanol, por isso não houve necessidade de secar a fração hidroalcoólica. Transferiu-se para cada tubo de ensaio 5 mL do conteúdo das cápsulas, juntando-se uma pastilha de zinco e

lentamente HCl fumegante, sendo esta reação exotérmica com necessidade de ser feita em copo de Becker contendo gelo e sob a capela.

Apenas os diidroflavonóis produzem coloração rocha violeta. As flavononas e flavonol não produzem coloração.

4.4.2.4 Pesquisa de leucoantocianidinas

As leucoantocianidinas são consideradas flavonóides monoméricos 3,4-dióis ou raramente 4-óis.

Para a pesquisa, transferiu-se para cada cápsula de porcelana 10 mL das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila e levou-se à secura. A cápsula com o a fração hidroalcoólica não houve necessidade de secar.

Dissolveu-se o resíduo nas cápsulas com 5 mL de álcool etílico e adicionou-se 5 gotas de HCL concentrado, aquecendo.

Na reação positiva observa-se o desenvolvimento de coloração vermelha.

4.4.3 Pesquisa de Alcalóides

Esta técnica é baseada na capacidade que os alcalóides possuem quando em estado de sal (extratos ácidos), de combinar-se com o iodo e metais pesados como bismuto, mercúrio, tungstênio, formando precipitados.

Utilizou-se para esta pesquisa os reativos gerais para alcalóides: Mayer (iodo-mercurato de potássio), Dragendorff (iodo-bismutato de potássio), Bouchardart (iodo-iodeto de potássio) e Berthrand (ácido sílico-túgstico).

Levou-se à secura 50 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica, em banho-maria a 70°C. O resíduo foi dissolvido em 1 mL de etanol e 20 mL de ácido clorídrico a 1%. Transferiu-se o extrato clorídrico para 5 tubos de ensaio (2 mL em cada tubo) e adicionou-se em cada tubo duas gotas dos reativos gerais para alcalóides, mantendo o quinto tubo como branco.

O aparecimento de precipitado indica reação positiva, sendo este precipitado branco para o reativo de Mayer e de Bertrand, cor tijolo para o reativo de Dragendorff e alaranjado para o reativo de Bouchardat.

A figura 9 mostra a estrutura química da cafeína, uma das substâncias representantes da classe dos alcalóides.

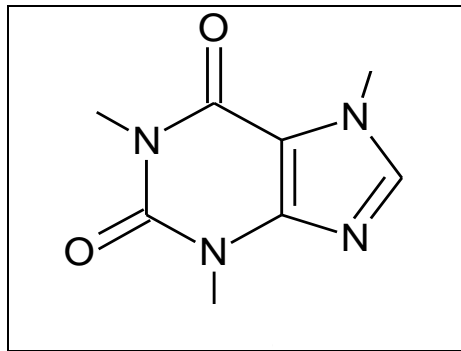


Figura 9: Estrutura química do alcalóide cafeína
Fonte: SIMÕES *et al.*, 2007

4.4.4 Pesquisa de Cumarinas

As cumarinas são caracterizadas pela observação sob luz ultravioleta em 360 nm, já que a maioria possui fluorescência azul brilhante ou verde.

A pesquisa baseia-se na conversão em sal alcalino fluorescente do ácido hidroxí cinâmico, por meio da dissolução das cumarinas em álcali cáustico com clivagem do anel pirrólico e conseqüente formação do ácido hidroxí cinâmico ou sais de seu ânion. Ao irradiar luz ultravioleta, a forma *cis* migra para forma *trans*, que exibe coloração azul ou verde amarelada em poucos minutos.

A estrutura básica das cumarinas está representada na figura 10, e para este ensaio, concentrou-se 30 mL de cada fração hexano, clorofórmio e acetato de etila, até volume de 5 mL.

Da fração hidroalcoólica foram transferidos 30 mL para uma cápsula de porcelana e acidificou-se HCl 2N até pH 1. Concentrou-se em banho-maria até volume de 5 mL. Após o esfriamento transferiu-se para um funil de separação e

extraiu-se por 2 vezes com 10 mL de éter etílico. As frações étera foram concentradas em banho-maria até volume de 5 mL.

Transferiu-se para cada tubo de ensaio 3 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e a etérea, adicionou-se 2 mL de NaOH 1 N e estes tubos foram levados a uma câmara de luz ultravioleta em 366 nm, deixando-os expostos por 15 minutos.

No caso então de reação positiva, vamos observar no ultravioleta o aparecimento de fluorescência com coloração azul ou verde amarelada.

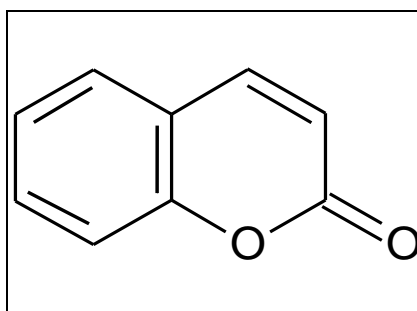


Figura 10: Estrutura básica das cumarinas
Fonte: SIMÕES *et al.*, 2007

4.4.5 Pesquisa de Antraquinonas e Naftoquinonas

Foi levado à fervura 30 mL do extrato alcoólico em um balão, por 15 minutos sob refluxo adicionando 5 mL de ácido sulfúrico 10 %. Antes de esfriar, filtrou-se em papel filtro, e adicionou-se ao filtrado 30 mL de água destilada. Com um funil de separação, separou-se a fração orgânica das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila. Da fração hidroalcoólica extraiu-se com 10 mL de éter etílico por duas vezes. Concentrou-se as frações até aproximadamente 5 mL e transferiu-se para um tubo de ensaio, efetuando-se a reação de Bomtrager, ou seja, adicionou-se 5 mL de hidróxido de amônia, agitando lentamente.

O aparecimento de coloração avermelhada indica a presença de antraquinonas e/ ou naftoquinonas e a figura 11 detalha a estrutura básica para esta classes de substâncias.

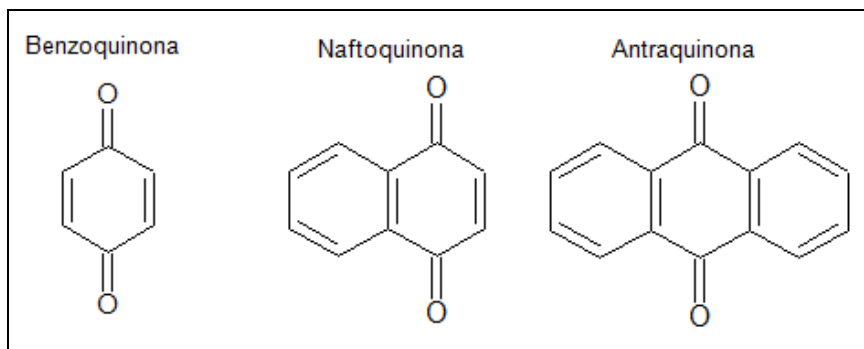


Figura 11: Estruturas básicas de quinonas
Fonte: SIMÕES *et al.*, 2007

4.4.6 Pesquisa de Esteróis e Triterpenos

Foram evaporados 30 mL de cada fração em banho-maria e, com o auxílio de um bastão seco, dissolveu-se com clorofórmio e filtrou-se. Pipetou-se 0,1mL, 0,5mL e 1,0mL do extrato clorofórmico de cada fração para 3 tubos de ensaio, completando-se o volume para 2mL com clorofórmio. Realizou-se a reação de Libermann Bouchard, em capela, adicionando-se 1,0mL de anidrido acético e 2,0mL de ácido sulfúrico concentrado lentamente.

O desenvolvimento de coloração rósea escura ou azul indica a presença da função carbonila na posição 3 e duplo enlace em 5, 6, enquanto que a coloração verde indica função hidroxila na posição 3 e duplo enlace em 5, 6. Quando ocorre o desenvolvimento de coloração amarela, possivelmente existe a presença de metila em C14. A coloração verde demonstra a presença de esteróides e /ou triterpenos (figura 12).

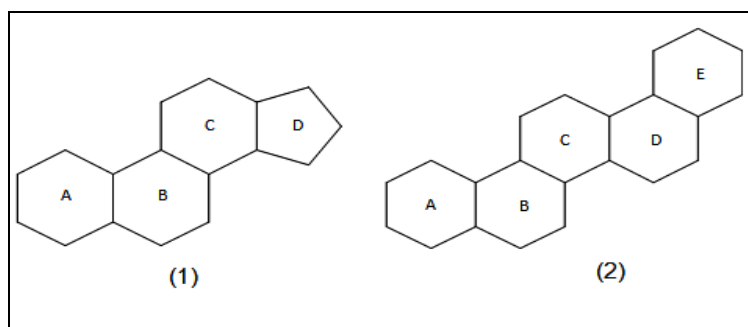


Figura 12: Estrutura básica de esteróides (1) e triterpenos (2)
Fonte: SIMÕES *et al.*, 2007

4.5 FLUXOGRAMA

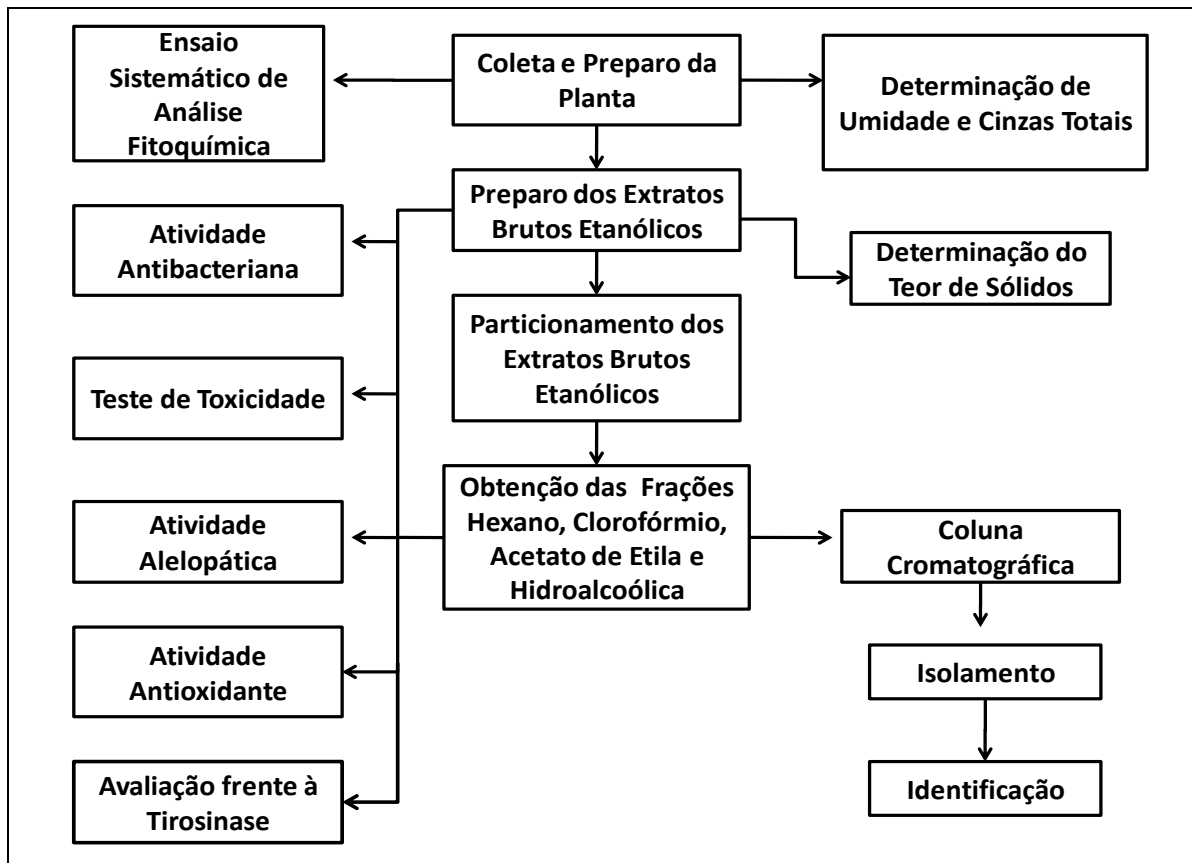


Figura 13: Fluxograma
Fonte: a autora, 2009

4.6 PREPARO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES

4.6.1 Extrato Bruto Etanólico

Os extratos brutos das raízes, dos caules e das folhas foram preparados conforme fluxograma (figura 13), em sistema fechado à quente no aparelho de Soxhlet, utilizando-se como solvente extrator o álcool etílico absoluto (PA), conforme figura 14.

Terminada as extrações, cada material foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório até adquirir aspecto de extrato fluido.



Figura 14 – Preparo dos extratos brutos em aparelho de Soxhlet
Fonte: a autora, 2009.

4.6.1.1 Determinação de cor, pH e teor de sólidos

Após o preparo dos extratos, fez-se a determinação de cor, pH e teor de sólidos. Para determinação da cor utilizou-se a verificação feita pelo observador e para o pH utilizou-se tira indicadora da Merck®.

O teor de sólidos baseia-se na eliminação total da fase líquida por secagem do produto proveniente da extração dos componentes solúveis. Para esta determinação, depositou-se 1 mL do extrato bruto etanólico em cadinho, previamente seco e tarado, levou-se à estufa a 100 °C até peso constante e procedeu-se aos cálculos aonde o resultado é apresentado em quantidade de sólidos em 1 mL e porcentagem em peso do teor de sólidos em relação ao material vegetal.

4.6.2 Partição dos Extratos Brutos Etanólicos

Os extratos brutos etanólicos obtidos foram fracionados separadamente, por meio de partição líquido-líquido, em aparelho de soxhlet modificado segundo Carvalho (2001), com solventes de polaridade crescente, obtendo-se as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente.

Todo o sistema foi levado ao aquecimento e deixado em refluxo contínuo por aproximadamente 6 horas.

4.7 OBTENÇÃO DE ÓLEOS VOLÁTEIS

Os óleos voláteis, ou essenciais, são produtos obtidos de partes das plantas principalmente pelo método de destilação por arraste com vapor d'água. São compostos de uma mistura de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (SIMÕES *et al.*, 2007).

Foram submetidos à hidrodestilação em aparelho tipo “Clevenger”, 100 g de material seco ao ar das folhas, conforme Miguel (2002). A técnica consistiu em levar a um balão o vegetal fragmentado e água em quantidade suficiente para cobrir o material. Acoplou-se ao balão o “Clevenger” e o condensador. O balão foi aquecido até temperatura suficiente para obter-se uma gota de condensado por minuto.

Decorridas aproximadamente 6 horas, procedeu-se a leitura do volume do óleo no tubo graduado do aparelho.

O material foi enviado para análise em CG-EM para a pesquisa das substâncias que compõem o óleo.

4.8 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS

4.8.1 Isolamento de Constituintes Químicos

Após a obtenção das frações dos extratos brutos, partiu-se para a realização das colunas cromatográficas.

Esta técnica, que se utiliza de processos cromatográficos para análise e identificação de compostos de um determinado extrato, segue princípios básicos como: montagem de coluna ou placa; aplicação da amostra; passagem do eluente escolhido (fase móvel) através da fase estacionária; revelação/visualização das diferentes zonas de separação dos compostos; e/ou extração das substâncias retidas na fase estacionária (SIMÕES *et al.*, 2007).

A cromatografia líquida em coluna é uma das técnicas mais utilizadas (SIMÕES *et al.*, 2007) e a eleita para a separação e isolamento dos constituintes dos extratos analisados. É uma técnica que permite diferentes combinações, utilizando-se de colunas de diferentes dimensões e tipos, e de diversas fases móveis e estacionárias.

As frações utilizadas para a realização de coluna cromatográfica foram selecionadas a partir de prévia avaliação das placas CCD realizadas com as mesmas.

Todas as colunas foram realizadas com fase estacionária sílica gel 60 Merck 0,063 – 0,200mm, e fase móvel que variou conforme o tipo de fração. A pastilha a ser cromatografada foi preparada com sílica gel 60 F 254 na proporção de 5 partes em relação a quantidade de amostra e levada à secura em banho-maria a 50°C, sob constante homogeneização.

Em uma coluna de vidro, preparou-se a sílica-gel a ser depositada na proporção de 5 partes em relação à quantidade de pastilha.

As amostras foram sendo recolhidas em frascos de aproximadamente 20 mL e foram levadas à secura à temperatura ambiente para a formação de cristais.

Em alguns casos conseguiu-se separar os cristais de outros contaminantes dos frascos, pela utilização de solventes, que consiste em solubilizar os contaminantes com algum solvente que não dissolva o cristal. A partir daí, faz-se a separação de ambos.

Para a realização de coluna cromatográfica preparativa utilizou-se a mesma sílica utilizada na preparação da pastilha, isto para diminuir os pratos teóricos e melhorar a separação de compostos presentes na amostra. O procedimento foi igual ao descrito para a coluna cromatográfica simples.

