

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VINÍCIUS BEDNARCZUK DE OLIVEIRA

**ESTUDO MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DAS
FRONDES DA ESPÉCIE VEGETAL *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook.
(DICKSONIACEAE)**

CURITIBA

2016

VINÍCIUS BEDNARCZUK DE OLIVEIRA

**ESTUDO MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DAS
FRONDES DA ESPÉCIE VEGETAL *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook.
(DICKSONIACEAE)**

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

Orientador: Dr. Obdulio Gomes Miguel

Coorientadora: Dr^a. Marilis Dallarmi Miguel

CURITIBA
2016

TERMO DE APROVAÇÃO


VINÍCIUS BEDNARCZUK DE OLIVEIRA

Título: "ESTUDO MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DAS FRONDES DA ESPÉCIE VEGETAL *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook. (DICKSONIACEAE)"

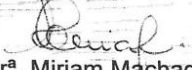
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.


Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel
Orientador


Prof.ª Dr.ª Yanna Dantas Rattmann
Universidade Federal do Paraná


Prof.ª Dr.ª Rosi Zanoni da Silva
Universidade Estadual de Ponta Grossa


Prof.ª Dr.ª Cristina Peitz de Lima
Centro Universitário Autônomo do Brasil – UniBrasil


Prof.ª Dr.ª Miriam Machado Cunico
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 24 de março de 2016.

Oliveira, Vinícius Bednarczuk de

**Estudo morfoanatômico, fitoquímico e biológico das frondes da espécie vegetal
*Dicksonia sellowiana***

**(Presl.) Hook. (*Dicksoniaceae*) / Vinícius Bednarczuk de Oliveira – Curitiba, 2016.
171 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm**

Orientador: Professor Dr. Obdulio Gomes Miguel

Coorientadora: Professora Dra. Marilis Dallarmi Miguel

**Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor
de Ciências
da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2016.**

Inclui bibliografia

**1. *Dicksonia sellowiana*. 2. *Dicksoniaceae*. 3. Analítica. 4. Ácido gálico. 5. Atividades
biológicas.**

**I. Miguel, Obdulio Gomes. II. Miguel, Marilis Dallarmi. III. Universidade Federal do
Paraná. IV. Título.**

CDD 615.321

AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande quanto escrever esta tese é conseguir agradecer todas às pessoas que direta ou indiretamente fizeram parte da construção deste trabalho, pois sozinhos não construímos nada.

Primeiramente gostaria de agradecer a DEUS pelo dom da vida e que nas horas mais difíceis me deu forças, serenidade e sabedoria para continuar.

A meus pais, minha esposa e familiares, pela compreensão nas horas que estive ausente, pelos incentivos e apoio nas horas que precisei.

A Universidade Federal do Paraná, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de continuar meus estudos e realizar este trabalho.

Ao Dr. Obdulio Gomes Miguel e Dr^a Marilis Dallarmi Miguel pela orientação, ensinamentos, confiança e amizade nesses seis últimos anos, desde o mestrado.

A todos os professores do programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelos ensinamentos científicos e lições de vida.

Aos Departamentos de Química e Bioquímica da UFPR, pela utilização de equipamentos que ajudaram na construção deste trabalho.

A Prof^a Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis e a doutoranda Camila Tainah da Silva do programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Imunologia da UNIFESP pela realização dos ensaios de citotoxicidade.

A Dr.^a Cristiane Bezerra da Silva pela realização dos ensaios morfoanatômicos e histoquímicos.

Aos amigos Ana Flávia Schwabe Duarte, Ângela Souza, Beatriz Hirota, Camila Freitas de Oliveira, Cristiane da Silva Paula, Daniela Maria Soares de Oliveira, Ellis Szabo, Fernanda Maria Marins Ocampos, Fernando Betim, Francis Zortéa Merino, Gislene Mari Fujiwara, Isabel Mignoni Homem, Katlin Rech, Luciane Dalarmi, Maria Christina Verdham, Mariana Saragiotto Krause, Marileda Zucheto, Paula Moura, Pedro Zanin, Ranieri Campos, Ricardo de Lara, Samantha Gollin, que, de diversas formas entre conversas e cafés, contribuíram para a realização deste trabalho.

A Prof^a Dra. Josiane de Fátima Gaspari Dias, Prof^a Dra. Sandra Zanin, Prof^o Dr. Vitor Alberto Kerber, pelos ensinamentos e contribuições.

Ao Paulo Diniz, do laboratório de farmacotécnica pelo apoio e disponibilidade constante e à Maria da Graça da Central Analítica sempre simpática e amiga, pelo grande apoio técnico, auxiliando em todas as necessidades.

Agradeço também à CAPES pelo suporte financeiro e bolsa de estudo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Gostaria de agradecer de forma especial a duas pessoas que neste período durante a Pós-Graduação fizeram toda a diferença na minha vida para que este trabalho fosse elaborado;

Primeiramente, gostaria de agradecer à Consuelo Bednarczuk, minha MÃE, por todos os esforços, valores e conhecimentos passados durante a vida, e que me possibilitaram ingressar no mestrado e no doutorado. Presente ou espiritualmente, ela sempre colaborou muito para a minha formação profissional.

Agradeço também à Verônica Del Gragnano Stasiak Bednarczuk de Oliveira, minha esposa, que de forma mais do que especial, colaborou neste período de doutorado para que este trabalho fosse realizado, me amparando em todos os momentos necessários, bons ou ruins. Juntos superamos e aproveitamos unidos! Este período nos ensinou a verdade sobre nosso relacionamento, e juntos construímos uma FAMÍLIA.

A estas duas mulheres que em minha vida fizeram toda a diferença, eu dedico este trabalho.

“A ciência é uma disposição de aceitar os fatos mesmo quando eles são opostos aos desejos”.

(Burrhus Frederic Skinner)

“O ser humano vivencia a si mesmo, seus pensamentos como algo separado do resto do universo, numa espécie de ilusão de ótica de sua consciência. E essa ilusão é uma espécie de prisão que nos restringe a nossos desejos pessoais, conceitos e ao afeto por pessoas mais próximas. Nossa principal tarefa é a de nos livrarmos dessa prisão, ampliando o nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Ninguém conseguirá alcançar completamente esse objetivo, mas lutar pela sua realização já é por si só parte de nossa liberação e o alicerce de nossa segurança interior”.

(Albert Einstein)

RESUMO

O objetivo do presente trabalho concentrou-se na realização de uma abordagem fitoquímica, morfoanatômica e analítica da espécie vegetal *Dicksonia sellowiana* Presl. Hook. (Dicksoniaceae). Esta espécie, conhecida popularmente como xaxim, encontra-se na lista do IBAMA como ameaçada de extinção desde 2001. Tendo-se que esta planta endêmica da mata atlântica encontra-se em perigo de extinção, as frondes de *Dicksonia sellowiana* foram doadas pela empresa CHAMEL, que possui no município de Inácio Martins (Paraná) uma plantação de xaxim. O material foi seco em estufa e armazenado para a preparação dos extratos vegetais para testes analíticos. Na sequência, foi realizado estudo morfoanatômico e histoquímico verificando a presença de flavonoides e taninos nas frondes. Na preparação dos extratos vegetais por diferentes métodos e solventes, verificou-se que o método de extração influencia no extrato vegetal desde a quantidade de sólidos até na atividade biológica que demonstrou uma alta concentração de polifenóis, principalmente de proantocianidinas, relacionadas diretamente a alta atividade antioxidante observada. Na análise dos órgãos da fronde verificou-se que a maior atividade está relacionada aos folíolos, apresentando, através de análise de UPLC-MS, diversos flavonoides derivados da quercetina e do kaempferol. Na atividade alelopática apenas o extrato bruto apresentou atividade na velocidade de germinação. Foram identificados três fitoesteróis presentes na fração hexano, sendo estes o β -sitosterol, campesterol e estigmasterol. Nas atividades utilizando o padrão ácido gálico, o mesmo apresentou atividade citotóxica no modelo testado e ativação de neutrófilos humanos.

PALAVRAS-CHAVE: *Dicksonia sellowiana*, Dicksoniaceae, analítica, ácido gálico, atividades biológicas.

ABSTRACT

This study aimed to conduct a phytochemical, morphoanatomical and analytical approach to plant species *Dicksonia sellowiana* Presl. Hook. (Dicksoniaceae). This species known popularly as tree fern is the list of IBAMA as endangered since 2001. To carry out this project as this endemic plant of the rainforest is in danger of extinction, the fronds of *Dicksonia sellowiana* were donated by CHAMEL company It has the Inácio Martins municipality in the state of Paraná one tree fern plantation. This material was dried in an oven and stored for the preparation of plant extracts for analytical testing. Following was held morphoanatomical and immunohistochemical study verifying the presence of the flavonoid tannins in the fronds. In the preparation of plant extracts with different methods and solvents, it was found that the extraction method influences the plant extract from the amount of solids to the biological activity demonstrated a high concentration of polyphenols, mainly proanthocyanidins directly related to high antioxidant activity observed. The analysis of the frond bodies verified that the greatest activity is related to the leaflets, showing by UPLC-MS analysis, various derivatives of flavonoids quercetin and kaempferol. In allelopathic only the crude extract showed activity in the germination rate. three phytosterols present were identified in the hexane fraction, these being the β -sitosterol, campesterol and stigmasterol. The activities using the standard gallic acid, it showed cytotoxic activity on the tested model and activation of human neutrophils.

KEYWORDS: *Dicksonia sellowiana*, Dicksoniaceae, Analytics, Gallic acid, Biological activities.

Lista de Figuras

Figura 1 - Classificação das samambaias	9
Figura 2 - Exemplares da espécie <i>Dicksonia sellowiana</i> (Presl.) Hook.....	12
Figura 3 - Distribuição da espécie <i>Dicksonia sellowiana</i> pelo mundo.	14
Figura 4 - Distribuição geográfica da espécie <i>Dicksonia sellowiana</i> no Brasil .	14
Figura 5 - Locais que realizaram pesquisa com a espécie <i>Dicksonia sellowiana</i>	15
Figura 6 - Estruturas químicas isoladas e identificadas na espécie <i>Dicksonia sellowiana</i>	17
Figura 7 – Rota metabólica do Ácido Gálico	20
Figura 8 - Estruturas de compostos fenólicos	22
Figura 9 - Antioxidantes naturais separados em enzimáticos e não enzimáticos.	25
Figura 10 - Fluxograma das fases da pesquisa com a espécie <i>Dicksonia sellowiana</i>	28
Figura 11 - Registro da exsicata depositada no museu botânico	29
Figura 12 - Exsicata da espécie <i>Dicksonia sellowiana</i>	29
Figura 13 - Extração por Ultrassom.....	36
Figura 14 - Extração por Turbólise	37
Figura 15 - A. Vista geral do aspecto arborescente de <i>D. sellowiana</i> ; B. Aspecto dos esporos; C. Vista geral do Indúcio; D. Esporos revestidos por indúcio; E. Aspecto geral da epiderme do indúcio, mostrando a cutícula estriada; F. Aspecto da membrana que recobre os esporos	51
Figura 16 - A. Aspecto das frondes de <i>D. sellowiana</i> ; B. Pinula; C. Aspecto da raque em secção transversal; D. Aspecto da bácula; E. Aspecto do indúcio; F. Aspecto dos esporos; G. Cáudice.	52
Figura 17 - A. Aspecto dos estômatos da face adaxial; B. Vista geral da epiderme da face adaxial; C. Aspecto dos estômatos na face abaxial; D. Aspecto geral da epiderme da face abaxial; E, F. Aspecto dos tricomas tectores.....	54
Figura 18 - A> vista geral da pínula; B. Aspecto geral do sistema vascular; C. Detalhe de um feixe vascular de pequeno porte; D. Aspecto do colênquima e epiderme da face abaxial; E. Aspecto do parênquima da face adaxial contendo idioblastos; F. Vista geral do parênquima clorofiliano; G. Detalhe dos estômatos, demonstrando as células guarda e câmara subestomática.	55
Figura 19 - A. Secção transversal do pecíolo; B. Tricoma tector; C. Detalhe do tricoma tector; D. Parênquima contendo idioblastos; E. Epiderme do pecíolo; F. Região do parênquima da face abaxial; G. Detalhe do feixe vascular.	57
Figura 20 - A. Secção transversal da raque; B. Detalhe da cutícula e endoderme Da raque; C. Feixe vascular; D. Detalhe do floema e xilema com células cúbicas; E, F. detalhe ds pelos presentes na raque, com tricomas.....	59

Figura 21 - A. aspecto do Cádúdice em corte transversal; B. Aspecto do parênquima contendo amido; C. Aspecto do sistema vascular, contendo floema primário e secundário.	61
Figura 22 - Pínula. Testes histoquímicos demonstrando a presença de A. amido; B. Compostos fenólicos, C. Flavonoides, D. Lipídios, E. Terpenóides neutros; F. Lignina, G, H. Polissacarídeos neutros; I. Proteínas.	63
Figura 23 - Pecíolo. Testes histoquímicos demonstrando a presença de A. amido; B. Compostos fenólicos, C. Flavonoides, D. Lipídios, E. Terpenóides neutros; F. Lignina, G. Polissacarídeos neutros; H. Proteínas.	64
Figura 24 - Raque . Testes histoquímicos demonstrando a presença de A. amido; B. Compostos fenólicos, C. Flavonoides, D, E. Lipídios, F. Terpenóides neutros; G. Lignina, H. Polissacarídeos neutros; I. Proteínas.	65
Figura 25 - Rendimento de extração obtidos por diferentes técnicas a partir de frondes de <i>Dicksonia sellowiana</i> . A) Extrações Etanólicas, B) Extrações hidroalcoólicas.....	81
Figura 26 - Perfil cromatográfico das extrações a frio das frondes de <i>D. sellowiana</i> . A) MAC-E, B) MAC-HÁ, C) TUR-E, D) TUR-HÁ, E) US-E, F) US-HÁ	84
Figura 27 - Perfil cromatográfico das extrações a quente das frondes de <i>D. sellowiana</i> . A) INF-E, B) INF-HÁ, C) SOX-E, D) SOX-HÁ, E) DEC-E, F) DEC-HÁ	85
Figura 28 - Análise dos principais componentes (PCA) pela similaridade entre as características químicas e as propriedades antioxidantes dos extratos obtidos por diversas técnicas com dois solventes extrativos.....	90
Figura 29 - Espectro de Massas das substâncias 1,2 e 3	95
Figura 30 - Espectros de massas das substâncias 4, 5 e 6	96
Figura 31 - Espectro de massas da substância 7	97
Figura 32 - Substâncias identificadas por espectroscopia de massas dos órgãos da espécie <i>Dicksonia sellowiana</i>	99
Figura 33 - Cromatogramas da fração acetato de etila dos órgãos da fronde de <i>Dicksonia sellowiana</i> . A) Cromatograma da Fronde, B) Cromatograma da Raque, C) Cromatograma da Pínula, D) Cromatograma do Folíolo.....	100
Figura 34 - A) Espectro de RMN de ¹ H do extrato bruto total e extratos brutos das partes da fronde; B e C) Análise quimiométrica por PCA do espectro de RMN de ¹ H.	102
Figura 35 - Estrutura elucidada VBO1 (β-Sitosterol).	106
Figura 36 - Espectro de RMN ¹ H para VBO1 (β-sitosterol) (200,12 MHz) em CDCl ₃	108
Figura 37 - Espectro de RMN ¹³ C para VBO1 (β-sitosterol) (50,56 MHz) em CDCl ₃	108
Figura 38 - Espectro de RMN ¹³ C/DEPT para VBO1 (β-sitosterol) em CDCl ₃	109
Figura 39 - Espectro de ¹ H RMN da mistura de fitosteróis	111
Figura 40 - Espectro de ¹³ C RMN da mistura de fitosteróis.....	111
Figura 41 - Espectro de DEPT RMN da mistura de fitosteróis	112

Figura 42 - Estruturas dos esteróides identificados na mistura	112
Figura 43 - Estrutura química do Ácido Gálico	114
Figura 44 - Espectro de absorção no UV do ácido gálico.....	114
Figura 45 - Espectro de H-RMN do ácido gálico	115
Figura 46 - Espectro de C-RMN do Ácido Gálico	115
Figura 47 - Cromatograma do Ácido Gálico	116
Figura 48 - Viabilidade celular das células após 24 e 48 horas em exposição ao Ácido Gálico	120
Figura 49 - Ensaio de formação de colônias na concentração de 200uM do Ácido Gálico e padrão	121
Figura 50 - Formação das colônias no controle negativo e na placa contendo ácido gálico.....	121
Figura 51 - Neutrófilos ativados com 2,5 (A), 5,0 (B), 10 (C) e 15 (D) ug.mL ⁻¹ de ácido gálico	122
Figura 52 - Controles da atividade sobre neutrófilos humanos. A) Neutrófilos B) Neutrófilos com NBT C) Neutrófilos com PMA	123

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Índice de velocidade de germinação (ivg) das sementes de <i>L. sativa</i> testadas com os extratos brutos e frações de <i>Dicksonia sellowiana</i>	73
Gráfico 2 - Comparação da fotossíntese total das plântulas das sementes <i>L. sativa</i> testadas com o extrato bruto e frações de <i>Dicksonia sellowiana</i> comparadas ao controle água.....	76
Gráfico 3 - Comparação das absorbâncias do ensaio de respiração das raízes das sementes <i>L. sativa</i> testadas com o extrato bruto e frações de <i>Dicksonia sellowiana</i>	78
Gráfico 4 - Box-plot de média e variação dos fatores utilizados. FenT – Fenólicos totais. FlavT – Flavonoides totais. ProT – Proantocianidinas totais. EstT – Esteroides totais.....	89
Gráfico 5 - Relação da atividade antioxidante do ácido gálico frente aos padrões vitamina C e Rutina.....	118

