

ANA CAROLINA WINKLER HEEMANN

**ESTUDO FITOQUÍMICO, BOTÂNICO E DAS PROPRIEDADES
ANTIMICROBIANAS DE *Pterocaulon interruptum* DC.
(ASTERACEAE)**

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

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Marilis D. Miguel

CURITIBA

2002

Resumo da Ata de Defesa de Dissertação de Mestrado

Título: "Estudo fitoquímico, botânico e das propriedades antimicrobianas de *Pterocaulon interruptum* DC. (Asteraceae)",

Candidata: ANA CAROLINA WINKLER HEEMANN

A Comissão Examinadora reunida nesta data nas dependências do Setor de Ciências da Saúde, sede botânico, composta pelos docentes: Obdulio Gomes Miguel (Orientador/Presidente), Paulo I. B. Carneiro (Universidade Estadual de Ponta Grossa) e Márcia do Rocio Duarte (Universidade Federal do Paraná), indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, após exame e julgamento da dissertação, atribui as seguintes notas:

Prof. Dr. Paulo I. B. Carneiro

Nota: 9,5

Prof^a Dr^a Márcia do Rocio Duarte

Nota: 9,0

Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

Nota: 10,0

A Comissão Examinadora aprova a dissertação com nota 9,5, conceito A e recomenda sua publicação após as correções sugeridas, que serão conferidas pelo orientador.


Curitiba, 6 de setembro de 2002.



Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel - Presidente



Prof. Dr. Paulo I. B. Carneiro - UEPG



Prof^a Dr^a Márcia do Rocio Duarte - UFPR

**“A arte de vencer é ter fé e acreditar em si mesmo”.
(Autor desconhecido)**

**À minha mãe, exemplo de luta e dedicação,
ao meu pai que do céu está sempre olhando por mim,
ao Rodrigo pelo incentivo e amor diários,
aos meus familiares e amigos pelo carinho que sempre recebi,
dedico este trabalho.**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná pela oportunidade e incentivo à pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, professores e colaboradores por toda luta em prol da existência e reconhecimento deste curso.

Ao Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel e Prof^ª Dr^ª Marilis Dallami Miguel pela orientação deste trabalho, companheirismo, presença constante e palavras de apoio em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Franco Delle Monache da Universidade Católica de Roma pela obtenção dos espectro de RMN ¹H, RMN ¹³C e HETCOR.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná pela obtenção dos espectros de absorção no infravermelho.

Ao Prof. Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos pelo auxílio na obtenção dos espectros de absorção no ultravioleta e à Prof. Dr^ª Marcia do Rocio Duarte pela grande colaboração na descrição dos estudos botânicos.

Ao Prof. Dr. Vitor Alberto Kerber, Prof^ª Dr^ª Tania Maria Bordin Bonfim, Prof^ª MSc. Wanda Moscalewski, Prof^ª Dr^ª Cyntia Pichet, Prof^ª Dr^ª Almeriane M. W. Santos os quais contribuíram com seus conhecimentos na realização deste trabalho.

Ao botânico Gert Hatschbach e ao biólogo Osmar dos Santos Ribas do Museu Botânico Municipal de Curitiba pela identificação e depósito de exemplar da espécie em estudo.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná pelo preparo do material e realização das fotografias em Microscópio Eletrônico de Varredura.

Ao geógrafo e querido tio Julio Cesar Winkler pela melhoria do mapa de distribuição geográfica da espécie em estudo.

A todos os funcionários do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná.

À futura farmacêutica Cristina Mayumi Sasaki pela grande colaboração nos estudos fitoquímicos e à Cristina Peitz, Éverson Miguel Bianco, Jane Manfron Budel e Paulo Vitor Farago pelos momentos de amizade cultivados neste tempo em que passamos juntos.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	4
2.1 OBJETIVO GERAL.....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	5
3.1 FAMÍLIA ASTERACEAE.....	5
3.2 CUMARINAS.....	8
3.3 ESTERÓIDES.....	10
3.4 FLAVONÓIDES.....	10
3.4.1 Di-hidroflavonóides.....	11
3.5 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	11
3.6 Gênero <i>Pterocaulon</i>	12
3.6.1 Aspectos Anatômicos do Gênero <i>Pterocaulon</i>	14
3.6.1.1 Aspectos anatômicos da espécie <i>Pterocaulon interruptum</i> DC.....	15
3.6.2 Posição Sistemática do <i>Pterocaulon interruptum</i> DC.....	16
3.6.3 Aspectos Agronômicos.....	16
3.6.4 Aspectos Quimiotaxonômicos.....	16
3.6.5 Aspectos Fitoquímicos.....	17
3.6.6 Aspectos Biológicos e Farmacológicos.....	21
3.6.6.1 Atividade antimicrobiana.....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	26
4.2 ESTUDOS FITOQUÍMICOS.....	26
4.2.1 Marcha Sistemática Fitoquímica.....	26
4.2.1.1 Preparo do extrato hidroalcoólico a 20%.....	27
4.2.1.2 Preparo do extrato aquoso a 20%.....	27
4.2.1.3 Pesquisa de alcalóides.....	27
4.2.1.4 Pesquisa de flavonóides.....	27
4.2.1.5 Pesquisa de cumarinas.....	28
4.2.1.6 Pesquisa de antraquinonas.....	28
4.2.1.7 Pesquisa de esteróides e triterpenos.....	29
4.2.1.8 Pesquisa de heterosídeos antociânicos.....	29
4.2.1.9 Pesquisa de saponinas.....	29
4.2.1.10 Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos.....	29
4.2.1.11 Pesquisa de taninos.....	30
4.2.1.12 Pesquisa de aminogrupos.....	31
4.2.2 Extração do Óleo Essencial.....	31
4.2.3 Extração por Soxhlet Modificado.....	31
4.2.4 Determinação do Teor de Sólidos das Frações.....	32
4.2.5 Processamento das Frações Hexânica, Clorofórmica, Acetato de Etila e Metanólica.....	32
4.2.6 Caracterização das Substâncias Isoladas.....	33

4.2.6.1 Cromatografia em camada delgada.....	33
4.2.6.2 Espectroscopia de absorção no ultra violeta de flavonas e flavonóis.....	33
4.2.2.6.1 Em metanol.....	33
4.2.2.6.2 Presença de NaOMe.....	34
4.2.6.2.2.1 Detecção de grupos hidroxila nas posições 3 e 4'.....	34
4.2.6.2.2.2 Detecção de sistema dihidroxil 3,4'em flavonóis.....	34
4.2.6.2.3 Presença de NaOAc.....	34
4.2.6.2.4 Detecção de grupos 7-hidroxil.....	35
4.2.6.2.4.1 Detecção de grupos 4'-hidroxil em flavonas e flavonóis por efeito de NaOAc.....	35
4.2.6.3.5 Degeneração do espectro em ultravioleta de flavonas e flavonóis na presença de NaOAc.....	35
4.2.6.2.6 Detecção de grupos orto-hidroxil em flavonas e flavonóis por efeito de NaOAc/H ₃ BO ₃	36
4.2.6.2.4 Presença de AlCl ₃	36
4.2.6.3 Espectroscopia de absorção no infravermelho.....	36
4.2.6.4 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹ H e ¹³ C.....	36
4.2.6.5 Espectroscopia de massa.....	37
4.3 ESTUDO MORFO-ANATÔMICO.....	37
4.3.1 Processamento do Material Coletado.....	37
4.3.2 Testes Microquímicos (Histoquímicos).....	38
4.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	38
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	38
4.4.1 Preparo do Material.....	39
4.4.2 Preparo da Amostra.....	39
4.4.3 Preparo dos Discos de Papel.....	39
4.4.4 Meio de Cultura.....	40
4.4.5 Preparo do Inóculo.....	40
4.4.6 Controles.....	41
4.4.7 Preparo do Teste.....	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1 ESTUDOS FITOQUÍMICOS.....	42
5.1.1 Fração Hexânica.....	47
5.1.1.1 Espectro de absorção no infravermelho.....	47
5.1.1.2 Espectro de absorção no ultravioleta.....	48
5.1.1.3 Espectro de massa.....	48
5.1.1.4 Espectro de ressonância magnética nuclear ¹ H.....	48
5.1.1.5 Espectro de ressonância magnética nuclear ¹³ C.....	48
5.1.2 Fração Clorofórmica.....	56
5.1.2.1 Substância FC1.....	56
5.1.2.1.1 Espectro de absorção no infravermelho.....	56
5.1.2.1.2 Espectro de ressonância magnética nuclear ¹ H.....	57
5.1.2.1.3 Espectro de ressonância magnética nuclear ¹³ C.....	57
5.1.2.2 Substância FC2.....	61
5.1.2.2.1 Espectro de absorção no infravermelho.....	61
5.1.2.2.2 Cromatografia gasosa.....	61
5.1.2.2.3 Espectro de ressonância magnética nuclear ¹ H.....	61
5.1.2.2.4 Espectro de ressonância magnética nuclear ¹³ C.....	61

5.1.3 Fração Acetato de Etila.....	66
5.1.3.1 Substância FA1.....	67
5.1.3.1.1 Espectro de absorção no infravermelho.....	67
5.1.3.1.2 Espectro de massa.....	67
5.1.3.1.3 Espectro de absorção no ultravioleta.....	67
5.1.3.1.4 Espectro de ressonância magnética nuclear ^1H	70
5.1.3.1.5 Espectro de ressonância magnética nuclear ^{13}C	70
5.1.3.2 Substância FA2.....	74
5.1.3.2.1 Espectro de absorção no infravermelho.....	74
5.1.3.2.2 Espectro de absorção no ultravioleta.....	74
5.1.3.2.3 Espectro de ressonância magnética nuclear ^1H	76
5.1.3.2.4 Espectro de ressonância magnética nuclear ^{13}C	76
5.1.4 Fração Metanólica.....	83
5.2 ESTUDOS MORFO-ANATÔMICOS.....	84
5.3 ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS.....	90
5.4 DISCUSSÃO.....	93
6 CONCLUSÃO.....	97
REFERÊNCIAS.....	98

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	EXEMPLARES DA ESPÉCIE <i>Pterocaulon interruptum</i> DC. CATALOGADAS NO MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL, CURITIBA – PR ATÉ 23 DE ABRIL DE 2002.....	13
TABELA 2	RESUMO DAS AÇÕES BIOLÓGICAS DE ESPÉCIES DE <i>Pterocaulon</i>	24
TABELA 3	CONCENTRAÇÕES DAS SUSPENSÕES BACTERIANAS.....	40
TABELA 4	RESULTADOS DA ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR.....	42
TABELA 5	COMPONENTES CARACTERIZADOS NO ÓLEO ESSENCIAL.....	42
TABELA 6	RENDIMENTO DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS POR SOXHLET.....	47
TABELA 7	FRAÇÕES COLETADAS E REUNIDAS DA FRAÇÃO HEXÂNICA.....	47
TABELA 8	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN ¹³ C DO SABANDINOL.....	48
TABELA 9	FRAÇÕES COLETADAS E REUNIDAS DA FRAÇÃO CLOROFÓRMICA.....	56
TABELA 10	DADOS DE RMN DE ¹³ C PARA ESTIGMASTEROL.....	57
TABELA 11	DADOS DE RMN DE ¹³ C PARA 3-O-ACETIL TARAXASTEROL.....	62
TABELA 12	FRAÇÕES COLETADAS E REUNIDAS DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA.....	66
TABELA 13	ANÁLISE POR ULTRAVIOLETA DA QUERCETINA EM MeOH e NaOMe ($\lambda_{\text{máx}}$, nm).....	69
TABELA 14	ANÁLISE POR ULTRAVIOLETA DA QUERCETINA EM NaOAc e NaOAc e H ₃ BO ₃ ($\lambda_{\text{máx}}$, nm).....	69
TABELA 15	ANÁLISE POR ULTRAVIOLETA DA QUERCETINA EM AlCl ₃ e AlCl ₃ /HCl ($\lambda_{\text{máx}}$, nm).....	69
TABELA 16	DADOS DE RMN DE ¹³ C E ¹ H DA QUERCETINA.....	70
TABELA 17	ANÁLISE POR ULTRAVIOLETA DA TAXIFOLINA 7-O-PRENILADA ($\lambda_{\text{máx}}$, nm)....	76
TABELA 18	ANÁLISE POR ULTRAVIOLETA DA TAXIFOLINA 7-O-PRENILADA ($\lambda_{\text{máx}}$, nm)....	76
TABELA 19	ANÁLISE POR ULTRAVIOLETA DA TAXIFOLINA 7-O-PRENILADA ($\lambda_{\text{máx}}$, nm)....	76
TABELA 20	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN ¹³ C DA TAXIFOLINA 7-O-PRENILADA.....	77
TABELA 21	FRAÇÕES COLETADAS E REUNIDAS DA FRAÇÃO METANÓLICA.....	83

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO GÊNERO <i>Pterocaulon</i> (CABRERA; RAGONESE, 1978) MODIFICADO POR Julio Cesar Winkler.....	14
FIGURA 2	PURPURENOL.....	18
FIGURA 3	OBTUSIFOL.....	18
FIGURA 4	5-(3-METIL-2-BUTENILOXI)-6,7-METILENODIOXICUMARINA.....	19
FIGURA 5	5-METOXI-6,7-METILENODIOXICUMARINA.....	19
FIGURA 6	PURPURASOLOL.....	20
FIGURA 7	ESTRUTURAS A E C – SABANDINOL E SABANDINONA RESPECTIVAMENTE (DEBENEDETTI et al, 1981). ESTRUTURAS B E D – CORREÇÃO DAS ESTRUTURAS DE SABANDINOL E SABANDINONA (DEBENEDETTI et al., 1997).....	20
FIGURA 8	VIRGATENOL E VIRGATOL.....	21
FIGURA 9	CHRYSOSPLENOL C.....	21
FIGURA 10	DISPOSIÇÃO DOS DISCOS NO ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA....	41
FIGURA 11	CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Pterocaulon interruptum</i> DC. A. ALIL CICLOHEXANO; B. ORTO CIMENO.....	43
FIGURA 12	CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Pterocaulon interruptum</i> DC. C. ACETALDEÍDO BENZÊNICO; D. α -TUJENO; E. 3-HEPTANONA.....	44
FIGURA 13	CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Pterocaulon interruptum</i> DC. F. CARVACROM (METILÉTER); G. SAFROL.....	45
FIGURA 14	CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Pterocaulon interruptum</i> DC. H. 1,4,6-TRIMETIL-5,6-DIHDRONAFTALENO.....	46
FIGURA 15	ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DO SABANDINOL.....	50
FIGURA 16	ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA DO SABANDINOL.....	50
FIGURA 17	ESPECTRO DE MASSA DO SABANDINOL.....	51
FIGURA 18	ROTA DE FRAGMENTAÇÃO DO SABANDINOL.....	52
FIGURA 19	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H DO SABANDINOL.....	53
FIGURA 20	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H DO SABANDINOL.....	53
FIGURA 21	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C DO SABANDINOL.....	54
FIGURA 22	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C DO SABANDINOL.....	54
FIGURA 23	ESPECTRO HETCOR DO SABANDINOL.....	55
FIGURA 24	ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DO ESTIGMASTEROL.....	58
FIGURA 25	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H DO ESTIGMASTEROL.....	59
FIGURA 26	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H AMPLIADO DO ESTIGMASTEROL.....	59
FIGURA 27	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C DO ESTIGMASTEROL.....	60
FIGURA 28	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C DO ESTIGMASTEROL.....	60
FIGURA 29	ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO 3-O-ACETIL TARAXASTEROL.....	63
FIGURA 30	CROMATOGRAMA DO 3-O-ACETIL TARAXASTEROL.....	53
FIGURA 31	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H DO 3-O-ACETIL TARAXASTEROL.....	64
FIGURA 32	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H AMPLIADO DO 3-O-ACETIL TARAXASTEROL.....	64
FIGURA 33	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C DO 3-O-ACETIL TARAXASTEROL.....	65
FIGURA 34	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C DO 3-O-ACETIL TARAXASTEROL.....	65
FIGURA 35	ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DA QUERCETINA.....	71
FIGURA 36	ESPECTRO DE MASSA DA QUERCETINA.....	71

FIGURA 37	ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA DA QUERCETINA.....	72
FIGURA 38	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹ H DA QUERCETINA.....	73
FIGURA 39	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹³ C DA QUERCETINA.....	73
FIGURA 40	ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DA TAXIFOLINA 7-O-PRENILADA.....	78
FIGURA 41	ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA DA TAXIFOLINA 7-O-PRENILADA.....	79
FIGURA 42	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹ H DA TAXIFOLINA 7-O-PRENILADA.....	80
FIGURA 43	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹ H DA TAXIFOLINA 7-O-PRENILADA.....	80
FIGURA 44	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹³ C DA TAXIFOLINA 7-O-PRENILADA.....	81
FIGURA 45	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹³ C DA TAXIFOLINA 7-O-PRENILADA.....	81
FIGURA 46	ESPECTRO HETCOR DA TAXIFOLINA 7-O-PRENILADA.....	82
FIGURA 47	A. ASPECTO GERAL DE <i>Pterocaulon interruptum</i> DC. B. DESTAQUE DO CAULE ALADO; C. FACE ADAXIAL COM COLORAÇÃO VERDE E FACE ABAXIAL COM COLORAÇÃO CINZA ESVERDEADO; D. INFLORESCÊNCIA COM CAPÍTULOS TERMINAIS.....	86
FIGURA 48	A. SUPERFÍCIE ADAXIAL, PRESENÇA DE TRICOMAS TECTORES (MEV 282 X); B. SUPERFÍCIE ADAXIAL DESTACANDO-SE CÉLULAS DE CONTOURO ONDULADO, LEVEMENTE ESTRIADAS (MEV 1288 X); C. SUPERFÍCIE ABAXIAL ONDE OBSERVA-SE NUMEROSOS TRICOMAS TECTORES (MEV 248 X); D. SUPERFÍCIE ABAXIAL, CUTÍCULA INTENSAMENTE ESTRIADA (MEV 1350 X).....	87
FIGURA 49	A. SECÇÃO TRANSVERSAL, EPIDERME UNISTRATIFICADA, CUTÍCULA RELATIVAMENTE DELGADA, ESTÔMATOS PROEMINENTES EM RELAÇÃO ÀS DEMAIS CÉLULAS (FUCSINA); B. DESTACA-SE ESTÔMATO PROEMINENTE (MEV 1535 X); C. MESOFILO DORSIVENTRAL (AZUL DE TOLUIDINA); D. BORDO FOLIAR (AZUL DE TOLUIDINA).....	88
FIGURA 50	A. NERVURA MEDIANA (AZUL DE TOLUIDINA); B. PRESENÇA DE AMIDO (LUGOL); C. PRESENÇA DE COMPOSTOS FENÓLICOS (CLORETO FÉRRICO); D. NERVURA CENTRAL (AZUL DE TOLUIDINA); E. DETALHE DA ANTERIOR; F. BAINHA ESCLERENQUIMÁTICA (FLOROGLUCINOL CLORÍDRICO); G. PRESENÇA DE SUBSTÂNCIAS GRAXAS (SUDAM III).....	89
FIGURA 51	CONTROLE DE ESTERILIDADE DO MEIO DE CULTURA.....	91
FIGURA 52	CONTROLE DE ESTERILIDADE DOS DISCOS.....	91
FIGURA 53	CONTROLE DE AUSÊNCIA DE INIBIÇÃO DOS DISCOS DE SOLVENTE (ÁLCOOL ETÍLICO) E ÁGUA FRENTE ÀS CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> (A), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (B) E <i>Staphylococcus aureus</i> (C).....	91
FIGURA 54	PLACAS DE ÁGAR MÜLLER-HINTON CONTENDO MICRORGANISMOS SEMEADOS E DISCOS DE PAPEL CONTENDO CONCENTRAÇÃO CONHECIDA DE EXTRATO. A - <i>Escherichia coli</i> ; B - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; C - <i>Staphylococcus aureus</i>	92

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
AlCl_3	Cloreto de alumínio
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia gasosa
CGEM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cm	Centímetro
CoA	Coenzima A
d	Densidade
DNA	Ácido desoxiribonucléico
EM	Espectrometria de massa
g	grama
H_3BO_3	Ácido bórico
HCl	Ácido clorídrico
IV	Infravermelho
kg	Quilograma
m/v	Massa por volume
mg	Miligrama
MHz	Mega hertz
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
N	Normal
NaOAc	Acetato de sódio
NaOMe	Metóxido de sódio
NH_4OH	Hidróxido de amônio
nm	Nanômetro
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
pH	Potencial de hidrogênio
RMN ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear de próton
RNA	Ácido ribonucléico
UFC	Unidade formadora de colônia
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta
v	Volume
VIS	Visível

RESUMO

No presente trabalho foram realizados estudos sobre a espécie *Pterocaulon interruptum* DC., Asteraceae, cujas partes aéreas foram submetidas a estudo botânico fitoquímico, sendo o processo extrativo por Soxhlet, o qual apresenta melhor rendimento e rapidez, isolando-se e caracterizando-se cinco compostos: sabandinol (cumarina), quercetina (flavonol), taxifolina 7-O-prenilada (di-hidroxi-flavonol), estigmasterol (esteróide) e 3-O-acetil taraxasterol (esteróide). Do óleo essencial foram caracterizados oito compostos: α -tujeno; 1,4,6-trimetil-5,6-dihidronaftaleno; 3-heptanona; acetaldeído benzênico; alil ciclohexano; carvacrol (metil éter); *orto*-cimeno e safrol. Estudos botânicos foram realizados para determinação das características anatômicas e possível comparação com estudos anteriores. A fração do extrato alcoólico avaliada não apresentou atividade inibitória frente a cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

In the present paper was realized studies about *Pterocaulon interruptum* DC., Asteraceae family, which aerial parts were submitted to botanical study to obtain anatomic characteristics and possibility to compare with others studies. It was conducted the phytochemical studies and the extractive process was developed by Soxhlet, which presented a better performance and speed. It was isolated five compounds: sabandinol (coumarin), quercetin (flavonol), 7-O-prenyl taxifolin (dihydroxyflavonol), stigmasterol (steroid) and 3-O-acetyl taraxasterol (steroid). From essential oil was identified eight compounds: α -thujene; 1,4,6-trimethyl-5,6-dihydronaphtalene; 3-heptanone; benzenic acetaldeid; alil ciclohexane; carvacrol (methyl ether); *ortho*-cimene and safrol. The fraction available from alcoholic extract wasn't active like anti microbial in the microorganisms species *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*.

1 INTRODUÇÃO

O Homem e as plantas medicinais possuem uma inter-relação direta, desde o início de sua existência. Este ao observar os animais passou a fazer uso das plantas como fonte de alimento e também na prevenção e tratamento de suas enfermidades. As plantas lentamente foram sendo incorporadas a forma de vida do homem. Neste contexto, o uso das mesmas representa um patrimônio advindo do saber popular. Inúmeros registros, tratam a aproximação técnica-científica do homem às plantas medicinais.

Discórides, médico e botânico grego foi o primeiro a tratar a botânica como uma ciência aplicada à farmácia. Seu trabalho, *De Materia Medica* é considerado uma pedra fundamental no desenvolvimento da botânica farmacêutica ou farmacobotânica e no estudo das substâncias medicinais encontradas na natureza (ANSEL, 2000).

O Brasil possui vasta flora cuja biodiversidade encontra-se entre as maiores do planeta, das 250 mil espécies já catalogadas, cerca de 120 mil destas ocorrem neste país e somente 10% já foram estudadas sob o ponto de vista químico e farmacológico (HECK, 1996; MIGUEL, 1996).

Nas últimas três décadas têm-se observado inúmeros grupos de pesquisa, direcionando esforços na busca de novos fármacos potencialmente ativos. Tais interesses vem compor enorme demanda declarada pela Organização Mundial de Saúde, em propor a seus países membros redirecionar esforços na pesquisa com produtos naturais.

Em toda história, os vegetais têm sido reservatório potencial de fármacos e a partir do isolamento e da identificação estrutural das substâncias ativas vegetais, é possível recriá-los por síntese total em laboratório, ou utilizar a substância isolada como material de partida para a criação de estruturas químicas ligeiramente diferentes por meio de procedimentos de modelagem molecular. Atualmente os produtos naturais são responsáveis por 40% dos fármacos disponíveis no mercado.

O processo e o tempo decorrido desde a descoberta do fármaco até a aprovação para posterior comercialização podem ser longos e onerosos, cerca de 300 bilhões de dólares, sendo que os resultados obtidos após inúmeros anos de

estudo e ensaios biológicos, nem sempre são satisfatórios. Todos os ensaios que devem ser realizados fazem parte da garantia de segurança e eficácia do novo fármaco que pretende-se apresentar ao mercado.

A busca por novos ativos derivados de plantas medicinais mostra-se crescente em nosso país, havendo maior interesse em conhecer e estudar a biodiversidade do território nacional.

A pesquisa científica de plantas medicinais empregadas na terapêutica possui caráter multi e interdisciplinar, sendo este aspecto fundamental para o desenvolvimento de estudos mais elaborados e de maior rigor técnico-científico, de modo a atender as exigências da Resolução RDC 17, no que se refere ao desenvolvimento e registro de fitoterápicos.

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam-se de plantas medicinais para tratamento de suas enfermidades (SILVA, 2000).

A descoberta e, por conseqüência, o uso de fitoterápicos e/ou fármacos, abrangem uma gama interdisciplinar de conhecimentos etnobotânicos, botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos e clínicos. Especialmente a área da química e biologia tem contribuído para o isolamento, purificação, identificação e modificação estrutural de moléculas com potencial farmacológico (MIGUEL, 1999).

Cabe ressaltar que por inúmeras vezes a descoberta de tais substâncias representou não somente o surgimento de um novo grupo de substâncias, mas originou a identificação de uma nova possibilidade de intervenção terapêutica (SIMÕES et al., 2000).

Inúmeros exemplos considerados como marcos importantes da química de produtos naturais podem ser destacados, como a morfina isolada em 1803 por SETÜRNER da *Papaver somniferum*, planta usada para acalmar a dor visceral, cuja fórmula estrutural foi proposta por ROBINSON no ano de 1925. Sendo posteriormente, em 1932 isolada da mesma planta a codeína por ROBIQUET e por MERCK em 1948, a papaverina (YUNES; CALIXTO, 2001). Outro importante marco pode-se destacar a digitoxina e a digoxina encontrados das folhas de *Digitalis purpurea* L. e a *Digitalis lanata* Ehrh, respectivamente (EVANS, 1996; BRUNETON, 1991).

Em 1820, PELLETIER e CAVENTON isolaram o alcalóide quinolínico, a quinina, extraída das cascas do gênero *Cinchona* (ROBBERS, SPEEDIE, TYLER, 1997), sendo esta utilizada como febrífugo no impaludismo, pela sua ação esquizotóxica (BARREIRO, 1990; SILVA, 1995).

A artemisinina, lactona sesquiterpênica, isolada em 1972 por cientistas chineses, das folhas e flores de *Artemisia annua* L. cuja estrutura química foi elucidada em 1979, qual confere potente ação contra o *Plasmodium falciparum*, causador da malária, responsável por cerca de 2 milhões de óbitos por ano (MILES, NGUYEN, 1998; AGTMAIEL, EGGELTE, BOXTEL, 1999).

Muitos autores têm relatado o isolamento de cumarinas e outros compostos em diversas espécies de *Pterocaulon*, como *Pterocaulon sphacelatum* (JOHNS, 1968), *Pterocaulon virgatum* (L.) DC. (DEBENEDETTI et al., 1998), *Pterocaulon balansae* Chodat (MAGALHÃES em DEBENEDETTI et al., 1996), *Pterocaulon lanatum* O. Kuntze (MAGALHÃES em DEBENEDETTI et al., 1996) *Pterocaulon polystachium* DC. (DEBENEDETTI et al., 1994a) e *Pterocaulon purpurascens* (DEBENEDETTI et al., 1996), o que tem suscitado interesse na pesquisa fitoquímica com espécies do referido gênero. Em levantamentos bibliográficos realizados até o presente momento não foram encontrados estudos relativos à espécie *Pterocaulon interruptum* DC. justificando a relevância do trabalho ao qual nos propomos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Realizar investigação fitoquímica, botânica e das propriedades antimicrobianas das partes aéreas de *Pterocaulon interruptum* DC. Asteraceae.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar, identificar botanicamente e depositar em herbário;
- Promover o isolamento de substâncias presentes nas partes aéreas da espécie em estudo, por meio de técnicas cromatográficas;
- Determinação de estruturas químicas de compostos isolados utilizando técnicas espectroscópicas em UV, IV, EM, RMN ¹H, RMN ¹³C e CGEM;
- Realizar estudo dos caracteres morfo-anatômicos das partes aéreas;
- Realizar estudos das propriedades antimicrobianas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 FAMÍLIA ASTERACEAE

As Compositae ou Asteraceae compreendem cerca de 1.100 gêneros, com, aproximadamente, 25.000 espécies e 13 tribos, de ampla distribuição, bem representadas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (BARROSO, 1991; JOLY, 1991).

Deriva o nome da família Asteraceae da estrutura característica da inflorescência, em capítulos florais (BUKART, 1974; CRONQUIST, 1981; JOLY, 1991). Considerada uma das famílias mais numerosas e evoluídas do reino vegetal (OLIVEIRA, 1993).

Segundo CABRERA (1963), a família Asteraceae é cosmopolita, com grande concentração de espécies em regiões subtropicais, temperado-frias e temperadas. Também são muito abundantes nas regiões montanhosas. As tribos Astereae e Inuleae, da qual faz parte a espécie em estudo, são características do hemisfério norte, existindo também muitos gêneros no hemisfério sul.

DRURY e WATSON em 1966, afirmaram que o gênero estava erroneamente contido na tribo Inuleae, uma vez que possui uma combinação pouco freqüente de caracteres anatômicos, os quais não coincidem com aqueles dos grupos taxonômicos afins, destacando-se em primeiro lugar o diferente tipo de tricoma, o flageliforme (BARROSO, 1991).

São na verdade plantas que tanto podem localizar-se em regiões ao nível do mar, como atingir os picos das mais altas montanhas, tendo invadido, com sucesso, todos os tipos de habitats, com exceção, talvez, do aquático, visto que poucas espécies são, realmente, aquáticas verdadeiras, são mais abundantes nas regiões áridas do que nas florestas tropicais úmidas.

No Brasil, estão representadas por, aproximadamente, 180 gêneros, sem considerar muitos daqueles criados recentemente como as espécies de *Eupatarium* L., por exemplo (BARROSO, 1991).

A origem filogenética das Asteraceae e as suas afinidades são ainda incertas. BENTHAM (1873) e BESSEY (1897) sugeriram seu parentesco com as Dipsacaceae; WERNHAM (1912) e TURNER (1977) relacionaram-nas com as Calyceraceae, enquanto CRONQUIST (1968) considerou o complexo Rubiales-

Dipsacales com mais requisitos para representar o ancestral mais provável das Compositae. A maioria dos autores, porém, tem procurado o parentesco do grupo, junto as Campanulaceae.

HEYWOOD (1978 em BARROSO, 1991) diz que entre as famílias referidas como possíveis ancestrais das Compositae afastam-se as Rubiaceae, Caprifoliaceae, Dipsacaceae e Valerianaceae, pelo tipo cimoso das inflorescências e pela bioquímica, enquanto as Stylidaceae, Goodeniaceae e Brunoniaceae, embora lembrem as Compositae no tipo racemoso das inflorescências, diferem, contudo, em vários outros aspectos, e que as Calyceraceae são pouco conhecidas quimicamente, para que possam oferecer bases para uma discussão filogenética, restando portanto as Campanulaceae, que, embora apresentem diferenças em detalhes embriológicos, concordam bioquimicamente, pela presença de inulina, ausência de tanóides e de compostos iridóides.

Ervas, arbustos, árvores baixas ou médias, não é raro trepadeiras perenes, com indumento variado não secretor ou glanduloso, com abundantes princípios ativos muito diversificados, incluindo inulina, alcalóides, com ou sem sistema de canais lactíferos e condutos ou depósitos, esquizolisígenos de resina, freqüentemente com floema ou canais vasculares em uma medula (SALINAS, 1992). A inflorescência das Asteraceae é o capítulo, que é composto de um receptáculo comum sobre no qual se inserem as flores, rodeadas por brácteas especializadas, as brácteas involucrais (chamadas também de escamas ou filárias). Neste invólucro pode constar uma ou mais séries de brácteas herbáceas, coriáceas ou escariosas, livres ou soldadas nos seus bordos. O receptáculo pode ser delgado ou carnoso, maciço ou oco, côncavo, plano, convexo ou cônico. A superfície pode ser quase lisa, estando somente marcada pelas cicatrizes da inserção das flores, pode ser desnudo ou coberto por tricomas (CABRERA, 1963).

Considera-se que o tipo de flor mais primitivo é a flor hermafrodita com corola tubulosa, pentadentada ou pentalobada no limbo, sendo que este é o tipo de flor que se encontra na parte interior dos capítulos da maioria das espécies de Asteraceae (CABRERA, 1963).

Muitos trabalhos tem sido realizados com exemplares da referida família, o que ressalta a importância econômica e científica da mesma. Extratos etanólicos

de 83 plantas da família Asteraceae, coletadas no estado de Minas Gerais, Brasil, foram testadas quanto à atividade larvicida contra o mosquito *Aedes fluviatilis* Diptera: Culicidae. O extrato da espécie *Tagetes minuta* caracterizou-se como mais ativo, sendo identificado como derivado de tiofenos, uma classe de compostos presente na maioria das espécies da família Asteraceae. Os extratos de *Eclipta paniculata* também foram significativamente ativos não havendo estudos previamente relatados quanto a composição química e atividade larvicida. Entretanto, os extratos de *Achyrocline satureoides*, *Gnaphalium spicatum*, *Senecio brasiliensis*, *Trixis vauthieri*, *Tagetes patula* e *Vernonia ammophila* foram menos ativos, eliminando mais de 50% das larvas somente na maior dose testada 100 mg/l) (MACÊDO et al., 1997).

Realizou-se estudo da atividade moluscicida nos extratos vegetais das partes aéreas de 66 espécies da família Asteraceae, incluindo o *Pterocaulon alopecuroides* (Lam.) D.C., coletadas em Belo Horizonte e municípios vizinhos, estado de Minas Gerais, Brasil.

Nas Américas Central e do Sul, a espécie *Shistosoma mansoni*, causa esquistossomose intestinal em 8 a 12 milhões de pacientes. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a doença atinge mais de 200 milhões de pessoas e coloca mais 600 milhões em risco de infecção em mais de 70 países dos trópicos. O ciclo de vida do parasita envolve a infecção de algumas espécies de moluscos. No Brasil, geralmente o gênero é *Biomphalaria*, em especial *Biomphalaria glabrata*, são os hospedeiros intermediários mais importantes do *Schistosoma mansoni*.