Outra metodologia utilizada para auxiliar na separação de compostos químicos foi a cromatografia de camada delgada (CCD) preparativa. Esta técnica consistiu em se aplicar a amostra, por reunião de determinados frascos da coluna cromatográfica, com o auxílio de um capilar, em placas cromatográficas com sílica-gel GF254nm (20 cm de largura e 10 cm de altura). A aplicação foi realizada em forma de linha ou barra. Após aplicação, deixou-se a placa em contato com fase móvel adequada, em recipiente fechado, até saturação da mesma. As bandas formadas foram raspadas e o resíduo foi ressuscitado com solvente específico. Posteriormente fez-se a filtração para separar a sílica da CCD da substância dissolvida no seu solvente. A sílica ficou retida no filtro sinterizado, e o solvente com a substância dissolvida foi coletada para um frasco previamente tarado. Levou-se este frasco à secura e finalmente verificou-se a quantidade da substância isolada.

4.8.2 Caracterização dos Constituintes Químicos Isolados

Foram utilizados os seguintes métodos e equipamentos para caracterizar os isolados obtidos no processo de separação:

- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear: RMN Bruker DPX 200, operando a 4,7 Tesla, observando os núcleos de ^1H e ^{13}C à 200,13 e 50,62 MHz, respectivamente;
- Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa: CG-EM realizadas em um cromatógrafo a gás “VARIAN”, modelo 3800, acoplado a um espectrômetro de massa também da marca “VARIAN”, modelo 4000 e software MS-Workstation 6.9.1;
- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Ultravioleta acoplado ao mesmo equipamento: CLAE Merck Hitachi - Elite Lachrom, detector diodo L-2450, coluna RP-18 (fase reversa), 5 micrometros.

4.9 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.9.1 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Para a avaliação do potencial antimicrobiano da espécie *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo foi utilizado o método de microdiluição em caldo para a determinação da concentração mínima inibitória segundo metodologia do CLSI (2009).

Os extratos brutos foram testados frente ao desenvolvimento de cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922 e 35218), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25913 e 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212 e 5129) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603).

Para reativação, as cepas conservadas em condições de congelamento foram subcultivadas em ágar TSA (Difco), à temperatura de 37°C por 20-24 horas.

Para o preparo dos inóculos foram realizadas suspensões em tubo contendo salina estéril (NaCl a 0,85%) na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, equivalente ao tubo 0,5 de McFarland.

O ensaio da microdiluição em caldo foi realizado em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de “U”, contendo 12 colunas e 8 linhas, identificadas de A a H.

Os extratos foram diluídos em DMSO a 2%, no momento do teste, na concentração de 20 mg/mL e filtrados em membrana milipore 0,22 µm. Após a filtração foram preparadas soluções dos extratos na concentração de 2000 µg/mL. Em seguida foram transferidos 100 µL de caldo Mueller-Hinton (Merck) na linha A das colunas 2 a 10. Na coluna 2 foi inoculado 100 µL dos extratos vegetais e transferidos após homogeneização 100 µL para o orifício da coluna 3, repetindo-se o procedimento até a coluna 10 e desprezando-se após homogeneização o excesso da diluição, obtendo-se assim concentrações decrescentes dos extratos (1000 µg/mL–coluna 2; 500 µg/mL–coluna 3; 250 µg/mL–coluna 4; 125 µg/mL–coluna 5; 62,5 µg/mL–coluna 6; 31,25 µg/mL–coluna 7; 15,62 µg/mL–coluna 8; 7,81 µg/mL–coluna 9; 3,9 µg/mL–coluna 10).

Os inóculos bacterianos preparados na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, equivalente ao tubo 0,5 de “McFarland” foram inoculados em um volume de 5 µL nos orifícios das colunas de 2 a 10.

Os orifícios das colunas 1, 11 e 12 foram destinados para os testes de controle do experimento. A coluna 1 foi reservada para o controle negativo ou de esterilidade, utilizando 100 µL de caldo Mueller-Hinton e 100 µL de extrato vegetal na concentração de 2000 µg/mL. O orifício da coluna 11 para o controle negativo da atividade inibitória do diluente DMSO, utilizado na preparação dos extratos. Nesta coluna, 100 µL de solução de DMSO a 2% foram adicionados com 100 µL de caldo Mueller-Hinton e 5 µL do inóculo bacteriano. O orifício da coluna 12 para controle positivo ou de viabilidade, receberam 100 µL de caldo Mueller-Hinton e 5 µL do inóculo bacteriano.

As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 16 a 20 horas. Decorrido este intervalo de tempo foram acrescentados 20 µL de solução aquosa de TTC (cloreto de trifetil tetrazolium, MERCK®), conforme Ayres *et al* (2008), a 0,5% e as microplacas foram reincubadas por três horas a 35 °C. Após esta incubação foram realizadas as leituras dos resultados.

A presença de coloração vermelha nos orifícios foi interpretada como prova negativa de efeito inibitório do extrato vegetal, enquanto que a ausência da

coloração vermelha foi considerada prova positiva da ação inibitória do extrato vegetal. Cada teste foi realizado em duplicata.

4.9.2 Ensaio de Toxicidade com *Artemia salina*

Adquiriu-se os ovos do crustáceo *Artemia salina* e procedeu-se o preparo do ensaio conforme metodologia citada por Meyer *et al* (1982).

Os ovos do crustáceo foram eclodidos em água salina, preparada dissolvendo-se 14,31g de sal marinho em 400mL de água purificada. Para esta quantidade, adicionou-se 200mg dos ovos do crustáceo. O pH foi mantido entre 8,0 e 9,0 para evitar a morte dos crustáceos. A temperatura foi controlada entre 27°C e 30°C e a solução sob agitação e aeração constante por 48 horas. Na primeira hora do processo manteve-se iluminação (20W) sobre o recipiente.

Preparou-se uma solução com os extratos e frações em concentrações de 1000µL/mL, 100 µL/mL e 10 µL/mL, todos em triplicata. Colocou-se em frascos que possibilitassem posteriormente a visualização dos crustáceos vivos.

Os frascos com as soluções foram colocados em estufa para total eliminação do solvente, inclusive a do controle que utilizou-se apenas o solvente utilizado na dissolução das amostras. Após a evaporação do mesmo, os crustáceos foram adicionados ao frasco com a ajuda de um conta gotas de vidro, num total de 10 em cada amostra adicionando-se salina suficiente para acomodar e visualizar os crustáceos.

Após 24 horas foram observados quantos deles morreram em presença das concentrações analisadas, procedendo-se aos cálculos de DL50 através do método estatístico Probitos com 95% de intervalos de confiança. As frações foram consideradas ativas quando DL₅₀ foi menor que 1000 µg/mL (MEYER *et al.*, 1982).

4.9.3 Estudo da Atividade Alelopática

Foi avaliada a possível atividade alelopática dos extratos brutos e frações da raiz, caule e folhas de *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo sobre sementes de *Lactuca Sativa*, realizado de acordo com Malheiros e Peres (2001) e Dias *et al* (2005).

A semente utilizada é conhecida como alface, cultivar Babá de verão, com 99% de germinação detectada através de teste padrão de germinação. A escolha desta semente foi realizada por apresentar germinação rápida e uniforme (DIETZ e WINTERHALTER, 1996), ser pequena, possuir grande superfície de contato, sendo sensível ao meio que a rodeia e não requerer nenhuma manipulação além do contato no meio (MALHEIROS e PERES, 2001).

Paralelamente ao ensaio da atividade alelopática da espécie em estudo, fez-se o ensaio utilizando água destilada e etanol, para posterior verificação de possível influência do solvente (etanol) empregado no preparo e na diluição das amostras utilizadas no ensaio alelopático (DIAS *et al.*, 2005).

Foram preparadas 15 soluções dos extratos brutos etanólicos e das frações em concentrações decrescentes (0,8 mg, 0,4 mg, 0,2 mg, 0,1 mg) e em duplicata, partindo-se de uma solução mãe de 10mg/mL. As soluções foram preparadas em 2 mL de etanol ou clorofórmio para uma das frações. Nas caixas gerbox foram colocados pedaços de papel de filtro (Whatman nº. 6) e embebidos com as soluções preparadas com as devidas concentrações e colocados em estufa a 60°C por 24 horas para total evaporação do solvente. Em câmara de fluxo laminar, os papéis de filtro previamente secos foram colocados nos gerbox e umedecidos com 3 mL de água destilada. Após preparo das caixas gerbox, colocou-se 20 sementes de *Lactuca sativa* em cada caixa divididos em 4 quadrantes de 5 sementes.

Os gerbox foram protegidos da luz com papel alumínio e colocados em germinador de câmara à temperatura de 24 °C.

Para cada concentração preparou-se duas caixas, uma para estudo da germinação e outra para estudo do crescimento. Para controle utilizou-se água destilada sob as mesmas condições do ensaio, assim como o controle apenas com solvente, água destilada e sementes.

Para análise estatística empregou-se o programa SISVAR e a verificação das diferenças de médias estatisticamente significantes foi realizada por meio do teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade. O teste de Scott-Knott foi escolhido por ser claro, objetivo e isento de ambigüidades (presentes na maioria dos testes de comparações múltiplas). O tratamento foi considerado efetivo quando todas as repetições estiverem no mesmo grupo de médias (DIAS *et al.*, 2005).

4.9.3.1 Germinação

Durante a germinação fez-se leitura diária no mesmo horário abrindo as caixas em fluxo laminar. As sementes que germinaram foram retiradas diariamente até o sétimo dia. As sementes foram consideradas germinadas quando se tornou visível a protrusão da radícula através do tegumento.

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

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

4.9.3.2 Crescimento

A avaliação do crescimento foi feita pela mensuração das radículas e dos hipocótilos de *Lactuca sativa*, após tratamento com as diferentes amostras. Comparou-se os resultados obtidos com controle água e solvente.

A leitura do crescimento foi realizada apenas no último dia de experimento com abertura das caixas e retirada das plântulas uma a uma (com auxílio de uma pinça) para medir em papel milimetrado o comprimento da radícula e do hipocótilo.

Os resultados das leituras de crescimento foram submetidos ao Teste de Scott-Knott para comparação das médias.

4.9.4 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada por dois métodos. O primeiro baseou-se na formação de um complexo fosfomolibdênico e o outro foi caracterizado pela capacidade da amostra em reduzir o radical DPPH. Ambos utilizaram leituras espectrofotométricas na região do UV para apresentar os resultados.

4.9.4.1 Formação do complexo fosfomolibdênico

O ensaio de complexação pelo fosfomolibdênio baseia-se na técnica descrita por Prieto, Pineda e Aguilar (1999).

Possui a vantagem de avaliar, de forma simples, a capacidade antioxidante tanto de componentes lipofílicos quanto de hidrofílicos.

A reação para formação do complexo requer o preparo de um reativo que consiste de uma solução com fosfato de sódio 0,1M (28 mL), molibdato de amônio 0,03M (12 mL) e ácido sulfúrico 3M (20 mL), sendo o volume completado com água para 100 mL. Esse reativo foi preparado no momento do uso. Soluções padrões de vitamina C e rutina, bem como as amostras a serem testadas, estavam na concentração de 200 µg/mL em etanol e clorofórmio para uma das frações.

Em um tubo de ensaio, retirou-se uma alíquota de 0,3 mL de cada amostra, e adicionou-se 3 mL de reativo. Realizou-se o mesmo para os padrões. O branco é constituído de 0,3 mL de metanol e 3 mL de reativo. A análise foi realizada em triplicata. Os tubos hermeticamente fechados foram colocados em banho-maria a 95°C por 90 minutos. Ao atingir a temperatura ambiente, realizou-se a leitura das absorbâncias (Abs) em espectrofotômetro de UV da marca Shimadzu, modelo UV-1601 PC, em 695 nm. Os resultados foram expressos como atividade antioxidante relativa (AAR%) da amostra em relação à vitamina C e rutina, conforme as equações da tabela 3.

Tabela 3 – Equações para Determinação da Atividade Antioxidante Relativa

AAR% em relação à Vitamina c	$\frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (vitamina C)} - \text{Abs (branco)}} \times 100$
AAR% em relação à Rutina	$\frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (rutina)} - \text{Abs (branco)}} \times 100$

Fonte: a autora, 2010.

4.9.4.2 Redução do radical DPPH

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas de plantas.

Um dos mais usados consiste em avaliar a atividade seqüestradora do radical livre 2,2- difenil-1-picril-hidrazila - DPPH•, de coloração púrpura que absorve a 515 nm¹⁰. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R•), o DPPH• é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou seqüestradora de radicais livres.

A metodologia foi realizada de acordo com Mensor *et al* (2001), que avalia a capacidade antioxidante quantitativa tendo como base este princípio da redução do radical DPPH medida em espectrofotometria de UV visível.

Preparou-se a solução de DPPH minutos antes do ensaio a 0,03 mmol/mL em etanol absoluto. Foram preparadas cinco diluições de cada amostra, com concentrações que variaram entre 25 µg/mL a 300 µg/mL adicionando-se 1 mL da solução de DPPH. Para cada amostra foi preparado um branco com 2,5mL da solução e 1mL de metanol para cada concentração. Paralelamente foi feito um controle com 2,5mL de metanol e 1mL de DPPH. Como padrões foram utilizados a vitamina C em etanol nas concentrações entre 2 µg/mL e 5,5 µg/mL. Todas as etapas foram feitas em triplicata.

Após os 30 minutos, mediu-se a absorbância das soluções em 518 nm e medir a porcentagem da atividade antioxidante (AA%) através da fórmula da tabela 4.

Tabela 4 – Fórmula para Determinação de Porcentagem da Atividade Antioxidante

AA%	$100 - \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco})}{\text{Abs controle positivo}}$
-----	---

Fonte: a autora, 2010

Calculou-se os valores da concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante (IC₅₀) em gráfico onde a abscissa representa a concentração da amostra de óleo e a ordenada é a média da AA% das amostras de cada concentração. A equação da reta desse gráfico, do tipo $y = ax + b$, serviu de base para determinação do valor de IC₅₀.

4.9.5 Ensaio *In Vitro* da Atividade da Enzima Tirosinase

O ensaio da avaliação da atividade da enzima tirosinase foi executado de acordo com os métodos descritos previamente por Miyazawa e colaboradores (2003) com algumas modificações.

O método baseia-se na ação da enzima tirosinase sobre a L-tirosina fazendo uma hidroxilação e produzindo L-DOPA que, por conseguinte, sofre oxidação novamente por ação da tirosinase, produzindo dopaquinona.

A atividade da tirosinase foi determinada com relação à formação de dopaquinona, metabólito colorido. Essa conversão enzimática pode ser mensurada por espectrometria UV-VIS, pois a dopaquinona absorve luz UV em 490 nm. Quanto maior a atividade da tirosinase, mais dopaquinona será formada e maior será a absorção no UV em comparação ao controle.

Em uma microplaca com 96 poços, testou-se as amostras em concentrações de 100 µg/mL, 300 µg/mL e 1000µg/mL, frente à enzima tirosinase (500 U/mL).

A cada poço adicionou-se 170 µL de L-tirosina 1mM ou L-DOPA 1mM e tampão fosfato de potássio 50mM (pH = 6,5), H₂O (10:10:9) e incubou-se a microplaca à 37°C por 30 minutos.

Como controle positivo foi utilizado ácido kójico 1mM e como controle negativo água destilada (VIRADOR *et al.*, 1999).

Para a avaliação dos resultados utilizou-se o teste estatístico ANOVA de análise de variância entre grupos, seguidos por teste de Newman-Kewls.

Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos e foram representados nos gráficos dos resultados da seguinte forma: $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***), de acordo com o nível de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 UMIDADE E CINZAS TOTAIS

A Farmacopéia (1988) aplica como limite aceitável de teor de água em material vegetal entre 8 e 14%. Os resultados obtidos e demonstrados na tabela 5 indicam que os valores obtidos estão dentro dos limites referenciados nesta literatura.

Pode-se observar resultados inferiores de umidade nas folhas.

Tabela 5 – Resultados da Determinação de Umidade e Cinzas Totais

DETERMINAÇÃO	RAÍZ	CAULE	FOLHAS
UMIDADE(%)	13,345%	13,285%	6,837%
CINZAS(%)	3,315%	3,874%	8,060%

Fonte: a autora, 2010.

5.2 ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE FITOQUÍMICA

Tabela 6 – Resultados do Ensaio Sistemático de Análise Fitoquímica

PESQUISA	RAÍZ				CAULE				FOLHA			
	FRAÇÕES											
	H	C	AE	HA	H	C	AE	HA	H	C	AE	HÁ
Alcalóides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leucoantocianidinas	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Heterosídeos Flavônicos	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Cumarinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heterosídeos Antraquinônicos	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Esteróides e/ou Triterpenos	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-

Nota: H: hexano; C: clorofórmio; AE: acetato de etila; HA: hidroalcoólica remanescente (+): resultado positivo; (-): resultado negativo.

Fonte: a autora, 2010.

Na pesquisa de alcalóides, o resultado demonstrou-se positivo em presença do reagente Dragendorf, porém não foi indicativo deste grupo na planta uma vez que substâncias com alta densidade eletrônica também proporcionam resultado positivo em reagentes gerais. Na pesquisa foi considerada a ausência de alcalóides uma vez que se mostrou negativo frente aos outros reativos utilizados.