Lista de Quadros

Quadro 1 - Principais espécies do gênero <i>Dicksonia</i> , local e altura máxima. ..	11
Quadro 2 - Nomes científicos sinônimos da espécie <i>Dicksonia sellowiana</i> (Presl.) Hook.	13
Quadro 3 - Classificação taxonômica da espécie <i>Dicksonia sellowiana</i>	13
Quadro 4 - Constituição da fase móvel, do revelador e interpretação do resultado.....	34
Quadro 5 - Parâmetros Físicos das frondes de <i>Dicksonia sellowiana</i>	68
Quadro 6 - Análise Fitoquímica do Extrato Aquoso de <i>Dicksonia sellowiana</i> ...	69
Quadro 7 - Análise Fitoquímica do Extrato Hidroalcoólico de <i>Dicksonia sellowiana</i>	70
Quadro 8 - Análise fitoquímica por CCD do extrato bruto e frações de <i>Dicksonia sellowiana</i>	71
Quadro 9 - Extratos brutos obtidos e suas abreviaturas.....	80
Quadro 10 - Parâmetros Físico-Químicos das diferentes extrações a frio	81
Quadro 11 – Parâmetros Físico-Químicos das diferentes extrações a quente	82

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Índice de velocidade de germinação de <i>L. sativa</i> submetidas ao extrato bruto etanólico e frações de <i>Dicksonia sellowiana</i> em ensaio alelopático	73
Tabela 2 - Ensaio de fotossíntese das plântulas de <i>L. sativa</i> submetidas ao extrato bruto etanólico e frações de <i>Dicksonia sellowiana</i>	75
Tabela 3 - Ensaio de respiração das raízes de <i>L. sativa</i> submetidas ao extrato bruto etanólico e frações de <i>Dicksonia sellowiana</i>	77
Tabela 4 - Teor de fenóis totais, flavonoides totais, proantocianidinas totais, esteroides totais e atividade antioxidante frente ao radical DPPH e complexo fosfomolibdênio dos extratos brutos das frondes de <i>Dicksonia sellowiana</i> obtidos por diversos métodos.....	87
Tabela 5 - Teor de material e de resíduo seco por órgão vegetal de <i>Dicksonia sellowiana</i>	93
Tabela 6 - Composição química da fração acetato de etila dos três órgãos de <i>Dicksonia sellowiana</i>	Erro! Indicador não definido.
Tabela 7 - Fenólicos totais e atividade antioxidante dos órgãos e da fronde de <i>Dicksonia sellowiana</i>	104
Tabela 8 - Comparação dos dados de deslocamentos químicos de RMN 13C (50,14 MHz em CDCl ₃) de VBO1 com os dados da literatura para β-sitosterol.	107
Tabela 9 - Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C (50,14 MHz em CDCl ₃) da mistura de fitosteróis	110
Tabela 10 - Tempo de retenção e lambda máximo da substância ácido gálico	116
Tabela 11 - Atividade antioxidante do ácido gálico pelo método de fosfomolibdênio	117
Tabela 12 - Atividade antioxidante do ácido gálico pelo método DPPH	117
Tabela 13 - Atividade do ácido gálico sobre neutrófilos humanos.....	122

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- AA Atividade antioxidante
- Abs Absorbância
- ANOVA Análise de variância
- BHT Butil-hidroxitolueno
- CCD Cromatografia em camada delgada
- CD₃OD Metanol deuterado
- CI₅₀ Concentração Inibitória 50%
- CL₅₀ Concentração letal 50%
- CIM Concentração inibitória mínima
- CLAE Cromatografia líquida de alta eficiência
- *d* Dubleto
- *dd* Duplo dubleto
- DEPT Experimento de ¹³C utilizando transferência de polarização
- DMSO Dimetilsulfóxido
- DP Desvio Padrão
- DPPH● 2,2-difenil-1- picril-hidrazil
- EAG Equivalente de ácido gálico
- EB Extrato Etanólico Bruto
- EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ERO Espécies reativas de oxigênio
- FAE Fração acetato de etila
- FCLO Fração clorofórmio
- FR Fração hidroalcoólica residual
- Hz Hertz
- IA Índice antioxidante
- i.p. Intra-peritoneal
- IVG Índice de velocidade de germinação
- J Constante de acoplamento
- m múltiplo
- MDA Malonaldeído
- MHZ megahertz
- MPO Mieloperoxidase
- MTT Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio
- NADPH Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
- NBT azul p-Nitrotetrazólio
- O₂^{*} Ânion superóxido
- PBS Salina tamponada com fosfatos
- pH Potencial hidrogeniônico
- PMA 13-acetato de fobol éster 12 miristato
- ppm Partes por milhão

- RMN de ^1H Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
- RMN de ^{13}C Ressonância magnética nuclear de carbono treze
- SDS Dodecil sulfato de sódio
- SiHa Linhagem celular de câncer de collo de útero
- sl Simpleto largo
- SNC Sistema Nervoso Central
- SOD Superóxido dismutase
- TBA Ácido tiobarbitúrico
- TBARS Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
- TMS Tetrametilsilano
- TPA O-tetradeconoilforbol-13-acetato
- TSA Meio de cultura Tryptic Soy Tooltip Agar
- TSB Meio de cultura Tryptic Soy Broth
- TTC Cloreto de trifeniltetrazólio
- UFC Unidade formadora de colônia
- UV Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	4
2	OBJETIVOS	7
2.1	OBJETIVO GERAL	7
2.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS	7
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1	SAMAMBAIAS	8
3.2	A FAMÍLIA DICKSONIACEAE	10
3.3	GÊNERO <i>Dicksonia</i>	10
3.4	A ESPÉCIE <i>Dicksonia sellowiana</i>	11
3.4.1	Estudos realizados com a espécie <i>Dicksonia sellowiana</i> , DICKSONIACEAE	15
3.5	TANINOS.....	18
3.5.1.	Ácido gálico	19
3.5.2.	Ácido protocatecuíco	22
3.6	SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES.....	23
4	METODOLOGIA	28
4.1	MATERIAL BOTÂNICO	29
4.2	ESTUDOS MORFOANATÔMICOS	30
4.3	ENSAIOS DE PUREZA	31
4.3.1	Teor de umidade e sólidos (método gravimétrico).....	31
4.3.2	Teor de cinzas	32
4.4	ENSAIOS PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	32
4.4.1	Ensaio clássico	32
4.4.2	Screening fitoquímico por cromatografia de camada delgada	33
4.5	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES	35
4.5.1	Extrações a frio.....	36

4.5.1.1	Extração por Ultrassom	36
4.5.1.2	Extração por turbólise.....	36
4.5.1.3	Extração utilizando maceração.....	37
4.5.2	Extrações a quente	37
4.5.2.1	Extração por decocção	37
4.5.2.2	Extração por infusão.....	38
4.5.2.3	Extração por Soxhlet	38
4.6	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS	39
4.7	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS.....	40
4.7.1	Análise por CLAE/DAD	40
4.7.2	Análise por UPLC/MS.....	40
4.8	DOSEAMENTOS DOS EXTRATO BRUTOS	41
4.8.1	doseamento de polifenóis	41
4.8.2	Doseamento de flavonoides totais	41
4.8.3	Doseamento de protoantocianidinas totais	41
4.8.4	Doseamento de esteroides totais	42
4.9	ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	42
4.9.1	Avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH.....	42
4.9.2	Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio.....	43
4.9.3	Atividade imunomoduladora sobre neutrófilos humanos	44
4.10	ESTUDOS EM CÉLULAS.....	45
4.10.1	Cultivo celular	45
4.10.2	Ensaio de formação de colônias.....	45
4.11	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA	45
4.11.1	Teste de germinação.....	46
4.11.2	Teste de crescimento	46
4.11.3	Respiração radicular.....	47

4.11.4	Conteúdo de clorofila total.....	47
4.11.5	Análise Estatística	48
4.12	ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA DOS DADOS	48
5	RESULTADOS	50
5.1	ESTUDOS MORFOANATÔMICOS	50
5.1.1	Descrição macroscópica.....	50
5.1.2	Descrição microscópica.....	53
5.1.2.1	Pínula	53
5.1.2.2	Raque.....	58
5.1.2.3	Cáudice	60
5.1.3	Testes histoquímicos	61
5.1.4	Discussão	65
5.2	CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICO DO MATERIAL VEGETAL.....	67
5.2.1	Material Vegetal.....	67
5.2.2	Parâmetros Físicos do Material Vegetal	67
5.2.3	Pesquisas De Grupos Fitoquímicos.....	68
5.2.3.1	Análise Fitoquímica Clássica.....	68
5.2.3.2	Análise Fitoquímica Por CCD	70
5.3	ATIVIDADE ALELOPÁTICA	72
5.3.1	Germinação	72
5.3.2	Fotossíntese	74
5.3.3	Respiração das raízes	76
5.3.4	Discussão	78
5.4	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS POR DIVERSOS MÉTODOS EXTRATIVOS, DOSEAMENTOS TOTAIS E ATIVIDADES ANTIOXIDANTES.....	80
5.4.1	Obtenção dos extratos vegetais	80

5.4.2	Teor de sólidos totais dos extratos brutos	81
5.4.3	Análise dos extratos brutos por cromatografia líquida de alta eficiência	82
5.4.4	Doseamentos e atividades antioxidantes por métodos espectrofotométricos.....	86
5.4.5	Definição do extrato bruto para a realização dos testes biológicos	90
5.5	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS DAS PARTES DA FRONDE, ANÁLISE POR UPLC/MS, ¹ H-RMN, DOSEAMENTOS TOTAIS E ATIVIDADES ANTIOXIDANTES.....	92
5.5.1	Preparo Dos Extratos Vegetais.....	92
5.5.2	Controle Físico-Químico dos Extratos das Partes da Fronde	93
5.5.2.1	Rendimento por parte da Fronde.....	93
5.5.2.2	Análise das frações acetato de etila das partes da fronde por UPLC-MS	94
5.5.2.3	Screening por RMN de ¹ H dos extratos brutos da fronde e das partes ..	101
5.5.2.3	Doseamento de polifenóis e atividade antioxidante dos extratos brutos da fronde e suas partes	103
5.5.3	Discussão	104
5.6	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS DA FRAÇÃO HEXANO DA FRONDE.....	106
5.6.1	β-Sitosterol.....	106
5.6.2	Mistura de fitosteróis.....	109
5.7	ESTUDOS REALIZADOS COM A SUBSTÂNCIA ÁCIDO GÁLICO....	114
5.7.1	Características físico-química do ácido gálico	114
5.7.2	Atividade antioxidante.....	116
5.7.3	Atividades antineoplásicas no melanoma	119
5.7.4	Atividade sobre neutrófilos humanos	122
6	CONCLUSÃO.....	125
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	127

ANEXOS	128
REFERÊNCIAS.....	132

1 INTRODUÇÃO

Universidades e indústrias farmacêuticas retomaram o interesse pelos fitoterápicos, alavancando diversos estudos visando a consolidação da fitoterapia através de evidências científicas, garantindo a eficácia terapêutica e o potencial tóxico das matérias-primas e do medicamento fitoterápico. Essa retomada de estudos após quase um século de moléculas provenientes de sínteses químicas deve-se ao fato que as matérias-primas vegetais se destacam como fontes de novos recursos terapêuticos, oriundos principalmente do metabolismo secundário vegetal (Braz Filho, 2010).

Uma dentre as diversas características dos seres vivos é de possuírem atividade metabólica, e entre as células vegetais esse fator não é diferente, dividindo-se entre metabólitos primários e secundários (Kutchan, 2001). O metabolismo primário desenvolve as características essenciais para a sobrevivência do vegetal, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos. Aminoácidos, nucleotídeos, lipídios, carboidratos e clorofila, compostos provenientes do metabolismo primário são encontrados em todas as espécies de plantas (Gobbo-Neto e Lopes, 2007).

O metabolismo secundário origina compostos não comuns entre todas as plantas, pois não são necessários para a sobrevivência da mesma (Fumagali *et al.*, 2008). Diferentemente das angiospermas, onde a presença de flavonoides possui uma importância muito grande na proteção ultravioleta (UV) e na sinalização com outros organismos vivos, plantas primitivas como as pteridófitas apresentam pouca variabilidade estrutural, apresentando alta concentração de proantocianidinas através da enzima di-hidroflavonol-4-redutase que utiliza a molécula dihidroflavona como substratos pela via do ácido chiquímico (Markham, 1988).

O Brasil tem uma das mais ricas biodiversidades da Terra, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e micro-organismos (Guerra e Nodari, 2007). De acordo com Guerra e colaboradores (1998) o Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 mil espécies.

Neste contexto, faz-se necessário que equipes multidisciplinares, formadas por profissionais da área médica, farmacêutica, química, agrônoma,

econômica e política, somem esforços para o desenvolvimento de um programa, em nível nacional, que vise o desenvolvimento e a produção de medicamentos à base de plantas, com o objetivo de prevenir e combater enfermidades que assolam os brasileiros (Pereira, 2008).

No Brasil, diversas medidas vêm sendo criadas para que as plantas medicinais e os fitoterápicos se tornem cada vez mais utilizados pela população. Por meio da Portaria GM/MS nº 971, de 3 de maio de 2006, aprovou-se a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), que contempla, plantas medicinais, fitoterapia, medicina tradicional chinesa, acupuntura, homeopatia, medicina antroposófica, além das práticas complementares de saúde. Logo após, o Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.

Como a demanda de utilização da população vêm aumentando com o tempo, o SUS através das políticas que foram criadas, foi elaborado uma lista com 71 plantas de interesse ao SUS (RENISUS), entre estas, se destaca as espécies Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia*), Guaco (*Mikania glomerata*), Alcachofra (*Cynara scolymus*), Aroeira (*Schinus terebenthifolius*); Cáscara-sagrada (*Rhamnus purshiana*); Garra-do-diabo (*Harpagophytum procumbens*); Isoflavona-de-soja (*Glycine max*); Unha-de-gato (*Uncaria tomentosa*).

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

Calcula-se que o ritmo de espécies em extinção é provavelmente bem mais acelerado que o ritmo da ciência na identificação e descrição de novas espécies, a ciência ainda desconhece de 10 a 20% das atuais espécies de angiospermas (Scheffers *et al.*, 2012). A extinção das espécies está relacionada a destruições de habitats, sobre-matanças, introdução de espécies exóticas, cadeias de extinção e as mudanças climáticas dos últimos anos. O efeito sinérgico entre estes cinco elementos são relevantes, porém a destruição de ambientes naturais através de queimadas, alagamentos e para a construção de cidades ou hidroelétricas são apontados como os maiores desencadeadores da extinção de espécies (Thomas *et al.*, 2004; Brook, Sodhi e Bradshaw, 2008).

Apesar do crescimento de espécies em extinção na Flora no Brasil, é importante que estudos químicos e farmacológicos sejam realizados sobre plantas ainda pouco conhecidas, em busca de substâncias e atividades que possam auxiliar no tratamento das diversas patologias. Neste sentido, este trabalho teve como mérito e originalidade o estudo da morfoanatomia, composição fitoquímica, atividade biológica e farmacológica, utilizando frondes de *Dicksonia sellowiana*, cultivadas na cidade de Inácio Martins – Paraná, não destruindo a espécie e contribuindo com novas informações científicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as características morfoanatômicas, fitoquímicas, alelopáticas, antioxidante e analíticas das frondes da espécie *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook., da família Dicksoniaceae.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Realizar análise do teor de água e cinzas totais das frondes secas;
- Realizar estudo morfoanatômico e os testes histoquímicos das frondes;
- Realizar análise fitoquímica preliminar clássica e por CCD identificando as principais classes de constituintes presentes nos extratos brutos e frações;
- Preparar 6 extratos brutos etanólicos e 6 extratos brutos hidroalcoólicos por métodos de extração diferentes e verificar o perfil químico e biológico dos extratos;
- Preparar utilizando o melhor método extrativo extratos brutos das partes da fronde (raque, pínula e folíolo) e avaliar o perfil químico e biológico das diferentes partes;
- Preparar extrato bruto cetônico e etanólico e frações hexano, clorofórmio e acetato de etila e fração residual a partir das frondes secas para isolamento;
- Isolar e identificar os constituintes químicos presentes no extrato das frondes de *Dicksonia sellowiana*;
- Verificar os efeitos alelopáticos do extrato etanólico e frações frente às sementes de *Lactuca sativa* (alface) por ensaios de germinação, crescimento, teor de clorofila e respiração;
- Verificar a atividade antioxidante, hemolítica, toxicidade frente neutrófilos humanos e a citotoxicidade por redução do MTT utilizando a linhagem celular SiHa (ATCC® HTB35TM/Neoplasia de melanoma)

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SAMAMBAIAS

As samambaias são pteridófitas que constituem um grupo aproximadamente 12.000 espécies de plantas vasculares que se reproduzem através de esporos, não possuindo sementes e nem flores (Chapman, 2009). Conhecidas como fetos e fetas, ou em inglês designadas tree fern, a reprodução se dá através de esporos que se localizam na parte abaxial da fronde. Essas plantas, quando adultas, normalmente são formadas por um caule, um rizoma e por folhas, denominadas de frondes (Christenhusz e Chase, 2014).