O controle da população de moluscos via moluscicidas pode desempenhar importante papel no controle da doença, porém estes produtos podem atingir as comunidades. Então, o desenvolvimento de produtos eficientes, baratos e seguros ao meio ambiente resultam em importante ferramenta para minimizar o impacto da esquistossomose. A demanda tem estimulado o envolvimento de muitos grupos na pesquisa de novos produtos derivados de plantas que possam ser utilizados como moluscicidas.

Das 66 plantas estudadas, 15 (23%) são consideradas como medicinais por populações no Brasil. Somente os extratos de *Actinoseris angustifolia* (Gardn.) Cabr, *Alomia myriadenia* Baker, *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C.,

Verbesina claussoni Sch. Bip., *Piptocarpha rotundifolia* Baker e *Vanillosmopsis erythropappa* Sch. Bip. eliminaram 100% de caracóis após 24 horas de exposição. Sendo que os extratos de *A. angustifolia*, *A. myriadenia* e *A. satureioides* foram os mais ativos. *A. satureioides* foi objeto de muitas investigações fitoquímicas que demonstraram a presença de terpenóides, fenilpropanóides e flavonóides, entre outras classes de compostos. Por outro lado, *P. rotundifolia* não foi estudada quimicamente para identificar os componentes moluscicidas (MENDES et al., 1999).

LEAL et al., 2000 relatam atividades antinociceptiva, anti-inflamatória e broncodilatadora de extratos hidroalcoólicos das espécies *Torresea cearensis*, *Justicia pectoralis*, *Eclipta alba*, *Pterodon polygaliflorus* e *Hybanthus ipecacuanha*. Estas plantas são muito utilizadas no nordeste brasileiro para doenças do trato respiratório, e tem em comum cumarinas em sua composição, a exemplo também do *Pterocaulon interruptum* DC.

SERRANO et al., 2000 determinaram a atividade anti-protozoária de 79 extratos aquosos de plantas de diferentes famílias, incluindo a família Asteraceae. Dois protozoários com diferentes vias metabólicas foram estudados *Trypanossoma cruzi* e *Trichomonas vaginalis*. A inibição dose dependente da proliferação parasitária foi observada nos extratos das seguintes plantas *Mikania cordifolia* (Asteraceae), *Scutia buxifolia* e *Neurolaena lobata*, reagindo em concentração intermediária resultando em altos valores de inibição do crescimento, até 100%.

Contra o protozoário *Trichomonas vaginalis*, os extratos de *Mikania cordifolia*, *Scutia buxifolia* e *Neurolaena lobata* foram novamente os mais efetivos, sendo que a inibição no crescimento não foi tão pronunciada quanto a do *Trypanossoma cruzi*.

3.2 CUMARINAS

As cumarinas são apresentadas em muitas espécies de diferentes famílias botânicas as quais estão distribuídas na região nordeste do Brasil. Algumas delas são relatadas na medicina popular como remédios tradicionais para o tratamento de doenças do trato respiratório (ROCHA, 1945 em LEAL et al., 2000).

Amplamente distribuídas no reino vegetal e representam uma classe de lactonas, com efeito antipirético e inibidor da carcinogênese; algumas cumarinas como a escopoletina são antiarrítmicas, vasodilatadoras, hipotensoras, espasmolíticas e simpatolíticas (DI STASI, 1996).

Como por exemplo, o estudo da escoparona (6,7-dimetóxi-cumarina), isolada da planta chinesa *Artemisia scoparia* Waldst & Kit, Asteraceae, aponta atividades imunossupressoras, relaxante vascular, hipolipidêmica e hipotensora (HOULT E PAYÁ em SIMÕES, 2000).

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

Derivadas da 5,6-benzo-2-pirona (α -cromona) e originam-se do ácido *trans*-cinâmico que, por oxidação, resulta no ácido *o*-cumárico, cuja hidroxila fenólica condensa com uma unidade de glicose. Esse composto isomeriza no seu correspondente *cis*, o qual por ciclização, forma a cumarina. A prenilação nas posições C-6 ou C-8 do anel benzênico de uma 7-hidróxi-cumaria conduz à formação de pirano ou furanocumarinas (SIMÕES, 2000).

As cumarinas livres, solúveis em álcool, são extraídas com solventes orgânicos como o éter. As formas heterosídicas são mais ou menos solúveis em água. Numerosas cumarinas são arrastadas por vapor d'água. Para sua purificação pode-se atuar sobre as propriedades da lactona: abertura e solubilização em meio alcalino, fechamento do ciclo em meio ácido. Convém salientar que este procedimento pode induzir uma transformação das estruturas originais; a mesma observação é válida para métodos que utilizam sublimação, pode haver reordenações térmicas, especialmente nas prenil cumarinas.

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

O reconhecimento destes compostos se realizam facilmente por CCD, revelado em UV (algumas cumarinas resultam "falso positivo" com o reativo de Dragendorff). As cumarinas podem ser avaliadas por CLAE, espectrofluorimetria depois de eluir as manchas em CCD e por densitometria (BRUNETON, 1991).

Cumarinas contendo grupos di-hidroxilados em posição *orto* como a fraxetina (7,8-di-hidróxi-6-metóxi-cumarina), esculetina (6,7-di-hidróxi-cumarina) e 4-metilesculetina (6,7-di-hidróxi-4-metilcumarina) são poderosos inibidores da peroxidação lipídica, além de eliminarem o ânion radical superóxido e quelarem íons ferro. Essas propriedades as tornam substâncias de interesse como antioxidantes, de possível aplicação na prevenção de doenças causadas por radicais livres (MARTÍN-ARAGÓN et al. em SIMÕES, 2000).

3.3 ESTERÓIDES

Os esteróides constituem uma classe de compostos naturais com ampla distribuição na natureza, havendo grande diversidade das atividades biológicas, destacando-se a utilização como anticoncepcionais, cardiotônicos, agentes anti-inflamatórios e anabolizantes (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

São formados a partir do pirofosfato de isopentinila e em sua biossíntese ocorre a mesma seqüência de reações presentes na biossíntese dos terpenóides. Os primeiros esteróides isolados na natureza foram os álcoois C_{27} - C_{29} , encontrados nas frações lipídicas de muitos tecidos. Nas plantas, o esterol mais comum é o β -sitosterol (estigmasta-5-en-3 β -ol), composto C_{29} . Muito semelhante ao β -sitosterol é o estigmasterol (22*E*)-estigmasta-5,22-dien-3 β -ol, isolado primeiramente da fava-de-calabar, mas também encontrado no óleo de soja. A ligação dupla na posição 22 do estigmasterol possibilita que a sua conversão nos hormônios esteroidais do tipo pregnana seja mais rápida que a do β -sitosterol (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997). Sendo assim, o estigmasterol é um esteróide utilizado como matéria-prima na semi-síntese de hormônios esteroidais (SIMÕES et al., 2000).

3.4 FLAVONÓIDES

Os flavonóides estão entre os compostos naturais mais disseminados em plantas, registrando-se mais de dois mil, tanto em estado livre quanto como glicosídeos. Foram atribuídas diversas funções aos flavonóides, entre elas: compostos antimicrobianos, produtos do estresse de metabólitos ou moléculas sinalizadoras. Da biossíntese geral dos flavonóides participam como intermediários fundamentais a *p*-cumaroil CoA e três unidades de malonil-CoA

para alongar a cadeia lateral da unidade fenilpropanoídica original (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

3.4.1 Di-hidroflavonóides

Os representantes desta classe são: as flavanonas, di-hidroflavonóis e as di-hidrochalconas. Como característica comum, possuem uma ligação simples entre os carbonos 2 e 3 em seu núcleo fundamental, ao contrário das outras classes de flavonóides. Em consequência estes flavonóides apresentam centros de assimetria em suas moléculas, no entanto, devido ao fato de terem sido isoladas, em geral, pequenas quantidades destas substâncias nos vegetais, a estereoquímica é freqüentemente omitida nas publicações (SIMÕES et al., 2000).

A taxifolina é classificada como di-hidroflavonol possuindo como substituinte –OH nas posições 5, 7, 3', 4' (SIMÕES et al., 2000).

A quercetina é classificada como flavonol, o qual é freqüentemente oxigenado, substituído com hidroxilas e/ou metoxilas. A maioria dos flavonóis identificados em plantas estão sob a forma conjugada, com um ou mais açúcares ligados aos grupos hidroxilas por uma ligação hemiacetal facilmente destruída por hidrólise ácida (SIMÕES, et al., 2000). Os flavonóis (ex. quercetina) são pouco solúveis em água, enquanto que os di-hidroflavonóis (ex. taxifolina) são mais solúveis.

3.5 ÓLEOS ESSENCIAIS

São constituídos por misturas químicas muito complexas, em grande parte por monoterpenóides e fenilpropanóides, variando muito de uma planta para outra. Muitas plantas são usadas com fins medicinais por conterem óleos voláteis, mas em muitos casos o próprio óleo separado da planta é utilizado como medicamento. Além dos usos farmacêuticos, os óleos voláteis são empregados como aromatizantes de alimentos, em cosméticos e perfumes. Analisa-se a constituição principalmente utilizando-se cromatografia a gás em coluna capilar e cromatografia líquida de alta eficiência, em conjunto com instrumentos que combinam a cromatografia a gás com espectrometria de massa, levando a identificação precisa dos componentes dos óleos voláteis (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

3.6 GÊNERO *Pterocaulon*

Em 1836, Richard Émile Augustin de Candolle (*Prodromus*, 5:453) descreve a espécie *Pterocaulon interruptum* DC. (CABRERA & RAGONESE, 1978). Possui uma área geográfica bicêntrica que faz com que seja um interessante exemplo deste tipo de distribuição (Figura 1 p. 14). Das dezoito espécies descritas, doze são americanas, estendendo-se do sul dos Estados Unidos até o centro da Argentina, e seis são Australianas, estendendo-se a Nova Caledônia, Indonésia e sul da Ásia. O gênero não ocorre na Europa, África e na maior parte da Ásia, Polinésia e Nova Zelândia. Também não ocorre em regiões temperadas e frias da América (CABRERA & RAGONESE, 1978).

A espécie encontra-se relatada no INDEX KEWENSIS, 1997 e no MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2001, mencionando em ambos a publicação em *Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis* 5:454, 1836.

Aproximadamente 25 espécies ocorrem em regiões frias da América, Ásia, Austrália, Madagascar e Nova Caledônia. Na Argentina existem 10 espécies, todas no norte e centro do país (CABRERA, 1963).

Estudos sobre a flora do estado do Paraná, realizados na década de 60, revelaram a presença de quatro espécies de *Pterocaulon*, sendo elas: *Pterocaulon alopecuroideum* (Lamarck) DC., *Pterocaulon angustifolium* DC., *Pterocaulon interruptum* DC. e *Pterocaulon rugosum* (Vahl.) Malme (ANGELY, 1965).

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

Em BARROS et al., 1991 no qual foi estudada a flora fanerogâmica da Ilha do Cardoso, localizada no litoral sul do estado de São Paulo, é citada a ocorrência de diversos gêneros da família Asteraceae (Compositae) incluindo as espécies, *Pterocaulon angustifolium* (Sw.) Gleason e *Pterocaulon rugosum* (Vahl.) Malme.

Levantamentos publicados por MASS & WESTRA, 1998, incluem vários gêneros de Asteraceae, entre eles: *Baccharis*, *Bidens*, *Conyza*, *Mikania*, entre outras. Não cita porém, o gênero *Pterocaulon*, que como já relatado anteriormente foi encontrada nos estados da região sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e nordeste da Argentina (CABRERA, 1963).

Sugere-se a inclusão do gênero *Pterocaulon* em novos levantamentos que venham a ser realizados na região neotrópica.

No Missouri Botanical Garden estão arquivados onze exemplares da espécie em estudo, sendo dez coletadas no Paraguai e uma na Bolívia, entre os anos de 1992 e 1995 (MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2001).

No Brasil, são encontrados cerca de 16 gêneros com poucas espécies. (BARROSO, 1991).

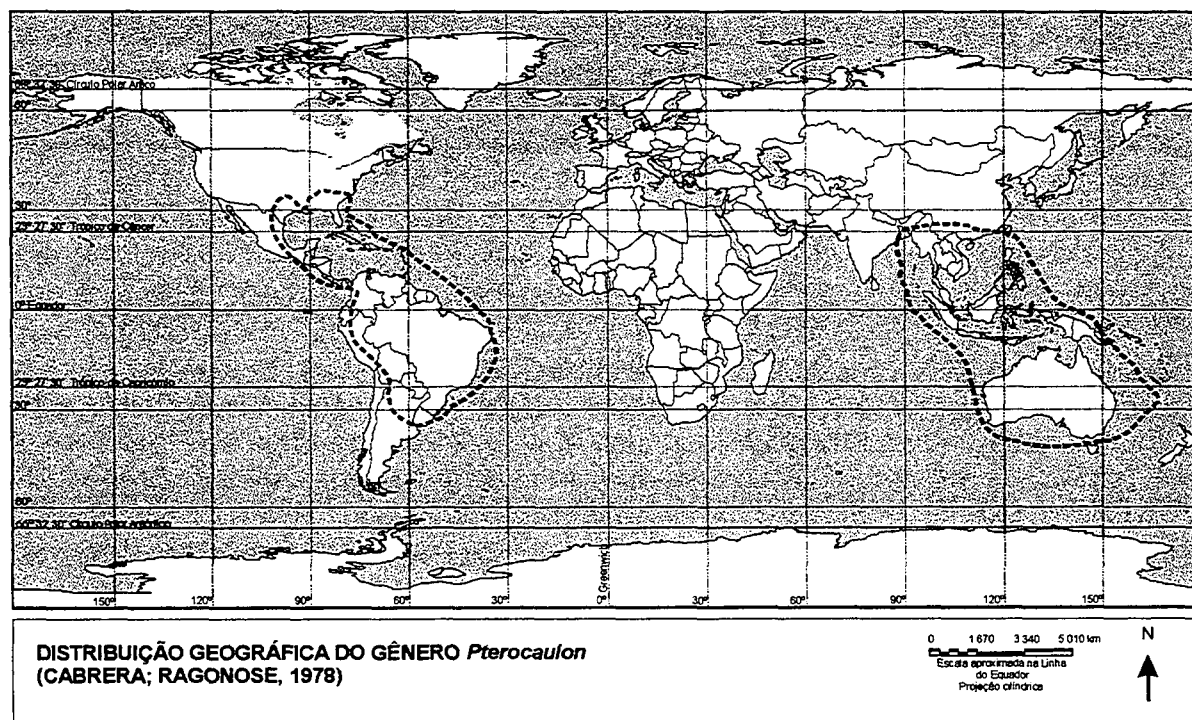
Diversos exemplares da espécie também encontram-se arquivados no Museu Botânico Municipal na cidade de Curitiba, estado do Paraná, Brasil (Tabela 1 p.13).

TABELA 1 – EXEMPLARES DA ESPÉCIE *Pterocaulon interruptum* DC. CATALOGADAS NO MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL, CURITIBA – PR ATÉ 23 DE ABRIL DE 2002

Número de Registro	Local de coleta	Coletor	Data de coleta
5154	Curitiba – PR	G. Tessmann e A. Frenzel 760	20/03/52
5156	Curitiba – PR	G. Tessmann e A. Frenzel 761	20/03/52
42690	Braço Joaquim, Luis Alves - SC	Reitz e Klein 2880	22/03/56
42688	Bocaiúva do Sul, Paraná - PR	G. Hatschbach 6940	05/04/60
31601	Argentina	T.M. Pedersen 5867	06/03/61
18504	Itaperussu, Rio Branco do Sul - PR	G. Hatschbach 26581	24/03/71
20680	Rio Tupitinga, Guaratuba - PR	G. Hatschbach 29301	11/03/72
62226	Três Lagoas, Foz do Iguaçu - PR	O.M. Klun e E. Buttura 19	08/07/79
202695	Rio Vermelho, Florianópolis - SC	M.L. Souza e D.B. Falkenberg 724	29/03/85
245272	Amaporã – PR	S. Goetzke 318	08/04/86
167358	Bairro Pilarzinho, Curitiba - PR	O.S. Ribas 637	27/03/94
226670	APA do Arujá, São José dos Pinhais – PR	D.P. Zakrewski e L.F. Rocha s/n	23/05/97
236522	Margens do Rio Tainhas, Bom Jesus – RS	M.Rossato e R.Wasum 52	19/03/99
42689	Rio Pereque, Paranaguá - PR	G. Hatschbach 3668	N.C ¹ .
257314	Parque Paraíso da Serra, São Francisco de Paula - RS	R. Wasum 551	12/03/00
266085	Jardim Botânico, Curitiba - PR	A.C.W. Heemann e O.G.Miguel 1	11/04/02
266086	Jardim Botânico, Curitiba - PR	A.C.W. Heemann e O.G.Miguel 2	23/04/02

¹N.C. não consta

FIGURA 1 - Distribuição geográfica do gênero *Pterocaulon* (CABRERA; RAGONOSE, 1978) modificado por Julio Cesar Winkler.



3.6.1 Aspectos Anatômicos do Gênero *Pterocaulon*

Cutículas com estrias, em disposição radial com relação às células oclusivas estomáticas e a base dos tricomas tectores. Epiderme adaxial formada por células de paredes anticlinais onduladas ou retas em vista superficial, de forma aproximadamente retangular em secção transversal. Estômatos anomocíticos presentes em ambas faces da folha, quase sempre elevados. Mesofilo bifacial, com uma camada de células emparelhadas pouco conspícuas. Nervura mediana com um ou vários vasos formando um arco. Colênquima laminar ou laminar-angular na nervura mediana. Drusas de oxalato de cálcio muito numerosas, às vezes cristais simples, rômnicos ou prismáticos dispersos no mesofilo, presentes na maioria das espécies. As folhas, que são decorrentes no comprimento do caule, possuem na alas destes a mesma estrutura que na parte livre. O caule se caracteriza por apresentar no estado primário, um anel de feixes colaterais rodeado por um córtex de células parenquimáticas de paredes delgadas. Medula formada por grandes células parenquimáticas de paredes lignificadas. Não existem neste gênero canais resiníferos esquizógenos, como é comum em outros membros da família, nem tampouco floema interno.

O estudo comparativo dos tricomas de todas as espécies do gênero revelou a existência de tricomas glandulares e tectores, sendo que estes podem ser do tipo I, frageliforme septado ou do tipo II, flageliforme não septado, o qual possui base unicelular que se dispõe por cima de um grupo de comumente quatro células epidérmicas não modificadas. Corpo formado por duas a cinco células, com as bases curtas, mais ou menos retangulares e a apical flageliforme, muito comprida e recurvada, de parede grossa e de secção circular. A parede basal desta célula é transversa e oblíqua, as vezes com pontuações. Este tipo de tricomas é observado em todas as espécies americanas: *Pterocaulon lorentzii*, *Pterocaulon angustifolium*, *Pterocaulon purpurascens*, entre outras espécies (CABRERA; RAGONESE, 1978). A presença de tipos particulares de tricomas podem freqüentemente caracterizar espécies, gêneros e até famílias (METCALFE; CHALK, 1988).

3.6.1.1 Aspectos anatômicos da espécie *Pterocaulon interruptum* DC.

Planta perene, de 1 a 1,5 m de altura, caules eretos, delicados, pentáalados, lanosos, folhosos. Folhas alternas, sésseis e decorrentes, as inferiores são obovado-lanceoladas, obtusas no ápice e semi-inteiras ou ligeiramente dentadas na margem, de 10 a 15 cm de comprimento por 2,5 a 4 cm de largura. Folhas superiores lanceoladas, agudas, mais ou menos dentadas, de 8 a 10 cm de comprimento por 1,5 a 3 cm de largura. Presença de tricomas do tipo II, flageliforme não septado. Capítulos muito numerosos, sésseis, dispostos em espigas. Invólucro acampanado, de 5 mm de altura por 3,5 mm de diâmetro; brácteas exteriores lanceoladas, lanosas; as interiores lineares, glabras. Flores dimorfas: as marginais numerosas, femininas, com corola filiforme de 4 mm de largura, dentada no ápice. Flores do disco, hermafroditas (ou masculinas), 3 a 5, com corola tubulosa, pentadentada no limbo. Aquênios pubescente-glandulosos. Pappus branco (CABRERA, 1963).

3.6.2 Posição Sistemática do *Pterocaulon interruptum* DC.

	ENGLER (1964)	CRONQUIST (1998)
Divisão	Angiospermae (Anthophyta)	Magnoliophyta
Classe	Dicotyledoneae	Magnoliopsida
Sub-classe	Sympetalae (Gamopetalae)	Asteridae
Ordem	Campanulales (Synandreae)	Asterales
Família	Compositae	Asteraceae
Gênero	<i>Pterocaulon</i>	<i>Pterocaulon</i>
Espécie	<i>Pterocaulon interruptum</i>	<i>Pterocaulon interruptum</i>

3.6.3 Aspectos Agronômicos

O cultivo de plantas medicinais envolve a possibilidade de domesticação da espécie a ser utilizada (SIMÕES et al., 2000). A espécie em estudo não apresenta-se domesticada, ou seja, deverá sofrer processo de adaptação em condições adequadas para seu bom desenvolvimento, caso sejam comprovadas as atividades biológicas descritas. Uma vez que a espécie é bem distribuída na região sul do Brasil, há grandes possibilidades de haver fácil adaptação em solos desta região.

Por meio de informações etnobotânicas, é sabido que a parte utilizada para fins terapêuticos são as partes aéreas. Assim sendo, havendo rebrota, a espécie poderá ser preservada nos canteiros de cultivo, evitando práticas de extrativismo.

3.6.4 Aspectos Quimiotaxonômicos

No início do século XIX, De Candolle (1816) introduziu a questão, “plantas diferentes nascidas em solos idênticos continham produtos diferentes enquanto que plantas análogas nascidas em solos completamente diferentes formavam produtos análogos”. Considerando assim, a composição química como um caráter taxonômico (SIMÕES et al., 2000).

A presença de certos compostos em determinados grupos de plantas é de grande importância nos estudos sobre evolução. Segundo alguns autores, a existência de um padrão comum no metabolismo secundário pode prover

evidências mais corretas de parentesco do que similaridades morfológicas, que podem tanto ser devidas a ancestrais comuns quanto à evolução convergente (SIMÕES et al., 2000).

Estudo sobre métodos quimiosistemáticos realizado por SILVA, 1978, apresenta diversas famílias vegetais caracterizadas pela presença de vários tipos de cumarinas.

Salienta-se a importância da quimiotaxonomia na área farmacêutica, uma vez que aliado a estudos etnofarmacológicos são aumentadas as possibilidades de se desenvolver novos fármacos.

Até o presente momento, a presença de cumarinas em diversas espécies de *Pterocaulon* tem caracterizado grande significado para pesquisa quimiotaxonômica.

3.6.5 Aspectos Fitoquímicos

Em 1968, JOHNS et al., isolaram a 6,7-dimetoxi-cumarina de *Pterocaulon sphacelatum*.

MARTINO et al., 1979, isolaram ácidos cafeolquínicos do extrato metanólico a 25% particionado com éter de petróleo, clorofórmio e éter etílico de *Pterocaulon virgatum* e *Pluchea sagittalis*.

Em MAGALHÃES, 1981, apresenta-se o isolamento de oito cumarinas do extrato etéreo das partes aéreas das espécies *Pterocaulon balansae* e *Pterocaulon lanatum*.

Foram isoladas, do extrato clorofórmico, duas cumarinas denominadas sabandinol e sabandinona por DEBENEDETTI et al., 1981. A cumarina sabandinol, havia sido anteriormente isolada e caracterizada por GONZÁLEZ et al., 1973 da espécie *Ruta pinnata* (Rutaceae).

BOHLMANN et al., (1981) foram responsáveis pelo estudo de *Pterocaulon virgatum*, do qual isolaram humuleno, esqualeno, timohidroquinona dimetil éter, taraxasterol, o respectivo acetato, aromadendrina 7-O-prenilada e taxifolina 7-O-prenilada, entre outros. A ocorrência de tiofenos acetilados em raízes de *Pterocaulon virgatum* confirma que o gênero pertence à tribo Inuleae.

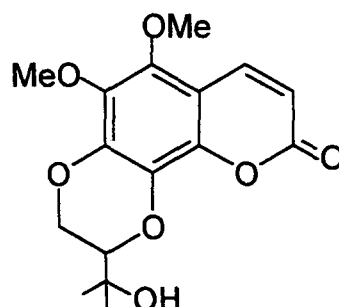
No estado da Bahia, Brasil, foram coletadas raízes de *Pterocaulon virgatum* e submetidas a estudo na Alemanha por BOHLMANN et al., 1985. Os autores

demonstraram o isolamento de sesquiterpenos e tiofenos acetilados, derivados de himachalano.

O trabalho realizado por MAGALHÃES, 1989 relata poliacetilenos em quatro outras espécies: *Pterocaulon allopecuroides*, *Pterocaulon balansae*, *Pterocaulon lanatum* e *Pterocaulon rugosum*. Das raízes destas espécies foram isolados e identificados oito poliacetilenos, sendo que um deles não havia sido relatado anteriormente. As espécies *Pterocaulon allopecuroides* e *Pterocaulon balansae* apresentam morfologia similar, havendo diferenciação significativa relacionada à constituição química destas espécies.

Isolou-se de *Pterocaulon purpurascens*, uma 5,6,7,8-tetraoxigenada cumarina cuja estrutura ainda não havia sido publicada, denominada purpurenol (Figura 2 p.18) (DEBENEDETTI et al., 1991).

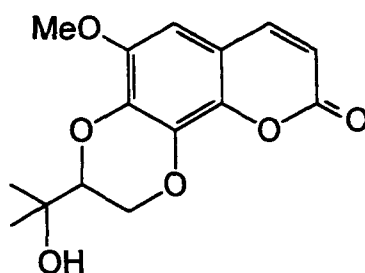
FIGURA 2 - PURPURENOL



Também do *Pterocaulon purpurascens* foi isolado uma nova cumarina trioxigenada, denominada purpurasol (DEBENEDETTI et al, 1992).

BOEYKENS et al., 1994 publicaram um trabalho contestando a caracterização do purpurasol e indicando que a estrutura do referido composto é idêntica ao obtusifol (Figura 3 p.18), cumarina isolada de *Haplophyllum obtusifolium* por GASHIMOV & KUZNETSOVA em 1974.

FIGURA 3 - OBTUSIFOL



Das partes aéreas do *Pterocaulon polystachium* foram isolados: quercetina (0,04%) e isohamnetina (0,08%), ácido caféico (0,01%), ácido clorogênico (0,23%), ácido isoclorogênico (1,49%), ácido 4,5-dicafeolquínico (0,09%), ácido 3,5-dicafeolquínico (0,97%), ácido 3,4-dicafeolquínico (0,44%) (DEBENEDETTI et al., 1994a).

Estudos realizados por DEBENEDETTI et al., 1994b, isolaram a cumarina 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilenodioxicumarina (Figura 4 p.19) e 5-metoxi-6,7-metilenodioxicumarina (Figura 5 p.19), de *Pterocaulon balansae*.

FIGURA 4 - 5-(3-METIL-2-BUTENILOXI)-6,7-METILENODIOXICUMARINA)

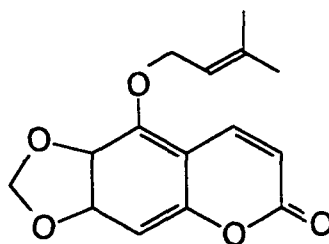
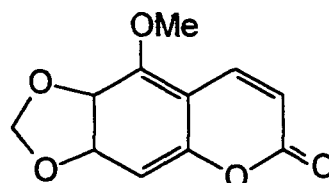


FIGURA 5 - 5-METOXI-6,7-METILENODIOXICUMARINA



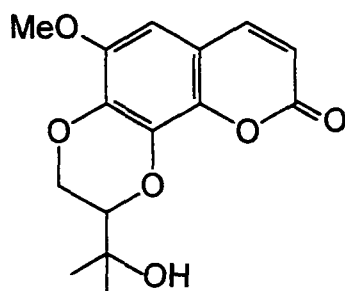
Das partes aéreas do *Pterocaulon virgatum* (L.) DC. foram isolados cinco flavonóides (DEBENEDETTI et al., 1984), o ácido 3,4-dicafeolquínico (MARTINO, 1989) e duas cumarinas (DEBENEDETTI et al., 1981).

VILEGAS et al., em 1995, estudaram partes aéreas da espécie *Pterocaulon alopecuroides* coletada da Serra do Taboão, estado de Minas Gerais, Brasil.

Foram isoladas duas cumarinas oxipreniladas, 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxi cumarina e 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-5-hidroxi-6-metoxi cumarina e um flavononol, 3,5,3',4'-tetrahidroxi-7-(2,3-eno-3-metilbutioxi)-2,3-dihidroflavonol.

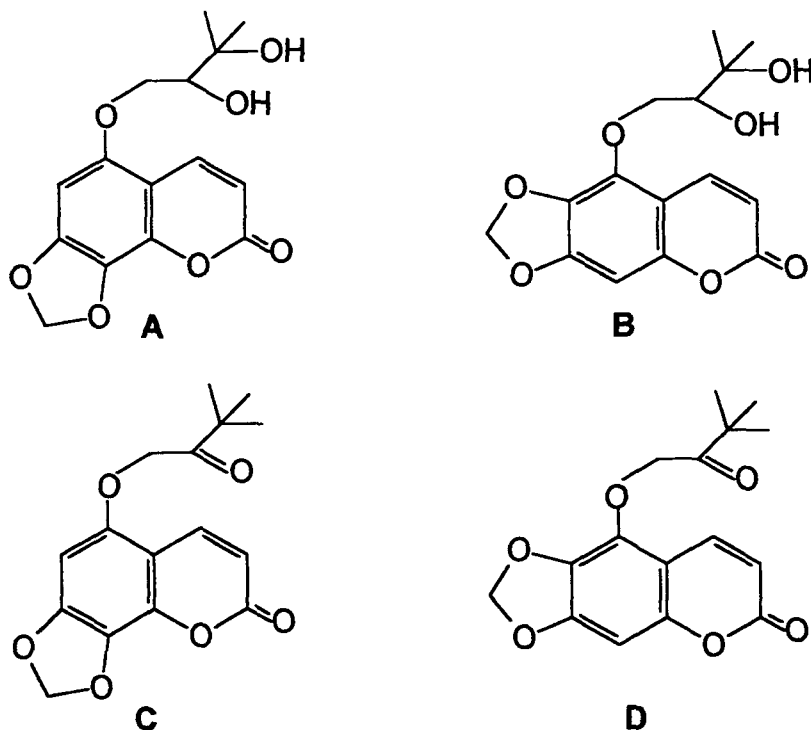
Isolou-se uma cumarina 5,6,7,8-tetraoxigenada, {2,3-dihidro-6-hidroxi-2-(1-hidroxi-1-metiletil)-5-metoxi-9H-pirano[2,3-f]-1,4-benzodioxina-9-ona} denominada purpurasolol (Figura 6 p.20) de *Pterocaulon purpurascens* (DEBENEDETTI et al., 1996).

FIGURA 6 - PURPURASOLOL



DEBENEDETTI et al., 1997, realizaram uma revisão estrutural de quatro cumarinas de espécies de *Pterocaulon* (Figura 7 p.20).

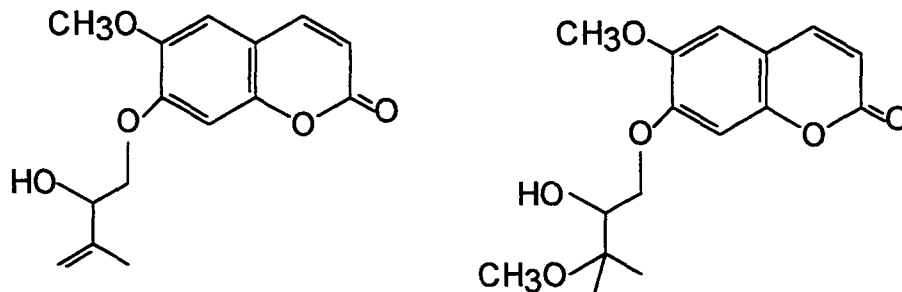
FIGURA 7 - ESTRUTURAS A E C – SABANDINOL E SABANDINONA RESPECTIVAMENTE (DEBENEDETTI et al., 1981). ESTRUTURAS B E D – CORREÇÃO DAS ESTRUTURAS DE SABANDINOL E SABANDINONA RESPECTIVAMENTE (DEBENEDETTI et al., 1997)



Foram isoladas e identificadas, dos extratos etéreo e clorofórmico, seis cumarinas da mesma fonte, sendo que duas não apresentam publicação anterior, denominadas virgatenol e virgatul (Figura 8 p. 21) e as quatro cumarinas conhecidas 7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxi cumarina; 7-(2,3-dihidroxi-

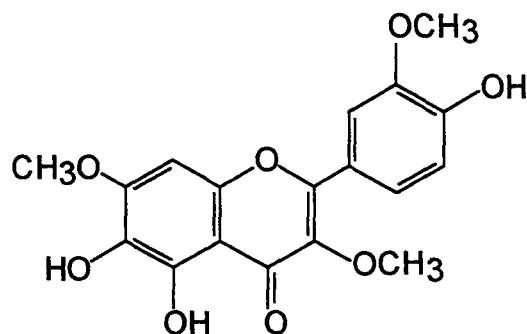
metilbutoxi)-6-metoxi cumarina, ayapin e escopoletina (DEBENEDETTI et al., 1998).

FIGURA 8 - VIRGATENOL E VIRGATOL



Em 1999, SEMPLE et al., isolaram um flavonóide, de *Pterocaulon sphacelatum* (Labill.) Benth. & Hook f. ex F. Muell, denominado chrysosplenol C (3,7,3'-trimetoxi-5,6,4'-trihidroxi-flavona) (Figura 9 p.21) responsável pela inibição da replicação de poliovírus. Este composto é um 4'-hidroxi-3-metoxiflavona, grupo reconhecido por ser inibidor potente e específico na replicação de picornaviral.

FIGURA 9 - CHRYSOSPENOL C



3.6.6 Aspectos Biológicos e Farmacológicos

As espécies da família Asteraceae produzem frequentemente poliacetilenos, óleos essenciais e terpenos, sendo que a larga ocorrência de lactonas sesquiterpênicas é a característica química mais marcante da família. São conhecidas mais de 2500 lactonas, a maioria isoladas de Asteraceae. Muitas apresentam atividade antitumor, mas nenhuma com emprego clínico. Apresentam também atividade antibacteriana, antifúngica, anti-helmíntica, anti-inflamatória e antipirética. Muitas são conhecidas por causarem dermatite, enquanto outras

inibem a penetração da cercária de *Schistosoma mansoni*. A presença de óleos essenciais e lactonas sesquiterpênicas poderia ser responsável pelo uso popular contra dores, febres, indigestão e doenças infecciosas (STEFANELLO, 1993).

