

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VINÍCIUS BEDNARCZUK DE OLIVEIRA

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DA ESPÉCIE VEGETAL *Dicksonia sellowiana* (DICKSONIACEAE)

CURITIBA
2012

Vinícius Bednarczuk de Oliveira

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DA ESPÉCIE VEGETAL *Dicksonia sellowiana* (DICKSONIACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos, Linha de Pesquisa em Produtos Naturais, do Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel

Co-Orientadora: Prof.^a Dra. Marilis Dallarmi Miguel

CURITIBA
2012

Oliveira, Vinícius Bednarczuk

Estudo fitoquímico e atividades biológicas da espécie vegetal
Dicksonia sellowiana (Dicksoniaceae) / Vinícius Bednarczuk de Oliveira
– Curitiba, 2012.
124 f.: il. (algumas color.); 30 cm

Orientador: Professor Dr. Obdulio Gomes Miguel

Coorientadora: Professora Dra. Marilis Dallarmi Miguel

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do
Paraná, 2012.

Inclui bibliografia

1. *Dicksonia sellowiana*. 2. Xaxim. 3. Fitoquímica. 4. Atividade
Antioxidante. 5. Toxicidade. I. Miguel, Obdulio Gomes. II. Miguel, Marilis
Dallarmi. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.32

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus** pela vida e por permitir que os meus caminhos levassem a esse acontecimento.

A minha mãe **Consuelo**, uma palavra pequena, mas com um significado infinito. Obrigado pelo incentivo, apoio, compreensão, dedicação, carinho e amor.

A minha **família**, pela força e apoio.

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

Ao meu orientador **Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel**, pelos conhecimentos a mim repassados, dedicação, confiança e amizade.

A minha co-orientadora **Prof^a Dr^a. Marilis Dallarmi Miguel** pela confiança, dedicação e amizade.

Aos colegas de laboratório de fitoquímica pela amizade e companhia. Em especial a **Vanessa Cristina Cantelli, Milena Kalegari, Cristina Mayumi, Cristiane Paula, Ranieri Campos, Rodrigo Damian, Beatriz Hirota, Maria Christina Verdam** pelas conversas, contribuições e amizade construída.

A professora **Josiane Dias** pelo incentivo nos trabalhos e por compartilhar seus conhecimentos.

Ao professor **Dr. Vitor Kerber**, pelas inúmeras curiosidades esclarecidas.

A empresa **Bioceutica** por ter cedido o material vegetal, e por ter possibilitado que eu realizasse o mestrado no período em que eu trabalhava.

A minha amiga **Marileda Zuchetto** por sempre estar ao meu lado ajudando e mandando boas vibrações.

Ao meu amigo **Antônio Carlos Pieruccini** pela amizade construída e apoio para que este projeto fosse construído.

Aos meus amigos **Rafael Lago, Daniel Almeida, André Santos e Leandro Oliveira** pela amizade e companheirismo.

A **Angela Souza** do laboratório de microbiologia do hospital de clinicas da UFPR pelas análises microbiológicas do extrato e frações.

Ao **CNPQ** pelo fomento da pesquisa.

A **todos os funcionários e professores** do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, que de diversas maneiras contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos os meus colegas de mestrado.

A **todos** que de maneira direta ou indireta colaboraram para que este estudo fosse realizado.

Muito Obrigado.

*“Que os vossos esforços desafiem as
impossibilidades, lembrai-vos que as grandes
coisas do homem foram conquistadas do que
parecia impossível.”*

(Charles Chaplin)

RESUMO

A presente pesquisa teve como objetivo estudar as frondes da espécie *Dicksonia sellowiana*, pertencente à família Dicksoniaceae. A partir das frondes coletadas no município de Inácio Martins, localizado no estado do Paraná, foi preparado o extrato etanólico bruto em aparelho de soxhlet, sendo que este extrato foi particionado por coeficiente de polaridade. A partir das amostras foi possível separar por técnicas cromatográficas dois compostos, identificados por RMN ¹³C, RMN ¹H, ponto de fusão e espectroscopia de ultravioleta, dois taninos hidrolisáveis pertencentes à rota do ácido chiquímico, o ácido protocatecuico e o ácido gálico. Os estudos de atividades biológicas com o extrato bruto, frações e substâncias isoladas comprovaram que esta espécie possui grande capacidade antioxidante pelos métodos testados, possivelmente pelo alto teor de polifenóis presentes, não apresentando toxicidade nos modelos testados. Na atividade antimicrobiana a espécie não possui atividade na inibição de crescimento dos micro-organismos testados. A espécie *Dicksonia sellowiana* demonstrou neste estudo que possui atividade antioxidante em diferentes meios de ação provavelmente proveniente do seu alto teor de polifenóis, sem demonstrar atividade tóxica em modelos preliminares.

Palavras-chave: *Dicksonia sellowiana*, Dicksoniaceae, Atividade Antioxidante, Polifenóis, Toxicidade Preliminar.

ABSTRACT

The present work aimed to study the fronds of *Dicksonia sellowiana* species, belonging to family Dicksoniaceae. From the fronds collected in the municipality of Inácio Martins, the state of Parana, the ethanolic extract was prepared in crude soxhlet apparatus, the extract was partitioned by the coefficient of polarity. From the samples was possible to separate two compounds by chromatographic techniques, identified by RMN ¹³C, RMN ¹H, melting point and ultraviolet spectroscopy, two hydrolysable tannins belonging to the route of shikimic acid, protocatechuic acid and gallic acid. Through studies of biological activities with the crude extract, fractions and isolated compounds revealed that the species has high antioxidant activity by the methods tested, possibly due to high content polyphenols, with no significant toxicity in the models tested. In antimicrobial activity does not have the kind of activity in inhibiting growth of micro-organisms tested. The species *Dicksonia sellowiana* in this study that has demonstrated antioxidant activity in different modes of action probably from its high content of polyphenols, without showing toxic activity in preliminary models.

Keywords: *Dicksonia sellowiana*, Dicksoniaceae, Antioxidant activity, polyphenols, Preliminary toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Exemplares da Espécie <i>Dicksonia sellowiana</i> , Dicksoniaceae	28
Figura 2	Tronco da espécie <i>Dicksonia sellowiana</i> servindo como suporte para orquídea, uma planta epífita.	29
Figura 3	Distribuição geográfica da espécie <i>Dicksonia sellowiana</i> no Brasil	31
Figura 4	Estruturas dos Ácido Gálico e Ácido Elágico.	35
Figura 5	Dímero de Proantocianidina	36
Figura 6	Rota Biosintética para formação de taninos hidrolisáveis.	37
Figura 7	Registro da exsicata depositada no museu botânico	39
Figura 8	Exsicata da espécie <i>Dicksonia sellowiana</i>	39
Figura 9	Método utilizado para análise em HPLC com suas respectivas concentrações e tempos.	52
Figura 10	Reação do TBA com MDA	55
Figura 11	Espectro de absorção no UV do ácido protocatecuico (V1)	71
Figura 12	Estrutura do Ácido Protocatecuico	72
Figura 13	Espectro de RMN de ^1H (Metanol- d_6 , 200 MHz) do ácido protocatecuico	73
Figura 14	Espectro de RMN de ^{13}C (Metanol- d_6 , 50 MHz) do ácido protocatecuico	74
Figura 15	Experimento bidimensional HMBC e HMQC (Metanol- d_6 , 125 MHz) do ácido protocatecuico (V1).	75
Figura 16	Cromatograma da Substância Isolada V1 (Ácido Protocatecuíco)	76
Figura 17	Espectro de absorção no UV do ácido gálico (V2)	77
Figura 18	Espectro de RMN de ^1H (Metanol- d_6 , 200 MHz) do ácido gálico	78
Figura 19	Espectro de RMN de ^{13}C (Metanol- d_6 , 50 MHz) do ácido gálico	78
Figura 20	Cromatograma da Substância Isolada V2 (Ácido Gálico)	79
Figura 21	Estrutura do Ácido Gálico.....	79
Figura 22	Perfil cromatográfico do extrato bruto de <i>Dicksonia sellowiana</i>	81

Figura 23	Estrutura química dos flavonóides	82
Figura 24	Perfil cromatográfico da Fração Clorofórmio da espécie <i>Dicksonia sellowiana</i> em 260 e 300nm.	83
Figura 25	Perfil cromatográfico da fração acetato de etila da espécie <i>Dicksonia sellowiana</i>	86
Figura 26	Perfil cromatográfico da fração remanescente da espécie <i>Dicksonia sellowiana</i>	87
Figura 27	Reação de Complexação do Fosfomolibdênio	91
Figura 28	Cromatografia em Camada Delgada com Revelador DPPH....	91
Figura 29	Atividade Hemolítica do extrato bruto	110
Figura 30	Atividade Hemolítica do Ácido Protocatecuico (V1).....	110
Figura 31	Atividade Hemolítica do ácido gálico (V2)	111
Figura 32	Fração hemolítica em ágar-sangue do extrato bruto na concentração de 1000 µg.	112
Figura 33	Controle positivo com saponina na concentração de 1000 µg.	112
Figura 34	Controle negativo do solvente metanol	113
Figura 35	Fração hemolítica em ágar-sangue do ácido protocatecuico na concentração de 1000 µg.	113
Figura 36	Fração hemolítica em ágar-sangue do ácido gálico na concentração de 1000 µg.	113

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Curva Padrão de Ácido Gálico.....	69
Gráfico 2	Porcentagem do Extrato Bruto e Frações Frente ao Padrão Rutina de Inibição do Complexo do Fosfomolibdênio	90
Gráfico 3	Porcentagem do Extrato Bruto e Frações Frente ao Padrão Vitamina C de Inibição do Complexo do Fosfomolibdênio	90
Gráfico 4	Curvas dos Padrões Vitamina C e Rutina pela Redução do DPPH	93
Gráfico 5	Curvas do Extrato Bruto, das Frações: Hexano, Clorofórmio, Acetato de Etila e Remanescente e Substâncias Isoladas pela Redução do DPPH	94
Gráfico 6	Atividade sequestradora de radicais livres medidos pelo teste do DPPH.....	95
Gráfico 7	Atividade sequestradora de radicais livres medidos pelo teste do DPPH.....	95
Gráfico 8	Porcentagem do Extrato Bruto e Frações Frente aos Padrões BHT e Vitamina C pelo Método TBARS na Concentração de 1000 ppm.	99
Gráfico 9	Porcentagem do Extrato Bruto e Frações Frente aos Padrões BHT e Vitamina C pelo Método TBARS na Concentração de 500 ppm.	99
Gráfico 10	Porcentagem do Extrato Bruto e Frações Frente aos Padrões BHT e Vitamina C pelo Método TBARS na Concentração de 100 ppm.	100
Gráfico 11	Curva da atividade antioxidante dos padrões Rutina e Vitamina C determinadas pelo Sistema β -caroteno/ácido linoleico	101
Gráfico 12	Inibição da Oxidação pelo Sistema β -caroteno/ácido linoleico nas Diferentes Concentrações	102
Gráfico 13	Curva do Extrato Bruto, frações: hexano, clorofórmio, acetato de atila e remanescente, Substâncias Isoladas e Padrões Vitamina C e Rutina pelo Sistema β -caroteno/ácido linoleico	104

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classificação taxonômica da espécie <i>Dicksonia sellowiana</i> ...	30
Quadro 2	Soluções e o branco com respectivas concentrações para metodologia de Folin-Ciocalteu.....	49
Quadro 3	Soluções para teste preliminar.	58
Quadro 4	Procedimento para não ocorrência de hemólise.	59
Quadro 5	Soluções para teste principal.	59
Quadro 6	Análises físico-químicas do pó de frondes de <i>Dicksonia sellowiana</i>	65
Quadro 7	Análise Sistemática do Extrato Aquoso.....	66
Quadro 8	Análise Sistemática do Extrato Hidroalcoólico a 20%	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Massa seca das Frações e do Extrato Bruto de <i>Dicksonia sellowiana</i>	68
Tabela 2	Absorbância e Concentração de Polifenóis Correspondente ao Ácido Gálico das Frações e do Extrato Bruto de Folhas de <i>Dicksonia sellowiana</i> , com Relação à Concentração das Mesmas.....	70
Tabela 3	Resultados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para o ácido protocatecuico	72
Tabela 4	Tempo de retenção e lambda máximo da substância isolada V1 (ácido protocatecuíco)	76
Tabela 5	Tempo de retenção e lambda máximo da substância isolada V2 (ácido gálico)	79
Tabela 6	Tempo de retenção e lambda máximo do <i>fingerprint</i> do extrato bruto de <i>Dicksonia sellowiana</i>	80
Tabela 7	Tempo de retenção e lambda máximo do <i>fingerprint</i> da fração clorofórmio da espécie <i>Dicksonia sellowiana</i> em 260 e 300nm.	83
Tabela 8	Tempo de retenção e lambda máximo do fingerprint da fração acetato de etila da espécie <i>Dicksonia sellowiana</i>	85
Tabela 9	Tempo de retenção e lambda máximo do fingerprint da fração remanescente da espécie <i>Dicksonia sellowiana</i>	87
Tabela 10	Atividade Antioxidante pela Redução do Complexo do Fosfomolibdênio	88
Tabela 11	Resultados de IC50 e do Teste de Tukey para Redução do DPPH	96
Tabela 12	Resultados da atividade antioxidante pelo método TBARS nas 3 concentrações	98
Tabela 13	Atividade antioxidante determinada pelo Sistema β-caroteno/ácido linoleico do extrato, frações e substâncias isoladas da espécie <i>Dicksonia sellowiana</i>	102
Tabela 14	Valores de K (constante de velocidade), HalfLife (tempo de meia vida) e de R2 para a concentração de 50 µg.....	105

Tabela 15	Valores de K (constante de velocidade), HalfLife (tempo de meia vida) e de R2 para a concentração de 100µg.....	106
Tabela 16	Valores de K (constante de velocidade), HalfLife (tempo de meia vida) e de R2 para a concentração de 200 µg.....	106
Tabela 17	Mortalidade de <i>Artemia salina</i> e CL ₅₀	109
Tabela 18	Atividade antimicrobiana da espécie <i>Dicksonia sellowiana</i> ...	115

LISTA DE SIGLAS

ABS	Absorbância
ANOVA	Ánalyse de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CITES	Convention on International Trade in Endangered Species
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo Dubleto
DAD	Detector de Arranjo de Diodo
DP	Desvio Padrão
EM	Espectro de Massa
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IA%	Índices de Atividade
IAPAR	Instituto Agronômico do Paraná
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC 50	Concentração Inibitória de 50%
IV	Infra Vermelho
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
PPM	Partes por Milhão
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
<i>s/</i>	Singleto Largo
TSA	Ágar Triptona de Soja
TSB	Caldo de Soja Tríplica
UV	Ultra Violeta

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µg/mL	Micrograma por mililitro
AlCl ₃	Cloreto de alumínio
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto de cálcio biidratado
CaCl ₂ .6H ₂ O	Cloreto de cálcio hexaidratado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
cm	Centímetro
DL ₅₀	Dose letal média
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
g	Gramas
HCL	Ácido clorídrico
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
H ₃ BO ₃	Ácido bórico
KCl	Cloreto de potássio
M	Molar
m	Metro
MgCl ₂ .6H ₂ O	Cloreto de magnésio hexaidratado
mg/mL	Miligramas por mililitro
mL	Mililitro
N	Normal
NaOH	Hidróxido de sódio
NaOAc	Acetato de sódio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
Na ₃ PO ₄	Fosfato de sódio
NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	Molibdato de amônio tetraidratado
nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2.	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVO GERAL.....	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1	A MATA ATLÂNTICA.....	24
3.2	FLORESTA OMBRÓFILA MISTA.....	25
3.3	SAMAMBAIAS.....	26
3.4	A FAMÍLIA DICKSONIACEAE	26
3.5	GÊNERO <i>Dicksonia</i>	27
3.6	A ESPÉCIE <i>Dicksonia sellowiana</i>	28
3.6.1.	ESTUDOS REALIZADOS COM A ESPÉCIE <i>Dicksonia sellowiana</i> , DICKSONIACEAE	31
3.7	COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	33
3.7.1	GRUPOS FENÓLICOS	33
3.7.2	TANINOS	34
3.7.2.1	Rota Biosintética para formação de taninos hidrolisáveis.	36
4	METODOLOGIA DA PESQUISA.....	38
4.1	CLASSIFICAÇÃO DO TIPO DA PESQUISA	38
4.2	MATERIAL BOTÂNICO	38
4.3	ENSAIOS DE PUREZA	39
4.3.1	Teor de umidade (Método gravimétrico).....	39
4.3.2	Teor de cinzas	40
4.4	OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES.....	40
4.5	ENSAIO PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR.....	41
4.5.1	Metabólitos Solúveis em Álcool	41

4.5.1.1	Pesquisa de alcalóides.....	41
4.5.1.2	Pesquisa de leucoantocianidinas	42
4.5.1.3	Pesquisa de heterosídeo flavônico.....	42
4.5.1.4	Pesquisa de flavonóis.....	43
4.5.1.5	Pesquisa de dihidroflavonois.....	43
4.5.1.6	Pesquisa de cumarinas	43
4.5.1.7	Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos.....	44
4.5.1.8	Pesquisa de esteróides e triterpenos	44
4.5.2	Metabólitos Solúveis em Água	45
4.5.2.1	Pesquisa de heterosídeos antociânicos	45
4.5.2.2	Pesquisa de heterosídeos saponínicos	46
4.5.2.3	Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos	46
4.5.2.4	Pesquisa de taninos	46
4.5.2.5	Pesquisa de ácidos voláteis	47
4.5.2.6	Pesquisa de ácidos fixos	47
4.5.2.7	Pesquisa de amino grupo.....	48
4.6	DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS PELO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU.....	48
4.7	ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS	50
4.8	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS	50
4.9	PERFIL CROMATOGRÁFICO	51
4.10	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	52
4.10.1	Ensaio da Redução do Complexo Fosfomolibdênio.	52
4.10.2	Potencial Antioxidante por Cromatografia de Camada Delgada....	53
4.10.3	Avaliação da Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila).....	53
4.10.4	Ensaio Antioxidante pelo Método do Ácido Tiobarbitúrico-Espécies Reativas (TBARS).....	54

4.10.5	Inibição da oxidação pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico	55
4.11	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i>	56
4.11.1	Preparo da Solução Salina	56
4.11.2	Eclosão dos Ovos	57
4.11.3	Preparo das Amostras contendo extrato e frações de <i>Dicksonia sellowiana</i>	57
4.11.4	Avaliação da Toxicidade.....	57
4.12	AVALIAÇÃO HEMOLÍTICA IN VITRO	58
4.12.1	Operações preliminares.....	58
4.12.2	Teste preliminar.....	58
4.12.3	Teste principal.....	59
4.13	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA EM AGAR SANGUE	60
4.14	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	61
4.14.1	Preparo dos inóculos.....	61
4.14.2	Técnica de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (cim).	61
4.14.3	Leitura dos resultados	62
4.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65
5	RESULTADOS	64
5.1	PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	64
5.2	PESQUISAS DE GRUPOS FITOQUÍMICOS	65
5.3	PREPARAÇÕES REALIZADAS DO EXTRATO E FRAÇÕES	67
5.4	DOSAGENS DE POLIFENÓIS PELO MÉTODO DE Folin-Ciocalteu.....	68
5.5	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS.....	70
5.5.1	Identificação da Substância V1	70
5.5.2	Identificação da Substância V2	77
5.6	PERFIL CROMATOGRÁFICO	80

5.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	88
5.7.1	Ensaio pelo Método da Redução do Complexo do Fosfomolibdênio	88
5.7.2	Potencial Antioxidante por Cromatografia por Camada Delgada ..	91
5.7.3	Ensaio pela Redução do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)	92
5.7.4	Ensaio Antioxidante pelo Método do Ácido Tiobarbitúrico-Espécies Reativas (TBARS).....	97
5.7.5	Inibição da oxidação pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico	100
5.7.6	Discussão da atividade antioxidante por diferentes métodos	107
5.8	BIOENSAIO FRENTE AO MICROCRUSTÁCEO <i>Artemia salina</i>	108
5.9	ATIVIDADE HEMOLITICA.....	109
5.9.1	Atividade Hemolítica em Placas de Ágar-Sangue	112
5.10	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA ESPÉCIE <i>Dicksonia sellowiana</i>	114
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	116
	REFERÊNCIAS.....	118

1 INTRODUÇÃO

Atualmente tem-se observado uma demanda maior por produtos naturais sejam eles de origem animal, vegetal ou mineral. Esses produtos têm aplicabilidade em diversos setores principalmente na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica.

A utilização de plantas medicinais na tentativa de resolver problemas de saúde da sua comunidade possuem registros desde a pré-história. Os homens primitivos bem como os animais se alimentavam de determinadas plantas em razão do instinto de sobrevivência, porém observavam que algumas plantas possuíam efeitos tóxicos e outras minimizavam enfermidades, construindo assim um conhecimento empírico que foi repassado de geração em geração.

Inúmeras civilizações antigas (egípcios, chineses, indianos, gregos e romanos) deixaram manuscritos que apontavam o uso da fitoterapia no tratamento de diversas doenças. Dentre estes documentos históricos destaca-se o Papiro de Ebers datado de 1700 a.C. um dos mais antigos documentos médicos do Egito e do mundo, neste documento destaca-se a utilização do alho, folha de sene, zimbro, semente de linho e funcho. (PINTO, A.C *et al.* 2002)

No período da Idade Média o uso de plantas medicinais entrou em processo de descrédito devido à intolerância da Santa Inquisição, que durante a “caça as bruxas” mandaram queimar centenas de homens e mulheres considerados curandeiros, pois estes traduziam do latim e do grego as primitivas obras sobre plantas medicinais para utilizarem no tratamento de enfermidades. (ALONSO, J, 2008, p. 22).

Durante a conquista da América, no século XVI, xamãs, indígenas transferiram aos padres e frades sua sabedoria a respeito do uso das plantas medicinais americanas, estes levaram para Europa o conhecimento transferido dos mesmos.

Entre o Renascimento e a Era Moderna, a fitoterapia recebeu um forte impulso por parte dos alquimistas. O surgimento de importantes escolas médicas na Itália e na Alemanha propiciou o uso da fitoterapia. No século XIX, Friedrich Wohler sintetizou a uréia a partir de Cianato de Amônio um composto inorgânico dando origem à síntese química. (VARGAS, C. R. Q., 2008, p. 31).

O século XX foi marcado pela liderança dos produtos de síntese, relegando as plantas medicinais a um uso médico menor, porém os principais produtos sintéticos considerados de primeira linha continuaram surgindo das plantas, entre eles: a penicilina, os alcalóides do ergot, a beladona, a vincristina, a pilocarpina, a emetina, a atropina, a reserpina, a podofilina e outros (ALONSO, J, 2008, p. 23).

Nos anos 80, a Organização Mundial da Saúde - OMS, devido a grande diferença na área de saúde no que se diz ao tratamento de doenças que há entre os países industrializados e os países denominados emergentes, houve a implementação por parte das autoridades governamentais, das terapias tradicionais, enfatizando a investigação e a prescrição de drogas vegetais (MIGUEL, M.D *et al.*, 1999).

No Brasil devido ao incentivo governamental para que produtos fitoterápicos fossem utilizados no SUS - Sistema Único de Saúde, houve um aumento na área de pesquisa de produtos naturais, resultando no avanço dos métodos de extração, estudos farmacológicos, pré-clínicos, toxicológicos e químicos visando o isolamento e caracterização das substâncias ativas, permitindo gerar margens de segurança para a prescrição de medicamentos fitoterápicos.

Segundo GUERRA, M. P *et al*, (2007, p.14), o Brasil têm uma das mais ricas biodiversidades do planeta, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microorganismos. De acordo com DIAS, B. F. S. A. (1996, p.10) o Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 mil espécies.

Neste contexto, se faz necessário que equipes multidisciplinares formadas por profissionais da área médica, farmacêutica, química, agrônômica, econômica e política, somem esforços para o desenvolvimento de um programa, em nível nacional, que vise o desenvolvimento e a produção de medicamentos a base de plantas, com objetivo de prevenir e combater enfermidades que assolam os brasileiros. (PEREIRA. A. M. S. 2008, p.XV).

Estima-se que cerca de metade das espécies de plantas brasileiras pode estar ameaçada de extinção, e a falta de conhecimento da flora frente à atual crise ambiental torna-se uma situação preocupante (PITMAN &

JORGESEN, 2002, p. 298). Cerca de 450 espécies brasileiras foram incluídas em um dos três apêndices da CITES - Convention on International Trade in Endangered Species -, porém essa lista se restringe basicamente a Orchidaceae, Cactaceae e espécies de samambaias arbóreas (*Cyathea* spp. e *Dicksonia sellowiana*, o xaxim) (GIULIETTI, 2009, p.24).

A *Dicksonia sellowiana* da família Dicksoniaceae, o Xaxim, que foi uma espécie incluída em um dos três apêndices da CITES, é uma planta característica das florestas ombrófilas mistas do Brasil meridional na mata atlântica, e se apresenta com maior frequência em áreas com alta densidade de araucária. Devido à sua exploração comercial para a confecção de vasos para jardinagem e floricultura, o CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente, elaborou a resolução 278/2001, que veta o comércio desta espécie, colocando a planta endêmica da Mata Atlântica, na lista oficial do IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, de espécies brasileiras ameaçadas de extinção.

Com o crescimento da extinção das espécies na Flora do Brasil, se fazem necessários que estudos químicos sejam realizados sobre plantas ainda pouco conhecidas. A falta de estudos científicos sobre a espécie *Dicksonia sellowiana* da família Dicksoniaceae, uma espécie que se encontra na lista oficial do IBAMA como ameaçada de extinção, justifica o estudo da espécie.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo fitoquímico da espécie *Dicksonia sellowiana* Presl. Hook, Dicksoniaceae com o objetivo de verificar as possíveis atividades biológicas da espécie estudada, bem como determinar a sua composição fitoquímica, por meio de métodos analíticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o perfil físico-químico do extrato bruto da espécie *Dicksonia sellowiana* e realizar a análise fitoquímica preliminar da espécie;
- Fracionar o extrato bruto da espécie selecionada para o estudo;
- Isolar e identificar os metabólitos secundários, através de ressonância magnética nuclear de carbono e hidrogênio, espectrofotômetro de ultravioleta e ponto de fusão.
- Realizar o doseamento de polifenóis pelo método de Folin-Ciocalteu utilizando-se do espectrofotômetro para determinar a quantidade de polifenóis no extrato e frações.
- Realizar um screening fitoquímico por HPLC.
- Analisar a atividade antioxidante das frações e/ou substâncias isoladas da espécie *D. Sellowiana*.
- Identificar a atividade toxicológica das frações e/ou substâncias isoladas da espécie *D. sellowiana* frente à *Artemia Salina*.
- Analisar a atividade hemolítica “in vitro” das frações da espécie *D.Sellowiana*.
- Analisar a atividade antimicrobiana das frações da espécie *D. Sellowiana*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A MATA ATLÂNTICA

Do nordeste ao sul do Brasil encontra-se, a Mata Atlântica conhecida por sua diversidade tanto na flora como na fauna. Nela estão localizadas as florestas ombrófila densa, ombrófila mista, estacional semidecidual, estacional decidual além de outros ecossistemas que se encontram associados aos campos de altitude, aos manguezais, as restingas, aos brejos interioranos e as ilhas oceânicas.

A Mata Atlântica abrangia originalmente 1.315.460 km² do território brasileiro, porém aproximadamente 93% de sua formação original já foi devastada por indústrias madeireiras e não madeireiras para a exploração de palmito-juçara, a erva-mate, dentre tantas espécies encontra-se o xaxim, ornamentais e medicinais (SOS MATA ATLÂNTICA & INPE, 2008).

A Mata Atlântica possui diversificados ecossistemas, apresentando estruturas e composições florísticas diferenciadas, por possuir diferentes tipos de solos, relevo e características climáticas existentes nessa ampla área de ocorrência deste bioma (IBAMA).

Com diversos ecossistemas cujos processos ecológicos se interligam, acompanhando as características climáticas das regiões de Mata Atlântica que possuem em comum a exposição de ventos úmidos que sopram do oceano atlântico, fazendo com que o trânsito de animais, o fluxo gênico das espécies e as áreas de tensão ecológica, onde os ecossistemas se encontram, se transformem. (SOS MATA ATLÂNTICA)

Segundo dados do Censo Populacional de 2007, do IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística aproximadamente 61% (112 milhões de pessoas) da população brasileira vive em regiões da Mata Atlântica.

Em 1988, a Constituição Federal declarou a Mata Atlântica patrimônio nacional, o Decreto Federal foi publicado em 1993 (n.750/93) permitindo apenas a derrubada da mata secundária que foi regulamentada por leis posteriores. A derrubada de mata primária é proibida. Existem diversas fundações como, por exemplo, a Fundação SOS Mata Atlântica, que trabalham para a recuperação e preservação da Mata Atlântica para que sua destruição não leve ao desequilíbrio dos ecossistemas e das populações que vivem nessa região, pois muitas cidades dependem de mananciais localizados nessa mata tão prejudicada.

3.2 FLORESTA OMBRÓFILA MISTA

Floresta ombrófila mista (VELOSO, H. P *et al.*, 1991), é também conhecida como floresta com Araucária (HUECK, 1953), Pinheiral (RIZZINI *et al.*, 1988) dependendo do autor. São algumas das denominações utilizadas em literatura para caracterizar esse bioma.

A floresta ombrófila mista está localizada desde o sul de São Paulo até o sul do Rio Grande do Sul e possui faixas no estado de Minas Gerais, do Rio de Janeiro e do Espírito Santo. É uma floresta de clima temperado com chuvas regulares e estações bem definidas, com um inverno normalmente frio e geadas frequentes e um verão razoavelmente quente.

Na última década do século XX, as áreas ocupadas pela Floresta Ombrófila Mista no sul do Brasil foram bastante reduzidas, pela exploração madeireira de *Araucaria angustifolia* e de espécies consorciadas a ela, como por exemplo, a imbuia (*Ocotea porosa* (Nees) L. Barr.), e a expansão de áreas agrícolas representam alguns dos fatores responsáveis pela expressiva redução da área ocupada por esse tipo vegetacional (BACKES, A. 1983, p.49).

De acordo com o IBGE (1992), a Floresta Ombrófila Mista pode ser subdividida e classificada em formação Aluvial, Submontanha, Montanha e Alta montanha, em função da latitude e altitude de ocorrência da vegetação.