Possuem um potencial adaptativo muito elevado, levando em consideração que as samambaias são as plantas mais antigas existentes, predominando no planeta por cerca de 345 milhões de anos, antes mesmo das árvores e flores que vieram 145 milhões de anos após. Essas plantas foram capazes de suportar o “big bang” voltando a predominar na terra mesmo após a extinção dos dinossauros (Olsen, 2007).

A maioria das samambaias não são de grande importância econômica, porém, diversas espécies são cultivadas ou coletadas para fins alimentares e ornamentais, além de diversos estudos apontarem a capacidade de removerem alguns poluentes químicos do ar (Revedin *et al.*, 2010).

De acordo com Revedin e colaboradores (2010) as samambaias são utilizadas para diversas finalidades. Algumas espécies são utilizadas para fins alimentares, como a espécie *Pteridium aquilinum* e *Osmundastrum cinnamomeum*, outras são cultivadas para horticultura, para fins de jardinagem, como as espécies *Dicksonia sellowiana* encontrada na América do Sul e a espécie *Dicksonia antarctica* encontrada na Nova Zelândia, ambas servindo de suporte para plantas epífitas.

Em florestas úmidas, as pteridófitas encontram condições ótimas para apresentarem alta diversidade (Tryon e Tryon, 1982). Algumas samambaias, como as presentes nas famílias Dicksoniaceae e Cyatheaceae, podem chegar até 5 metros de altura, conhecidas como pteridófitas arborescentes. Estas, quando comparadas com as angiospermas, possuem um crescimento

considerado lento, e, um dos fatores que afetam o crescimento das samambaias, é a duração do dia (Schmitt e Windisch, 2006).

A classificação das samambaias, com base em sua filogenia, apresenta-se em quatro classes, conforme figura abaixo.

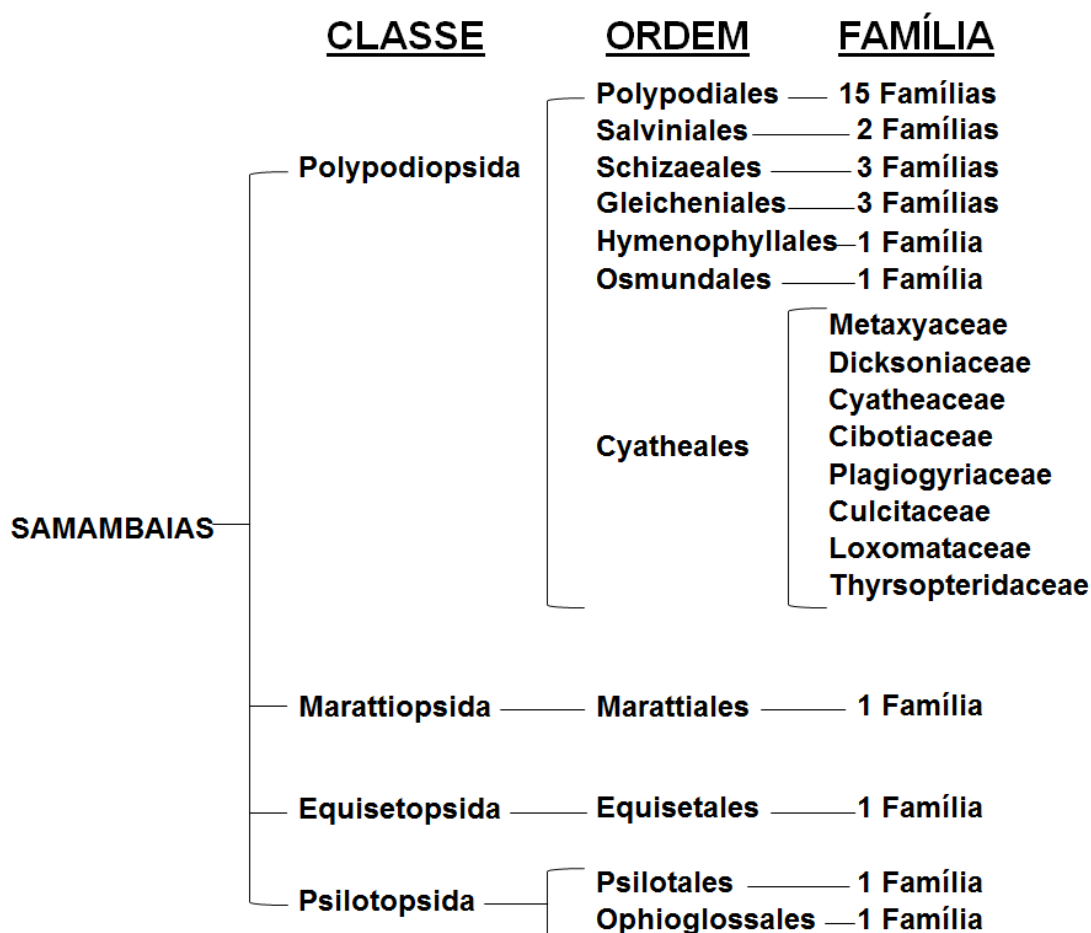


Figura 1 - Classificação das samambaias, adaptado de (Smith *et al.*, 2006)

As famílias Cyatheaceae e Dicksoniaceae são as mais conhecidas por apresentarem representantes arborescentes. A presença de escamas e a posição dos esporos, diferenciam estas duas famílias (Korall *et al.*, 2006). Atualmente, as samambaias viraram moda, podendo ser encontradas em várias residências, servindo como ítem decorativo no âmbito do paisagismo e também como suporte para plantas epífitas, como orquídeas e bromélias.

3.2 A FAMÍLIA DICKSONIACEAE

Dicksoniaceae é uma pequena família de filicíneas arborescentes, semelhantes no hábito da família Cyatheaceae, e se distinguem pela posição marginal dos esporos (Joly, 1985). Esta família compreende apenas seis gêneros sobreviventes de um total de nove gêneros. A família Dicksoniaceae compreende de 40-45 espécies divididas em seis gêneros (*Calochlaena*, *Cibotium*, *Culcita*, *Cystodium*, *Dicksonia*, e *Thyrsopteris*), encontrados em zonas tropicais e temperadas no mundo (Korall *et al.*, 2006).

Dentro da família, apenas os gêneros *Dicksonia* e *Cibotium* possuem espécies de samambaias na forma de árvores e os outros gêneros apresentam espécies rasteiras (Kubitzki, 1990). As espécies desta família são fetos tropicais, subtropicais e de latitudes temperadas quentes, encontradas em regiões tropicais do hemisfério sul, atingindo área temperadas como o sul da Nova Zelândia (Tryon e Tryon, 1982).

Em geral, esta família apresenta caule bastante grosso, não ramificado, com cerca de 8 a 12 frondes amplas no ápice, que quando caem deixam cicatrizes no tronco. Estas porções mais velhas são totalmente recobertas por raízes adventícias que engrossam o caule. As frondes são grandes podendo alcançar 2 metros de comprimento, sendo 3 a 4 vezes pinadas, onde as férteis possuem soros marginais no ápice de nervuras (Joly, 1985).

3.3 GÊNERO *Dicksonia*

Entre as samambaias, este gênero oferece algumas opções maravilhosas para os entusiastas desta planta. Nomeado por James Dickson (1738-1822), o gênero possui de 20 a 25 espécies tropicais (Kubitzki, 1990; Korall *et al.*, 2006). O gênero *Dicksonia* é um gênero de feto arbóreo pertencente a ordem podypodiales, parente próximo do gênero *Cyathea*, porém mais primitivo, através de fósseis de caules, pínulas e esporos botânicos datam sua origem nos períodos jurássico e cretáceo. Estando presentes em diversos países tropicais como Austrália e Brasil, é na Nova Guiné que atinge maior diversidade com 5 espécies conhecidas (Churchill, Tryon e Barrington, 1998).

As espécies do gênero *Dicksonia* possuem troncos de crescimento lento e delgado em sua estrutura vascular básica, mas se ampliam significativamente

pelos feixes de raízes que se estendem até o solo retirando a água e nutrientes que necessitam (Tryon e Tryon, 1982). As copas são bipenadas e as frondes são reconhecidas pelo aspecto peludo da raque. Os esporos são transportados em copos em miniatura ao longo das margens da fronde, mas são de duração relativamente curta e para obter os melhores resultados devem ser semeados logo que possível após a maturação (Joly, 1985).

Quadro 1 - Principais espécies do gênero *Dicksonia*, local e altura máxima.

Espécie	Local	Altura Máxima	Referência
<i>Dicksonia antactica</i>	Austrália e Tasmânia	6 metros	(Hunt <i>et al.</i> , 2002)
<i>Dicksonia arborescens</i>	Ilha e Santa Helena	5 metros	(Maunder <i>et al.</i> , 1995)
<i>Dicksonia sellowiana</i>	América do Sul e Central	5 metros	(Schmitt, Schneider e Windisch, 2009)
<i>Dicksonia fibrosa</i>	Nova Zelândia	7 metros	(Page e Brownsey, 1986)
<i>Dicksonia lanata</i>	Nova Zelândia	2 metros	(Ogden, 1971)
<i>Dicksonia squarrosa</i>	Nova Zelândia	7 metros	(Héban-Mauri, 1975)

Este gênero é conhecido por suportar baixas temperaturas (ate -5°C) e por possuir um crescimento lento chegando a 2,5 cm/ano (Schmitt, Schneider e Windisch, 2009).

3.4 A ESPÉCIE *Dicksonia sellowiana*

A espécie *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook. conhecida popularmente por xaxim, xaxim-bugio, samambaiçu, samambaiçu-imperial e feto arborescente. Possui cáudice ereto, simples ou ramificado, suas frondes bipenadas de até 2,4 m de comprimento estão presentes no ápice do cáudice, o crescimento das frondes é mediada pelo hormônio auxina e a propagação da espécie é através da germinação de esporos (Mantovani, 2004). O xaxim é planta grande podendo chegar a 10 m de altura possuindo um cáudice fibroso e espesso podendo estar totalmente envolvido por larga bainha constituída por emaranhado de raízes adventícias e com abundantes tricomas castanho-dourados no ápice (Fernandes, 1997). Resistente ao frio essa planta apresenta um crescimento lento, menor que 1m³/ano (Mielke, 2002; Mantovani, 2004).



Figura 2 - Exemplos da espécie *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook.
Fonte: O autor (2011).

Pertencente à divisão Pteridophyta e à família Cyatheaceae (Corrêa, 1984) ou Dicksoniaceae (Tryon e Tryon, 1982), possui registros desde o sul do México até o Uruguai, passando pela América Central, Venezuela, Colômbia, Bolívia, Paraguai e Brasil.

A espécie *Dicksonia sellowiana* apresenta alguns nomes científicos sinônimos como pode ser visualizado no quadro 2.

Quadro 2 – Sinônima científica da espécie *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook.

Nomes científicos sinônimos
<i>Balantium karstenianum</i> Klotzsch
<i>Balantium sellowianum</i> (Hook.) C. Presl
<i>Dicksonia ghiesbreghtii</i> Maxon
<i>Dicksonia gigantea</i> H. Karst.
<i>Dicksonia karsteniana</i> (Klotzsch) H. Karst.
<i>Dicksonia lobulata</i> Christ
<i>Dicksonia navarrensis</i> Christ
<i>Dicksonia spruceana</i> Kuhn
<i>Dicksonia stuebelli</i> Hieron.

Fonte: Tropicos <http://www.tropicos.org/Name/26606534?tab=synonyms>

O xaxim conhecido como samambaiçu (do tupi “hamabe+açu” = samambaia gigante), é uma importante espécie de pteridófita arbórea (Mielke, 2002). Seu nome científico, *Dicksonia sellowiana*, foi descrito pela primeira vez por Karel Borivoj Presl, botânico tcheco que, segundo convenções botânicas, é citado em textos científicos pela sua abreviatura “C. Presl” ou somente “Presl.”. Posteriormente, a espécie teve sua posição taxonômica alterada pelo botânico William Jackson Hooker, cuja abreviatura é “Hook.” *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook, 1844. A espécie vegetal *Dicksonia sellowiana* tem a seguinte posição sistemática descrita no quadro 3.

Quadro 3 - Classificação taxonômica da espécie *Dicksonia sellowiana*

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

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



Figura 3 - Distribuição da espécie *Dicksonia sellowiana* pelo mundo.

Fonte: Tropicos

<http://www.tropicos.org/MapsCountry.aspx?maptype=4&lookupid=26606534&usenonflash=1>

De acordo com Fernandes (1997), o xaxim é encontrado no Brasil nas regiões Sudeste e Sul, com maior intensidade na última, provavelmente por influência de fatores climáticos, em altitudes que podem variar desde 60m à 2250m acima do nível do mar (Figura 4). Essa espécie característica das florestas ombrófilas mistas do Brasil meridional na mata atlântica, apresenta-se com maior frequência em áreas com alta densidade de araucária (*Araucaria angustifolia*) (Sehnem, 1978).



Figura 4 - Distribuição geográfica da espécie *Dicksonia sellowiana* no Brasil

Fonte: Condack, J.P.S. *Dicksoniaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil.

Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:

<<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB90947>>. Acesso em: 11 Jun. 2015

Utilizada no paisagismo, normalmente cultivada em região de sombra ou meia sombra, gosta de terrenos úmidos com solo rico em matéria orgânica, servindo de suporte para plantas epífitas, como flor de maio, orquídeas, bromélias e outras samambaias (Tryon e Tryon, 1982; Churchill, Tryon e Barrington, 1998).

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

3.4.1 ESTUDOS REALIZADOS COM A ESPÉCIE *Dicksonia sellowiana*, DICKSONIACEAE

São escassos os estudos realizados com o gênero *Dicksonia* e com a espécie *Dicksonia sellowiana*, conforme pode ser visto na figura 5, apresentando apenas 10 estudos na base de dados PubMed, destes estudos apenas 2 são referentes a atividades farmacológicas, os outros estudos referentes a propagação de mudas da referida espécie. Vale ressaltar que os presentes estudos foram realizados no Brasil com parceria de outros países. O local destes estudos podem ser visualizados nos pontos vermelhos do mapa da figura 5.



Figura 5 - Locais que realizaram pesquisa com a espécie *Dicksonia sellowiana*

O uso popular possui registros da utilização desta espécie de diversas maneiras (via oral, tópica ou por inalação) para o tratamento da asma, da pele, doenças cardiovasculares e doença parasitária (Corrêa, 1984; Marquesini, 1995). Segundo Marquesini (1995) os brotos de *Dicksonia sellowiana* são utilizados para o tratamento de sarna e vermes intestinais em humanos, possuindo indicação como vermífugo.

Em um estudo realizado por Ribeiro (2003), o extrato foi testado na inibição do crescimento do sarcoma 180 (tumor de EHRLICH) e os resultados indicam que o extrato da planta *D. sellowiana* apresenta atividade antitumoral, pois inibe o crescimento do sarcoma 180, indicando que essa planta pode ter alguma ação moduladora na produção de leucócitos em animais portadores do sarcoma 180 uma vez que diminui a porcentagem de neutrófilos e aumenta a de monócitos e linfócitos.

Segundo Bora e colaboradores (2005) a *Dicksonia sellowiana* possui alto teor de polifenóis determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, e atividade antioxidante determinado pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio.

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

Segundo Rattmann e colaboradores (2009) estudos realizados em ratos o extrato de *Dicksonia sellowiana* possui ação nos receptores muscarínicos na atividade vasorrelaxante e hipotensora, porém o mecanismo de ação não está completamente esclarecido. Neste estudo foi demonstrado que o extrato induz o relaxamento vascular dependente dos mediadores endoteliais, resultando em hipotensão.

Segundo Rattmann e colaboradores (2011) o extrato padronizado de *Dicksonia sellowiana* diminuiu o dano oxidativo em cultura de células endoteliais e em tecidos de ratos. O extrato possui uma ação sequestradora potente contra o peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e radical hidroxilo.

Segundo ensaios farmacológicos realizados por Rattmann e colaboradores (2012) em artéria coronária de suínos e em células endoteliais deste vaso, o extrato padronizado de *Dicksonia sellowiana* causou vasodilatação independente da ativação dos receptores muscarínicos, mas também dependente da estimulação endotelial de óxido nítrico sintase que foi mediado por duas vias. Este estudo mostrou que a produção sustentada de óxido nítrico permaneceu estável por um longo período mesmo após a remoção do extrato de *D. sellowiana* dos vasos ou da cultura de células endoteliais, confirmando o mecanismo hipotensor do extrato.

O estudo fitoquímico preliminar desta espécie realizado por Oliveira (2012), no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, onde foram analisados extratos obtidos das frondes de *Dicksonia sellowiana*, coletadas no município de Inácio Martins no estado do Paraná, em abril de 2010. O ensaio fitoquímico preliminar demonstrou a presença de leucoantocianidinas, flavonoides, taninos hidrolisáveis, taninos condensados, esteroides, triterpenos e aminogrupos. Além disso, esta espécie também demonstrou atividade antioxidante significativa por quatro métodos diferentes, mostrando que possui ação em meios hidrofílicos e lipofílicos. Nos testes de toxicidade, não demonstrou atividade tóxica nos modelos testados. Foram isolados e identificados dois taninos hidrolisáveis (ácido protocatecuico e ácido gálico - figura 3) sendo possíveis marcadores para o extrato deste vegetal.