MARTINO et al., 1979 relataram que ensaios em ratos demonstraram o aumento do fluxo biliar quando administradas *Pterocaulon virgatum* e *Pluchea sagittalis*, as quais são popularmente descritas como digestivas, devido, provavelmente, ao elevado conteúdo de ésteres do ácido caféico (p. ex. ácido 3,4-dicafeolquínico).

As partes aéreas de *Pterocaulon purpurascens* Malme são utilizadas na medicina popular argentina devido suas propriedades digestivas, inseticidas e como agente contra picada de cobras (SORARÚ & BANDONI, em DEBENEDETTI et al., 1992).

As partes aéreas do *Pterocaulon virgatum* (L.) DC. são utilizadas na medicina tradicional argentina devido suas propriedades digestivas, emenagogas, inseticidas e como agente contra picadas de cobras (SORARÚ & BANDONI, em DEBENEDETTI et al., 1994a).

As partes aéreas do *Pterocaulon polystachium* apresentam utilização na medicina tradicional argentina como repelente de pulgas e moscas e como decocto em casos de insolação (MARTINEZ, 1981 em DEBENEDETTI et al., 1994a).

Em estudo sobre a atividade antiviral de plantas medicinais australianas, partes aéreas verdes da espécie *Pterocaulon sphacelatum* (Labill.) Benth. & Hook f. ex F. Muell, indicadas na medicina tradicional para uso em resfriados, infecções respiratórias, feridas de pele e doenças oculares, apresentou grau de inibição de 75% de poliovírus tipo 1, representante da família Picornaviridae, família de RNA vírus nos quais são incluídos os rinovírus, principal causa de resfriados. (SEMPLE et al., 1998; PALOMBO; SEMPLE, 2001).

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

Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus, 1762) e *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) são mosquitos vetores de arbovírus que infectam o homem e, no Brasil, infestam 3.592 e 1.533 municípios, respectivamente. Diversos estudos sobre ecologia, biologia, controle e descrição de criadouros dessas espécies têm sido desenvolvidos. Os criadouros preferenciais para *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* são os recipientes artificiais como: latas, vidros, vasos de cemitérios, caixas d'água e pneus. Dentre os criadouros artificiais, onde ambas as espécies são encontradas, os pneus têm merecido atenção da vigilância epidemiológica por apresentarem criação relevante desses mosquitos. Esses depósitos conseguem armazenar grande quantidade de água, proporcionam baixa evaporação e são importantes artigos de comércio em nível nacional e internacional, o que facilita a dispersão passiva das espécies (HONÓRIO; OLIVEIRA, 2001).

O uso de extratos de plantas no controle de insetos possui grande interesse para o homem e representa um método de controle alternativo para minimizar os efeitos nocivos de alguns compostos pesticidas em outras espécies de insetos e ao meio ambiente (FATOPE et al., 1993). Diante disso, estudos realizados por CICCIA et al., na Argentina, publicados em 2000, relatam a ação do *Pterocaulon polystachium* como inseticida, apresentando atividade contra a larva do mosquito *Aedes aegypti*, vetor de arbovírus, responsável pela febre amarela e de dengue hemorrágica, a qual é endêmica no sudeste asiático, ilhas do Pacífico, África e Américas (MAILLARD; MARSTON; HOSTETTMANN, 1993 em CICCIA, 2000).

Na tabela 2 p. 24 são demonstradas em resumo as ações biológicas de quatro espécies de *Pterocaulon*, sendo que para a espécie em estudo não foram encontradas ações biológicas descritas na literatura consultada.

TABELA 2 – RESUMO DAS AÇÕES BIOLÓGICAS DE ESPÉCIES DE *Pterocaulon*

<i>Espécie</i>	<i>Ações biológicas</i>	<i>Autor</i>
<i>Pterocaulon virgatum</i> (L.) DC.	Digestiva	MARTINO et al., 1979
	Digestiva, emenagoga, inseticida e agente contra picadas de cobras	SORARÚ & BANDONI, em DEBENEDETTI et al., 1994
<i>Pterocaulon purpurascens</i> Malme	Digestiva, inseticida e agente contra picada de cobras	SORARU E BANDONI, em DEBENEDETTI et al., 1991
<i>Pterocaulon polystachium</i>	Repelente de pulgas e moscas e em casos de insolação	MARTINEZ, 1981 em DEBENEDETTI et al., 1994
	Atividade em células de carcinoma epidermóide oral humano e DNA	MONGELLI et al., 2000
	Atividade contra a larva do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	CICCIA et al., 2000.
<i>Pterocaulon sphacelatum</i> (Labill.) Benth. & Hook f. ex F. Muell	Resfriados, infecções respiratórias, pele sensível, irritações oculares e inibição de 75% de poliovírus tipo 1	SEMPLE et al., 1998
	Inibição da replicação de poliovírus	SEMPLE et al., 1999

3.6.6.1 Atividade antimicrobiana

O conhecimento sobre determinadas espécies vegetais com propriedades antimicrobianas têm sido revisto e ampliado, devido aos crescentes problemas associados ao uso de diversos antibióticos (YUNES; CALIXTO, 2001).

Em ampla revisão sobre plantas medicinais, RECIO et al., 1989 em YUNES; CALIXTO, 2001, fizeram uma avaliação concreta sobre a atividade antimicrobiana de extratos, óleos essenciais e de substâncias obtidas de espécies vegetais frente cepas de bactérias gram-positivas, gram-negativas e espécies antifúngicas. Mais recentemente, outros autores revisaram os efeitos antimicrobianos de produtos naturais e verificaram o grande arsenal de moléculas potencialmente antimicrobianas (COWAN, 1999).

Com relação aos microrganismos, geralmente são selecionados e utilizados nos ensaios microbiológicos, gêneros e espécies de bactérias e fungos ou outros microrganismos patogênicos. Podem ser cepas padrão como *American*

Type Culture Collection – ATCC ou *Centraalbureau voor Schimmelcultures – CBS*, ou microrganismos isolados a partir de materiais biológicos. Nos testes de atividade antimicrobiana sempre estão incluídos bactérias gram-positivas: *Staphylococcus aureus*; gram-negativas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*; *Mycobacterium smegmatis* ou *M. phlei*, que representam bactérias ácido-resistentes; *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, dermatófitos, os fungos (YUNES; CALIXTO, 2001).

Realiza-se análise para verificação do potencial antimicrobiano também em substâncias isoladas de plantas, entre elas os flavonóides tem destaque especial havendo relatos de efeitos antimicrobianos importantes da quercetina, rutina e apigenina frente a cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e outras bactérias (YUNES; CALIXTO, 2001).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

Foram realizadas duas coletas do material botânico, sendo a primeira no litoral do Estado de Santa Catarina, Município de Piçarras nos meses de janeiro e fevereiro de 2001 e a segunda no bairro Jardim Botânico, Município de Curitiba – Paraná nos meses de março e abril de 2002.

A determinação botânica foi realizada pelo botânico Gert Hatschbach, curador do herbário do Museu Botânico Municipal da cidade de Curitiba, Estado do Paraná e pelo biólogo Osmar dos Santos Ribas, exsicatas encontram-se depositadas no mesmo local sob os números 266085 e 266086.

4.2 ESTUDOS FITOQUÍMICOS

Na investigação fitoquímica, as partes aéreas coletadas foram submetidas a seleção visual, excluindo-se material orgânico estranho e partes não sadias (atacadas por insetos, fungos, ressecadas ou oxidadas). Posteriormente, este foi fragmentado e seco em temperatura ambiente. Após secagem, foi fragmentado e acondicionado em recipientes apropriados, ao abrigo da luz e umidade.

4.2.1 Marcha Sistemática Fitoquímica

De acordo com MOREIRA, 1979, foram preparados pelo método de maceração, extrato aquoso a 20% e extrato hidroalcoólico a 20% do vegetal em estudo, para determinação do resíduo seco e dos seguintes grupos químicos:

1. Extrato hidroalcoólico: glicosídeos flavônicos, alcalóides, esteróides e/ou triterpenos, aminogrupos, glicosídeos cumarínicos e glicosídeos antraquinônicos.
2. Extrato aquoso: glicosídeos antociânicos, saponinas, glicosídeos cianogenéticos, taninos (condensados e hidrolisáveis), aminogrupos e flavonóides.

4.2.1.1 Preparo do extrato hidroalcoólico a 20%

Realizou-se extração por maceração em banho-maria a 70°C por 90 minutos de 40 g das partes aéreas de *Pterocaulon interruptum* DC. estabilizadas e moídas, em 200 mL de álcool etílico a 70 %. Após 24 horas, o macerado foi filtrado por meio de papel de filtro e completou-se o volume até 200 mL, lavando-se o marco com líquido extrator. O extrato foi mantido sob refrigeração até a realização de todos ensaios fitoquímicos.

4.2.1.2 Preparo do extrato aquoso a 20%

Em banho-maria a 70°C, realizou-se extração de 40 g das partes aéreas de *Pterocaulon interruptum* DC. estabilizadas e moídas, em 200 mL de água destilada por 90 minutos. Após 24 horas, o macerado foi filtrado por meio de papel de filtro e completou-se o volume até 200 mL, lavando-se o marco com líquido extrator. O extrato foi mantido sob refrigeração até a realização de todos ensaios fitoquímicos.

4.2.1.3 Pesquisa de alcalóides

A pesquisa de alcalóides foi realizada utilizando-se os reativos gerais de alcalóides (Mayer, Dragendorff, Bouchardat e Bertrand). Foi evaporado à secura 50 mL de extrato hidroalcoólico em banho-maria a 70 °C, seguido de dissolução do resíduo em 1 mL de etanol e 20 mL de ácido clorídrico a 1 %. Foi transferido para 5 tubos de ensaio, 1 mL do extrato clorídrico (em cada tubo) e efetuou-se a pesquisa de alcalóides com os reativos gerais. O aparecimento de precipitado indica reação positiva. Para confirmar a reação foram transferidos 15 mL do extrato hidroalcoólico para um funil de separação e alcalinizou-se com hidróxido de amônio até pH 10. Extraíu-se com uma mistura de éter : clorofórmio (3 : 1), este extrato foi submetido às mesmas reações anteriores.

4.2.1.4 Pesquisa de flavonóides

A pesquisa de flavonóides foi realizada pela reação de Schinoda ou reação da cianidina, inicialmente com o extrato alcoólico total, e após extração seletiva.

Em tubo de ensaio foram transferidos 5 mL do extrato hidroalcoólico. Juntou-se 200 mg de limalha de magnésio e 1 mL de ácido clorídrico fumegante

pelas paredes do tubo. O desenvolvimento de coloração alaranjada indica a presença de flavonas, violácea indica a presença de flavanonas e vermelha indica a presença de flavonóis. A limitação da técnica é que chalconas, auronas e isoflavonas não desenvolvem coloração, porém algumas chalconas em meio ácido produzem flavanonas.

4.2.1.5 Pesquisa de cumarinas

Foi transferido para um béquer 30 mL do extrato hidroalcoólico e acidificado até pH 1, concentrado em banho-maria a 60 °C até 10 mL. Ao resíduo foi adicionado 5 mL de água deionizada e extraído em funil de separação com éter etílico em três porções de 10 mL. Reduziu-se o volume do extrato orgânico até 5 mL em banho-maria a 60 °C. Depositou-se 3 gotas do extrato etéreo em papel de filtro, previamente demarcados. Deixou-se secar e foi adicionada 1 gota de hidróxido de sódio N sobre as manchas 1 e 2. Com a mancha 2 encoberta por uma moeda, observou-se, sob luz ultravioleta em ondas longas a presença de fluorescência cor azul ou verde-amarelada indicando reação positiva.

Em um tubo de ensaio, adicionou-se 5 mL do extrato etéreo e 2 mL de hidróxido de amônio SR, agitou-se e observou-se sob luz ultravioleta. A presença de fluorescência de azul ou verde-amarelada indica reação positiva.

4.2.1.6 Pesquisa de antraquinonas

A pesquisa de antraquinonas foi realizada pela reação de Borntraeger, com NH_4OH . Em um balão de fundo chato de 100 mL foram transferidos 30 mL do extrato hidroalcoólico e adicionados 5 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico a 10 %. O balão foi acoplado a um condensador e levado ao refluxo por 30 minutos. O extrato foi filtrado, ainda quente, por papel de filtro. Ao filtrado foi adicionado 30 mL de água deionizada, transferido para um funil de separação e foi extraído com éter etílico por duas vezes de 10 mL. A fase orgânica foi separada e concentrada em banho-maria a 60 °C até 5 mL e transferido para um tubo de ensaio, foram adicionados 5 mL de solução de hidróxido de amônio N. Agitou-se lentamente para evitar elevação excessiva da pressão interna. O desenvolvimento de coloração rósea-vermelha indica a presença de antraquinonas; o desenvolvimento

de coloração violeta indica a presença de naftoquinonas e se houver desenvolvimento de coloração azul está indicada a presença de benzoquinonas.

4.2.1.7 Pesquisa de esteróides e triterpenos

Em um béquer, foram evaporados à secura 30 mL do extrato hidroalcoólico em banho-maria a 60 °C. O resíduo seco foi dissolvido com 5 mL de clorofórmio e filtrado. Foram pipetadas alíquotas de 0,1 mL, 0,5 mL e 1,0 mL do extrato clorofórmico para tubos de ensaio e o volume foi completado para 2,0 mL com clorofórmio. Foi adicionado em cada tubo de ensaio, 1 mL de anidrido acético e 1 a 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado (reação de Liebermann-Burchard). O desenvolvimento de coloração de azul a verde indica a provável presença de núcleo esteroidal e o aparecimento de coloração vermelha, rósea, púrpura ou violácea indica a presença provável de policíclicos triterpênicos.

4.2.1.8 Pesquisa de heterosídeos antociânicos

Em três tubos de ensaio foram separadas três porções de 5 mL do extrato aquoso. O primeiro foi acidificado com ácido sulfúrico N até pH 1; o segundo foi alcalinizado com hidróxido de sódio até pH 10 e o terceiro foi neutralizado até pH 7. O aparecimento de diferentes colorações indicam a presença de heterosídeos antociânicos.

4.2.1.9 Pesquisa de saponinas

Os três tubos de ensaio utilizados na análise de heterosídeos antociânicos foram agitados energicamente por cinco minutos. Em seguida foram deixados em repouso por trinta minutos. Mediu-se a espuma formada. Espuma persistente, maior ou igual a um centímetro indica a presença de heterosídeos saponínicos.

4.2.1.10 Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos

Transferiu-se 15 mL do extrato aquoso para um tubo de ensaio e adicionou-se 1 mL de ácido sulfúrico N sem umedecer as paredes do tubo. Suspendeu-se uma tira de papel picro-sódico com o auxílio de uma rolha de cortiça, sem que a tira tocasse no extrato. O tubo de ensaio foi transferido para o

banho-maria a 60 °C, durante 30 minutos. O papel adquirindo coloração vermelha, indica presença de heterosídeos cianogénicos.

4.2.1.11 Pesquisa de taninos

a) Reação com cloreto férrico 1 % (m/V)

A 5 mL do extrato aquoso adicionou-se 5 gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1 %. O desenvolvimento de coloração verde a azul, cinza, marrom ou formação de precipitado indicam a presença de tanóides.

b) Reação com sulfato de ferro amoniacal 1 % (m/V)

A 5 mL do extrato aquoso, foram adicionados 2 gotas de sulfato de ferro amoniacal solução aquosa a 1 %. O desenvolvimento de coloração de verde a azul indica a presença de tanóides.

c) Reação com acetato de chumbo 10 % (m/V)

A 5 mL do extrato aquoso, foram adicionados 5 mL de ácido acético a 10 % e gota a gota, 5 mL de acetato de chumbo solução aquosa a 10 %. A formação de precipitado indica a presença de tanóides.

d) Precipitação com solução de gelatina a 2,5 % em cloreto de sódio a 0,9%

Foram transferidos para tubos de ensaio: 0,5 mL, 1,0 mL e 2 mL do extrato aquoso. Adicionou-se em cada tubo 2,0 mL da solução de gelatina a 2,5 %. A formação de precipitado nesta fase indica a presença de tanóides.

e) Reação com formol-clorídrico

Foram transferidos para um balão de fundo chato de 100 mL. de capacidade, 30 mL do extrato aquoso, 6,0 mL de formaldeído e 4,0 mL de ácido clorídrico concentrado. O balão foi acoplado a um condensador de bolas e levado ao refluxo por uma hora. Foi filtrado a quente e separado o filtrado. O resíduo do papel de filtro foi lavado com álcool etílico a 70 %. Gotejou-se sobre o resíduo gotas de solução aquosa de hidróxido de sódio a 5 %. O desenvolvimento de coloração azul indica a presença de taninos condensados. Ao filtrado foi

adicionado excesso de acetato de sódio e três gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1 %. O desenvolvimento de coloração azul indica a presença de taninos hidrolisáveis.

4.2.1.12 Pesquisa de aminogrupos

Em um béquer concentrou-se 10 mL do extrato aquoso, em banho-maria a 60 °C, até o volume de 5 mL. Depositou-se em papel de filtro, em pontos previamente determinados, 5 gotas do extrato concentrado. Deixou-se secar e nebulizou-se reativo de ninhidrina sobre o papel de filtro, o qual foi levado para a estufa à temperatura de 100 °C por 15 minutos. Desenvolvendo-se a coloração azul-violácea, indicando a presença de aminogrupos.

4.2.2 Extração do Óleo Essencial

Para detectar a presença de óleo essencial, foi utilizado material seco, estabilizado e fragmentado (150 g de partes aéreas). O material foi submetido à hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger, modificado por WASICKY (1963), anotando-se o rendimento bruto após o funcionamento ininterrupto do aparelho por um período de 6 horas.

4.2.3 Extração em Soxhlet Modificado

Foram utilizadas 420 g das partes aéreas de *Pterocaulon interruptum* DC., secas e estabilizadas, as quais foram submetidas a sete extração com alíquotas de 60 g de planta em cada extração.

Em cartucho de vidro com placa porosa nº 1, adicionou-se 60 g da planta. O cartucho de vidro foi colocado no interior do Soxhlet modificado, o qual possui uma saída na parte inferior para que na concentração do extrato e conseqüente recuperação do solvente, este não volte a refluxar. Em seguida foi adicionado 350 mL de hexano sobre a droga sendo recebido em balão de fundo chato de 500 mL, contendo pérolas de vidro. Conectou-se o conjunto ao condensador de bolas e iniciou-se o processo de aquecimento para a extração contínua onde o solvente condensado percolava pelo cartucho de vidro e eluía para o extrator até refluxar. Este procedimento foi mantido por três a quatro horas. Decorrido este tempo, retirando o cartucho de vidro, o extrato foi concentrado até estar praticamente

seco. Após a primeira extração e concentração todo equipamento foi limpo e seco e o cartucho contendo o marco residual foi novamente colocado no Soxhlet, sendo realizadas desta maneira mais três extrações com clorofórmio, acetato de etila e metanol.

Foram obtidas quatro frações sendo elas: fração hexânica, fração clorofórmica, fração acetato de etila e fração metanólica.

4.2.4 Determinação do Teor de Sólidos das Frações

Após a concentração das frações obtidas, estas foram acondicionadas em recipientes de vidro previamente tarados e identificados. Utilizando-se aquecimento em banho-maria, o restante do solvente foi evaporado, obtendo-se assim o teor de sólidos, posteriormente calculado em relação a quantidade de material vegetal utilizado.

4.2.5 Processamento das Frações Hexânica, Clorofórmica, Acetato de Etila e Metanólica

As quatro frações foram processadas da mesma forma, previamente dissolvidas em metanol e em seguida incorporadas a 6 g de Sílica gel 60 - Merck® - Art. 7734 – Tamanho da partícula 0,063-0,200 mm, 70-230 mesh ASTM (cerca de uma vez o seu peso seco) para formação da pastilha de sílica. Posteriormente foram submetidas à uma cromatografia em coluna (30 x 3 cm) empacotada com 30 g Sílica gel 60 (0,063 a 0,200 mm) Merck®. A amostra foi eluída com sistema de solventes na forma de gradiente de polaridade crescente, sendo utilizado hexano, acetato de etila e metanol. O controle da eluição foi realizado com lâmpada de ultravioleta à 360 nm. Após o recolhimento das frações e evaporação dos solventes, realizou-se cromatografia em camada delgada, utilizando-se cromatoplasmas de Sílica gel 60 F₂₅₄ Merck® e visualização em lâmpada UV nos comprimentos de onda de 360 nm, de 2 em 2 frascos para visualizar a semelhança do conteúdo, e em seguida, as frações foram reunidas dissolvendo-se em clorofórmio e em seguida em metanol.

4.2.6 Caracterização das Substâncias Isoladas

4.2.6.1 Cromatografia em camada delgada

As análises por cromatografia em camada delgada foram realizadas em cromatoplasmas de Sílica gel 60 F₂₅₄ Merck® e a visualização em lâmpada UV nos comprimentos de onda de 360 nm.

4.3.6.2 Espectroscopia de absorção no ultra violeta de flavonas e flavonóis

As substâncias isoladas foram submetidas à varredura na região do ultravioleta próximo. Os espectros foram registrados em espectrofotômetro Shimadzu UV 1601, no intervalo entre 200 e 500 nm.

As substâncias isoladas foram dissolvidas em metanol na concentração de 1 mg/100 mL. Cada série de espectros para cada uma das substâncias contém um em metanol (representando o espectro original da substância) e cinco obtidos pela adição de reagentes diagnósticos (NaOMe; NaOAc NaOAc/H₃BO₃; AlCl₃ e AlCl₃/HCl) de acordo com MABRY et al. (1970).

Os espectros de absorção de luz na região do UV foram interpretados segundo MABRY et al. (1970).

4.2.6.2.1 Em metanol

Exibe dois picos de absorção principal na região de 240 - 400 nm⁻¹. Estes dois picos referem-se comumente como Banda I (usualmente 300 – 380 nm⁻¹) e Banda II (usualmente em 240 – 280 nm⁻¹). A Banda I é considerada como associação com a absorção do anel B-cinamoil e a Banda II com absorção envolvendo o anel A, sistema benzoil.

4.2.6.2.2 Presença de NaOMe

O metóxido de sódio é uma base forte e ioniza todos os grupamentos hidroxila do núcleo flavonoídico. É utilizado para detecção de grupamentos hidroxila livres nas posições 3 e/ou 4' em flavonas e flavonóis.

4.2.6.2.2.1 Detecção de grupos hidroxila nas posições 3 e 4'

A adição de NaOMe em flavonas e flavonóis em metanol usualmente produz efeito batocrômico em todas as bandas de absorção. Sendo que na Banda I, o efeito é de aproximadamente 40 – 65 nm, sem diminuir a intensidade, é diagnóstico da presença de um grupo hidroxila livre em 4'. Alguns flavonóis que não apresentam grupo hidroxila livre em 4', possuem efeito batocrômico de 50 – 60 nm na Banda I, usualmente com diminuição na intensidade do pico. Estes compostos o efeito batocrômico resulta da presença de um grupo hidroxila livre na posição 3.

Obs. A presença de grupo hidroxila livre em 4' também pode ser detectado no espectro em NaOAc.

4.2.6.2.2.2 Detecção de sistema dihidroxil 3,4' em flavonóis

Os flavonóis que possuem grupos hidroxila livre em 3 e 4' são instáveis em NaOMe e os picos de absorção degeneram em poucos minutos. Flavonóis que contém sistema 3,3',4'-tri-hidroxil decompõem mais rapidamente que sistemas di-hidroxil. Embora a instabilidade em meio alcalino esteja geralmente associada a 3, 4'-di-hidroxil, outros modelos de hidroxilação em flavonas podem apresentar sensibilidade.

Os espectros devem ser obtidos medindo-se imediatamente após a adição de NaOMe e após 5 a 10 minutos.

4.2.6.2.3 Presença de NaOAc

O acetato de sódio é uma base mais fraca que o metóxido de sódio e ioniza somente os grupos hidroxilas fenólicas mais ácidas em flavonas e flavonóis, p. ex. 3,7- e 4'-hidroxila. A ionização do grupo 7-hidroxil afeta principalmente a banda II, enquanto que a ionização de 3- e 4'-hidroxil afeta

principalmente a banda I), NaOAc é um reagente diagnóstico útil para detecção específica de grupos 7-hidroxil.

4.2.6.2.4 Detecção de grupos 7-hidroxil

O espectro em ultravioleta de flavonas e flavonóis que contém grupo hidroxila livre em 7, com algumas exceções, exibem efeito batocrômico de 5 –20 nm na banda II em presença de NaOAc. Porém, quando 6 a 8 substituintes oxigenados estão presentes em flavonas (mas não em flavonóis) o efeito batocrômico é pequeno ou imperceptível, devido a redução da acidez do grupo 7-hidroxil.

4.2.6.2.4.1 Detecção de grupos 4'-hidroxil em flavonas e flavonóis por efeito de NaOAc

Flavonas e flavonóis que possuem grupo hidroxila livre em 4' e não livre em 3 ou 7 usualmente mostram um pronunciado ombro no lado do comprimento de onda longo da banda I na presença de NaOAc. O efeito na banda I é também observado quando o grupo hidroxila em 7 é livre e se um grupo 4'-hidroxil está presente ou não no flavonóide. Se for utilizado NaOAc contendo HOAc livre em flavonas e flavonóis contendo grupo hidroxila livre em 4', aparece um pico na banda I similar ao observado com NaOMe.

4.2.6.2.5 Degeneração do espectro em ultravioleta de flavonas e flavonóis na presença de NaOAc

O espectro de flavonas e flavonóis na presença de NaOAc mudam após alguns minutos pela decomposição na presença de álcali de um grupo sensível. O mais comum modelo de oxigenação alcali sensível em flavonas e flavonóis é quando contém 5,6,7; 5,7,8 ou 3,3', 4'-hidroxil grupos. No último modelo a função de 3' pode ser um grupamento metoxila. Por esta razão é difícil determinar a presença ou ausência de grupo hidroxila livre em 7 em flavonóides que possuem estes modelos de oxigenação a menos que o espectro seja obtido imediatamente após a adição de NaOAc na cubeta.

4.2.6.2.6 Detecção de grupos *orto*-hidroxil em flavonas e flavonóis por efeito de NaOAc/H₃BO₃

Na presença de NaOAc, o ácido bórico irá quelar os grupos *orto*-dihidroxil em todos os locais no núcleo flavonoídico, exceto em C-5 e C-6. Flavonas e flavonóis contendo um grupo *orto*-dihidroxil no anel B mostram um efeito batocrômico de 12 – 30 nm na banda I na presença de NaOAc/H₃BO₃. Grupos *orto* di-hidroxil no anel A (em C-6,7 ou C-7,8) em flavonóides também são detectados pelo efeito de NaOAc/H₃BO₃. Embora os dados sejam limitados, ocorre efeito batocrômico de 5 – 10 nm na banda I.

4.2.6.2.4 Presença de AlCl₃

O contato de cloreto de alumínio com flavonas e flavonóis, os quais contém grupamentos hidroxila em C-3 ou C-5 forma complexos ácidos estáveis, porém forma complexos ácidos instáveis em flavonóides que contém sistemas *orto*-dihidroxil. Sendo assim, a presença de grupamentos *orto*-dihidroxil no anel B de flavonas e flavonóis pode ser detectada pela comparação com o espectro do flavonóide na presença de AlCl₃ quando comparado com o espectro obtido com AlCl₃/HCl. Grupamentos *orto*-dihidroxil no anel A, envolvendo hidroxilação nos carbonos C-6,7 e C-7,8 podem também ser detectados por este método.

4.2.6.3 Espectroscopia de absorção no infravermelho

O espectro no infra vermelho (IV) foi obtido em equipamento Bomem – Hartmann & Braum MB-Série, preparando a amostra em pastilha comprimida de brometo de potássio anidro (KBr).

4.2.6.4 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C

Os espectros de ressonância nuclear magnética de próton e carbono-13 foram obtidos no Departamento de Química, da Universidade Católica de Roma, Itália. Os espectros de RMN ¹H foram obtidos em CDCl₃ a 300 MHz, enquanto os espectros de RMN ¹³C foram obtidos a 75,5 MHz também em CDCl₃.

4.2.6.5 Espectroscopia de massa

Os espectros de massa (m/e) foram obtidos em espectrômetro Shimadzu CGMS-Qp 2000 A.

4.3 ESTUDO MORFO-ANATÔMICO

Para o estudo morfo-anatômico foram selecionados diversos exemplares da espécie em estudo, dos quais foram realizadas secções da porção mediana do limbo foliar e da região de inserção do limbo no caule.

4.3.1 Processamento do Material Coletado

A fixação das partes aéreas para o preparo das lâminas permanentes foi realizada logo após a coleta, utilizando-se F.A.A. 70% (JOHANSEN, 1940), sendo posteriormente armazenados em álcool etílico 70%.

Para a montagem das lâminas semi-permanentes foi utilizado o método de BERLYN & MIKSCHE (1976). Realizaram-se secções transversais da porção central mediana das folhas. As secções foram feitas à mão livre e a clarificação das folhas foi efetuada com hipoclorito de sódio a 20% (FOSTER, 1949). Seguiu-se a coloração com azul de toluidina 0,05% (HADDAD, 1989) e fucsina básica + azul de astra (0,0125 e 1%, respectivamente) (ROESER, 1962). A montagem das lâminas foi desenvolvida usando-se glicerina a 50%, seguindo-se a lutagem com esmalte de unha incolor.

Para a preparação das lâminas permanentes, utilizou-se a técnica de inclusão em glicol metacrilato, de acordo com as indicações do fabricante (Polysciences®) e segundo FEDER & O'BRIAN (1968). Empregou-se o material previamente fixado e armazenado em álcool etílico 70%. As folhas, as bases peciolares e os caules sofreram secções transversais.

A microtomização foi realizada em micrótomo rotatório Spencer 820. As secções que possuíam de 7 a 9 μm foram hidratadas, distendidas nas lâminas e secas em mesa térmica. Para a coloração, empregou-se o azul de toluidina 0,05% (SAKAI, 1973) e a fucsina básica 0,0125% + azul de astra 1% em solução aquosa (BRITO & ALQUINI, 1996). Como meio de montagem foi usado o Entellan®.

4.3.2 Testes Microquímicos (Histoquímicos)

Para os testes microquímicos, foram obtidas secções transversais à mão livre das partes aéreas frescas de *Pterocaulon interruptum* DC., que foram tratadas com os seguintes corantes e reagentes: cloreto férrico (JOHANSEN, 1940) para comprovação de compostos fenólicos; floroglucinol acidificado (FOSTER, 1949) para evidenciar lignina; lugol (BERLYN & MIKSHE, 1976) indicador para amido e Sudam III (SASS, 1951) para substâncias graxas (paredes cutinizadas e suberizadas e gotículas de óleo essencial).

Os registros fotográficos foram realizados em Fotomicroscópio Zeiss MC-80. As escalas micrométricas foram fotografadas e ampliadas nas mesmas condições ópticas.

4.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para análise em microscópio eletrônico de varredura, utilizou-se amostras fixadas em F.A.A. 70% (JOHANSEN, 1940). Estas amostras foram desidratadas em série alcoólica-etílica, sendo que permaneceu 2 horas em álcool a 90% e em seguida por duas trocas de álcool absoluto a cada hora. Posteriormente, o material foi desidratado pelo método de ponto crítico em equipamento Balzers CPC 010 (SILVEIRA, 1989) e fixado em suporte metálico com auxílio de fita adesiva dupla face. A metalização em ouro foi feita em aparelho Balzers Sputtering SCD 030. As amostras foram analisadas e fotografadas em Microscópio Eletrônico de Varredura SEM 505 Philips e as escalas projetadas nas mesmas condições das fotografias.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana da fração hidrossolúvel do extrato etanólico das partes aéreas de *Pterocaulon interruptum* DC., foi realizada de acordo com a metodologia de difusão em disco, utilizando-se microrganismos patogênicos. O ensaio procedeu-se em condições totalmente assépticas em câmara de fluxo laminar, utilizando-se meio de cultura específico e suspensão padronizada dos microrganismos. Sobre este meio de cultura foram colocados discos de papel impregnados com suspensões padronizadas das amostras a serem testadas e

disco de cloranfenicol como controle positivo. Esse material então, foi incubado a 37 °C por 24h.

4.4.1 Preparo do Material

O material utilizado na realização do ensaio foi previamente separado e esterilizado em autoclave a 120°C por 15 minutos.

4.4.2 Preparo da Amostra

O extrato etanólico foi obtido por maceração de 420 g de planta por 7 dias em recipiente fechado ao abrigo da luz. Após a obtenção do extrato, a fração lipossolúvel foi retirada através de resfriamento em congelador, filtrando-se à vácuo imediatamente após a retirada do congelador.

A fração hidrossolúvel do extrato etanólico obtida, foi submetida a calor úmido em autoclave para esterilização a 120 °C por 15 minutos. Realizou-se a quantificação do resíduo seco, uma vez que o volume de extrato diminui, havendo concentração durante o processo de autoclavagem. A partir dos valores obtidos para o resíduo seco foram calculados os volumes da fração que seriam adequados para a obtenção das seguintes concentrações: 400 µg, 300 µg, 200 µg, 100 µg e 50 µg. Foi necessário proceder três diluições do material para a obtenção das concentrações desejadas sem ultrapassar o limite de absorção dos discos de papel.

4.4.3 Preparo dos Discos de Papel

Foram utilizados discos de papel de 6 mm de diâmetro (Newprov®), previamente autoclavados. Estes foram colocados sobre uma placa de petri estéril de 15 cm de diâmetro, devidamente identificadas e acrescentado a quantidade calculada do extrato com auxílio de micropipeta.

Os discos foram deixados em estufa a 35°C por 24 horas para total secura.

Foram também impregnados discos com água e etanol, solventes utilizados, para controle de qualidade.

4.4.4 Meio de Cultura

O meio de cultura utilizado para o estudo foi o ágar Müeller-Hinton, por se tratar de um meio não seletivo, propiciando assim o desenvolvimento das três cepas em estudo. As placas já preparadas contendo o ágar foram adquiridas da empresa Newprov®.

4.4.5 Preparo do Inóculo

As cepas utilizadas para o estudo foram *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), as quais foram repicadas em ágar Müller-Hinton 24 horas antes do preparo do inóculo para que estivessem na fase log de crescimento durante a preparo do mesmo.

Em câmara de fluxo laminar, com auxílio de alça foram retiradas colônias isoladas de cada uma das cepas e suspensas em tubos de ensaio contendo água destilada estéril. Após o preparo das suspensões foram realizadas as leituras da absorvância de cada inóculo, verificando-se assim a concentração microbiana.