Existem diversos trabalhos no Brasil, especialmente na região sul sobre esse bioma, que contribuíram em diversos aspectos para o melhor entendimento e conhecimento sobre as espécies pertencentes à Floresta Ombrófila Mista. A espécie *Dicksonia sellowiana*, uma espécie de samambaia, é uma planta característica desse bioma.

3.3 SAMAMBAIAS

As samambaias também conhecidas como fetos e fetas, ou em inglês designada tree fern, são plantas vasculares que se reproduzem através de esporos que no período de esporos se localizam na parte abaxial da fronde. Essas plantas quando adultas normalmente são formadas por um caule, um rizoma e por folhas, denominadas de frondes.

Essas plantas são as mais antigas existentes, predominam no planeta terra por cerca de 345 milhões de anos, antes mesmo das arvores e flores que vieram 145 milhões de anos após. Essas plantas foram capazes de suportar o “big bang” voltando a predominar na terra (OLSEN, SUE., 2007, p. 26).

Em 1974, John Lindsay, um cirurgião britânico que viajava pela Jamaica, observou que após longos períodos de chuvas, o pó de samambaia no solo, e que desse pó, nasciam às samambaias. A propagação das samambaias iniciou na Royal Botanic Gardens Kew, na Inglaterra, pois John Lindsay enviou o material junto com as instruções de semeadura (OLSEN, SUE., 2007, p. 27).

Mas foi em 1844, onde Karl von Nägeli um botânico suíço que observou e descreveu a presença de espermatozoides na fase intermediária da geração de germinação. Em 1848 esse mesmo botânico descobriu a estrutura de óvulos femininos das samambaias, e em 1853 foi realizada a primeira hibridação.

As samambaias viraram moda com o decorrer do tempo estando presentes em várias residências, servindo como decorativa no paisagismo e como suporte para plantas epífitas como orquídeas e bromélias.

3.4 A FAMÍLIA DICKSONIACEAE

Dicksoniaceae é uma pequena família de filicíneas arborescentes, semelhantes no hábito da família Cyatheaceae, essas se distinguem pela posição marginal dos esporos (JOLY, 1985, p.173). Esta família compreende apenas três gêneros sobreviventes de um total de nove gêneros.

As espécies desta família são fetos tropicais, subtropicais e de latitudes temperadas quentes, encontradas em regiões tropicais do

hemisfério sul, atingindo área temperadas como o sul da Nova Zelândia. A maioria dos gêneros da família se caracteriza por serem rasteiros e possuírem troncos muito pequenos, no entanto algumas das maiores espécies podem atingir vários metros de altura.

Em geral esta família apresenta caule bastante grosso, não ramificado, com cerca de 8 a 12 frondes amplas no ápice, que quando caem deixam cicatrizes no tronco. Estas porções mais velhas são totalmente recobertas por raízes adventícias que engrossam o caule. As frondes são grandes podendo alcançar dois metros de comprimento, sendo 3 a 4 vezes pinadas, onde as férteis possuem Soros marginais no ápice de nervuras (JOLY, 1985, p.173).

Uma das características das espécies desta família são esporos com indúcio. Estes juntamente com um segmento do folíolo fértil formam uma estrutura bilabiada (JOLY, 1985, p.173). Representantes do gênero *Dicksonia* ocorrem na região litorânea do sul do Brasil, nas florestas ombrófilas mistas.

3.5 GÊNERO *Dicksonia*

O gênero *Dicksonia* é um gênero de feto arbóreo pertencente a ordem Podypodiales, parente próximo do gênero *Cyathea*, porém mais primitivo, através de fósseis de caules, pínulas e esporos botânicos datam sua origem nos períodos jurássico e cretáceo. Este gênero contém entre 20 a 25 espécies dependendo do autor, distribuída em diversos países. É na Nova Guiné que atinge maior diversidade com 5 espécies conhecidas.

A espécie mais conhecida do gênero é a *Dicksonia Antarctica* conhecida também como samambaia da Tasmânia, localizada em maior concentração na Nova Zelândia. As frondes desta espécie são utilizadas na alimentação de humanos e animais.

Este gênero é conhecido por suportar baixas temperaturas (até -5°C) e por possuir um crescimento lento chegando a 2,5cm por ano. Este gênero possui 22 espécies conhecidas na região do Pacífico Sul na Nova Zelândia e Austrália (OLSEN, SUE., 2007, p. 202).

Gênero descrito pela primeira vez em 1789, por Charles Louis L'Héritier de Brutelle, mas o gênero *Dicksonia* homenageia James Dickson um botânico escocês.

3.6 A ESPÉCIE *Dicksonia sellowiana*

São escassos, na literatura científica, dados sobre estudos químicos e atividades biológicas da espécie *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook.

Essa espécie também é conhecida por xaxim, samambaiçu, samambaiçu-imperial e feto arborescente. Possui cáudice ereto, cilíndrico, frondes bipenadas de até 2 metros presentes no ápice do cáudice, o crescimento das frondes é mediada pelo hormônio auxina (MANTOVANI, M., 2004. p 8), e a propagação da espécie é através da germinação de esporos. É uma planta grande podendo chegar a 4 metros possuindo um cáudice fibroso e espesso. Resistente ao frio essa planta apresenta um crescimento lento, menor que 1m³/ano (REIS, M.S. & GOMES, G. S. 2000, p.37). Abaixo (figura 1) mostra três exemplares da espécie *Dicksonia sellowiana*.

Figura 1 – Exemplares da Espécie *Dicksonia sellowiana*, Dicksoniaceae



Fonte: O Autor (2010).

A espécie *Dicksonia sellowiana* é umas das 27 espécies da família Dicksoniaceae e é natural do continente americano. De acordo com TRYON & TRYON (1982, p.144), há registros desde o sul do México até o Uruguai, passando pela América Central, Venezuela, Colômbia, Bolívia, Paraguai e Brasil. De acordo com FERNANDES, I. (1997), o xaxim é encontrado no Brasil nas regiões Sudeste e Sul, com maior intensidade nesta última, provavelmente por influência de fatores climáticos, em altitudes que podem variar desde 60m à 2250m acima do nível do mar.

Essa planta característica das florestas ombrófilas mistas do Brasil meridional na mata atlântica, se apresenta com maior frequência em áreas com alta densidade de araucária, (*Araucaria angustifolia*).

Utilizada no paisagismo, normalmente cultivada em região de sombra ou meia sombra, gosta de terrenos úmidos com solo rico em matéria orgânica, servindo de suporte para plantas epífitas, como flor de maio, orquídeas, bromélias e outras samambaias, como pode ser visualizado na figura 2.

Figura 2 – Tronco da espécie *Dicksonia sellowiana* servindo como suporte para orquídea, uma planta epífita.



Fonte: O Autor (2010).

Devido à exploração comercial dessa planta para a confecção de vasos para jardinagem e floricultura, o CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente, elaborou a resolução 278/2001, que veta o comércio, colocando a planta endêmica da Mata Atlântica, na lista oficial do IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, de espécies brasileiras ameaçadas de extinção (Portaria/IBAMA n°. 37-N/92 e COPAM 085/97) e no Apêndice II da Convenção Internacional sobre o Comércio Internacional de Espécies da Fauna e Flora em Perigo de Extinção - CITES.

O xaxim é o nome vulgar de uma grande samambaia popularmente conhecida como xaxim imperial, xaxim bugio, samambaia verdadeira, samambaiaçu (do tupi “hamabe+açu” = samambaia gigante), sendo importante espécie de pteridófita arbórea (SUZUKI, C. C. L. F., 2003). Seu nome científico, *Dicksonia sellowiana*, foi descrito pela primeira vez por Karel Borivoj Presl, botânico tcheco que, segundo convenções botânicas, é citado em textos científicos pela sua abreviatura “C. Presl” ou somente “Presl.”. Posteriormente, a espécie teve sua posição taxonômica alterada pelo botânico William Jackson Hooker, cuja abreviatura é “Hook.” *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook, 1844, de acordo com SEHNEM, A. (1983); SCHULTZ, A. (1991) E TRYON & TRYON (1982, p.144), tem a seguinte posição sistemática descrita no quadro 1:

Quadro 1 - Classificação taxonômica da espécie *Dicksonia sellowiana*

TAXA	Segundo SCHULTZ (1991)
Divisão	Pterydophyta
Classe	Polypodiopsida
Ordem	Podypodiales
Família	Dicksoniaceae
Gênero	<i>Dicksonia</i>
Espécie	<i>Sellowiana, Hook</i>

Fonte: <http://www.tropicos.org/Name/26606534>

A figura 3 apresenta a distribuição geográfica da espécie *Dicksonia sellowiana* no Brasil, mostrando que essa planta endêmica da Mata atlântica encontra-se em maior concentração na região sul e sudeste.

Figura 3- Distribuição geográfica da espécie *Dicksonia sellowiana* no Brasil



Fonte: Condack, J.P.S. 2010. Dicksoniaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB090947>).

3.6.1. ESTUDOS REALIZADOS COM A ESPÉCIE *Dicksonia sellowiana*, DICKSONIACEAE

A revisão da espécie *Dicksonia sellowiana* foi realizada em diversas bases de dados, não foi encontrado estudos químicos e biológicos sobre o gênero *Dicksonia*, apenas estudos agrônômicos. A revisão realizada no item 3.6.1 demonstram as conclusões que os autores obtiveram com o estudo realizado.

De acordo com o Laboratório de Manipulação Biofarma, localizado em Ponta Grossa, no estado do Paraná, por meio de um parecer técnico científico, os produtos compostos por *Dicksonia sp*, apresentaram reações positivas a várias doenças do sistema respiratório em voluntários, não apresentando efeitos colaterais (MIELKE, E. J. C. 2002).

De acordo com RIBEIRO ,K.J.C *et. al* (2003) o extrato foi testado na inibição do crescimento do sarcoma 180 (tumor de EHRLICH) e os resultados indicam que o extrato da planta *D. Sellowiana* apresenta atividade antitumoral, pois inibe o crescimento do sarcoma 180, indicando

que essa planta pode ter alguma ação moduladora na produção de leucócitos em animais portadores do sarcoma 180 uma vez que diminui a porcentagem de neutrófilos e aumenta a de monócitos e linfócitos.

Segundo BORA, K *et al* (2006) a *Dicksonia sellowiana* possui alto teor de polifenóis determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, e possui atividade antioxidante pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio.

Em 2006, através da parceria entre o Setor de Zootecnia da Universidade Federal do Paraná e o IAPAR - Instituto Agrônomo do Paraná foi realizado um estudo de intoxicação em bovinos por *Dicksonia sellowiana*. Uma das preocupações com este estudo era devido à exposição dos bovinos ao sol, pois o Xaxim possui cumarinas e estes serem fotossensibilizantes, poderiam provocar a irritabilidade da derme dos bovinos testados. Porém este estudo apresentou resultados negativos, onde foi verificado que não ocorreu a irritabilidade na derme dos bovinos testados e que também nenhum dos animais demonstrou sintomas clínicos de possível intoxicação pela planta, inclusive estes ganharam peso.

Segundo FURTADO, S. K (2006) o uso de extratos de *Dicksonia sellowiana* e formulações contendo os respectivos extratos no controle *in vivo* e *in vitro* de verminose ovina no estado do Paraná, resultou na inibição de 80% do desenvolvimento de ovos de trichostrongíldeos (formação de larva) quando comparado com sulfóxido de albendazol em testes *in vitro*. Nos testes *in vivo*, os animais apresentaram sinais físicos (alimentação, atividade motora, ruminação e excreção) normais durante todo o tempo do tratamento e verificou-se que a redução média do número de ovos encontrados nas fezes após sete dias de tratamento foi de 83,71% para os animais que receberam extrato seco de *D. sellowiana*.

Segundo RATTMANN, Y. D. (2009) estudos realizados em camundongos o extrato possui ação nos receptores muscarínicos na atividade vasorrelaxante e hipotensora, porém o mecanismo de ação não está completamente esclarecido. Neste estudo foi demonstrado que o extrato induz relaxamento vascular dependente dos mediadores endoteliais.

Segundo RATTMANN, Y. D. (2011) o extrato padronizado de *Dicksonia sellowiana* diminuiu o dano oxidativo em cultura de células

endoteliais e em ratos. O extrato possui uma ação sequestradora potente contra o peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e radical hidroxilo.

3.7 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

3.7.1 GRUPOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são comuns em diversas espécies, provenientes do metabolismo secundário das plantas, possuem ação antioxidante conhecida. Estes compostos englobam desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização (BRAVO, L. 1998).

Estes compostos encontram-se distribuídos nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares e proteínas. Em 1968 Ribéreau-Gayon adotou a seguinte classificação para estes compostos: pouco distribuídos na natureza, polímeros e largamente distribuídos na natureza.

Entre os compostos poucos distribuídos na natureza encontram-se os fenóis simples (pirocatecol, hidroquinona e o resorcinol). A este grupo pertencem também os aldeídos derivados dos ácidos benzoicos que são constituintes dos óleos essenciais (SOARES, S.E., 2002). Entre os compostos fenólicos que se apresentam sob a forma de polímeros, onde não se apresentam em forma livre nos tecidos vegetais, estão os taninos e as ligninas.

Os taninos são compostos de alto peso molecular maior que 500, conhecidos por conferirem ao alimento a sensação de adstringência, essa sensação deve-se ao fato de os taninos terem a capacidade de precipitação de proteínas.

Com base em sua estrutura os taninos são divididos em dois grupos, taninos hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis contêm um núcleo central de glicose ou um álcool poliédrico, esterificado com ácido gálico ou elágico, e são hidrolisáveis com ácidos, bases e enzimas. Os taninos condensados também conhecidos como protoantocianidinas, são polímeros ligados por 2 ou mais unidades de flavonóides ligadas por ligações carbono-carbono, não são prontamente hidrolisáveis por tratamento ácido (BENNICK, A. 2002).

Dentre compostos largamente distribuídos na natureza estão os fenólicos geralmente encontrados em todo o reino vegetal, estes estão

divididos em dois grandes grupos: os flavonóides e derivados e os ácidos fenólicos. Os flavonóides possuem ação antioxidante já conhecida em diversas literaturas científicas possuindo um estrutura básica C₆-C₃-C₆ que corresponde a 2 anéis aromáticos (anéis A e B) ligados por uma unidade de 3 carbonos (anel C) conforme pode ser visualizado na pagina 83, figura 21. Entre os grupos fenólicos encontram-se as antocianidinas, flavonas, flavonóis e com menor frequência as auronas, chalconas e isoflavonas (SOARES. S.E., 2002).

Os grupos fenólicos possuem diversas ações biológicas, porém a ação antioxidante é a mais descrita na literatura científica, a ação antioxidante destes compostos deve-se a capacidade de sequestrar radicais e algumas vezes como quelantes de metais agindo tanto na iniciação como na propagação do processo oxidativo (SHAHIDI, F *et al.*, 1992).

3.7.2 TANINOS

Solúveis em água, álcool e acetona e insolúveis em éter puro, clorofórmio e benzeno possuem peso molecular entre 500 a 3000 Dalton. Essas moléculas possuem habilidade de formar complexos com proteínas, gelatinas e alcaloides. Essa ligação entre taninos e proteínas, ocorre possivelmente, através de pontos de hidrogênio entre os grupos fenólicos dos taninos e determinados sítios das proteínas (MONTEIRO, J.M. *et al.*, 2005)

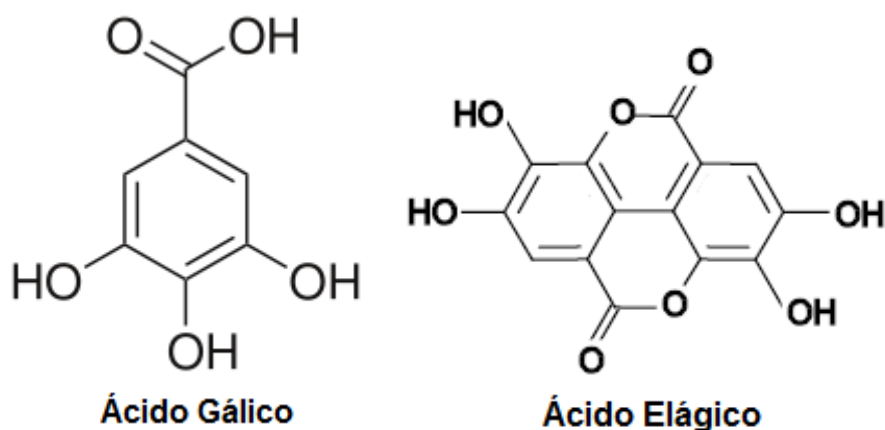
São substâncias complexas presentes em diversos vegetais decorrente do metabolismo secundário. Sua função nas plantas é de proteção inibindo o ataque por herbívoros vertebrados e invertebrados diminuindo a palatabilidade, dificultando a digestão e a partir de sua hidrólise produz compostos tóxicos.

Para sua identificação geralmente são utilizados testes como precipitação com proteínas, e ensaios colorimétricos utilizando sais, metais pesados e o reagente de Folin-Ciocalteu. Para quantificação, isolamento e identificação dessas substâncias é um processo complexo devido a variabilidade de estruturas, alta reatividade de suas subunidades com materiais oxidativos e a complexação com macromoléculas.

Os taninos são empregados de forma bastante diversificada. Na indústria de curtume precipitando proteínas ligadas ao couro e farmacologicamente como antioxidantes, antídotos para tratamento de intoxicação de metais pesados e alcalóides, adstringentes, antidiarreicos, cicatrizantes, hemostáticos e antissépticos.

Os taninos hidrolisáveis são constituídos por ésteres de ácido gálico e elágico glicosilados, formados a partir do chiquimato conforme pode ser observado na figura 4.

Figura 4 - Estruturas dos Ácido Gálico e Ácido Elágico.

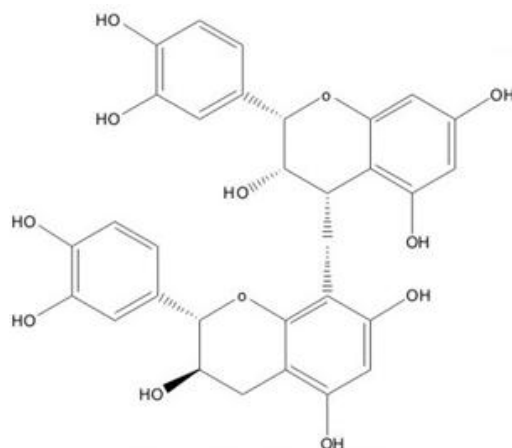


Fonte: O autor (2011).

(Estruturas desenhadas no programa ChemDraw)

Os taninos condensados ou proantocianidinas são polímeros de flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol, produtos do metabolismo do fenilpropanol (MONTEIRO, J.M. *et al.*, 2005). Substâncias de coloração avermelhada, apresentam uma gama de estruturas, resultantes dos padrões de substituições entre unidades flavânicas, diversificando em posições entre suas ligações e a estereoquímica de seus compostos, conforme pode ser observado na figura 5.

Figura 5 - Dímero de Proantocianidina



Fonte: O autor (2011).

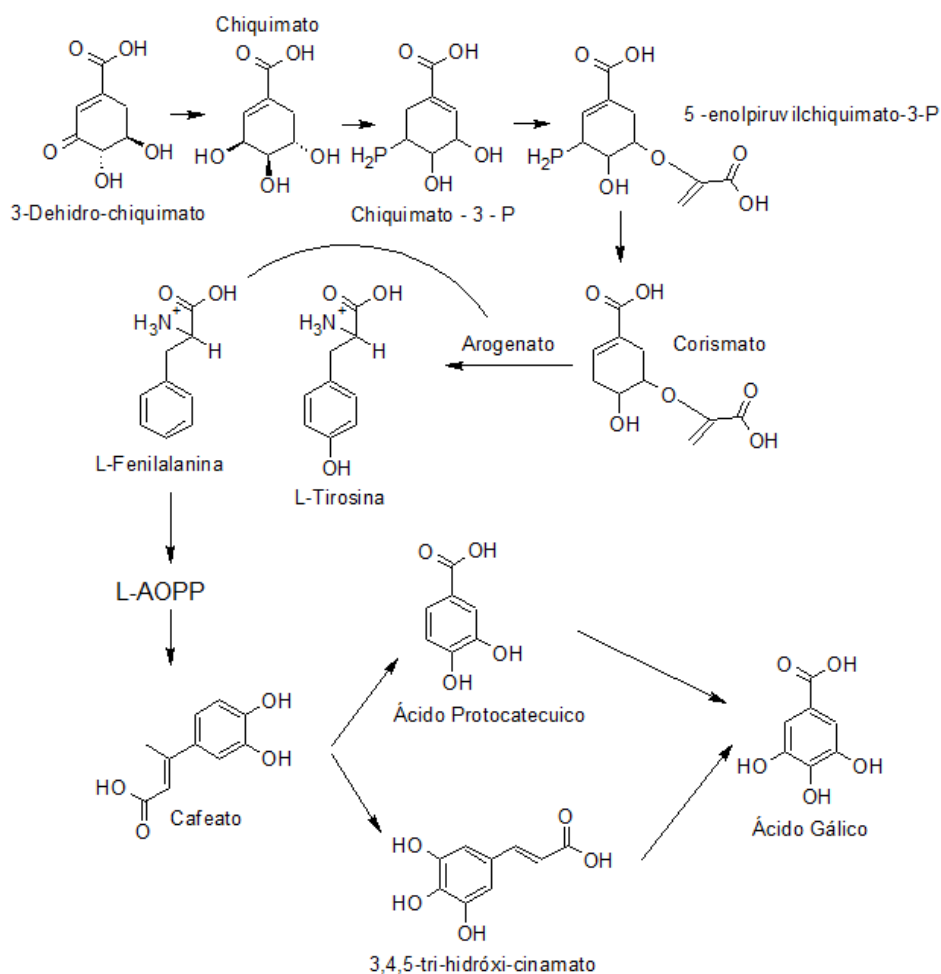
(Estrutura desenhada no programa ChemDraw)

Geralmente estão presentes nos vinhos tintos, obtidos da casca da uva, os taninos dão ao vinho aromas complexos, estrutura, textura, e auxiliam na longevidade do vinho. Um vinho novo é adstringente, pela alta concentração de taninos, conforme o vinho “envelhece” a complexação dos taninos gera uma complexidade aromática, se o vinho muda de cor de tinto para alaranjado houve a oxidação dos taninos.

3.7.2.1 Rota Biosintética para formação de taninos hidrolisáveis.

Para a formação do ácido gálico, um tanino hidrolisável, o processo de formação dessa molécula ocorre a partir da via do ácido chiquímico que inicia na molécula 3-dehidro-chiquimato, a partir dessa molécula ocorre diversas etapas enzimáticas com a formação de outras substâncias até a formação do ácido gálico a partir do ácido protocatecuico ou da substância 3,4,5-tri-hidróxi-cinamato, como pode ser visualizado na figura 6.

Figura 6 - Rota Biosintética para formação de taninos hidrolisáveis.



Fonte: O autor (2010).

(Estruturas desenhadas no programa ChemDraw)

3.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Diversas doenças têm sido relacionadas com os radicais livres que causam oxidação por possuir elétrons de valência desemparelhados. Esses radicais livres podem ser gerados intrinsecamente pelo próprio metabolismo por meio do processo de combustão do oxigênio e também através de fatores extrínsecos como cigarro, álcool, poluição ambiental entre outros (FERREIRA, A.L.A., MATSUBARA, L.S., 1997).

A ação antioxidante de polifenóis deve-se principalmente as suas propriedades redutoras e a sua intensidade de ação depende do número e posição de hidroxilas presentes na molécula (RICE-EVANS, MILLER, PAGANGA, 1997).

Os antioxidantes têm a capacidade de inibir a oxidação de diversos substratos, de moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos, por meio de dois mecanismos: o primeiro envolve a inibição da formação

de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação; o segundo abrange a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcoxila e peroxila, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (NAMIKI, 1990; SIMIC *et al.*, 1994).

Antioxidantes fenólicos funcionam como seqüestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais (SHAHIDI *et al.*, 1992), agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. E diante deste contexto foi realizado diversas metodologias para verificar a ação do extrato bruto e frações em diferentes meios de ação (hidrofílicos e lipofílicos).

4 METODOLOGIA DA PESQUISA

4.1 CLASSIFICAÇÃO DO TIPO DA PESQUISA


A pesquisa realizada é do tipo experimental e exploratória, por possuir fins práticos, envolvendo investigação de vários experimentos para a pesquisa de compostos químicos e de atividades biológicas da espécie *Dicksonia sellowiana*. Essa pesquisa também envolveu revisão bibliográfica para a fundamentação teórica. Para a análise dos dados obtidos a pesquisa foi qualitativa e quantitativa.

4.2 MATERIAL BOTÂNICO

As amostras de folhas de *Dicksonia sellowiana*, da família Dicksoniaceae foram coletadas pelo mestrando Vinícius Bednarczuk de Oliveira e Marileda Zuchetto, farmacêutica, na cidade de Inácio Martins, no estado do Paraná, com localização via GPS S25° 29' 35,7" WO 51° 12' 00.0", no mês de abril de 2010, época em que os esporos estão no início do amadurecimento. As frondes foram secas na Universidade Federal do Paraná em estufa com circulação de ar forçada na temperatura de 50°C por um período de aproximadamente 30 horas.

A exsicata da espécie *D. Sellowiana* está registrada no Museu Botânico de Curitiba pelo número 358323, bem como um exemplar da espécie nas figuras 7 e 8:

Figura 7 - Registro da exsicata depositada no museu botânico

 PREFEITURA MUNICIPAL DE CURITIBA MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL		HERBÁRIO Nº 358323
Dicksoniaceae	Xaxim	
<i>Dicksonia sellowiana</i> Hook		
Det. S. Maluche 2010		
Inácio Martins - Paraná		
Vinícius B. Oliveira & Marileda Zuchetto 01, 24.VI.2010		
Altitude: 1189m. Localização: S 25° 29' 35,7" WO 51° 12' 00,0"		
<small>PMC - DPP 004</small>		

Fonte: O autor - Museu botânico de Curitiba (2011).

Figura 8 - Exsicata da espécie *Dicksonia sellowiana*



Fonte: O autor – Museu botânico de Curitiba (2011).

4.3 ENSAIOS DE PUREZA

4.3.1 Teor de umidade (Método gravimétrico)

Para a verificação do teor de umidade da espécie *Dicksonia sellowiana*, foi utilizado frondes de xaxim trituradas em triturador de facas e martelo. Foi colocado aproximadamente um grama do material vegetal em cada cadinho de porcelana previamente dessecado e tarado. Para a obtenção de um resultado com maior precisão foi utilizado 6 cadinhos com

um grama de amostra. Os cadinhos com a amostra foram colocados em estufa a aproximadamente 100°C, por um período de 2 à 3 horas, até a obtenção de um peso constante. Os cadinhos foram retirados da estufa e colocados para resfriamento em um dessecador. Após este processo a amostra da espécie *Dicksonia sellowiana* foi pesada e foi realizado o seguinte cálculo para a obtenção do teor da unidade da amostra:

$$\% \text{ umidade} = \frac{Pa - Ps}{Pa} \times 100$$

Pa= Peso do cadinho + peso da amostra

Ps= Peso do cadinho + peso da amostra seca

4.3.2 Teor de cinzas

Para a determinação do teor de cinzas foi utilizado os resíduos de sólidos inorgânicos presentes na amostra seca do ensaio anterior, e estes foram incinerados a 600°C até o peso constante, aproximadamente 6 horas. Os cadinhos foram retirados da mufla e colocados no dessecador até esfriar. A seguir a amostra foi pesada rapidamente para determinação da % do teor das cinzas presentes na amostra. Realizou-se o seguinte calculo:

$$\% \text{ de cinzas} = \frac{Pa - Pi}{Pa} \times 100$$

Pa= Peso do cadinho + peso da amostra

Pi = Peso do cadinho + peso da amostra incinerada

4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES

O extrato bruto foi obtido a partir de 1,3kg do material vegetal em 7,5L de etanol, com a utilização do aparelho de Soxhlet. Este foi concentrado em aparelho de Soxhlet, até 550ml e depois filtrado. O extrato bruto foi utilizado para obtenção das frações por partição líquido/líquido solventes de diferentes polaridades, na seguinte ordem: hexano, clorofórmio e acetato de etila.

4.5 ENSAIO PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR

A realização dos ensaios fitoquímicos preliminares são de fundamental importância quando há poucos estudos sobre a espécie. Para a realização dessa triagem fitoquímica foi utilizada a metodologia desenvolvida por Moreira (1979, p. 3-19), com adaptações, que constam nas etapas abaixo descritas.

4.5.1 Metabólitos Solúveis em Álcool

Para obtenção do extrato hidroalcoólico a 20%, foi utilizado 40g de material vegetal seco e estabilizado em 200mL de álcool etílico, a 70% v/v. Este material foi deixado em maceração em banho-maria, a 70°C, por aproximadamente uma hora. Após este período o material foi filtrado em papel filtro e completado o volume com água destilada para 200mL. Após este processo o extrato foi concentrado até um terço do seu volume e particionado com solventes de polaridade crescente: hexano, clorofórmio e acetato de etila, em funil de separação. Para cada fração foram utilizados 20mL do extrato e o volume completado para 200mL, com o próprio solvente. O resíduo do extrato constituiu a fração hidroalcoólica remanescente, tendo seu volume completado para 200mL com etanol.

Essas 4 frações obtidas foram usadas para a pesquisa dos seguintes grupos fitoquímicos: glicosídeos flavônicos, alcalóides, esteróides e/ou triterpenos, aminogrupos, glicosídeos cumarínicos e glicosídeos antraquinônicos.

4.5.1.1 Pesquisa de alcalóides

Para a pesquisa qualitativa de alcalóides foi utilizado reativos conhecidos, como reativos gerais de alcalóides: mercúrio tetraiodeto de potássio (Reativo de Mayer), tetraiodeto bismuto de potássio (Reativo de Dragendorff), ácido sílico túngico (Reativo de Bertrand), p-dimetilamino benzaldeído (Reativo de Ehrlich) e Reativo de Vitali-Morin (promove a nitração de alcalóides).

De cada fração foi retirada uma amostra de 50mL, a qual foi evaporada em banho-maria a 50°C. Dissolveu-se o resíduo em 1mL de etanol e acrescentou-se 20mL de HCl 1%. Para cada amostra testada foram feitos 5 tubos de ensaio, cada um com 1mL do respectivo extrato clorídrico, para cada tubo adicionou-se duas gotas de um reativo citado abaixo.