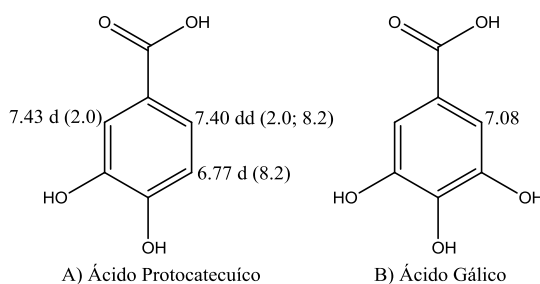


Figura 6 - Estruturas químicas isoladas e identificadas na espécie *Dicksonia sellowiana*
 Fonte: (Oliveira, 2012).

Segundo Oliveira e colaboradores (2015) o extrato obtido de frondes da espécie vegetal *D. sellowiana* atua como inibidor da oxidação lipídica, podendo também servir como fonte de substâncias antioxidantes que poderão ser utilizadas em doenças, como as cardiovasculares, neurodegenerativas e no combate ao envelhecimento que estão relacionadas aos modelos propostos. No mesmo estudo foi verificado a toxicidade frente à nauplios de *Artemia salina* e verificou que a ausência de toxicidade nos modelos testados estimula a realização de novas pesquisas na área química e farmacológica para determinar as propriedades terapêuticas que esta espécie possui.

3.5 TANINOS

Os polifenóis são compostos fenólicos que possuem um ou mais anéis aromáticos com uma ou mais hidroxilas (Rice-Evans, Miller e Paganga, 1997). Com mais de 8.000 variantes estruturais, são categorizados como ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, estilbenos, cumarinas, quinonas, e outros com base no número de anéis fenólicos e dos elementos estruturais que estão presentes nestes anéis (Sousa, C. M. D. M. *et al.*, 2007).

Os ácidos fenólicos são uma importante classe de compostos fenólicos, ocorrendo largamente no reino vegetal (Beara *et al.*, 2015). Os ácidos fenólicos incluem ácidos hidroxibenzóicos predominantes (por exemplo: ácido gálico, ácido p-hidroxibenzóico, ácido protocatecuíco, ácido vanílico e ácido siringico) e ácidos hidroxicinâmicos (por exemplo: ácido ferúlico, ácido cafeíco, ácido p-cumárico e ácido clorogênico) (Stalikas, 2007). Ácidos fenólicos ocorrem nas formas livres ou conjugados, aparecem geralmente como ésteres ou amidas. Devido à sua semelhança estrutural, vários outros polifenóis são considerados como análogos de ácidos fenólicos, tais como a capsaicina, ácido rosmarínico e ácido elágico (Rice-Evans, Miller e Paganga, 1996).

A palavra tanino é derivada do termo “tanante”, implicando que o material vegetal produza couro a partir de peles (Monteiro *et al.*, 2005). Os taninos são solúveis em água, compostos polifenólicos naturais com peso molecular variando de 500 a 4000, classificados em duas categorias: taninos hidrolisáveis (galo- taninos e elagi- taninos) e taninos condensados (proantocianidinas) (Zuiter, 2014). As unidades básicas de taninos hidrolisáveis são o ácido gálico e seus derivados. Os taninos são encontrados

geralmente combinado com alcalóides, polissacarídeos e principalmente com as proteínas através de pontes de hidrogênio entre os grupos fenólicos dos taninos e determinados sítios das proteínas (Sousa, C. M. D. M. *et al.*, 2007).

Taninos são polifenóis solúveis em água, que diferem da maioria dos outros compostos fenólicos naturais pela sua capacidade de precipitar as proteínas, tais como gelatina em solução (Scalbert, 1991). Por serem fenólicos, os taninos são muito reativos quimicamente, formam pontes de hidrogênio, intra e intermoleculares. Um mol de taninos pode ligar-se a doze moles de proteínas; fundamentando-se nessa propriedade pode-se identificar taninos por teste de precipitação de gelatinas. Os taninos são facilmente oxidáveis, tanto através de enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais, como cloreto férrico, o que ocasiona o escurecimento de suas soluções (Schofield, Mbugua e Pell, 2001; Oliveira Simões, Universidade Federal Do Rio Grande Do e Universidade Federal De Santa, 2003; Sousa, C. M. D. M. *et al.*, 2007).

As atividades dos taninos são bem amplas, utilizados no curtimento de couro (Haslam e Cai, 1994), indústria de tintas (Flora, Shrivastava e Mittal, 2013), atividade antimicrobiana e antiviral (Scalbert, 1991), antitumoral (Locatelli, Claudriana, Filippin-Monteiro, Fabíola Branco e Creczynski-Pasa, Tânia Beatriz, 2013), anti-inflamatória (Leicach e Chludil, 2014), entre outros. Estas atividades fazem deste grupo uma importante fonte de novos estudos em busca de novas atividades terapêuticas e industriais.

3.5.1. ÁCIDO GÁLICO

O ácido gálico é um polifenol muito encontrado em diversos chás, vinhos, uvas e outras frutas (Denderz e Lehotay, 2014). Nas plantas é encontrado em diversas espécies, tanto nas folhas quanto em matérias mais duros como cascas e raízes (Núñez Sellés *et al.*, 2002). O ácido 3,4,5-triidroxibenzóico é um cristal branco a amarelado com massa molecular de $170,12 \text{ g mol}^{-1}$, com ponto de fusão Em $250 \text{ }^\circ\text{C}$ sendo solúvel em água de 1,1% a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (Werner, Bacher e Eisenreich, 1997).

O ácido gálico é um precursor dos taninos hidrolisáveis formado em quantidades substanciais pelas plantas e fungos, sendo os taninos hidrolisáveis ésteres formados a partir do ácido gálico (Badhani, Sharma e Kakkar, 2015). Devido a sua importância como um antioxidante nos

organismos e nos alimentos, diversos estudos vêm sendo realizados com a finalidade de elucidar a rota metabólica desta substância.

Vários estudos vêm demonstrando duas vias possíveis para a síntese de ácido gálico, podendo ser formado a partir da fenilalanina ou através de chiquimato-3 desidroshimate por direta desidrogenação ou por meio do ácido protocatecuico (Haslam e Cai, 1994). Neste sentido a enzima (SDH) responsável pela redução de 3-DHS de ácido chiquímico e utilizado principalmente na formação de aminoácidos aromáticos L-fenilalanina, L-triptofano e L-tirosina, também é necessário na biossíntese de ácido gálico (Badhani, Sharma e Kakkar, 2015). A síntese do ácido gálico a partir das substâncias pode ser visualizado na figura 7.

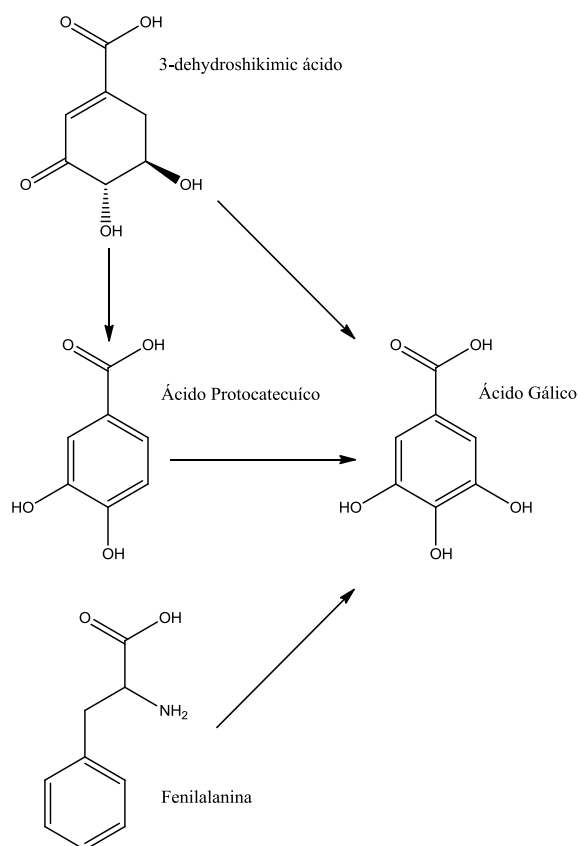


Figura 7 – Rota metabólica do Ácido Gálico
Fonte: (Ossipov *et al.*, 2003)

Devido ao alto potencial terapêutico desta substância, diversos são os estudos sobre as atividades farmacológicas do ácido gálico. Esta substância tem demonstrado possuir um forte efeito antioxidante (Galati e O'brien, 2004; Gawlik-Dziki *et al.*, 2013), anti-inflamatório (Flora, Shrivastava e Mittal, 2013), antimutagênico (Jang *et al.*, 2009) e propriedades anticâncer (Ohno, Inoue e

Ogihara, 2001; Locatelli *et al.*, 2012; Teng *et al.*, 2014). Mesmo sendo uma substância com alto poder antioxidante na presença de íons metálicos, tem apresentado uma ação pro-oxidante, e esta atividade tem sido relacionada na diminuição da indução da apoptose em linhas celulares de câncer (Yen, Duh e Tsai, 2002; Verma, Singh e Mishra, 2013).

O ácido gálico é uma molécula plana, que consiste de um anel aromático, três hidroxilas e um grupo de ácido carboxílico, conforme figura 7. Os três grupos hidroxilas estão ligados ao anel aromático em posição orto em relação um ao outro, e este arranjo que é o principal determinante para a forte capacidade antioxidante dos compostos fenólicos (Sroka e Cisowski, 2003). O arranjo do anel aromático influencia diretamente na atividade antioxidante dos ácidos fenólicos, conseqüentemente, vários fatores como o número e a posição das hidroxilas, a presença de outros grupos funcionais e a sua posição em relação aos grupos hidroxila demonstram que afeta diretamente na atividade antioxidante (Badhani, Sharma e Kakkar, 2015), Um exemplo é grupo carboxílico facilmente ionizável que contribui para a doação de hidrogênio fenólico. Deste modo, o ácido gálico mostrou uma atividade antioxidante maior do que o pirogalol, mostrando assim uma influência na atividade antioxidante dos ácidos fenólicos (Rice-Evans, Miller e Paganga, 1996).

Diversos efeitos sobre vários tipos de tumores em diferentes níveis moleculares tem demonstrado o ácido gálico e seus derivados, tanto *in vivo* como *in vitro*, porém, não é o poder antioxidante responsável por essas atividades, mas sim a ação pro-oxidante dos compostos de galato, que é responsável pela sua potente ação anticancerígena na indução de apoptose (Inoue *et al.*, 2000; Forbes-Hernández *et al.*, 2014). As espécies reativas de oxigênio gerados pelos galatos são responsáveis pela morte celular por apoptose e necrose, induzindo seletivamente a apoptose em células tumorais deixando as célula saudáveis intactas (Chia *et al.*, 2010).

Analisando as diversas aplicações do ácido gálico, desde seu uso industrial no curtimento do couro, aditivos de alimentos, produção de tintas (Haslam e Cai, 1994; Flora, Shrivastava e Mittal, 2013; Badhani, Sharma e Kakkar, 2015), até na terapêutica do tratamento do câncer, inflamações, antimicrobiano, antiviral, entre outros, (Inoue *et al.*, 2000; Cordova *et al.*, 2011; Locatelli, Claudriana, Filippin-Monteiro, Fabíola Branco e Creczynski-Pasa,

Tânia Beatriz, 2013), esta molécula possui um potencial para estudos nas diversas áreas.

3.5.2. ÁCIDO PROTOCATECÚICO

Os ácidos fenólicos são compostos encontrados no reino vegetal com semelhanças estruturais, com presença de grupo carboxílico como o ácido cafeíco, ácido gálico, ácido p-cumárico, ácido vanílico, ácido ferúlico e ácido protocatecuico que ocorre naturalmente no reino vegetal, conforme pode ser visualizado na figura 8 (Denderz e Lehotay, 2014). Amplamente distribuído, o ácido protocatecuico é encontrado na cebola (*Allium cepa* L.), ameixa (*Prunus domestica* L.), uva (*Vitis vinífera*), anis estrelado (*Illicium verum*), melissa (*Melissa officinalis* L.), *Ginkgo biloba*, entre outras espécies (Kakkar e Bais, 2014).

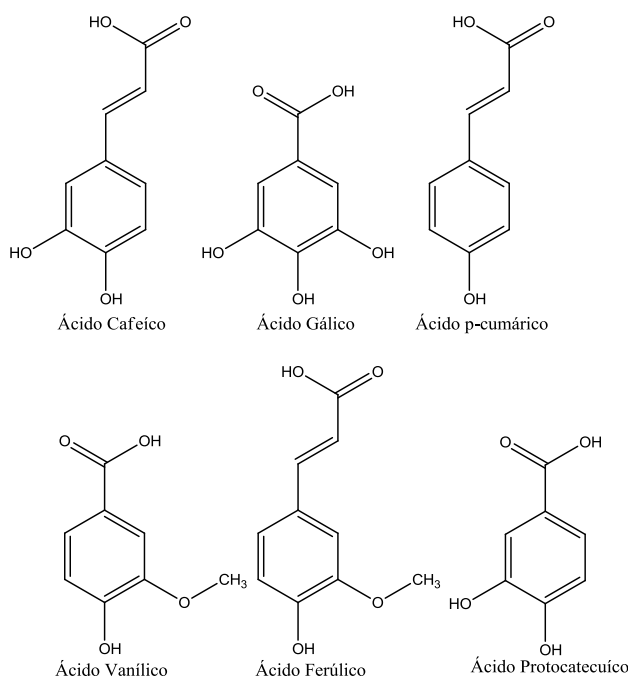


Figura 8 - Estruturas de compostos fenólicos

Fonte: O autor

O ácido protocatecuico quimicamente conhecido como ácido 3,4-dihidroxibenzóico, esta substância é derivada da fenilalanina através da via do ácido chiquímico. Apresenta-se como um pó sólido cristalino, com massa molecular de $154,12 \text{ g.mol}^{-1}$ e ponto de fusão em 221°C , sendo

moderadamente solúvel em água (1: 50), solúvel em álcool, clorofórmio e éter (Noubigh, Aydi e Abderrabba, 2015).

Nas atividades farmacológicas, destaca-se pela sua atividade antioxidante (Oliveira, 2012), antibacteriana (Chao e Yin, 2008), antidiabética (Scazzocchio *et al.*, 2011), antitumoral (Fabiani *et al.*, 2011), antiúlcera (Kore *et al.*, 2011), antiviral (Zhou *et al.*, 2007), anti-inflamatória (Lende *et al.*, 2011), analgésica (Lende *et al.*, 2011), cardioprotetora (Zhou, Zuo e Chow, 2005) e hepatoprotetora (Kakkar e Bais, 2014).

3.6 SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES

O consumo de alimentos é uma importante fonte de antioxidantes exógenos e estima-se que uma dieta típica fornece mais de 25.000 constituintes alimentares e muitos destes podem modificar diversos processos que estão relacionadas com diferentes doenças. Os antioxidantes são abundantes em legumes e frutas sendo encontrados também em cereais, chás, legumes, nozes e outros produtos alimentícios. A diminuição na ingestão de alimentos nutritivos e antioxidantes podem aumentar a chance de estresse oxidativo que pode levar ao dano celular, portanto, a ingestão de tais antioxidantes naturais podem gerar efeito protetor contra doenças induzidas por radicais livres (Saikat e Raja, 2011).

(Halliwell e Gutteridge, 1995) definem antioxidantes como " qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação com um substrato oxidável, atrasa significativamente ou inibe a oxidação deste", mas depois as definiu como "qualquer substância, que impede ou elimina os danos oxidativos de uma molécula alvo". Em 2007 (Khlebnikov *et al.*, 2007) definiram antioxidantes como "qualquer substância que elimina diretamente espécies reativas de oxigênio (EROS), indiretamente age regulando as defesas antioxidantes ou inibindo a produção de EROS". Outra propriedade que um composto deveria ter para ser considerado um antioxidante é a capacidade, após eliminação do radical, formar um novo radical que é estável (Halliwell, 1990).

Os radicais livres são átomos, moléculas ou íons com elétrons desemparelhados que são altamente instáveis e ativos nas reações químicas

com outras moléculas. Elas derivam de três elementos: oxigênio, nitrogênio e enxofre, criando assim, espécies reativas de oxigênio (EROS), espécies reativas de nitrogênio (ERNS) e espécies reativas de enxofre (ERSS) (Rice-Evans, Miller e Paganga, 1997).

Internamente, os radicais livres são produzidos normalmente no metabolismo dentro da mitocôndria, através de xantina oxidase, peroxissomas, processos inflamatórios, fagocitose, isquemia e exercício físico (Silva e Jasiulionis, 2014). Fatores externos como tabagismo, poluentes ambientais, radiação, drogas, pesticidas, solventes industriais e ozônio ajudam na produção de radicais livres (Caputo, Vegliante e Ghibelli, 2012). (Lobo *et al.*, 2010) descrevem como irônico que esses elementos, essenciais para a vida (especialmente oxigênio) possuem efeitos deletérios sobre o corpo humano através destas espécies reativas. Porém, esses radicais são necessários para várias vias metabólicas, como exemplo o óxido nítrico, é um radical livre necessário para o sistema imune, cardiovascular e no SNC (Rattmann *et al.*, 2012).