Utilizou-se como parâmetro de turbidez, o tubo 5 da escala de McFarland, preparado de acordo com BIER (1980), obtendo-se suspensões bacterianas com concentrações apresentadas na tabela 7. As suspensões foram ajustadas para que o valor da absorvância do tubo 5, que foi de 0,07, fosse obtida exatamente.

As leituras foram realizadas em fotocolorímetro Spectronic 20, marca Bausch & Lomb, a 650 nm.

TABELA 3 - CONCENTRAÇÕES DAS SUSPENSÕES BACTERIANAS

Microrganismo	Absorvância Suspensões	Total de bactérias em suspensão (UFC/mL)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739)	0,07	$1,5 \times 10^9$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	0,07	$1,5 \times 10^9$
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	0,07	$1,5 \times 10^9$

4.4.6 Controles

Foram realizados os seguintes controles: esterilidade do meio, esterilidade dos discos de papel com e sem impregnação, ausência de inibição dos solventes frente às três cepas estudadas.

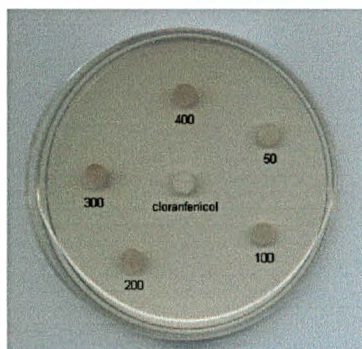
Em cada placa contendo as cepas inoculadas e os discos impregnados foram adicionados discos de cloranfenicol, uma vez que FERRARO et al., 1988 descrevem atividade inibitória deste antibiótico nas três cepas inoculadas.

4.4.7 Preparo do Teste

Após o preparo do inóculo, descrito em 4.4.5, em câmara de fluxo laminar foram inoculadas as cepas em água Müller-Hinton utilizando-se swab estéril, embebido na suspensão padronizada e retirando-se o excesso das paredes internas do tubo, girando-se a placa em 60°, esfregando-se três vezes para distribuição uniforme da suspensão bacteriana.

Em seguida foram distribuídos, em cada placa contendo as cepas, seis discos de papel impregnados com 400 µg, 300 µg, 200 µg, 100 µg, 50 µg e disco contendo o antibiótico cloranfenicol (Newprov®) (30 µg). A disposição dos discos com as devidas concentração foi realizada conforme figura 10 p. 41. O ensaio foi realizado em triplicata, e as placas prontas foram incubadas em estufa à 37 °C durante 24 horas. Passado este período, as placas foram retiradas da estufa, observadas e registradas.

FIGURA 10 - DISPOSIÇÃO DOS DISCOS NO ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDOS FITOQUÍMICOS

A análise fitoquímica preliminar demonstrou a presença de ácidos graxos, aminogrupos, cumarinas, esteróides e triterpenos e flavonóides. A positividade para alcalóides é explicada pela presença de cumarinas no vegetal, as quais podem interferir nesta análise.

TABELA 4 – RESULTADOS DA ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR

Metabólitos	Extrato aquoso	Extrato hidroalcoólico
Ácidos graxos	++	n.r.
Alcalóides	n.r.	++
Aminogrupos	+++	n.r.
Cumarinas	n.r.	+++
Esteróides e/ou triterpenos	n.r.	++
Flavonóides	n.r.	++
Glicosídeos antociânicos	-	n.r.
Glicosídeos antraquinônicos	n.r.	-
Glicosídeos cianogenéticos	-	n.r.
Leucoantocianidinas	n.r.	-
Saponinas	++	n.r.
Taninos	-	n.r.
Cor	Castanho	Verde amarelado
pH	6,0	6,0

Observações:	-	Resultado negativo	++	Resultado positivo
	+	Apresenta traços	+++	Resultado fortemente positivo
			n.r.	Não realizado neste extrato

Através do processo de hidrodestilação, foi obtido 0,2% de óleo essencial da espécie *Pterocaulon interruptum* DC., o qual possuía as seguintes características organolépticas: cor amarelo ouro e odor característico da espécie em estudo. Realizou-se análise de composição por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, sendo identificados os seguintes componentes citados na tabela 5 p.42 e nas figuras 11 a 14 p. 43 a 46.

TABELA 5 - COMPONENTES CARACTERIZADOS NO ÓLEO ESSENCIAL

Número	Substância	Tempo de retenção (min)
1	α -tujeno	4,1
2	1,4,6- trimetil-5,6-dihidronaftaleno	17
3	3-heptanona	4,5
4	Acetaldeído benzênico	2,8
5	Alil ciclohexano	5
6	Carvacrol (metil éter)	10
7	Orto-cimeno	5,4
8	Safrol	13

FIGURA 11 – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Pterocaulon interruptum* DC.
A. ALIL CICLOHEXANO; B. ORTO CIMENO.

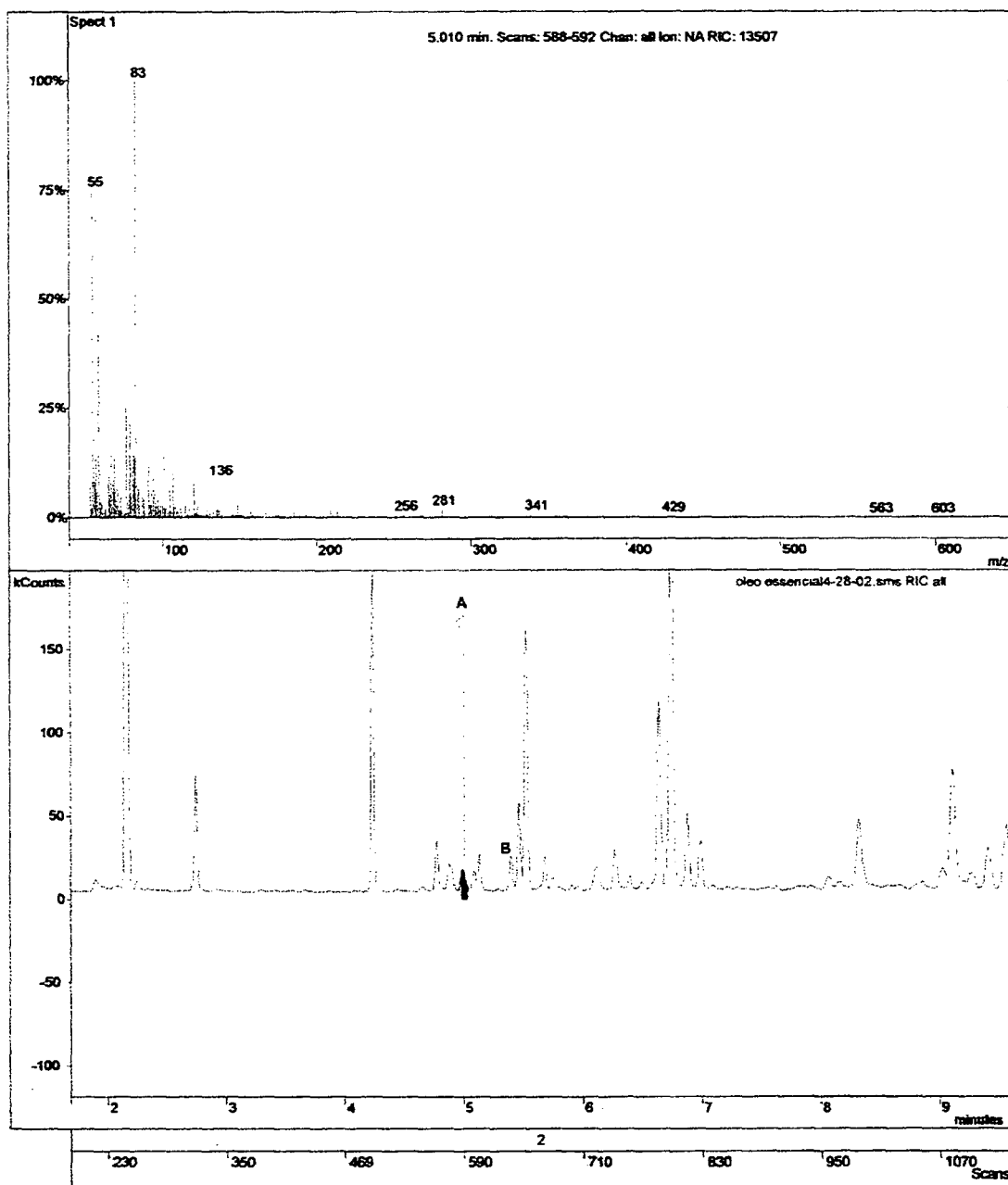


FIGURA 12 – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Pterocaulon interruptum* DC.
C. ACETALDEÍDO BENZÊNICO; D. α -TUJENO; E. 3-HEPTANONA

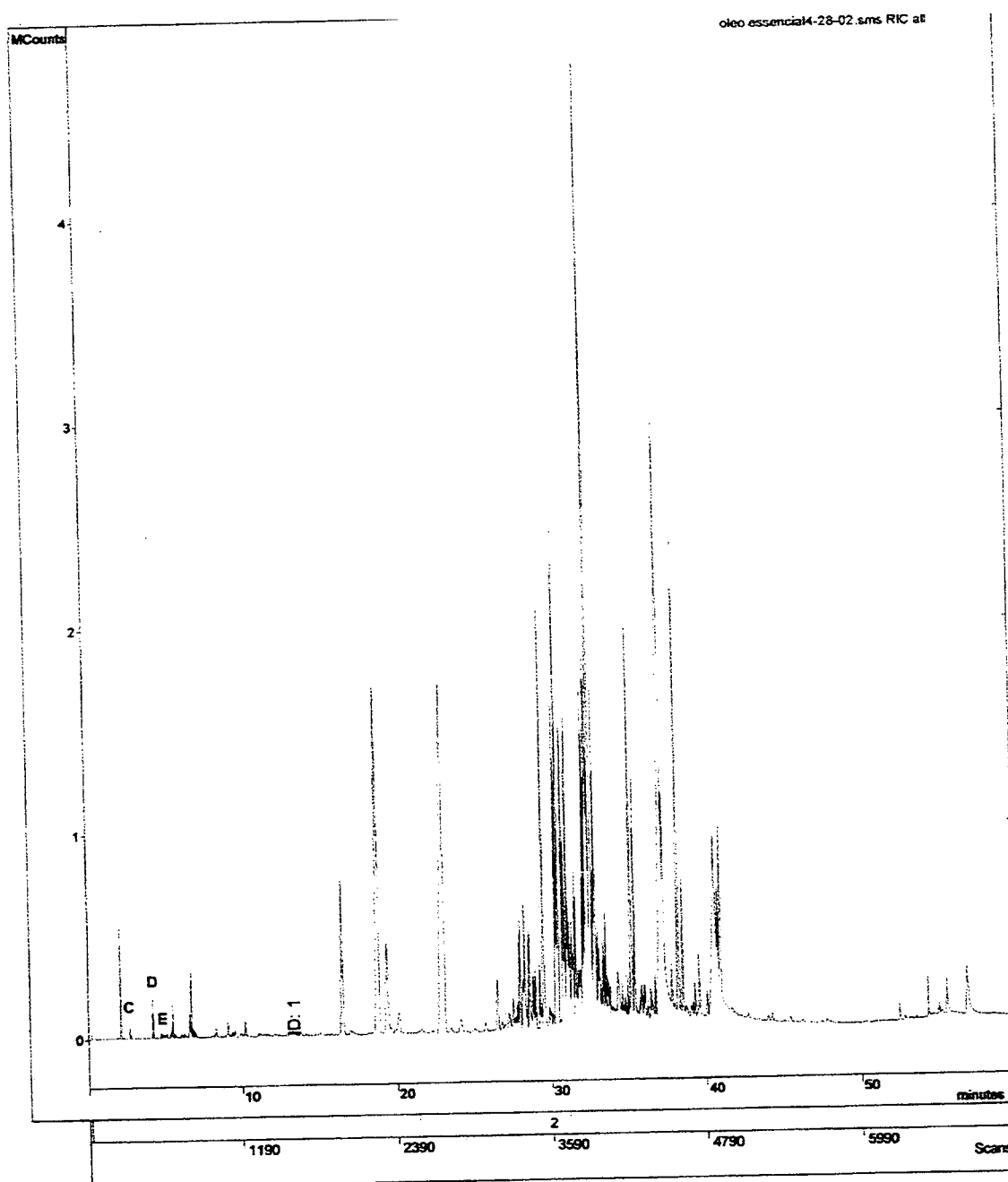


FIGURA 13 – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Pterocaulon interruptum* DC.
F. CARVACROL (METIL/ÉTER); G. SAFROL

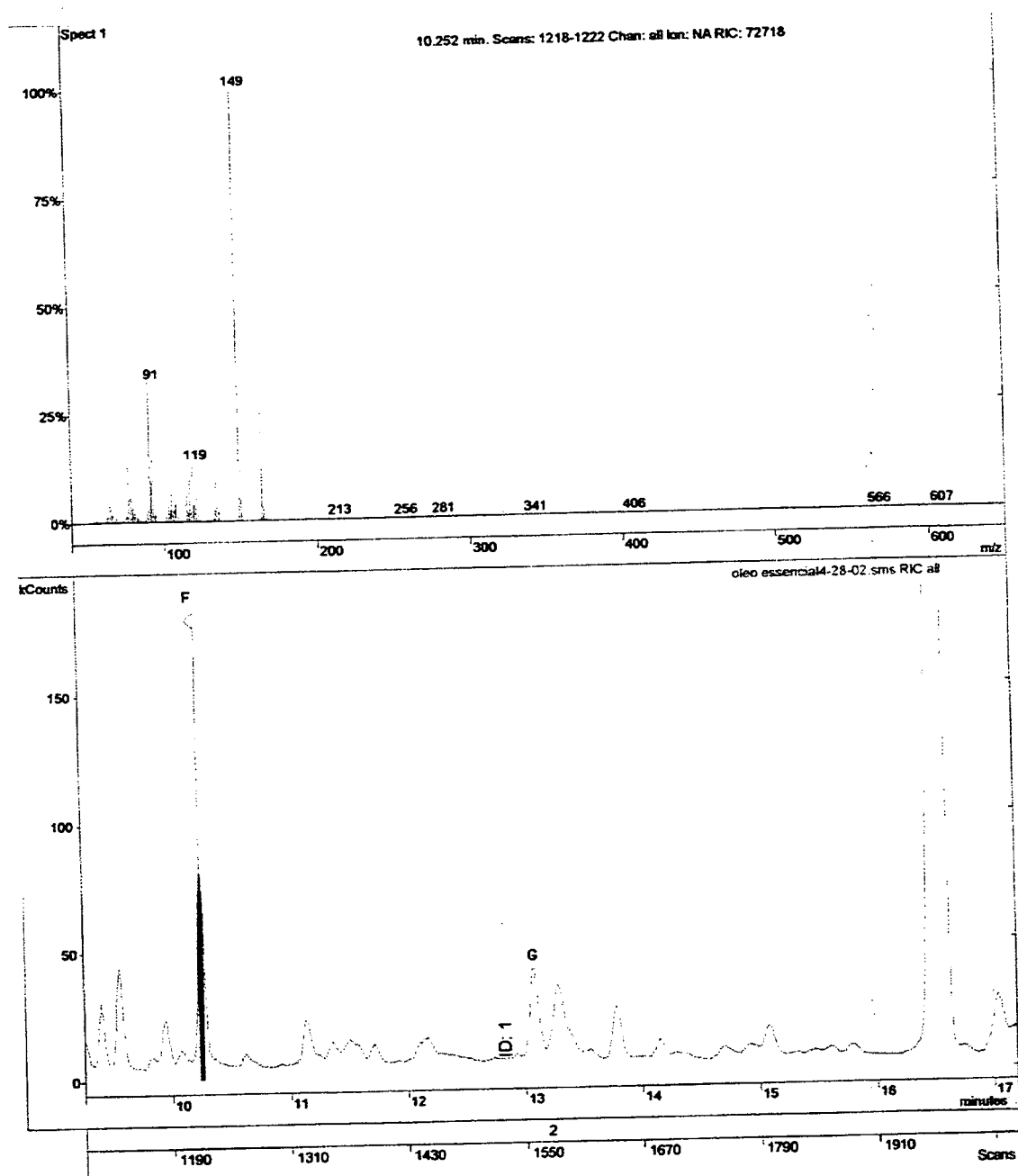
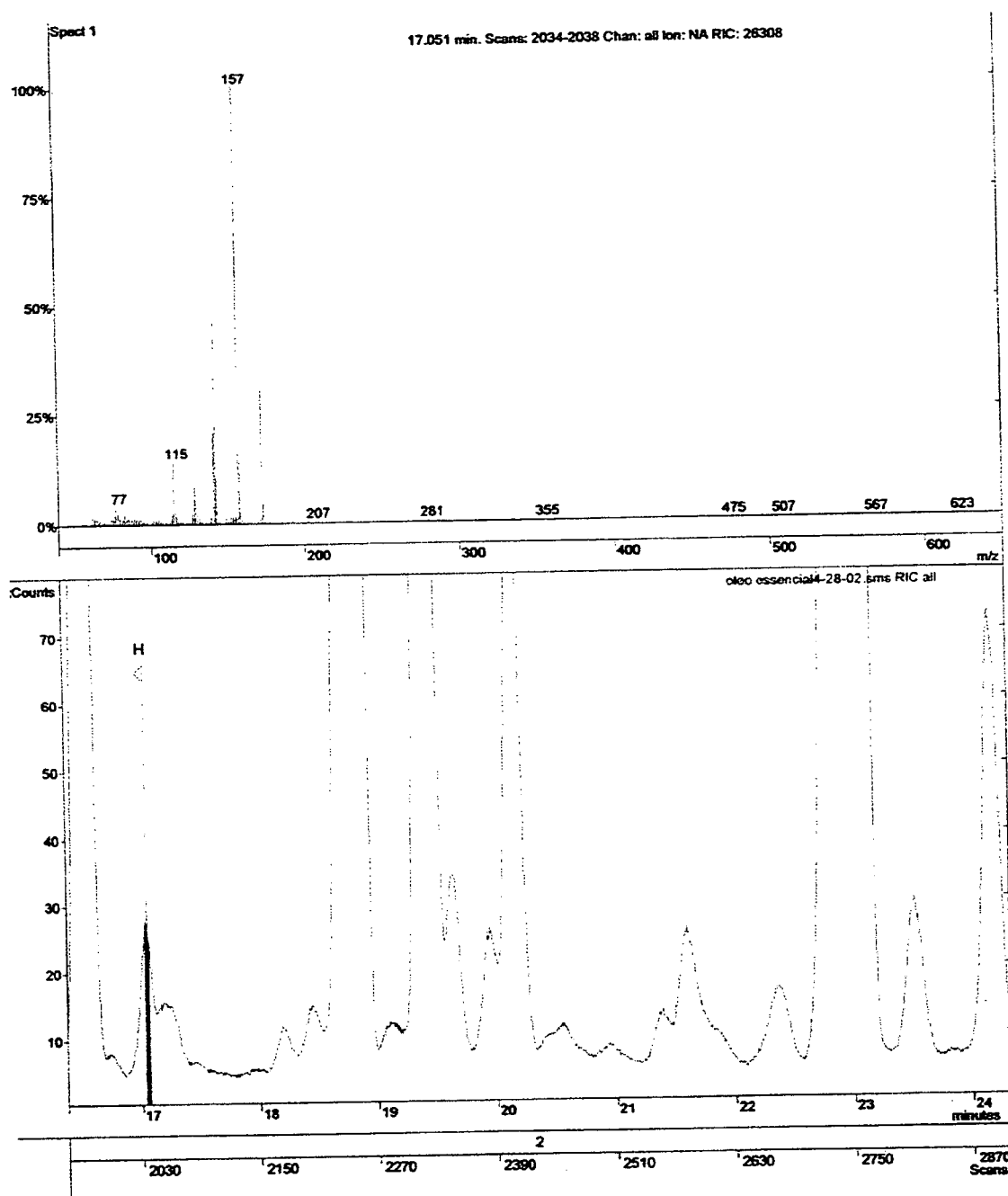


FIGURA 14 - CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Pterocaulon interruptum* DC.
H. 1,4,6-TRIMETIL-5,6-DIHDRONAFTALENO



A partir da extração de 420 g das partes aéreas estabilizadas e moídas de *Pterocaulon interruptum* DC., foram obtidas as frações constantes na tabela 6 p.47.

TABELA 6 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS POR SOXHLET

Frações extraídas	Rendimento (g)	Rendimento (%)
Fração Hexânica	19,06	4,53
Fração Clorofórmica	6,7	1,59
Fração Acetato de Etila	3,6	0,85
Fração Metanol	19,7	4,68
TOTAL	49,06	11,65

5.1.1 Fração Hexânica

Foram colhidas 202 frações de aproximadamente 10 mL cada (Tabela 7 p. 47).

TABELA 7 - FRAÇÕES COLETADAS E REUNIDAS DA FRAÇÃO HEXÂNICA

Frações	Hexano: AcOEt: MeOH	Frações reunidas	Frações	Hexano: AcOEt: MeOH	Frações reunidas
1	100:0:0	1 a 12	13	40:60:0	109 a 113
2	95:5:0	13 a 20	14	35:65:0	114 a 117
3	90:10:0	21 a 26	15	30:70:0	118 a 122
4	85:15:0	27 a 36	16	25:75:0	123 a 127
5	80:20:0	37 a 48	17	20:80:0	128 a 131
6	75:25:0	49 a 59	18	15:85:0	132 a 137
7	70:30:0	60 a 71	19	10:90:0	138 a 144
8	65:35:0	72 a 80	20	5:95:0	145 a 151
9	60:40:0	81 a 87	21	0:100:0	152 a 161
10	55:45:0	88 a 95	22	0:95:5	162 a 168
11	50:50:0	96 a 101	23	0:50:50	169 a 175
12	45:55:0	102 a 108	24	0:0:100	176 a 202

A fração de 88 a 95 apresentou precipitado branco (300 mg), caracterizado por FH1.

5.1.1.1 Espectro de absorção no infravermelho

O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 15 p. 50) apresentou absorção em 3400 cm^{-1} característico de hidroxila e outras absorções em 2990 cm^{-1} , 1700 cm^{-1} característico de carbonila, 1620 cm^{-1} , 1450 cm^{-1} , 1250 cm^{-1} , entre outras (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994).

5.1.1.2 Espectro de absorção no ultravioleta

O espectro de absorção na região do ultra violeta (UV) (Figura 16 p. 50), foi obtido em espectrofotômetro Shimatzu, utilizando-se metanol como solvente. Foram obtidas as seguintes absorções máximas: 316 e 235,5 nm.

5.1.1.3 Espectro de massa

O espectro de massa (m/e) (Figura 17 p. 51), foi obtido no espectrômetro Shimadzu CGMS-Qp. 2000 A, apresenta o íon (M^+) a m/e 308 (100) e os seguintes fragmentos principais em 206, 178, 59 e 43 (Figura 18 p. 52).

5.1.1.4 Espectro de ressonância magnética nuclear de 1H

O espectro de ressonância magnética nuclear de 1H (Figura 19 e 20 p. 53), foram obtidos a uma frequência de 70 MHz em MeOD e apresenta δ , ppm, 8,10 (1H, d), 6,65 (1H, s), 6,20 (1H, d), 5,96 (2H, s), 5,14 (1H, dd), 4,77 (1H, t), 4,29 (1H, dd), 1,63 (3H, s), 1,60 (3H, s).

5.1.1.5 Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C

Os deslocamentos químicos atribuídos pelos espectros de ^{13}C à 75 MHz, em MeOD (Figuras 21 e 22 p. 54), estão expressos na tabela 8 p. 48. Também foi realizado espectro HETCOR que permite correlacionar cada sinal dos carbonos protonados com o sinal do respectivo próton (Figura 23 p. 55).

TABELA 8 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN ^{13}C DO SABANDINOL

C	RMN ^{13}C	1H (HETCOR)
2	160,70	
3	111,47	6,20
4	139,18	8,10
4a	107,15	
5	135,28	
6	132,41	
7	151,73	
8	92,22	6,65
8a	152,81	
O-CH ₂ -O	102,32	5,96
1'	75,15	5,14 e 4,77
2'	77,37	4,29
3'	71,35	
4'	27,31	1,63
3'-CH ₃	25,56	1,60

Com base nos dados da literatura (DEBENEDETTI et al., 1997) e espectrais propôs-se a seguinte estrutura correspondente à cumarina, denominada sabandinol.