A reação foi considerada positiva a presença de alcalóides na amostra quando apresentar as seguintes visualizações para os reativos:

- Mayer: formação de precipitado branco ou leve turvação branca.
- Dragendorff: formação de precipitado de coloração tijolo.
- Bouchardat: formação de precipitado de coloração alaranjada.
- Bertrand: formação de precipitado branco ou leve turvação branca.

Para cada amostra, utilizou-se um tubo somente com o extrato, que serviu como controle negativo.

4.5.1.2 Pesquisa de leucoantocianidinas

Foram levados à secura 10mL das frações e depois dissolvidos com 5mL de álcool etílico. Posteriormente foi adicionado 5 gotas de HCl concentrado, e levado ao aquecimento em banho maria até a ebulição. Para análise dos resultados através da amostra foi considerado que a reação será positiva quando apresentar a coloração vermelha.

4.5.1.3 Pesquisa de heterosídeo flavônico

Para esta pesquisa foi utilizado 20mL de cada fração e essas foram levados à secura e dissolvidos posteriormente com 10mL de etanol. Dessas frações, 5mL foi transferida para cada tubo de ensaio, a fração hidroalcoólica não passou pela secura, foi transferida diretamente ao tubo de ensaio. Em cada tubo foram adicionados 200mg de limalha de ferro e HCl fumegante lentamente. O resultado positivo é observado quando ocorre o desenvolvimento de coloração vermelho a vermelho sangue.

4.5.1.4 Pesquisa de flavonóis

Esta pesquisa é realizada pelo teste do Oxálico Bórico ou conhecido como reação de Taubock. Para o teste, 10mL de cada fração foram levados à secura, depois adicionadas 5 gotas de acetona e 30mg da mistura de ácido bórico e ácido oxálico (1:1), levando novamente a secura, a este resíduo foram adicionados 5mL de éter etílico. A visualização foi realizada em aparelho de ultravioleta, se houver fluorescência a reação é considerada positiva.

4.5.1.5 Pesquisa de dihidroflavonois

Em cápsulas de porcelana adicionou-se 10mL de cada fração, os quais foram levados à secura em banho maria. O resíduo obtido foi aquecido em fogareiro na presença de alguns cristais de acetato de sódio, 0,1mL de anidrido acético e 0,1mL de HCl concentrado. Para análise do resultado o desenvolvimento de coloração roxa é considerada positiva.

4.5.1.6 Pesquisa de cumarinas

Para a pesquisa de cumarinas concentrou-se as frações até 5mL em banho maria, através da secura de 30mL a 50°C, e recuperação com acetato de etila (5mL). A fração hidroalcoólica foi levada até pH 1 por adição de HCl 2N e 5mL de HCl concentrado. Esta mistura foi resfriada e transferida para um funil de separação para extração com éter etílico (2 X 10mL). Após esse processo essas frações foram reunidas e concentradas em banho-maria até 5mL.

Das frações obtidas transferiu-se 3mL para tubos de ensaio, onde adicionaram-se 2mL de NaOH 2N. Os tubos foram levados para a câmara de luz ultravioleta em 366nm por 15 minutos. Para reação positiva é observada fluorescência azul ou verde amarelada.

Paralelamente, com o restante dos extratos etéreos, foram marcados, em um papel de filtro, três pontos com manchas de aproximadamente 1cm de diâmetro.

As manchas 1 e 2 foram tratadas com NaOH 1N e, sobre a mancha 1, colocou-se uma moeda, depois foram levadas à câmara de ultravioleta a 365nm, novamente deixando em exposição por 15 minutos. A reação é tida como positiva com o desenvolvimento de fluorescência, com coloração azul ou verde amarelada na mancha 2.

4.5.1.7 Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos

Em balões de fundo chato foram transferidos 30mL das frações junto com 5mL de solução aquosa de ácido sulfúrico a 10%. A mistura foi deixada em refluxo por uma hora, e posteriormente filtrada, adicionando-se, em seguida, 30mL de H₂O.

Após a mistura ser filtrada esta foi transferida para um funil de separação, para extração com éter (2 X 10mL). As frações obtidas foram reunidas e concentradas em banho-maria, até um volume de 5mL, e colocadas em um tubo de ensaio, adicionando-se 5mL de NH₄OH (Reação de Borntraeger). A reação é considerada positiva se houver a observação de coloração vermelha.

4.5.1.8 Pesquisa de esteróides e triterpenos

As frações (10mL) foram evaporadas até a secura e os resíduos redissolvidos em 5mL de clorofórmio e filtrados em algodão. De cada uma das amostras 0,1; 0,5 e 1,0mL foram transferidos para três tubos de ensaio, e o volume completado para 2mL com clorofórmio.

- Reação de Liberman-Bouchard

Para essa reação, foi adicionado aos tubos de ensaio 1mL de anidrido acético e lentamente 2mL de H₂SO₄ concentrado.

A coloração obtida poderá indicar:

1. Rósea ou azul: presença de função carbonila na posição 3 e duplo enlace nas posições 5 e 6 ou 7 e 8.
2. Verde: função hidroxila em 3 e dupla ligação entre 5 e 6 ou 7 e 8.
3. Amarela: grupamento metila no carbono 14.

- Reação de Keller Kelliani

Foi levado à secura 2mL dos extratos clorofórmicos preparados anteriormente. Os resíduos foram dissolvidos com 2mL de ácido acético glacial e 0,2mL de solução aquosa de cloreto férrico 1%. Após este processo as misturas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 2mL de H₂SO₄.

O desenvolvimento de coloração azul ou verde na zona de contato entre as duas fases indica a presença de desoxiaçúcares, sendo:

azul: presença de esteróides;

verde: presença de triterpenos.

4.5.2 Metabólitos Solúveis em Água

Para a realização do teste dos metabólitos solúveis em água foi utilizado o extrato aquoso que foi preparado com 40g do vegetal e 200mL de água em banho-maria por uma hora, à 70°C. Após este processo o material foi filtrado e foi completado o volume com água até 200mL. Objetivo deste extrato é o de pesquisar os seguintes grupos fitoquímicos: glicosídeos antociânicos, saponinas, glicosídeos cianogenéticos taninos condensados e hidrolisáveis, aminogrupos e flavonóides.

4.5.2.1 Pesquisa de heterosídeos antociânicos

Para a realização da pesquisa de heterosídeos antociânicos foram separados 5mL do extrato em 3 tubos de ensaio.

No primeiro tubo de ensaio colocou-se HCl 1% até pH 4, se aparecerem tons avermelhados a reação é positiva.

No segundo tubo de ensaio foi alcalinizado com NaOH até pH 10, e se positivo observa-se tons azulados.

O terceiro tubo de ensaio foi neutralizado a pH 7 com o aparecimento de tons violáceos. Após a neutralização, 10mL do extrato foram extraídos com álcool butílico em funil de separação por duas vezes. Reuniu-se as duas frações obtidas em uma cápsula de porcelana e concentradas até 5mL. Foram adicionadas 5 gotas de HCl concentrado e

aquecidos até ebulição. O desenvolvimento de coloração vermelha indica a presença de antocianidina.

4.5.2.2 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Para esse teste foram utilizados 3 tubos de ensaio com 5mL de extrato. Os tubos de ensaio foram agitados energicamente por cinco minutos e após este processo foi medida espuma formada. Após repouso de 30 minutos, a presença de saponinas é confirmada pela formação de espuma persistente com altura superior a 1cm.

4.5.2.3 Pesquisa de heterosídeos cianogênicos

A um tubo de ensaio, foram adicionados 5mL do extrato aquoso, de modo a não umedecer as paredes do tubo, e 1ml de H₂SO₄ 10% ou 1N. Suspendeu-se uma tira de papel picro-sódico, com o auxílio de uma rolha de cortiça, mantendo em banho-maria (60°C) por 30 minutos. O resultado positivo para heterosídeos cianogênicos é observado pelo desenvolvimento de coloração marrom a vermelho no papel picro-sódico.

Para preparar o papel picro-sódico para o teste, foram cortadas tiras de papel de filtro, com 1cm de largura e, estas foram embebidas em solução de ácido pícrico 1% e secas ao abrigo da luz. Após este processo as tiras de papel picro, já secas são embebidas em solução de carbonato de sódio 10%. Secas serão armazenadas em frasco âmbar.

4.5.2.4 Pesquisa de taninos

Para a pesquisa de taninos foi transferido 1mL de extrato aquoso para cinco tubos de ensaio e adicionados aos mesmos os seguintes reagentes bem como a quantidade dos mesmos, conforme especificação abaixo relatada:

Tubo de Ensaio 1: Adicionado ao extrato aquoso 3 gotas de cloreto férrico. O resultado é positivo para os taninos quando aparecer a coloração azul ou verde, com formação ou não de precipitado.

Tubo de Ensaio 2: Adicionado ao extrato aquoso de 1 a 3 gotas de sulfato amoniacal. Coloração azul ou verde indica resultado positivo.

Tubo de Ensaio 3: Adicionado ao extrato aquoso de 1 a 3 gotas de cloridrato de emetina. Formação de precipitado indica resultado positivo.

Tubo de Ensaio 4: Adicionado ao extrato aquoso 5mL de ácido acético (gota a gota) e 5mL de acetato de chumbo. Presença de precipitado indica resultado positivo.

Tubo de Ensaio 5: Adicionado ao extrato aquoso 3 gotas de dicromato de potássio 1%. Desenvolvimento de precipitado indica resultado positivo.

Para a pesquisa de taninos condensados e hidrolisáveis foi transferido 30mL do extrato aquoso para um balão de fundo chato, e adicionado 6mL de formaldeído 40% e 4mL de ácido clorídrico 37%. Essa mistura foi aquecida em refluxo por uma hora, e depois de fria a mistura foi filtrada. O resíduo do papel de filtro foi lavado com solução de álcool 50% e gotejadas algumas gotas de KOH a 5%. A coloração verde indica a presença de taninos condensados. Ao filtrado adicionou-se excesso de acetato de sódio e gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1%, e se aparecer a coloração azul indica a presença de taninos hidrolisáveis.

4.5.2.5 Pesquisa de ácidos voláteis

Esse teste foi realizado da mesma maneira do que o teste para heterosídeos cianogénéticos com uma fita de pH. A presença desses ácidos é indicada pela coloração da fita para valores abaixo de pH 7.

4.5.2.6 Pesquisa de ácidos fixos

Em um balão, foram adicionados 20mL do extrato aquoso e 2ml de NaOH 1N, que permaneceram em refluxo por 30 minutos. Após resfriamento, acidificou-se com H₂SO₄ 2N e extraiu-se com éter etílico (3 porções de 10mL).

Os extratos etéreos foram reunidos e tratados com carvão ativo, sendo em seguida filtrados e evaporados em banho-maria (50°C) até a secura. O resíduo foi deixado em estufa por 10 minutos, resfriado e adicionados 5mL de NH₄OH 1N. Em uma tira de papel de filtro

concentraram-se duas manchas (3 gotas em cada mancha) com o resíduo amoniacal, deixando na estufa até secar, e sobre uma das manchas foi gotejado o reativo de Nessler. A coloração marrom nessa mancha indica a presença de ácidos fixos. Os ácidos fórmico, propiônico e aminoacético não formam manchas, pois não fixam a amônia, apresentando reação negativa.

4.5.2.7 Pesquisa de amino grupo

Para a realização deste teste foi utilizado 10 mL do extrato aquoso e o mesmo foi concentrado até 5 mL, a uma temperatura de 60°C. Em uma cromatoplaça de cromatografia de camada delgada foi depositada 3 gotas deste extrato concentrado, e após as gotas secarem sobre uma das manchas foi colocado uma gota de ninhidrina. A placa foi aquecida em estufa, por 15 minutos, com temperatura de 90 - 100°C. A coloração azul-violácea indica a presença de aminogrupos.

4.6 DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS PELO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU

O doseamento de polifenóis foi realizado com extrato total e suas frações hexano, clorofórmio e acetato de etila e fração remanescente. Para a realização desse doseamento foi feita uma curva padrão para calibração utilizando como padrão a substância ácido gálico nas concentrações de 10 µg, 15 µg, 20 µg, 25 µg, 30 µg, 35 µg e 40 µg. As concentrações foram obtidas a partir de uma solução de ácido gálico 0,25 mg/ml.

Todas as concentrações foram realizadas em triplicata no volume de 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 µl. As soluções e o branco e suas respectivas concentrações estão expressas no quadro 2.

Quadro 2 - Soluções com respectivas concentrações para metodologia de Folin-Ciocalteau

SOLUÇÕES	Branco	1º tubo	2º tubo	3º tubo	4º tubo	5º tubo	6º tubo	7º tubo
Água	3,6ml	3,6ml	3,6ml	3,6ml	3,6ml	3,6ml	3,6ml	3,6ml
Folin	0,2ml	0,2ml	0,2ml	0,2ml	0,2ml	0,2ml	0,2ml	0,2ml
Água:etanol	160ul	120ul	100ul	80ul	60ul	40ul	20ul	-
Amostra	-	40ul	60ul	80ul	100ul	120ul	140ul	160ul
Carbonato de sódio 10%	0,4ml	0,4ml	0,4ml	0,4ml	0,4ml	0,4ml	0,4ml	0,4ml

Fonte: O autor (2010).

Após a preparação das soluções, estas foram agitadas e após 3 minutos foi colocada a solução de carbonato de cálcio 10%. É necessário aguardar 30 minutos para que seja realizada a leitura para que nesse tempo ocorra a reação com o reativo Folin-Ciocalteau. Após 30 minutos a leitura das absorbância é realizada em espectrofotômetro, a 760nm.

Os resultados obtidos foram colocados no programa Excel, na forma de tabela (concentração/absorbância) e com base nos dados foi construído um gráfico de dispersão, adicionando linha de tendência, exibindo equação do gráfico e valor de R-quadrado no gráfico.

Para o doseamento de polifenóis no extrato total e de suas frações foi feita uma solução de 0,25mg/ml da respectiva fração, e feitas soluções iguais as soluções feitas para curva padrão, utilizando 10µg, 20µg, 30µg e 40µg no lugar da amostra. O procedimento foi igual ao descrito acima para a validação da curva padrão com ácido gálico. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro e a absorbância foi colocada na fórmula, obtendo as concentrações de polifenóis nas respectivas concentrações das frações.

4.7 ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS

A fração acetato de etila obtida do extrato foram passadas em coluna cromatográfica com fase estacionária sílica gel 60 Merck 0,063 – 0,200mm, e fase móvel hexano/acetato de etila e acetato de etila/metanol. A pastilha a ser cromatografada foi preparada com sílica gel 60, na proporção de 5 partes em relação a quantidade de amostra (3 gramas) 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. O sistema eluente iniciou com 100% de hexano, tendo acetato de etila como gradiente de polaridade, com variação de 5%, até 100% de acetato de etila. A partir deste foi utilizado metanol como gradiente, com variação de 5%.

As amostras coletadas foram levadas a secura na temperatura ambiente para cristalização dos compostos.

Após cristalização, as amostras que se encontravam cristalizadas foi realizado uma CCD para verificar se a amostra estava pura. Como a maioria das amostras não se encontravam pura foi feito uma cromatografia preparativa em placa de CCD para separação dos compostos com fase móvel hexano/acetona/água destilada na proporção de 20:95:5. Após este procedimento a placa foi raspada nas bandas e filtradas em filtro para retirada da sílica, e depois deixado secar em temperatura ambiente.

4.8 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS

Após o isolamento dos compostos descritos no item 4.7, essas foram analisadas espectrometricamente para elucidação de sua estrutura. Foram realizadas as seguintes análises: espectroscopia de absorção ultravioleta, espectroscopia de ressonância nuclear magnética de ^1H e ^{13}C e análise através de cromatografia líquida de alta performance.

Para análise de RMN, equipamento pertencente ao Laboratório de RMN do Departamento de Química, da Universidade Federal do Paraná, utilizou-se espectrofotômetro Bruker® modelo DPX 200 MHz, operando a 4,7 Tesla, observando os núcleos de ^1H e ^{13}C a 200,12 e 50,56 MHz, respectivamente. Para solubilização da amostra utilizou-se metanol deuterado e TMS como padrão interno de referência.

Após análise de RMN e com o espectro gerado de ^1H e ^{13}C , esses foram interpretados pelo programa mestre-c.

Para identificação por espectroscopia por absorção ultravioleta as amostras foram solubilizadas em metanol na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ e colocadas em cubetas de cristal em espectrofotômetro, este acoplado ao computador onde foi feita a varredura de 450 a 220nm.

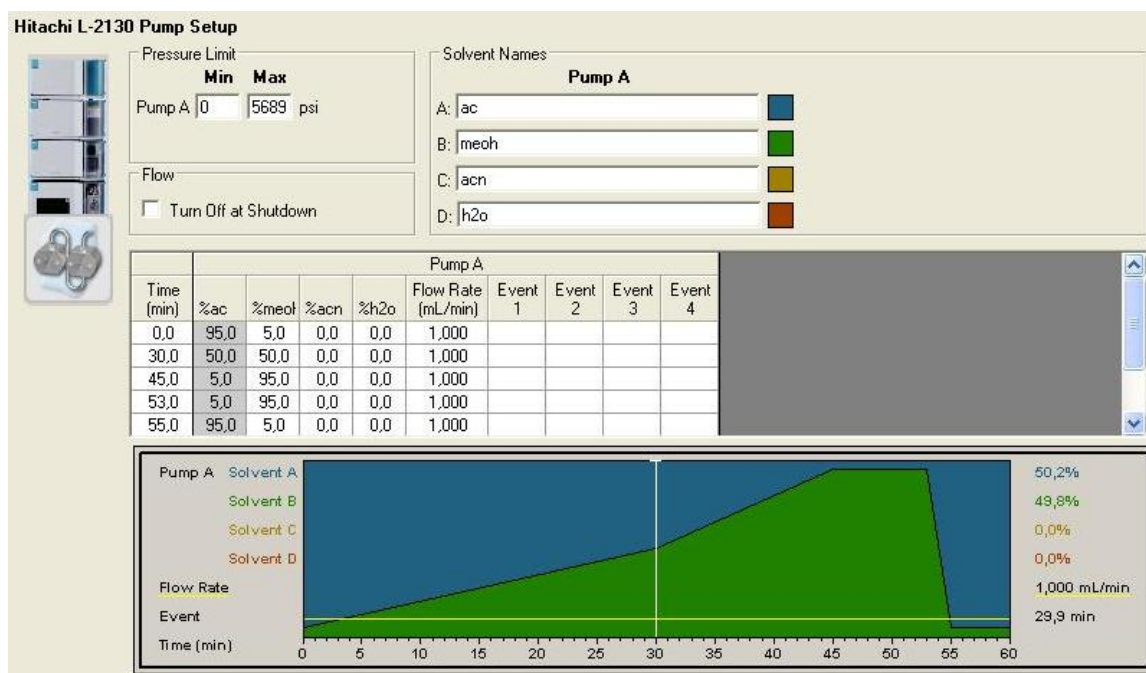
Na metodologia empregada para identificação através de HPLC foi empregada a metodologia descrita no item 4.9, onde a substância isolada foi solubilizada juntamente com o padrão em metanol/água destilada 50:50 v/v e injetada no aparelho e depois analisado o cromatograma gerado.

4.9 PERFIL CROMATOGRÁFICO

Para realização do perfil cromatográfico do extrato e frações foi utilizado o aparelho HPLC (High Performance Liquid Chromatograph) da marca Merck-Hitachi composto de bomba L2130, detector DAD L2450, INTERFACE L7000 conectada ao sistema operacional Windows XP, com coluna XTERRA C18 de fase reversa, a temperatura de $\pm 25^\circ\text{C}$. O detector de arranjos de díodos (DAD) foi configurado para realizar varredura entre 200 a 400 nm.

Para o extrato e frações foi utilizada a mesma fase móvel, utilizando como fase móvel metanol e fase ácida em todas as injeções, com tempo de corrida de 60 minutos. A figura 9 apresentada abaixo representa o método empregado nessa análise com suas respectivas concentrações e tempos.

Figura 9 - Método utilizado para análise em HPLC com suas respectivas concentrações e tempos.



Fonte: O autor (2011).

4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.10.1 Ensaio da Redução do Complexo Fosfomolibdênio.

O método de complexação pelo fosfomolibdênio, descrito por Prieto, Pineda e Aguilar (1999, p.337 - 341), é uma maneira simples e barata de se avaliar a capacidade antioxidante total de uma mistura complexa de compostos, como é o caso de extratos obtidos de plantas, bem como suas frações. Possui a vantagem de avaliar a capacidade antioxidante tanto de componentes lipofílicos quanto de hidrofílicos. O complexo fosfomolibdênico é formado pela reação da solução de Na_3PO_4 (28mL, 0,1mol/L) com solução de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (12mL, 0,03mol/L) e solução de H_2SO_4 (20mL, 3mol/L), em meio aquoso, sendo o volume final, ajustado com H_2O destilada para 100mL, e possui coloração amarela, tornando-se verde à medida que se reduz (PRIETO, PINEDA E AGUILAR, 1999). As amostras (frações e substâncias M1 e M5) para efeitos deste estudo foram levadas à secura em banho-maria (40°C), e a partir do material seco, bem como das substâncias isoladas, foram preparadas soluções metanólicas com concentração final de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Destas, 0,3mL

foram adicionados à 3mL de solução reagente do complexo fosfomolibdênio.

Os tubos foram fechados e mantidos em banho-maria à 95°C, por 90 min. Após resfriamento, foi feita a leitura a 695nm, em um espectrofotômetro UV- 1601 Shimadzu® para obtenção das absorbâncias, usando 0,3mL de metanol com 3mL do reagente como branco. A capacidade antioxidante das amostras é expressa em relação à rutina (200µg/mL) usada como padrão, e vitamina C (200µg/mL) cuja atividade antioxidante de referência foi considerada 1,00.

As fórmulas abaixo demonstram o cálculo de atividade antioxidante frente a rutina e vitamina C.

$$\text{AA\% EM RELAÇÃO À RUTINA} = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (rutina)} - \text{Abs (branco)}} \times 100$$

$$\text{AA\% EM RELAÇÃO À VITAMINA C} = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (vitamina C)} - \text{Abs (branco)}} \times 100$$

4.10.2 Potencial Antioxidante por Cromatografia de Camada Delgada

De acordo com o método descrito por Conforti, F. *et al.* (2002), as amostras das frações, e os padrões (10mg/ml) para a realização do presente teste para esta pesquisa. foram submetidos à cromatografia em camada delgada (CCD), usando como fase móvel a mistura acetato de etila, acetona e água (25:8:2). Após este processo as placas foram reveladas com solução a 0,2% (p/v) de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) em etanol e o desenvolvimento de coloração amarela nas manchas revelou reação positiva.

4.10.3 Avaliação da Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) é um radical livre e estável com o qual compostos vegetais que apresentam potencial atividade antioxidante interagem, permutando os elétrons ou átomos de hidrogênio para o radical livre reduzindo-o. É um método fácil, rápido e muito utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de amostras vegetais.

O potencial de redução do radical DPPH das amostras foi analisado espectrofotometricamente de acordo com Mensor, L. L. *et al.*(2001). Foram preparadas cinco soluções metanólicas diferentes de cada amostra e interpoladas em gráfico para determinação da equação da reta. Em tubo de ensaio foram adicionados 2,5mL da amostra a ser testada e depois adicionado 1mL de uma solução metanólica de DPPH na concentração de 0,03 mmol/mL. 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. Após trinta minutos de reação foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 518nm, correspondente a absorção máxima do radical em estudo. Como padrões foram utilizados rutina e vitamina C.

A porcentagem de atividade antioxidante (AA%) foi calculada através da fórmula abaixo:

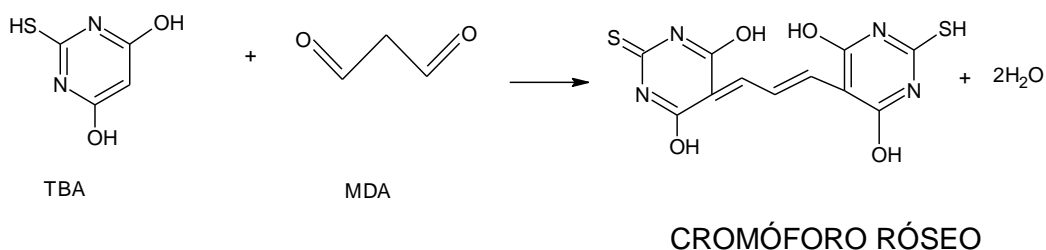
$$AA\% = \frac{100 - (\text{Abs amostra} - \text{Abs branco})}{\text{Abs controle negativo}}$$

Os valores de concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante (IC50) são calculadas no gráfico onde a abscissa representa a concentração da amostra e a ordenada é a média da AA% das amostras testadas, cada amostra possui 5 pontos. A equação da reta do gráfico, do tipo $y = ax + b$, serve de base para determinação do valor de IC50.

4.10.4 Ensaio Antioxidante pelo Método do Ácido Tiobarbitúrico- Espécies Reativas (TBARS)

O malonildialdeído (MDA) é um dos principais produtos de decomposição dos hidroxiperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, formado no decorrer do processo oxidativo (OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES, 2005). Ao reagir o MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em meio acidificado e sob condições de elevada temperatura, pode-se mensurar a peroxidação lipídica de matrizes biológicas por meio do cromóforo róseo formado, que pode ser observado na figura 10.

Figura 10 - Reação do TBA com MDA



Fonte: OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES, 2005.

Este método, adaptado de Kishida *et al.* (1993) e Moraes *et al.* (2006), envolve a peroxidação da gema de ovo por meio da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico –TBARS.

Foram testadas as frações e o extrato bruto da espécie *Dicksonia sellowiana* e como padrões positivos os antioxidantes BHT (butilhidroxidotolueno) e ácido ascórbico nas mesmas proporções. Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,5 mL de solução de gema de ovo (10% p/v), 0,1 mL de amostra ou padrão (100, 500 e 1000 ppm) e completado o volume para 1 mL com água destilada. Após este processo, acrescentou-se a cada um dos tubos de ensaio, 0,05 mL de solução de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorato $0,07 \text{ mol.L}^{-1}$ (ABAP), 1,5 mL de solução de ácido acético 20% (pH 3,5) e 1,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,8% p/v (TBA) em solução de dodecil sulfato de sódio 1,1% p/v (SDS). Os tubos de ensaio foram submetidos ao banho-maria (95°C) por 1 hora, sob agitação. Após resfriamento, foi acrescentado a cada tubo 5 mL de n-butanol e estes foram centrifugados por 10 minutos, a 3000 rpm. Os sobrenadantes foram submetidos ao espectrofotômetro, em 532 nm. O mesmo processo foi realizado com os tubos de ensaio que continham todos os reagentes exceto as amostras.

4.10.5 Inibição da oxidação pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada utilizando-se o sistema β -caroteno/ácido linoléico (MILLER, 1971; SHON; KIM; SUNG, 2003). Inicialmente, o β -caroteno (2 mg) foi dissolvido em CHCl_3 (10 mL), sendo 2 mL dessa solução transferidos para um balão volumétrico (100

mL). O clorofórmio foi então evaporado sob fluxo de N₂. No balão volumétrico, foram adicionados 40 mg de ácido linoleico, 400 mg de Tween 40 e 100 mL de água destilada aerada. Essa solução (172.8 µL) foram adicionadas aos extratos (10 µL) em diferentes concentrações (25, 50, 100 e 200 µg/mL) em placas de poliestireno de 96 poços. O BHT foi usado para comparação. A absorbância no tempo zero foi medida em 470 nm usando um leitor de placa (Tecan Infinite M200). Para realização da curva de declínio da atividade antioxidante, o leitor de microplaca com temperatura constante de 50°C, realizava a leitura a cada 30 segundos para construção da curva, totalizando 241 leituras. Um branco, sem β-caroteno foi preparado para posterior subtração, já que os extratos eram coloridos. A atividade antioxidante (AA) foi calculada usando: $AA = [(absorbância\ após\ 2\ h\ de\ ensaio/absorbância\ inicial) \times 100]$.

4.11 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina*, segundo Meyer, B. N. *et al.* (1982), é um ensaio biológico rápido, de baixo custo, não requer ambiente asséptico, utiliza um grande número de organismos para validação estatística, não requer equipamentos especiais e a quantidade de amostra é relativamente pequena (2- 20mg) (MEYER, B. N. *et al.*, 1982; DALL' STELLA, 2008).

4.11.1 Preparo da Solução Salina

A água do mar artificial foi preparada com 38g de sal marinho (23g NaCl, 11g MgCl₂·6H₂O, 4g Na₂SO₄, 1,3g CaCl₂·2H₂O ou CaCl₂·6H₂O, 0,7g KCl) e 1000mL de água purificada.

O pH foi ajustado para 9,0 com Na₂CO₃ para evitar o risco de morte das larvas por diminuição do pH durante a incubação. Segundo Lewan *et al.* (1992), um pH superior a 6 é essencial para o desenvolvimento de *Artemia Salina*, e um pH superior a 10,5 deve ser evitado.

4.11.2 Eclosão dos Ovos

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

4.11.3 Preparo das Amostras contendo extrato e frações de *Dicksonia sellowiana*

O estudo foi realizado com as frações e o extrato bruto de *Dicksonia sellowiana*. As amostras (20mg) foram levadas à secura em banho-maria (40°C), e adicionados solvente em quantidade suficiente para obter a concentração inicial da solução de 10mg/mL.

Como solvente foi utilizado o metanol. Desta solução, 2,5, 25 e 250 µL foram transferidos com pipeta automática para os tubos de ensaio correspondendo respectivamente a 10, 100 e 1000µg/mL, em triplicata. O solvente foi evaporado por 12 horas (DALL' STELLA, 2008).

4.11.4 Avaliação da Toxicidade

Após a eclosão dos ovos, 10 larvas de *Artemia salina* foram transferidas para cada tubo de ensaio contendo as frações e para os tubos controles. Os controles negativos consistiram de tubos com o solvente solubilizador da fração, os quais foram evaporados juntamente com as amostras. Como controle positivo foi utilizado sulfato de quinidina nas mesmas quantidades utilizadas para as amostras. O volume de todos os tubos foi ajustado com água do mar artificial para 2,5mL.