A reação que demonstra a presença de leucoantocianidinas na planta mostrou-se positiva nas frações clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica da raiz e na hidroalcoólica das folhas, e é explicada pela redução da leucoantocianidina de coloração amarela que, em presença de HCl, se reduz à antocianidina de coloração vermelha, produzindo o deslocamento batocrômico da Banda I.

Na pesquisa de flavonóides verificou-se a presença de Flavonas pelo desenvolvimento de coloração amarela a vermelha nas frações clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica na raiz, caule e folhas e derivados antociânicos pelo desenvolvimento de coloração vermelha para rosa na fração acetato de etila do caule. Nas reações não foi observado o desenvolvimento de cor vermelha a vermelha sangue que indicaria a presença da classe dos flavonóis. Sua ausência na planta foi confirmada pelo não desenvolvimento de fluorescência amarela esverdeada na Reação de Taubock. O ensaio de Pacheco indicou a presença de diidroflavonóis, pelo efeito batocrômico das bandas I e II, ou seja, coloração roxa característica, nas frações hidroalcoólica do caule e da folha o que foi confirmado na reação com zinco e ácido clorídrico apenas na fração hidroalcoólica do caule.

O resultado para a pesquisa de cumarinas foi negativo uma vez que a reação não apresentou desenvolvimento de fluorescência de coloração azul ou verde amarelada.

A pesquisa de heterosídeos antraquinônicos revelou um resultado positivo nas frações hidroalcoólica do caule e da folha pelo desenvolvimento de coloração vermelha, indicando a presença de hidroxilas fenólicas com hidrogênio ácido que reage com álcali.

A presença de esteróides e/ou triterpenos na planta foi confirmada nas reações pelo desenvolvimento de coloração esverdeada nas frações hexano da raiz, caule e folhas e nas frações clorofórmio da raiz e caule. Esta coloração verde é indicativa de função hidroxila na posição três e duplo enlace na posição cinco e seis ou sete e oito no esqueleto terpenóide.

5.3 PREPARO DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS

Os resultados obtidos estão relacionados na Tabela 7, aonde demonstrou que as folhas de *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo apresentaram resultados superiores nas determinações de teor de sólidos em relação à raiz e ao caule.

Tabela 7 – Resultados Obtidos com os Extratos Brutos

PARÂMETRO	RAÍZ	CAULE	FOLHAS
QUANTIDADE DO VEGETAL	838g	1500g	987g
VOLUME APÓS CONCENTRADO	80mL	100mL	120mL
COR	Marron Avermelhado	Marron Esverdeado	Marron Esverdeado
pH	5,0	5,5	6,0
TEOR DE SÓLIDOS (mg/mL)	587	525	628
TEOR DE SÓLIDOS (g%)	5,603	3,502	7,635

Fonte: a autora, 2010.

5.4 PARTIÇÃO DOS EXTRATOS

O melhor rendimento apresentado foi na fração clorofórmio das folhas de *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo, além das frações hidroalcoólicas remanescentes, como demonstrado na tabela 8.

Tabela 8 – Rendimento das Frações Extraídas por Soxhlet

FRAÇÕES	RENDIMENTO EM (g)		
	RAÍZ	CAULE	FOLHA
Hexano	2,143	7,700	7,120
Clorofórmio	1,270	4,300	20,230
Acetato de Etila	0,690	0,093	0,1500
Hidroalcoólica remanescente	31,675	42,660	44,336

Fonte: a autora, 2010.

5.5 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO VOLÁTIL

Pelo processo de hidrodestilação das folhas da espécie *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo foi recolhido 0,5 mg de óleo, menos denso que a água, o qual foi submetido à avaliação por CG-EM, conforme cromatograma da figura 10.

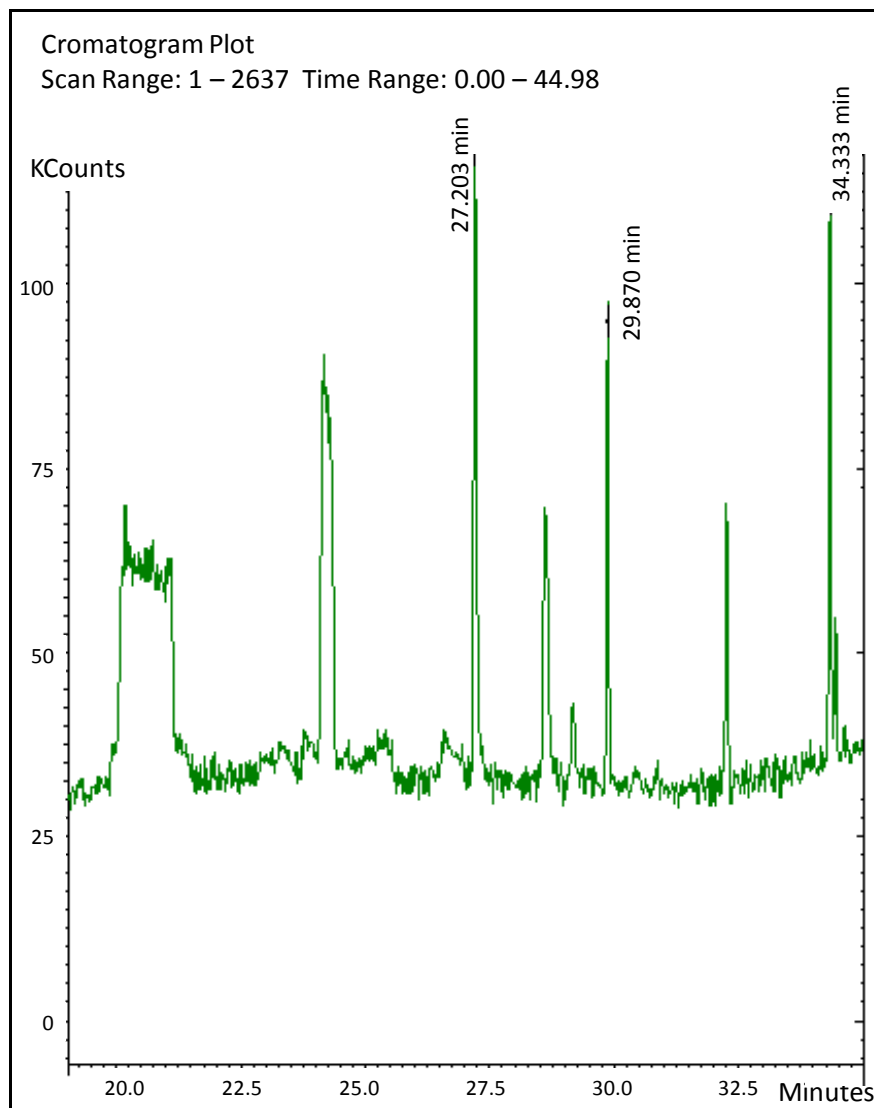


Figura 15 – Perfil cromatográfico do óleo extraído das folhas de *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo obtido por CG-EM
Fonte: a autora, 2010.

O software do equipamento identificou algumas substâncias referentes ao espectro obtido por CG-EM, e os resultados estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9 – Componentes Identificados no Óleo Volátil Extraído das Folhas de *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo

Tempo de Retenção (Minutos)	Composto	Fórmula
14.779	O-decil-hidroxilamina	C10H23NO
21.049	Hexadecametil-ciclooctasiloxane	C16H48O8Si8
24.050	Dibutil-ftalato	C16H22O4
24.343	Ácido ftálico, éster butil, éster com butil glicolato	C18H24O6
25.721	Metilhexadecanoato	C17H30O2
26.115	Ácido 1,2 benzenodicarboxílico, butil 2-etilexil éster	C20H30O4
26.679	Ácido hexadecanóico (Ácido palmítico)	C16H32O2
27.203	Não identificado	-
27.388	Pentadecanal	C15H30O
27.248	Ciclodecasíloxane, eicosametil	C20H60O10Si10
28.564	5-dodecyloxolan-2-one	C16H30O2
29.141	Ácido oléico	C18H34O2
29.870	Não identificado	-
34.333	Não identificado	-

Fonte: a autora, 2010.

Os ftalatos identificados assim como os compostos silicados são oriundos de contaminação provenientes de trabalhos de rotina do laboratório.

Uma nova extração deve ser realizada para continuar a elucidação das estruturas não identificadas do óleo, e para pesquisar se a planta possui constituintes similares ao do óleo volátil do Cravo-da Índia, *Syzygium aromaticum*, uma vez que a planta possui odor e sabor característicos da mesma.

5.6 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS QUÍMICOS

A Tabela 10 mostra a metodologia utilizada para o isolamento dos compostos químicos obtidos das frações trabalhadas de *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo assim como a denominação da amostra e metodologia utilizada para sua identificação.

Tabela 10 – Isolamento e Caracterização de Compostos Químicos

Fração Trabalhada	Metodologia de Isolamento	Denominação da Amostra (Rendimento)	Nome do Composto	Metodologia Identificação
Fração Hexano Caule	Coluna Cromatográfica e CCD Preparativa	FHC1 (23,9 mg)	β -Sitosterol	RMN ^1H e ^{13}C
	Coluna Cromatográfica e CCD Preparativa	FHC2 (3,8 mg)	Não identificado	Realizar nova análise em equipamento com melhor resolução
Fração Hexano Folha	Coluna Cromatográfica, Coluna Preparativa à vácuo e CCD Preparativa	FHF1 (26,3 mg)	Hidrocarboneto de cadeia longa	RMN ^1H e ^{13}C
Fração Clorofórmio Folha	Coluna Cromatográfica e CCD Preparativa	FCF1 (4,8mg)	Não identificado	-
Fração Clorofórmio Caule	Coluna Cromatográfica	FCC1 (9,3 mg)	Apigenina	RMN ^1H e ^{13}C e CLAE

Fonte: a autora, 2010.

5.6.1 Identificação da Amostra FHC1

Conforme mostra a figura 16 os resultados da avaliação do espectro de RMN ^1H são:

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS): δ (ppm) 0,66-1,00 (envelope de sinais de metilas; H18,H19, H21, H26, H27 e H29), 3,50 (*m*, H3), 5,30 (*d*, $J=5,1$ Hz; H6).

O grupo de absorções na região de 0,7-2,4 δ aponta o conjunto de hidrogênios das metilas, típico de estruturas esteroidais.

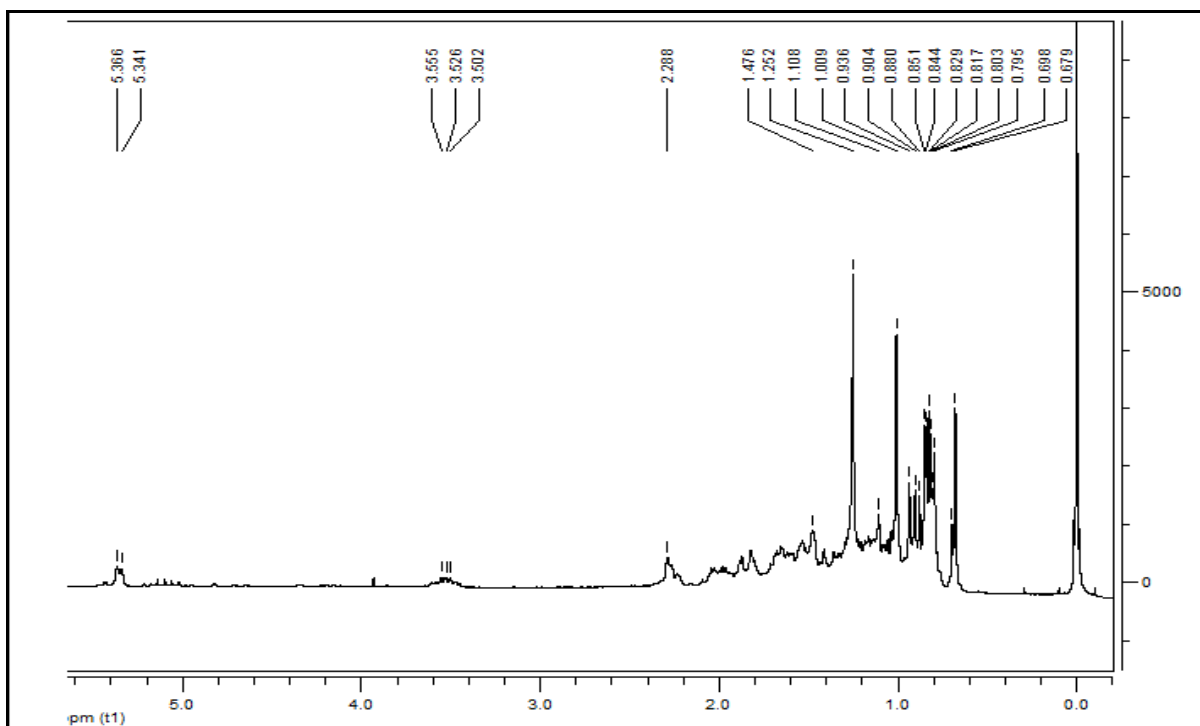


Figura 16 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 Hz) da substância FHC1
 Fonte: a autora, 2010.

A Figura 17 mostra o espectro de RMN de ^{13}C aonde podemos notar alguns pontos importantes como o sinal de 140,7 e 121,7 δ , correspondentes aos carbonos da ligação dupla trissubstituída nos carbonos 5-6 e um sinal em 71,8 δ correspondente ao carbono 3 ligado a uma hidroxila.

De acordo com os resultados obtidos no RMN ^1H e ^{13}C e DEPT, figuras 16, 17 e 18, os valores dos deslocamentos químicos obtidos e comparados com a literatura, confirmaram ser o esteróide β -sitosterol, cuja estrutura está representada na figura 19.

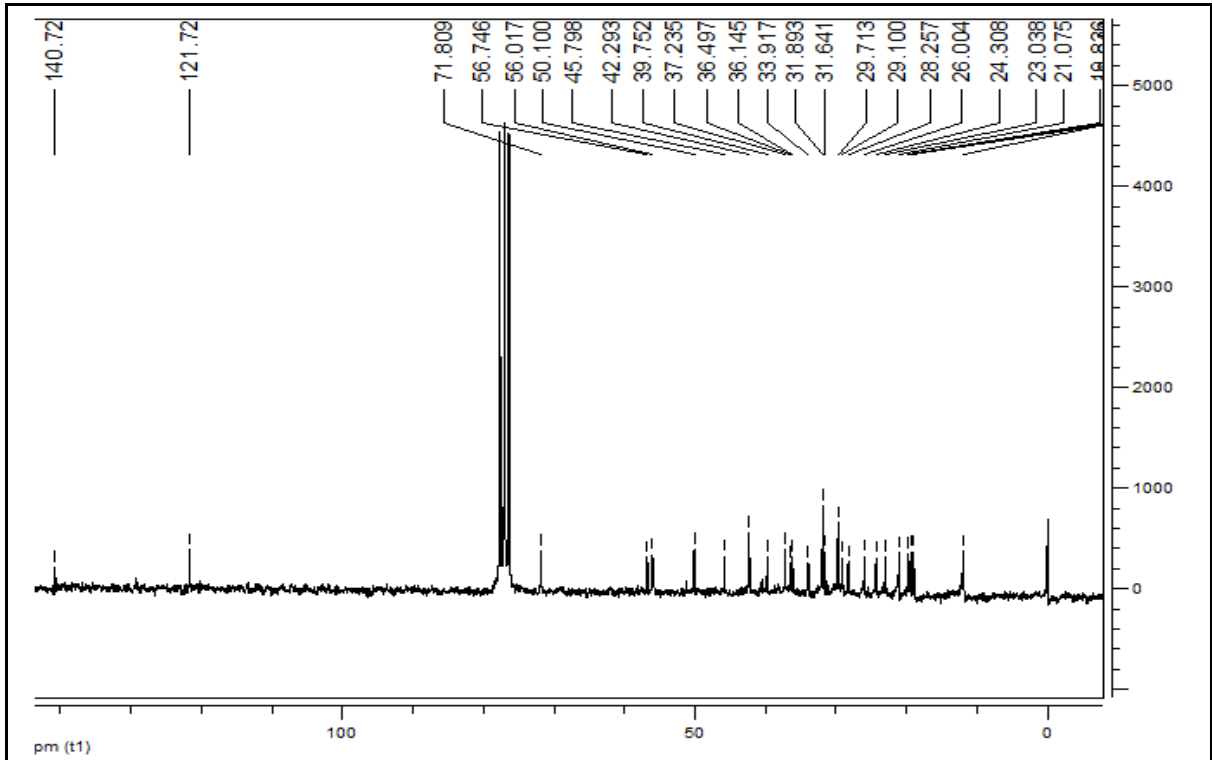


Figura 17– Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 Hz) da substância FHC1
 Fonte: a autora, 2010.