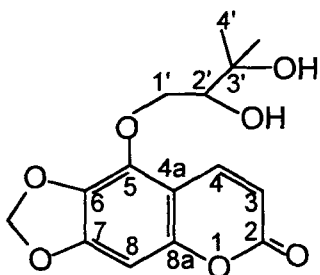


FIGURA 15 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DO SABANDINOL

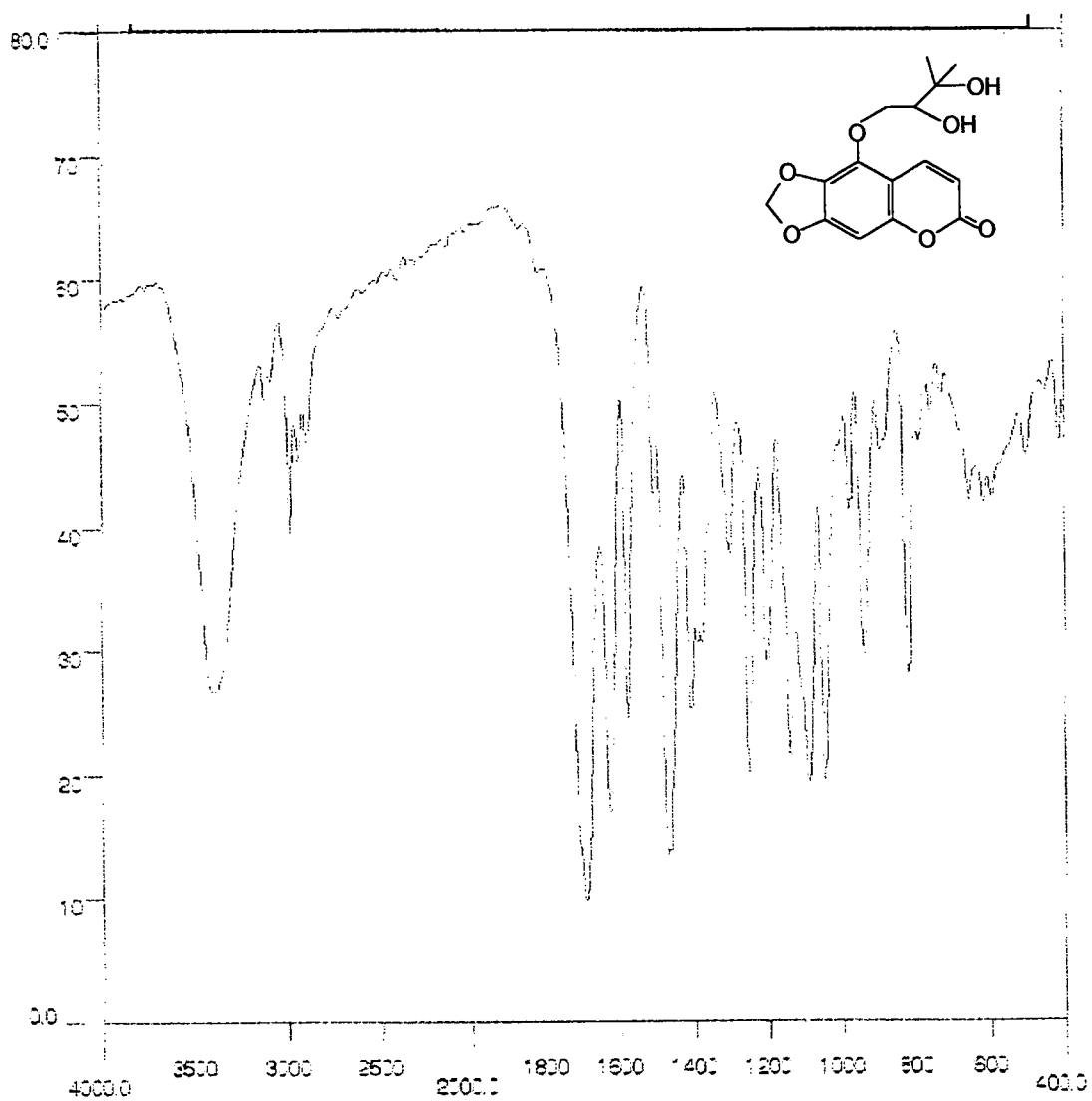


FIGURA 16 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA DO SABANDINOL

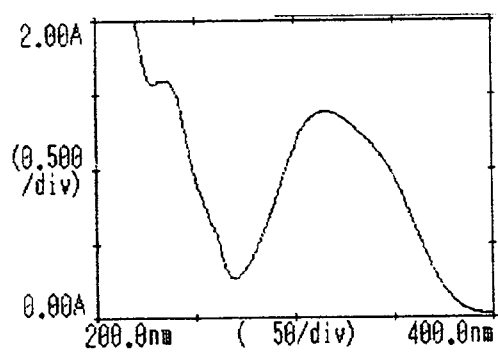


FIGURA 17 - ESPECTRO DE MASSA DO SABANDINOL

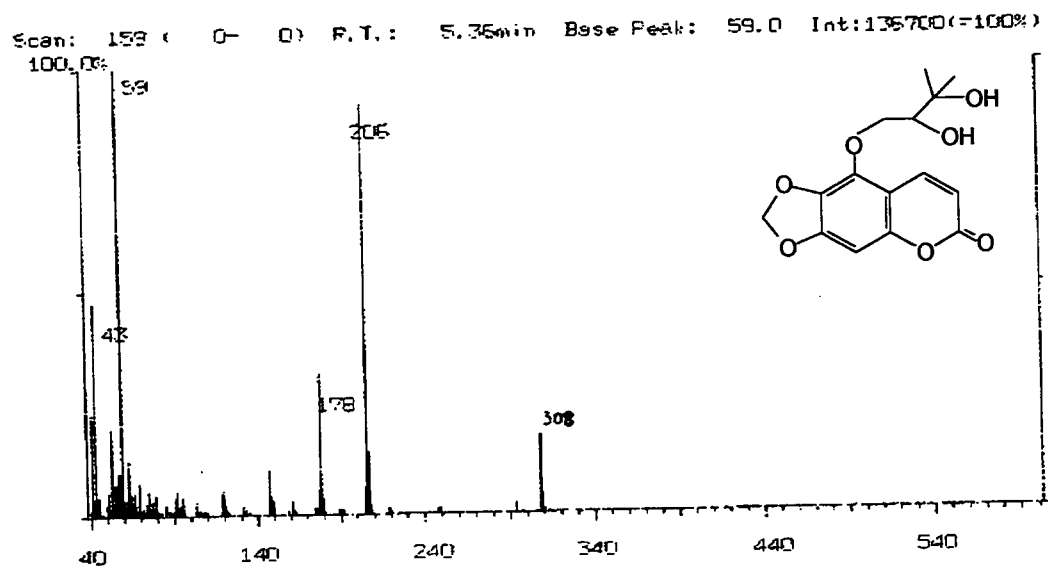


FIGURA 18 –ROTA DE FRAGMENTAÇÃO DO SABANDINOL

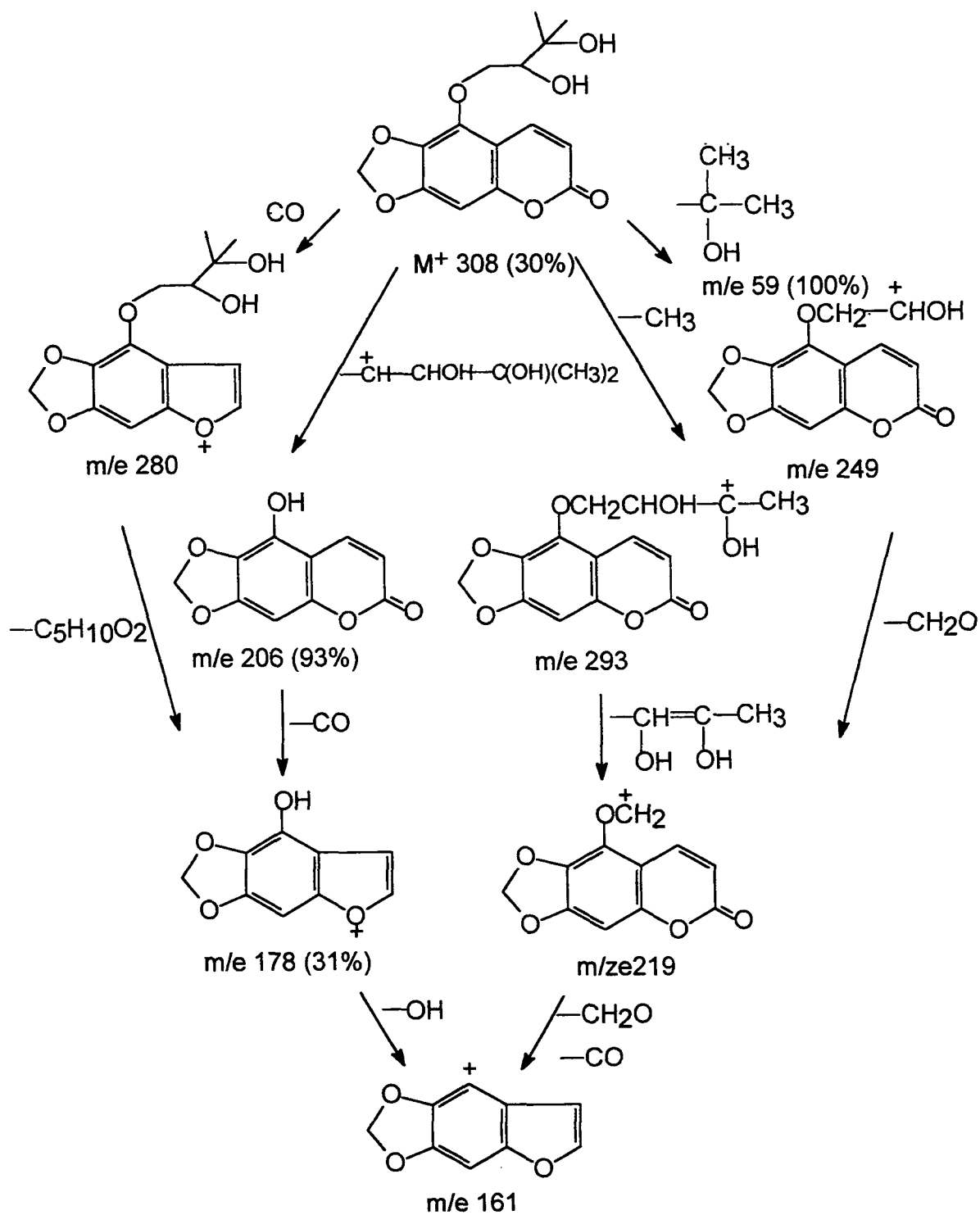


FIGURA 19 - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H DO SABANDINOL

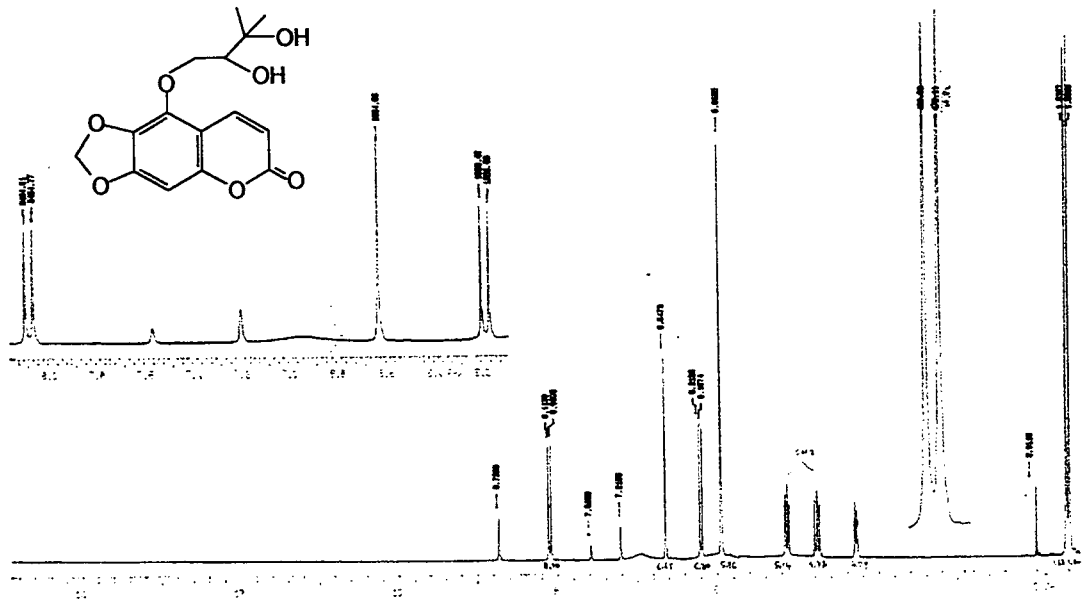


FIGURA 20 - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H DO SABANDINOL

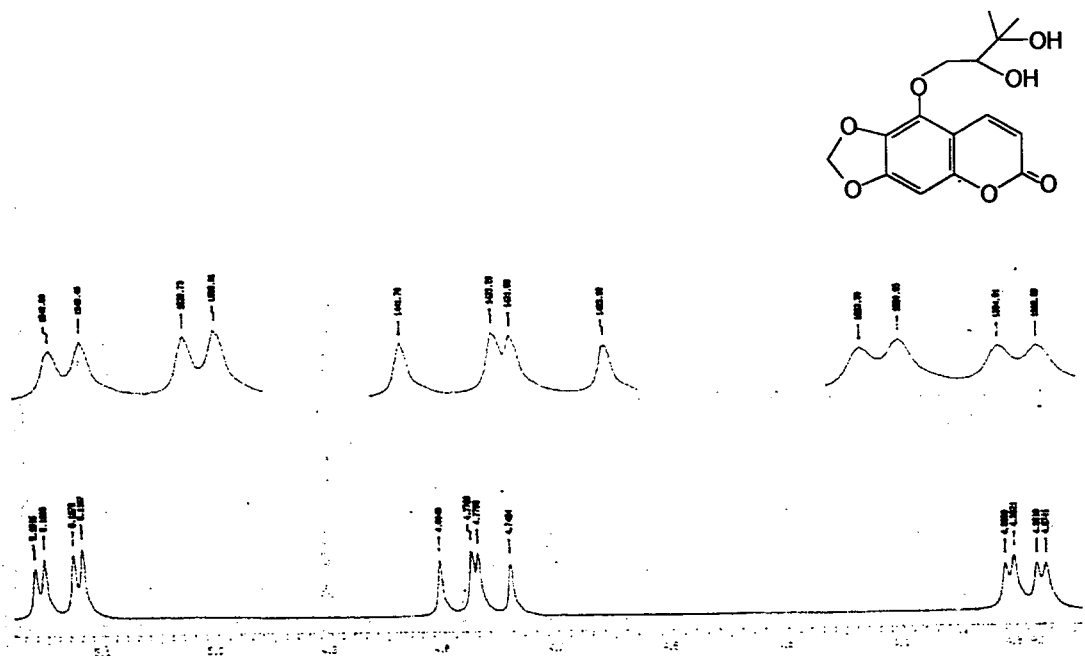


FIGURA 21 - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C DO SABANDINOL

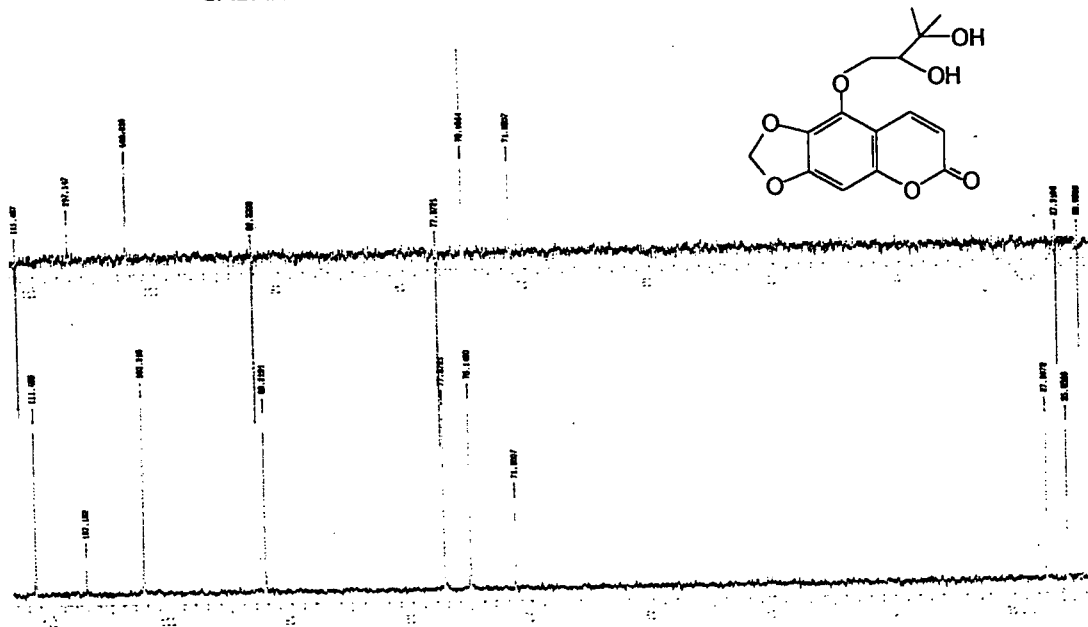


FIGURA 22 - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C DO SABANDINOL

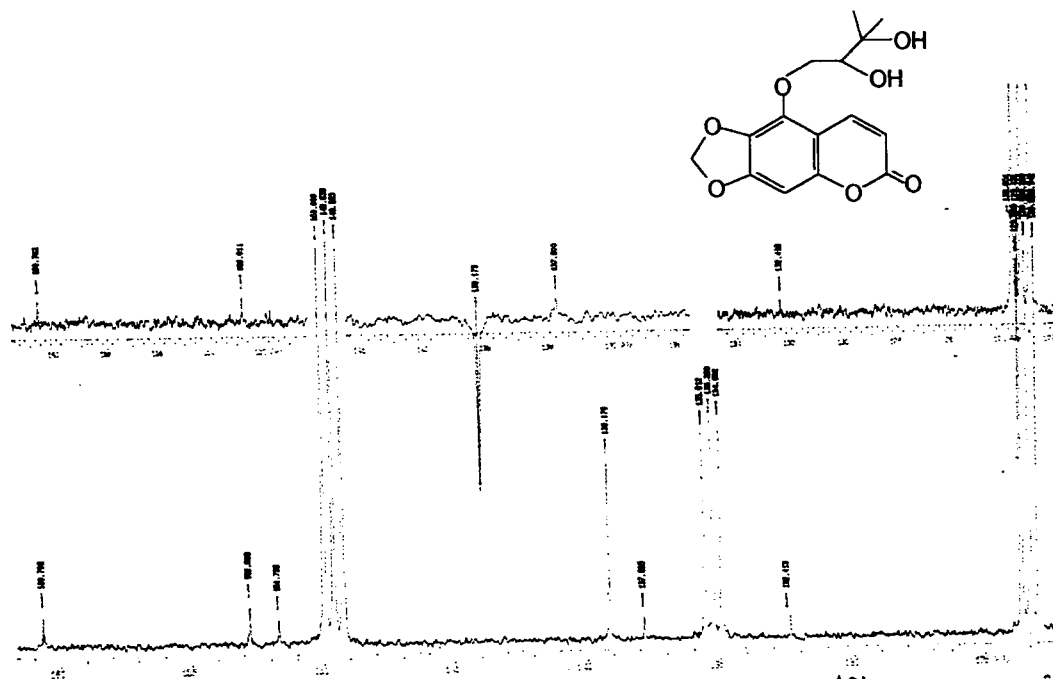
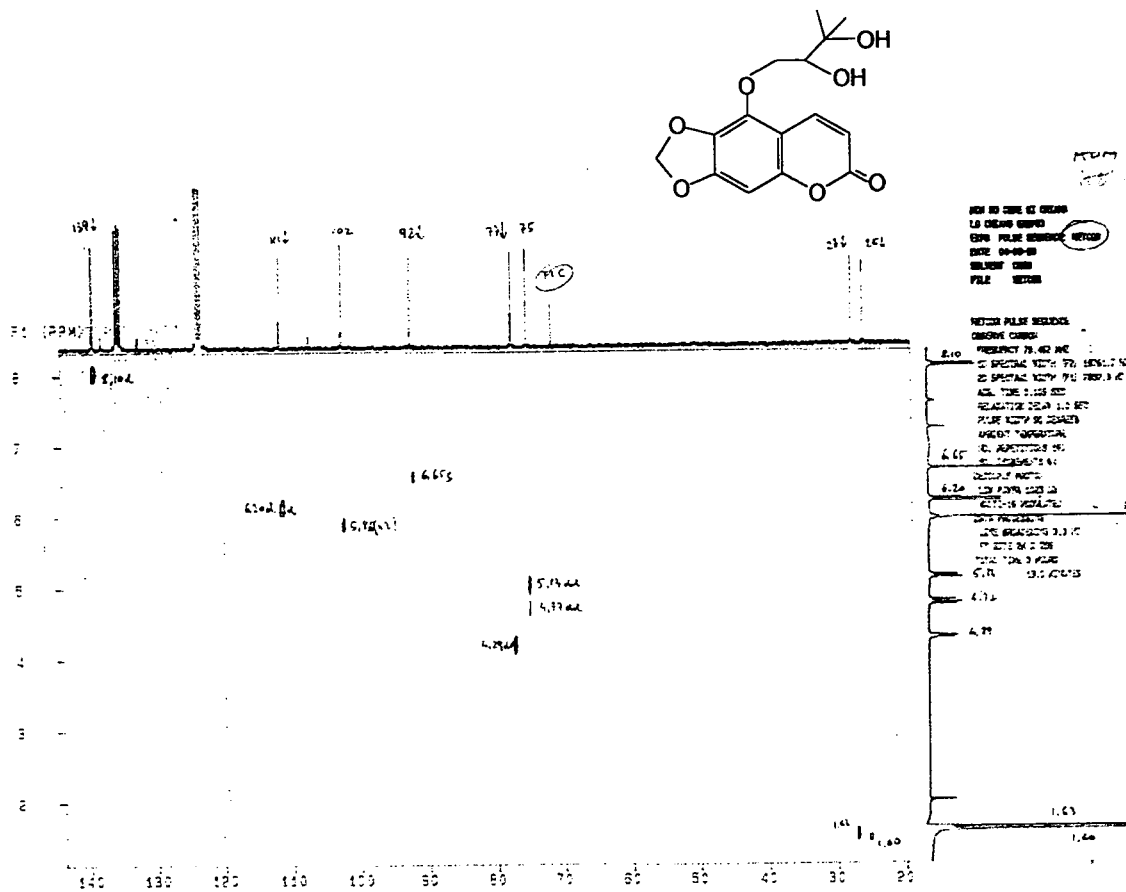


FIGURA 23 - ESPECTRO HETCOR DO SABANDINOL



5.1.2 Fração Clorofórmica

Foram colhidas 259 frações de aproximadamente 10 mL cada (Tabela 9 p. 56), as quais foram reunidas segundo monitoramento por cromatografia em camada delgada, utilizando-se cromatoplasmas de Sílica gel 60 F₂₅₄ Merck®, visualização em lâmpada UV no comprimento de onda de 360 nm, de 2 em 2 frascos para visualizar a semelhança do conteúdo, com fase móvel tolueno: acetato de etila (97:3) e como revelador o anisaldeído fosfórico. Em seguida, as frações foram reunidas dissolvendo-se em clorofórmio e em seguida em metanol

TABELA 9 - FRAÇÕES COLETADAS E REUNIDAS DA FRAÇÃO CLOROFÓRMICA

Frações	Hexano: AcOEt: MeOH	Frações reunidas	Frações	Hexano:AcOEt:MeOH	Frações reunidas
1	100:0:0	1 a 7	15	30:70:0	100 a 107
2	95:5:0	8 a 14	16	25:75:0	108 a 115
3	90:10:0	15 a 21	17	20:80:0	116 a 127
4	85:15:0	22 a 28	18	15:85:0	128 a 139
5	80:20:0	29 a 36	19	10:90:0	140 a 150
6	75:25:0	37 a 44	20	5:95:0	151 a 160
7	70:30:0	45 a 49	21	0:100:0	161 a 174
8	65:35:0	50 a 57	22	0:95:5	175 a 186
9	60:40:0	58 a 64	23	0:90:10	187 a 198
10	55:45:0	65 a 71	24	0:85:15	199 a 210
11	50:50:0	72 a 78	25	0:80:20	211 a 223
12	45:55:0	79 a 85	26	0:75:25	224 a 235
13	40:60:0	86 a 92	27	0:70:30	236 a 248
14	35:65:0	93 a 99	28	0:0:100	249 a 259

Da fração 24 a 26 foram isolados cristais brancos em agulhas (8,9 mg) identificados como **FC1**, da fração 12 e 13, cristais brancos (23,9 mg) identificados como **FC2**.

5.1.2.1 Substância FC1

5.1.2.1.1 Espectro de absorção no infravermelho

O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 24 p. 58) apresentou banda larga entre 3434,99 e 3310,19 cm⁻¹ referente ao estiramento do grupamento hidroxila, absorções normais de metilas e metilenos alifáticos em 2959,97; 2935,44 e 2863,36 cm⁻¹, e ainda uma banda de absorção de fraca intensidade em 1647,65 cm⁻¹ referentes a formação de olefinas isoladas (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994).

5.1.2.1.2 Espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H

Os espectros de ressonância magnética nuclear ^1H (Figuras 25 e 26 p. 59), foram obtidos a uma frequência de 300 MHz em CDCl_3 , apresenta multiplete centrado a δ 3,54 atribuído a H-3. As absorções na região de δ 0,65 e δ 1,30 são referentes a várias metilas. Os dubletes a δ 0,82, 0,93 com $J=6,54$ Hz são correspondentes aos prótons em C-26 e C-27. O triplete a δ 0,82, 0,93 com $J=6,34$ Hz é atribuído ao próton em C-29 e os tripletes a δ 0,67, 0,84 e 1,00 referem-se aos prótons das metilas em C-18, C-19 e C-21.

5.1.2.1.3 Espectros de ressonância magnética nuclear de ^{13}C

Os deslocamentos químicos atribuídos pelos espectros de RMN de ^{13}C estão expressos nas figuras 27 e 28 p. 60 e tabela 10 p. 57.

TABELA 10 - DADOS DE RMN DE ^{13}C PARA ESTIGMASTEROL

C	RMN ^{13}C	C	RMN ^{13}C
1	37.22	16	28.92
2	31.62	17	56.06
3	71.74	18	12.03
4	42.26	19	19.39
5	142.72	20	40.50
6	121.70	21	21.06
7	31.87	22	138.31
8	31.87	23	129.22
9	50.09	24	51.21
10	36.56	25	31.94
11	21.06	26	21.06
12	39.74	27	19.01
13	42.18	28	25.40
14	56.18	29	12.25
15	24.34		

Com base nos dados da literatura (MIGUEL, 1996) e espectrais propôs-se a seguinte estrutura correspondente ao estigmasterol.

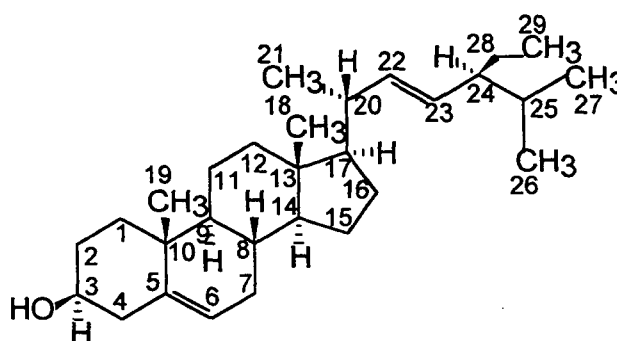


FIGURA 24 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DO ESTIGMASTEROL

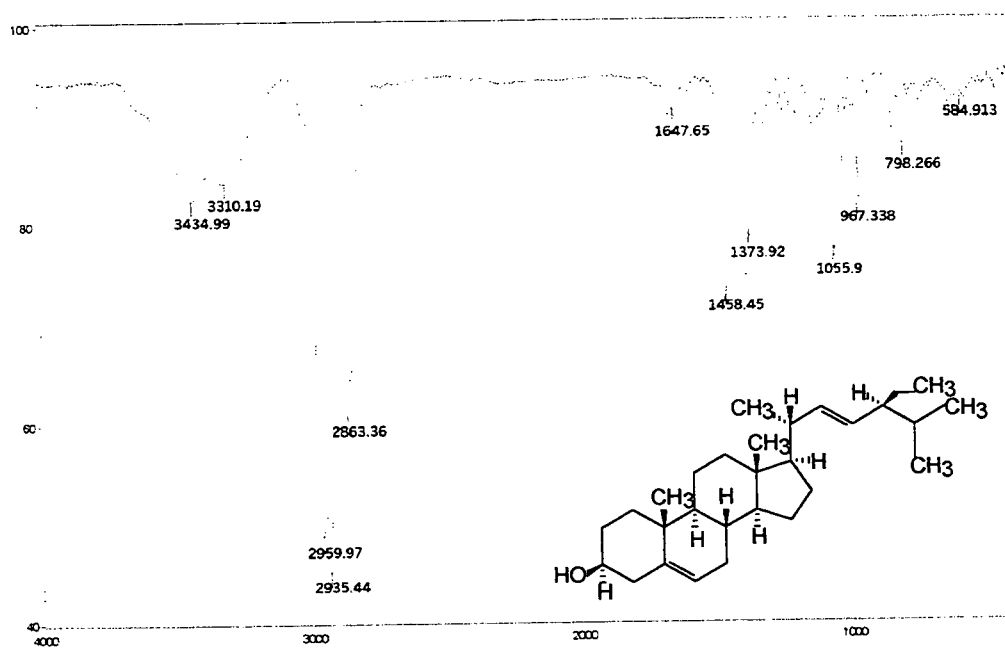


FIGURA 25 - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H DO ESTIGMASTEROL

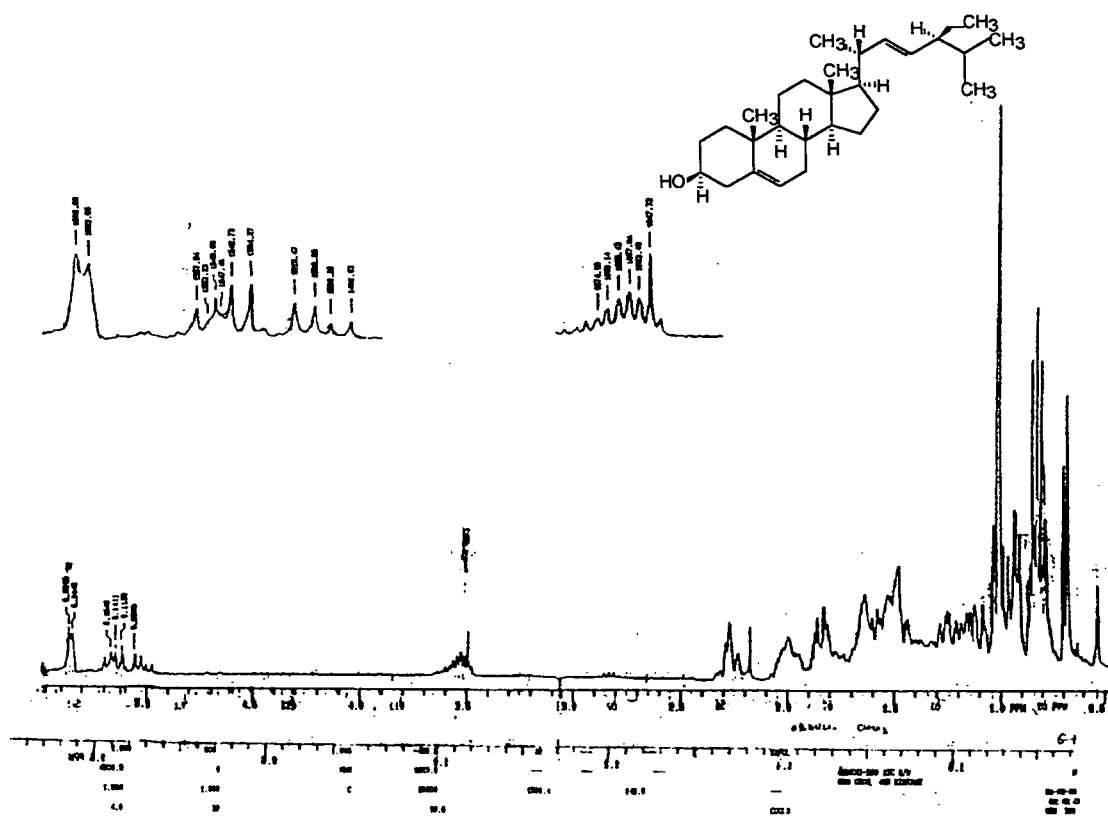


FIGURA 26 - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H AMPLIADO DO ESTIGMASTEROL

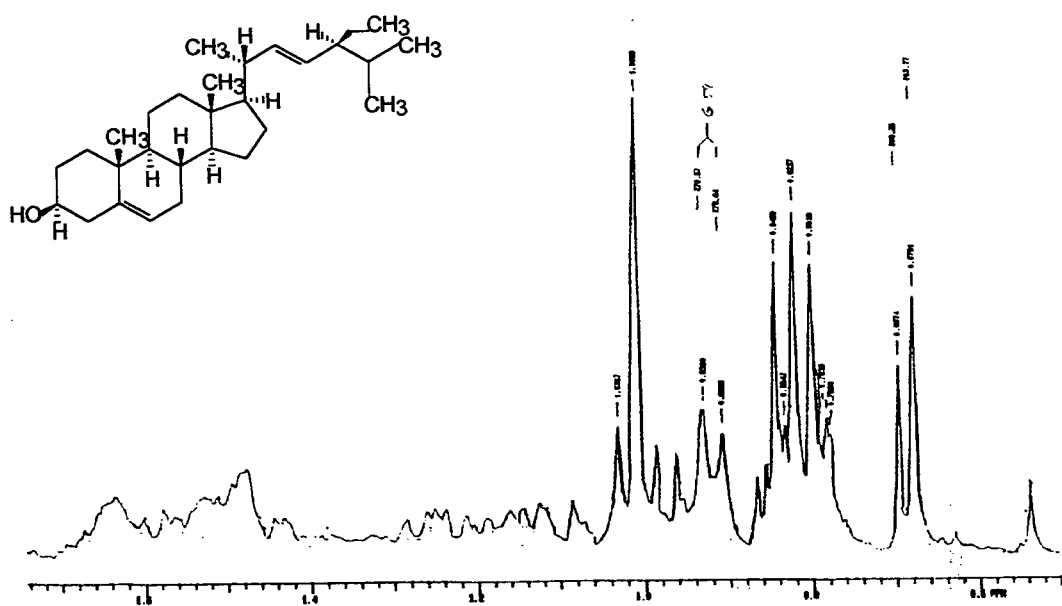


FIGURA 27 - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C DO ESTIGMASTEROL

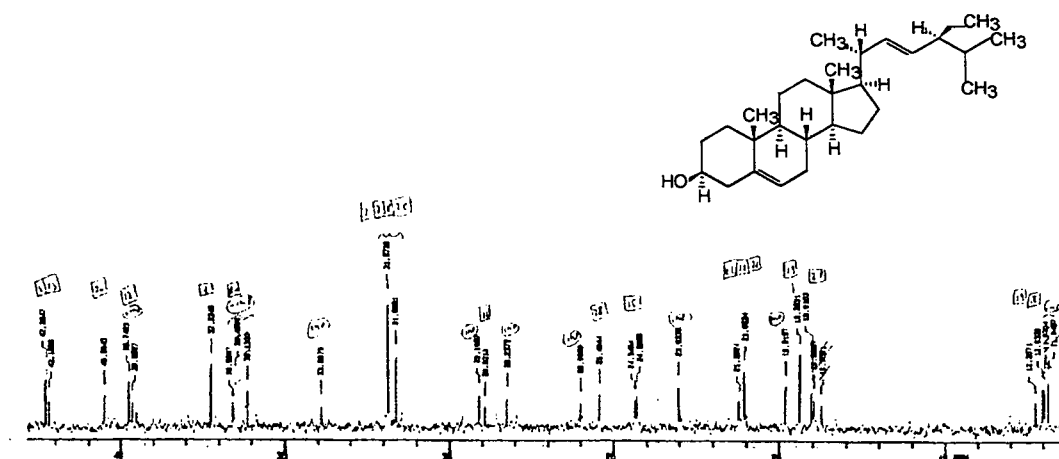
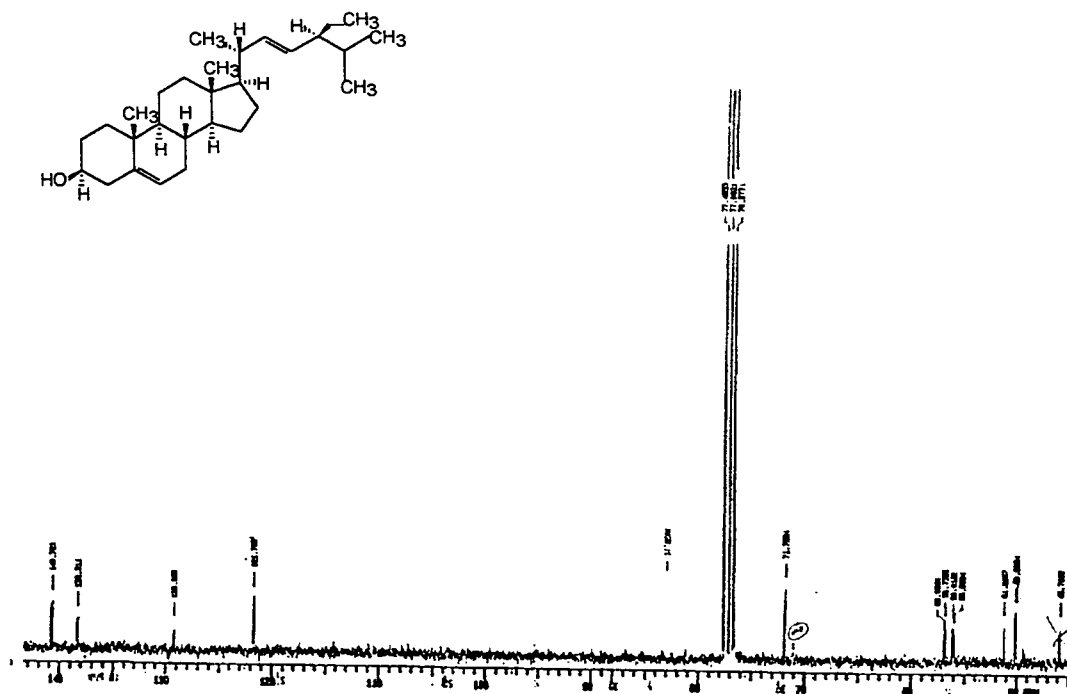


FIGURA 28 - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C DO ESTIGMASTEROL



5.1.2.2 Substância FC2

5.1.2.2.1 Espectro de absorção no infravermelho

O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 29 p. 63) apresentou absorção em banda larga em $3435,05\text{ cm}^{-1}$ característico de grupamento hidroxila, bandas de grande intensidade em $2988,32$; 2936 e $2856,37\text{ cm}^{-1}$ características de metilas e metilenos alifáticos. Absorção muito intensa em $1724,59\text{ cm}^{-1}$ caracterizando a presença de carbonila.

5.1.2.2.2 Cromatografia gasosa

Utilizando-se análise por cromatografia gasosa, foi possível detectar que o 3-O-acetil taraxasterol isolado apresenta 88,58% de pureza (Figura 30 p. 63).

5.1.2.2.3 Espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H

Os espectros de ressonância magnética nuclear ^1H (Figuras 31 e 32 p. 64), foram obtidos a uma frequência de 300 MHz em CDCl_3 . As absorções na região de $\delta 0,84$ e $\delta 1,63$ são referentes a várias metilas. O triplete centrado em $\delta 1,01$ refere-se aos hidrogênios de vários grupamentos CH_2 presentes na estrutura. O multiplete centrado em $\delta 2,20$ é atribuído aos prótons da metila do grupamento acetil no carbono 3 e multiplete centrado a $\delta 4,48$ atribuído a H-3. O triplete centrado em $\delta 4,61$ corresponde aos hidrogênios de CH_2 no carbono 20.

5.1.2.2.4 Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C

Os deslocamentos químicos atribuídos pelos espectros de ^{13}C à 300 MHz, em CDCl_3 , estão indicados nas figuras 33 e 34 p. 65 e na tabela 11 p. 62.

TABELA 11 - DADOS DE RMN DE ^{13}C PARA 3-O-ACETIL TARAXASTEROL

C	RMN ^{13}C	C	RMN ^{13}C
1	38.42	17	34.52
2	23.68	18	48.60
3	80.96	19	39.37
4	37.78	20	154.65
5	55.42	21	25.60
6	18.17	22	38.83
7	33.97	Me 23	27.93
8	40.63	Me 24	16.34
9	50.38	Me 25	16.50
10	37.03	Me 26	15.87
11	21.44	Me 27	14.71
12	26.13	Me 28	19.48
13	39.13	Me 29	25.48
14	42.30	Me Ac	21.35
15	26.63	=CH ₂	107.11
16	38.27	O-CO-CH ₃	171.03

Com base nos dados da literatura (BOHLMANN et al., 1981) e espectrais propôs-se a seguinte estrutura correspondente ao 3-O-acetil taraxasterol.