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

Os dados foram analisados através do método estatístico Probitos e foram determinados os valores de DL50 e 95% de intervalo de confiança. As frações foram consideradas ativas quando DL50 for menor que 1000 ppm (MEYER *et al.*, 1982).

4.12 AVALIAÇÃO HEMOLÍTICA IN VITRO

4.12.1 Operações preliminares

Para o preparo da solução foi transferido 1 mL de sangue de carneiro (Marca Newprov) para o balão volumétrico de 50 mL e completado o volume com tampão fosfato pH 7,4. (Suspensão diluída 2%).

A solução somente pode ser usada enquanto o líquido sobrenadante permanecer límpido e incolor e deve ser mantida fria.

4.12.2 Teste preliminar

Para a realização do teste foi necessário preparar a diluição em série do extrato vegetal com a solução tampão fosfato e suspensão de sangue a 2%. Foram usados 4 tubos de ensaio, partindo do extrato de *Dicksonia sellowiana* na concentração de 1000 µg/mL, conforme o quadro 3:

Quadro 3 – Soluções para teste preliminar.

Tubos de Ensaio	1º tubo	2º tubo	3º tubo	4º tubo
Extrato vegetal (ml)	0,10	0,20	0,50	1,00
Tampão fosfato pH 7,4 (ml)	0,90	0,80	0,50	-
Suspensão de sangue (2%) (ml)	1,00	1,00	1,00	1,00

Após o preparo da solução é necessário agitar cuidadosamente os tubos de ensaio evitando a formação de espuma. e aguardar 30 minutos. Agitar novamente e deixar em repouso por 150 minutos e centrifugar novamente por 5 minutos, a 3000 rpm. Após este processo foi preciso examinar os tubos de ensaio e anotar em qual dos tubos ocorreu hemólise total, ou seja, onde ocorreu solução límpida, vermelha e sem depósito de eritrócitos. Quando não ocorreu a hemólise em algum dos tubos de ensaio adotaram-se os procedimentos descritos no quadro 4:

Quadro 4 - Procedimento para não ocorrência de hemólise.

OCORRÊNCIA DE HEMÓLISE	Procedimentos
Apenas no 4º tubo de ensaio	Usar extrato original para teste principal
Nos tubos de ensaio 3 e 4	Diluir duas vezes o extrato vegetal com tampão fosfato
Nos tubos de ensaio 2, 3 e 4	Preparar solução diluída 5 vezes

Após estes procedimentos se em 6 horas todos os tubos de ensaio apresentarem solução límpida e vermelha é necessário preparar uma solução diluída 10 vezes soro fisiológico e fazer o teste preliminar, como descrito acima.

4.12.3 Teste principal

Partindo da análise do teste preliminar, item 4.11.2, foi preparada a diluição em série em 13 tubos de ensaio com tampão fosfato pH 7,4 e suspensão de sangue à 2%, conforme o quadro 5:

Quadro 5 – Soluções para teste principal.

Tubos	1º tubo	2º tubo	3º tubo	4º tubo	5º tubo	6º tubo	7º tubo	8º tubo	9º tubo	10º tubo	11º tubo	12º tubo	13º tubo
Extrato ou diluição (mL)	0,40	0,45	0,50	0,55	0,60	0,65	0,70	0,75	0,80	0,85	0,90	0,95	1,00
Tampão fosfato	0,60	0,55	0,50	0,45	0,40	0,35	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05	-
Suspensão de sangue 2%	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Após o processo descrito no quadro acima, os resultados deverão ser observados por 24 horas e a partir deste é calculado a quantidade do material vegetal em gramas, ou proporção em g/mL que produz hemólise total (b).

Para saponinas:

A referência para controle positivo do teste é a saponina. Para a realização do teste é necessário pesar exatamente 10 mg de Saponina R para o balão volumétrico de 100 mL. e completar o volume com tampão fosfato pH 7,4.

Usar solução salina recém preparada.

Preparar uma série de diluições de saponina como descrito anteriormente para o extrato vegetal. Calcular a quantidade de saponinas (g) que produz hemólise total (a).

Fórmula para calcular a atividade hemolítica do controle positivo.

$$1000 \times a/b$$

1000 = atividade hemolítica da saponina em relação ao sangue de carneiro

a= quantidade em gramas de saponina

b= quantidade em gramas de material vegetal

4.13 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA EM AGAR SANGUE

Em papel whatman número 1, foi aplicado de 10 µL a 20 µL da amostra a ser testada na concentração de 1000 µg/mL. Após este procedimento o papel whatman número 1, foi levado à secura, em estufa a 50 °C, e foi aplicado sobre sobre placa de Agar sangue. Foi incubado por 24 horas em estufa a 35 °C e após este processo foi medido o halo formado no Ágar sangue e comparado aos controles.

Para a obtenção do controle positivo é necessário uma solução de saponina ou solução 2% p/v de Triton que foi aplicada sobre o papel whatman 1000 µg/mL.

No que se refere a obtenção do controle negativo é necessário uma Solução salina 0,9%, que foi aplicada sobre o papel whatman 1000 µg/mL.

Realizar em cada teste o controle do solvente empregado aplicando sobre papel e levando a estufa do mesmo modo.

Foi realizado em cada teste o controle do solvente empregado, aplicando sobre papel whatman 1000 µg/mL e levado a estufa a 35°C.

4.14 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação da atividade antimicrobiana será avaliada pela técnica de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

MICROORGANISMOS UTILIZADOS:

Em uma fase inicial os microrganismos utilizados na pesquisa serão:

- *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923
- *Escherichia coli* ATCC® 25922
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853
- *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212

As linhagens de referência foram armazenados a -80°C em TSB com glicerol a 15%, até o momento do uso.

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

4.14.1 Preparo dos inóculos

O preparo dos inóculos para as linhagens referência serão 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.

4.14.2 Técnica de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (cim).

O ensaio 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. O extratos foram preparados na concentração de 100 mg/ml e as frações 20 mg/ml, diluídos em etanol a 10% e DMSO a 2%, foram filtrados utilizando membrana milipore 0,22 µm. Após a filtração foi preparado uma solução na concentração de 10000 µg/ml e 400 µg/ml de cada extrato e fração a ser testado. Em seguida foram transferidos 100 µl de caldo Mueller-Hinton (Merck) na linha A das colunas 2 a 9. Na coluna 2 foi

inoculado 100 µl de extrato ou fração e transferido após homogeneização 100 µl para o orifício da coluna 3, repetindo-se o procedimento até a coluna 9, e desprezando-se após homogeneização o excesso da diluição, obtendo-se assim concentrações decrescentes dos extratos (5000 µg/ml–coluna 2; 2500 µg/ml–coluna 3; 1250 µg/ml–coluna 4; 625 µg/ml–coluna 5; 312 µg/ml–coluna 6; 156 µg/ml–coluna 7; 78 µg/ml–coluna 8; 39 µg/ml–coluna 9) e frações (200 µg/ml–coluna 2; 100 µg/ml–coluna 3; 50 µg/ml–coluna 4; 25 µg/ml–coluna 5; 12 µg/ml–coluna 6; 6 µg/ml–coluna 7; 3 µg/ml–coluna 8; 1 µg/ml–coluna 9).

Os inóculos bacterianos preparados na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/ml, equivalente ao tubo 0,5 de “McFarland” serão inoculados em um volume de 5 µl nos orifícios das colunas de 2 a 9, permanecendo uma concentração final de 10^4 por poço.

Os orifícios das colunas 1, 10, 11 e 12 serão 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 ou fração na concentração de 10000 µg/ml e 400 µg/ml respectivamente. O orifício da coluna 10 e 11 para o controle negativo da atividade inibitória do diluente etanol e DMSO, utilizado na preparação dos extratos. Na coluna 10, 100 µl de solução de etanol a 10% serão adicionados com 100 µl de caldo Mueller-Hinton e 5 µl do inóculo bacteriano e na coluna 11, 100 µl de solução de DMSO a 2% onde 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 foi acrescentado 20 µl de solução aquosa de TTC (cloreto de trifetil tetrazolium, MERCK) a 0,5% e as microplacas foram reincubadas por três horas a 35 °C. Após esta incubação foi realizada a leitura dos resultados.

4.14.3 Leitura dos resultados

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

positiva da ação inibitória do extrato ou fração vegetal. Cada teste foi realizado em duplicata.

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância estatística para os resultados com distribuição normal e variâncias semelhantes foi determinada por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de *Tukey*, quando diferenças entre os grupos eram detectadas. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

A determinação da perda por secagem impede que o material permaneça úmido devido a uma secagem ineficiente ou que haja degradação de compostos por secagem excessiva (SIMÕES *et al.*, 1999). A finalidade da secagem é impedir reações de hidrólise e contaminação microbiana (SIMÕES *et al.*, 2007 p.230) além de reduzir volume e peso facilita a moagem do material (PRISTA *et al.*, 1981). A perda por dessecação das frondes de *Dicksonia sellowiana*, neste estudo específico foi realizada em estufa de circulação forçada em temperatura constante de 50°C e apresentou um teor de umidade abaixo de 14% que é o limite máximo recomendado para drogas vegetais (SIMÕES *et al.*, 1999).

A determinação de teor de cinzas permite a verificação de impurezas inorgânicas não-voláteis na droga vegetal como metais pesados, areia ou pedra, e é importante esta determinação para o controle de qualidade da droga vegetal. Os valores encontrados nesta análise encontram-se dentro dos limites preconizados pela farmacopéia, um índice individual simultaneamente de identificação e pureza. (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

O teor de extrativos emprega o álcool como solvente. A extração foi realizada em aparelho modificado de Soxhlet, e concentrado no próprio aparelho. O fracionamento foi realizado em aparelho de Soxhlet uma partição líquida-líquida, e o valor de pH do extrato apontou a presença de substâncias ácidas na planta estudada.

O quadro 6 demonstra todos os valores obtidos como parâmetros físico-químicos do pó de frondes de *Dicksonia sellowiana*.

Quadro 6 - Análises físico-químicas do pó de frondes de *Dicksonia sellowiana*

Parâmetros de Qualidade	Resultados obtidos (média ± DP)
Perda por dessecação em estufa	86,1375% ± 0,5573
Teor de cinzas totais	5,8769% ± 0,1764
Teor de cinzas insolúveis em ácido	0,07 % ± 0,102
Teor de sólidos do E.B	22,8636% ± 0,033
pH do E.B	6,0
Coloração do E.B	Verde

Fonte: O Autor

Nota: DP= Desvio Padrão, EB= Extrato Bruto

5.2 PESQUISAS DE GRUPOS FITOQUÍMICOS

Os quadros apresentados neste item demonstram os resultados do ensaio sistemático qualitativo preliminar para a identificação dos principais grupos de metabólitos secundários, que se encontram presentes na droga vegetal. Esta análise é fundamental como um guia para o isolamento de substâncias.

Na quadro 7, são apresentados os resultados da Análise Sistemática do Extrato Aquoso, e nesta análise foi verificada a presença de taninos hidrolisáveis, taninos condensados devido à cor verde obtida no resíduo do papel de filtro. Verificou-se também a presença dos aminogrupos, devido a coloração violácea. Heterosídeos antociânicos, saponinas, heterosídeos cianogenéticos, ácidos voláteis, ácidos fixos não foram encontrados.

Quadro 7 - Análise Sistemática do Extrato Aquoso

Análises	Extrato Aquoso
Heterosídeos Antociânicos	-
Heterosídeos Saponínicos	-
Heterosídeos Cianogênicos	-
Taninos Hidrolisáveis	+
Taninos Condensados	+
Ácidos Fixos	-
Ácidos Voláteis	-
Aminogrupos	+

Fonte: O Autor

Nota: + = positivo - = negativo

Como pode ser observado nos dados do quadro 8, Análise Sistemática do Extrato Hidroalcoólico a 20%, a indicação positiva da presença de leucoantocianidas, e de flavonóides, no teste de oxálico bórico com presença de fluorescência, indicando reação positiva especialmente para flavonóis, pois as flavanonas e isoflavanos não possuem esta propriedade e os derivados antociânicos coram-se, mas não produzem fluorescência. Esta reação é explicada pela formação de quelatos, produzindo deslocamento batocrômico da banda I dos derivados do ácido bórico (compostos obtidos do ácido bórico com substituições na molécula por dois radicais orgânicos).

Para esteróides e/ou triterpenos a reação de Libermann Bouchard indicou a presença de triterpenos nas frações hexano, clorofórmio e acetato de etila. A cor verde nessas frações indica função hidroxila em 3 e dupla ligação entre 5 e 6 ou 7 e 8 no anel aromático.

Na reação de Keller- Kelliani as frações hexano, clorofórmio e acetato de etila obtiveram resultado positivo com coloração verde indicando a presença de triterpenos.

Quadro 8 - Análise Sistemática do Extrato Hidroalcoólico a 20%

Grupos Fitoquímicos	Análises	Fração Hexano	Fração Clorofórmio	Fração Acetato de Etila	Extrato Hidroalcoólico
Alcalóides	Reativo Mayer	-	-	-	-
	Reativo Dragendorff	-	-	-	-
	Reativo Bouchardat	-	-	-	-
	Reativo Bertrand	-	-	-	-
Flavonóides	Leucoantocianidinas	-	-	+	+
	Heterosídeos flavônicos	-	-	-	-
	Oxálico bórico	+	+	+	+
	Pacheco	-	-	-	-
Cumarinas	Tubo	-	-	-	-
	Papel	-	-	-	-
Antraquinonas		-	-	-	-
Esteróides / Triterpenos	Reação Liberman-Bouchard	Verde	Verde	Verde	+
	Reação Keller-Kelliani	Verde	Verde	Verde	+

Fonte: O Autor

Nota: + = positivo - = negativo

5.3 PREPARAÇÕES REALIZADAS DO EXTRATO E FRAÇÕES

O extrato bruto foi preparado em aparelho de Soxhlet modificado, e para a preparação do mesmo utilizou-se 1350 gramas de droga vegetal e 7,5 litros de álcool absoluto. Foram realizadas 14 rotações. O extrato foi concentrado no próprio Soxhlet modificado e para o fracionamento foi utilizada 200 gramas do extrato bruto. O fracionamento foi realizado por partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente em aparelho de Soxhlet modificado e ao final do processo obtiveram-se 4 frações: hexano, clorofórmio, acetato de etila e fração remanescente. Após evaporação completa dos solventes foi calculado o rendimento de cada amostra, resultados estes apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Massa seca do Extrato Bruto e frações de *Dicksonia sellowiana*

Fração	Massa Seca Obtida (g)	Rendimento (%) em relação à massa obtida	Rendimento (%) em relação à massa inicial
Extrato Bruto	308,6586	100	22,8636
Hexano	74,8932	37,45	5,55
Clorofórmio	82,3821	41,19	6,10
Acetato de Etila	9,6781	4,84	0,72
Remanescente	21,5698	10,78	1,60

Fonte: O Autor

Conforme os resultados demonstrados na tabela 1, verificou-se que a fração clorofórmio foi a que obteve maior rendimento, 41,19%, em relação aos outros solventes. Esse maior rendimento deve-se ao alto teor de compostos fenólicos presentes na espécie.

5.4 DOSAGENS DE POLIFENÓIS PELO MÉTODO DE Folin-Ciocalteu

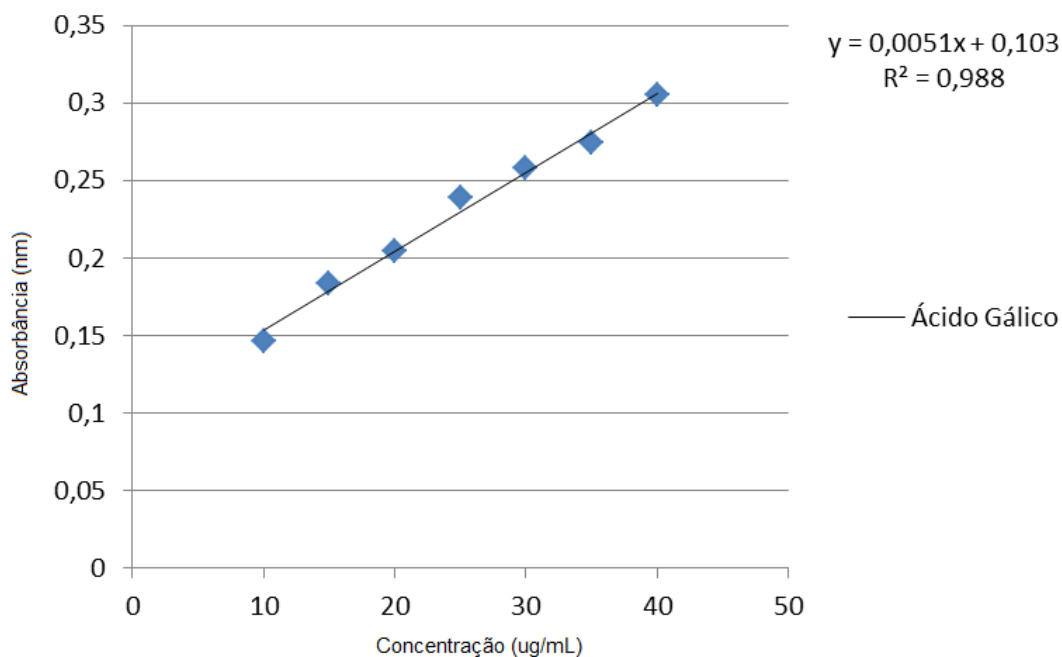
Polifenóis é um grupo muito estudado em plantas por possuírem atividade farmacológica, antinutricional e também por inibirem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos (NAGEM *et al.*, 1992), além de contribuírem com adstringência e coloração.

Este grupo é constituído por uma gama enorme de substâncias (fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, taninos e ligninas) a maioria de grande polaridade, muito reativos e suscetíveis a ação de enzimas (KING & YOUNG, 1999). Os polifenóis são substâncias redutoras e, portanto, oxidam-se com facilidade, resultando em substâncias coradas (SIMÕES *et al.*, 2007, p.237).

O método de dosagem de polifenóis pelo método de Folin-Ciocalteu, baseia-se na redução química do reagente, uma mistura de óxido de tungstênio e molibdênio, que com a redução de óxidos metálicos formam coloração azul que exhibe uma absorção de luz ampla, com um máximo de 765 nm. A intensidade de absorção de luz nesse comprimento de onda é proporcional à concentração de fenóis.

Para elaboração da curva de calibração para este estudo foi utilizado como padrão a substância Ácido Gálico, nas concentrações de 10,15, 20, 25, 30, 35 e 40 µg, conforme pode ser visualizado no gráfico 1.

Gráfico 1 - Curva Padrão de Ácido Gálico



Fonte: O autor (2010)

A equação da curva padrão de ácido gálico é: $y=0,0051x + 0,103$, onde x representa a concentração de polifenóis correspondente a ácido gálico e y representa a absorbância.

Após obter-se as absorbâncias e a média destas para cada concentração de cada amostra, e utilizando a equação da curva padrão de ácido gálico, foi possível determinar a concentração de compostos fenólicos correspondente a ácido gálico das amostras. A tabela 2 mostra a concentração de polifenóis no extrato e frações, nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 μg .

Tabela 2 - Absorbância e Concentração de Polifenóis Correspondente ao Ácido Gálico das Frações e do Extrato Bruto de Folhas de *Dicksonia sellowiana*, com Relação à Concentração das Mesmas.

CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS (µg/mL)	ABSORBÂNCIA					CONCENTRAÇÃO DE POLIFENÓIS (µG/mL)				
	ET	FH	FC	FAE	FR	ET	FH	FC	FAE	FR
10	0,122	0,104	0,135	0,148	0,124	3,73	0,20	6,27	8,82	4,11
20	0,143	0,128	0,156	0,185	0,148	7,84	4,90	10,39	16,09	8,82
30	0,167	0,138	0,167	0,228	0,160	12,55	6,86	12,55	24,51	11,18
40	0,182	0,153	0,193	0,264	0,179	15,49	9,80	17,65	31,57	14,90

Nota: ET – Extrato total, FH – Fração hexano, FC – Fração clorofórmio, FAE- Fração acetato de etila, FR- Fração remanescente.

Verificou-se com base nos dados da tabela 2, que a fração acetato de etila é a que possui maior concentração de polifenóis, seguida da fração clorofórmio, extrato total e da fração remanescente. A fração hexânica foi a que apresentou a menor concentração de polifenóis, resultado já era esperado por essa fração conter compostos apolares.

Esses resultados diferem dos já obtidos por BORA *et al.* (2006) descritos na pagina 33 deste trabalho, pelo fato de ter sido realizado uma alteração na metodologia do método, essa alteração foi feita na curva padrão do ácido gálico com concentrações maiores, pois no trabalho realizado por BORA *et al* (2006) quando as absorbâncias das amostras testadas eram colocadas na equação do gráfico da curva padrão, o valor de polifenóis de algumas amostras extrapolavam o valor testado.

5.5 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS

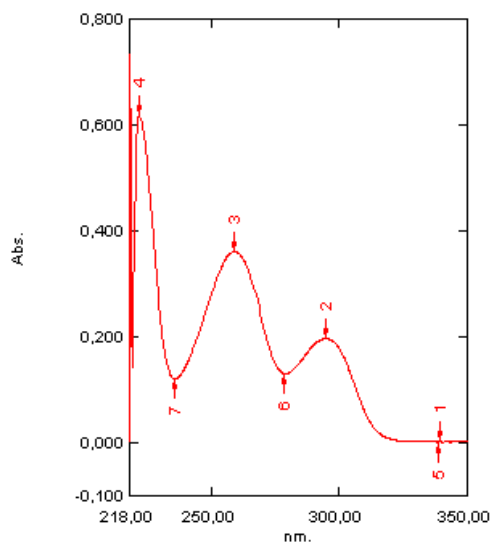
5.5.1 Identificação da Substância V1

Para isolamento da substância denominada V1, foi utilizada a técnica de cromatografia de coluna com sílica-gel da fração acetato de etila, com gradiente de polaridade descrito no item 4.7. Após este procedimento foi realizada a cromatografia preparativa para o isolamento das substâncias.

O espectro de absorção na região do UV dessa substância apresentou bandas de absorção em 222, 260 e 294 nm, semelhantes aos

dados da literatura para o ácido protocatecuico (AO et al., 2009), conforme pode ser visualizado na figura 11.

Figura 11 - Espectro de absorção no UV do ácido protocatecuico (V1)



Para análise de RMN a metodologia foi descrita no item 4.8. Analisando os espectros de RMN (figura 13), verificou-se o aparecimento de sinais apenas acima de $\delta = 6,50$ ppm no espectro ^1H -RMN, o que indica a presença de núcleo aromático, que se confirmou pela presença de sete sinais de carbono acima de $\delta = 100$ ppm, no espectro de ^{13}C -RMN (figura 14), sendo que o sinal 170,80 ppm ocorreu em região típica para ácidos carboxílicos, restando os seis sinais do núcleo aromático. Havendo apenas três sinais de prótons, o padrão de substituição no anel aromático ficou estabelecido pelas constantes de acoplamento verificadas. O sinal $\delta = 7,40$ ppm apresenta-se como um duplodoubleto com constantes de acoplamento $J = 2,0$ Hz (meta) e $8,2$ Hz (orto), com os sinais a $\delta = 7,43$ ppm, d ($J = 2,0$ Hz – meta) e $\delta = 6,77$ ppm, d ($J = 8,2$ Hz – orto). Através da correlação HMQC (próton-carbono direto) e HBMC (próton-carbono a distância) foi estabelecido a posição dos diferentes carbonos conforme descrito na tabela 3, chegando-se a estrutura do ácido 3,4-dihidroxi-benzóico (figura 12). Esta substância apresentou ponto de fusão de 202°C .

Tabela 3 - Resultados de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o ácido protocatecuico

Posição	H^1NMR			C^{13}NMR
	δ (ppm)	Multip.	$J = \text{Hz}$	δ (ppm)
1				123,85
2	7,40	<i>dd</i>	2,0 ; 8,2	123,90
3	6,77	<i>d</i>	8,2	115,90
4				151,40
5				146,10
6	7,43	<i>d</i>	2,0	117,90
7				170,80

Fonte: O autor

Figura 12 - Estrutura do Ácido Protocatecuico

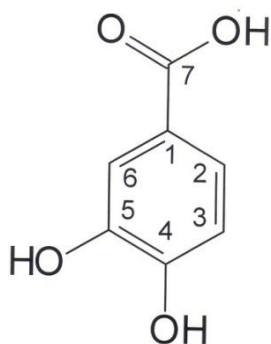
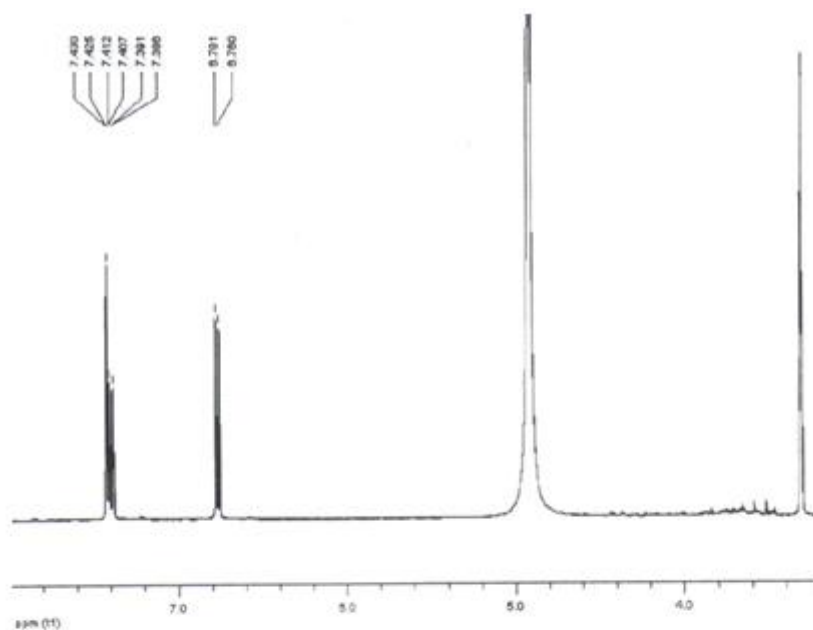
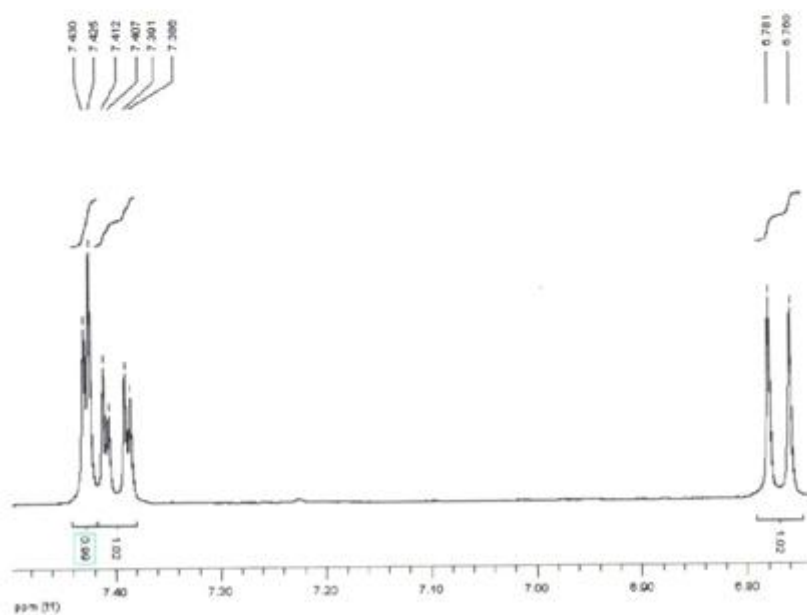


Figura 13 - Espectro de RMN de ^1H (Metanol- d_6 , 200 MHz) do ácido protocatecuico

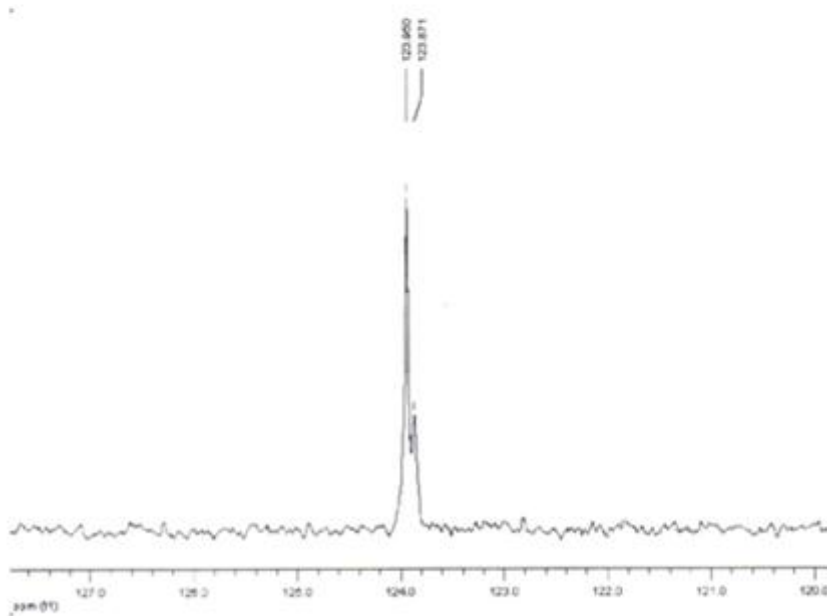
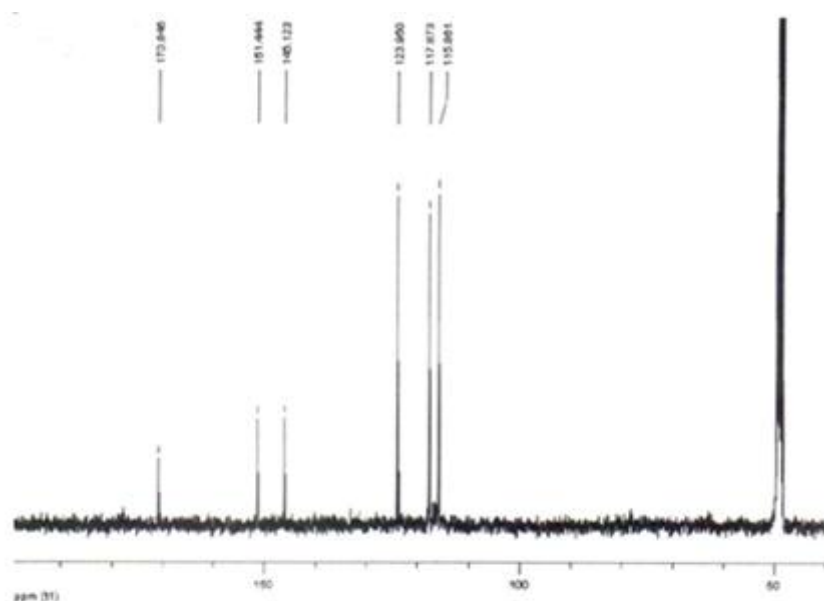


^1H -RMN



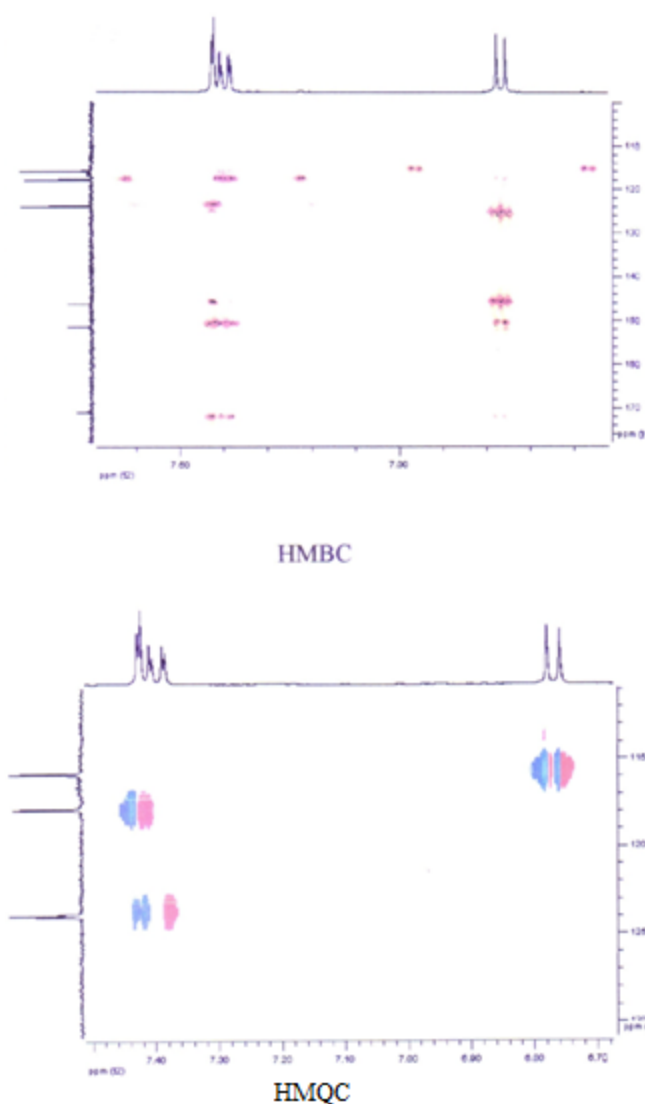
^1H -RMN expandido

Figura 14 - Espectro de RMN de ^{13}C (Metanol- d_6 , 50 MHz) do ácido protocatecuico



O experimento HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) (figura 15), forneceu correlações a J_2 e J_3 , definindo a estrutura da molécula. No experimento HMBC observou-se que o H2 (δ 7,32) apresentou correlação com os carbonos em δ 167 (Carbonila) (C1'), δ 150 (C4), δ 145 (C3) e δ 122,4 (C6). O H5 (δ 6,76) apresentou correlação com os carbonos em δ 145,0 (C3) e δ 122,4 (C6) e finalmente o H6 (δ 7,27) apresentou correlação com os carbonos em δ 167,0 (carbonila) (C1'), δ 150,0 (C4) e δ 117,1 (C2). Comparação dos dados obtidos com os da literatura (SOUZA F *et al.*, 2006) permitiu concluir que V1 trata-se do ácido protocatecuico.