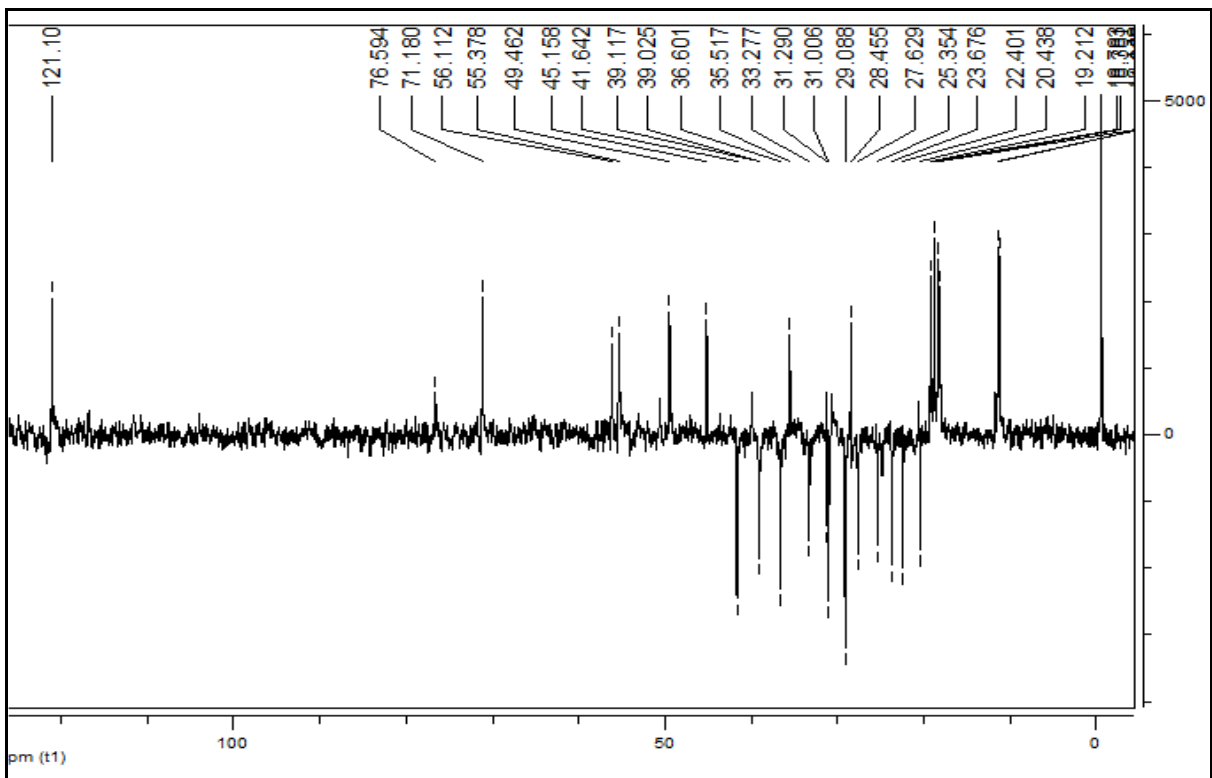


Figura 18 – Espectro de RMN DEPT da substância FHC1
 Fonte: a autora, 2010.

Tabela 11 – Valores de Deslocamentos Químicos (δ) de RMN ^{13}C /DEPT para FHC1 e Dados da Literatura para o β -Sitosterol (KOJIMA, SATO e HATANO, 1990)

C	β Sitosterol (Literatura)	Substância FHC1	C	β Sitosterol (Literatura)	Substância FHC1
1	37,2 (CH ₂)	37,226 (CH ₂)	16	28,248 (CH ₂)	28,2 (CH ₂)
2	32,6 (CH ₂)	31,883 (CH ₂)	17	56,008 (C)	56,8 (C)
3	71,8 (CH)	71,801 (CH)	18	11,855 (CH ₃)	11,9 (CH ₃)
4	42,3 (CH ₂)	42,280 (CH ₂)	19	19,400 (CH ₃)	19,0 (CH ₃)
5	140,7 (C)	140,713 (C)	20	36,136 (CH)	36,1 (CH)
6	121,7 (CH)	121,719 (CH)	21	18,769 (CH ₃)	18,8 (CH ₃)
7	31,9 (CH ₂)	31,633 (CH ₂)	22	33,908 (CH ₂)	33,9 (CH ₂)
8	31,9 (CH)	31,9 (CH)	23	25,994 (CH ₂)	26,1 (CH ₂)
9	50,1 (CH)	50,091 (CH)	24	45,789 (CH)	45,8 (CH)
10	36,6 (C)	36,489 (C)	25	29,091 (CH)	29,1 (CH)
11	21,1 (CH ₂)	21,065 (CH ₂)	26	19,827 (CH ₃)	19,8 (CH ₃)
12	39,9 (CH ₂)	39,743 (CH ₂)	27	19,006 (CH ₃)	19,4 (CH ₃)
13	42,3 (C)	42,3 (C)	28	23,029 (CH ₂)	23,1 (CH ₂)
14	56,6 (CH)	56,738 (CH)	29	11,974 (CH ₃)	12,0 (CH ₃)
15	24,3 (CH ₂)	24,299 (CH ₂)			

Fonte: a autora, 2010

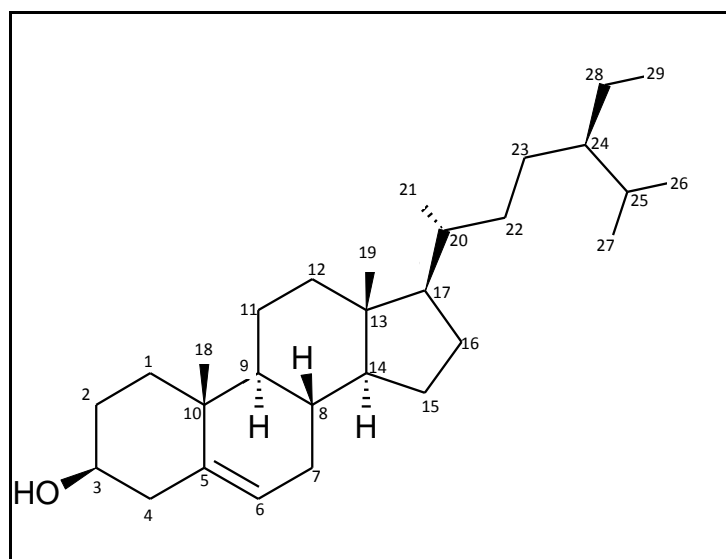


Figura 19 – Estrutura do β -sitosterol

Fonte: a autora, 2010.

5.6.2 Identificação da Amostra FHF1

As figuras 20 e 21 mostram os espectros de RMN ^1H e ^{13}C obtidos com a amostra isolada da fração hexano da folha, solúvel em metanol e denominada FHF1.

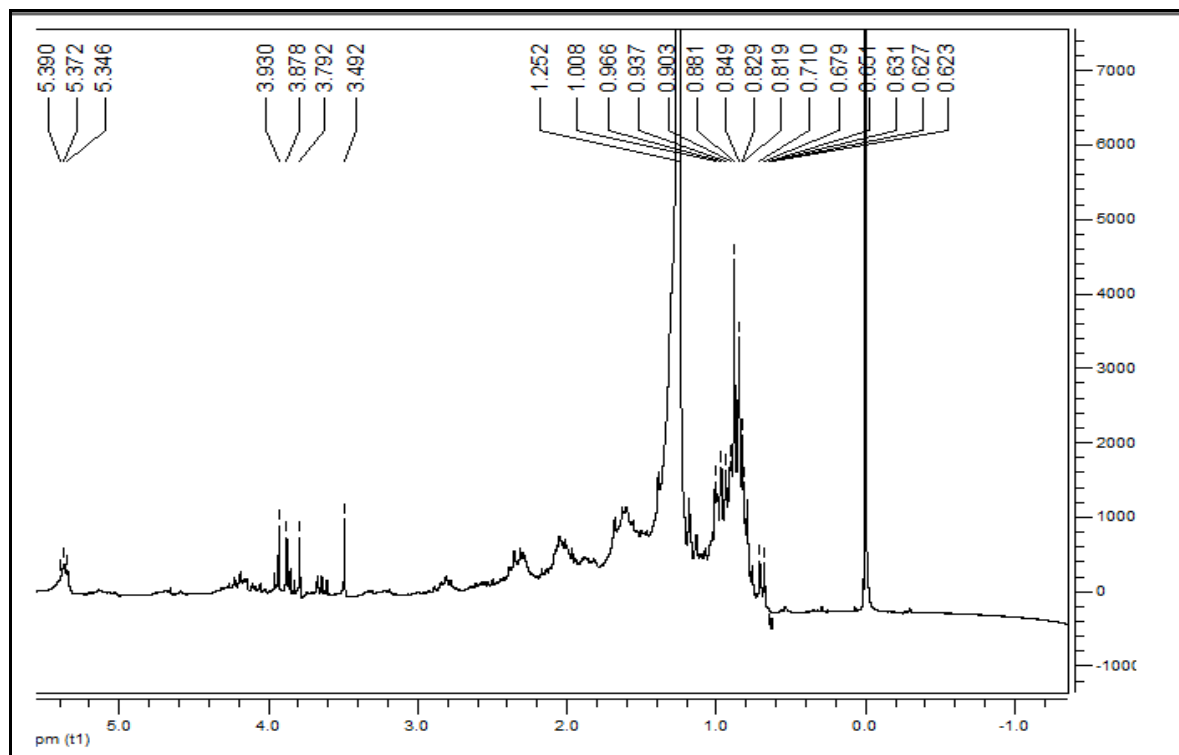


Figura 20 – Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 200 Hz) da substância FHF1
Fonte: a autora, 2010

No espectro de RMN ^1H (figura 20) observou-se deslocamentos na região entre 0,8 a 1,7 ppm, região característica de compostos alifáticos alicíclicos. O deslocamento em δ 1,25 indica a presença dos hidrogênios correspondentes a CH_2 , o que indica tratar-se de um hidrocarboneto de cadeia longa. A determinação do tamanho da cadeia carbônica seria dada pelo espectro de massa o qual não foi realizado.

Análises mais aprofundadas dos espectros de RMN juntamente com novas análises seriam necessárias para elucidar a estrutura da amostra FHF1 isolada da fração hexânica das folhas de *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo.

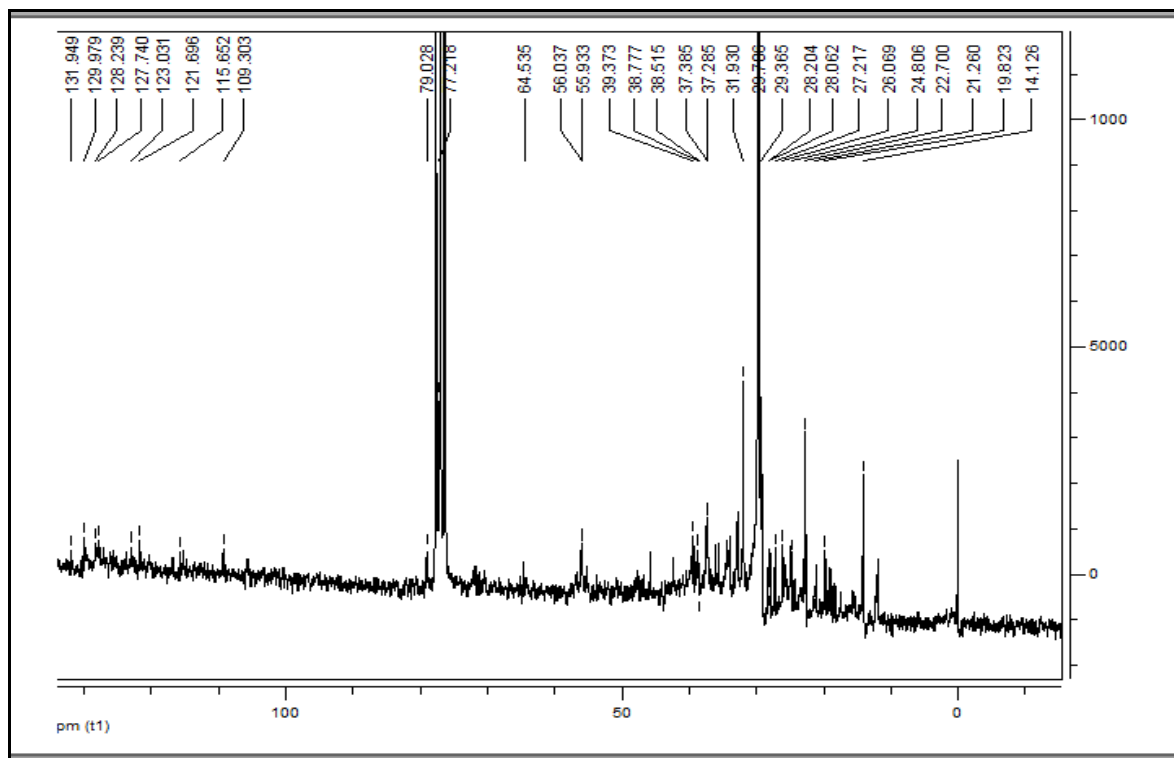


Figura 21 – Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 50 Hz) da substância FHF1
 Fonte: a autora, 2010.

5.6.3 Identificação da Amostra FCC1

A substância identificada como FCC1, isolada da fração clorofórmio do caule é solúvel em DMSO. A estrutura foi elucidada baseada em dados de RMN ^1H e ^{13}C e DEPT, e comparados à literatura.

O espectro de RMN ^1H (Figura 22) apresentou sinais compatíveis para um flavonóide. Um singleto entre δ 6,0 e δ 8,0 característico do hidrogênio ligado ao C-3, confirmou se tratar de uma flavona.

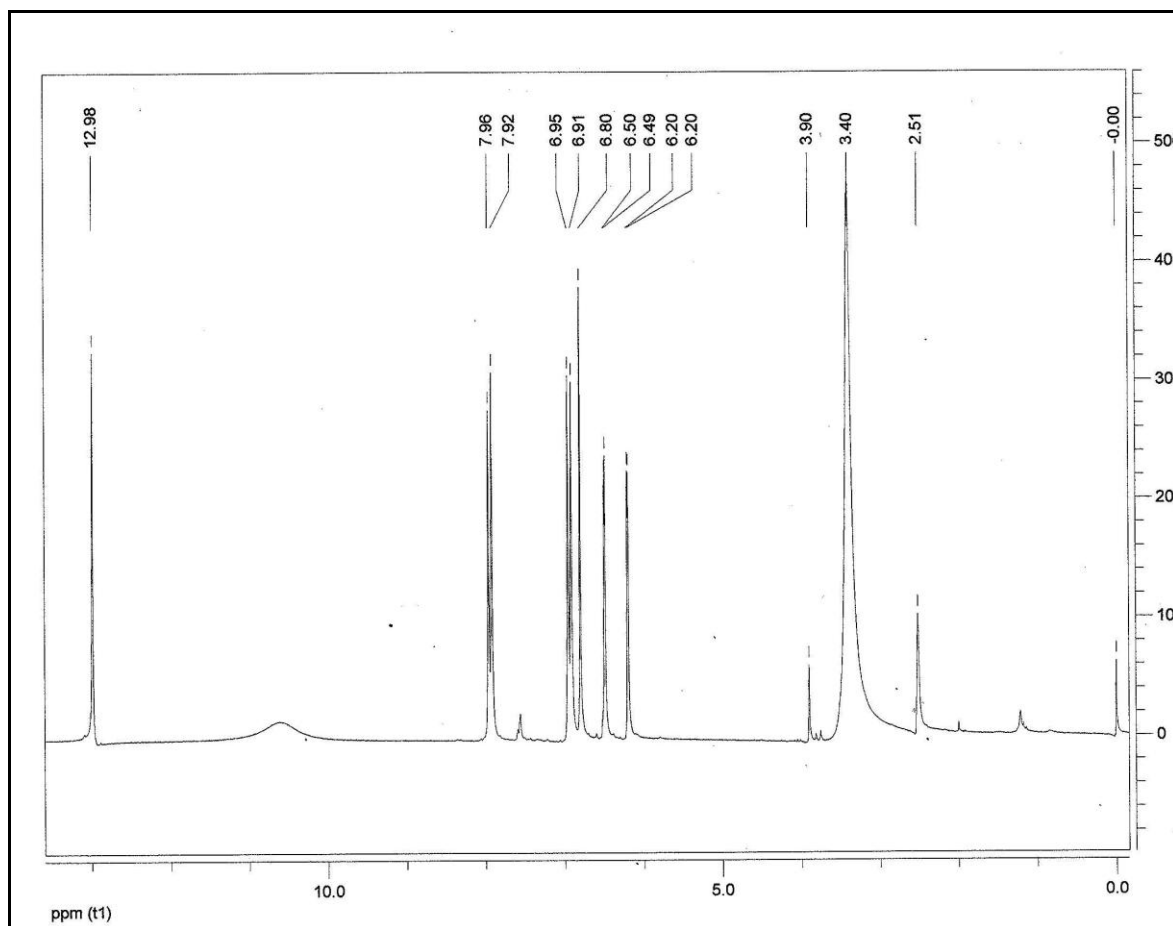


Figura 22 – Espectro de RMN ^1H (DMSO- D_6 , 200 Hz) da substância FCC1
 Fonte: a autora, 2010.

O sinal mais deslocado, ou seja, mais desblindado, como um simpleto em 12,98 ppm corresponde ao hidrogênio da hidroxila 5 da aglicona que se encontra em ligação de hidrogênio com o oxigênio da carbonila em 4.