As moléculas antioxidantes desempenham um vital papel em vias metabólicas e na proteção das células, mas recentemente alguns estudos tem verificado o papel dos antioxidantes e pro-oxidantes (Saikat e Raja, 2011). Os pro-oxidantes são definidos como produtos químicos que induzem o estresse oxidativo, normalmente através da formação de espécies reativas ou por inibição sistemas antioxidantes (Yen, Duh e Tsai, 2002). Os radicais livres são considerados pro-oxidantes, porém os antioxidantes também podem ser pro-oxidantes. A vitamina C é considerada um antioxidante potente e intervém em muitas reações fisiológicas, mas também pode tornar-se um pró-oxidante, quando combinada com ferro e cobre reduzindo Fe^{3+} para Fe^{2+} (ou Cu^{3+} para Cu^{2+}), que por sua vez reduz o peróxido de hidrogênio a radicais hidroxila (Duarte e Lunec, 2005).

Durante a evolução humana, as defesas endógenas melhoraram gradualmente mantendo um equilíbrio entre os radicais livres e o estresse oxidativo (Gregoris *et al.*, 2013). A atividade antioxidante pode ser eficaz por meio de várias maneiras: a partir de inibidores de reações de oxidação de radicais livres, interrompendo a propagação de auto-oxidação, como supressores de oxigênio, através de sinergismo com outros antioxidantes,

como agentes que reduzem hidroperóxidos em compostos estáveis, como quelantes de metais que converter estes oxidantes em produtos estáveis e finalmente como inibidores de enzimas pró-oxidativas (lipooxigenases) (Rice-Evans, Miller e Paganga, 1997).

O sistema antioxidante humano é dividido em dois grandes grupos, antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Fig. 3). Os antioxidantes endógenos possuem uma eficiência notável, porém apenas este sistema não é suficiente, e os seres humanos dependem de vários tipos de antioxidantes que estão presentes na dieta para se manter livre dos radicais (Carocho e Ferreira, 2013).

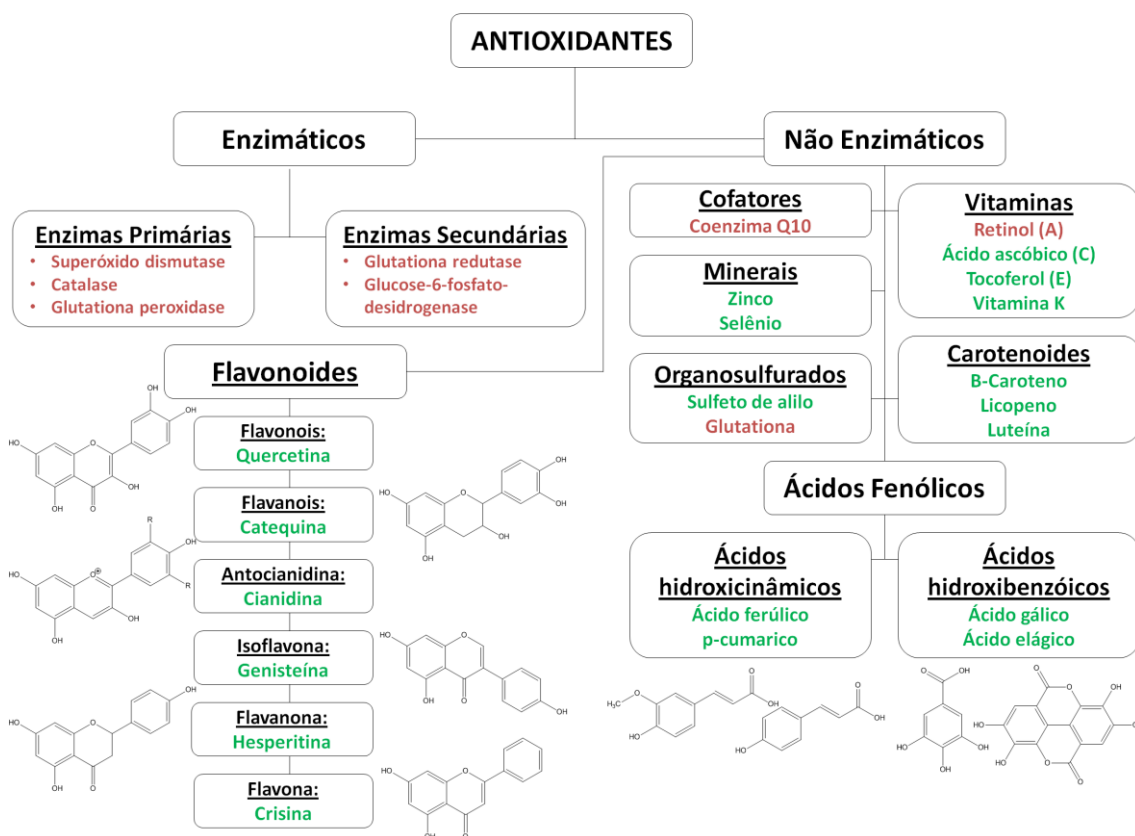


Figura 9 - Antioxidantes naturais separados em enzimáticos e não enzimáticos. Fonte: Adaptado de (Carocho e Ferreira, 2013).

Os flavonoides são um grupo de compostos antioxidantes constituídos por flavonóis, antocianinas, isoflavonas, flavanonas e flavonas. Flavanonas e flavonas são normalmente encontrados em frutos e os mesmos são ligados por enzimas específicas, enquanto flavonóis não compartilham esse

fenômeno e raramente são encontrados juntos. As antocianinas também estão ausentes em plantas ricas em flavanona. As propriedades antioxidantes conferidas aos flavonoides é devido aos grupos hidroxilas ligados a estruturas de anel, podendo atuar como agentes redutores, doadores de hidrogénio, sequestradores de radicais superóxido e até mesmo como quelantes de metais. Alguns dos mais importantes são os flavonoides catequina, quercetina e campferol (Rice-Evans, Miller e Paganga, 1996; Halliwell, 2009; Carochi e Ferreira, 2013)

Os ácidos fenólicos são compostos hidroxicinâmico ou hidroxibenzóico. Eles são onipresentes de material vegetal e, por vezes, presente como ésteres e glicosídeos. Eles possuem atividade antioxidante como quelantes e sequestrantes de radicais livres. Um dos compostos mais estudados e com atividades promissoras no grupo hidroxibenzóico é o ácido gálico, que também é o precursor de muitos dos taninos, enquanto que o ácido cinâmico é o precursor de todos os ácidos hidroxicinâmicos (Krimmel *et al.*, 2010).

Existem diversas formas de se avaliar a atividade antioxidante, cada um tendo o seu alvo específico dentro da matriz e todas elas com vantagens e desvantagens. Não há um método que pode fornecer resultados inequívocos e a melhor solução é usar vários métodos em vez de apenas um modelo de atividade. Alguns ensaios utilizam antioxidantes sintéticos ou radicais livres, alguns são específicos para a peroxidação lipídica e tendem a precisar de células animais ou vegetais, alguns têm um âmbito mais alargado, alguns exigem uma preparação mínima e conhecimento, alguns utilizam reagentes com respostas rápidas.

O teste de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é um dos métodos mais utilizados na atividade antioxidante, este método baseia-se na premissa de que um hidrogénio doador é um antioxidante. Este ensaio colorimétrico utiliza o radical DPPH, que muda de púrpura para amarelo, na presença de antioxidantes, e é amplamente utilizado como um estudo preliminar (Campos *et al.*, 2014).

A contribuição dos efeitos dos antioxidantes para a saúde humana ainda é incerta. Antioxidantes em altas doses não fazem bem e podem causar danos, baixas concentrações são indicadas levando em consideração a dieta e estilo de vida. Neste sentido além de estudar os antioxidantes seria necessário

avaliar as ações dos pró-oxidantes na terapêutica, como agente de proteção e no antienvhecimento (Gutteridge e Halliwell, 2010).

4 METODOLOGIA

Esta pesquisa compreende 5 diferentes linhas de análise da espécie vegetal *D. sellowiana*, dividindo-se em:

- Estudos morfoanatômicos e histoquímicos;
- Controle físico-químico do material vegetal;
- Obtenção dos extratos brutos e frações;
- Análise dos diversos métodos extrativos;
- Extração das partes da fronde (raque, pínula e folíolo).

O fluxograma abaixo auxilia na compreensão das técnicas e métodos empregados em cada parte da pesquisa científica.

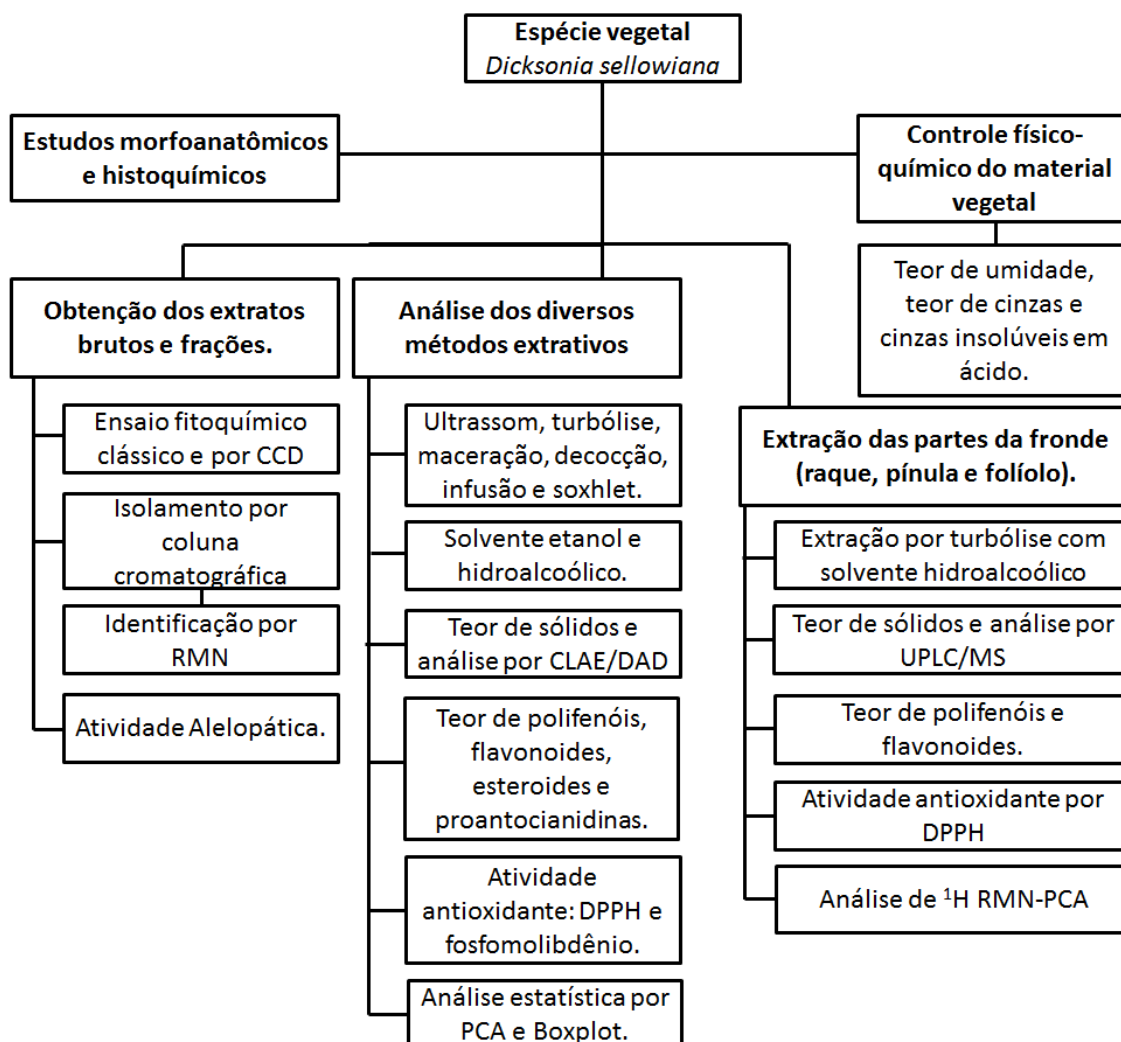


Figura 10 - Fluxograma das fases da pesquisa com a espécie *Dicksonia sellowiana*

Fonte: O autor (2016)

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

O material botânico é composto por frondes da espécie vegetal *Dicksonia sellowiana* Hook., Dicksoniaceae, que foram coletadas no município de Inácio Martins, Paraná, na chácara da empresa Chamel, com localização via GPS S25° 29' 35,7" WO 51° 12' 00.0". No local, há uma plantação da espécie e a coleta foi realizada no mês de Junho de 2012. As frondes coletadas foram secas em estufa de circulação de ar fechada, em temperatura constante de 50°C, por um período aproximado de 36 horas. Depois, foram trituradas em moinho de facas com martelo e armazenadas. As frondes foram comparadas para autenticação da espécie pelo Curador Osmar dos Santos Ribas com a exsicata registrada no Museu Botânico de Curitiba sob o número 358323.

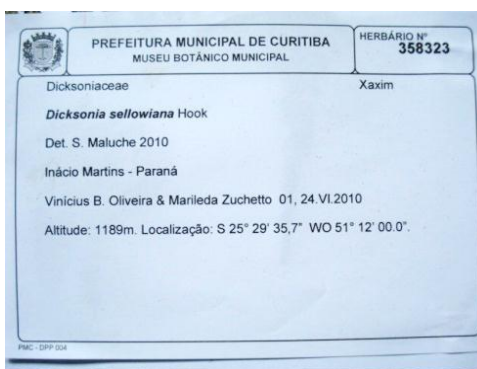


Figura 11 - Registro da exsicata depositada no museu botânico

Fonte: O autor (2012)



Figura 12 - Exsicata da espécie *Dicksonia sellowiana*

Fonte: O autor (2012)

Por tratar-se de uma espécie ameaçada de extinção, este estudo possui autorização do IBAMA para acesso ao patrimônio genético por meio da Autorização n.º023/2010, para fins de pesquisa científica, atendendo os requisitos descritos na resolução n° 35, de 27 de abril de 2011 que dispõe sobre a regularização de atividade de acesso ao patrimônio genético (Brasil, 2011b).

4.2 ESTUDOS MORFOANATÔMICOS

Para a análise morfoanatômica foram retiradas as folhas adultas e fixadas em FAA 70, sendo este composto de formol, ácido acético glacial e álcool etílico a 70%. O tempo mínimo para fixar as amostras foi de 18 horas. A fixação foi realizada para bloquear imediatamente o metabolismo das células, preservando-as (Johansen, 1940). Para a preservação das folhas adultas utilizou-se álcool etílico a 70% (Berlyn e Miksche, 1977). Para a realização dos testes microquímicos foram empregadas folhas adultas e fragmentos de caule frescos ou fixados no FAA.

Foram realizados cortes, à mão livre, paradérmicos e transversais, com o auxílio de isopor como suporte. Para a coloração desses cortes foram utilizados o azul de astra e a safranina, para corar estruturas acidófilas e basófilas, respectivamente (Roeser, 1972). A montagem da lâmina, com intuito de preservar o material e unir a lâmina com a lamínula, foi feita com glicerina a 50%. E por fim, foi realizada a fixação utilizando esmalte. Esse procedimento serve para retardar as modificações do material impedindo que o mesmo entre em contato com o ambiente (Beçak e Paulete, 1976). Os cortes foram analisados e fotografados em aumentos de 4x, 10x, 20x e 40x no microscópio fotônico (BX40, Olympus®).

Para os testes microquímicos foram utilizados cinco indivíduos e retirados caules e folhas adultos que estavam fixados em FAA, exceto para os testes de terpenoides com grupo carbonila que foram usados materiais frescos. Foram realizados cortes transversais à mão livre, na porção mediana, selecionados os melhores cortes, aplicados os reagentes de acordo com cada teste, lavados em água destilada e montados na lâmina com glicerina a 50%. Em seguida, os resultados foram observados e fotografados em microscópio fotônico nos aumentos de 4x, 10x, 20x e 40x (BX40, Olympus®).

Nos ensaios microquímicos utilizaram-se várias metodologias conhecidas. Para a detecção de flavonoides utilizou-se cloreto de alumínio; compostos fenólicos gerais, cloreto férrico; para amido, lugol; para lignina, floroglucinol-HCl; para lipídios totais, utilizou-se Sudan III; para polissacarídeos neutros, PAS - Ácido Periódico/Reagente de Schiff; para terpenoides com grupo carbonila, 2,4- dinitrofenil-hidrazina e para proteínas totais, Azul Brilhante de Comassie (Erbano, 2014). Seções controle foram realizadas simultaneamente aos testes histoquímicos, conforme procedimento padrão. Para a verificação do aspecto natural dos órgãos e das secreções, foram montadas e observadas algumas seções sem tratamento. A análise ultraestrutural de superfície em microscópio eletrônico de varredura (MEV).

As amostras (partes aéreas vegetativas da planta) acondicionadas em FAA 70 sofreram uma desidratação etanólica crescente (80%, 90% e 100%), sendo transferidas a cada 15 minutos. Essas amostras foram inseridas em uma câmara preenchida com álcool absoluto e colocadas no aparelho de ponto crítico (CPD-030, Balt-Tec®). Nessa fase, ocorreu a substituição até a remoção completa de álcool etílico por CO₂ para que o material ficasse completamente seco. O material, após ponto crítico, foi aderido com uma fita de cobre a um suporte do MEV e metalizado com ouro no aparelho SCD-030, Balzers®. Essa etapa tem como finalidade o aumento da condutividade da superfície da amostra devido à presença da fina camada de metal que através de bombeamento de íons pesados de argônio, os átomos de ouro se depositam sobre todas as reentrâncias e proeminências da superfície da amostra. A última etapa foi a observação e a análise no microscópio eletrônico de varredura (JSM 6360LV, JEOL®) que produz imagens tridimensionais (Erbano, 2014).