Figura 15 - Experimento bidimensional HMBC e HMQC (Metanol-d6, 125 MHz) do ácido protocatecuico (V1).



A substância isolada V1 identificada como ácido protocatecuico foi analisada por HPLC juntamente com o padrão. O cromatograma demonstra que ambas são a mesma substância, pois o cromatograma demonstra apenas um pico com espectro característico do ácido protocatecuico como pode ser visualizado na figura 16.

Figura 16 - Cromatograma da Substância Isolada V1 (Ácido Protocatecuico)

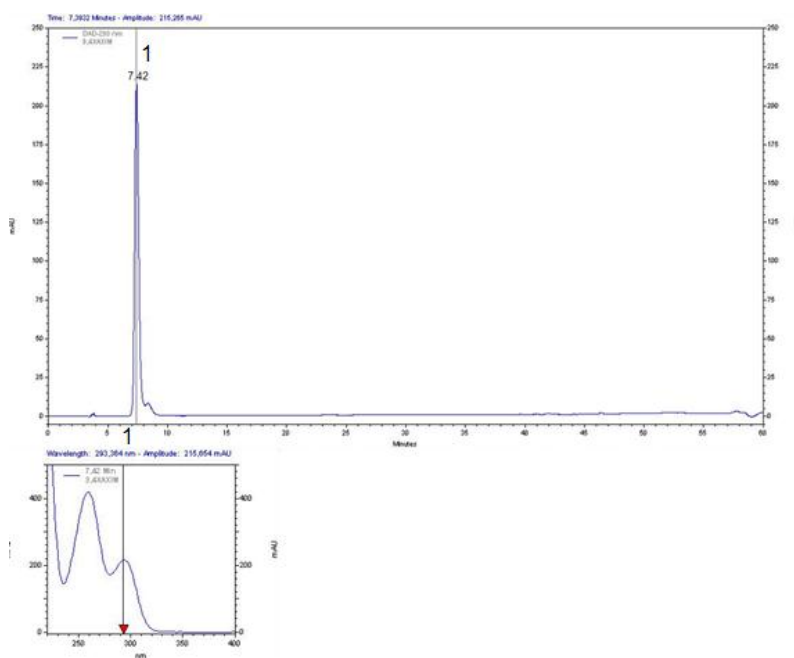


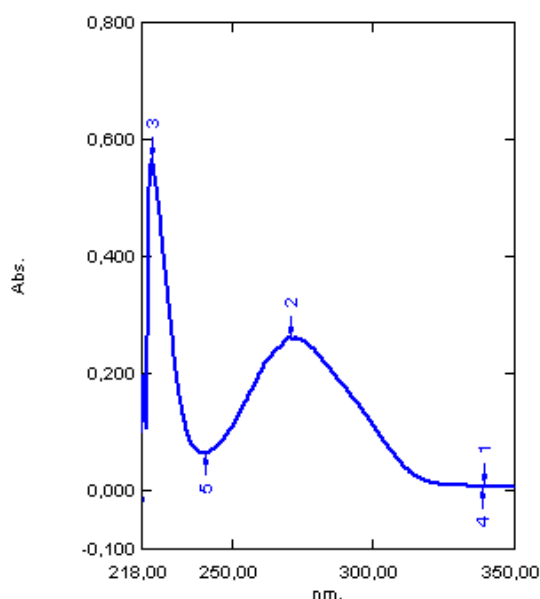
Tabela 4 - Tempo de retenção e lambda máximo da substância isolada V1 (ácido protocatecuico)

Pico	Tempo de Retenção	Lambda Máximo
1	7,42	260 nm

5.5.2 Identificação da Substância V2

Para identificação da substância V2 foram utilizadas às técnicas de espectroscopia de absorção ultravioleta, ressonância nuclear magnética, ponto de fusão e através de técnica de HPLC descrita no item 4.9, onde o padrão de ácido gálico foi homogeneizado com a substância isolada V2 em metanol na proporção de 1:1 (3mg). Através de CCD foi realizado a corrida da substância juntamente com o padrão ácido gálico e revelado com cloreto férrico e ambas apresentaram a mesma distância de corrida. O espectro de absorção na região do UV dessa substância apresentou bandas de absorção em 273 nm e 222 nm semelhante ao padrão ácido gálico (RINALDO, D 2007).

Figura 17 - Espectro de absorção no UV do ácido gálico (V2)



Para análise de RMN a metodologia foi descrita no item 4.8. Analisando os espectros de RMN, verificou-se o aparecimento de sinais de $\delta = 5,10$ ppm no espectro ^1H -RMN, respectivo as 3 hidroxilas no anel aromático e um sinal em $\delta = 7,08$ ppm correspondente aos dois hidrogênios do anel aromático que são correspondentes, esses valores indicam a presença de núcleo aromático, que se confirmou pela presença de cinco sinais de carbono acima de $\delta = 100$ ppm, no espectro de ^{13}C -RMN, sendo que o sinal 169,05 ppm ocorreu em região típica para carbonila, restando os quatro sinais do núcleo aromático, chegando-se a estrutura do Ácido 3,4,5-triidroxibenzóico (figura 21) conhecida como ácido gálico. Esta

substância apresentou ponto de fusão de 252°C. Os espectros de RMN de ^{13}C e ^1H estão representados nas figuras 18 e 19.

Figura 18 - Espectro de RMN de ^1H (Metanol- d_6 , 200 MHz) do ácido gálico

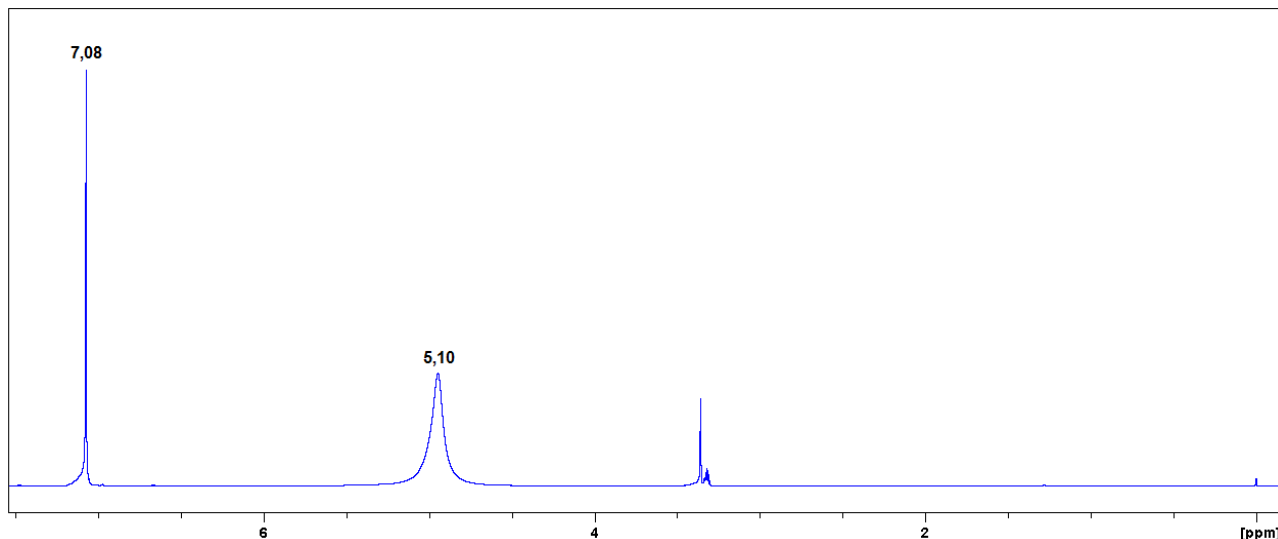
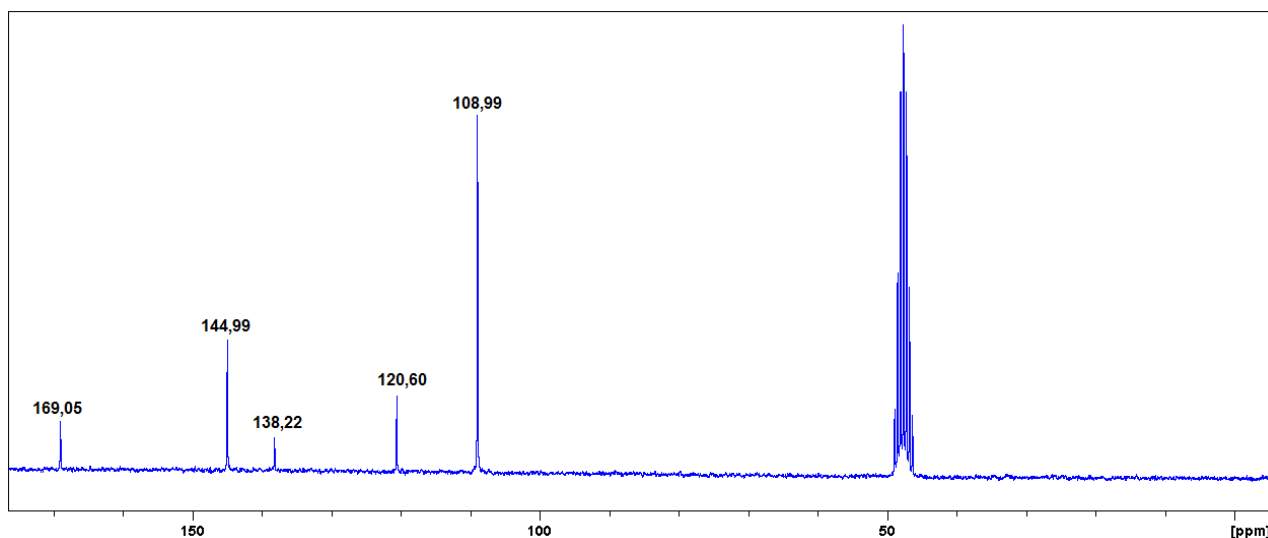


Figura 19 - Espectro de RMN de ^{13}C (Metanol- d_6 , 50 MHz) do ácido gálico



A substância isolada V2 identificada como ácido gálico foi analisada por HPLC juntamente com o padrão. O cromatograma (figura 20) demonstra que ambas são a mesma substância, pois o cromatograma demonstra apenas um pico com espectro de ultravioleta característico do ácido gálico.

Tabela 5 - Tempo de retenção e lambda máximo da substância isolada V2 (ácido gálico)

Pico	Tempo de Retenção	Lambda Máximo
1	5,58 minutos	273 nm

Figura 20 - Cromatograma da Substância Isolada V2 (Ácido Gálico)

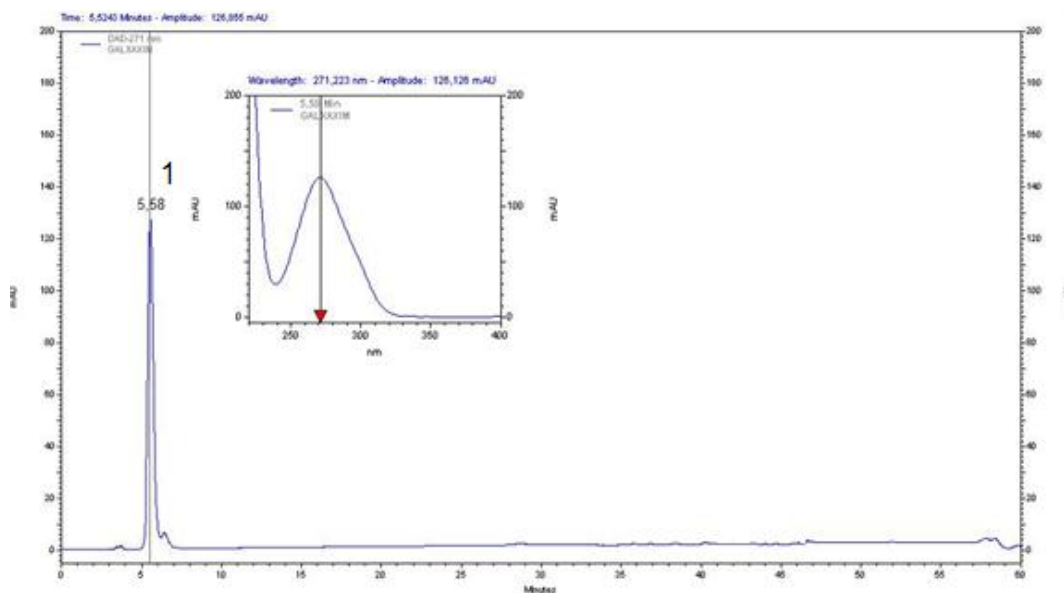
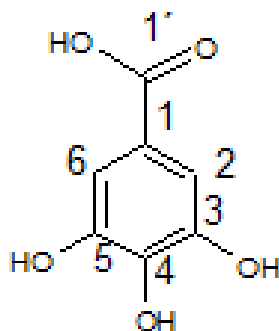


Figura 21 - Estrutura do Ácido Gálico



A figura 21 demonstra a estrutura do ácido gálico, um tanino hidrolisável pertencente a rota do ácido chiquímico. As duas substâncias isoladas são pertencentes a essa rota, sendo que a substância isolada V1 (ácido protocatecuico) é precursora da substância isolada V2 (ácido gálico), o que diferencia essas duas substâncias é uma hidroxila na posição 3 do anel aromático.

5.6 PERFIL CROMATOGRÁFICO

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em inglês: High Performance Liquid Chromatography (HPLC), é uma técnica importante para a realização de análise qualitativas e quantitativas, muito utilizada para o controle de qualidade de produtos vegetais. Com o conhecimento de marcadores químicos da droga vegetal a ser analisada é possível o monitoramento dos marcadores presentes. Diante deste contexto a técnica da CLAE foi utilizada para levantar o Perfil Cromatográfico do Extrato Bruto e frações de *Dicksonia sellowiana*, determinando o *fingerprint* (caracterização fitoquímica) da espécie vegetal, com finalidade de servir de auxílio para futuras pesquisas e controle de qualidade do material vegetal.

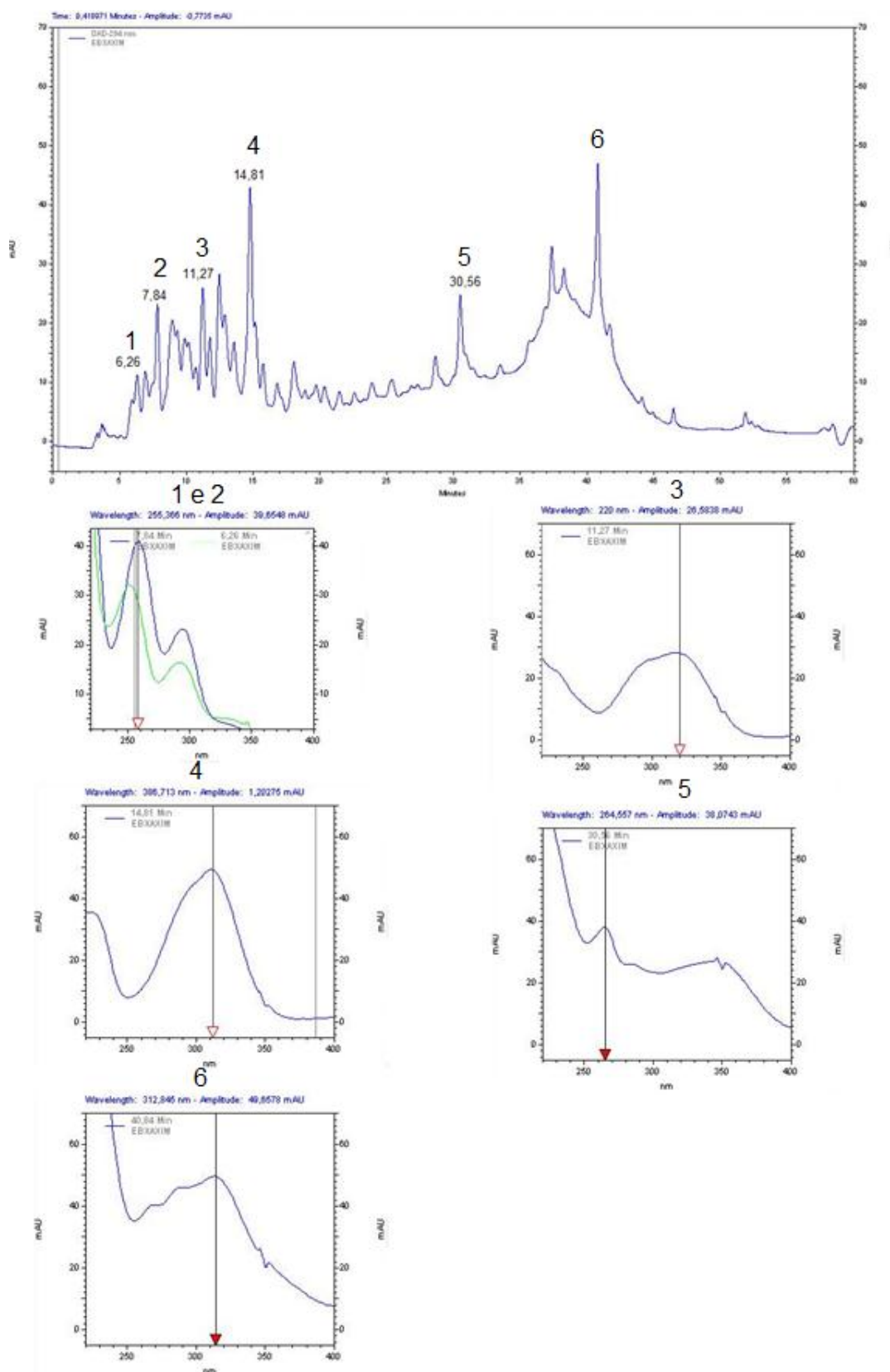
O material utilizado para análise está descrito no item 4.4 utilizando as frondes da espécie pesquisada.

A figura 22 demonstra o perfil cromatográfico do extrato bruto de *Dicksonia sellowiana*, onde foi detectado 6 picos majoritários. Com o auxílio da tabela 6 que demonstra o tempo de retenção com lambda máximo do espectro de UV, é possível determinar o *fingerprint* do extrato bruto.

Tabela 6 - Tempo de retenção e lambda máximo do *fingerprint* do extrato bruto de *Dicksonia sellowiana*.

Pico	Tempo de Retenção	Lambida Máximo
1	6,26 minutos	256 nm
2	7,84 minutos	260 nm
3	11,27 minutos	320 nm
4	14,81 minutos	312 nm
5	30,56 minutos	265 nm
6	40,84 minutos	315 nm

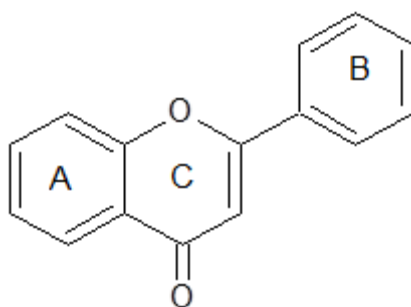
Figura 22 - Perfil cromatográfico do extrato bruto de *Dicksonia sellowiana*.



Conforme pode ser visualizado na figura anterior, o espectro do pico 2 corresponde ao ácido protocatecuíco apresentando banda de absorção máxima e 260 nm, correspondendo a figura 11. Os espectros 1 e 2 são

correspondentes variando a banda de absorção máxima entre 256 a 260 nm, provavelmente o espectro 1 seja um derivado do ácido protocatecuíco (espectro 2). Os picos 3, 4 e 6 apresentam um espectro com duas bandas de absorção máximas entre 230 a 320 nm. Estes espectros são característicos de flavonóides (figura 23), possuindo duas bandas de absorção máxima, uma relacionada com os anéis B e C em 300 a 380 nm (banda I) e a segunda entre 230 a 280 nm, relacionada ao anel A (figura 17). Os espectros dessa classe de substância variam conforme a oxigenação do composto, provocando desvios das bandas de absorção. (SMORALEK, F.S.F., 2011 p. 80)

Figura 23 - Estrutura química dos flavonóides

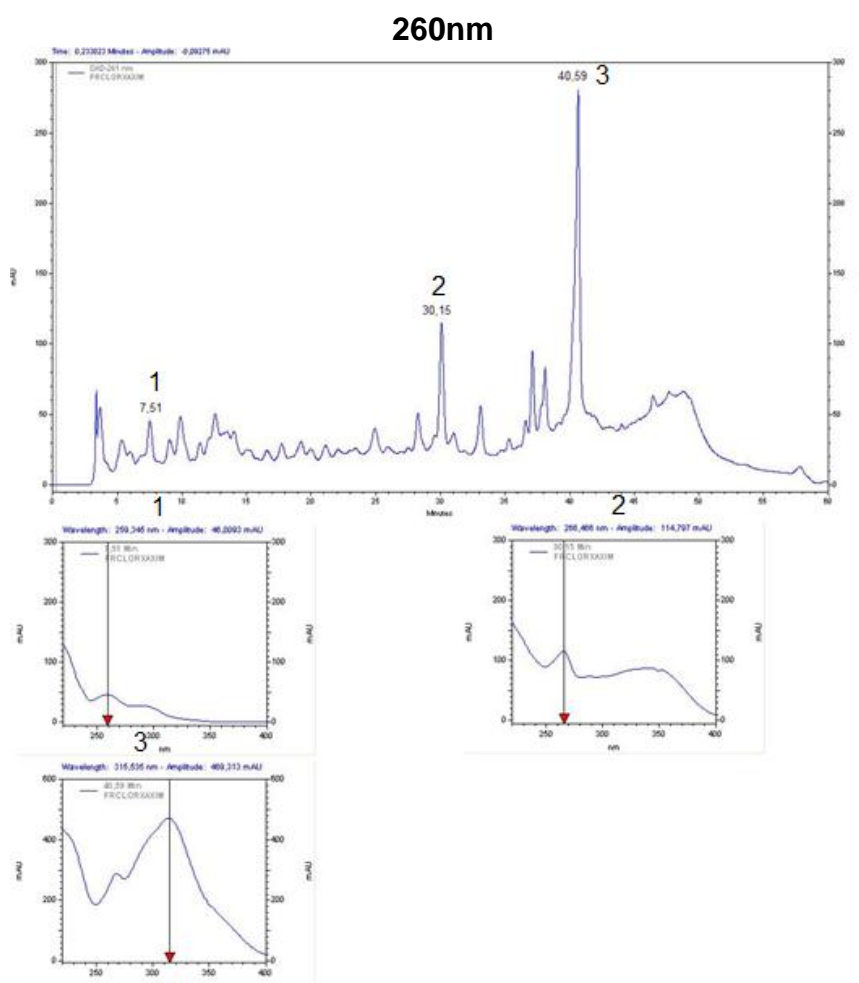


Sob as mesmas condições cromatográficas, a fração clorofórmio foi analisada com o intuito de verificar as substâncias presentes nessa fração. A vantagem de fazer a análise de frações do extrato é de verificar as substâncias majoritárias dessas frações que nem sempre se encontram majoritárias no extrato bruto. A tabela 7 demonstra os tempos de retenções e lambda máximo dos picos majoritários da fração. Essa fração foi utilizado o perfil cromatográfico em 260 nm e em 300 nm, pois a mesma apresentou picos majoritários diferentes nessas faixa de absorção.

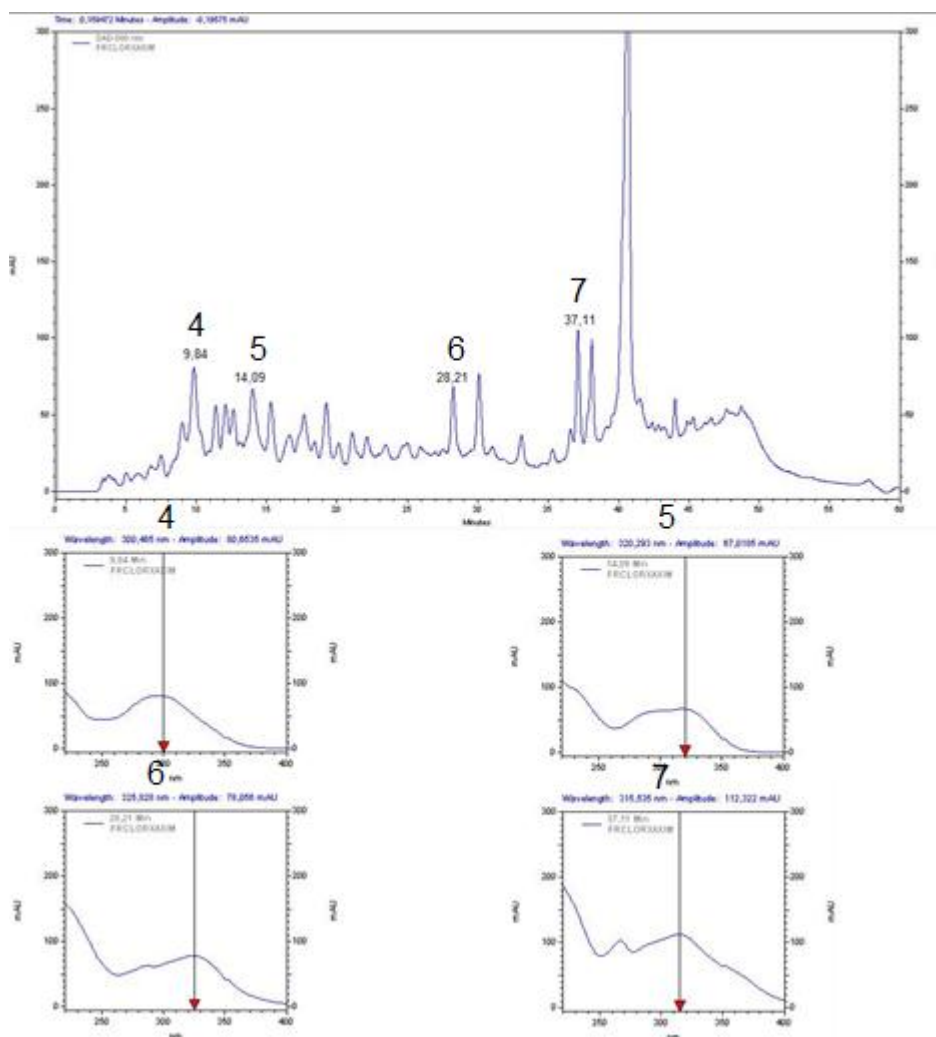
Tabela 7 - Tempo de retenção e lambda máximo do *fingerprint* da fração clorofórmio da espécie *Dicksonia sellowiana* em 260 e 300nm.