A região entre 6,00 e 8,00 ppm, correspondente aos hidrogênios dos anéis aromáticos, apresentou sinais duplos (dupletos) em 7,96 ppm ($J= 8,68$ Hz) e 6,95 ppm ($J= 8,68$ Hz), com integração para dois hidrogênios cada um. As constantes de acoplamento observadas (8 - 9 Hz) indicam uma relação *orto* entre esses hidrogênios. Esses sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-2',6' e H-3',5' do anel B, respectivamente, característicos de um anel aromático substituído na posição 4' (padrão 4'-OH). Isso ocorre devido à simetria apresentada por este anel, fazendo com que os hidrogênios das posições 2' e 3' apresentem equivalência em deslocamento químico com os hidrogênios das posições 6' e 5', respectivamente.

Para o anel A foram observados dupletos em 6,20 ppm (H-6, $J = 1,64$ Hz) e 6,50 ppm (H-8, $J = 1,64$ Hz). A constante de acoplamento observada (aproximadamente 2 Hz) confirma um acoplamento *meta* entre esses hidrogênios, mostrando tratar-se de um flavonóide 5,7- dihidroxilado no anel A.

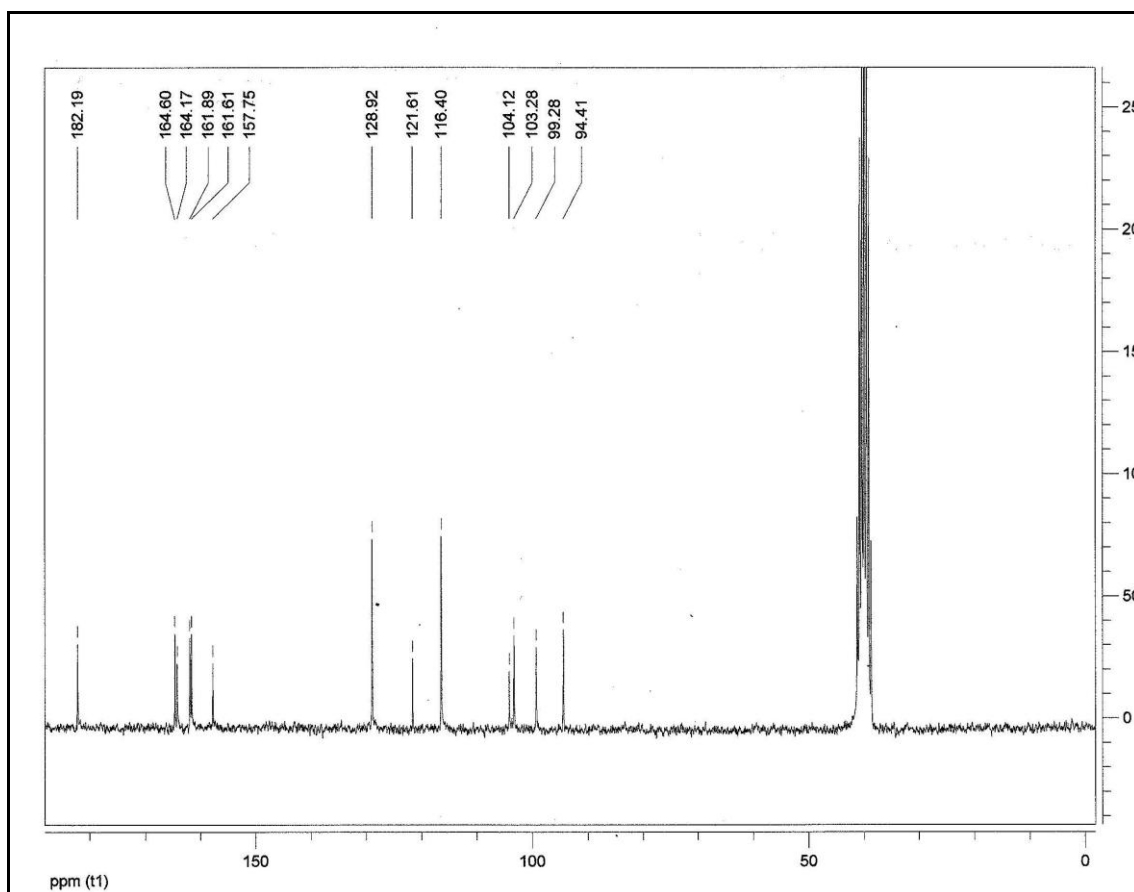


Figura 23 – Espectro de RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 50 Hz) da substância FCC1
Fonte: a autora, 2010.

Pelos dados acima apresentados, e pelos valores de deslocamentos químicos observados no espectro de ^{13}C (Figura 18), confirma-se para FCC1 a estrutura 5,7,4'- triidroxiflavona, também conhecida como apigenina (Figura 24). Os deslocamentos químicos dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C obtidos da amostra e os deslocamentos químicos extraídos da literatura para a molécula estão listados na Tabela 12.

Tabela 12 – Valores de Deslocamentos Químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C para FCC1 e Dados da Literatura para Apigenina (STOCHMAL *et al.*, 2001)

C	δC (ppm) Literatura	δC (ppm) FCC1	δH (ppm); m; J (Hz) Literatura	δH (ppm); m; J (Hz) FCC1
2	166.1	164.17	-	
3	104.8	103.28	6.87 s	6.80 s
4	183.9	182.19	-	
5	163.2	161.61	-	
6	100.2	99.28	6.19 d J=1,9	6.20 d J=1,64
7	165.5	164.60	-	
8	95.1	94.41	6.51 d J=1,9	6.50 d J=1,64
9	159.4	157.75	-	
10	105.4	104.12	-	
1'	126.1	121.61	-	
2' e 6'	129.1	128.92	7.98 d J=8,7	7,96 d J=8,68
3' e 5'	117.9	116.40	7.10 d J=8,7	6.95 d J= 8,68
4'	161.3	161.89	-	

Fonte: a autora, 2010.

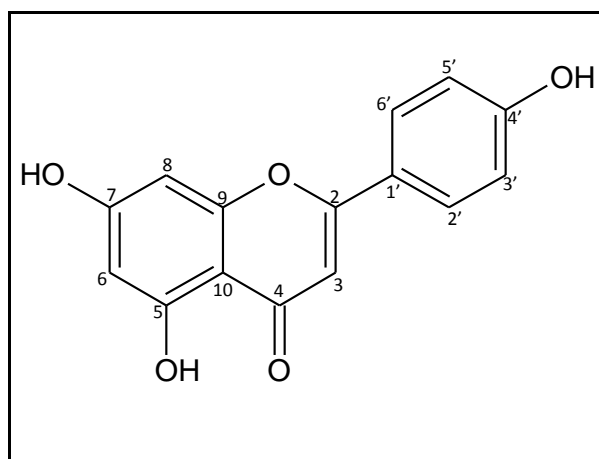


Figura 24 – Estrutura química da apigenina

Fonte: a autora, 2010.

A figura 25 mostra o cromatograma por CLAE obtido da amostra FCC1. O pico de retenção em 36.81 minutos confirma a pureza do material.

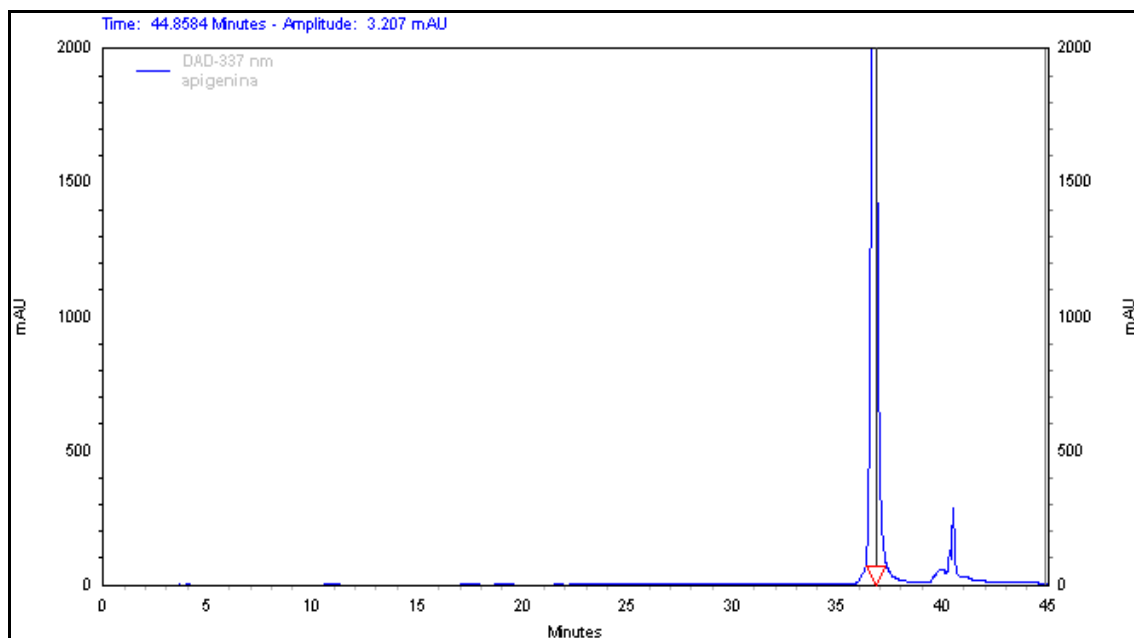


Figura 25 – Cromatograma obtido por CLAE da substância FCC1
Fonte: a autora, 2010

A metodologia utilizada para a obtenção do cromatograma da substância FCC1 está representada na tabela 13.

Tabela 13 – Metodologia Utilizada para CLAE da Substância FCC1

Tempo (min)	Fase Ácida (%) [*]	Acetonitrila (%)
0	98	2
30	69	31
35	60	40
36	5	95
40	5	95

(^{*}) Fase Ácida: Ácido Sulfúrico 0,02N e Ácido Fosfórico 0,2%.
Fonte: a autora, 2010

O espectro de ultravioleta da substância FCC1, figura 26, confirma as características de um flavonóide que, em metanol, exibem duas bandas de maior absorção na região entre 240-400 nm. A banda I absorve entre 300- 380 nm e a

banda II entre 240-280 nm. A banda I se refere ao anel B (cinamoil) e a banda II representa o anel A (benzoil) (KALEGARI, 2009).

A substância FCC1, em metanol, apresentou bandas (λ_{max}) em 339 nm referentes ao anel B e em 266 nm, referentes ao anel A, valores estes confirmados para a apigenina conforme descrito na literatura (MABRY, MARKHAM e THOMAS, 1970).

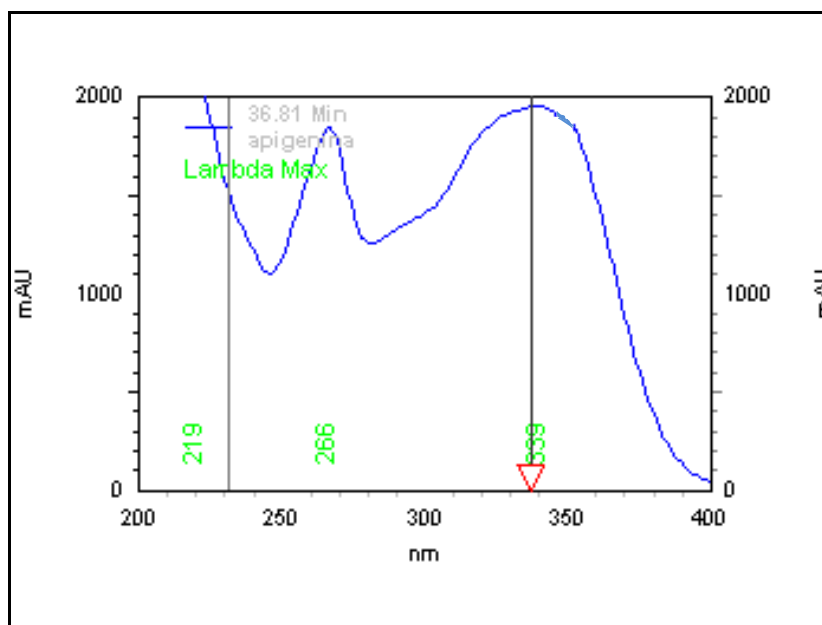


Figura 26 – Espectro UV da substância FCC1
Fonte: a autora, 2010

5.6.4 Análise das Frações Hidroalcoólicas Remanescentes do Caule e das Folhas

As frações hidroalcoólicas remanescentes do caule e das folhas foram submetidas a uma avaliação por meio de CLAE que forneceu um “fingerprint” destes extratos conforme representado nas figuras 27 e 28.

A CLAE é utilizada rotineiramente em fitoquímica tanto para isolamento de produtos naturais como para o controle de pureza de compostos isolados. Os cromatogramas que são empregados como impressão digital são comparados àqueles de amostras desconhecidas para permitir a identificação de drogas ou para efetuar pesquisa de adulterações (FERNANDES *et al.*, 2009).

A figura 27, juntamente com a análise das bandas de absorção no ultravioleta, indicam a presença de ácido clorogênico (absorção UV em 326 nm) e alguns flavonóides na fração hidroalcoólica remanescente do caule. O flavonóide 1 com pico mais intenso possui absorção no UV de 335 e 270 nm.

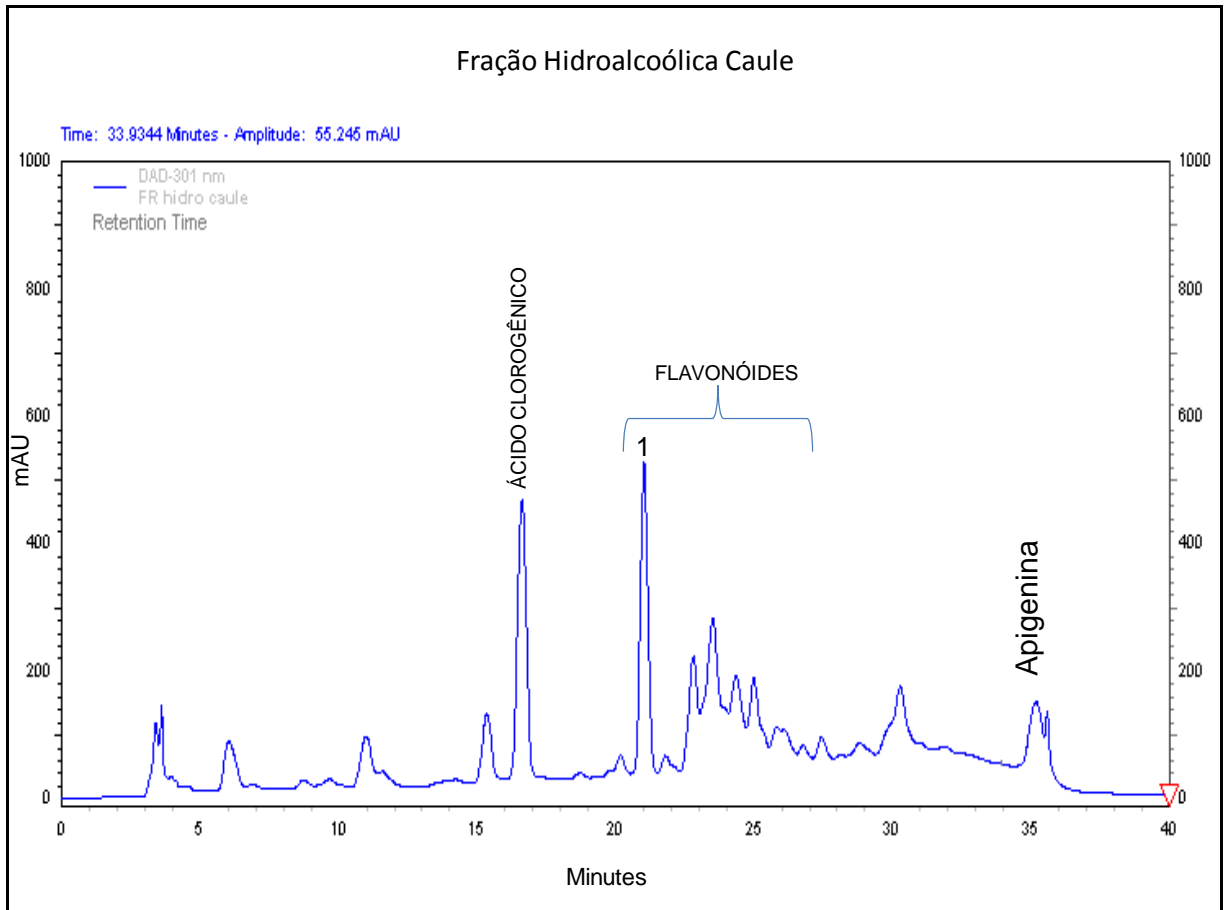


Figura 27 – Perfil cromatográfico obtido por CLAE da fração hidroalcoólica remanescente do caule
Fonte: a autora, 2010

A figura 28, juntamente com a análise das bandas de absorção no ultravioleta, indicam também a presença de ácido clorogênico (absorção UV em 325nm) e de alguns flavonóides na fração hidroalcoólica remanescente das folhas. O flavonóide 1 com pico mais intenso possui absorção no UV de 335 e 270nm e está presente nas duas frações analisadas.