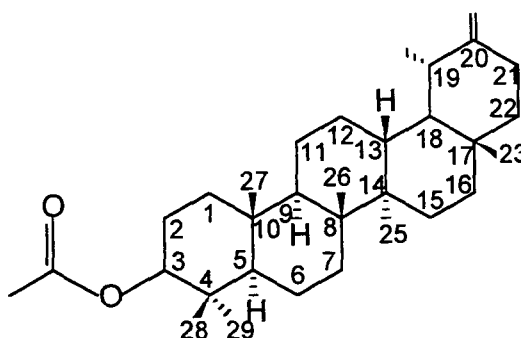


FIGURA 29 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DO 3-O-ACETIL TARAXASTEROL

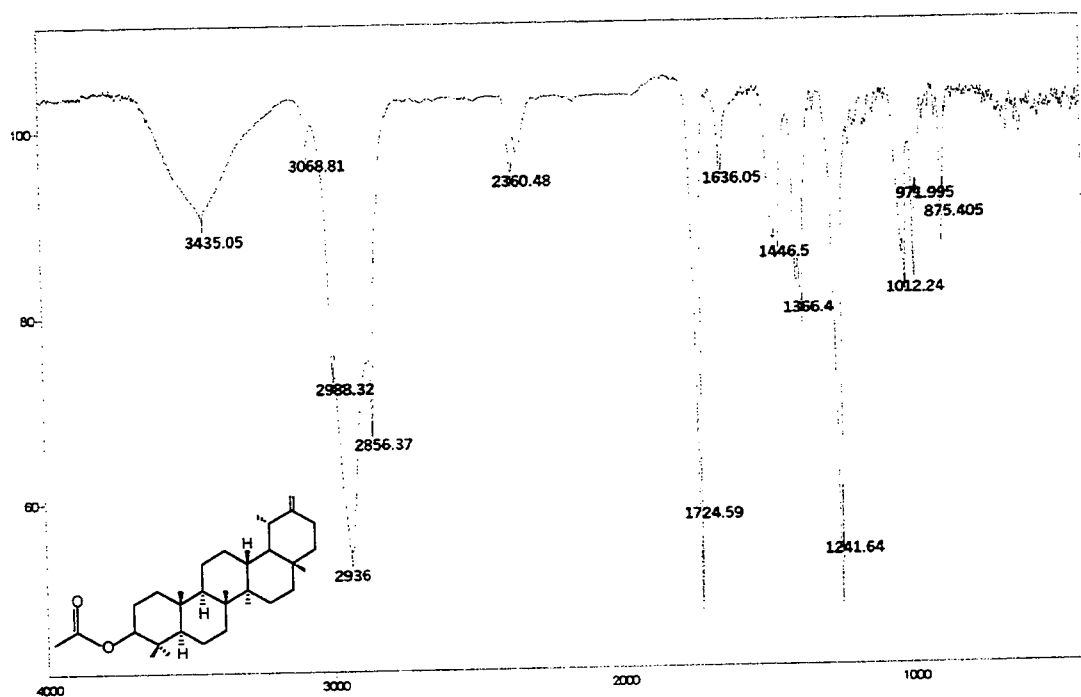


FIGURA 30 - CROMATOGRAMA DO 3-O-ACETIL TARAXASTEROL

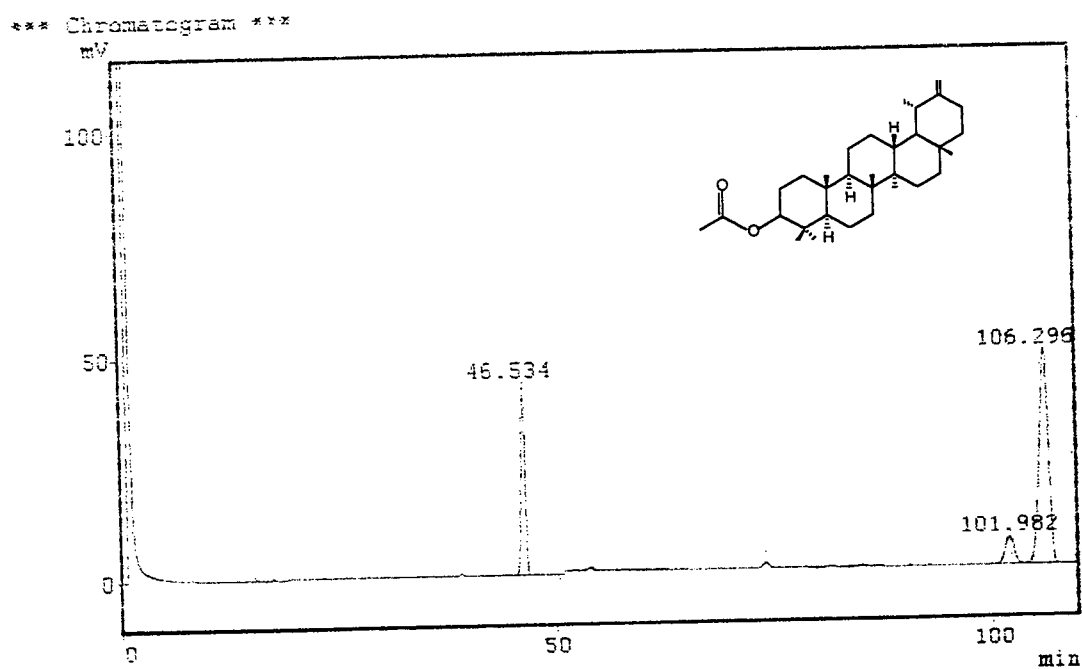


FIGURA 31 - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H DO 3-O-ACETIL TARAXASTEROL

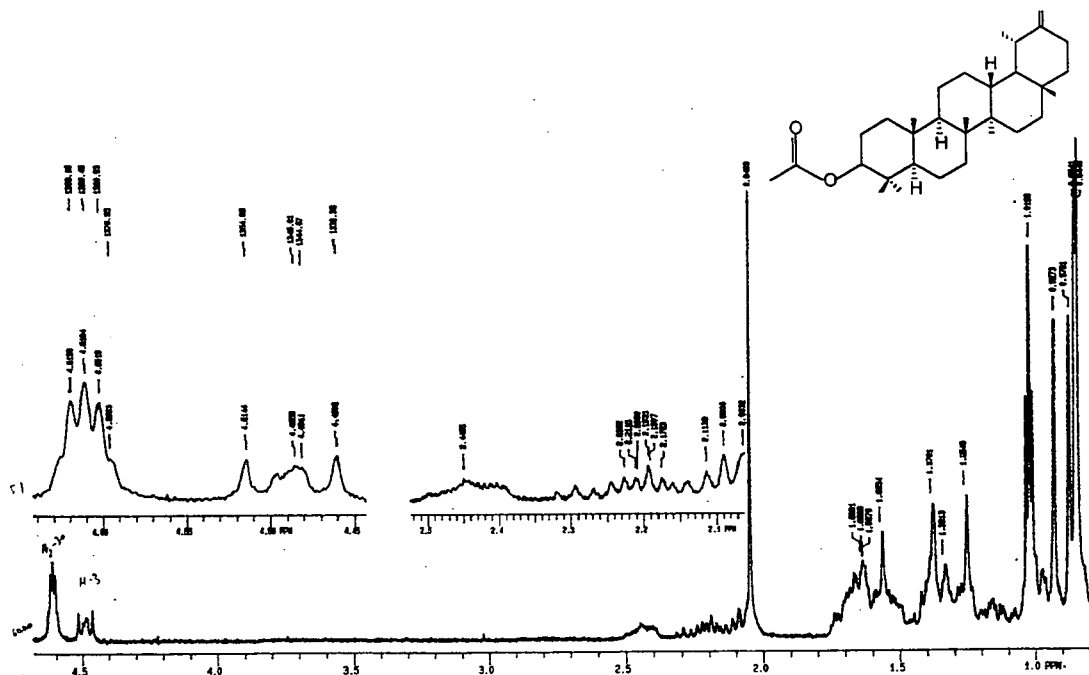


FIGURA 32 - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H AMPLIADO DO 3-O-ACETIL TARAXASTEROL

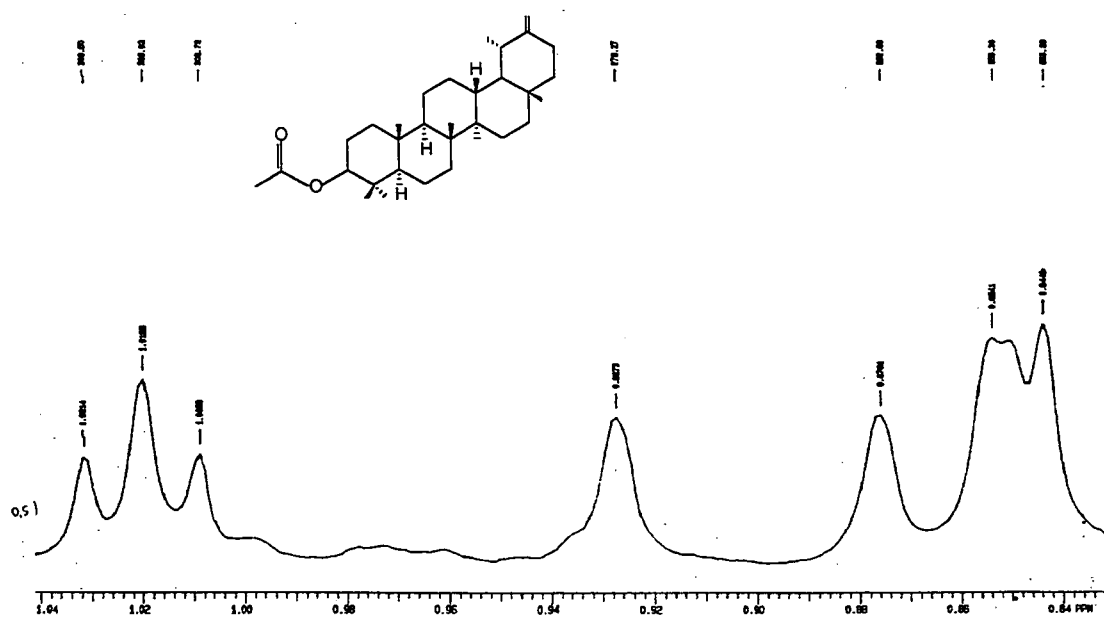


FIGURA 33 - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C DO 3-O-ACETIL TARAXASTEROL

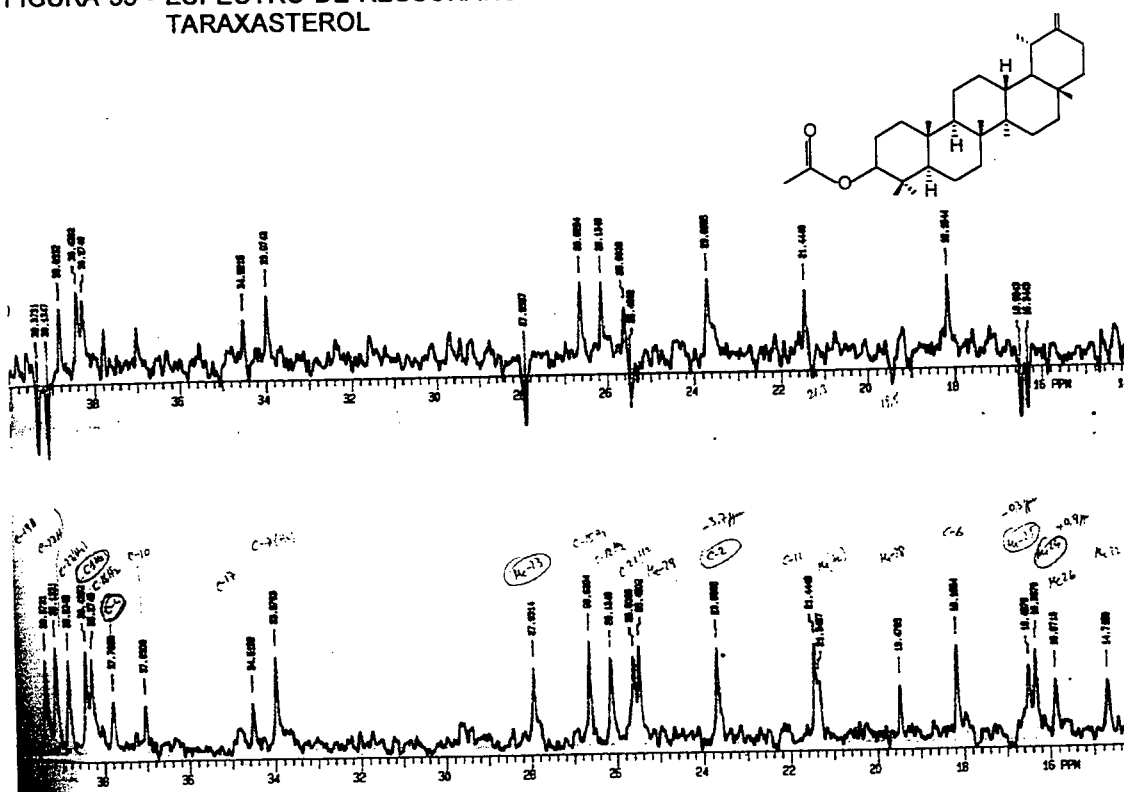
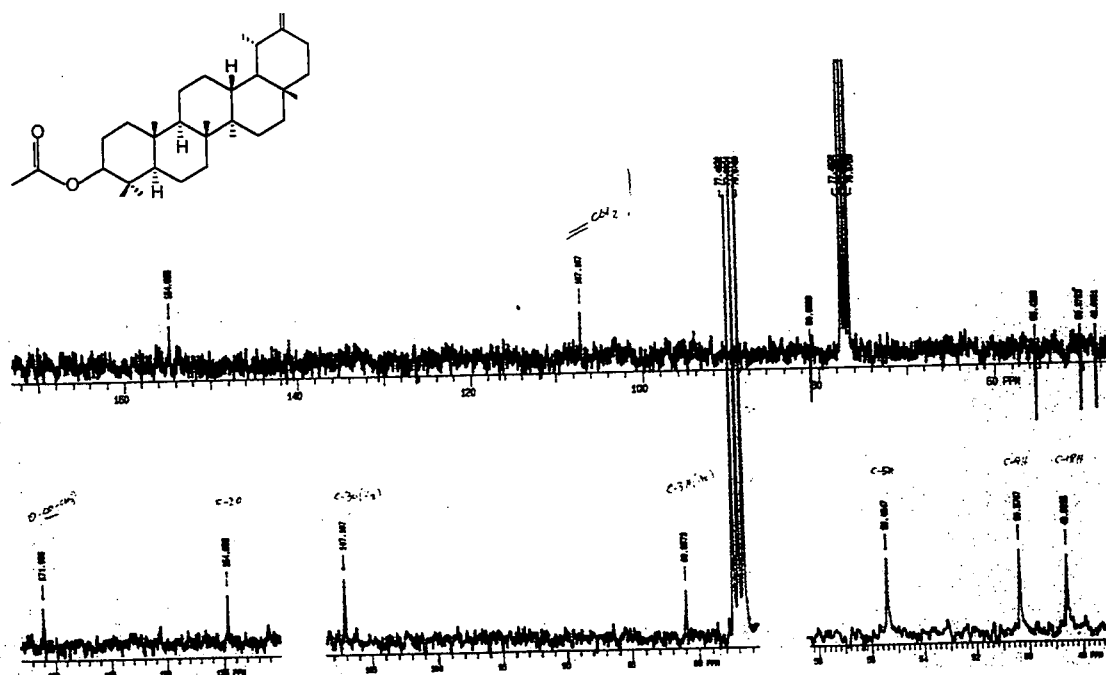


FIGURA 34 - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C DO 3-O-ACETIL TARAXASTEROL



5.1.3 Fração Acetato de Etila

Foram colhidas 231 frações de aproximadamente 10 mL cada (Tabela 12 p. 66), as quais foram reunidas segundo monitoramento por cromatografia em camada delgada, utilizando-se cromatoplasas de Sílica gel 60 F₂₅₄ Merck®, visualização em lâmpada UV no comprimento de onda de 360 nm, de 2 em 2 frascos para visualizar a semelhança do conteúdo, com fase móvel acetona: acetato de etila: água (80:20:2). A revelação foi realizada com o reativo NEU para flavonóides, vanilina fosfórica para esteróides e/ou triterpenos e KOH alcoólico a 5% para cumarinas (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1983).

Ainda esta fração, dissolvida inicialmente em metanol foi redissolvida e passada por Sephadex LH-20 com metanol 70% como eluente, uma vez que por CCD havia indicação da presença de cumarinas ou flavonóides. Foram coletados 32 frascos, sendo que apenas os frascos 1 a 6 apresentaram fluorescência azul.

Das frações coletadas não foi possível o isolamento das substâncias indicadas na CCD.

TABELA 12 - FRAÇÕES COLETADAS E REUNIDAS DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA

Frações	Hexano: AcOEt: MeOH	Frações reunidas	Frações	Hexano: AcOEt: MeOH	Frações reunidas
1	100:0	1 a 5	13	40:60	80 a 85
2	95:5	6 a 12	14	35:65	86 a 91
3	90:10	13 a 18	15	30:70	92 a 98
4	85:15	19 a 24	16	25:75	99 a 105
5	80:20	25 a 31	17	20:80	106 a 112
6	75:25	32 a 37	18	15:85	113 a 125
7	70:30	39 a 44	19	10:90	126 a 135
8	65:35	45 a 51	20	5:95	136 a 147
9	60:40	52 a 58	21	0:100	148 a 158
10	55:45	59 a 65	22	0:70:30	159 a 168
11	50:50	66 a 72	23	0:50:50	169 a 177
12	45:55	73 a 79	24	0:30:70	178 a 190
			25	0:0:100	191 a 231

Das frações 57 a 73 foi obtido precipitado amarelo (8,4 mg), denominado de **FA1**.

Das frações 72 e 80 foi obtido precipitado branco em cristais (70,7 mg), denominado de **FA2**.

5.1.3.1 Substância FA1

5.1.3.1.1 Espectro de absorção no infravermelho

O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 35 p. 71) apresentou uma banda larga de absorção em $3409,1\text{ cm}^{-1}$ relativo à presença de grupo hidroxila, outra banda em $1663,86\text{ cm}^{-1}$, indicando a presença de carbonila conjugada e ainda em $1611,48\text{ cm}^{-1}$ característico de insaturação (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994).

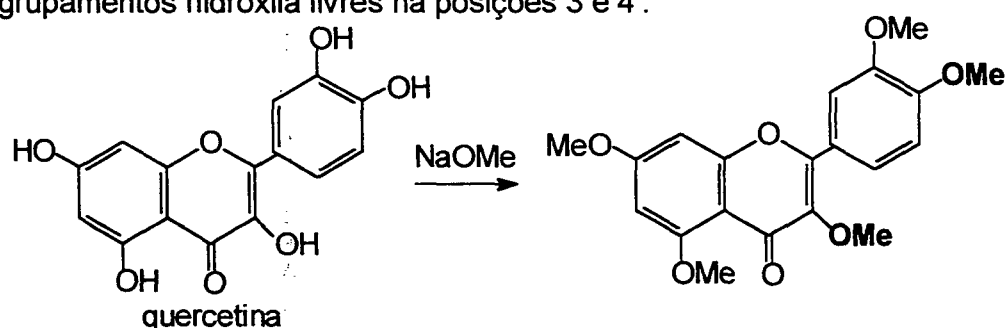
5.1.3.1.3 Espectro de massa

O espectro de massa (m/e) (Figura 36 p. 71), apresenta pico significativo em m/e 302 (M^+) (100) e os seguintes fragmentos principais: 273 (27,0), 257 (7,0), 229 (14,8), 153 (23,8), 137 (38,0) e 109 (14,2) típicos de estruturas flavonoídicas.

5.1.3.1.4 Espectro de absorção no ultravioleta

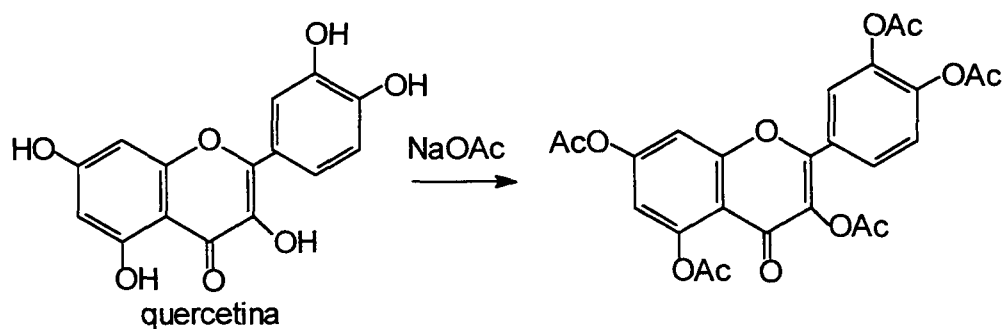
A análise do espectro de absorção na região do ultra violeta (Figura 37 p. 72) em metanol da substância FA1 apresentou duas bandas, sendo a Banda I em 371 nm e a Banda II em 255 nm e um ombro a 304 nm, correspondendo a absorções típicas para flavonóis.

Na adição em NaOMe ocorreu deslocamento hipsocrômico de todas as bandas, sendo que a banda I deslocou-se em 40 nm, característico da presença de grupamentos hidroxila livres na posições 3 e 4'.

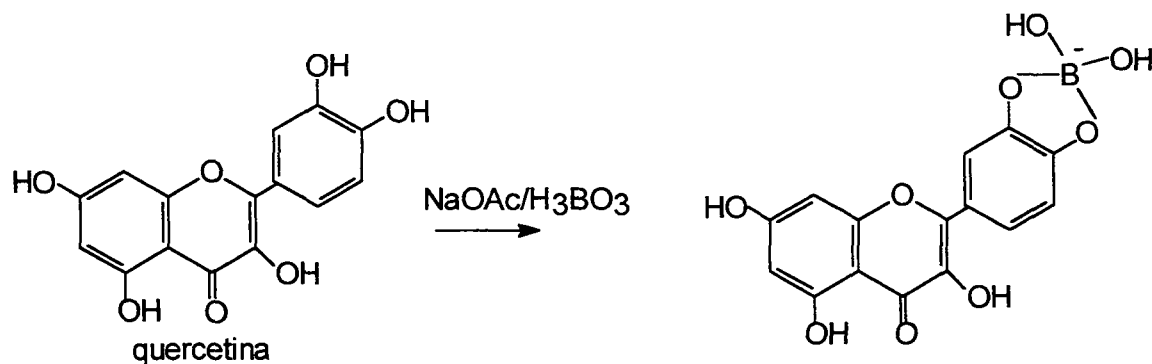


Quando adicionado NaOAc à solução metanólica da substância FA1 ocorreu um deslocamento batocrômico de todas as bandas, sendo que a banda I é deslocada em 9 nm e a banda II deslocada em 1 nm, caracterizando presença de hidroxila livre na posição 7. Quando a oxigenação da molécula é elevada o

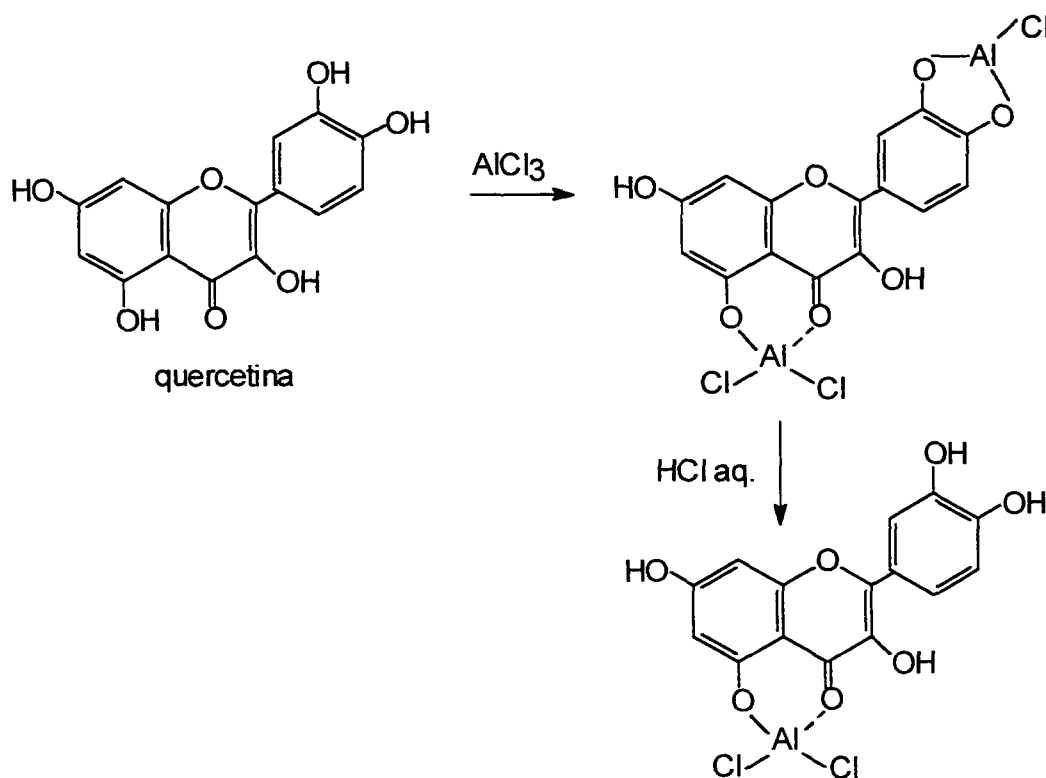
efeito com NaOAc é pequeno ou imperceptível. Após 5 min, não houve alteração nos deslocamentos ocorridos imediatamente.



Quando adicionado NaOAc/H₃BO₃ ocorreu deslocamento batocrômico de 16 nm na Banda II em relação ao espectro com metanol, o que segundo MABRY, 1970, ocorre em flavonóis quando há presença de hidroxilas livres em 3' e 4'.



O espectro obtido na adição de AlCl₃/HCl apresentou deslocamento batocrômico de 21 nm na Banda II, em relação ao espectro em metanol, indicando a presença de grupamentos hidroxilas vicinais em 3' e 4'.

TABELA 13 - ANÁLISE POR ULTRAVIOLETA DA QUERCETINA EM MeOH E NaOMe ($\lambda_{m\acute{a}x}$, nm)

MeOH	NaOMe (imediate)	NaOMe (após 5 min)	NaOMe (após 10 min)
371,6	327,8	322,0	321,0
304,6	274,8		
255,6	253,0		

TABELA 14 - ANÁLISE POR ULTRAVIOLETA DA QUERCETINA EM NaOAc E NaOH E H₃BO₃
($\lambda_{M\acute{A}X}$, nm)

MeOH + NaOAc (imediate)	MeOH + NaOH (após 5 min)	MeOH + NaOAc/H ₃ BO ₃
380,4	380,4	387,0
325,6	324,6	302,8
256,6	256,8	259,6

TABELA 15 - ANÁLISE POR ULTRAVIOLETA DA QUERCETINA EM AlCl₃ E AlCl₃/HCl ($\lambda_{m\acute{a}x}$, nm)

MeOH	MeOH + AlCl ₃	MeOH + AlCl ₃ /HCl
371,6	436,0	427,0
304,6	269,0	361,0
255,6		303,0
		264,0

5.1.3.1.5 Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H

Os espectros de RMN ^1H , foram obtidos a uma frequência de 75 MHz em acetona (Figura 38 p. 73 e tabela 16 p. 70), observa-se várias absorções na região de próton aromático, em 6,27 (1H, d), 6,53 (1H, d), 7,00 (1H, d), 7,70 (1H, dd), 7,83 (1H, d).

5.1.3.1.6 Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C

Os deslocamentos químicos atribuídos pelos espectros de ^{13}C à 75 MHz, em acetona, estão indicados na figura 39 p. 73 e na tabela 16 p. 70.

TABELA 16 - DADOS DE RMN DE ^{13}C E ^1H DA QUERCETINA

Anel A			Anel B		
	^{13}C	^1H		^{13}C	^1H
5	165.95		1	122.33	
6	98.40	7.70	2	115.39	7.00
7	164.10		3	145.26	
8	93.40	7.83	4	147.89	
9	156.43		5	115.89	6.53
10	103.20		6	120.35	6.27
2C α	145.26				
2C β	135.95				
4CO	176.05				

Com base nos dados da literatura (MABRY, 1970; MIGUEL, 1996; SDBS, 2002) e espectrais propôs-se a seguinte estrutura correspondente à quercetina.

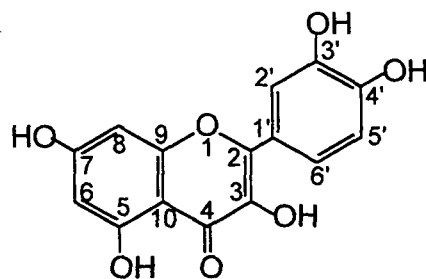


FIGURA 35 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DA QUERCETINA

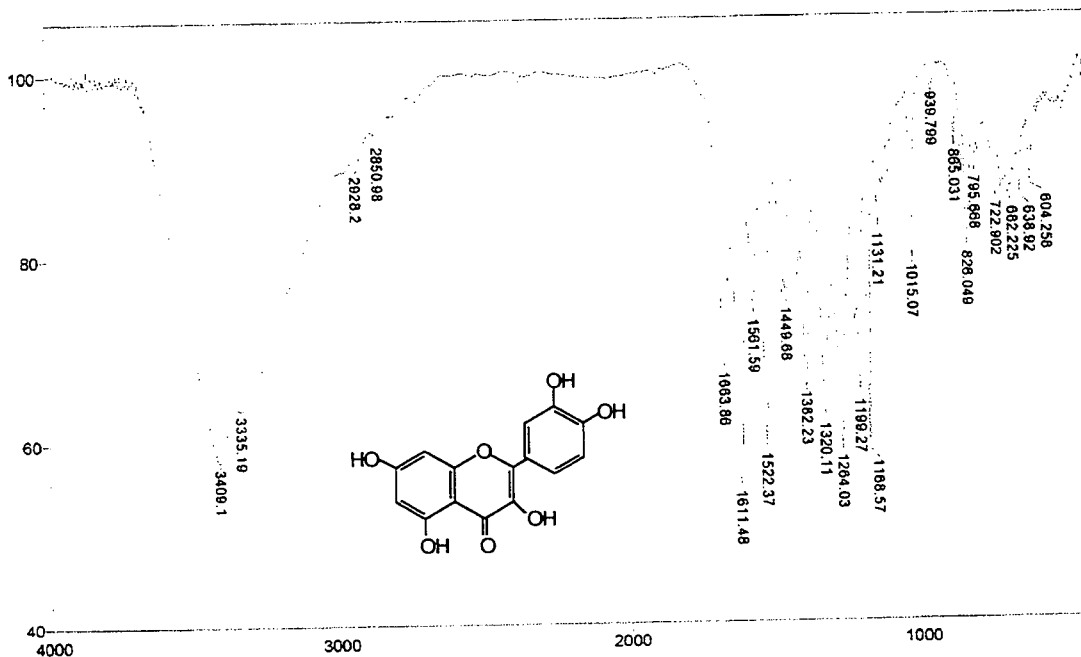


FIGURA 36 - ESPECTRO DE MASSA DA QUERCETINA

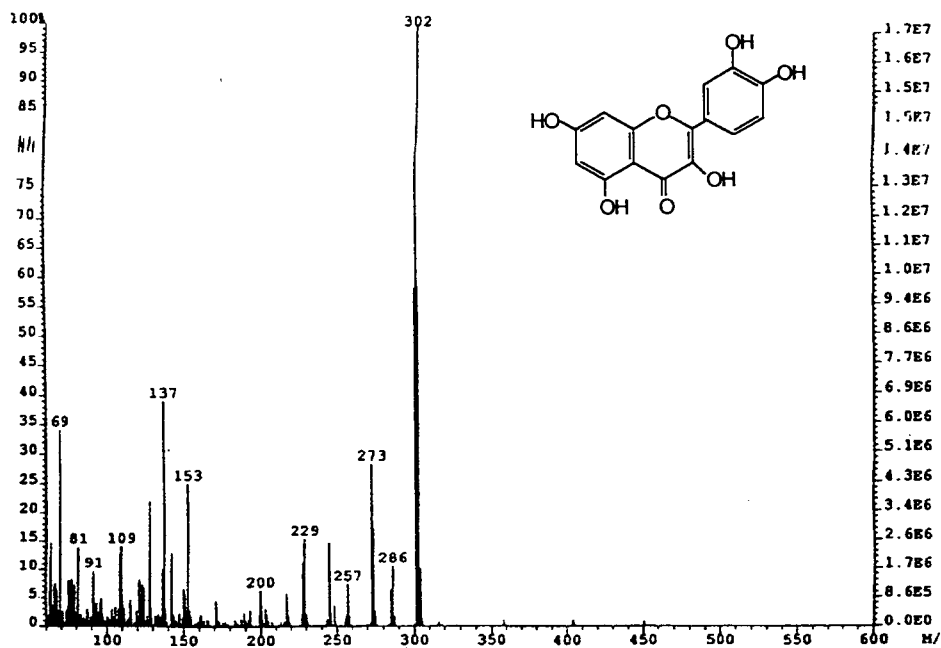
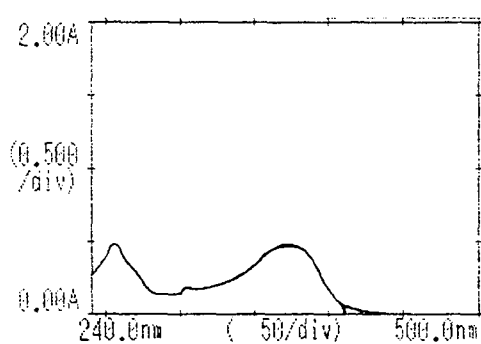
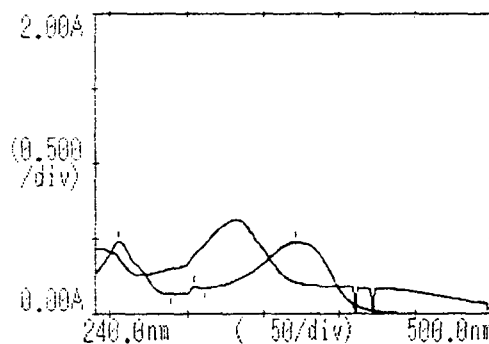


FIGURA 37 - ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA DA QUERCETINA



A

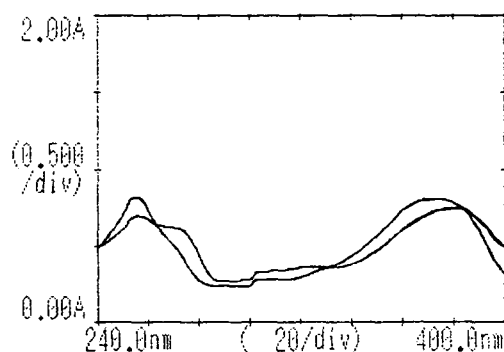


B

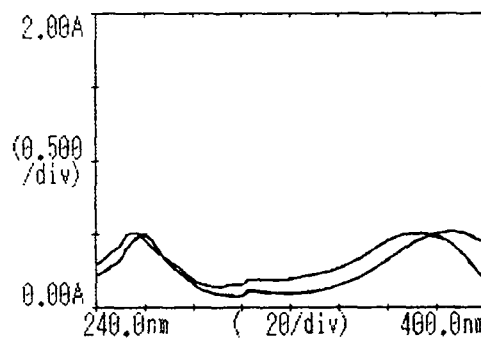
A. Substância em metanol ($\lambda_{m\acute{a}x}$, nm – 371,6; 304,6 ombro; 255,6)

B. Efeito hipsocrômico na presença de NaOMe ($\lambda_{m\acute{a}x}$, nm – 327,8; 274,8 ombro; 253,0)

Legenda: — MeOH; — NaOMe



C

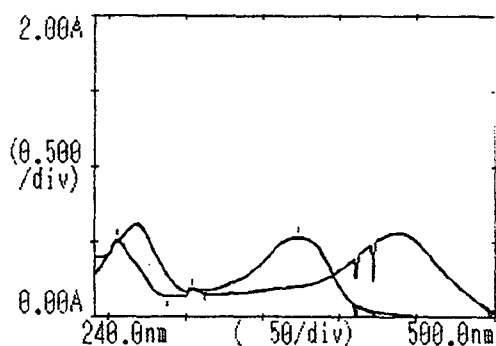


D

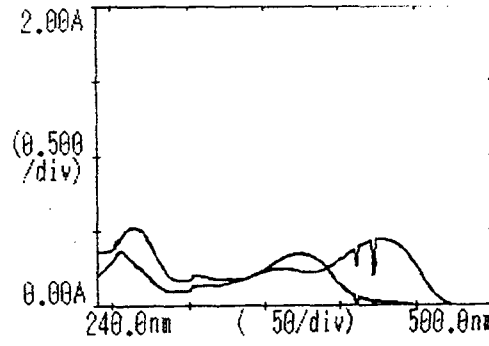
C. Efeito batocrômico na presença de NaOAc ($\lambda_{m\acute{a}x}$, nm – 380,4; 325,6 ombro; 256,6)

D. Efeito batocrômico na presença de NaOAc/H₃BO₃ ($\lambda_{m\acute{a}x}$, nm – 387,0; 302,6 ombro; 259,6)

Legenda: — NaOAc; — NaOAc/H₃BO₃



E

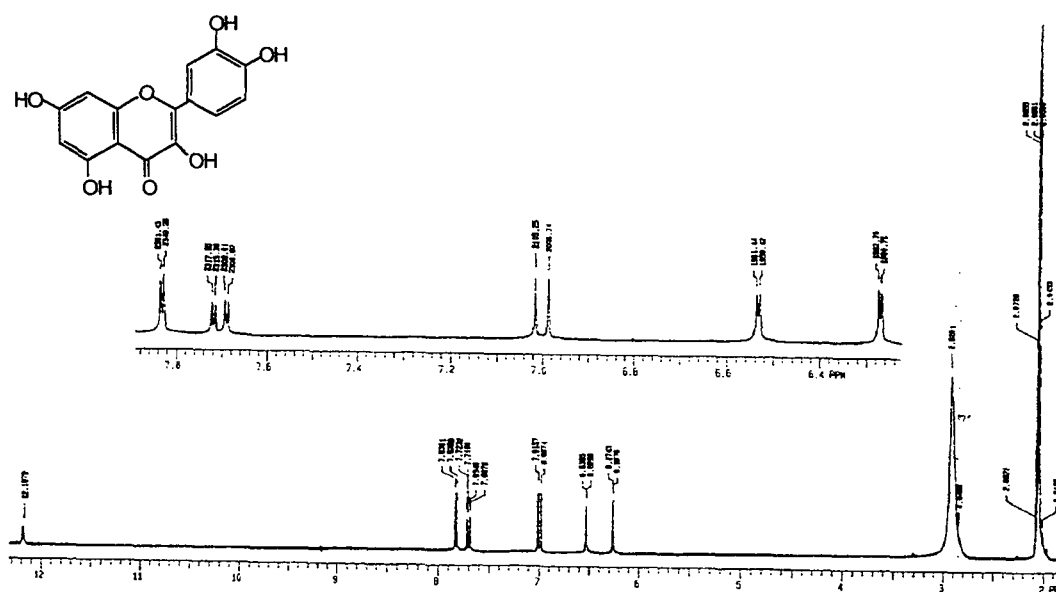
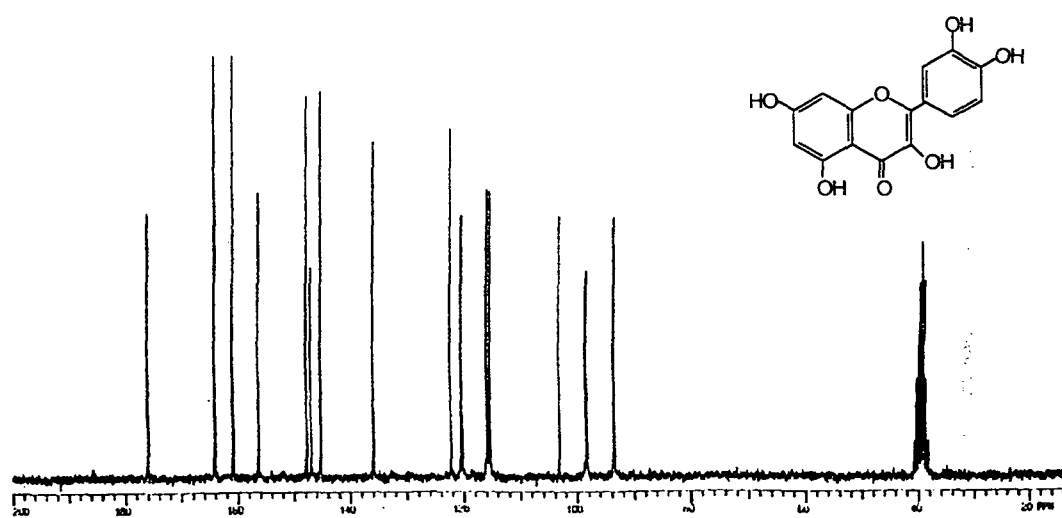


F

E. Efeito batocrômico na presença de AlCl₃ ($\lambda_{m\acute{a}x}$, nm – 436,0; 269,0)

F. Efeito batocrômico na presença de AlCl₃/HCl ($\lambda_{m\acute{a}x}$, nm – 427,0; 361,0; 303,0; 264,0)

Legenda: — AlCl₃; — AlCl₃/HCl

FIGURA 38 - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H DA QUERCETINAFIGURA 39 - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C DA QUERCETINA

5.1.3.2 Substância FA2

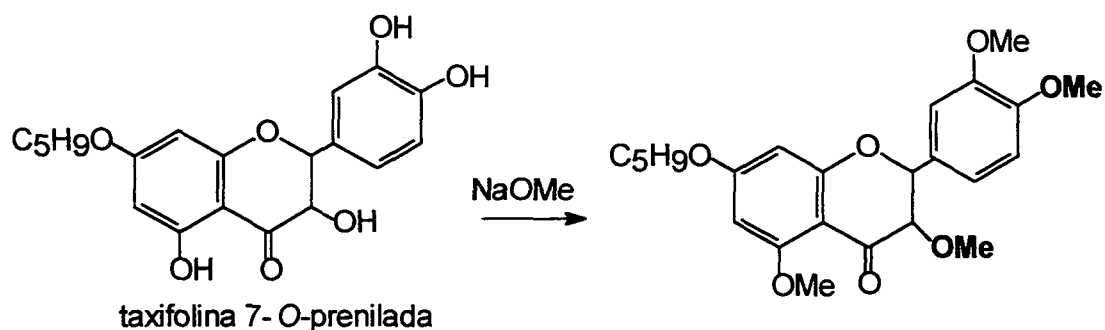
5.1.3.2.1 Espectro de absorção no infravermelho

O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 40 p. 78) apresentou banda larga entre 3487,32 e 3342,4 cm^{-1} referente ao estiramento do grupamento hidroxila, absorção normal de metilenos alifáticos em 2907,64 cm^{-1} , e ainda uma banda de absorção de grande intensidade em 1651,68 e 1631,55 cm^{-1} referentes a formação de olefinas conjugadas (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994).