Pico	Tempo de Retenção (260nm)	Lambda Máximo (260nm)	Tempo de Retenção (300nm)	Lambda Máximo (300nm)
1	7,51 minutos	259 nm	-	-
2	30,15 minutos	265 nm	-	-
3	40,59 minutos	314 nm	-	-
4	-	-	9,84 minutos	300 nm
5	-	-	14,09 minutos	330 nm
6	-	-	28,21 minutos	323 nm
7	-	- </tr		

Figura 24 - Perfil cromatográfico da Fração Clorofórmio da espécie *Dicksonia sellowiana* em 260 e 300nm.



300nm



Conforme pode ser visualizado nas figuras anteriores, essa fração apresentou diversas substâncias majoritárias. Analisando os espectros pelo tempo de retenção e lambda máximo da fração clorofórmio, provavelmente o espectro 1 seja um derivado do ácido protocatecuico que está presente no extrato bruto em menor concentração. O composto do espectro 2 é majoritário no extrato bruto analisando tempo de retenção e banda máxima. Essa fração apresentou diversos compostos com duas bandas, sendo a primeira acima de 300 nm, sendo um indicativo de flavonóides.

A figura 25 representa o cromatograma da fração acetato de etila, essa fração provavelmente apresentou água na amostra a partir de 35 minutos, pois ela não manteve uma linearidade ou é preciso rever o método de análise para essa fração. Neste trabalho não foi proposto um novo método para análise, pois o objetivo era avaliar o extrato bruto e frações a partir do mesmo método de análise.

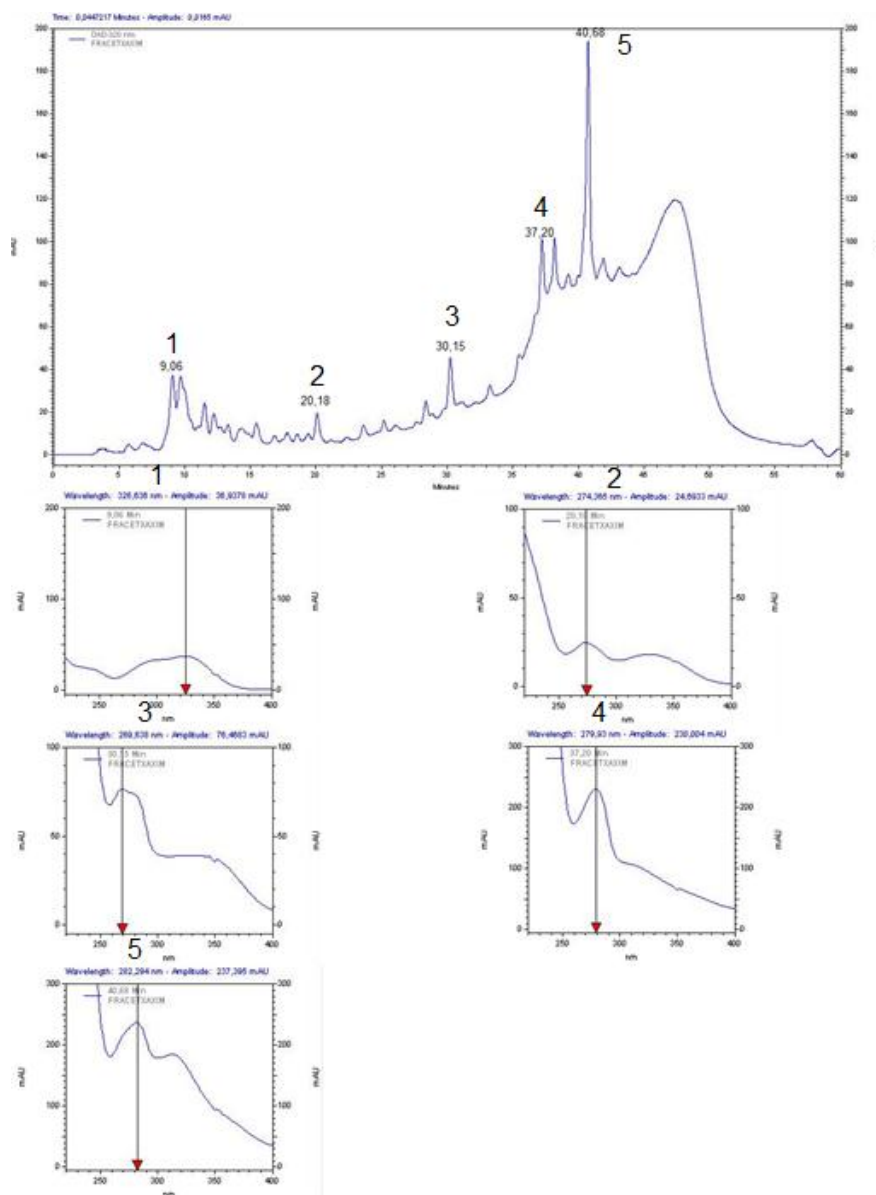
Abaixo segue a tabela 8 com tempo de retenção e lambda máximo da fração acetato de etila da espécie *Dicksonia sellowiana*.

Tabela 8 - Tempo de retenção e lambda máximo do fingerprint da fração acetato de etila da espécie *Dicksonia sellowiana*.

Pico	Tempo de Retenção	Lambda Máximo
1	9,06 minutos	325 nm
2	20,18 minutos	274 nm
3	30,15 minutos	268 nm
4	37,20 minutos	279 nm
5	40,68 minutos	283 nm

A fração acetato de etila apresentou bandas máxima entre 268 a 325 nm, conforme pode ser visualizado na tabela 8. Nenhuma das substâncias majoritárias dessa fração se encontra no cromatograma do extrato bruto de *Dicksonia sellowiana*, é necessário revisar a metodologia para está fração, para obter um *fingerprint* com uma linha base mais linear. O cromatograma da fração acetato de etila é visualizado na figura 25.

Figura 25 - Perfil cromatográfico da fração acetato de etila da espécie *Dicksonia sellowiana*.

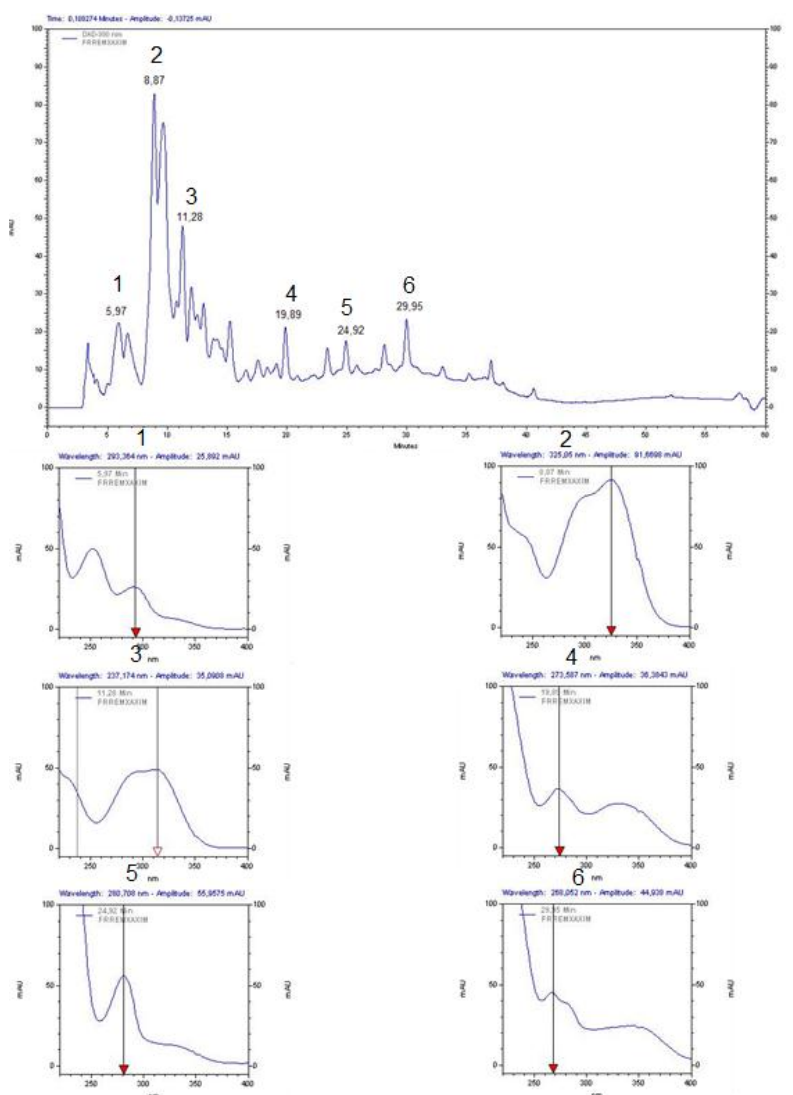


A figura 26 correspondente a fração remanescente apresentou bandas de absorção máxima entre 256 a 327 nm conforme pode ser observado na tabela 9. Provavelmente o espectro 1 seja correspondente ao o espectro 1 do extrato bruto (figura 22, espectro 1), com um pequeno desvio no tempo de retenção. Essa fração apresentou 6 compostos majoritários, com uma linearidade no tempo de corrida.

Tabela 9 - Tempo de retenção e lambda máximo do fingerprint da fração remanescente da espécie *Dicksonia sellowiana*.

Pico	Tempo de Retenção	Lambda Máximo
1	5,97 minutos	256 nm
2	8,87 minutos	327 nm
3	11,28 minutos	314 nm
4	19,89 minutos	272 nm
5	24,92 minutos	280 nm
6	29,95 minutos	268 nm

Figura 26 - Perfil cromatográfico da fração remanescente da espécie *Dicksonia sellowiana*.



Diante dos resultados obtidos pelo perfil cromatográfico do extrato bruto e frações conclui-se que o cromatogramas demonstraram diversas

substâncias ainda não isoladas de interesse que são majoritárias no extrato. O isolamento dessas substâncias juntamente com o cromatograma do extrato é importante para o controle de qualidade do extrato utilizando as substâncias majoritárias como marcadores de qualidade do extrato.

5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.7.1 Ensaio pelo Método da Redução do Complexo do Fosfomolibdênio

Este ensaio fundamenta-se na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) que na presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, ocorre a formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V), em pH ácido, determinado espectrofotometricamente, a 695nm.

A atividade antioxidante das amostras (frações hexano, clorofórmio, acetato de etila, remanescente e extrato bruto) e dos isolados (ácido protocatecuíco e ácido gálico) para este estudo foi calculada em relação à vitamina C e à rutina, atividades consideradas 100% nesse modelo como atividade antioxidante. Os resultados estão demonstrados na tabela abaixo.

Tabela 10 - Atividade Antioxidante pela Redução do Complexo do Fosfomolibdênio

Amostra	Atividade Antioxidante em relação à rutina (%)	Atividade Antioxidante em relação à vitamina C (%)
Fração Hexano	32,54	9,46
Fração Clorofórmio	45,56	13,24
Fração Acetato de Etila	70,12	20,38
Fração Remanescente	43,20	12,55
Extrato Bruto	70,71	20,55
Isolado V1 (ácido protocatecuíco)	58,77	17,68
Isolado V2 (ácido gálico)	158,21	47,60
Rutina	100	34,15
Vitamina C	292,82	100

A partir dos dados obtidos foi possível concluir que todas as amostras testadas, apresentaram atividade antioxidante por redução do complexo fosfomolibdênio. Considerando a vitamina C e a rutina como padrões que já possuem diversos estudos sobre sua atividade antioxidante,

o extrato bruto de *Dicksonia sellowiana* e a fração acetato de etila são os que apresentaram maior atividade antioxidante, em torno de 70%, frente ao padrão de referência rutina, e quando comparadas com a vitamina C apresentaram um valor em torno de 20% de atividade antioxidante, sendo que a vitamina C é considerada 100% de atividade antioxidante. Este resultado já era esperado devido a estas amostras possuírem uma maior concentração de compostos fenólicos.

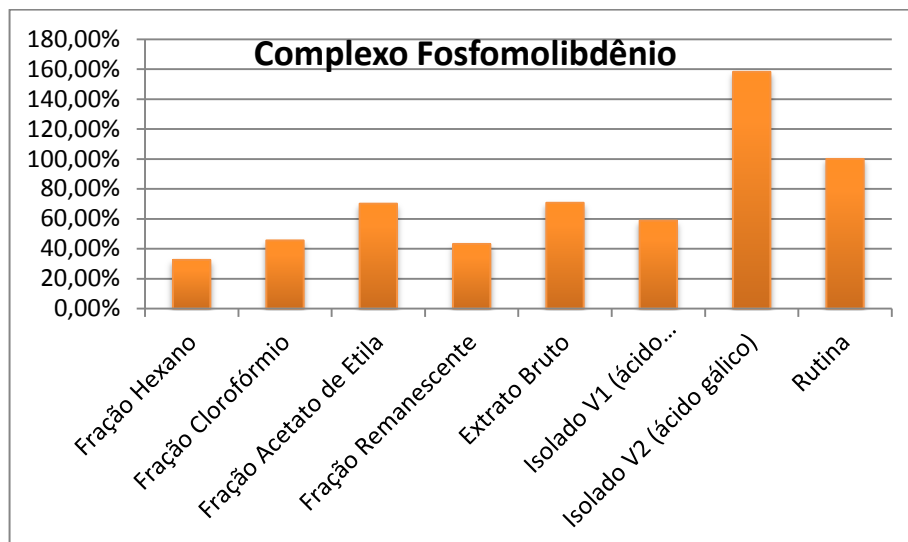
As frações clorofórmio e remanescente apresentaram uma atividade antioxidante, em torno de 45%, frente ao padrão rutina, e a fração hexano uma atividade antioxidante, de 32,54% frente ao padrão rutina e menos que 10% frente a vitamina C, resultado já esperado devido a presença de compostos apolares nessa fração. Assim, conclui-se que o extrato bruto de *Dicksonia sellowiana* e a fração acetato de etila apresentaram uma boa atividade antioxidante pelo método de redução do fosfomolibdênio, porém em relação a fração clorofórmio que era esperada uma atividade antioxidante maior, por possuir maior concentração de polifenóis frente ao extrato bruto, resultado obtido pelo método de Folin-Ciocalteu (item 4.4), essa fração não obteve resultado muito significativo nesse método.

Entre as substâncias isoladas, o ácido gálico (158,21%) foi o que apresentou melhor resultado frente ao padrão rutina (100%), também apresentando maior atividade comparando com o ácido protocatecuíco (58,77%). Essa atividade antioxidante pode ser devido ao ácido gálico possuir uma hidroxila a mais. Das amostras testadas frente aos padrões, o isolado ácido gálico foi o que apresentou o melhor resultado nesse método.

Os resultados alcançados frente ao padrão Rutina podem ser visualizados no gráfico 2.

Gráfico 2 - Porcentagem do Extrato Bruto e Frações Frente ao Padrão Rutina de Inibição do Complexo do Fosfomolibdênio

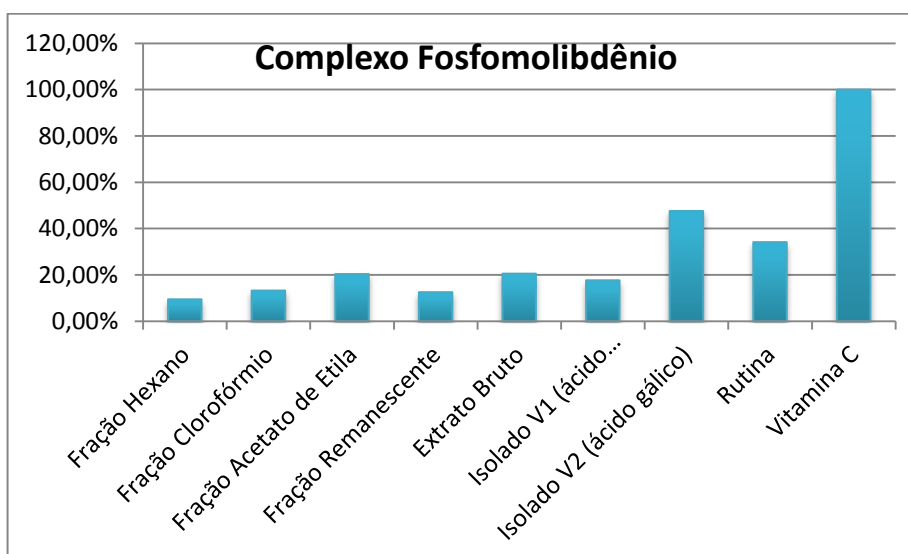
Eixo horizontal - eixo das abcissas - valores da variável independente. Eixo de x
Eixo vertical - eixo das ordenadas - valores da variável dependente. Eixo de y



Os resultados alcançados frente ao padrão vitamina C podem ser visualizados no gráfico 3:

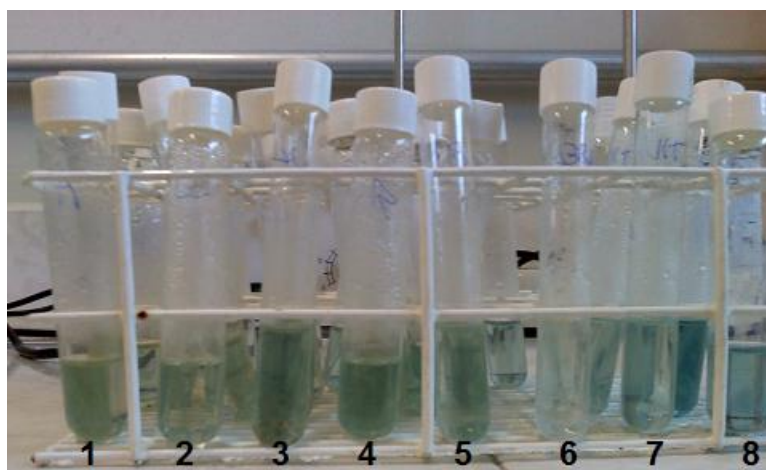
Gráfico 3 - Porcentagem do Extrato Bruto e Frações Frente ao Padrão Vitamina C de Inibição do Complexo do Fosfomolibdênio

Eixo horizontal - eixo das abcissas - valores da variável independente. Eixo de x
Eixo vertical - eixo das ordenadas - valores da variável dependente. Eixo de y



A Figura 27 apresenta a visualização da reação de complexação com o fosfomolibdênio em triplicata, demonstrando a coloração esverdeada resultante da reação entre fosfato/molibdênio (V).

Figura 27 - Reação de Complexação do Fosfomolibdênio



Fonte: O autor.

Nota: [1] = Fração Hexano [2] = Fração Clorofórmio [3] = Fração Acetato de Etila [4] = Fração Remanescente [5] = Extrato Bruto [6] = Branco [7] = Vitamina C [8] = Rutina

5.7.2 Potencial Antioxidante por Cromatografia por Camada Delgada

O ensaio qualitativo permite a visualização de substâncias com potencial antioxidante e o resultado foi demonstrado na figura 28.

Neste método todas as amostras foram testadas pelo método qualitativo de redução do radical DPPH.

Figura 28 - Cromatografia em Camada Delgada com Revelador DPPH



Nota: [1] = Rutina [2] = Vitamina C [3] = Fração Hexano [4] = Fração Clorofórmio [5] = Fração Acetato de Etila [6] = Fração Remanescente [7] = Extrato Bruto
DPPH= (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

Observando a foto é possível verificar que apenas a fração hexano não teve forte reação ao revelador DPPH, pois não foi visualizada a coloração amarela indicativa de reação positiva. Essa fração possui apenas três pequenas manchas, mas de coloração fraca. Essa fração não seria de interesse para quantificação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH, porém como essa fração apresentou resultado antioxidante mesmo baixo pela redução do complexo fosfomolibdênio, será testada no teste de redução do radical DPPH por possuir bastante material.

As outras frações (clorofórmio, acetato de etila e remanescente) reagiram com o DPPH e obtiveram a coloração amarela que é indicativa de reação positiva, revelando um potencial ação antioxidante. Neste método todas as amostras também foram testadas pelo método quantitativo de redução do radical DPPH.

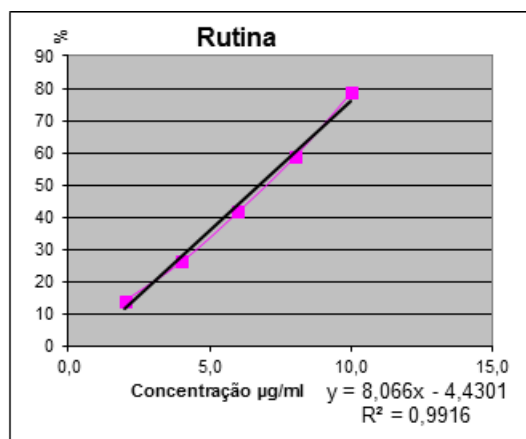
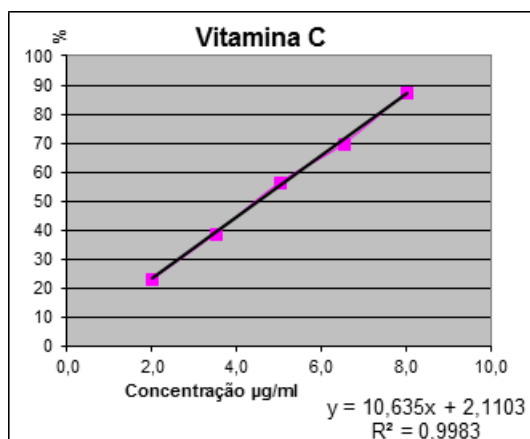
5.7.3 Ensaio pela Redução do Radical DPPH

Esse método fundamenta-se na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), um radical livre e estável devido a presença de um elétron sobressalente ao longo da molécula, pois este elétron não dimeriza, o que normalmente ocorre com os demais radicais livres. Esta solução apresenta uma coloração violeta intensa, e quando em contato com uma substância antioxidante (doadora de hidrogênio) o radical passa para sua forma reduzida, passando da coloração violeta para amarela, produzindo um decréscimo da absorbância a 518 nm.

A partir das amostras testadas (hexano, clorofórmio, acetato de etila, remanescente, extrato bruto, ácido protocatecuíco e ácido gálico) foi calculada a porcentagem de redução do radical DPPH e por regressão linear foi calculada o IC₅₀ (concentração de cada amostra que reduz 50% da concentração inicial de DPPH). Estas amostras foram comparadas com os padrões rutina e vitamina C.

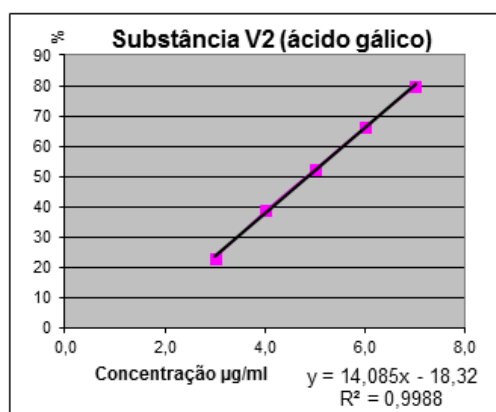
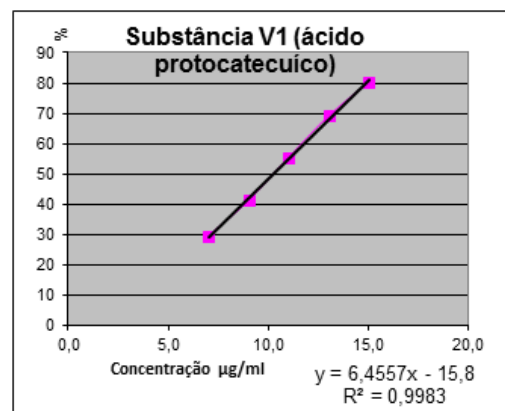
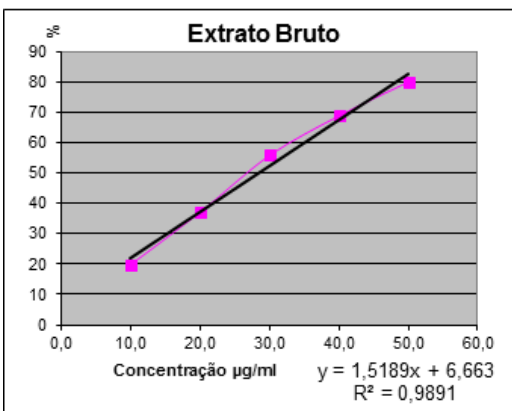
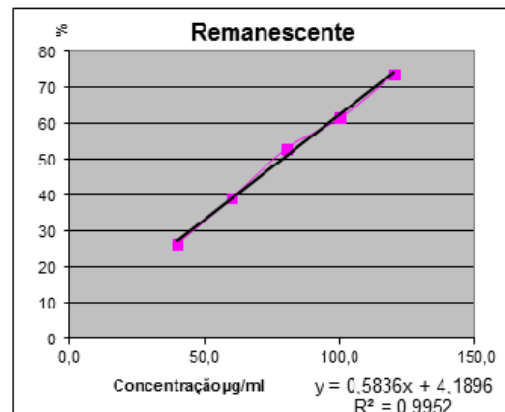
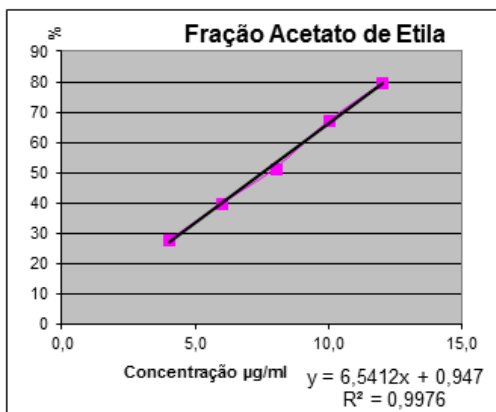
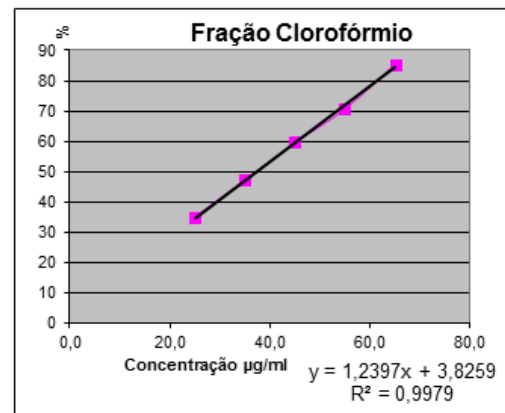
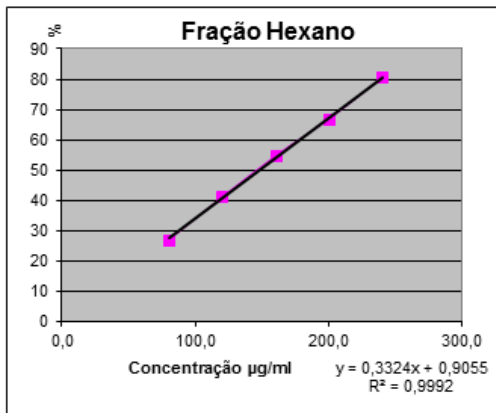
Os gráficos de 4 e 5, apresentam os 5 pontos das concentrações utilizadas para cada amostra com sua respectiva porcentagem de atividade antioxidante do Ensaio pela Redução do Radical DPPH, através dos pontos foi adicionado a linha de tendência e a equação de cada gráfico foi proposta para o cálculo do IC 50.

Gráfico 4 - Curvas dos Padrões Vitamina C e Rutina pela Redução do DPPH



Fonte: O autor (2011)

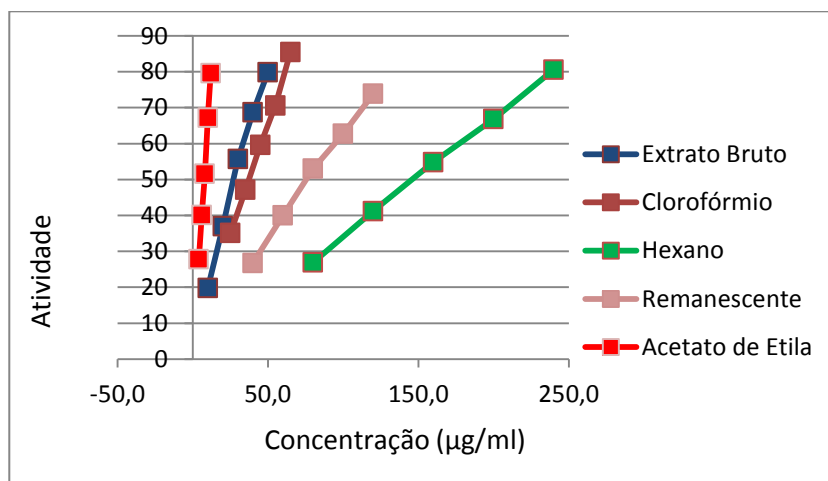
Gráfico 5 - Curvas do Extrato Bruto, das Frações: Hexano, Clorofórmio, Acetato de Etila e Remanescente e Substâncias Isoladas pela Redução do DPPH



Fonte: O autor (2011)

O gráfico 6, relaciona todas as curvas do extrato bruto e frações para uma melhor visualização entre a atividade antioxidante e a concentração das amostras.

Gráfico 6 - Atividade sequestradora de radicais livres medidos pelo teste do DPPH.

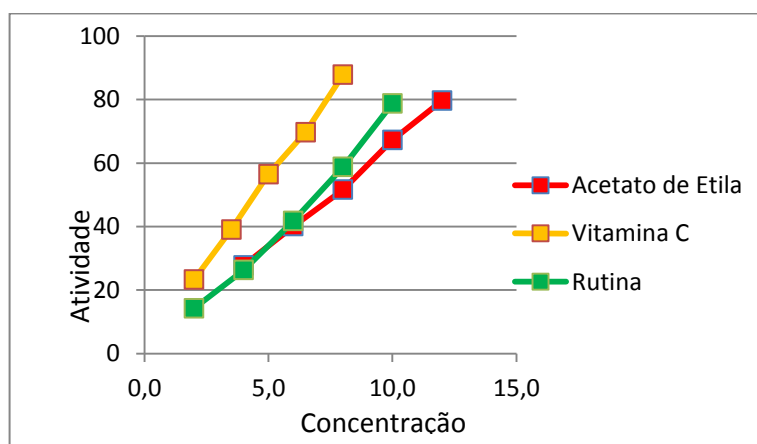


Fonte: O autor (2011)

Nota: Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão (n = 3).

O gráfico 7, relaciona a fração acetato de etila e os padrões vitamina C e Rutina. Esta fração foi a que obteve melhores resultados frente aos padrões estudados.