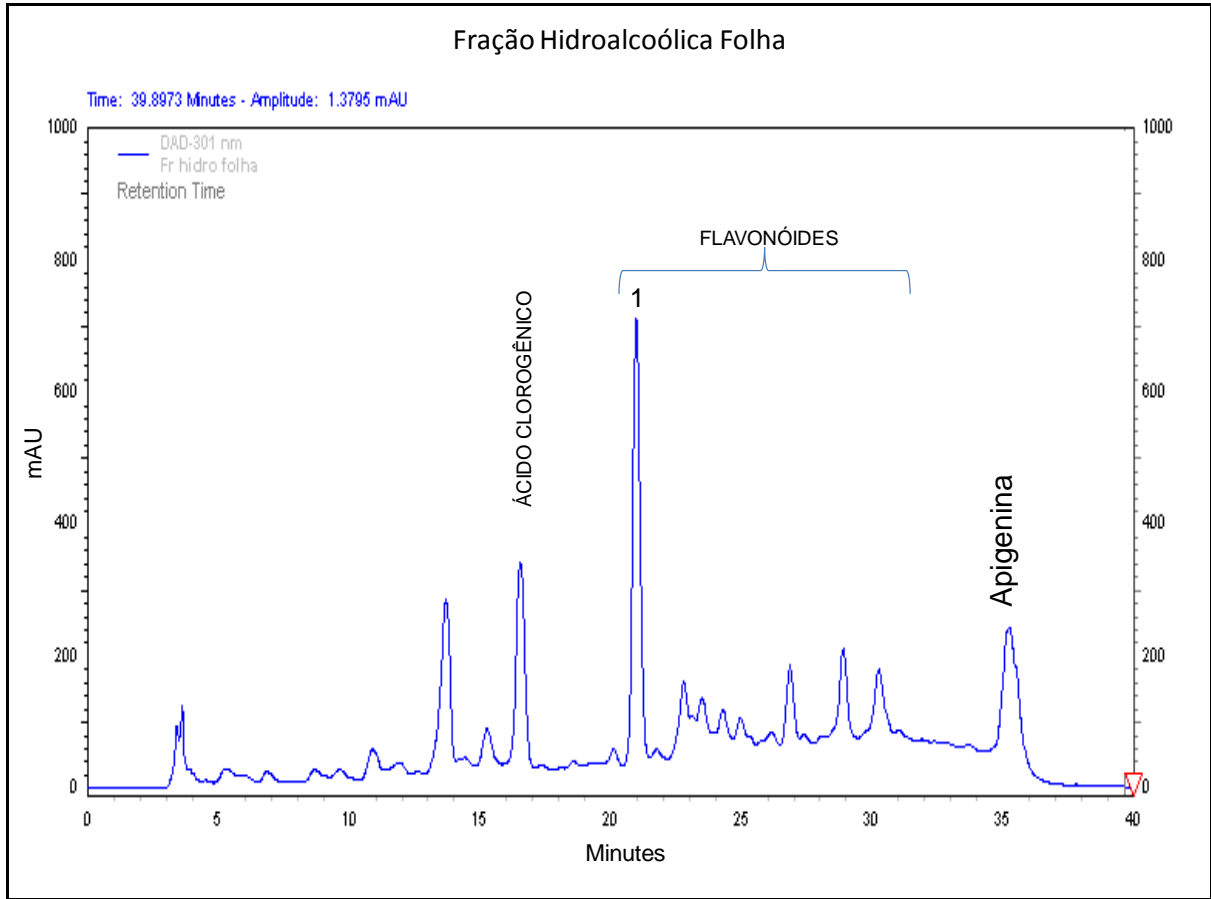


Figura 28 – Perfil cromatográfico obtido por CLAE da fração hidroalcoólica remanescente das folhas
Fonte: a autora, 2010

Os espectros das figuras 27 e 28 foram obtidos pelo método descrito na tabela 14.

Tabela 14 – Metodologia Utilizada para CLAE das Frações HAC e HAF

Tempo (min)	Fase Ácida (%)*	Metanol (%)
0	100	0
30	45	53
31	20	80
35	20	80
36	100	0
40	100	0

(*) Fase Ácida: Ácido Sulfúrico 0,02N e Ácido Fosfórico 0,2%.
Fonte: a autora, 2010

5.7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Tynanthus micranthus* CORR. MÉLLO

5.7.1 Atividade Microbiológica

Os resultados obtidos na determinação da Concentração Inibitória Mínima estão representados na tabela 15 e indicam a influência dos extratos sobre algumas bactérias, todos na concentração igual ou maior que 1000 µg/mL.

As substâncias β-sitosterol e apigenina presentes na espécie *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo possuem atividade antimicrobiana já evidenciada frente algumas bactérias, conforme mencionado no item 2.10 e 2.11, e isto pode estar sendo confirmado nestas análises.

Novos ensaios devem ser realizados com as frações e seus isolados para esclarecer os agentes que estão ocasionando esta atividade.

Tabela 15 – Concentração Inibitória Mínima dos Extratos Brutos de *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DE INIBIÇÃO				
	<i>S.aureus</i> ATCC 25913 e 25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E.* coli</i> ATCC 25922 e 35218	<i>E.** faecalis</i> ATCC 29212 e 5129	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603
EBR	-	-	1000 µg/mL	-	-
EBC	1000 µg/mL	1000 µg/mL	1000 µg/mL	-	-
EBF	1000 µg/mL	1000 µg/mL	-	-	-

Nota: S.: *Staphylococcus*; P.: *Pseudomonas*; E.*: *Escherichia*; E.** *Enterococcus*; K.: *Klebsiela*.
Fonte: a autora, 2010

5.7.2 Teste de Toxicidade Frente *Artemia salina*

Foram calculadas as DL₅₀ das amostras testadas a partir do teste estatístico Probitos, conforme resultados presentes na tabela 16.

As frações AER, AEC, AEF, CC e CF apresentaram um valor de DL₅₀ inferior a 1000µg/mL, concentração máxima para uma amostra ser considerada ativa

segundo Meyer *et al* (1982), caracterizando assim toxicidade destas amostras frente ao molusco.

Comparando-se com o sulfato de quinidina, utilizado como controle positivo, as frações AER e AEC foram as que apresentaram maior toxicidade.

Os controles realizados com os solventes etanol e clorofórmio não apresentaram influência sobre os resultados, pois nenhuma larva morreu na presença dos mesmos, do mesmo modo que o controle realizado com salina.

O teste de toxicidade sobre a *Artemia salina* tem demonstrado uma boa correlação com várias atividades biológicas (MEYER *et al.*, 1982), como atividade antitumoral, atividade contra o *Trypanosoma cruzi*, atividade antibacteriana e antifúngica. Em geral, extratos com alta toxicidade para *Artemia salina* ($DL_{50} < 200\mu\text{g/mL}$) apresentam alto potencial para estas atividades (COSTA *et al.*, 2009).

Tabela 16 – Resultados de DL_{50} no Teste de Toxicidade frente à *Artemia salina*

Fração	DL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Intervalo de Confiança (95%) ($\mu\text{g/mL}$)
EBR	>1000	-
EBC	>1000	-
EBF	>1000	-
HR	>1000	-
HC	>1000	-
HF	>1000	-
CR	>1000	-
CC	201,29	175,93 – 230,30
CF	396,13	310,14 – 505,97
AER	42,99	32,30 – 57,21
AEC	63,88	41,55 – 98,22
AEF	116,59	76,86 – 176,85
HAR	>1000	-
HAC	>1000	-
HAF	>1000	-
Sulfato de Quinidina	50,12	35,8 – 70,16

Fonte: a autora, 2010

5.7.3 Alelopatia

5.7.3.1 Avaliação da germinação

Qualquer alteração ocorrida na germinação influenciada por uma outra planta, pode ser decorrente da interferência em todas as fases da germinação ou especificamente em uma delas.

De acordo com a tabela 17, observa-se uma pequena influência negativa da fração CC sobre a germinação de *Lactuca sativa*, na concentração de 0,8mg, em comparação com os controles água e etanol.

A fração HAF apresentou pequena influência positiva sobre a germinação de *Lactuca sativa* também em comparação com os controles.

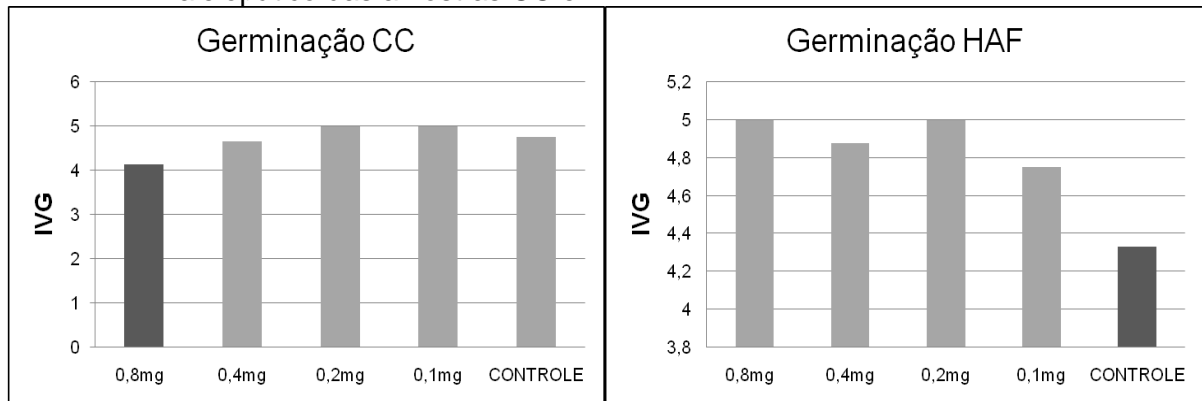
A influência das frações CC e HAF sobre a germinação de *Lactuca sativa* estão melhor representadas no gráfico 1.

Tabela 17 – Teste de Scott-Knott realizado para avaliar os Índices de Velocidade de Germinação de *Lactuca sativa* no Ensaio Alelopático com Extrato Bruto e Frações de *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (mg)				CONTROLE ETANOL	CONTROLE ÁGUA	CONTROLE CLOROF.
	0,8	0,4	0,2	0,1			
EBR	4,125 a1	4,750 a1	4,625 a1	4,625 a1	4,875 a1	4,4575 a1	-
EBC	4,875 a1	5,00 a1	4,75 a1	4,875 a1	4,875 a1	4,75 a1	-
EBF	5,00 a1	5,00 a1	5,00 a1	4,75 a1	4,583 a1	4,75 a1	-
HR	4,875 a1	4,875 a1	4,75 a1	4,75 a1	4,50 a1	4,50 a1	-
HC	4,875 a1	4,875 a1	4,875 a1	4,375 a1	4,50 a1	4,50 a1	-
HF	4,50 a1	4,25 a1	4,75 a1	4,50 a1	-	4,50 a1	5,00 a1
CR	4,50 a1	5,00 a1	4,75 a1	4,75 a1	4,75 a1	4,75 a1	-
CC	4,125 a1	4,652 a2	5,00 a2	5,00 a2	4,75 a2	4,75 a2	-
CF	4,375 a1	4,625 a1	4,875 a1	4,625 a1	4,50 a1	4,50 a1	-
ERA	4,625	4,50 a1	4,875 a1	4,00 a1	3,875 a1	4,365 a1	-
AEC	4,582 a1	4,75 a1	3,707 a1	3,582 a1	3,875 a1	4,54 a1	-
AEF	4,625 a1	4,75 a1	4,75 a1	5,00 a1	4,75 a1	4,75 a1	-
HAR	4,75 a1	4,375 a1	4,875 a1	4,50 a1	3,875 a1	4,3325 a1	-
HAC	4,75 a1	4,375 a1	3,75 a1	4,625 a1	3,875 a1	4,332 a1	-
HAF	5,00 a2	4,875 a2	5,00 a2	4,75 a2	3,875 a1	4,3325 a1	-

(*) Amostras seguidas da mesma letra e numeração na mesma linha não diferem estatisticamente
Fonte: a autora, 2010

Gráfico 1 – Resultados dos Índices de Velocidade de Germinação (IVG) em ensaio alelopático das amostras CC e HAF



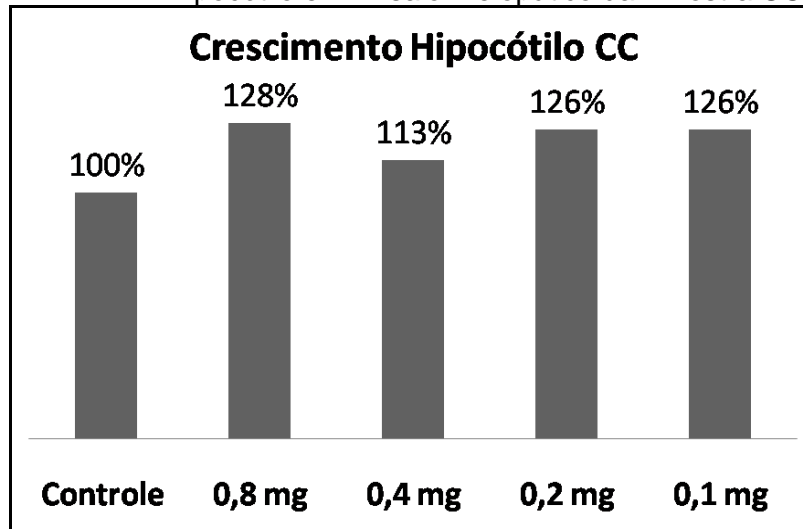
Fonte: a autora, 2010

5.7.3.2 Avaliação do crescimento

De acordo com a tabela 18 e 20, não houve influência no crescimento dos hipocótilos e radículas das sementes de *Lactuca sativa*, na avaliação com extrato bruto e frações das raízes e folhas de *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo visto que se enquadram no mesmo grupo estatístico dos controles.

A influência no crescimento de *Lactuca sativa*, na avaliação com extrato bruto e frações do caule de *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo está representada na tabela 19 e mostra uma variação estatística na fração CC em todas as concentrações e principalmente na concentração de 0,8mg, caracterizando uma influência positiva no crescimento do hipocótilo das sementes, contrastando com a influência negativa que o mesmo exerce na germinação. A influência está melhor representada no gráfico 2.

Gráfico 2 – Resultados Percentuais do Crescimento do Hipocótilo em Ensaio Alelopático da Amostra CC



Fonte: a autora, 2010

Geralmente os efeitos causados tendem a ser dependentes da concentração dos aleloquímicos, sendo mais acentuados em concentrações mais altas, como ocorreu em FCC. Mas alguns autores afirmam que os efeitos alelopáticos podem escapar deste padrão, pois resultam de um somatório de alterações moleculares (MARASCHIN-SILVA e AQUILA, 2006), e isto pode justificar a diferença apresentada pela concentração de 0,4 mg em comparação as concentrações de 0,2 mg e 0,1 mg.