5.1.3.2.2 Espectro de absorção no ultravioleta

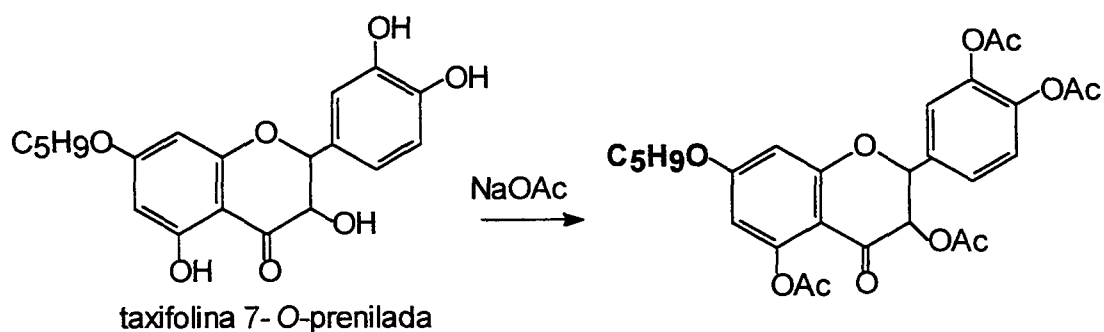
A análise do espectro de absorção na região do ultra violeta (Figura 41 p. 79) em metanol da substância FA2 apresentou uma banda em 290 nm e um ombro em 325 nm.

Pela adição de NaOMe ocorreu um deslocamento batocrômico de aproximadamente 1 nm na Banda principal e de aproximadamente 32 nm no ombro, indicando a presença de grupamento hidroxila livre na posição 4' do anel B. O espectro obtido após 5 min apresentou deslocamento batocrômico mais pronunciado em relação ao espectro obtido imediatamente, havendo grandes possibilidades de tratar-se de um sistema 3,3',4'-trihidroxil, o qual decompõe-se rapidamente. O espectro obtido após 10 min não apresentou alterações significativas daquele obtido em 5 min.

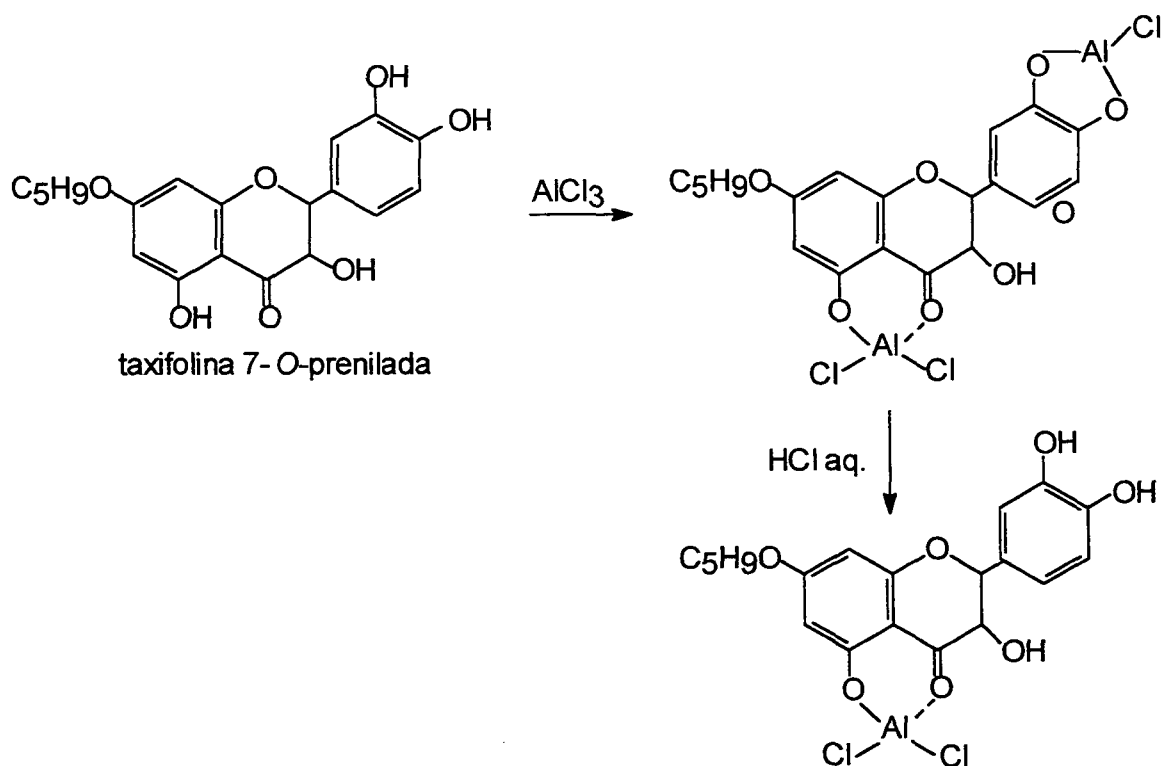


Quando adicionado NaOAc a solução metanólica da substância FA2 não ocorreu alterações em relação ao espectro obtido somente em solução

metanólica, indicando a ausência de hidroxila livre na posição 7 e em consequência a presença de grupamento ligado a este carbono.



O espectro obtido na adição de AlCl_3/HCl apresentou deslocamento batocrômico de 21 nm na Banda II, em relação ao espectro em metanol, indicando a presença de grupamentos hidroxilas vicinais em 3' e 4'.



Diante dos resultados obtidos na análise por ultravioleta, conclui-se que a substância apresenta sistema 3,3',4'-trihidroxil, não possui grupamento hidroxila livre na posição 7 e possui hidroxila livre na posição 5, e trata-se de um 5-hidroxi-

dihidro-flavonol. Segundo MABRY, 1970, a taxifolina apresenta absorções típicas em 290 nm e um ombro em 327 nm.

TABELA 17 - ANÁLISE POR ULTRAVIOLETA DA TAXIFOLINA 7-O-PRENILADA ($\lambda_{m\acute{a}x}$, nm)

MeOH	NaOMe (imediate)	NaOMe (após 5 min)	NaOMe (após 10 min)
290,4	357,8	360,8	360,4
	291,6	302,4	302,4
	242,4	290,8	290,8
		243,2	242,6

TABELA 18 - ANÁLISE POR ULTRAVIOLETA DA TAXIFOLINA 7-O-PRENILADA ($\lambda_{m\acute{a}x}$, nm)

MeOH + NaOAc (imediate)	MeOH + NaOAc (após 5 min)	MeOH + NaOAc/H ₃ BO ₃
Não houve reação	Não houve reação	Não houve reação

TABELA 19 - ANÁLISE POR ULTRAVIOLETA DA TAXIFOLINA 7-O-PRENILADA ($\lambda_{m\acute{a}x}$, nm)

MeOH	MeOH + AlCl ₃	MeOH + AlCl ₃ /HCl
290,4	302,6	363,4
	293,2	311,8
	253,0	253,2

5.1.3.2.3 Espectro de ressonância magnética nuclear de ¹H

O espectro de ressonância magnética nuclear ¹H (Figuras 42, 43 p. 80 e tabela 20 p. 77), foram obtidos a uma frequência de 75 MHz, utilizando acetona como solvente.

5.1.3.2.4 Espectro de ressonância magnética nuclear de ¹³C

Os deslocamentos químicos atribuídos pelos espectros de ¹³C (Figuras 44, 45 p. 81 e tabela 20 p. 77) à 75 MHz, em Acetona. Também foram realizados espectros em HETCOR que permite correlacionar cada sinal dos carbonos protonados com o sinal do respectivo próton (Figura 46 p. 82).

TABELA 20 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN ¹³C DA TAXIFOLINA 7-O-PRENILADA

C	RMN ¹³ C	¹ H (HETCOR)
2	84.51	5.05
3	73.13	4.64
4	198.48	
5	163.84	
6	95.17	6.04
7	168.44	
8	96.24	6.07
9	164.5	
10	101.9	
1'	129.64	
2'	115.80	7.07
3'	146.49	
4'	145.66	
5'	115.67	6.87
6'	120.79	6.93
1''	66.15	4.63
2''	119.93	5.45
3''	139.01	
4''	18.16	1.75
5''	25.73	1.78

Com base nos dados da literatura (MABRY, 1970; VILEGAS, 1995) e espectrais propôs-se a seguinte estrutura correspondente à taxifolina 7-O-prenilada.

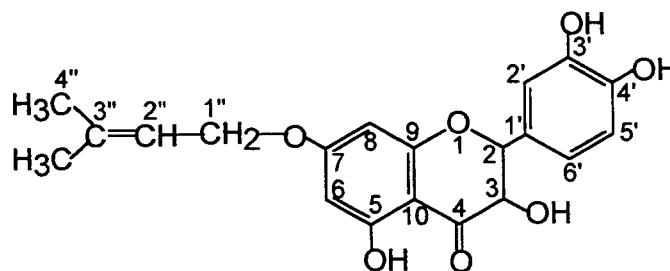


FIGURA 40 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DA TAXIFOLINA 7-O-PRENILADA

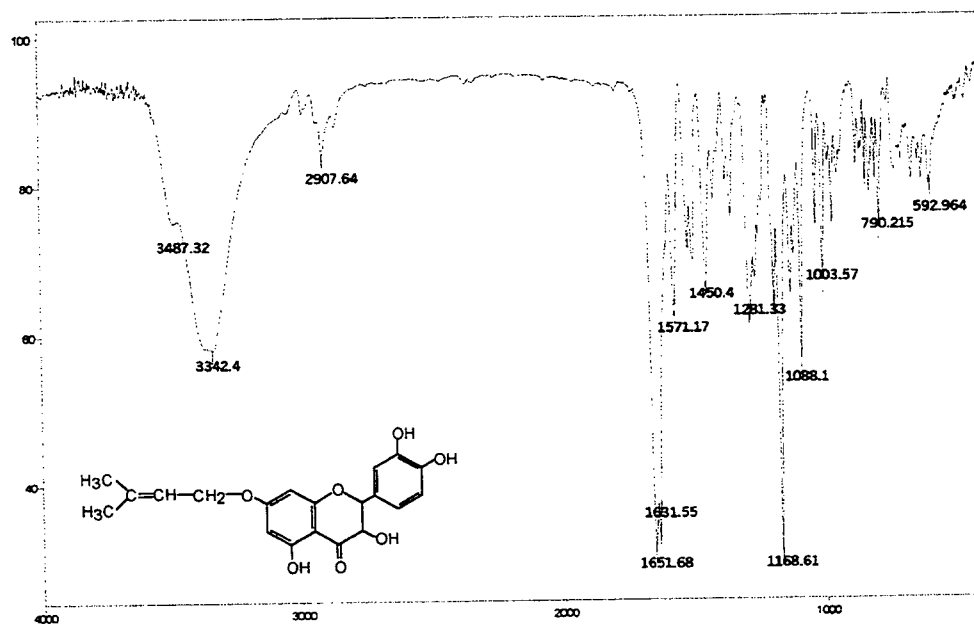
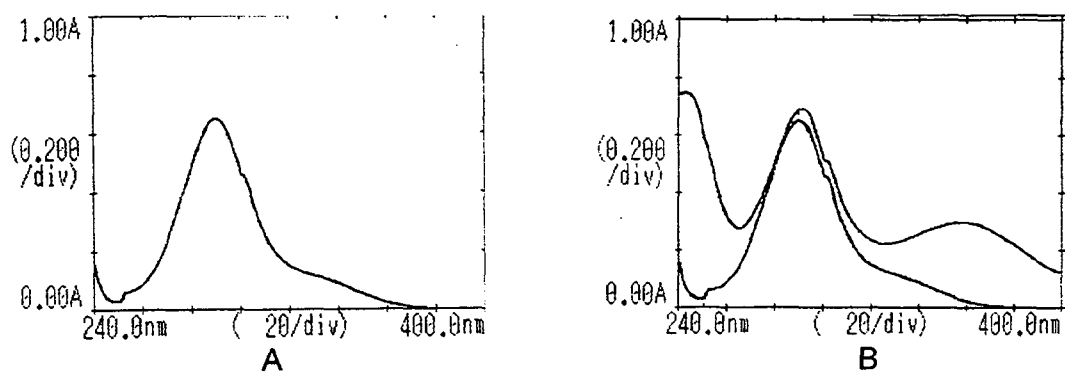


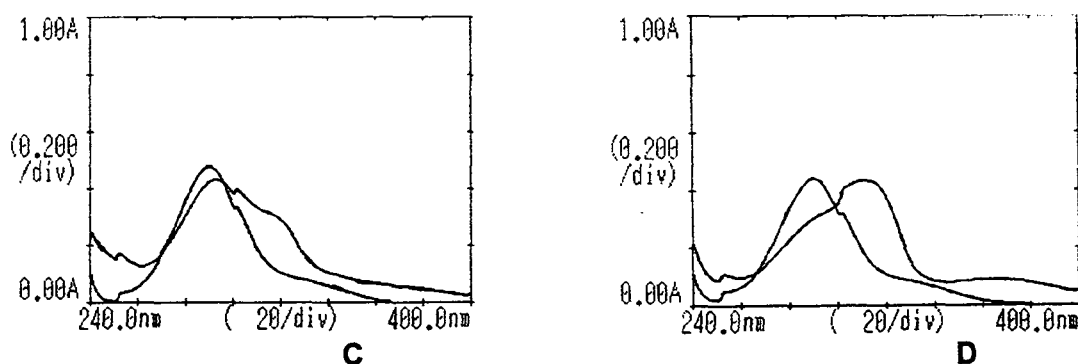
FIGURA 41 - ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA DA SUBSTÂNCIA TAXIFOLINA 7-O-PRENILADA.



A. Substância em metanol ($\lambda_{\text{máx}}$, nm - 290,4)

B. Efeito batocrômico na presença de NaOMe ($\lambda_{\text{máx}}$, nm - 357,8; 291,6; 242,4)

Legenda: — MeOH; — NaOMe



C. Efeito batocrômico na presença de AlCl_3 ($\lambda_{\text{máx}}$, nm - 302,6; 293,2; 253,0)

D. Efeito batocrômico na presença de AlCl_3/HCl ($\lambda_{\text{máx}}$, nm - 363,4; 311,8; 253,2)

Legenda: — AlCl_3 ; — AlCl_3/HCl

FIGURA 42 - ESPECTRO RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H DA TAXIFOLINA 7-O-PRENILADA

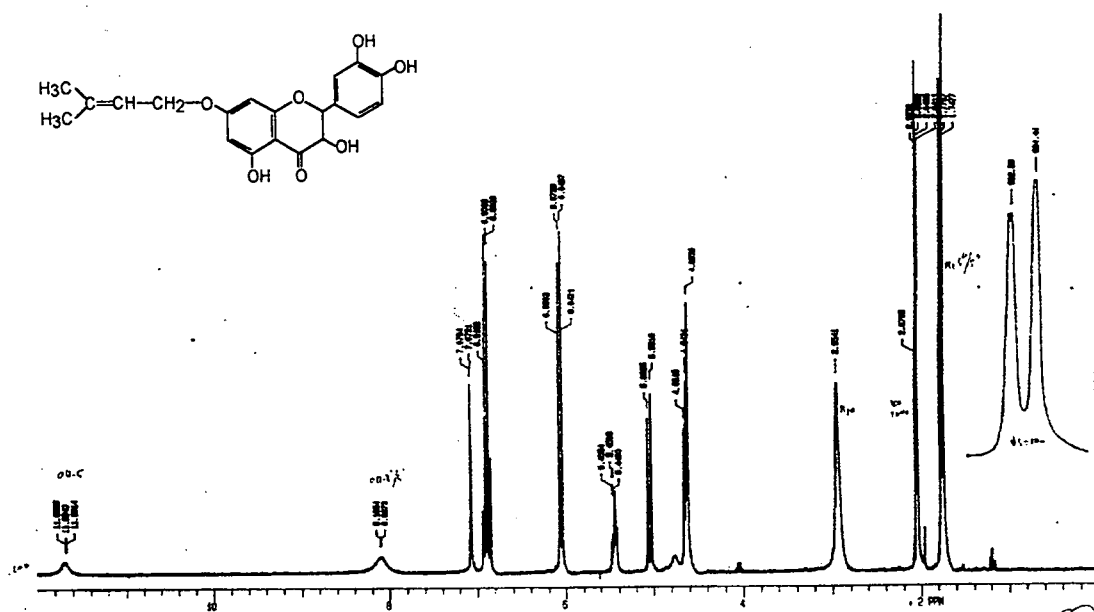


FIGURA 43 - ESPECTRO RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H DA TAXIFOLINA 7-O-PRENILADA

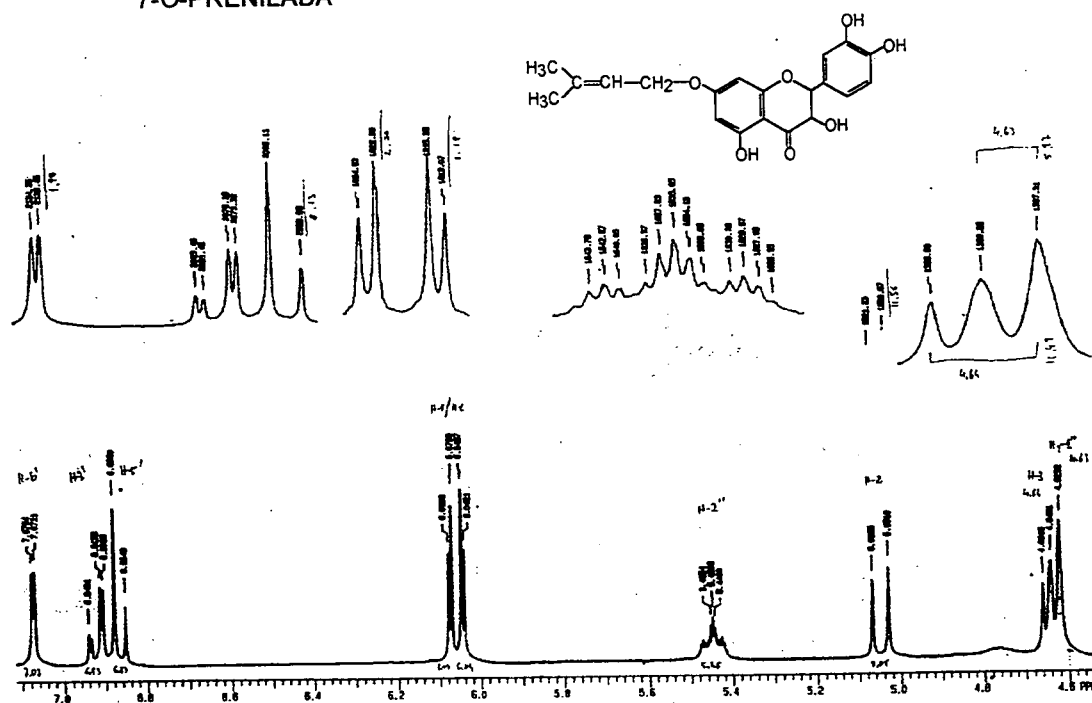


FIGURA 44 - ESPECTRO RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C DA TAXIFOLINA 7-O-PRENILADA

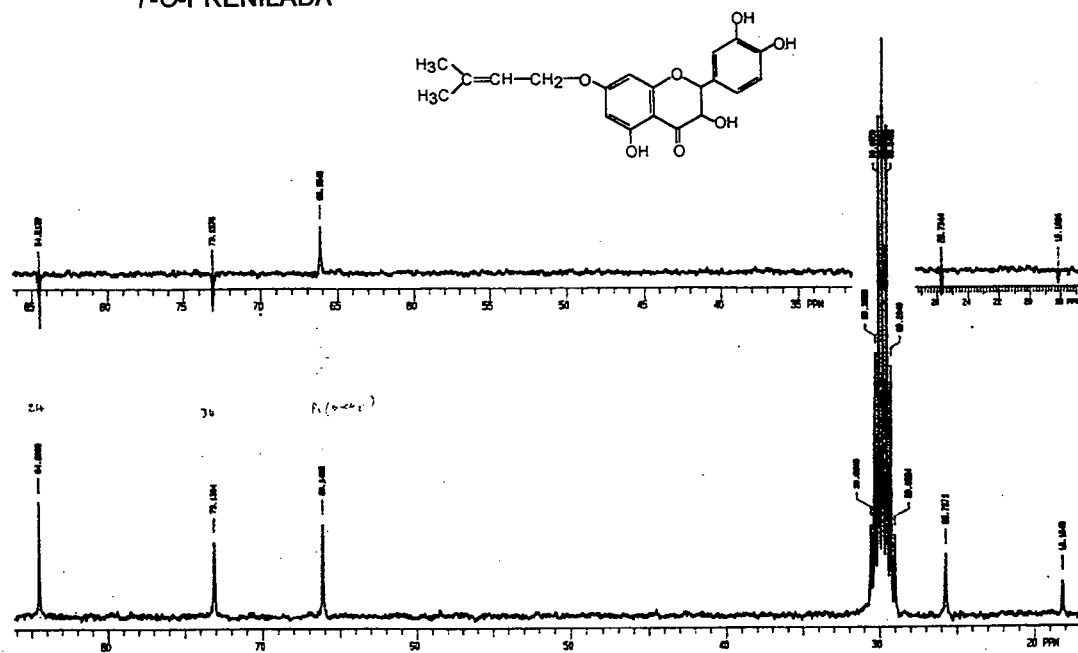
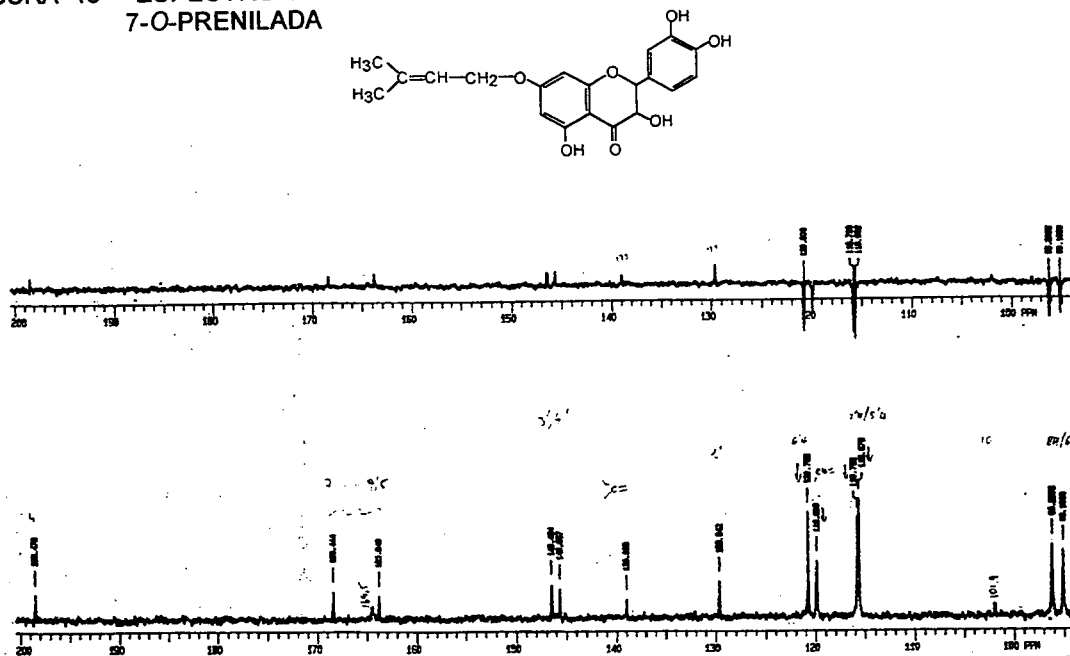


FIGURA 45 - ESPECTRO RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C DA TAXIFOLINA 7-O-PRENILADA



5.1.4 Fração metanólica

Foram colhidas 210 frações de aproximadamente 10 mL cada (Tabela 21 p.83).

TABELA 21 - FRAÇÕES COLETADAS E REUNIDAS DA FRAÇÃO METANÓLICA

Frações	Hexano: AcOEt: MeOH	Frações reunidas	Frações	Hexano: AcOEt: MeOH	Frações reunidas
1	100:0:0	1 a 7	13	40:60:0	86 a 92
2	95:5:0	8 a 14	14	35:65:0	93 a 99
3	90:10:0	15 a 21	15	30:70:0	100 a 107
4	85:15:0	22 a 28	16	25:75:0	108 a 115
5	80:20:0	29 a 36	17	20:80:0	116 a 127
6	75:25:0	37 a 44	18	15:85:0	128 a 139
7	70:30:0	45 a 49	19	10:90:0	140 a 150
8	65:35:0	50 a 57	20	5:95:0	151 a 160
9	60:40:0	58 a 64	21	0:100:0	161 a 174
10	55:45:0	65 a 71	22	0:95:5	175 a 186
11	50:50:0	72 a 78	23	0:90:10	187 a 198
12	45:55:0	79 a 85	24	0:85:15	199 a 210

Desta fração não houve isolamento de substâncias.

5.2 ESTUDOS MORFO-ANATÔMICOS

A espécie *Pterocaulon interruptum* DC. apresenta-se em grupos ou isolada (Figura 47, A p. 85). Possui porte subarborescente com aproximadamente 1,20 m de altura, caule ereto, penta-alado (Figura 47, B p. 85).

As folhas de *Pterocaulon interruptum* DC., de acordo com HICHEY, 1974, são simples, alternas, lanceoladas, sésseis, simétricas, ápice agudo (menor que 90°) e mucronado, margem irregular levemente serrilhada, textura aveludada, nervura reticulada e proeminente na face abaxial, base da folha prolonga-se na ala, discolor, sendo verde na face adaxial e cinza esverdeado na face abaxial (Figura 47, C p. 85). Possui gema caulinar evidente e inflorescência composta em capítulos terminais (Figura 47, D p. 85). A epiderme adaxial apresenta tricomas tectores pluricelulares do tipo flageliforme com paredes colabadas (Figura 48, A p. 86) e revela paredes anticlinais de contorno ondulado (Figura 48, B p. 86). A epiderme abaxial em vista frontal também apresenta paredes anticlinais de contorno ondulado e estômatos do tipo anomocítico, apresenta tricomas tectores em maior abundância comparativamente à face adaxial (Figura 48, C p. 86) e cutícula mais intensamente estriada que na face adaxial (Figura 48, D p. 86). Em secção transversal, observa-se epiderme uniestratificada, cutícula relativamente delgada (Figura 49, A p. 87), estômatos proeminentes em relação às demais células (Figura 49, B p. 87), presença de tricoma glandular. No mesofilo, o clorênquima se diferencia em parênquima paliçádico atípico com aproximadamente duas camadas, células pouco alongadas, parênquima lacunoso multi estratificado com pequenos espaços intercelulares, compondo mesofilo do tipo dorsiventral ou heterogêneo assimétrico (Figura 49, C p. 87). O bordo foliar possui as mesmas características das demais partes, porém está levemente curvado em direção à face abaxial (Figura 49, D p. 87). O terço proximal possui características que se assemelham ao terço mediano. A nervura mediana em secção transversal possui formato plano convexo, sendo a convexidade proeminente na face abaxial (Figura 50, A p. 88), epiderme uniestratificada, estômato inserido em nível mais elevado que as demais células, numerosos tricomas tectores pluricelulares, de modo subjacente a ambas as faces epidérmicas encontra-se colênquima do tipo angular. Mergulhado no parênquima fundamental encontra-se feixe vascular do tipo colateral, envolto por bainha de

células esclerenquimáticas. O xilema se dispõe em direção à face adaxial e os elementos traqueais se dispõem em fileiras separadas por células parenquimáticas. Em secção transversal da nervura mediana evidencia-se grãos de amido, observados em diversas células do colênquima (Figura 50, B p. 88), células contendo compostos fenólicos foram encontradas no mesofilo da lâmina foliar e na nervura (Figura 50, C p. 88), evidência de região colenquimática junto às faces epidérmicas (Figura 50, D e E p. 88), bainha esclerenquimática pela reação com floroglucinol clorídrico (Figura 50, F p. 88), também apresenta substâncias graxas na cutícula e base dos tricomas tectores (Figura 50, G p. 88). O caule em estrutura secundária e secção transversal apresenta epiderme pilosa, porção central arredondada apresentando cinco projeções laterais formando alas. O sistema floemático encontra-se disposto periféricamente e o xilemático centriptamente delimitando a região medular, calotas de células esclerenquimáticas apostas ao floema.