4.3 ENSAIOS DE PUREZA

4.3.1 TEOR DE UMIDADE E SÓLIDOS (MÉTODO GRAVIMÉTRICO)

Para a verificação do teor de umidade da espécie *Dicksonia sellowiana*, foi utilizado frondes de xaxim trituradas em moinho de facas e martelo. Foi colocado aproximadamente 1 g do material vegetal em cada cadinho de porcelana previamente dessecado e tarado. Os cadinhos com a amostra foram colocados em estufa a aproximadamente 90°C, por um período de 2 à 3 horas, até a obtenção de um peso constante. Os cadinhos foram retirados da estufa e colocados para resfriamento em

um dessecador. Após este processo a amostra da espécie *Dicksonia sellowiana* foi pesada e foi realizado o seguinte cálculo para a obtenção do teor da unidade da amostra:

$$\% \text{ umidade} = \left(\frac{P_a - P_s}{P_a} \right) \times 100$$

P_a = Peso do cadinho + peso da amostra

P_s = Peso do cadinho + peso da amostra seca

Para obtenção do teor de sólidos nos extratos vegetais de *Dicksonia sellowiana* foi colocado em uma placa de petri (tarada) 10 mL dos extratos vegetais e estas placas foram levadas a estufa até secura. O resultado foi apresentado em peso de extrato seco em relação a amostra do vegetal, e foi realizado em triplicata.

4.3.2 TEOR DE CINZAS

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

$$\% \text{ de cinzas} = \frac{P_a - P_i}{P_a} \times 100$$

P_a = Peso do cadinho + peso da amostra

P_i = Peso do cadinho + peso da amostra incinerada

4.4 ENSAIOS PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA

4.4.1 ENSAIOS CLÁSSICOS

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

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

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

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

4.4.2 SCREENING FITOQUÍMICO POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA

Para realização deste método de identificação dos grupos de metabólitos secundários por cromatografia de camada delgada (CCD), foram utilizados os extratos e frações preparados conforme item 4.5. A fase móvel foi colocada na cuba cromatográfica para saturação do meio. O tempo é fundamental, promovendo a saturação da atmosfera interior com a fase móvel na forma de vapor auxiliando na migração das substâncias através da camada delgada. As paredes internas da cuba foram revestidas com papel filtro e no

fundo colocada certa quantidade da fase móvel a ser utilizada, o que permite uma completa saturação do meio cromatográfico.

Para a realização do ensaio de CCD foi utilizado cromatoplaças de sílica gel 60 UV₂₅₄, cortadas no comprimento de 3 cm de largura por 5 cm de comprimento. As amostras foram aplicadas com capilar de modo que os pontos de aplicação fiquem concentrados em uma pequena área.

Após a eluição da fase móvel pela cromatoplaça, o solvente foi seco e utilizado reveladores específicos para os grupos de metabólitos secundários presentes no quadro 4.

Quadro 4 - Constituição da fase móvel, do revelador e interpretação do resultado

	Fase Móvel	Reveladores Específicos	Resultado	Referências para comparação dos resultados
Alcaloides	Clorofórmio – 95 ml Metanol – 5 ml Universo de amônio em tubo de ensaio	Dragendorff Carbonato de bismuto – 5 g Iodeto de potássio – 25 g Ácido clorídrico concentrado – 12 ml Água destilada qsp. 100 ml	Coloração alaranjado forte na presença de alcaloides.	(Souza <i>et al.</i> , 2014; Oliveira <i>et al.</i> , 2014)
Cumarinas	Diclorometano – 10 ml Acetona – 10 ml	Hidróxido de potássio 1% Hidróxido de potássio – 1 g Etanol – 100 ml	Coloração azul ou verde quando expostas a luz UV.	(Amaral <i>et al.</i> , 2009)
Esteroides e Triterpenos	Tolueno – 93 ml Acetato de etila – 7 ml	Vanilina sulfúrica Vanilina 1% - 10 ml Ácido sulfúrico 5-10% - 10 ml	Desenvolvimento de coloração azul ou violácea após carbonização em chapa quente.	(Carvalho, 2001; Fernandes <i>et al.</i> , 2015)
Flavonoides	Acetato de etila – 100 ml Ácido fórmico – 11 ml Ácido acético glacial – 11 ml Água destilada – 26 ml	NEU Difenol boril oxil etil amino – 1 g Metanol – 100 ml	Desenvolvimento de coloração amarela em luz UV.	(Carvalho, 2001; Fernandes <i>et al.</i> , 2015)
Taninos	Acetato de etila – 100 ml Ácido fórmico – 11 ml Ácido acético glacial – 11 ml Água destilada – 26 ml	Cloreto Férrico 2% Cloreto férrico – 2 g Metanol ou água – 100 ml	Coloração verde para taninos condensados. Coloração azul para taninos hidrolisáveis. Coloração marrom para presença de compostos fenólicos.	(Souza <i>et al.</i> , 2014; Oliveira <i>et al.</i> , 2014)

As placas foram visualizadas sob luz ultravioleta (365 nm) antes da revelação com os reagentes, verificando a fluorescência dos pontos na CCD. Nas técnicas de flavonoides e cumarinas após revelação, a placa foi visualizada novamente no ultravioleta analisando a mudança da coloração após utilização do revelador. Para identificação dos esteroides e triterpenos, após colocar o reagente, a placa foi levada à estufa quente e carbonizada para visualização da coloração azul à violácea. Na identificação de taninos e alcaloides após secura do reagente revelador, a mudança de coloração indicou a presença dos metabólitos.

4.5 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES

Após a espécie vegetal *Dicksonia sellowiana* ter sido triturada em moinho de facas e martelo, o pó de xaxim foi tamizado em tamizes de ordem crescente (7, 16, 25, 35) de granulometria. A granulometria influencia diretamente na eficiência da extração, levando em consideração que a estrutura tecidual das diversas partes da planta é heterogênea, partes como as raízes e os caules possuem tecidos mais densos, enquanto que em folhas e flores os tecidos apresentam uma densidade menor. Neste sentido, é desejável que a granulometria seja homogênea para que a penetração de solventes no material seja facilitada e consistente (Migliato *et al.*, 2011).

Muitos estudos vêm demonstrando a influência da extração no teor de metabólitos secundários (Vongsak *et al.*, 2013; Bampouli *et al.*, 2014; Karabegović *et al.*, 2014). Neste sentido, foram elaborados extratos vegetais com pó de xaxim com granulometria abaixo de 500 μ , utilizando como solventes, álcool de cereais 92,8°GL e uma mistura hidroalcolólica de álcool de cereais e água destilada na proporção de 7:3 (v/v) respectivamente aferida com alcoômetro. Foram realizados seis métodos de extrações, sendo três métodos a frio (ultrassom, turbólise e maceração) e três métodos a quente (decocção, infusão e soxhlet), utilizando os dois solventes para as referidas extrações. Os métodos extrativos estão descritos nos itens a seguir.

4.5.1 EXTRAÇÕES A FRIO

4.5.1.1 Extração por Ultrassom

Para estas extrações foi utilizado aparelho de ultrassom utilizando 10g de pó de xaxim e 150mL de solvente extrator por um período de 90 minutos em temperatura ambiente, e após este período, os extratos foram filtrados e concentrados em rota-evaporador. Foram elaborados dois extratos vegetais por este método, o extrato bruto por ultrassom etanólico (EBUSE) e o extrato bruto por ultrassom hidroalcológico (EBUSHA). Ambos os extratos foram verificados o teor de sólidos, o teor de polifenóis, a atividade antioxidante pelo método de DPPH e os respectivos dados estatísticos.



Figura 13 - Extração por Ultrassom

Fonte: O autor (2013).

4.5.1.2 Extração por turbólise

Para estas extrações foi utilizado aparelho de turbólise da marca Ultra-Turrax® modelo T-50 Basic, as extrações foram realizadas utilizando 10g de pó de xaxim e 150mL de solvente extrator por um período de 10 minutos a 4000rpm em temperatura ambiente, e após este período, os extratos foram filtrados e concentrados em rota-evaporador. Foram elaborados dois extratos vegetais por este método, o extrato bruto por turbólise etanólico (EBTE) e o extrato bruto por turbólise hidroalcológico (EBTHA), ambos os extratos foram verificados o teor de sólidos, o teor de polifenóis, a atividade antioxidante pelo método de DPPH e os respectivos dados estatísticos.



Figura 14 - Extração por Turbólise

Fonte: O autor (2013).

4.5.1.3 Extração utilizando maceração

Para estas extrações foi utilizado dois frascos âmbar fechados hermeticamente por um período de 7 dias sem iluminação com agitação diária conforme descrito no formulário de fitoterápicos da farmacopeia Brasileira (Brasil, 2011a), as extrações foram realizadas utilizando 10g de pó de xaxim e 150mL de solvente extrator, e após este período, os extratos foram filtrados e concentrados em rota-evaporador. Foram elaborados dois extratos vegetais por este método, o extrato bruto por maceração etanólico (EBME) e o extrato bruto por maceração hidroalcolico (EBMHA), ambos os extratos foram verificados o teor de sólidos, o teor de polifenóis, a atividade antioxidante pelo método de DPPH e os respectivos dados estatísticos.

4.5.2 EXTRAÇÕES A QUENTE

4.5.2.1 Extração por decocção

Para estas extrações foi utilizado dois frascos âmbar fechados hermeticamente e colocados em banho-maria a 90°C por um período de 15 minutos, e após este período, os extratos foram filtrados e concentrados em rota-evaporador.. As extrações foram realizadas utilizando 10g de pó de xaxim e 150mL de solvente extrator. Foram elaborados dois extratos vegetais por este método, o extrato bruto por decocção etanólico (EBDE) e o extrato bruto por decocção hidroalcolico (EBDHA). Em ambos os extratos foram verificados

o teor de sólidos, o teor de polifenóis, a atividade antioxidante pelo método de DPPH e os respectivos dados estatísticos.

4.5.2.2 Extração por infusão

Para estas extrações, os solventes foram levados até a temperatura de ebulição. Após este processo, foram vertidos em frascos âmbar onde continha o xaxim em pó e fechados por um período de 30 minutos, e após este período, os extratos foram filtrados e concentrados em rota-evaporador. As extrações foram realizadas utilizando 10g de pó de xaxim e 150mL de solvente extrator. Foram elaborados dois extratos vegetais por este método, o extrato bruto por infusão etanólico (EBIE) e o extrato bruto por infusão hidroalcolico (EBIHA). Nos dois extratos foram verificados o teor de sólidos, o teor de polifenóis, a atividade antioxidante pelo método de DPPH e os respectivos dados estatísticos.

4.5.2.3 Extração por Soxhlet

Para estas extrações foi utilizado aparato de Soxhlet. As extrações foram realizadas utilizando 10g de pó de xaxim e 150mL de solvente extrator até total extração, observada pela limpidez do solvente, e após o período de extração, os extratos foram filtrados e concentrados em rota-evaporador. Foram elaborados dois extratos vegetais por este método, o extrato bruto por soxhlet etanólico (EBSE) e o extrato bruto por soxhlet hidroalcolico (EBSHA). Em ambos foram verificados o teor de sólidos, o teor de polifenóis, a atividade antioxidante pelo método de DPPH e os respectivos dados estatísticos.

Para a extração com a finalidade de isolamento foi utilizado aparato de Soxhlet modificado. As extrações foram realizadas utilizando 2.000g de xaxim triturado em moinho de facas e martelo e 7 litros de acetona até total extração, observada pela limpidez do solvente extrator (Carvalho *et al.*, 2009). Após este processo, a acetona foi retirada e foi adicionado 7 litros de etanol 93,8°GL no mesmo material da extração anterior. Procedeu-se com a extração até que o solvente extrator estivesse límpido. Este extrato foi particionado conforme item 4.5.3 e utilizado para isolamento de substâncias químicas pertencentes a espécie vegetal.

4.5.3 Fracionamento por Polaridade Crescente

Os fracionamentos foram realizados por partição líquido/líquido utilizando-se solventes de diferentes polaridades, na seguinte ordem: hexano, clorofórmio e acetato de etila. Para os particionamentos, fora utilizado aparato de soxhlet ou funil de separação, dependendo da finalidade do ensaio.

4.6 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS

Para isolamento das substâncias foram preparadas pastilhas com sílica gel 60 na proporção de 5 partes em relação à quantidade de amostra solubilizadas em clorofórmio, e posteriormente levada à secura em banho-maria a 50°C. A primeira pastilha preparada foi a fração hexano, seguida da fração clorofórmio e fração acetato de etila respectivamente.

As frações obtidas do extrato foram passadas em coluna cromatográfica com fase estacionária sílica gel 60 Merck 0,063 – 0,200mm. A eluição iniciou com solvente hexano e o gradiente crescente de polaridade de 10% com solvente acetato de etila. Com 100% de acetato de etila, iniciou-se a eluição de acetato de etila / metanol com gradiente de 10 em 10% até 100% de MeOH. As amostras foram coletadas em frascos de 10mL e levadas à secura em temperatura ambiente para cristalização dos compostos.

Após a secura, foi avaliada a presença de substâncias isoladas e/ou misturas. Essas substâncias foram identificadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) ^{13}C e ^1H , ultravioleta, CLAE/DAD e ponto de fusão.

Para RMN de ^{13}C e ^1H utilizou-se espectrofotômetro Brucker® modelo DPX 200 MHz, operando a 4,7 Tesla, observando os núcleos de ^1H e ^{13}C a 200,12 e 50,56 MHz, respectivamente, realizado no Laboratório de RMN do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná.

4.7 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

4.7.1 ANÁLISE POR CLAE/DAD

Os extratos brutos de *Dicksonia sellowiana* foram diluídos em MeOH a uma concentração de 20,00 mg.mL⁻¹ e submetidos à análise por CLAE Merck Hitachi – Elite Lachrom, com detector diodo (DAD) em 295 nm, coluna XTerra® RP18 5 µm, 4,6x250 mm, volume de injeção de 20 µL, fluxo 1,00 mL min⁻¹. Como fase móvel foi utilizado gradiente de concentração o sistema H₂O:H₃PO₄ a 0,1% (A) e MeOH (B) na seguinte programação: 1-45 min, iniciando com 10% de fase B e finalizando em 45 min com 100% de fase B. O MeOH utilizado foi grau HPLC (TEDIA) e a água MilliQ.

4.7.2 ANÁLISE POR UPLC/MS

As frações acetato de etila foram analisadas por cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) realizada em sistema Acquity-UPLC™ (Waters, MA, EUA), composto por uma bomba binária, gestor de amostra e forno de coluna. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente (22°C) e forno de coluna a 60°C. As detecções foram fornecidas por um detector de arranjo de fotodiodos (PDA) a 210-400 nm, e por espectrometria de massa por ionização de eletropulverização (ESI-MS) e digitalização m/z 100-2000, registrada em um triplo quadrupolo, Quattro LC (Waters), sob pressão atmosférica ionização (API) com nitrogênio como nebulizador e gás de solvatação. As energias foram fixados em 2,65 kV (capilar) e 75V (cone) na ionização negativa; 2,80 kV (capilar) e 100V (cone) na ionização positivo.

Na segunda etapa, os perfis em tandem-MS foram obtidos por espectrometria de dissociação induzida por colisão em massa (CID-MS), utilizando árgon como gás de colisão e energias que variam entre 30 e 80 eV para ambos, negativo e íons positivos. As separações foram desenvolvidas em colunas Waters UPLC BEH C18 com 50 milímetros x 2,1 milímetros id e 1,7µm de tamanho de partícula, utilizando H₂O (solvente A) e acetonitrila (solvente B) ambos com TFA a 8 mM⁻¹ (v/v). Um sistema de gradiente linear foi desenvolvido com fluxo de de 300µL.min⁻¹, através do aumento do solvente B de 0 a 40% em 12 min. As amostras (3 mg.ml⁻¹) foram preparadas em MeOH-H₂O (1:1, v / v) e o volume de injeção foi de 1 µL.

4.8 DOSEAMENTOS DOS EXTRATO BRUTOS

4.8.1 DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS

Para determinação do teor de fenólicos totais, os extratos brutos foram diluídos em metanol (1000 mg mL^{-1}) e adicionados ao tubo de ensaio e este completado para 3,4 mL com água destilada, após total solubilização foi adicionado 0,2 mL de reativo de Folin-Ciocalteu novamente homogeneizado e adicionado 0,4 mL de carbonato de sódio a 10%, agitado e depois 30 minutos de repouso em temperatura ambiente (Slinkard e Singleton, 1977). Após este período, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro à 760 nm utilizando curva de calibração de ácido gálico nas concentrações de 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5 e $20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ como padrão, as leituras foram realizadas em triplicata. Os teores de fenólicos totais foram determinados em miligramas equivalente de ácido gálico (EG) por grama de extrato bruto, utilizando a seguinte equação com base na curva de calibração: $y=0,0392x-0,0583$, $R^2=0,9964$.