Tabela 18 – Teste de Scott-Knott para Avaliação do Crescimento no Ensaio Alelopático com as Raízes de *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo

TRATAMENTO	REPETIÇÃO	RADÍCULA*					HIPOCÓTILO*				
		MÉDIA (MM)					MÉDIA (MM)				
		EBR	HR	CR	AER	HAR	EBR	HR	CR	ERA	HAR
0,8	1	37.0 a1	40.6 a1	37.8 a1	29.2 a1	39.0 a1	25.2 a1	30.6 a1	30.4 a1	24.2 a1	30.8 a1
	2	42.0 a1	31.8 a1	31.8 a1	34.2 a1	33.6 a1	31.2 a1	27.2 a1	31.0 a1	31.8 a1	34.0 a1
	3	37.2 a1	33.2 a1	30.0 a1	34.4 a1	26.8 a1	36.4 a1	38.8 a1	31.2 a1	26.6 a1	30.2 a1
	4	35.4 a1	39.6 a1	27.2 a1	23.8 a1	36.0 a1	30.4 a1	34.8 a1	28.8 a1	27.8 a1	33.6 a1
0,4	1	34.0 a1	29.4 a1	39.0 a1	36.8 a1	36.4 a1	24.6 a1	33.8 a1	30.8 a1	34.6 a1	25.2 a1
	2	45.2 a1	28.6 a1	35.4 a1	35.0 a1	32.2 a1	30.4 a1	22.8 a1	36.2 a1	35.6 a1	35.0 a1
	3	33.8 a1	35.6 a1	30.6 a1	36.6 a1	34.8 a1	27.2 a1	33.6 a1	34.6 a1	29.4 a1	33.0 a1
	4	43.4 a1	36.6 a1	24.2 a1	26.2 a1	31.4 a1	33.4 a1	28.6 a1	32.8 a1	31.4 a1	37.4 a1
0,2	1	30.4 a1	39.0 a1	32.2 a1	41.4 a1	36.0 a1	26.2 a1	35.4 a1	31.0 a1	35.8 a1	36.2 a1
	2	31.8 a1	37.6 a1	30.4 a1	35.4 a1	43.2 a1	24.8 a1	33.6 a1	30.8 a1	41.0 a1	33.2 a1
	3	33.0 a1	34.2 a1	32.4 a1	33.4 a1	25.4 a1	28.8 a1	38.0 a1	25.8 a1	38.2 a1	28.2 a1
	4	34.4 a1	38.6 a1	33.8 a1	36.2 a1	32.0 a1	32.4 a1	35.4 a1	33.6 a1	36.0 a1	27.2 a1
0,1	1	42.8 a1	38.0 a1	42.0 a1	30.4 a1	38.6 a1	35.0 a1	23.2 a1	32.8 a1	31.2 a1	25.8 a1
	2	29.0 a1	30.8 a1	36.2 a1	41.2 a1	34.4 a1	26.0 a1	34.2 a1	37.4 a1	30.0 a1	25.6 a1
	3	38.0 a1	35.2 a1	29.6 a1	31.4 a1	38.8 a1	27.8 a1	30.2 a1	29.2 a1	24.2 a1	31.6 a1
	4	39.8 a1	31.0 a1	37.2 a1	34.4 a1	42.4 a1	27.0 a1	28.2 a1	36.0 a1	24.6 a1	31.4 a1
Controle Etanol	1	39.2 a1	42.6 a1	32.4 a1	37.4 a1	32.4 a1	25.8 a1	28.8 a1	26. a1	32.8 a1	26.0 a1
	2	32.8 a1	37.0 a1	39.2 a1	25.2 a1	39.2 a1	31.8 a1	29.8 a1	27.2 a1	26.2 a1	27.2 a1
	3	38.2 a1	37.8 a1	36.0 a1	32.8 a1	36.0 a1	33.2 a1	32.2 a1	36.4 a1	29.6 a1	36.4 a1
	4	41.6 a1	31.2 a1	26.0 a1	22.8 a1	26.0 a1	30.8 a1	22.4 a1	26.2 a1	24.8 a1	26.2 a1
Controle Água	1	33.8 a1	38.0 a1	40.6 a1	23.6 a1	40.6 a1	35.4 a1	35.4 a1	33.8 a1	33.2 a1	33.8 a1
	2	36.0 a1	38.0 a1	34.0 a1	29.8 a1	34.0 a1	25.0 a1	24.6 a1	36.4 a1	30.8 a1	36.4 a1
	3	36.4 a1	35.4 a1	26.2 a1	34.2 a1	26.2 a1	30.6 a1	34.2 a1	24.2 a1	33.4 a1	24.2 a1
	4	35.0 a1	33.2 a1	37.0 a1	28.6 a1	37.0 a1	26.4 a1	30.6 a1	28.6 a1	19.8 a1	28.6 a1

* Médias seguidas pela mesma letra e numeração na mesma coluna não diferem estatisticamente.

Fonte: a autora, 2010

Tabela 19 – Teste de Scott-Knott para Avaliação do Crescimento no Ensaio Alelopático com o Caule de *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo

TRATAMENTO	REPETIÇÃO	RADÍCULA*					HIPOCÓTILO*				
		MÉDIA (MM)					MÉDIA (MM)				
		EBC	HC	CC	AEC	HAC	EBC	HC	CC	AEC	HAC
0,8	1	36.6 a1	36.0 a1	33.4 a1	28.6 a1	34.4 a1	35.4 a1	30.2 a1	36.0 a2	17.0 a1	35.4 a1
	2	24.0 a1	33.0 a1	29.0 a1	42.4 a1	35.8 a1	29.4 a1	30.2 a1	35.0 a2	32.0 a1	29.4 a1
	3	31.0 a1	35.8 a1	32.6 a1	38.6 a1	35.0 a1	34.4 a1	33.0 a1	40.0 a2	27.4 a1	34.4 a1
	4	39.8 a1	36.8 a1	30.8 a1	35.2 a1	35.6 a1	33.2 a1	31.8 a1	39.6 a2	26.8 a1	33.2 a1
0,4	1	32.4 a1	25.4 a1	30.6 a1	28.6 a1	32.0 a1	32.2 a1	29.2 a1	29.8 a1	24.4 a1	32.2 a1
	2	27.0 a1	27.4 a1	32.4 a1	39.4 a1	35.4 a1	39.8 a1	24.8 a1	37.8 a2	28.4 a1	39.8 a1
	3	33.4 a1	35.0 a1	33.6 a1	25.2 a1	37.8 a1	27.0 a1	29.0 a1	35.2 a2	25.2 a1	27.0 a1
	4	27.4 a1	38.8 a1	27.2 a1	26.6 a1	36.8 a1	34.4 a1	34.4 a1	30.0 a1	21.8 a1	34.4 a1
0,2	1	33.4 a1	31.8 a1	29.6 a1	34.8 a1	27.6 a1	32.2 a1	29.0 a1	39.8 a2	31.6 a1	32.2 a1
	2	31.8 a1	29.4 a1	38.8 a1	23.6 a1	31.0 a1	35.0 a1	22.6 a1	43.0 a2	26.6 a1	35.0 a1
	3	31.8 a1	24.4 a1	32.2 a1	32.2 a1	35.2 a1	38.4 a1	24.4 a1	36.0 a2	27.8 a1	38.4 a1
	4	30.0 a1	30.2 a1	29.8 a1	26.0 a1	41.2 a1	31.6 a1	25.6 a1	28.6 a1	29.0 a1	31.6 a1
0,1	1	27.0 a1	32.6 a1	24.4 a1	32.8 a1	42.4 a1	34.4 a1	34.0 a1	28.6 a1	37.2 a1	34.4 a1
	2	27.6 a1	33.4 a1	38.2 a1	40.6 a1	33.4 a1	30.0 a1	33.0 a1	45.2 a2	32.8 a1	28.0 a1
	3	33.8 a1	24.4 a1	39.0 a1	35.2 a1	42.6 a1	36.0 a1	25.2 a1	35.2 a2	34.2 a1	36.0 a1
	4	31.2 a1	33.0 a1	30.2 a1	34.8 a1	39.6 a1	32.2 a1	29.8 a1	38.4 a2	26.0 a1	32.2 a1
Controle Etanol	1	31.8 a1	42.6 a1	32.4 a1	37.4 a1	37.4 a1	32.8 a1	28.8 a1	26.0 a1	32.8 a1	32.8 a1
	2	31.0 a1	37.0 a1	39.2 a1	25.2 a1	25.2 a1	26.2 a1	29.8 a1	27.2 a1	26.2 a1	26.2 a1
	3	30.0 a1	37.8 a1	36.0 a1	32.8 a1	32.8 a1	29.6 a1	32.2 a1	30.4 a1	29.6 a1	29.6 a1
	4	18.4 a1	31.2 a1	26.0 a1	22.8 a1	22.8 a1	24.8 a1	22.4 a1	27.8 a1	24.8 a1	24.8 a1
Controle Água	1	25.4 a1	38.0 a1	40.6 a1	23.6 a1	24.0 a1	33.2 a1	35.4 a1	30.8 a1	33.2 a1	33.2 a1
	2	27.4 a1	38.0 a1	34.0 a1	29.8 a1	29.8 a1	30.8 a1	24.6 a1	22.8 a1	30.8 a1	30.8 a1
	3	31.0 a1	35.4 a1	26.2 a1	34.2 a1	34.2 a1	33.4 a1	34.2 a1	32.0 a1	33.4 a1	33.4 a1
	4	28.6 a1	33.2 a1	37.0 a1	28.6 a1	28.6 a1	19.8 a1	30.6 a1	29.0 a1	19.8 a1	19.8 a1

* Médias seguidas pela mesma letra e numeração na mesma coluna não diferem estatisticamente.

Fonte: a autora, 2010

Tabela 20 – Teste de Scott-Knott para Avaliação do Crescimento no Ensaio Alelopático com as Folhas de *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo

TRATAMENTO	REPETIÇÃO	RADÍCULA*					HIPOCÓTILO*				
		MÉDIA (MM)					MÉDIA (MM)				
		EBF	HF	CF	AEF	HAF	EBF	HF	CF	AEF	HAF
0,8	1	26.6 a1	32.6 a1	30.8 a1	36.4 a1	34.0 a1	30.6 a1	35.4 a1	31.0 a1	34.0 a1	26.4 a1
	2	32.0 a1	37.2 a1	25.4 a1	35.4 a1	41.4 a1	31.8 a1	31.0 a1	35.2 a1	27.6 a1	28.8 a1
	3	33. 2a1	27.2 a1	23.4 a1	37.8 a1	30.8 a1	28.6 a1	31.2 a1	21.2 a1	37.2 a1	27.6 a1
	4	30.2 a1	41.6 a1	26.2 a1	35.4 a1	30.4 a1	34.8 a1	31.4 a1	41.8 a1	36.4 a1	23.2 a1
0,4	1	26.2 a1	31.2 a1	28.8 a1	29.4 a1	37.6 a1	26.6 a1	22.6 a1	37.6 a1	35.0 a1	25.6 a1
	2	29.8 a1	36.6 a1	36.0 a1	38.0 a1	42.2 a1	27.0 a1	36.0 a1	42.6 a1	40.0 a1	30.4 a1
	3	34.4 a1	31.4 a1	36.8 a1	28.6 a1	36.4 a1	30.2 a1	38.6 a1	44.2 a1	36. 2a1	30.8 a1
	4	27.8 a1	30.0 a1	29.2 a1	31.6 a1	32.2 a1	24.2 a1	36.4 a1	38.2 a1	31.6 a1	29.2 a1
0,2	1	32.4 a1	38.4 a1	35.0 a1	32.0 a1	37.4 a1	32.0 a1	32.0 a1	34.6 a1	43.4 a1	29.6 a1
	2	28.8 a1	32.0 a1	32.2 a1	31.6 a1	37.2 a1	28.8 a1	30.2 a1	38.0 a1	35.6 a1	24.0 a1
	3	31.8 a1	38.4 a1	29.0 a1	22.8 a1	34.4 a1	28.6 a1	37.4 a1	36.4 a1	31.4 a1	25.4 a1
	4	26.8 a1	36.2 a1	32.4 a1	23.8 a1	29.6 a1	28.6 a1	37.8 a1	31.8 a1	32.6 a1	22.8 a1
0,1	1	30.4 a1	37.0 a1	29.6 a1	31.4 a1	29.4 a1	29.8 a1	33.4 a1	28.4 a1	36.8 a1	28.4 a1
	2	26.6 a1	36.2 a1	30.6 a1	28.0 a1	36.0 a1	29.4 a1	30.4 a1	43.4 a1	33.8 a1	24.2 a1
	3	30.8 a1	41.0 a1	23.0 a1	22.0 a1	38.6 a1	25.8 a1	32.0 a1	32.6 a1	27.8 a1	29.2 a1
	4	29.0 a1	36.2 a1	33.0 a1	35.2 a1	37.4 a1	27.8 a1	36.8 a1	38.0 a1	40.0 a1	27.8 a1
Controle Etanol ou Clorofórmio para (HF)	1	28.8 a1	25.2 a1	42.6 a1	32.4 a1	37.4 a1	26.0 a1	33.4 a1	28.8 a1	26.0 a1	24.8 a1
	2	33.6 a1	27.0 a1	37.0 a1	39.2 a1	25.2 a1	27.0 a1	30.4 a1	29.8 a1	27.2 a1	26.2 a1
	3	25.8 a1	41.4 a1	37.8 a1	36.0 a1	32.8 a1	30.4 a1	30.4 a1	32.2 a1	36.4 a1	29.6 a1
	4	32.2 a1	41.4 a1	31.2 a1	26.0 a1	22.8 a1	27.8 a1	38.4 a1	22.4 a1	26.2 a1	24.8 a1
Controle Água	1	25.6 a1	24.0 a1	38.0 a1	40.6 a1	24.0 a1	30.8 a1	33.2 a1	35.4 a1	33.8 a1	26.2 a1
	2	24.8 a1	29.8 a1	38.4 a1	34.0 a1	29.8 a1	22.8 a1	30.8 a1	24.6 a1	36.4 a1	30.8 a1
	3	26.0 a1	34.2 a1	35.4 a1	26.2 a1	34.2 a1	32.0 a1	33.4 a1	34.2 a1	24.2 a1	25.4 a1
	4	25.2 a1	28.6 a1	33.2 a1	37.0 a1	28.6 a1	29.0 a1	33.2 a1	28.6 a1	28.6 a1	19.8 a1

* Médias seguidas pela mesma letra e numeração na mesma coluna não diferem estatisticamente.

Fonte: a autora, 2010

5.7.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.7.4.1 Ensaio pelo método da redução do complexo do fosfomolibdênio

Foram calculadas as atividades antioxidantes pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio de cada amostra com relação à vitamina C e à rutina, considerando que estas substâncias possuem 100% de atividade. Os resultados encontrados são mostrados na tabela 21.

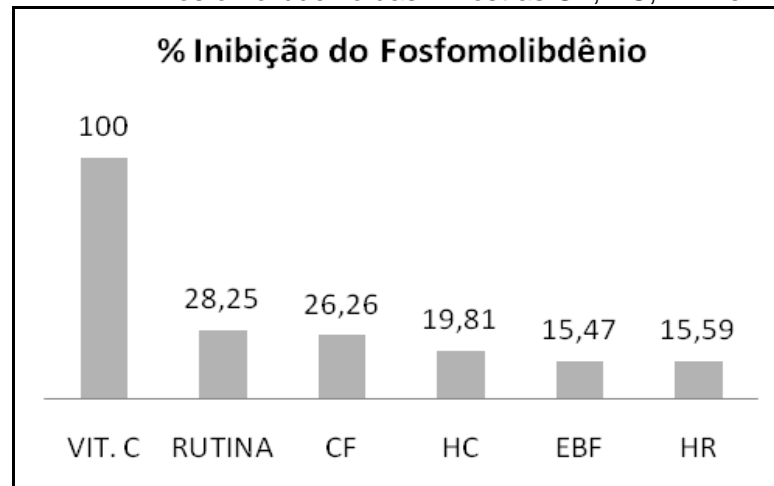
Tabela 21 – Resultados da Atividade Antioxidante pela Redução do Complexo do Fosfomolibdênio

Amostra	Atividade Antioxidante em relação à rutina (%)	Atividade Antioxidante em relação à vitamina C (%)
EBR	13,278	3,751
EBC	18,672	5,275
EBF	54,772	15,475
HR	55,187	15,592
HC	70,124	19,812
HF	8,299	2,345
CR	28,216	7,972
CC	28,631	8,089
CF	92,946	26,260
ERA	7,884	2,227
AEC	19,917	5,627
AEF	29,046	8,206
HAR	2,489	0,703
HAC	7,469	2,110
HAF	14,938	4,220

Fonte: a autora, 2010

Foram realizadas paralelamente, análises estatísticas dos resultados a partir do Teste de Tukey e observou-se que nenhuma amostra se mostrou no grupo da vitamina C utilizada como controle positivo. A amostra CF está no mesmo grupo estatístico da rutina, seguidos da amostra HC. O gráfico 3 compara as amostras com os melhores resultados obtidos e a rutina, com relação à vitamina C.

Gráfico 3 – Porcentagem de Inibição do Complexo Fosfomolibdênio das Amostras CF, HC, EBF e HR

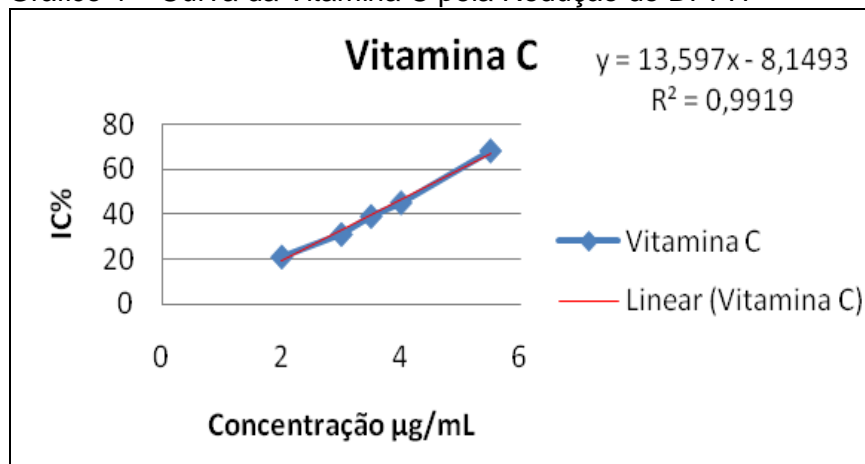


Fonte: a autora, 2010

5.7.4.2 Ensaio antioxidante pela redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

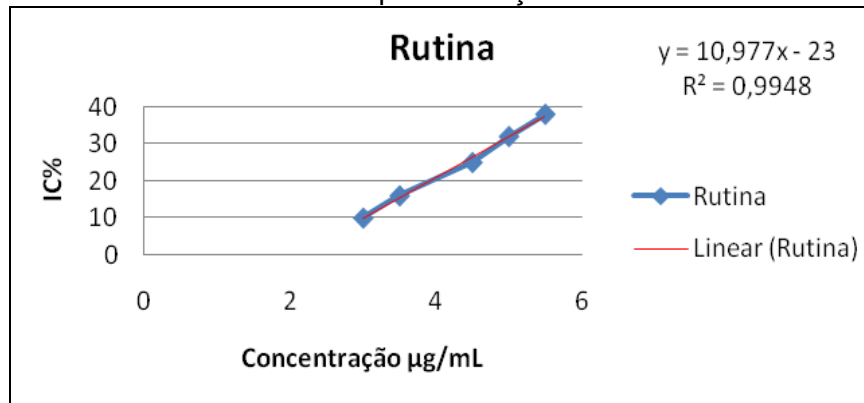
Os resultados desta análise foram obtidos calculando-se a porcentagem de inibição do DPPH partindo-se para a determinação da concentração da amostra que reduz 50% da concentração inicial de DPPH (IC_{50}), feita por regressão linear, conforme exemplos mostrados nos gráficos 4 e 5, para vitamina C e rutina.