Gráfico 7 - Atividade sequestradora de radicais livres medidos pelo teste do DPPH.



Fonte: O autor (2011).

Nota: Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão (n = 3).

Os resultados de IC50 estão representados na tabela 11, e correspondem às médias de três repetições \pm desvio padrão. Para verificação da diferença estatística entre as amostras aplicou-se análise de variância - ANOVA e para localização das diferenças o teste de *Tukey* ($p < 0,05$).

Tabela 11 - Resultados de IC50 e do Teste de Tukey para Redução do DPPH

Amostra	IC50 (μg) \pm DP	Classificação do Teste de Tukey
Vitamina C	4.4696 \pm 0,029501	a1
Substância V2 (ácido gálico)	4,850367 \pm 0,003412	a1
Rutina	5.6510 \pm 0,158521	a1
Fração Acetato de Etila	7.3290 \pm 0,215144	a1
Substância V1 (ácido protocatecuíco)	10,1925 \pm 0,009133	a2
Extrato Bruto	28.5223 \pm 0,415962	a3
Fração Clorofórmio	37.2450 \pm 0,273183	a4
Fração Remanescente	78.5016 \pm 0,661564	a5
Fração Hexano	147,7137 \pm 0,378965	a6

Nota: a1= estatisticamente equivalentes, IC50= concentração inibitória de 50%, DP= desvio padrão.

Através dos resultados obtidos e da análise estatística, verificou-se que a fração acetato de etila tem atividade antioxidante igual aos padrões vitamina C e rutina, pois não há diferença estatística significativa entre as três amostras. Entre as amostras testadas da espécie *Dicksonia Sellowiana* a fração acetato de etila foi a que apresentou menor valor de IC50 (7.3290 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Pela análise estatística verificou-se que ela foi considerada a fração mais ativa.

Entre as substâncias isoladas a que apresentou melhor resultado neste modelo foi o ácido gálico (substância V2), apresentando um IC 50 (4,850367 $\mu\text{g}/\text{ml}$) muito próximo ao padrão vitamina C e superior ao padrão rutina. Comparando com o ácido protocatecuíco (substância V1) o ácido gálico também apresentou o melhor resultado, porém nos modelos de toxicidade testados neste estudo foi ácido gálico apresentou toxicidade diferentemente do ácido protocatecuíco que não apresentou nenhum resultado positivo.

Neste modelo, a fração acetato de etila teve atividade antioxidante igual aos padrões, enquanto o extrato bruto e fração clorofórmio apresentaram IC50 superiores, porém com um IC50 de baixa concentração, indicando que essas frações são menos ativas do que os padrões analisados, pois é preciso uma quantidade maior destas amostras para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH. A fração remanescente e a fração hexano, possuem um IC50 muito alto, e são consideradas ativas mas precisam de muita quantidade de material para ter ação antioxidante neste modelo.

5.7.4 Ensaio Antioxidante pelo Método do Ácido Tiobarbitúrico- Espécies Reativas (TBARS)

Este ensaio mede o malonaldeído (MDA) formado a partir da oxidação de ácidos graxos insaturados. A formação de MDA, a partir de ácidos graxos com menos de três duplas ligações (p.e. o ácido linoleico) ocorre através da oxidação secundária de compostos carbonílicos (p.e. non-2-enal) (FERNÁNDEZ I. 1997; GUIMARÃES ET AL. 2010). O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar um pigmento rosa (TBARS), que é medido espectrofotometricamente a 532 nm (Ng et al. 2000; Guimarães et al. 2010).

A atividade antioxidante foi determinada pelo Índice Antioxidante (IA), obtido em porcentagem, segundo a Equação: $IA (\%) = 1 - (Abs_{amostra}/Abs_{controle}) \times 100$, sendo, $Abs_{amostra}$ a absorbância da amostra e $Abs_{controle}$ a absorbância do controle totalmente oxidado. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Para comparações entre as médias dos índices de atividade (IA%), utilizou-se o teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $P < 0,05$. Os resultados estão expressos na tabela 12.

Tabela 12 – Resultados da atividade antioxidante pelo método TBARS nas 3 concentrações

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (ppm)								
	1000			500			100		
	IA(%)	DP	Tukey	IA(%)	DP	Tukey	IA(%)	DP	Tukey
BHT	90,75	1,475	a17	80,66	0,729	a16	67,40	1,173	a13 a14
ÁCIDO ASCÓRBICO	72,38	0,743	a15	59,03	1,080	a12 a13	45,36	1,988	a6 a7
EXTRATO BRUTO	67,88	0,365	a13 a 14	60,34	1,114	a11 a12	51,09	1,931	a8
FRAÇÃO HEXANO	29,07	1,603	a3	20,85	2,252	a2	5,94	1,826	a1
FRAÇÃO CLOROFÓRMIO	44,90	2,158	a6	35,92	0,697	a4 a5	29,83	0,950	a3
FRAÇÃO AC. ETILA	70,48	0,898	a14 a15	57,98	1,091	a10	44,88	1,352	a6
FRAÇÃO REMANESCENTE	51,31	1,091	a8	34,17	1,148	a4	22,5	1,071	a2
Substância V1	63,03	0,782	a11 a12	56,39	0,751	a9 a10	52,63	1,638	a8 a9
Substância V2	59,77	1,355	a10 a11	49,50	0,783	a7 a8	38,47	0,574	a5

NOTAS: (1) IA (%) = Índice Antioxidante, média dos três experimentos; DP = Desvio Padrão.

(2) Médias seguidas com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste de Tukey, $P < 0,05$).

Relacionando com os outros testes (fosfomolibdênio e DPPH), o extrato bruto apresentou em outros ensaios valores significativos, mas não tão próximos a fração acetato de etila como neste método. Os valores do extrato bruto e fração acetato de etila são muito promissores neste ensaio, considerando ser um teste onde ocorre peroxidação lipídica consequência do stress oxidativo e está associada a perda progressiva do potencial da membrana aumentando a permeabilidade da membrana e assim conduzindo a morte celular.

Entre as substâncias isoladas o ácido protocatecuico (substância V1) apresentou melhor resultado nesse método diferentemente das outras metodologias onde o ácido gálico (substância V2) apresentou melhores resultados. Esse resultado pode sugerir que o ácido protocatecuico apresenta melhor atividade antioxidante em meio lipofílico.

Para uma melhor visualização comparativa dos resultados obtidos nesse método, os resultados foram expressos em gráficos nas respectivas concentrações de 1000, 500 e 100 ppm demonstrados nos gráficos 8, 9 e 10.

Gráfico 8 - Porcentagem do Extrato Bruto e Frações Frente aos Padrões BHT e Vitamina C pelo Método TBARS na Concentração de 1000 ppm.

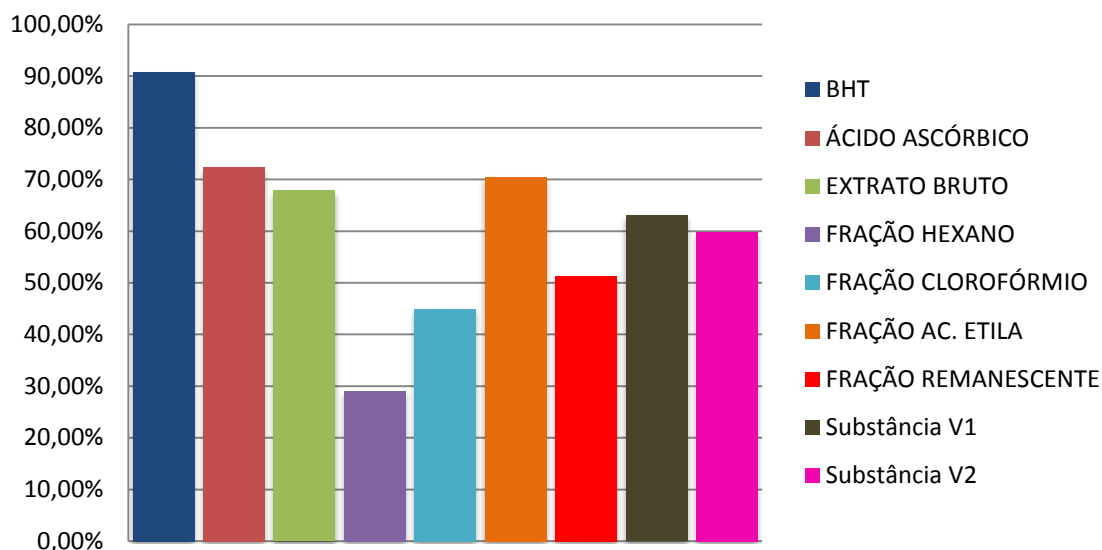


Gráfico 9 - Porcentagem do Extrato Bruto e Frações Frente aos Padrões BHT e Vitamina C pelo Método TBARS na Concentração de 500 ppm.

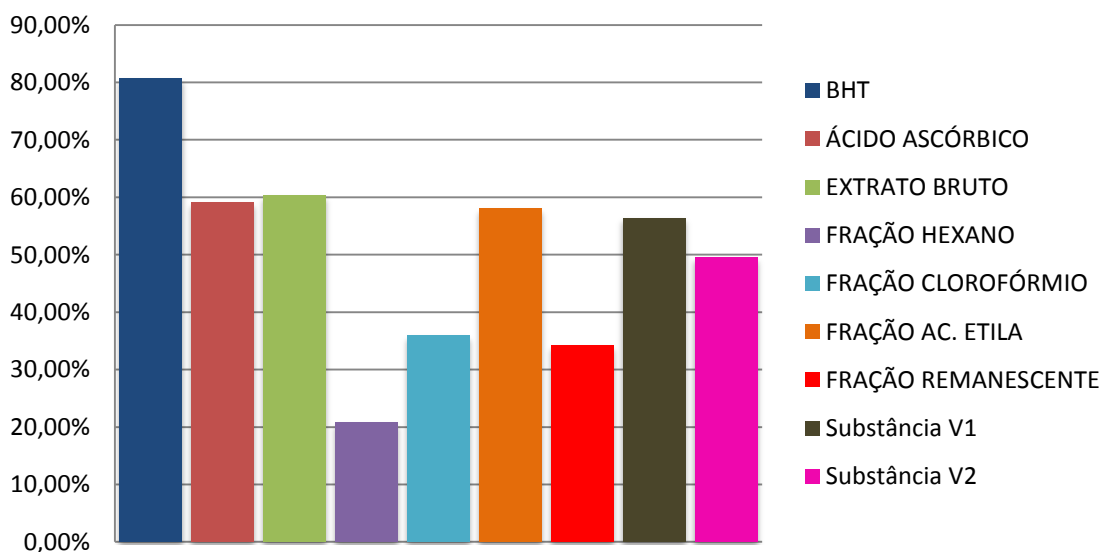
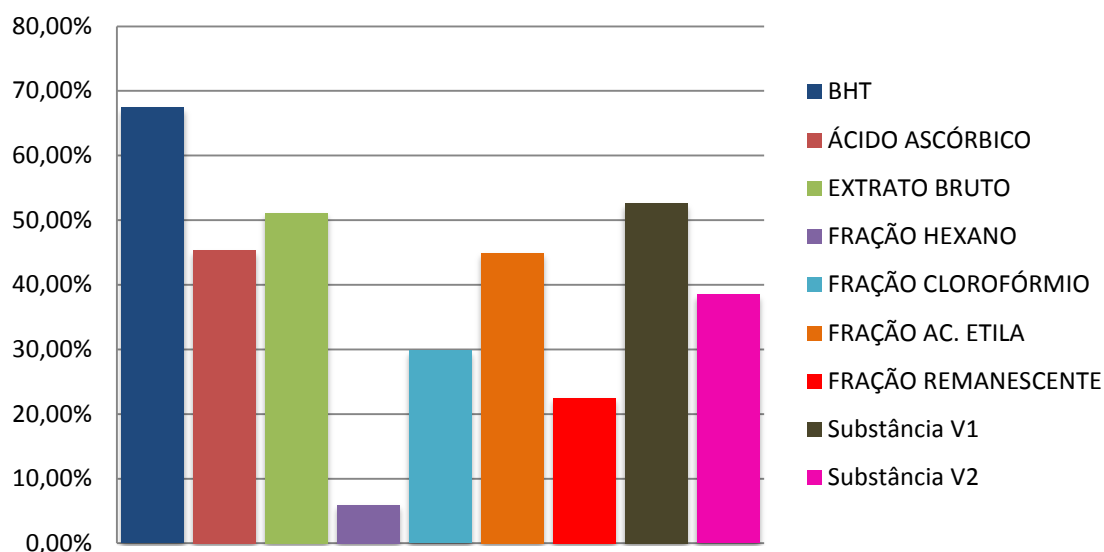


Gráfico 10 - Porcentagem do Extrato Bruto e Frações Frente aos Padrões BHT e Vitamina C pelo Método TBARS na Concentração de 100 ppm.



A formação de TBARS em homogeneização de gema de ovo é uma consequência da peroxidação lipídica. Um órgão altamente sensível a danos oxidativos por ser rico em material lipídico é o cérebro por consumir uma quantidade significativa de oxigênio, ser relativamente deficiente em defesas antioxidantes, rico em substratos oxidáveis como ácidos graxos poli-insaturados e catecolaminas (CHONG et al, 2005). Considerando que um dos principais ácidos graxos presentes no cérebro é o ácido linoleico e este estar presente também na gema de ovo é possível relacionar estes resultados como promissores na atividade antioxidante que ocorre no cérebro.

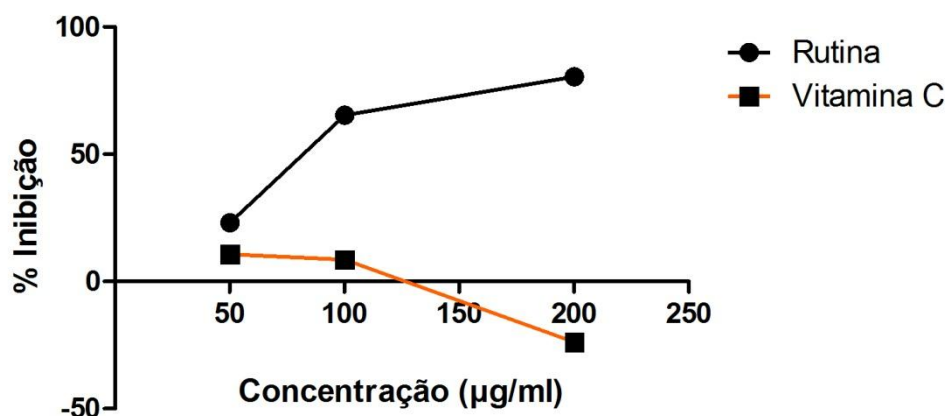
5.7.5 Inibição da oxidação pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico

Para este teste foram escolhidas três concentrações (50 μ g, 100 μ g e 200 μ g). Nestas concentrações foram testados os padrões Rutina e Vitamina C, e as frações e o extrato bruto da espécie *Dicksonia Sellowiana*. Os padrões escolhidos estão normalmente presentes em frutas e vegetais e já possuem conhecida atividade antioxidante no meio científico.

Os resultados mostraram, como é possível verificar no gráfico 11, que a Rutina, apresentou maior eficiência frente à Vitamina C. A rutina não apresentou linearidade em suas curvas devido à existência de várias

etapas na oxidação (iniciação, propagação e fase terminal) e também devido as suas particularidades antioxidantes (SHAHIDI, F.; NACZK, M. 1995).

Gráfico 11 - Curva da atividade antioxidante dos padrões Rutina e Vitamina C determinadas pelo Sistema β -caroteno/ácido linoleico



Fonte: O autor (2011)

A Vitamina C é amplamente conhecida por sua atividade antioxidante, sendo utilizado em alimentos, cosméticos e doenças degenerativas. Neste modelo de Inibição da Oxidação pelo Sistema β -caroteno/ácido Linoleico, a Vitamina C, apresentou atividade pró-oxidante representado na concentração de 200µg. Com o aumento da concentração houve o aumento da atividade pró-oxidante, conforme gráfico 11, esta atividade está relacionada ao fato de a Vitamina C após doar os dois hidrogênios redutores, fica passível de receber elétrons, devido ao radical ascorbila formado, que é um agente oxidante. A atividade pró-oxidante da Vitamina C nesse modelo já tinha sido relatada por DUARTE ALMEIDA *et al.* 2006.

A partir dos dados obtidos dos padrões, avaliou-se a atividade antioxidante do extrato e frações de *Dicksonia Sellowiana*. Os resultados encontram-se na tabela 13:

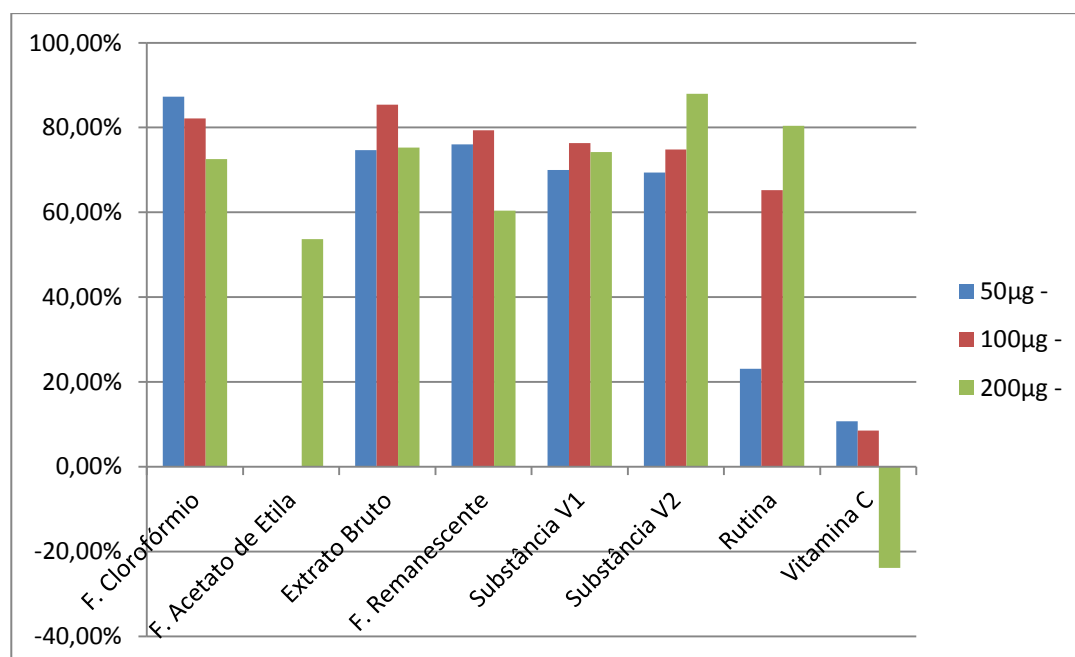
Tabela 13 - Atividade antioxidante determinada pelo Sistema β -caroteno/ácido linoleico do extrato, frações e substâncias isoladas da espécie *Dicksonia sellowiana*.

Amostras	Concentrações		
	50 μ g	100 μ g	200 μ g
F. Hexano	-	-	-
F. Clorofórmio	87,31%	82,11%	72,54%
F. Acetato de Etila	-	-	53,66%
Extrato Bruto	74,70%	85,36%	75,31%
F. Remanescente	76,05%	79,38%	60,42%
Substância V1	70,01%	76,33%	74,18%
Substância V2	69,38%	74,81%	87,98
Rutina	23,12%	65,26%	80,42%
Vitamina C	10,74%	8,56%	-23,86%

Fonte: O autor (2011)

O gráfico 12 é possível visualizar o decréscimo ou o aumento da atividade neste modelo por meio de gráfico.

Gráfico 12 - Inibição da Oxidação pelo Sistema β -caroteno/ácido linoleico nas Diferentes Concentrações



Fonte: O autor (2011).

Como nos padrões a atividade antioxidante do extrato e frações foi avaliada com três concentrações, a fração que obteve melhor resultado foi a fração clorofórmio, esse resultado pode estar relacionado pela melhor interação dos compostos desta fração com o meio do sistema, frações apolares contêm mais compostos lipofílicos e o sistema β -caroteno/ácido linoleico é um sistema lipofílicos. Este resultado foi realizado três vezes em triplicata e obteve os mesmo resultados.

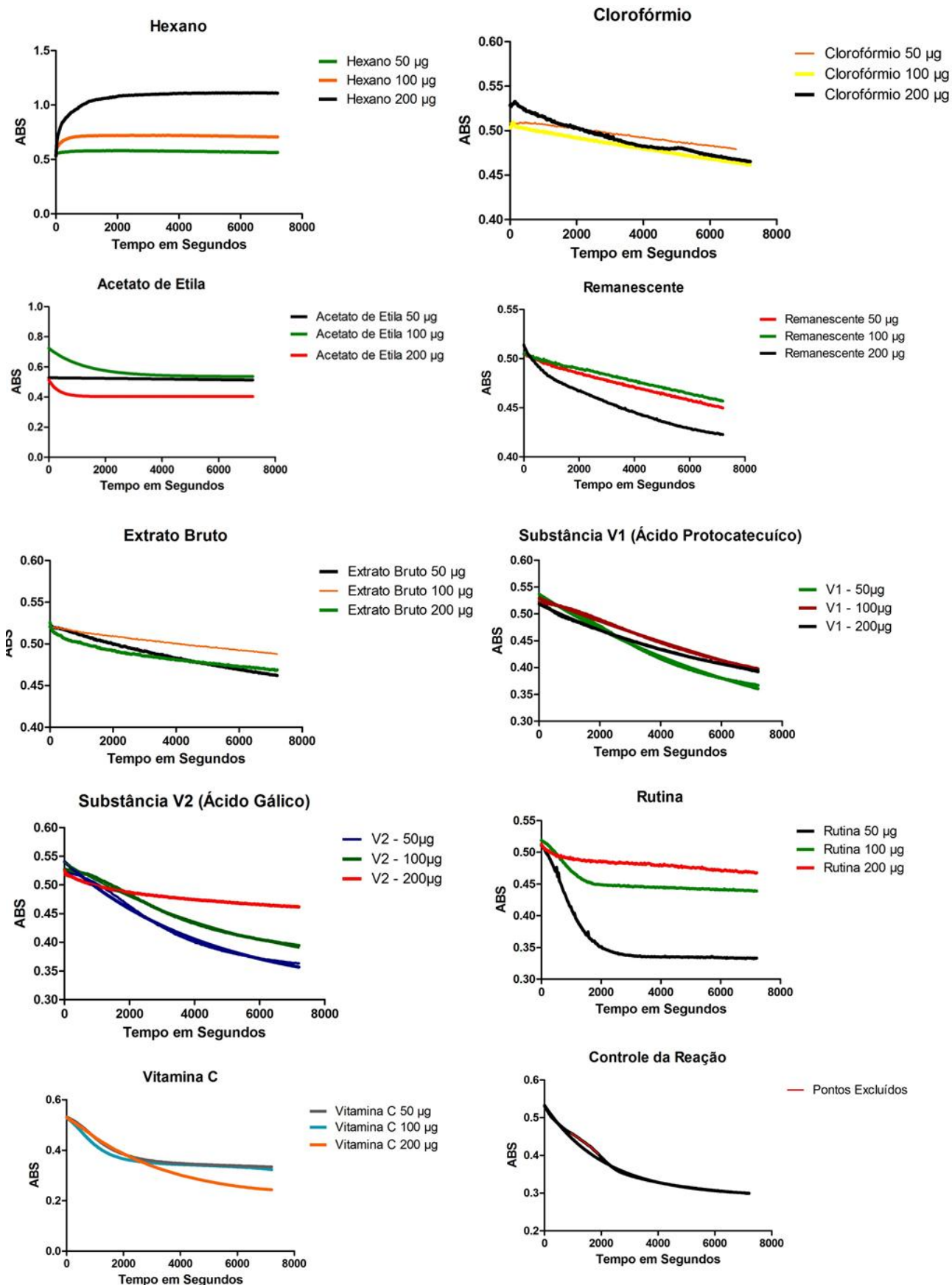
Seguido da fração clorofórmio, o extrato bruto foi a que obteve melhores resultados nas concentrações de 100 e 200 μ g, na concentração de 200 μ g essa obteve um decréscimo da atividade antioxidante, provavelmente relacionado com a formação do radical ascobila citado anteriormente para a vitamina C.

Entre as substâncias isoladas, a substância V1(ácido protocatecuico) apresentou melhores resultados nas concentrações de 50 e 100 μ g em comparação com a substância V2 (ácido gálico) reforçando o que foi dito no item 5.5.4, onde acredita que o ácido protocatecuico tem melhores resultados na atividade antioxidante em meios lipofílicos.

Neste modelo a fração hexano nas 3 concentrações e a fração acetato de etila na concentração de 50 e 100 μ g não apresentaram resultados compatíveis no modelo testado, apesar de na triplicata haverem resultados próximos neste modelo essas frações nessas concentrações supostamente apresentaram uma atividade redutora.

As curvas da atividade antioxidante por esse modelo estão representadas no gráfico 13, abaixo apresentados. Para a representação gráfica dos resultados foi utilizado o programa Graph Prism 5. Como as curvas não são lineares o próprio programa faz o ajuste de curvas, calculando o tempo de meia vida e o coeficiente de linearidade da reação.

Gráfico 13 - Curva do Extrato Bruto, frações: hexano, clorofórmio, acetato de atila e remanescente, Substâncias Isoladas e Padrões Vitamina C e Rutina pelo Sistema β -caroteno/ácido linoleico



Todas as amostras foram realizadas em triplicata, e na análise estatística os pontos que estavam fora da linearidade foram eliminados. Nenhuma amostra teve mais de dez pontos eliminados, mantendo um total acima de 231 pontos, dando maior confiabilidade no resultado.

Abaixo seguem as tabelas com os valores de HalfLife (Tempo de Meia Vida) e de R^2 proporção da variabilidade em Y que é explicada por X, nos três valores analisados das diferentes amostras. O objetivo dessas tabelas é por meio do tempo de meia vida, avaliar a capacidade de formação de peróxidos que ocorre nos primeiros 60 minutos de reação e de verificar na segunda parte qual possui maior poder em evitar a formação de peróxidos que ocorre até os 120 minutos de reação.

Tabela 14 - Valores de HalfLife (tempo de meia vida) e de R^2 para a concentração de 50 μg

Amostra	HalfLife	R^2
F. Hexano	62,34 Min	0,9240
F. Clorofórmio	132,58 Min	0,9776
F. Ac. Etila	59,26 Min	0,9439
Extrato Bruto	101,08 Min	0,9995
F. Remanescente	232,01 Min	0,9990
Isolado V1	96,02 Min	0,9923
Isolado V2	52,67 Min	0,9909
Rutina	08,04 Min	0,9982
Vitamina C	12,14 Min	0,9956

Tabela 15 - Valores de HalfLife (tempo de meia vida) e de R2 para a concentração de 100µg

Amostra	HalfLife	R ²
F. Hexano	2,58 Min	0,9663
F. Clorofórmio	298,11 Min	0,9992
F. Ac. Etila	14,53 Min	0,9572
Extrato Bruto	142,29 Min	0,9979
F. Remanescente	107,23 Min	0,9987
Isolado V1	218,55 Min	0,9966
Isolado V2	72,05 Min	0,9934
Rutina	09,51 Min	0,9867
Vitamina C	14,09 Min	0,9986

Tabela 16 - Valores HalfLife (tempo de meia vida) e de R2 para a concentração de 200 µg

Amostra	HalfLife	R ²
F. Hexano	09,42 Min	0,9963
F. Clorofórmio	49,15 Min	0,9941
F. Ac. Etila	03,58 Min	0,9743
Extrato Bruto	54,33 Min	0,9971
F. Remanescente	71,36 Min	0,9992
Isolado V1	78,08 Min	0,9984
Isolado V2	33,11 Min	0,9924
Rutina	63,36 Min	0,9382
Vitamina C	36,59 Min	0,9999

Com o auxílio da curva das reações determinando o decaimento da absorbância a 470 nm (descoramento do β-caroteno) com o tempo de meia vida (tabelas 14 à 16) os quais forneceram dados adicionais sobre a atividade antioxidante. De acordo com os resultados obtidos, a atuação das frações, extrato bruto e padrões como antioxidantes foi mais eficiente na formação de peróxidos que ocorre na primeira parte de reação até 60 min.

O padrão rutina apresentou baixa atividade antioxidante na segunda etapa da curva de oxidação por possuir maior atividade contra a formação

de peróxidos. A fração hexano através da curva é possível verificar que ela teve uma reação diferente das outras amostras não apresentando o decaimento da curva e sim obteve uma reação contrária, por este motivo não foi analisado a atividade antioxidante desta amostra, juntamente com a fração acetato de etila que não obteve um valor inicial próximo nas 3 concentrações impossibilitando o resultado preciso nesse modelo.

5.7.6 Discussão da atividade antioxidante por diferentes métodos

A formação de radicais livres derivados do oxigênio é um processo constante, devido aos processos metabólicos que ocorrem no corpo humano. Além dos processos metabólicos que são fatores intrínsecos de oxidação no sistema humano existem fatores extrínsecos como alimentação, cigarro, bebidas alcoólicas entre outros que estão ligados ao processo de oxidação no corpo humano. Algumas doenças já têm sido relacionadas com o stress oxidativo, entre elas doenças cardiovasculares e neurodegenerativas.

O estudo de atividade antioxidante por diferentes mecanismos de ação (hidrofílicos e lipofílicos) é importante para saber o local em que o extrato testado possui ação. Um exemplo é na difusão simples quanto mais lipossolúvel for a substância maior a sua facilidade de difusão pela membrana. Nos modelos utilizados nesses estudo é possível verificar em qual modelo o extrato possui maior atividade, podendo relacionar no corpo humano onde ele será capaz de agir.

Nesse estudo os ensaios de redução do complexo do fosfomolibdênio e de redução do radical DPPH são métodos de atividade antioxidante em meio hidrofílico, enquanto os ensaios do método do ácido tiobarbitúrico - espécies reativas (TBARS) e da oxidação pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico são métodos de antioxidantes lipofílicos, agindo por mecanismos de ações diferentes dentro do organismo.