4.8.2 DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES TOTAIS

Os extratos brutos diluídos em metanol ($1000 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) foram adicionados a 2 ml de AlCl_3 2%, o volume da amostra foi completado para 2 mL. Após 60 minutos foram realizadas as leituras em espectrofotômetro à 420 nm utilizando curva de calibração de quercetina nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 e $30 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ como padrão, as leituras foram realizadas em triplicata (Chang *et al.*, 2002). Os teores de flavonoides totais foram determinados em miligramas equivalente de quercetina (EQ) por grama de extrato bruto, utilizando a seguinte equação com base na curva de calibração: $y=0,0314x-0,0164$, $R^2=0,9996$.

4.8.3 DOSEAMENTO DE PROTOANTOCIANIDINAS TOTAIS

Para determinação do teor de protoantocianidinas totais, diluiu-se os extratos brutos em metanol ($1000 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) foram adicionados a 3 mL de uma solução reagente. Para a solução reagente foi preparado solução de vanilina 1% em metanol e solução de HCL 8% em metanol. Após o preparo, foram misturadas na proporção de 1:1. A leitura foi realizada após 20 minutos incubados em banho-maria a $30 \text{ } ^\circ\text{C}$ em espectrofotômetro à 500 nm utilizando curva de calibração de catequina nas concentrações de 25, 50, 75, 100, 125 e

150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ como padrão, e as leituras foram realizadas em triplicata (Burns, 1971). Os teores de protoantocianidinas totais foram determinados em miligramas equivalentes de catequina (EC) por grama de extrato bruto, utilizando a seguinte equação com base na curva de calibração: $y=0,0009x+0,0048$, $R^2=0,9952$.

4.8.4 DOSEAMENTO DE ESTEROIDES TOTAIS

Determinada concentração dos extratos brutos foram diluídos em clorofórmio (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), completado para 2 mL com clorofórmio, adicionado 2 mL do reativo de Libermann-Burchard e 5 mL de CHCl_3 . As amostras foram guardadas protegidas da luz, à temperatura ambiente, por 15 minutos. A presença de esteróis produz coloração verde característica, cuja absorbância foi determinada em espectrofotômetro, à 640 nm utilizando como curva de calibração de esteroides o padrão estigmasterol nas concentrações de 25, 50, 75, 100, 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As leituras foram realizadas em triplicata (Kim e Goldberg, 1969). Os teores de esteróides totais foram determinados em miligramas equivalentes de estigmasterol (EE) por grama de extrato bruto, utilizando a seguinte equação com base na curva de calibração: $y=0,0016x-0,0004$, $R^2=0,9963$.

4.9 ENSAIOS *IN VITRO*

4.9.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) é um radical livre e estável com o qual compostos vegetais que apresentam potencial atividade antioxidante interagem, permutando os elétrons ou átomos de hidrogênio para o radical livre reduzindo-o (Carocho e Ferreira, 2013). É um método fácil, rápido e muito utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de amostras vegetais.

O potencial de redução do radical DPPH das amostras foi analisado espectrofotometricamente a 518nm (Mensor *et al.*, 2001). Foram preparadas cinco soluções metanólicas diferentes de cada amostra e interpoladas em gráfico para determinação da equação da reta. Em tubo de ensaio, foram adicionados 2,5mL da amostra a ser testada e depois adicionado 1mL de uma

solução metanólica de DPPH na concentração de 0,03 mmol/mL. Para cada amostra foi preparado um branco com 2,5mL da solução e 1mL de metanol para cada concentração. Paralelamente foi feito um controle com 2,5mL de metanol e 1mL de DPPH. Após trinta minutos de reação foram realizadas as leituras em espectrofotômetro, correspondente a absorção máxima do radical em estudo. Como padrões foram utilizados rutina e vitamina C.

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

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

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

4.9.2 ENSAIO DA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO.

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

Os tubos foram fechados e mantidos em banho-maria à 95°C, por 90 min. Após resfriamento, foi realizada a leitura a 695nm, em um espectrofotômetro UV- 1601 Shimadzu® para obtenção das absorbâncias, usando 0,3 mL de metanol com 3 mL do reagente como branco. A capacidade antioxidante das amostras é expressa em relação à rutina (200 µg.mL⁻¹) usada como padrão, e vitamina C (200 µg.mL⁻¹) cuja atividade antioxidante de referência foi considerada 100%.

4.9.3 ATIVIDADE IMUNOMODULADORA SOBRE NEUTRÓFILOS HUMANOS

Este ensaio foi realizado após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFPR do projeto intitulado “Estudo de produtos naturais sobre a função dos neutrófilos humano sob registro CEP/SD 1033.158.10.11/ CAAE 0090.0.091.000-10 (ANEXO 2). Para avaliar a atividade sobre neutrófilos foram utilizados os compostos isolados da espécie *Dicksonia sellowiana*, o ácido gálico e ácido protocatecuíco.

Para este ensaio utilizou-se técnica adaptada e modificada de (Park, Fikrig e Smithwick, 1968; Abreu *et al.*, 2009). A partir de 1 mg de amostras dos compostos isolados foram preparadas soluções 2,5; 5,0; 10,0 e 15,0 µg.mL⁻¹. Lâminas contendo 50 µL destas soluções, de controle positivo PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) e controles negativos contendo neutrófilos humanos com e sem tratamento com o NBT (azul p-Nitrotetrazólio) foram preparadas 48 horas antes da realização do experimento e secas em temperatura ambiente. O ensaio iniciou-se com a adição de 3 mL de sangue humano (coletado no dia do ensaio com EDTA) em 36 mL de água destilada com homogeneização por 30 segundos. Em seguida, foram adicionados 12 mL de tampão PBS (salina tamponada com fosfatos, pH 7,2) concentrado 4 vezes com nova homogeneização (15 segundos) e posterior centrifugação (10 min/2000 rpm). O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspense em 3 mL de PBS normal. Em um tubo cônico, contendo 3 mL de uma mistura de polissacarídeos neutros hidrofílicos de alta densidade (FicollHypaque®), o sedimento ressuspense foi adicionado e centrifugado (25 min/1500 rpm). O sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspense novamente em 3 mL de PBS normal. Nova centrifugação (10 min/2000 rpm) foi realizada e o sobrenadante

desprezado e o sedimento ressuspensão em PBS. A suspensão de células em PBS foi adicionada nas lâminas previamente preparadas, e incubada (20 min/37 °C) em câmara úmida. Após incubação, as placas foram lavadas com PBS normal e adicionado NBT 79 (exceção da lâmina controle negativo), e incubadas (15 min/37 °C) em câmara úmida. As lâminas foram lavadas novamente com PBS normal e secas à temperatura ambiente e posteriormente coradas com safranina. Após o preparo, as lâminas foram examinadas ao microscópio, e a presença de grânulos azuis no interior de todos os neutrófilos foi considerada como ativação. A amostra foi considerada ativadora de neutrófilos somente após apresentar resultado positivo em cinco ensaios distintos.

4.10 ESTUDOS EM CÉLULAS

4.10.1 CULTIVO CELULAR

A linhagem murina de melanoma metastático 4C11+ foi cultivada em RPMI 1640 (Gibco®) pH 6,9 contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) em estufa a 37°C sob atmosfera contendo 5% de CO₂ (chamadas a partir de agora de condições normais de cultivo).

4.10.2 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS

Foram plaqueadas 200 células da linhagem 4C11+ em triplicata tratada com 200 uM de ácido gálico e controle contendo apenas veículo (DMSO) em placas de 6 cm de diâmetro em condições normais de cultivo. Após 10 dias, as células foram lavadas com PBS e fixadas com formaldeído 3,7% em PBS por 15 minutos. A coloração das colônias foi realizada com azul de Toluidina 1% em bórax por 5 minutos. As placas foram então lavadas 3 vezes com água destilada para retirar o excesso de corante e fotografadas. Para a quantificação colorimétrica, foi adicionado 1 mL de SDS 1% em H₂O por 4h e foi realizada a leitura de absorvância a 620 nm. O ensaio foi feito em triplicata técnica e duplicata biológica.

4.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

Foi analisado possível atividade alelopática do extrato bruto e frações obtidas das frondes de *Dicksonia sellowiana*, sobre sementes de *Lactuca sativa*

L. cv. Grand rapids (alface, da empresa Top Seed®, com 89% de germinação conforme informado pelo fabricante). As placas de Petri (9,0 cm de diâmetro) contendo papel filtro nº 1 (Whatman®), previamente autoclavadas, receberam 5,0 mL da solução das amostras (EB e frações), preparadas nas concentrações de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em quadruplicata. Em seguida, foram semeadas aleatoriamente sobre cada disco de papel filtro, 50 sementes de alface (Brasil, 2009). Como controle, procedimento similar foi realizado, substituindo extratos e frações por água.

As placas de Petri contendo as sementes foram levadas à uma câmara de germinação (BOD), com condições de luz (160 W), umidade relativa ($\pm 80\%$) e temperatura constantes (alface, 25 °C com luz interna constante)

4.11.1 TESTE DE GERMINAÇÃO

Para os bioensaios de germinação, fora realizada uma contagem diária do número de sementes germinadas, a cada 12 horas, tendo como critério a protrusão radicular com no mínimo 2,0 mm de comprimento, conforme metodologia descrita por (Macías, Castellano e Molinillo, 2000). O experimento foi considerado concluído quando a germinação foi nula por três dias consecutivos.

A germinação foi avaliada por meio do IVG (Índice de velocidade de germinação) (Maguire, 1962) e porcentagem de germinação (Labouriau, 1983). O IVG foi calculado para cada repetição de cada tratamento utilizando a quantidade de sementes germinadas, dividindo-a pelo dia da germinação e somando-se até o último dia de germinação. As médias dos IVGs foram submetidas à análise estatística.

4.11.2 TESTE DE CRESCIMENTO

Para os bioensaios de crescimento utilizou-se a metodologia descrita por (Macías, Castellano e Molinillo, 2000). Após três dias da protrusão radicular, mediu-se o alongamento da raiz e do hipocótilo/coleóptilo (dez plântulas por placa) utilizando papel milimetrado. Posteriormente, essas plântulas foram levadas para secar em uma estufa a 60°C até peso constante para a obtenção

da massa seca. O nível de atividade foi expresso em porcentagem de inibição/ estímulo de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ atividade} = \left(\frac{MT - MC}{MC} \right) \times 100\%$$

MT corresponde à média de alongamento dos tratamentos e MC a media de alongamento do controle.

4.11.3 RESPIRAÇÃO RADICULAR

Para este ensaio utilizou-se a técnica que estima a respiração das células radiculares por meio da redução do cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) por enzimas desidrogenases (envolvidas no processo de respiração), com surgimento dos cristais de formazan de coloração avermelhada (Steponkus e Lanphear, 1967; Carmo, Borges e Takaki, 2007).

Foram cortadas 10 raízes das sementes que germinaram a 1,0 cm a partir da coifa, e transferidas para tubos de ensaio com adição de 5 mL de cloridrato de trifetil tetrazólio (TTC) 0,6% (p/v), 1 mL de tampão fosfato de sódio (mono e dibásico) a 0,05M (pH 7,0) em cada tubo, mantidos em temperatura ambiente por 2 horas. Após esse período, os tubos foram transferidos para estufa a 40°C por 15 horas. Ao final desse tempo, as soluções dos tubos foram drenadas e as raízes lavadas duas vezes com água destilada, com posterior drenagem máxima. Adicionou-se então 7 mL de etanol 95% (v/v), e então os tubos foram levados para o banho-maria com água fervente ($\pm 100^\circ\text{C}$) durante 15 minutos, ou até secura.

Após esse período, os tubos foram resfriados até temperatura ambiente e acrescentado 10 mL de etanol 95% (v/v). Em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro usando como branco etanol 95% (v/v), sendo o resultado apresentado em absorbância a 530 nm.

4.11.4 CONTEÚDO DE CLOROFILA TOTAL

Foram cortadas 10 folhas primárias inteiras das plântulas de cada placa e transferidas para tubos de ensaio, contendo 5,0 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) e então os tubos foram embrulhados em papel alumínio e

deixados em temperatura ambiente por 24 horas. Após este período, foi realizada a leitura da absorvância da clorofila A (645 nm) e B (663 nm) em espectrofotômetro utilizando como branco DMSO. O teor de médio clorofila total (mg.L^{-1}) foi calculado de acordo com a equação abaixo (Arnon, 1949; Lichtenthaler e Buschmann, 2001).

$$\text{Clorofila total} = 20,2 \times \text{Abs A} + 8,02 \times \text{Abs B}$$

Onde: Abs A= absorvância da clorofila a; Abs B= absorvância da clorofila b

4.11.5 Análise Estatística

Para cada amostra avaliada, o delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos (controle água destilada, 250, 500 e 1000 mg L^{-1}) em quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade com auxílio do programa SISVAR (Ferreira, Souza e Faria, 2007). Os resultados foram expressos em relação ao controle negativo (branco) e mostrados em gráfico de barras. O valor "0" representa o controle. Qualquer valor positivo implica em estimulação dos parâmetros avaliados e os valores negativos inibição. As médias foram então submetidas à análise de variância (ANOVA) e comparadas entre si pelo teste de comparação de média Tukey 5% através do programa SISVAR.

4.12 ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA DOS DADOS

Para o processamento dos dados foi utilizado o software Statistica® 10.0 utilizando análise de PCA (Principal components analysis). Para todas as análises por PCA foi criada uma matriz de dados. Essa análise reduz a dimensionalidade de um conjunto de dados de forma que as informações relevantes fiquem condensadas nos primeiros componentes, desta forma, o primeiro componente principal (PC1) descreve uma maior variância em relação aos demais componentes (Daolio, 2006). O valor da variância está relacionado com a quantidade de informação referente aos dados originais.

Os espectros de RMN de ^1H foram avaliados no *software* Amix Statistics®, versão 3.9.12. A região espectral referente ao sinal da água (δ 4,6

a 5,1 ppm) foi removida, dessa forma, a variabilidade inerente a supressão pode ser eliminada, ou pelo menos minimizada. O próprio software desenvolve uma matriz para aplicação dos métodos multivariados.

5 RESULTADOS

5.1 ESTUDOS MORFOANATÔMICOS

5.1.1 Descrição macroscópica

D. sellowiana se caracteriza por apresentar aspecto arborescente, e o cáudice possui porte arborescente, ereto, de até aproximadamente 8 m de altura (figura 15, 16 A), envolvido por uma espessa bainha de raízes adventícias, ao longo de toda a sua extensão e que pode chegar a 1 m de diâmetro (Figura 16 F). As frondes podem chegar até 1,7 m de comprimento (Figura 16 A), com estípites característicos para indivíduos jovens, que possuem aspecto mais longos nos indivíduos jovens e sésseis nos adultos, com lâmina foliar descrita como bipinadopinatífidas a pinatissectas, com ápice agudo ou acuminado (Figura 16 B), conforme observado por Fernandes (2000).

A Raque em corte transversal, apresenta um sistema vascular côncavo, circundando toda a raque e assumindo o aspecto de ferradura (Figura 16 C). Apresenta báculas que se desenvolvem na região apical, quem podem medir até 15,5 cm (figura 16 D). Produz numerosos esporos marginais, que são envoltos por um indúcio semi-orbicular, de aspecto valvar, duro, extrorso e de margem introrsa, localizados na face abaxial das pínulas (figura 15 B, C, D, E). O indúcio possui uma epiderme levemente sinuosa, revestida por uma cutícula estriada (figura 15 E), e os esporos são cobertos por uma estrutura membranosa, de aspecto plissado (figura 15 F).

Os esporos são considerados heteropolares e apresentam 3 sulcos na região central, que se voltam para as margens, assumindo aspecto trilete. Estes são assimétricos e levemente truncados (Figura 15 F).

O cáudice é ereto, cilíndrico, envolvido e sustentado por uma massa de raízes adventícias, apresentando regiões sulcadas ao longo de todo o caule (Figura 16 G).