FIGURA 47 - A. ASPECTO GERAL DE *Pterocaulon interruptum* DC. B. DESTAQUE DO CAULE ALADO; C. FACE ADAXIAL COM COLORAÇÃO VERDE E FACE ABAXIAL COM COLORAÇÃO CINZA ESVERDEADO; D. INFLORESCÊNCIA COM CAPÍTULOS TERMINAIS

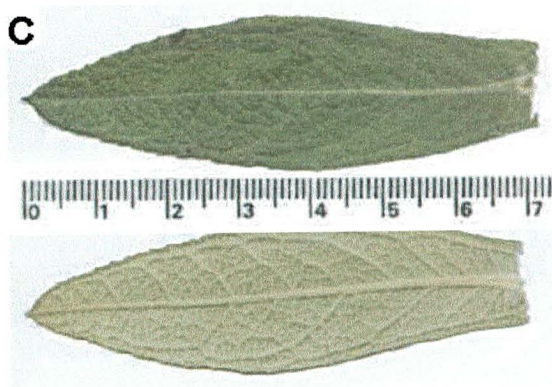
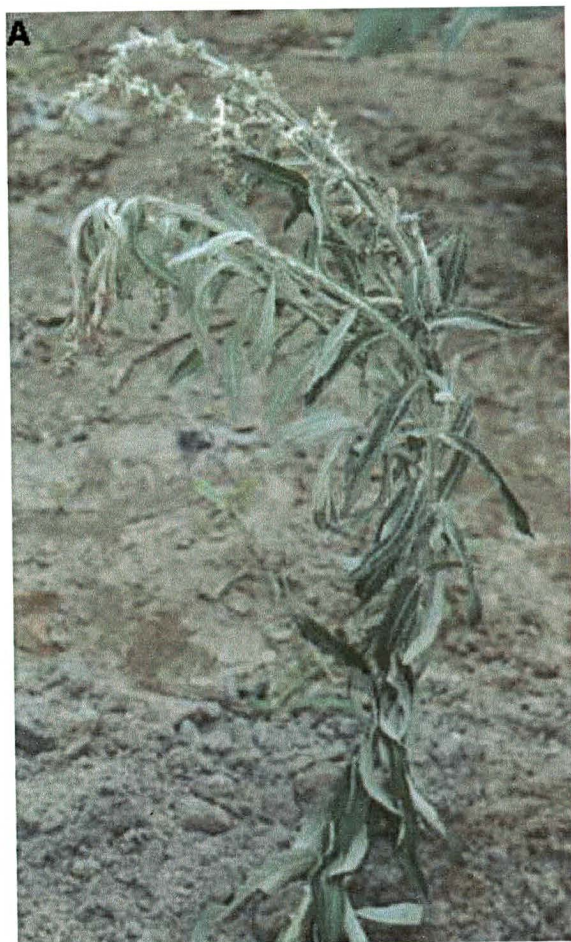


FIGURA 48 - A. SUPERFÍCIE ADAXIAL, PRESENÇA DE TRICOMAS TECTORES (MEV 282 X); B. SUPERFÍCIE ADAXIAL DESTACANDO-SE CÉLULAS DE CONTOURNO ONDULADO, LEVEMENTE ESTRIADAS (MEV 1288 X); C. SUPERFÍCIE ABAXIAL ONDE OBSERVA-SE NUMEROSOS TRICOMAS TECTORES (MEV 248 X); D. SUPERFÍCIE ABAXIAL, CUTÍCULA INTENSAMENTE ESTRIADA (MEV 1350 X)

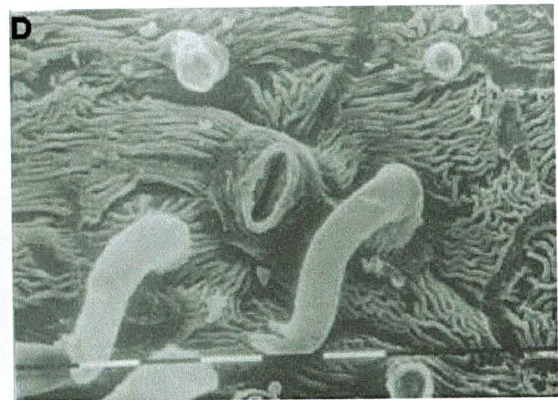
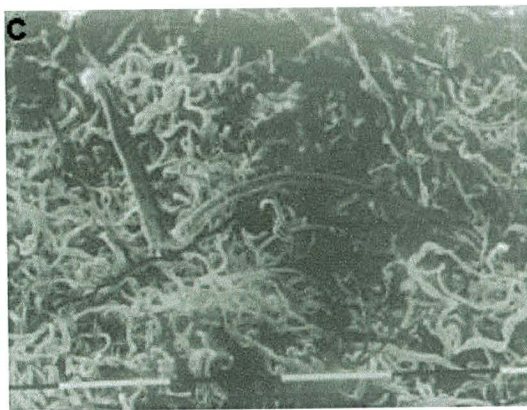
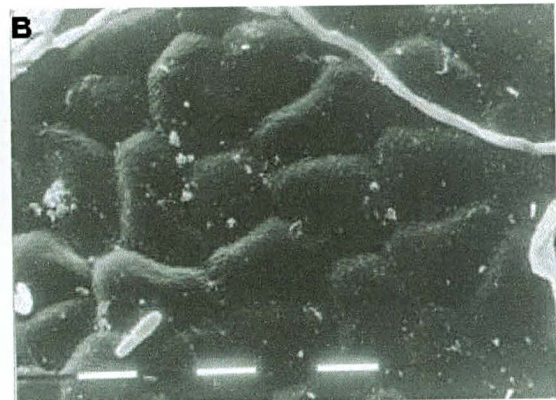
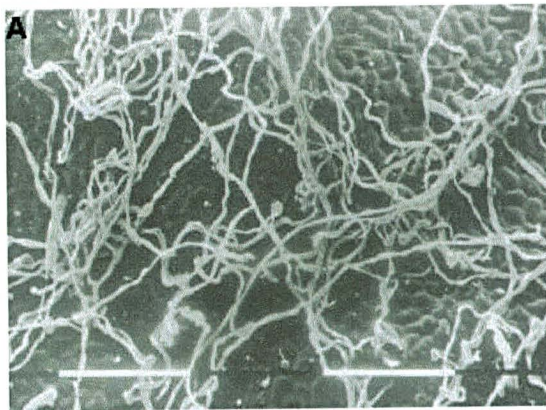


FIGURA 49 - A. SECÇÃO TRANSVERSAL, EPIDERME UNISTRATIFICADA, CUTÍCULA RELATIVAMENTE DELGADA, ESTÔMATOS PROEMINENTES EM RELAÇÃO ÀS DEMAIS CÉLULAS (FUCSINA); B. DESTACA-SE ESTÔMATO PROEMINENTE (MEV 1535 X); C. MESOFILO DORSIVENTRAL (AZUL DE TOLUIDINA); D. BORDO FOLIAR (AZUL DE TOLUIDINA)

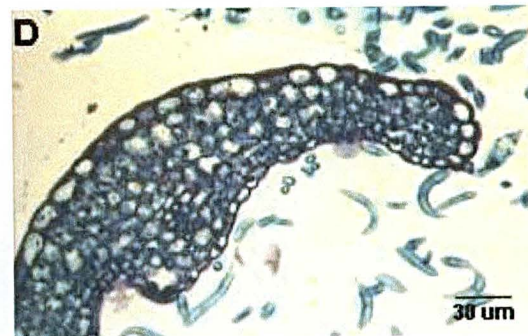
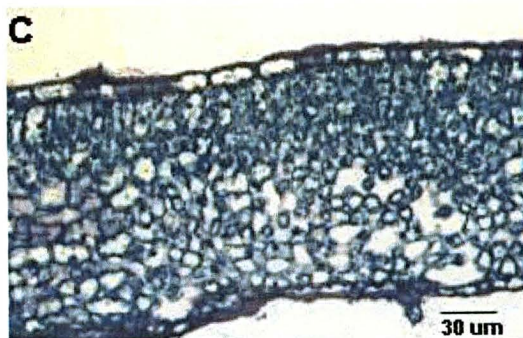
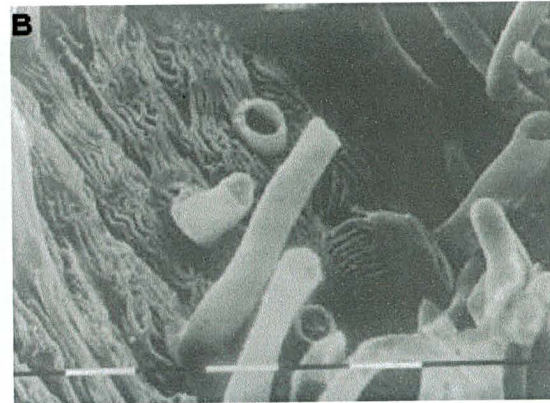
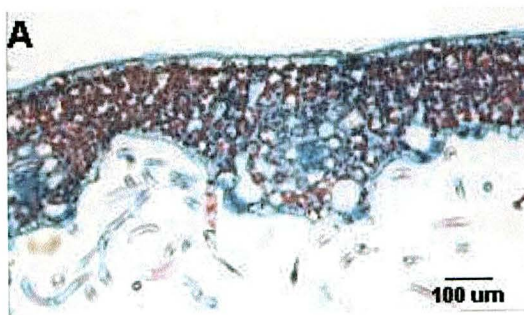
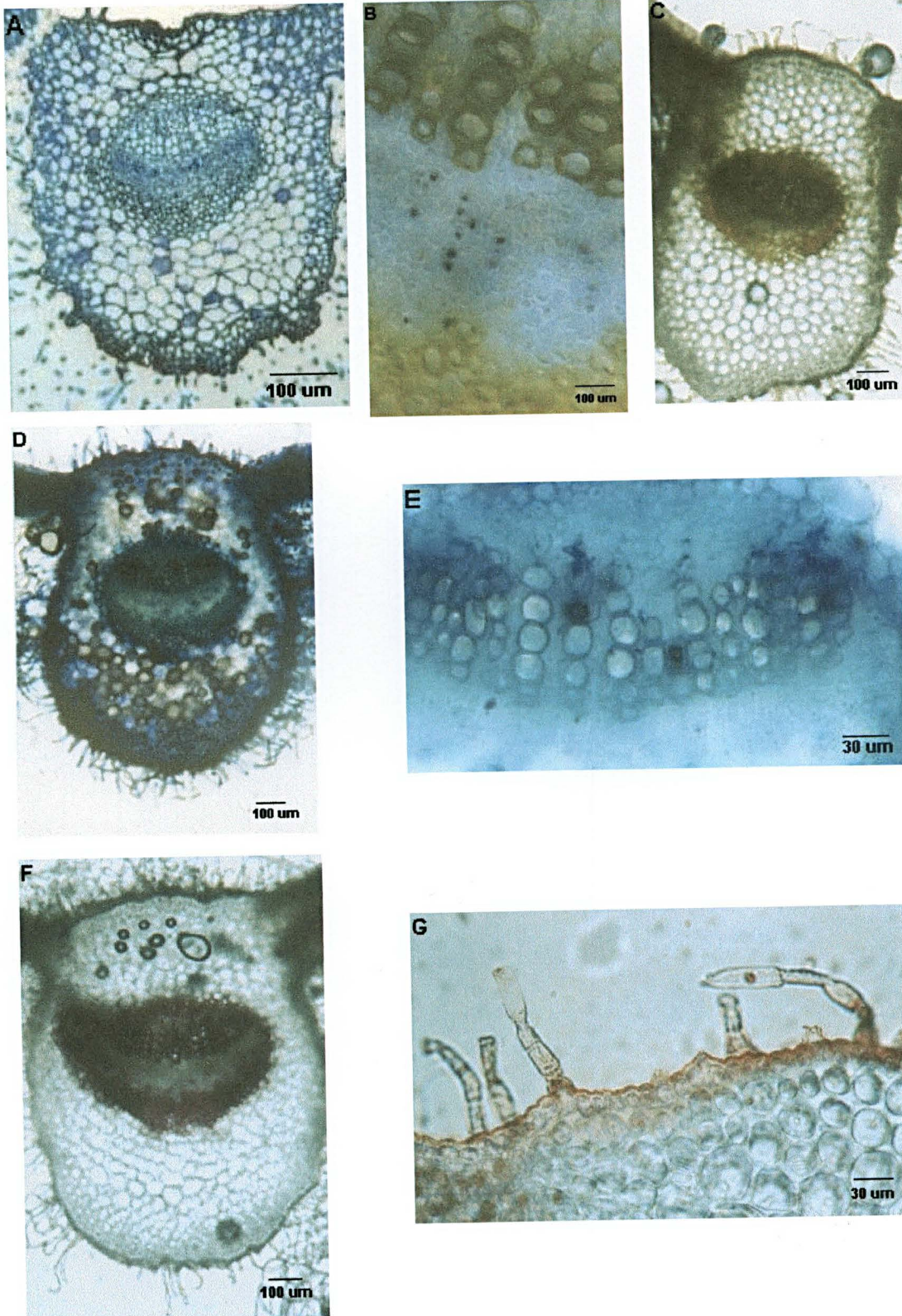


FIGURA 50 - A. NERVURA MEDIANA (AZUL DE TOLUIDINA); B. PRESENÇA DE AMIDO (LUGOL); C. PRESENÇA DE COMPOSTOS FENÓLICOS (CLORETO FÉRRICO); D. NERVURA CENTRAL (AZUL DE TOLUIDINA); E. DETALHE DA ANTERIOR; F. BAINHA ESCLERENQUIMÁTICA (FLOROGLUCINOL CLORÍDRICO); G. PRESENÇA DE SUBSTÂNCIAS GRAXAS (SUDAM III)



5.3 ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS

Os controles realizados foram satisfatórios, sendo que o meio de cultura (Figura 51 p. 91) e os discos contendo extrato (Figura 52 p. 91) utilizado apresentavam-se estéreis. Os discos que continham os solventes utilizados, álcool etílico e água, após secagem em estufa não apresentaram efeito inibitório frente as cepas utilizadas (Figura 53 p. 91).

A fração hidrossolúvel do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Pterocaulon interruptum* DC. não apresenta atividade antimicrobiana frente as seguintes cepas: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), conforme apresentado na Figura 54 p. 92.

FIGURA 51 – CONTROLE DE ESTERILIDADE DO MEIO DE CULTURA



FIGURA 52 – CONTROLE DE ESTERILIDADE DOS DISCOS



FIGURA 53 – CONTROLE DE AUSÊNCIA DE INIBIÇÃO DOS DISCOS DE SOLVENTE (ÁLCOOL ETÍLICO) E ÁGUA FRENTE ÀS CEPAS DE *Escherichia coli* (A), *Pseudomonas aeruginosa* (B) E *Staphylococcus aureus* (C).



A

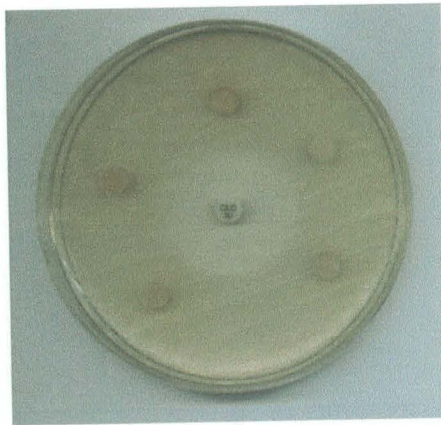


B



C

FIGURA 54 - PLACAS DE ÁGAR MÜLLER-HINTON CONTENDO MICRORGANISMOS SEMEADOS E DISCOS DE PAPEL CONTENDO CONCENTRAÇÃO CONHECIDA DE EXTRATO. **A** - *Escherichia coli*; **B** - *Pseudomonas aeruginosa*; **C** - *Staphylococcus aureus*

**A****B****C**

5.4 DISCUSSÃO

A determinação botânica foi realizada pelo botânico Gert Hatschbach, e pelo biólogo Osmar dos Santos Ribas, ambos Museu Botânico Municipal de Curitiba, Estado do Paraná, local onde havia maior número de exemplares da espécie em estudo em Curitiba, totalizando 15 exsicatas (Tabela 1 p. 13), havendo melhores condições de realizar a determinação corretamente.

Foram realizadas análises da estrutura anatômica por meio de microscopia fotônica e por microscopia eletrônica de varredura, sendo que as estruturas anatômicas descritas por CABRERA, 1963, são compatíveis com a análise do material em estudo.

A espécie *Pterocaulon interruptum* DC. apresentam-se em grupos ou isolados, possui porte subarborescente com aproximadamente 1,20 m de altura, caule ereto, alado com 5 alas. As folhas de *Pterocaulon interruptum* DC. são simples, alternas, lanceoladas, sésseis, simétricas, ápice agudo (menor que 90°) e mucronado, margem irregular levemente serrilhada, textura aveludada, nervura reticulada e proeminente na face abaxial, base da folha prolonga-se na ala, discolor, sendo verde na face adaxial e cinza esverdeado na face abaxial. Possui gema caulinar evidente e inflorescência composta em capítulos terminais. A epiderme adaxial apresenta tricomas tectores pluricelulares do tipo flageliforme não septado com paredes colabadas, o qual foi motivo de contestação por DRURY e WATSON em 1966, os quais afirmaram que o gênero estava erroneamente contido na tribo Inuleae (BARROSO, 1991). A epiderme abaxial em vista frontal também apresenta paredes anticlinais de contorno ondulado e estômatos do tipo anomocítico, apresenta tricomas tectores em maior abundância comparativamente à face adaxial, típico de plantas tropicais e cutícula mais intensamente estriada que na face adaxial. Em secção transversal, observa-se epiderme uniestratificada, cutícula relativamente delgada, estômatos proeminentes em relação às demais células, presença de tricoma glandular. No mesofilo, o clorênquima se diferencia em parênquima paliçádico atípico com aproximadamente duas camadas, células pouco alongadas, parênquima lacunoso multi estratificado com pequenos espaços intercelulares, compondo mesofilo do tipo dorsiventral ou heterogêneo assimétrico. O bordo foliar possui as mesmas características das demais partes, porém está levemente curvado em direção à

face abaxial. A nervura mediana em secção transversal possui formato plano convexo, sendo a convexidade proeminente na face abaxial, epiderme uniestratificada, estômato inserido em nível mais elevado que as demais células, numerosos tricomas tectores pluricelulares, de modo subjacente a ambas as faces epidérmicas encontra-se colênquima do tipo angular. Mergulhado no parênquima fundamental encontra-se feixe vascular do tipo colateral, envolto por bainha de células esclerenquimáticas. O xilema se dispõe em direção à face adaxial e os elementos traqueais se dispõem em fileiras separadas por células parenquimáticas. Em secção transversal da nervura mediana evidencia-se grãos de amido são observados em diversas células do colênquima, células contendo compostos fenólicos foram encontradas no mesofilo da lâmina foliar e na nervura, evidência de região colenquimática junto às faces epidérmicas, bainha esclerenquimática pela reação com floroglucinol clorídrico, também apresenta substâncias graxas na cutícula e base dos tricomas tectores. O caule em estrutura secundária e secção transversal apresenta epiderme pilosa, porção central arredondada apresentando cinco projeções laterais formando alas. O sistema floemático encontra-se disposto periféricamente e o xilemático centriptamente delimitando a região medular, calotas de células esclerenquimáticas apostas ao floema.

Na abordagem fitoquímica encontrou-se resultados comparáveis com os citados na literatura, destacando-se a presença no extrato aquoso de ácidos graxos, aminogrupos e glicosídeos saponínicos e no extrato hidroalcoólico a presença de alcalóides, cumarinas, esteróides e/ou triterpenos e glicosídeos flavônicos. Optou-se pela extração utilizando Soxhlet modificado (contendo uma saída lateral e inferior) uma vez que CARVALHO, 2001 comprovou em estudos comparativos que o processo eleito apresentou um rendimento 60% maior em relação ao processo de extração por dupla maceração. Também afirma ser um método mais eficiente, reprodutivo, rápido e termoestável.

Após a extração, as frações foram cromatografadas em coluna e reunidas utilizando-se CCD. Das frações reunidas foram isoladas e identificadas por métodos cromatográficos e espectrofotométricos UV, IV, EM, RMN ¹H, RMN ¹³C e CGEM, cinco substâncias: sabandinol (cumarina), quercetina (flavonol), taxifolina

7-O-prenilada (di-hidroflavonol), estigmasterol (esteróide) e 3-O-acetil taraxasterol (esteróide).

A cumarina isolada, denominada sabandinol havia sido anteriormente isolada e caracterizada da espécie *Ruta pinnata* (Rutaceae). DEBENEDETTI et al., 1981, também isolou esta cumarina da espécie *Pterocaulon virgatum*, porém em 1997, a mesma equipe realizou uma revisão e correção da estrutura anteriormente publicada.

A quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavona) - $C_{15}H_{10}O_7$ P.M. 302,24, é o flavonóide mais comum em plantas superiores, usualmente presente na forma glicosídica (ex. rutina, isoquercetrina, quercitrina), mas também isolado na forma livre das famílias Asteraceae, Passiflorae, Rhamnaceae e Solanaceae. Inibe muitas enzimas, p.ex. proteína quinase C, lipogêneses, 3',5'-ciclo adenosina monofosfato fosfodiesterases. É um capturador de radicais livres. Esta flavona também inibe a contração muscular lisa e a proliferação de linfócitos em ratos. É anticoncepcional, anti-inflamatório, antibacteriano, antiviral e antihepatotóxico, e apresenta alguma atividade mutagênica e propriedades alergênicas (HARBORNE, 1999).

Flavonóides, como a quercetina, extraídos de várias plantas, apresentam efeito diferenciado como inibidores das tirosinas quinases e as serina / treonina quinases. Inibidores específicos para as tirosina quinases podem ser importantes no tratamento do câncer (YUNES; CALIXTO, 2001).

BOHLMANN, et al., (1981) isolaram de *Pterocaulon virgatum* as substâncias taxifolina 7-O-prenilada, 3-O-acetil-taraxasterol, entre outras.

A taxifolina - $C_{15}H_{12}O_7$ P.M. 304,26, também denominada dihidroquercetina, distilina, e 3,5,7,3', 4'-pentahidroxi-flavanona possui ocorrência muito difundida, em muitas Coniferae, em *Acacia catechu* (Leguminosae), *Polygonum nodosum* (Polygonaceae) e *Salix caprea* (Salicaceae). A taxifolina 3-ramnosídeo, denominada astilbina, ocorre em *Astilbe* spp. (Saxifragaceae) e as taxifolinas 3 e 7-galactosídeo ocorrem em *Rhododendron* spp. (Ericaceae). Antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, antihepatotóxica e atividade anti oxidante. Estimula a síntese de RNA em fígado de ratos isolados *in vitro*. Inibe a NADH-oxidase, succinoxidase e Δ^5 -lipoxigenase. Também inibe o crescimento da larva de *Heliothis zea*, tanto quanto a astilbina (HARBONE, 1999).

A taxifolina 3-O-acetato - $C_{17}H_{14}O_8$ P.M. 346,29, é encontrada em *Hymenoxys turneri*, *Tessaria dodoneifolia*, *Baccharis varicans* e *Inula viscosa* (Asteraceae). Intensamente doce, cerca de 80 vezes mais doce que a sacarose.

O estigmasterol - $C_{29}H_{48}O$ P.M. 412,70, é encontrado em muitas plantas superiores, p.ex. grãos de soja, *Glycine max* e grãos de Calabar e *Physostigma venenosum* (Leguminosae). Executa um papel vital na estrutura das membranas celulares de plantas (HARBORNE, 1999).

O taraxasterol - $C_{30}H_{50}O$ P.M. 426,73 é também denominado de taraxasterina, antesterina e α -lactucerol, ocorre em raízes de dente-de-leão, *Taraxacum officinale*, em flores de *Anthemis nobilis*, em *Eupatorium cannabinum* (Asteraceae) e em *Euphorbia tirucalli* (Euphorbiaceae).

Por meio de hidrodestilação, obteve-se um rendimento de 0,2% de óleo essencial, o qual foi avaliado por CGEM, sendo identificados 8 compostos: α -tujeno; 1,4,6- trimetil-5,6-dihidronaftaleno; 3-heptanona; Acetaldeído benzênico; Alil ciclohexano; Carvacrol (metil éter); *Orto*-cimeno e Safrol.

O método de difusão em ágar, mostrou-se eficiente e com bom desempenho para a análise das amostras. Foram analisadas diversas concentração da fração hidrosolúvel do extrato alcoólico bruto, frente a cepas de *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), utilizando disco de cloranfenicol como controle positivo. A fração avaliada, mesmo em diferentes concentração não apresentou atividade inibitória frente às cepas utilizadas.

6 CONCLUSÃO

Os estudos morfológicos permitiram caracterizar a espécie em estudo, detectando-se características peculiares, como os tricomas do tipo flageliforme, pouco comum entre espécies da família Asteraceae.

Nos estudos fitoquímicos, foram isoladas e identificadas cinco substâncias: sabandinol (cumarina), quercetina (flavonol), taxifolina 7-O-prenilada (dihidroflavonol), estigmasterol (esteróide) e 3-O-acetil taraxasterol (esteróide), substâncias já isoladas em outras espécies de *Pterocaulon*, porém sem relatos de isolamento na espécie *Pterocaulon interruptum* DC.

A partir do óleo essencial obtido foram identificados oito compostos: α -tujeno; 1,4,6-trimetil-5,6-dihidronaftaleno; 3-heptanona; acetaldeído benzênico; alil ciclohexano; carvacrol (metil éter); orto-cimeno e safrol.

A fração hidrossolúvel do extrato alcoólico analisada não apresentou atividades antimicrobianas frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Estudo que pode ser continuado utilizando outros extratos, frente a diferentes microrganismos.

Os objetivos deste trabalho foram atingidos, destacando-se ainda a relevância da pesquisa com plantas da flora brasileira, um compromisso com a sociedade, a qual proporciona a possibilidade do estudo em Universidade pública, para o progresso da ciência e melhoria da qualidade de vida dos brasileiros.

REFERÊNCIAS

- AGTAMAEL, M.A.V; EGGELTE, T.A.; BOXTEL, C.J.V. Artemisinin drugs in the treatment of malaria. **From Medicinal Herbal to Registered Medication Tips**. v. 20, n. 5, p. 199-204, may 1999.
- ANGELY, J. **Flora analítica do Paraná**. 1. ed. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1965.
- ANSEL, Howard C.; POPOVICH, Nicholas G; ALLEN Jr., Loyd V. **Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos**. São Paulo: Editorial Premier, 2000. p.5.
- BARROS, F. de; et al. **Flora fanerogâmica da ilha do Cardoso**. Caracterização Geral da Vegetação e Listagem das Espécies Ocorrentes. São Paulo: Instituto de Botânica, v. 1, 1991.
- BARROSO, G. M. et al. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. v. 3. Viçosa: Imprensa Universitária, 1991.
- BERLYN, G.P. & MIKSCHE, J.P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Iowa: Iowa University, 1976.
- BERRY, P. E.; HOLST, B. K.; YATSKIEVYCH, K. **Flora of the Venezuelan Guayana**. Araliaceae-Cactaceae. v. 3. United States of America: Missouri Botanical Garden, 1997. p.177- 393.
- BIER, O. **Bacteriologia e imunologia**. 20. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1980. p. 782-783.
- BOEYKENS, M., et al. Revision of the sctructure of obtusifol. **Phytochemistry**. v. 36. n.6. p. 1559-1560, 1994.
- BOHLMANN, F. et al. Thiophene acetylenes and flavonols from *Pterocaulon virgatum*. **Phytochemistry**. v. 20, n.4, p.825-827, 1981.
- _____. Cuauthemone sesquiterpenoids from *Blumea alata*. **Phytochemistry**. v. 24, n.3, p. 505-509, 1985.
- BRITO, J.F.A. & ALQUINI, Y. A new method for staining botanical material embedded in glycol metacrilate (GMA). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 39, n. 4, p. 949-951, 1996.
- BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Zaragoza: Acribia, 1991.
- BURKART, S. **Flora ilustrada de Entre Rios (Argentina)**. Buenos Aires, 1974, v. 6, p. 106.

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

CABRERA, A.L.; RAGONESE, A.M. Revisión del género *Pterocaulon* (Compositae). **Revista del Instituto de Botánica Darwinion**. Tomo 21, n. 2-4, 1978.

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

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

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

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

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. New York: New York Botanical Garden, 1998.

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

DEBENEDETTI, S.L., et al. Polyphenols isolated from *Pterocaulon purpurascens*. **Journal of Natural Products**. v. 50, p. 512-513., 1987.

_____. Purpurenol, a highly oxygenated coumarin from *Pterocaulon purpurascens*. **Phytochemistry** v. 30 n.8, p. 2757-2758, 1991.

_____. Purpurasol, a highly oxygenated coumarin from *Pterocaulon purpurascens*. **Phytochemistry**. v. 31, p. 3284-3285, 1992.

_____. Polyphenols of *Pterocaulon polystachium*. **Fitoterapia**, v. LXV. n.2, 1994 a.

_____. 5-(3-methyl-2-butenyloxy)-6,7-methylenedioxy-coumarin, a 5,6,7-trioxygenated coumarin from *Pterocaulon virgatum*. **Journal of Natural Products**. v. 57. n. 11, p. 1539-1542, 1994 b.

_____. Purpurasolol, a highly oxygenated coumarin from *Pterocaulon purpurascens*. **Phytochemistry** v. 42, n.2, p. 563-564, 1996.

_____. Structural revision of four coumarins from *Pterocaulon* species. **Phytochemistry** v. 45 n. 7. p.1515-1517, 1997.

_____. Two 6,7-dioxygenated coumarins from *Pterocaulon virgatum*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 4. p. 707-710, 1998.

DI STASI, Luiz Claudio. **Plantas Mediciniais: arte e ciência: Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996. p. 125.

ENGLER, A. **Syllabus der pflanzenfamilien**. [S.l.: s.n.], 1964.

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

FATOPE, M.O.; IBRAHIM, H.; TAKEDA, Y. Screening of higher plants reputed as pesticides using the brine shrimp lethality assay. **International Journal of Pharmacognosy**. v. 31. p. 250-254, 1993.

FEDER, N. & O'BRIAN, T.P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v.55, n.1, p.123-142, 1968.

FERRARO, M.J., et al. **Normativa para la puesta en práctica del estudio de susceptibilidad antimicrobiana**. Octavo Suplemento Informativo. USA, Enero 1998.

FOSTER, A.S. **Practical plant anatomy**. New York: Van Nostrand, 1949.

HADDAD, A. Obtenção e coloração de cortes semi-finos. In: HADDAD *et al.* **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica**. Rio de Janeiro: Sociedade brasileira de microscopia eletrônica, 1989.

HARBORNE, J. B.; BAXTER, H.; MOSS, G. P. **Phytochemical dictionary – A Handbook of Bioactive Compounds from Plants**. 2. ed. London: Taylor & Francis, 1999.

HECK, M.C. **Conservação, manejo e legislação de plantas medicinais**. In: Workshop de Plantas Mediciniais de Botucatu, II Botucatu, 14-15/06/1996. Anais Botucatu, p.17.

HICHEY, L.J. Clasificación de la arquitectura de las hojas de dicotiledóneas. **Bol. Soc. Arg. Bot.** Buenos Aires, v.16, n.1/2, p. 1-26, 1974.

HONÓRIO, N.A.; OLIVEIRA, R.L.de; **Frequência de larvas e pupas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em armadilhas, Brasil**. Rev. Saúde Pública v. 35 n. 4 São Paulo Aug. 2001.

INDEX KEWENSIS on compact disc. Oxford: Oxford University Press, 1997. 1 CD-ROM.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book, 1940.

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

LEAL, L.K.A.M., et al. **Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study**. *Journal of Ethnopharmacology*, 2000, 151-159.

MABBERLEY, D.J. **The plant-book – A portable dictionary of the higher plants**. Cambridge University, 1987. p. 486

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. **The systematic identification of flavonoids**. Berlin: Springer, 1970.

MACÊDO, M.E. et al. **Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for larvicidal activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae)** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Vol. 92(4): 565-570, 1997.

MAGALHÃES, A.F. et al. Coumarins from *Pterocaulon balansae* and *P. lanatum*. **Phytochemistry**. v. 20, n. 6, p. 1369-1371, 1981.

MAILLARD, M.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Search for molluscicidal and larvicidal agents from plants. In: CICCIA, G.; COUSSIO, J.; MONGELLI, E. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 72. p. 185-189, 2000.

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

MARTINO, V.S. et al. **Acta Farmaceutica Bonaerense**. v. 8. n. 3, 1989 In: DEBENEDETTI, S.L., et al. Purpureanol, a highly oxygenated coumarin from *Pterocaulon purpurascens*. **Phytochemistry** v. 30 n.8, p. 2757-2758, 1991.

MASS, P.J.M.; WESTRA, L.Y.Th. **Neotropical plant families**. A concise guide to families of vascular plants in the Neotropics. 2nd ed. Germany: Koeltz Scientific Books, 1998.

MENDES, N.M; et al. **Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for molluscicidal activity**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. v. 94(3): 411-412, 1999.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. 2. ed. Oxford: Claredon, 1988. v. 2.

MIGUEL, M.D. **O ensino com pesquisa como metodologia articuladora na formação de profissionais da saúde na produção de fitoterápicos**. Curitiba,

1996, 276 p. Dissertação (Mestrado em Educação) - Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

MIGUEL, M.D. & MIGUEL, O.G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Robe, 1999.

MIGUEL, O. G. **Estudo químico e farmacológico das espécies *Phyllanthus sellowianus*, *Phyllanthus fraternus* e *Siphocampyllum verticillatus***. Florianópolis, 1996. 219 f. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina.

MILES, H.; NGUYEN, C.L.; MILES, D.H. Utilization of natural products for treatment of blood diseases. **Current Medicinal Chemistry**. v. 5, p. 421-440, 1998.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. **Nomenclatural Data Base**. Disponível em: <http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search_vast> Acesso em: 15 out. 2001.

MONGELLI, E., et al. Cytotoxic and DNA interaction activities of extracts from medicinal plants used in Argentina. **Journal of Ethnopharmacology** v. 71. p. 145-151, 2000.

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

OLIVEIRA, F. & AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. São Paulo: Atheneu, 1993.

PALOMBO, E.A.; SEMPLE, S.J. Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 77. p.151-157, 2001.

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

ROCHA, D. Formulário terapêutico de plantas medicinais cearenses, nativas e cultivadas In: LEAL, L.K.A.M., et al. **Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study**. **Journal of Ethnopharmacology**, 2000, p. 151-159.

ROESER, K. R. Die Nadel der Schwarzkiefer Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**, v. 61, n. 2, p. 33-36, 1962.

SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of parafin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain technology**, v. 43, n. 5, p.247-249, 1973.

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

SASS, J.E. **Botanical microtechnique**. 2nd ed. Iowa: State College Press, 1951.

SDBS Compound Information. Disponível em:
<<http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS>> Acesso em: 10 jun. 2002.

SEMPLE, S.J., et al. Screening of Australian medicinal plants for antiviral activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 60, n.2, p.163-172, 1998.

SEMPLE, S.J., et al. Antiviral flavonoid from *Pterocaulon sphacelatum* an Australian Aboriginal medicine. **Journal of Ethnopharmacology**. p. 283-288. v. 68, 1999.

SERRANO, S.M. et al. **In vitro screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis***. **Journal of Ethnopharmacology** v. 71, 2000 p.101-107.

SILVA, M. F. G. F. **Métodos quimiosistemáticos – aplicação a famílias vegetais caracterizadas por cumarinas**. São Paulo, 1978. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

SILVA, R. Z. da **Estudo fitoquímico e biológico das partes aéreas da *Mikania lamuginosa* DC. (Asteraceae)**. Florianópolis, 2000, 129 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina.

SILVEIRA, M. Preparo de amostras biológicas para microscópio eletrônico de varredura. In: SOUSA, W. **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica: técnicas básicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1989. v.1.

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

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.

STEFANELLO, M.E.A. **Avaliação estatística de plantas medicinais: química, farmacologia e sistemática**. São Paulo, 1993. 208 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade de São Paulo.

VILEGAS, W., et al. Coumarins and a flavonoid from *Pterocaulon alopecuroides*. **Phytochemistry** v. 38, n.4, p. 1017-1019, 1995.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M. **Drogen analyse**. Berlim: Springer Verlag, 1983.

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

YUNES, R.A.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos, 2001.