Gráfico 4 – Curva da Vitamina C pela Redução do DPPH



Fonte: a autora, 2010

Gráfico 5 – Curva da Rutina pela Redução do DPPH



Fonte: a autora, 2010

Os resultados de IC_{50} para as amostras testadas são apresentados na tabela 22 com \pm desvio padrão. Para verificar a diferença estatística entre as amostras aplicou-se Anova, e para localização das diferenças o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Cada amostra foi comparada posteriormente com os padrões de vitamina C e rutina, e observou-se 10 grupos que se diferem entre si das 15 amostras analisadas. A amostra AEC foi a que mais se aproximou dos padrões Vitamina C e Rutina.

Tabela 22 – Resultado de IC_{50} e Teste de Tukey para Redução do DPPH

Amostra	IC_{50} (μg) \pm SD	Classificação do Teste de Tukey*									
Vitamina C	4,294 \pm 0,031	a1									
Rutina	6,630 \pm 0,026	a1									
AEC	34,29 \pm 0,355		a2								
CC	57,563 \pm 4,866			a3							
AEF	85,634 \pm 4,356				a4						
HC	120,257 \pm 2,355					a5					
HAC	124,618 \pm 7,414					a5					
EBF	130,347 \pm 0,240					a5					
EBC	143,847 \pm 3,199						a6				
ERA	150,913 \pm 3,694						a6				
CR	181,493 \pm 3,510							a7			
HAF	188,170 \pm 3,861							a7			
EBR	216,330 \pm 0,065								a8		
CF	215,590 \pm 4,911								a8		
HR	232,976 \pm 5,540									a9	
HF	240,607 \pm 0,665									a9	
HAR	282,65 \pm 4,648										a10

(*) – Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente.

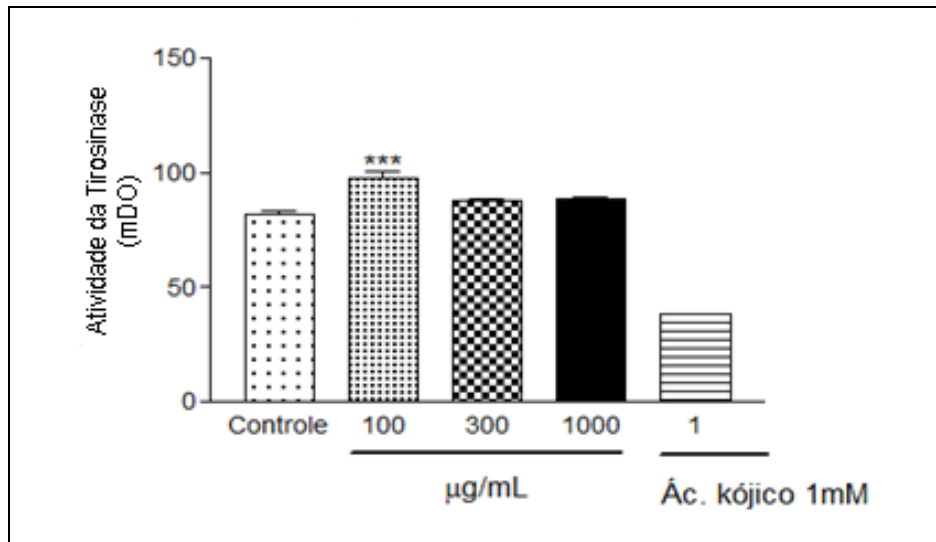
Fonte: a autora, 2010

5.7.5 Ensaio *In Vitro* da Atividade da Enzima Tirosinase

Para a metodologia utilizada, apenas a fração hidroalcoólica da folha demonstrou atividade estatisticamente considerável, conforme metodologia descrita no item 4.9.5, estimulando a enzima tirosinase na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ em comparação com os controles, conforme mostra o gráfico 6.

Como o estímulo da enzima resulta na maior formação de dopaquinona, a leitura (mDO) aumenta proporcionalmente.

Gráfico 6 – Atividade frente à Enzima Tirosinase da Fração Hidroalcoólica da Folha



Fonte: a autora, 2010

Em concentrações maiores como 300 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$, não foi observada interferência do extrato sobre a atividade da tirosinase. Isto pode ocorrer devido a outras substâncias presentes no extrato, ou outros mecanismos de ação, que podem estar envolvidos no estímulo ou não da melanogênese.

Estes resultados sugerem que esta planta pode ser utilizada em doenças de hipopigmentação, porém, como este teste serve apenas como um guia para a avaliação da influência de extratos vegetais sobre a enzima tirosinase, novas análises utilizando-se modelos celulares devem ser realizados para a comprovação desta atividade.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou o potencial de *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo nas condições dos experimentos utilizados para a avaliação das atividades propostas neste estudo, obtendo-se as seguintes conclusões:

- A espécie *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo, pertencente à família Bignoniaceae, não apresenta descrição na literatura sobre sua composição fitoquímica. Em uma pesquisa fitoquímica preliminar, esta espécie evidenciou a presença de grupos fitoquímicos como: flavonóides (flavonas, diidroflavonóis e leucoantocianidinas), esteróides e/ou triterpenos e heterosídeos antraquinônicos. Foram isolados cinco compostos, entre eles um hidrocarboneto de cadeia longa, com estrutura não completamente elucidada, a flavona apigenina, pela primeira vez isolada neste gênero e o esteróide β -sitosterol.
- Na atividade antimicrobiana evidenciou-se a atividade da fração EBR contra *E. coli*, a fração EBC contra *S. Aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* e a fração EBF para *S. aureus* e *P. aeruginosa*, todas com concentração inibitória mínima de 1000 μ g/mL, atividade esta considerada fraca. Novas análises devem ser realizadas com as frações e compostos isolados de *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo;
- Para o teste de toxicidade, as frações AER, AEC, AEF, CC e CF apresentaram um valor de DL₅₀ inferior a 1000 μ g/mL, concentração máxima para uma amostra ser considerada ativa, caracterizando assim toxicidade destas amostras frente ao molusco, principalmente as frações AER e AEC com DL₅₀ igual ao sulfato de quinidina utilizado como controle positivo.
- O ensaio alelopático revelou pequena influência negativa da fração CC na concentração de 0,8mg e da fração HAF pequena influência positiva, em todas as concentrações testadas, sobre a germinação de *Lactuca*

sativa. O crescimento do hipocótilo sofreu influência positiva na avaliação com a fração CC em todas as concentrações.

- Na atividade antioxidante, a amostra CF foi a amostra que demonstrou melhor resultado no teste de redução do complexo fosfomolibdênio com atividade similar à rutina. Na redução do radical DPPH, a amostra AEC foi a que mais se aproximou dos padrões Vitamina C e Rutina, porém com resultados não expressivos.
- Na avaliação da interferência dos extratos frente à enzima tirosinase a fração HAF apresentou atividade estatisticamente considerável, estimulando a tirosinase na concentração de 100 µg/mL. Isto pode sugerir a utilização desta planta no tratamento de doenças de hipopigmentação. As demais frações não apresentaram atividade frente a esta enzima.

Diante destes resultados, observa-se a necessidade da continuidade dos estudos em busca de novas atividades assim como a elucidação das estruturas responsáveis pela ação terapêutica relatadas na utilização popular desta planta.

REFERÊNCIAS

- ABIFISA - Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde. Disponível em: <<http://www.abifisa.org.br/default.asp>>. Acesso em: 30/05/2009.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10230#>>. Acesso em: 10/09/2009.
- AYRES, M. C. C. *et al.* Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.1, p.90-97, 2008.
- CARVALHO, J. L. de S. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico de *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae**. Curitiba, 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- CHANG, T. S. An updated review of tyrosinase inhibitors. **International Journal Molecular Sciencis**, v.10, n.6, p.2440-2475, 2009.
- CHASE, M. W.; REVEAL, J. L. A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, p.122–127, 2009.
- CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARTS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard – Eight edition. M7-A8, 2009.
- COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. **Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination**. Boca Raton: CRC, 1993.
- CORREA, M. P; PENNA, L. A. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro: Nacional, 1984. v.2.
- COSTA, S. S. *et al.* Estudos farmacognósticos, fitoquímicos, atividade antiplasmódica e toxicidade em *Artemia salina* de extrato etanólico de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott, Araceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.4, p.834-838, 2009.
- CRONQUIST, A. J. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. New York: Columbia University, 1981.
- CUNHA, A. P.; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R. **Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2003.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PRADO, M. R. M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebenthifolius* Raddi. **Ciências e Agrotecnologia**, v. 29, n.3, p.617-622, 2005.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2 ed. rev. e ampl. São Paulo: UNESP, 2002.

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

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

FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FERNANDES, R. S. *et al.* Validação do método de extração e quantificação de 7-hidróxi- 4',6-dimetóxi-isoflavona em culturas de células em suspensão e calos de *Dipteryx odorata*. **Eclética Química**, v.34, n.1, p.13-18, 2009.

GALOTTA, A. L. Q. A.; BOAVENTURA, M. A. D. Constituintes químicos da raiz e do talo da folha do açaí (*Euterpe precatoria* Mart., Arecaceae). **Química Nova**, v. 28, n.4, p.610-613, 2005.

GARCEZ, F. R. *et al.* Novos Constituintes Químicos das Cascas do Caule de *Tabebuia Heptaphylla*. **Química Nova**, v.30, n.8, p.1887-1891, 2007.

GENTRY, A. H. **Bignoniaceae**. Part I (Crescentieae and Tourrettieae). New York: The New York Botanical Garden, 1980 (Flora Neotropica, v.25).

GUPTA, M. B. *et al.* Anti-inflammatory and antipyretic activities of beta-sitosterol. **Planta Médica**, v.39, p.157-163, 1980.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: Edufscar, 2003.

JOLY, A. B. **Botânica**: Introdução a taxonomia vegetal. 12.ed. São Paulo: Nacional, 1998.

JOLY, A. B. **Botânica**: Introdução à taxonomia vegetal. 7.ed. São Paulo: Nacional. 1985.

JUDD, W. S. **Plant Systematics**: A Phylogenetic Approach. Massachusetts: Sinauer Associates, 1999.

KALEGARI, M. **Composição fitoquímica e atividades biológicas de *Rourea induta* Planch, Connaraceae**. Curitiba, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A. Sterol Glucosides from *Prunella Vulgaris*. **Phytochemistry**, Oxford, v.29, p.2351-2355, 1990.

LIMA, L. R. P. *et al.* Bixina, Norbixina e Quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.38, n.4, p.196-200, 2001.

LIMA, S. A. L.; AMORIM, E. L. C.; FONSECA, R. S. Antimicrobial activity of a mixture of two isomeric phenylpropanoid glycosides from *Arrabidaea harleyi* A.H. Gentry (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.39, n.1, p.80, 2003.

LOPES, M. M. M. *et al.* Crescimento de Mudas de Cipó-Cravo (*Tynanthus fasciculatus* Miers), uma Liana com Potencial Medicinal. **Revista Árvore**, Viçosa, v.32, n.2, p.211-216, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarum, 2002.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The Systematic Identification of Flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970.

MACRINI, D. J. *et al.* Extracts from Amazonian plants have inhibitory activity against tyrosinase: an *in vitro* evaluation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.45, n.2, 2009.

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

MARASCHIN-SILVA, F.; AQUILA, M. E. A. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L (Asteraceae). **Acta bot. Brás**, v.20, n.1, p.61-69, 2006.

MARTINS, M. B. G.; CASTRO, A. A.; CAVALHEIRO, A. J. Caracterização anatômica e química de folhas de *Jacaranda puberula* (Bignoniaceae) presente na Mata Atlântica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p.600-607, 2008.

MENSOR, L. L. *et al.* Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, p.127-130, 2001.

MEYER, B. N. *et al.* Brine Shrimp: A Convenient General Bioassays for Active Plant Constituents. **Planta Médica**, v.45, n.1, p.31-34, 1982.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Robe Editorial, 1999. p.30-31.

MIGUEL, O. G. **Óleo essencial**. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR. Curitiba, 2002.

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

MIYAZAWA, M. *et al.* Tyrosinase Inhibitor from Black Rice Bran. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.6953-6956, 2003.

MOBOT – **Missouri Botanical Garden**. Disponível em: <http://mobot1.mobot.org/website/map_post.asp><<http://www.tropicos.org/NameSpecimens.aspx?nameid=50124665>><<http://www.tropicos.org/NameSpecimens.aspx?nameid=50006036>>. Acesso em: 10/09/2009.

MORAIS, S. K. R. *et al.* Bioactive dihydroxyfuranonaphthoquinones from the bark of *Tabebuia incana* A.H. Gentry (Bignoniaceae) and CLAE analysis of commercial *pau d'arco* and certified *T.incana* bark infusions. **Acta Amazônica**, v.37, n.1, p.99-102, 2007.

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

NASCIMENTO, J. E. *et al.* Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (*Phyllanthaceae*). **Rev. Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.29, n.2, p.143-148, 2008.

OLIVEIRA, A. B. *et al.* Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de bignoniáceas brasileiras. **Química Nova**, São Paulo, v.3, n.4, p.302-307, 1990.

PARK, C. *et al.* β -Sitosterol Induces Anti-proliferation and Apoptosis in Human Leukemic U937 Cells through Activation of Caspase-3 and Induction of Bax/Bcl-2 Ratio. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.30, p.1317-1323, 2007.

PAULETTI, P. M.; BOLZANI, V. S. Constituintes Químicos de *Arrabidaea samydoides* (Bignoniaceae). **Química Nova**, São Paulo, v.26, n.5, p.641-643, 2003.

PERES, M. T. L. P. *et al.* Estudos químicos e biológicos de *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel (*Polypodiaceae*). **Química Nova**, v. 32, n.4, p.897-901, 2009.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; LOPES, B. M. Potencial alelopático de *Mimosa caesalpiniaefolia* benth sobre sementes de *Tabebuia alba* (cham.) Sandw. **Floresta e Ambiente**, v.8, n.1, p.130-136, 2001.

PLAZA, A. *et al.* Phenylpropanoid Glycosides from *Tynanthus panurensis*: Characterization and LC-MS Quantitative Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.53, p.2853-2858, 2005.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v.269, p.337-341, 1999.

SALGADO, J. M. *et al.* Efeito do abacate (*Persea americana* Mill) variedade hass na lipidemia de ratos hipercolesterolêmicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.4, p.922-928, 2008.

SANDWITH, N. Y.; HUNT, D. R. **Bignoniaceae**. Itajaí: Herbario "Barbosa Rodrigues", 1974. v.18.

SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.3, p. 455-465, 2007.

SEMA - SECRETARIA DO ESTADO DO MEIO AMBIENTE. **Lista Vermelha de plantas ameaçadas de extinção no Estado do Paraná**. Curitiba: SEMA/GTZ, 1995.

SHUKLA, S.; GUPTA, S. Apigenin: A Promising Molecule for Cancer Prevention. **Pharmaceutical Research**, v.27, n.6, p.962–978, 2010.

SILVA, J. M. S. C. *et al.* Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Sida galheirensis* Ulbr (Malvaceae). **Química Nova**, v.29, n.6, p.1250-1254, 2006.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**, v.26, n.3, p.407-416, 2003.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da Flora Brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Plantarum, 2005.

STOCHMAL, A. *et al.* Acylated apigenin glycosides from alfalfa (*Medicago sativa* L.) var. Artal. **Phytochemistry**, v.57, n.8, p.1223-1226, 2001.

UDULUTSCH, R. G. **Composição florística da comunidade de lianas lenhosas em duas formações florestais do estado de São Paulo**. Piracicaba, 2004. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

VILEGAS, J. H. Y. *et al.* Constituents of Brazilian medicinal plants. Constituents of *Tynanthus fasciculatus*. **Fitoterapia**, v.64, n.5, p.476, 1993.

VILEGAS, W. *et al.* The chemistry of “cipócravo”- *Tynanthus fasciculatus*. **Revista Latinoamericana de Química**, v.23, n.2, p.47-49, 1994.

VIRADOR, V. M. *et al.* A Standardized Protocol for Assessing Regulators of Pigmentation. **Analytical Biochemistry**, v.270, p.207–219, 1999.

VIRTUOSO, S. *et al.* Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.2, p.137-142, 2005.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal moderna: métodos de estudo, fitoterápicos e fitofármacos, biotecnologia, patente**. Chapecó: Argos, 2001.

YUNES, R. A.; FILHO, V. C. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: UNIVALI, 2007.