Em todos os ensaios realizados neste estudo, a fração que apresentou melhores resultados foi a acetato de etila, provavelmente pelo seu alto teor de substâncias fenólicas, conforme pode ser verificado na tabela 7. Entre as substâncias isoladas o ácido gálico apresentou melhores resultados nos modelos hidrofílicos (Fosfomolibdênio e DPPH)

provavelmente por possuir uma hidroxila a mais em seu anel aromático comparado com o ácido protocatecuico. Em contrapartida nos modelos lipofílicos (TBARS e sistema β -Caroteno/ácido linoleico) o ácido protocatecuico apresentou melhores resultados. Porém o ácido gálico é necessário realizar mais estudos de toxicidade dessa substância, pois nos modelos de toxicidade testados (*Artemia salina* e Atividade Hemolítica) nesse estudo essa substância apresentou resultados positivos.

Através dos resultados obtidos é possível verificar que o extrato e frações de *Dicksonia sellowiana* possui atividade antioxidante em ambos os meios (hidrofílicos e lipofílicos), resultado positivo que com mais estudos em ratos e humanos podem vir a se tornar um medicamento para a prevenção e/ou tratamento de doenças.

5.8 BIOENSAIO FRENTE AO MICROCRUSTÁCEO ARTEMIA SALINA

A utilização da *A. Salina* em estudos toxicológicos preliminares deve-se a simplicidade com que pode ser manuseado. A rapidez e o baixo custo favorecem a utilização em diversos estudos. Ensaio de letalidade são muito utilizados em análises preliminares de toxicidade geral podendo estimar a concentração média letal (CL50) (LUNA, J.S et al., 2005).

Segundo MEYER, B.N. et al. (1982), foi estabelecida uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, CL50, de extratos de plantas sobre microcrustáceos *Artemia Salina*, considerando que quando verificados valores acima de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e não havendo morte acima de 50%, estes, são considerados atóxicos. Diversos trabalhos vêm tentando correlacionar a toxicidade sobre *Artemia Salina* com atividades antifúngica, viruscida, antimicrobiana, tripanossomicida e parasiticida.

O extrato total e frações foram testados nas concentrações de 10, 100, 1000 μg . Em cada concentração foram colocadas 10 artemias e após 24 horas foi realizada a leitura. Todas as amostras foram realizadas em triplicata.

Para o cálculo da CL50, os resultados das amostras testadas (frações hexano, clorofórmio, acetato de etila, remanescente e extrato bruto) foram submetidos ao teste estatístico Probitos, e se encontram na tabela 17.

Tabela 17 - Mortalidade de *Artemia salina* e CL₅₀

Amostras	Mortalidade / Concentração			CL ₅₀ (µg/mL)
	10 (µg/mL)	100 (µg/mL)	1000 (µg/mL)	
Fração Hexano	2	2	1	>1000
Fração Clorofórmio	2	4	4	>1000
Fração Acetato de Etila	1	2	-	>1000
Fração Remanescente	1	-	-	>1000
Extrato Bruto	-	-	-	>1000
Substância Isolada V1	1	1	4	>1000
Substância Isolada V2	1	4	7	215,44

De acordo com os resultados da tabela 17, verificou-se que nenhuma das amostras do extrato se mostrou ativa frente ao micro crustáceo *Artemia salina*, pois todas apresentaram um resultado de CL₅₀ superior a 1000µg/mL, concentração máxima segundo MEYER, B. N. *et al.* (1982) para uma amostra ser considerada atóxica neste modelo.

Entre as substâncias isoladas a substância V2 apresentou toxicidade frente à *Artemia salina*, apresentando um valor de CL₅₀ de 215,44 µg/mL. Porém a concentração dessa substância no extrato e frações não interfere na toxicidade das amostras. Para essa substância é necessário mais estudos para verificar a sua toxicidade.

Todas as análises foram realizadas em triplicata e o controle com metanol não apresentou influência sobre os resultados, pois não houve mortalidade na presença do solvente controle, do mesmo modo que ocorreu com o controle com água salgada. Diante deste contexto, pode-se dizer que as frações e o extrato bruto da espécie *Dicksonia sellowiana*, não possuem toxicidade frente ao teste realizado.

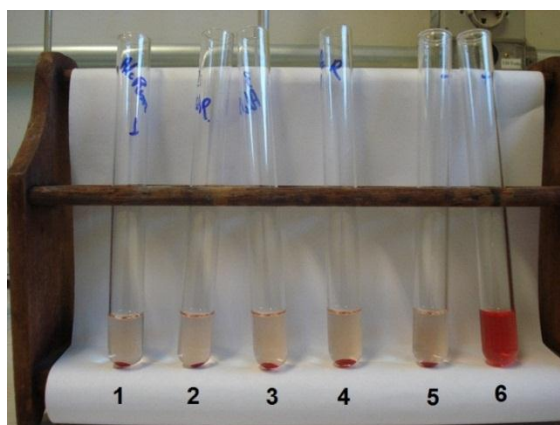
5.9 ATIVIDADE HEMOLITICA

A hemólise é caracterizada por ruptura do eritrócito com liberação de hemoglobina. A hemoglobina livre no plasma é prejudicial a saúde causando sérios danos em órgãos vitais tais como fígado, rins e coração, sendo necessário dessa maneira a observação da referida atividade (CARVALHO *et al.*, 2007). Nesse sentido na triagem de atividades

biológicas e toxicológicas de extratos vegetais, faz-se necessária a verificação da atividade hemolítica das espécies estudadas.

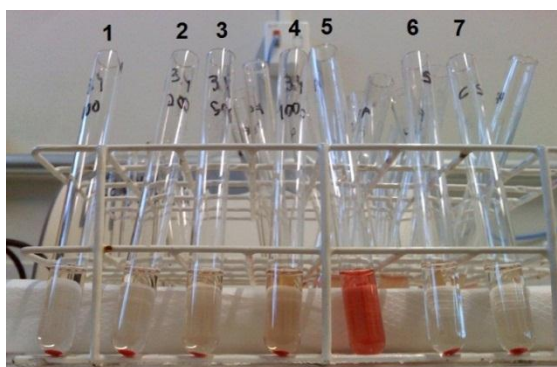
Para o ensaio de atividade hemolítica, foram testados as frações e o extrato bruto das frondes de xaxim. As figuras 29 a 31 demonstram as atividades hemolíticas realizadas neste estudo.

Figura 29 - Atividade Hemolitica do extrato bruto



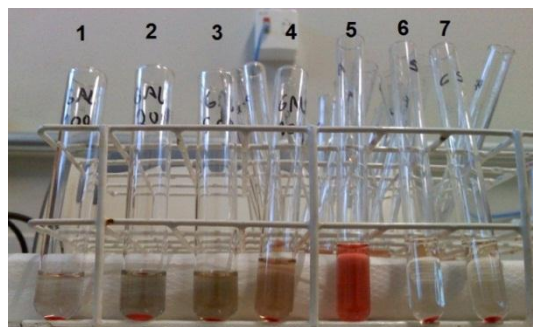
Nota: Tubo 1: 50 $\mu\text{g/mL}$, Tubo 2: 100 $\mu\text{g/mL}$, Tubo 3: 500 $\mu\text{g/mL}$, Tubo 4: 1000 $\mu\text{g/mL}$, Tubo 5: Controle Negativo, Tubo 6: Controle Positivo.

Figura 30 - Atividade Hemolitica do Ácido Protocatecuico (V1)



Nota: Tubo 1: 50 $\mu\text{g/mL}$, Tubo 2: 100 $\mu\text{g/mL}$, Tubo 3: 500 $\mu\text{g/mL}$, Tubo 4: 1000 $\mu\text{g/mL}$, Tubo 5: Controle Positivo, Tubo 6: Controle Negativo, Tubo 7: Controle de Solvente

Figura 31 - Atividade Hemolítica do ácido gálico (V2)



Nota: Tubo 1: 50 $\mu\text{g/mL}$, Tubo 2: 100 $\mu\text{g/mL}$, Tubo 3: 500 $\mu\text{g/mL}$, Tubo 4: 1000 $\mu\text{g/mL}$, Tubo 5: Controle Positivo, Tubo 6: Controle Negativo, Tubo 7: Controle de Solvente

As figuras acima demonstram o ensaio de atividade hemolítica do extrato bruto e substâncias isoladas (V1 e V2) que apresentaram resultado negativo nesse ensaio nas concentrações testadas. As frações também foram testadas e todas apresentaram resultados negativos nesse método.

Ensaio de toxicidade preliminar funciona como uma ótima ferramenta nos estudos com plantas medicinais e devem ser implementados, pois auxiliam na diminuição do uso de animais na experimentação o que vem sendo uma preocupação dos Comitês de ética em experimentação animal (BEDNARCZUK, V.O *et al*, 2010, p. 48)

Assim são necessários mais estudos para o uso do extrato e frações ou produtos isolados desta espécie como medicamentos para uso humano e animal. Esses resultados juntamente com o resultado de *Artemia salina* indicam que o extrato bruto de *Dicksonia sellowiana*, é um produto que não possui toxicidade nesses modelos. Para uma confirmação seria adequado a realização de estudos toxicológicos em camundongos, pensando na utilização desse extrato para o tratamento de alguma doença.

5.9.1 Atividade Hemolítica em Placas de Ágar-Sangue

O ensaio de atividade hemolítica em Ágar-sangue, foi realizado com o extrato bruto, frações e produtos isolados da espécie *Dicksonia Sellowiana*. O extrato bruto e frações apresentaram resultados negativos neste modelo, não ocorrendo à formação de halo. Para os isolados ácido protocatecuíco e ácido gálico, verificou-se que houve a formação de halo apenas para a substância ácido gálico, havendo uma atividade considerada tóxica, atividade já verificada no ensaio de *Artemia salina*.

As figuras a seguir representam o teste realizado em placas de Ágar Sangue do extrato bruto (figura 32), substâncias isoladas (figura 35 e 36) e controles positivos (figura 33) e negativos (figura 34) dessa metodologia, as figuras das frações (hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente) não foram anexadas, pois apresentaram resultados negativos iguais as demonstradas nas figuras 34 (controle negativo).

Figura 32 - Fração hemolítica em ágar-sangue do extrato bruto na concentração de 1000 µg.



Figura 33 - Controle positivo com saponina na concentração de 1000 µg.

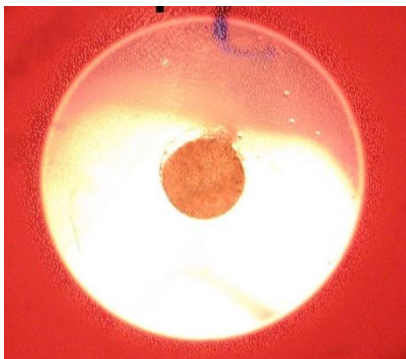


Figura 34 - Controle negativo do solvente metanol

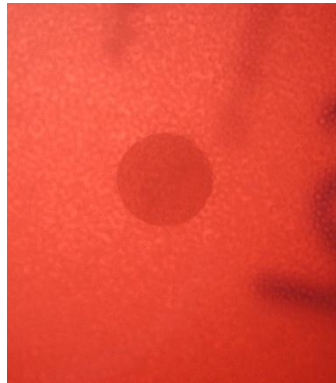
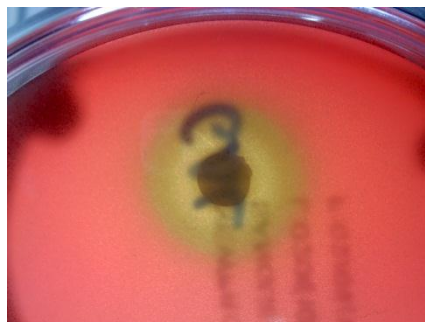


Figura 35 - Fração hemolítica em ágar-sangue do ácido protocatecuico na concentração de 1000 µg.



Figura 36 - Fração hemolítica em ágar-sangue do ácido gálico na concentração de 1000 µg.



Como pode ser visto nas imagens anteriores o extrato bruto e o ácido protocatecuico (V1) apresentaram resultados negativos iguais ao controle negativo demonstrado na figura 30. As frações como ditas anteriormente também não apresentaram atividade hemolítica nesse ensaio.

O ácido gálico (V2) apresentou formação de halo de hemólise igual o controle positivo demonstrado na figura 29, com 1,1cm de diâmetro. Como o controle positivo apresentou um halo de 2,1cm, esse considerado 100% nessa metodologia, a atividade hemolítica do ácido gálico nesse método foi de 52,38%, e a coloração amarelada é devida a formação de necrose. O calculo para atividade hemolítica está demonstrado abaixo.

$$\begin{array}{r} 2,1\text{cm} \text{ ---- } 100\% \\ 1,1\text{cm} \text{ ---- } \quad \quad x \end{array}$$

Os resultados da atividade hemolítica em ágar-sangue, confirmam os resultados negativos anteriores de toxicidade preliminar, apenas o ácido gálico não apresentou resultado similar no teste de atividade hemolítica item 5.9 onde havia apresentado resultado negativo nessa atividade. Mais testes são necessários para testar a toxicidade dessa substância, pois se faz necessário já que nesse método apresentou danos aos eritrócitos.

5.10 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA ESPÉCIE *DICKSONIA SELLOWIANA*

O ensaio de atividade antimicrobiana foi realizado com o extrato bruto e frações de *Dicksonia sellowiana*, com a finalidade de encontrar possível atividade antimicrobiana contra 4 patógenos. Diversas são as plantas brasileiras conhecidas por possuírem atividade antimicrobiana como exemplo o tomilho, guiné, guaçatonga. A busca por plantas que apresentem essa atividade é de interesse científico a fim de encontrar plantas com potencial biológico para gerar novos antibióticos.

Nesse modelo testado com o extrato e frações de *Dicksonia sellowiana*, as amostras não apresentaram resultados significativos na atividade antimicrobiana contra as cepas testadas. A tabela 12 demonstra os microorganismos utilizados e a concentração mínima inibitória para cada amostra testada.

Tabela 18 - Atividade antimicrobiana da espécie *Dicksonia sellowiana*

DICKSONIA SELLOWIANA	MICROORGANISMO	CIM
EXTRATO BRUTO	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	2500 µg/µl
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	5000 µg/µl
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	5000 µg/µl
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	5000 µg/µl
FRAÇÃO HEXÂNICA	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	>200 µg/µl
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	>200 µg/µl
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>200 µg/µl
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	>200 µg/µl
FRAÇÃO CLOROFÓRMIO	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	>200 µg/µl
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	>200 µg/µl
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>200 µg/µl
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	>200 µg/µl
FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	>200 µg/µl
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	>200 µg/µl
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>200 µg/µl
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	>200 µg/µl
FRAÇÃO REMANESCENTE	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	>200 µg/µl
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	>200 µg/µl
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>200 µg/µl
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	>200 µg/µl

Neste ensaio, não foi testadas as substâncias isoladas ácido protocatecuico e ácido gálico, por necessitar de uma quantidade considerável de material.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente dissertação teve como objetivo realizar um estudo fitoquímico da espécie *Dicksonia sellowiana* Presl. Hook, Dicksoniaceae, com o objetivo de verificar as possíveis atividades biológicas da espécie estudada, bem como determinar a sua composição fitoquímica, através dos métodos analíticos.

A espécie *Dicksonia sellowiana*, pertencente à família Dicksoniaceae, uma espécie natural do continente americano se encontra em perigo de extinção desde 2001, e possui em sua composição fitoquímica aminogrupos, taninos condensados, taninos hidrolisáveis, flavonóides e triterpenos. A partir das frondes coletadas no município de Inácio Martins, localizado no Estado do Paraná, foi preparado o extrato etanólico bruto em aparelho de soxhlet, sendo que este extrato foi particionado por coeficiente de polaridade. Foram isolados e identificados dois compostos pertencentes ao grupo de taninos hidrolisáveis: o ácido protocatecuico e o ácido gálico.

Na determinação do *fingerprint* da espécie utilizando CLAE-DAD, visualizaram-se diversas substâncias majoritárias ainda não isoladas de interesse para futuros trabalhos e controle de qualidade do extrato. Foi visualizado nesse método também as substâncias isoladas verificando o tempo de retenção e espectro de ultravioleta.

O estudo de atividade antioxidante, nos quatro métodos testados (fosfomolibdênio, DPPH, TBARS e β -Caroteno/ácido linoleico) foi bem expressiva. O extrato bruto e as frações acetato de etila e clorofórmio foram as que apresentaram melhores resultados nos modelos testados, possivelmente devido ao teor de polifenóis dessas amostras verificadas através do método Folin-Ciocalteu. Entre as substâncias isoladas o ácido gálico foi o que apresentou atividades mais expressivas frente ao ácido protocatecuico.

Nos ensaios toxicológicos (atividade hemolítica e toxicidade frente à *Artemia salina*) o extrato e frações não apresentaram atividade nos modelos testados, pois não demonstraram formação de coloração avermelhada, nem formação de halo nos testes de hemólise e frente à *Artemia salina* as amostras apresentaram um valor de DL50 superior a 1000 μ g/mL, mostrando a baixa toxicidade da espécie estudada. Entre as substâncias isoladas o ácido gálico apresentou atividade nesses modelos.

Como foi possível visualizar através do perfil cromatográfico não há quantidade suficiente de ácido gálico para que o extrato bruto e frações possuam ação tóxica nos modelos testados, porém como possui uma atividade antioxidante significativa em baixas concentrações, essa substância pode estar auxiliando na atividade antioxidante da espécie *Dicksonia sellowiana*.

A espécie *Dicksonia sellowiana* não apresentou resultados significativos na atividade antimicrobiana contra as cepas testadas. As substâncias isoladas não foram testadas devido à quantidade de material isolado ser insuficiente para o modelo.

Através desses resultados a espécie *Dicksonia sellowiana* conhecida popularmente como xaxim, demonstrou ser segura através dos testes toxicológicos preliminares, possui atividade biológica antioxidante e diversas substâncias a serem isoladas. Esses resultados abrem espaço para busca de outras atividades das amostras testadas, entre essas atividades à farmacologia, visando o conhecimento de uma planta a qual com estudos multidisciplinares poderá no futuro servir como um fitoterápico.

REFERÊNCIAS

- ALONSO, J.; Fitomedicina: Curso para profissionais da área da saúde, 1º edição. São Paulo, SP. Editora Pharmabooks. 2008.
- AO, C.; DEBA, F.; TAKO, M.; TAWATA, S.; Biological activity and composition of extract from aerial root of *Ficus microcarpa* L. International Journal of Food Science and Technology, v. 44, p. 349-358, 2009.
- BACKES, A.; Dinâmica do pinheiro-brasileiro. Iheringia, série Botânica, Porto Alegre, n.30, p.49-84, 1983.
- BASILE, J. R.; MINARDI, I.; DINIZ, J. M. F.; BARONI, J. M.; Intoxicação experimental em bovinos por *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook, com resultado negativo. Rev. Setor de Ciências Agrárias, Curitiba, v. 5, p. 55-58, 1983.
- BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. Revista Visão Acadêmica., 2011, p. 43.
- BENNICK, A; Interaction of plant polyphenols with salivary proteins, Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, Toronto, Canada, v. 13. p. 185, 2002.
- BICUDO, F.; Perigo à mesa – samambaia consumida em Minas Gerais favorece reprodução de vírus ligado a tumores. Pesquisa Fapesp, São Paulo, v. 80. p. 44-47, 2002
- BORA, K.; MIGUEL, O. G.; ANDRADE, C. A.; OLIVEIRA, A. O. T.; Identificação de polifenóis em folhas de *Dicksonia sellowiana*, In: EVINCI 13o, 2005, UFPR. Pró-Reitoria de Pesquisa e pós Graduação. Curitiba.
- BRAVO, L.; Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. *Nutrition Reviews*, New York, v.56, n.11, p.317-333, 1998.
- CARVALHO et al. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. V.29, n. 2. 149-152, 2007.
- CITES (Convention on International Trade in Endangered Species)., <http://www.cites.org/eng/app/appendices.shtml>., Acessado em 3 de maio de 2011.

- CHONG, Z.Z., LI, F., MAIESE, K.; (2005). Oxidative stress in the brain: Novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Progress in Neurobiology*, 75, 207-246.
- CONDACK, J.P.S.; 2010. Dicksoniaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB090947>).
- CONFORTI, F., *et al.*; Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum triquetrifolium* Turra aerial part. *Fitoterapia*, v.73, p.479-483, 2002.
- DALL'STELLA, D. S. G.; Estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) e de suas ações antibacteriana, antifúngica, alelopática, antioxidante e toxicológica. Curitiba, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- DIAS, B. F. S. A.; implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades. Campina: André Tosello. p. 10. 1996.
- DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.2, p.446-452, 2006.
- EFING, L.M.A.C. Compostos bioativos do material resinoso, subproduto do processamento da erva- mate. Universidade Federal do Paraná. 108p. 2008.
- FERNANDES, I.; Taxonomia e fitogeografia de Cytheacea e Dicksoniaceae nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil. Tese de Doutorado. São Paulo, Universidade de São Paulo. 1997.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S.; Radicais livres, conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Botucatu. *Rev Ass Med Brasil* 1997; 43 (1): 61- 8.
- FERRO, Degmar.; *Fitoterapia: conceitos clínicos*. São Paulo, SP, Editora Atheneu. 2008.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; e INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS (INPE) 2009. Atlas dos Remanescentes Florestais da Floresta Atlântica / Período 2005- 2008. Relatório final.

- FURTADO, S. K.; Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do paraná: testes in vitro e in vivo. Disserta o. Universidade Federal do Paraná. 2006.
- GIULIETTI, A. M e Colaboradores.; Plantas raras do Brasil. Belo Horizonte, MG, Conserva o Internacional. Co-Editora Universidade Estadual de Feira de Santana., 2009.
Co-editora: Universidade Estadual de Feira de Santana. p. 24. 2009
- GUERRA, M. P.; NODARI, R. O.; Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e  ticos. In: SIMÕES, C. M. O et al. (org). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, 2007. p. 15-20.
- GUIMARÃES AG, OLIVEIRA GF, MELO MS, CAVALCANTI SC, ANTONIOLLI AR, BONJARDIM LR, SILVA FA, SANTOS JPA, ROCHA RF, MOREIRA JCF, ARAÚJO AA, GELAIN DP, QUINTANS-JÚNIOR LJ: Bioassay-guided Evaluation of Antioxidant and Antinociceptive Activities of Carvacrol. Basic Clin Pharmacol Toxicol 107:949-957, 2010
- HUECK, K.; Distribui o e habitat natural do pinheiro-do-Paraná (*Araucaria angustifolia*). Boletim da Faculdade de Filosofia e Ciências da Universidade de São Paulo, n.10, p.1-24, 1953.
- IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Disponível em : http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/mata_atlantica.htm., Acessado em 13 de abril de 2010.
- IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA) <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/contagem2007/default.shtm>. Acessado em 27 de maio de 2010.
- JOLY, A. B.; Botânica: Introdu o   taxonomia vegetal. 7. ed. São Paulo: Ed. Nacional, p.173-174. 1985.
- KING, A., YOUNG, G.; Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, Chicago, v.99, n.2, p.213-218, 1999.
- KISHIDA E. *et al.*; Re-evaluation of malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactive substances as indices of autoxidation based on the oxygen consumption. *J. Agric. Food Chem.* 1993, 41:1-4

- LUNA, J. S. *et al.*; A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005. p. 199 - 206.
- MANTOVANI, M.; Caracterização de populações naturais de Xaxim (*Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hooker), em diferentes condições edafo-climáticas no Estado de Santa Catarina. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. p 8. 2004.
- MENSOR, L. L., *et al.*; Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytoterapy Research*, v.15, p.127-130, 2001.
- MEYER, B. N., *et al.*; Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*, v.45, p.31-34, 1982.
- MIELKE, E. J. C.; Análise da cadeia produtiva e comercialização do xaxim *Dicksonia sellowiana*, no Estado do Paraná. Curitiba, 2002. Dissertação (Mestrado em engenharia florestal) Universidade Federal do Paraná.
- MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; Desenvolvimento de fitoterápicos. Curitiba, PR, Editora Robe, 1999.
- MONTEIRO, J.M. *et al.*, TANINOS: UMA ABORDAGEM DA QUÍMICA À ECOLOGIA. *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 5, p. 892-896, 2005
- MOREIRA, E. A.; Marcha sistemática de análise em fitoquímica. *Tribuna Farmacêutica*, v.47, n.1, p.1-19, 1979.
- NAGEN, T.J., ALBUQUERQUE, T.T.O., MIRANDA, L.C.G.; Ácidos fenólicos em cultivares de soja: ação antioxidante. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, Curitiba, v.35, n.1, p.129-138, 1992.
- NAMIKI, M.; Antioxidants/antimutagens in food. *Journal of Nutrition*, Boca Raton, v.29, n.4, p.273-300, 1990.
- OLSEN, SUE.; *Encyclopedia of Garden Ferns*. Port Land, Oregon. Estados Unidos. Editora Timber Press. p. 26, 27, 201. 2007.
- PEREIRA. A. M. S.; Prefácio. In: FERRO, Degmar. *Fitoterapia: conceitos clínicos*. São Paulo, SP, Editora Atheneu. p. XV. 2008.

- PINTO, A. C.; BOLZANI, V.S.; SILVA, D. H. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIA, R. A.; Produtos Naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. Química. Nova, Vol. 25, Supl. 1, 45-61, 2002.
- PITMAN, N.C. & JORGENSEN, P.; Estimating the size of the world's threatened flora. Science. p. 298. 2002.
- 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.
- PRISTA, L. N *et al.*; Técnica farmacêutica e farmácia galênica. 3.ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1981. v.1.
- RATTMANN, Y, D.; MECANISMOS ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NOS EFEITOS VASCULARES DA *Dicksonia sellowiana* (PRESL.) HOOK. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina. 2009.
- REIS, M.S. & GOMES, G. S.; Estudos da Biodiversidade, Potencialidades de Uso e Estabelecimentos de Estratégias de Manejo Sustentado das Espécies do Entorno do Parque Nacional de São Joaquim, com ênfase no Xaxim. Braz. J. Genet., v 19, n4, supl., p37-47. 2000.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G.; Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.*, Oxford, v.4, p.304-309, 1997.
- RIBEIRO, K. J. C.; Ação do extrato de *Dicksonia sellowiana* na inflamação induzida por carregenina em camundongos com tumor de Ehrlich. Itajaí, 2003. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas), Universidade do Vale do Itajaí.
- RINALDO, D.; Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção química farmacológica de plantas superiores – *Neea theifera* Oersted (Nyctaginaceae). 2007. 84 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.
- RIZZINI, C. T.; COIMBRA FILHO, A. F.; HOUAISS, A.; Ecossistemas brasileiros. Rio de Janeiro, Editora Index, 1988.

- SANTOS, A. R. S.; Análise toxicológica crônica em camundongos do extrato seco padronizado das folhas da *Dicksonia sellowiana*. Florianópolis: UFSC. 2006. Relatório Técnico Parcial enviado para empresa Natureza Pura Ltda.
- SANTOS, A. R. S.; Análise toxicológica do extrato seco padronizado das folhas da *Dicksonia sellowiana*. Florianópolis: UFSC. 2005. Relatório Técnico Parcial enviado para empresa Natureza Pura Ltda.
- SANTOS, M. H. P.; Ação do extrato de *Dicksonia sellowiana* (Dicksoniaceae) no crescimento do tumor de Ehrlich. Itajaí, 2003. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas), Universidade do Vale do Itajaí.
- SHAHIDI, F., JANITHA, P.K., WANASUNDARA, P.D.; Phenolic antioxidants. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Boca Raton, v.32, n.1, p.67-103, 1992.
- SIMIC, M.G., JAVANOVIC, S.V.; Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. *In: HO, C.T., OSAWA, T., HUANG, T.M., ROSEN, R.T. (Ed.). Food phytochemicals for cancer prevention*. Washington : American Chemical Society, 1994. p.20-33. (ACS Symposium Series, n.546).
- SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., PALAZZO de MELLO, J. C., MENTZ, L.A., ROS PETROVICK, P.; Farmacognosia da planta ao medicamento. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1999, 821p.
- SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., PALAZZO de MELLO, J. C., MENTZ, L.A., ROS PETROVICK, P.; Farmacognosia da planta ao medicamento. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2007, p. 230, 237.
- SEHNEM, A.; Chave para as famílias de pteridófitos da região sul do país. *Flora Ilustrada Catarinense*. p.1-114. 1983.
- SCHULTZ, A. Introdução à botânica sistemática. 6ª edição. Porto Alegre: Sagra. V.1. 294p. 1991.
- SHAHIDI, F., JANITHA, P.K., WANASUNDARA, P.D.; Phenolic antioxidants. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Boca Raton, v.32, n.1, p.67-103, 1992.

- SOARES, S.E.; Ácidos fenólicos como antioxidantes. Rev. Nutr., Campinas, 15(1):71-81, jan./abr., 2002
- SOS MATA ATLÂNTICA - <http://www.sosmatatlantica.org.br/index.php?section=info&action=flo.>, (2008)., Acessado em 19 de abril de 2010.
- SOUZA FILHO, A. P. S.; SANTOS, R. A.; SANTOS, L. S.; GUILHON, G. M. P.; SANTOS, A. S.; ARRUDA, M. S. P.; MULLER, A. H.; ARRUDA, A. C. Potencial alelopático de *Myrcia guianensi*. Planta Daninha, v. 24, n. 4, p. 649-656, 2006.
- SMORALEK, F. S. F.; Contribuição ao estudo fitoquímico, toxicológico e das atividades biológicas da espécie vegetal *Solidago microglossa* DC (Compositae). Dissertação. Universidade Federal do Paraná. 2011.
- SUZUKI, C. C. L. F.; Desenvolvimento gametofítico e estudo de diferentes níveis de luz no crescimento de plântulas de Dicksonia sellowiana (Presl.) Hook. (Pteridófita-Dicksoniaceae). 2003. 62 f. Tese (Mestrado em Biologia Vegetal) Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2003.
- TROPICOS.; Taxonomia da espécie *Dicksonia sellowiana*: [http://www.tropicos.org/Name/26606534.](http://www.tropicos.org/Name/26606534), Acessado em 17 de julho de 2010.
- TRYON, R.M & TRYON, A F.; Ferns and allied plants with special reference to Tropical America. New York: Spring – Verlag. p. 144 – 149. 1982.
- VARGAS, C. R. Q.; Urea. Act Terap Dermatol División Dermatología Hospital de Clínicas "José de San Martín" (UBA). Buenos Aires. 2008; 31: 170.
- VELOSO, H. P.; RANGEL-FILHO, A. L. R.; LIMA, I. C. A.; Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal. Rio de Janeiro: IBGE, 1991.
- VICKERY, M. L. E.; VICKERY, B.; *Secondary Plant Metabolism*, The Macmillan Press LTD: London, 1981.