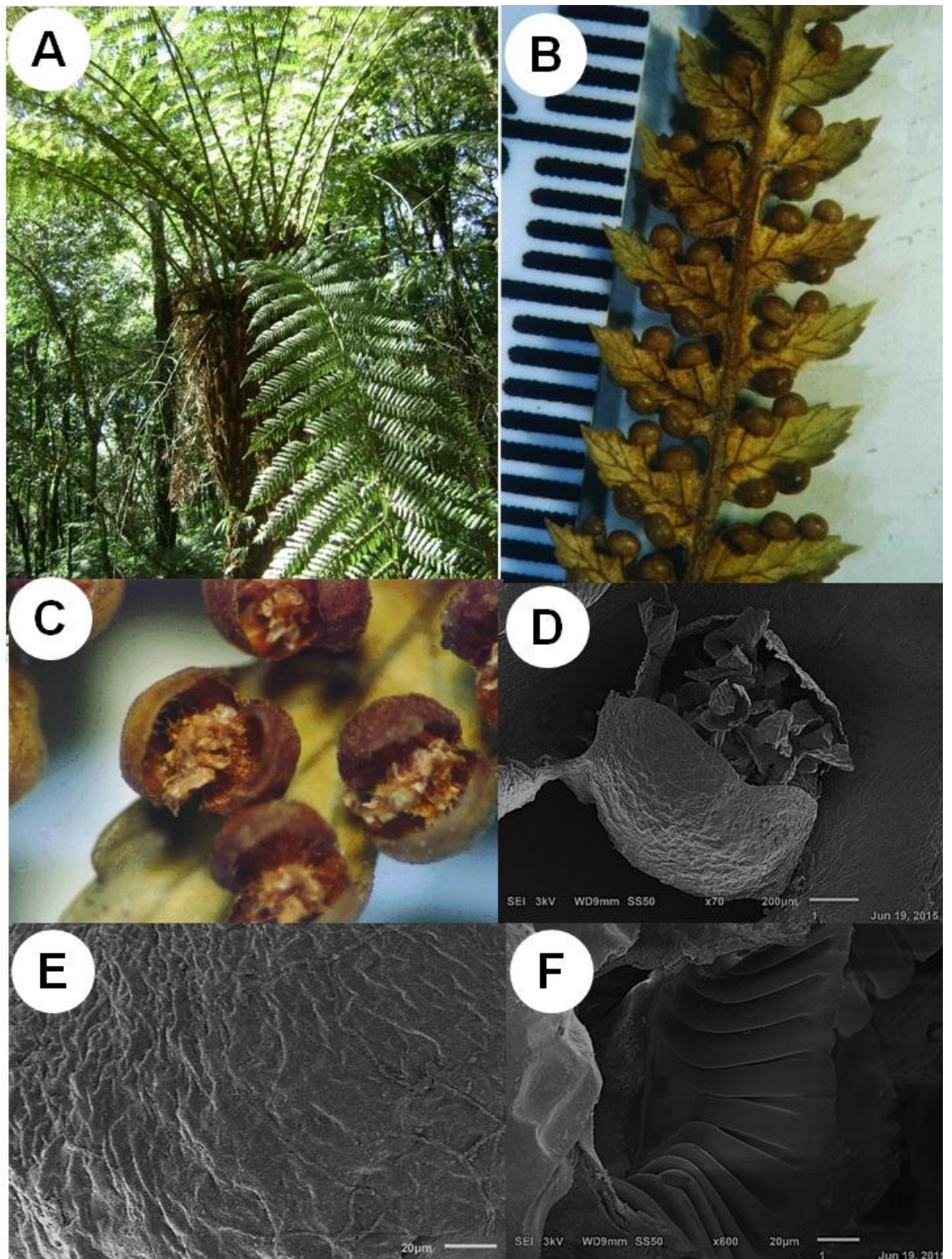


Figura 15 - A. Vista geral do aspecto arborescente de *D. sellowiana*; B. Aspecto dos esporos; C. Vista geral do Indúcio; D. Esporos revestidos por indúcio; E. Aspecto geral da epiderme do indúcio, mostrando a cutícula estriada; F. Aspecto da membrana que recobre os esporos

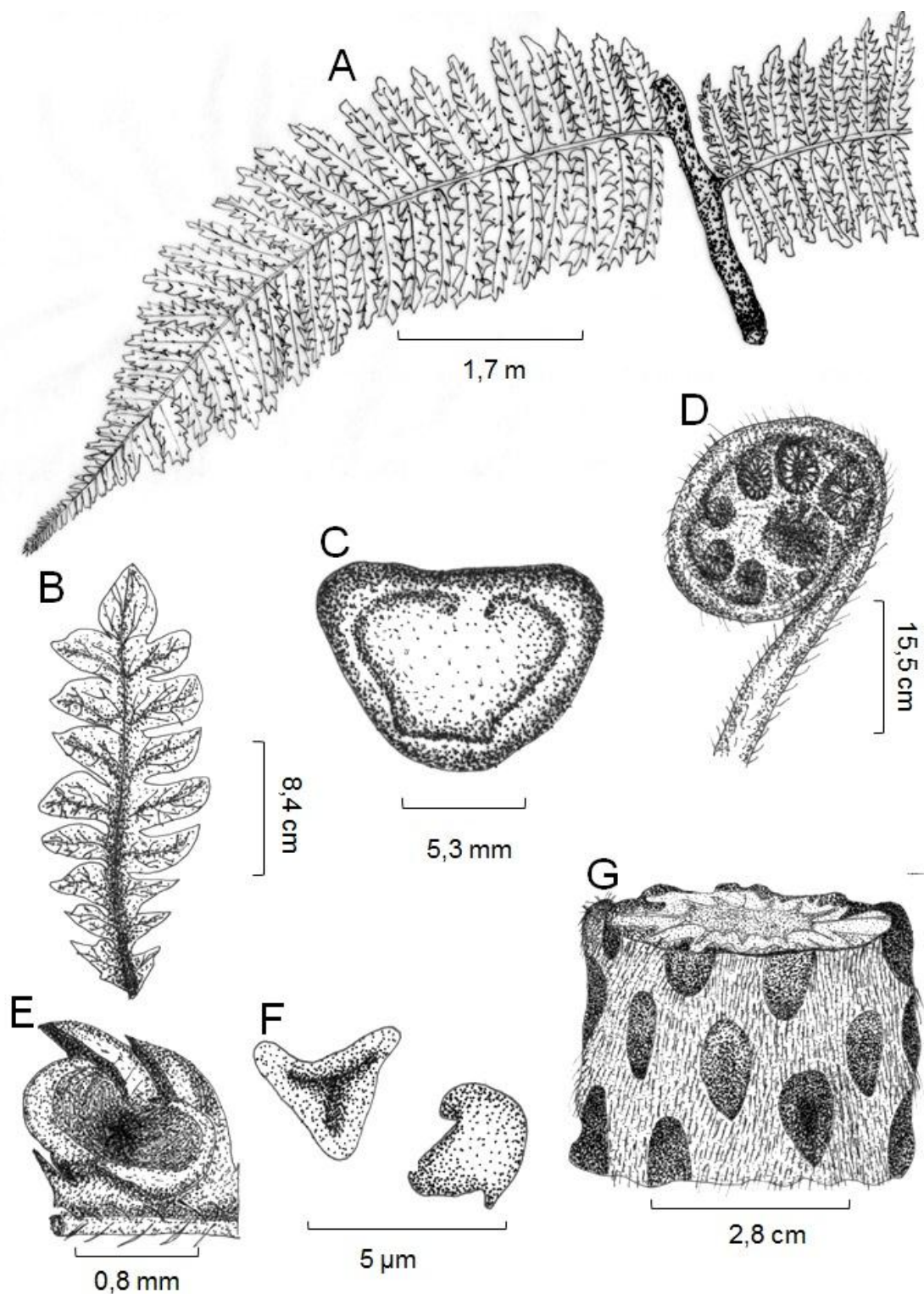


Figura 16 - A. Aspecto das frondes de *D. sellowiana*; B. Pinula; C. Aspecto da raque em secção transversal; D. Aspecto da báculo; E. Aspecto do indúcio; F. Aspecto dos esporos; G. Cáudice.

5.1.2 Descrição microscópica.

5.1.2.1 Pínula

As observações na pínula de *D. sellowiana* demonstram que em vista frontal, a lâmina foliar é anfiestomática e os estômatos são do tipo anomocítico (st) (figuras 17 A, B) e na face abaxial são visualizados tricomas tectores unisseriados e multicelulares com 0,2–11 mm de comprimento, com ponta arredondada e cutícula levemente estriada (figuras 17 E, F). A epiderme possui superfície sinuosa em ambas as faces e apresenta cutícula lisa (Figuras 17 A-D).

A pínula possui epiderme unisseriada e apresenta paredes espessadas e lignificadas ao longo da lâmina foliar com células maiores na face abaxial se comparadas com a face adaxial (figura 18 A). O meristelo da região mediana é do tipo anficrival, com 1-2 camadas de xilema (x), circundado por 2-3 camadas de floema (ph), e 4-6 camadas de colênquima (co) são observados, característica das pteridófitas. Também estão presentes 1-2 camadas de parênquima contendo idioblastos. Todo o meristelo é circundado por uma camada de células do periciclo e endoderme (Figura 18 B). A lâmina foliar possui meristelos de pequeno porte, contendo xilema circundado por 1-2 camadas de floema, com uma camada de endoderme (figura 18 B). Uma faixa de 3-4 camadas de colênquima predominantemente angular ocorre na face adaxial (figura 18 D), e na face abaxial, há 2-3 camadas de endoderme, seguidas por 4-6 camadas de parênquima de preenchimento contendo idioblastos (Figura 18 E).

Um parênquima clorofiliano tendendo ao paliçádico com 1-2 camadas é observado na face adaxial, seguido de 2 camadas de parênquima esponjoso na face abaxial. Os estômatos estão situados no mesmo nível das demais células da epiderme com as duas células-guarda, projetando-se sobre a superfície da folha (figura 18 F, G).

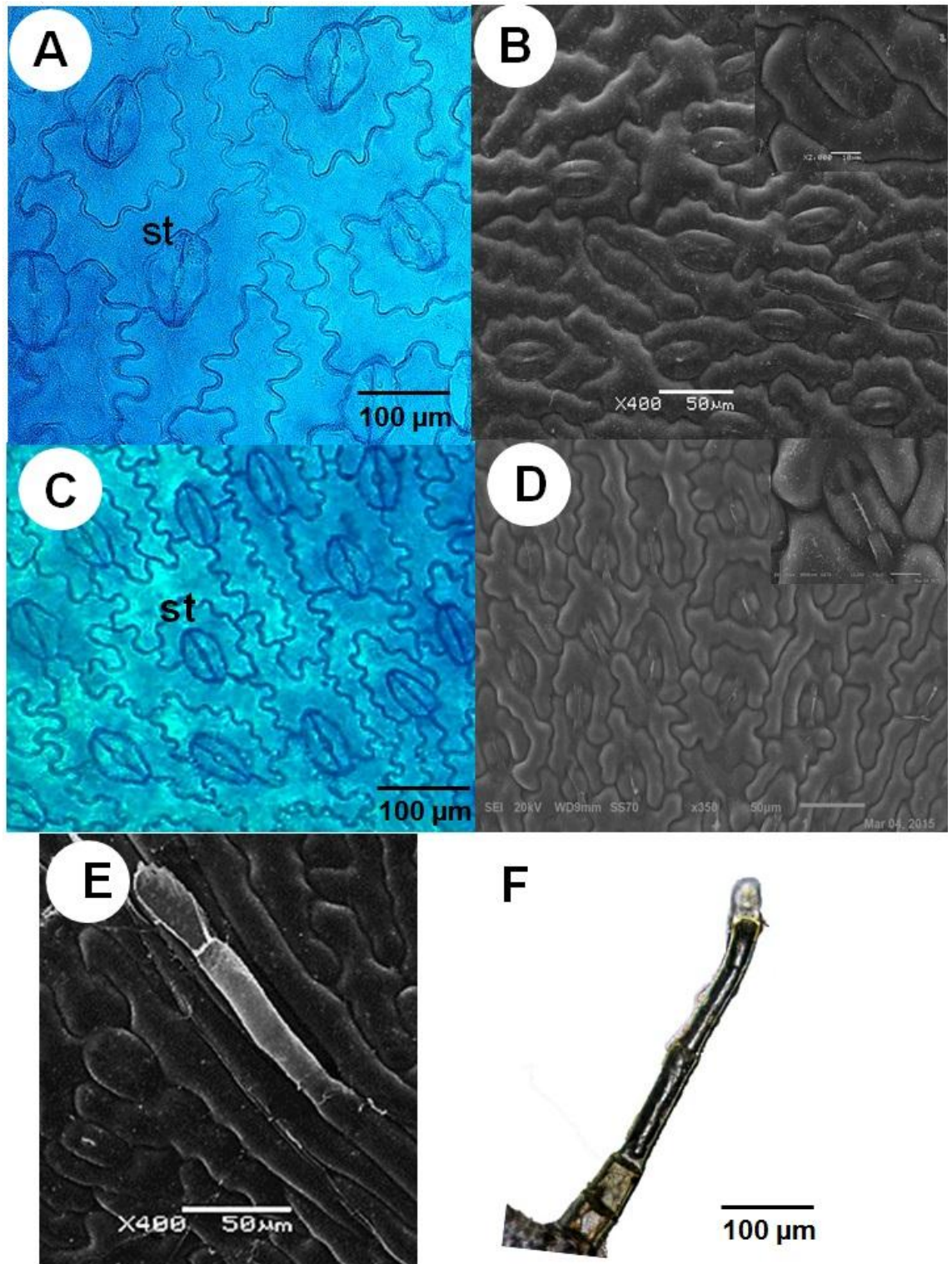


Figura 17 - A. Aspecto dos estômatos da face adaxial; B. Vista geral da epiderme da face adaxial; C. Aspecto dos estômatos na face abaxial; D. Aspecto geral da epiderme da face abaxial; E, F. Aspecto dos tricomas tectores.

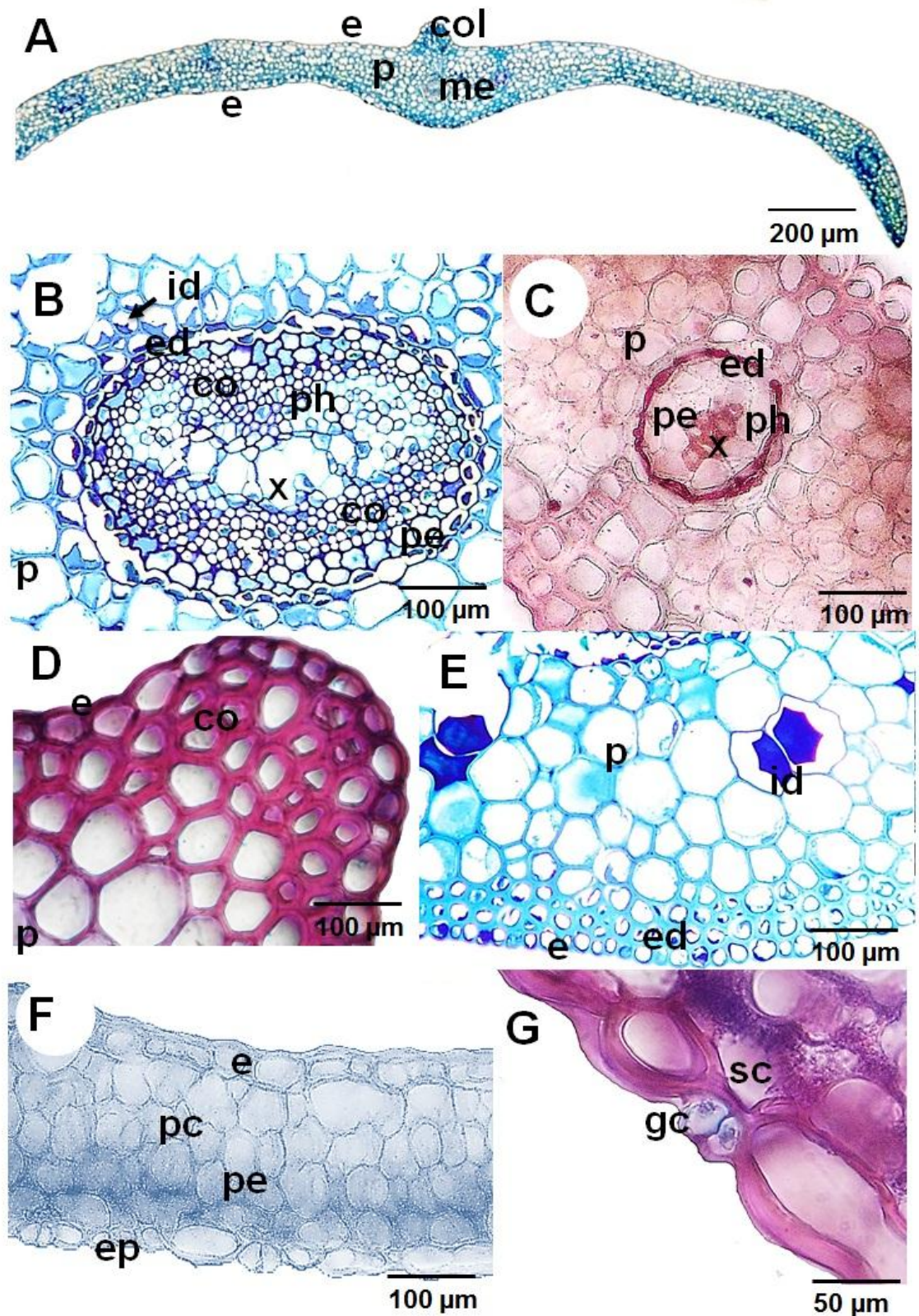


Figura 18 - A> vista geral da pínula; B. Aspecto geral do sistema vascular; C. Detalhe de um feixe vascular de pequeno porte; D. Aspecto do colênquima e epiderme da face abaxial; E. Aspecto do parênquima da

face adaxial contendo idioblastos; F. Vista geral do parênquima clorofiliano; G. Detalhe dos estômatos, demonstrando as células guarda e câmara subestomática.

O pecíolo, seccionado transversalmente, demonstra um contorno em arco e encurvado nas extremidades, com tricomas tectores, multicelulares com 0,2-0,14 mm de comprimento, de ápice arredondado (figuras 19 A-C). A epiderme de ambas as faces unisseriada, com células ovais e levemente ondulada (figuras 19 D, E). Na face adaxial, há uma camada de endoderme e colênquima anelar seguida de 8-10 camadas de parênquima (figura 19 D). Na face abaxial, abaixo da epiderme, há uma fileira de endoderme e 3 camadas de colênquima, seguidas de 4 camadas de parênquima de preenchimento (figura 19 F). O meristelo é anficrival e possui formato de ferradura, sendo constituído de xilema, e 1 a 2 camadas de floema. Ao redor da endoderme são observadas células lignificadas ao redor da endoderme, com 7 camadas de células lignificadas acima do meristelo, na região central da curvatura do meristelo (figura 19 G).

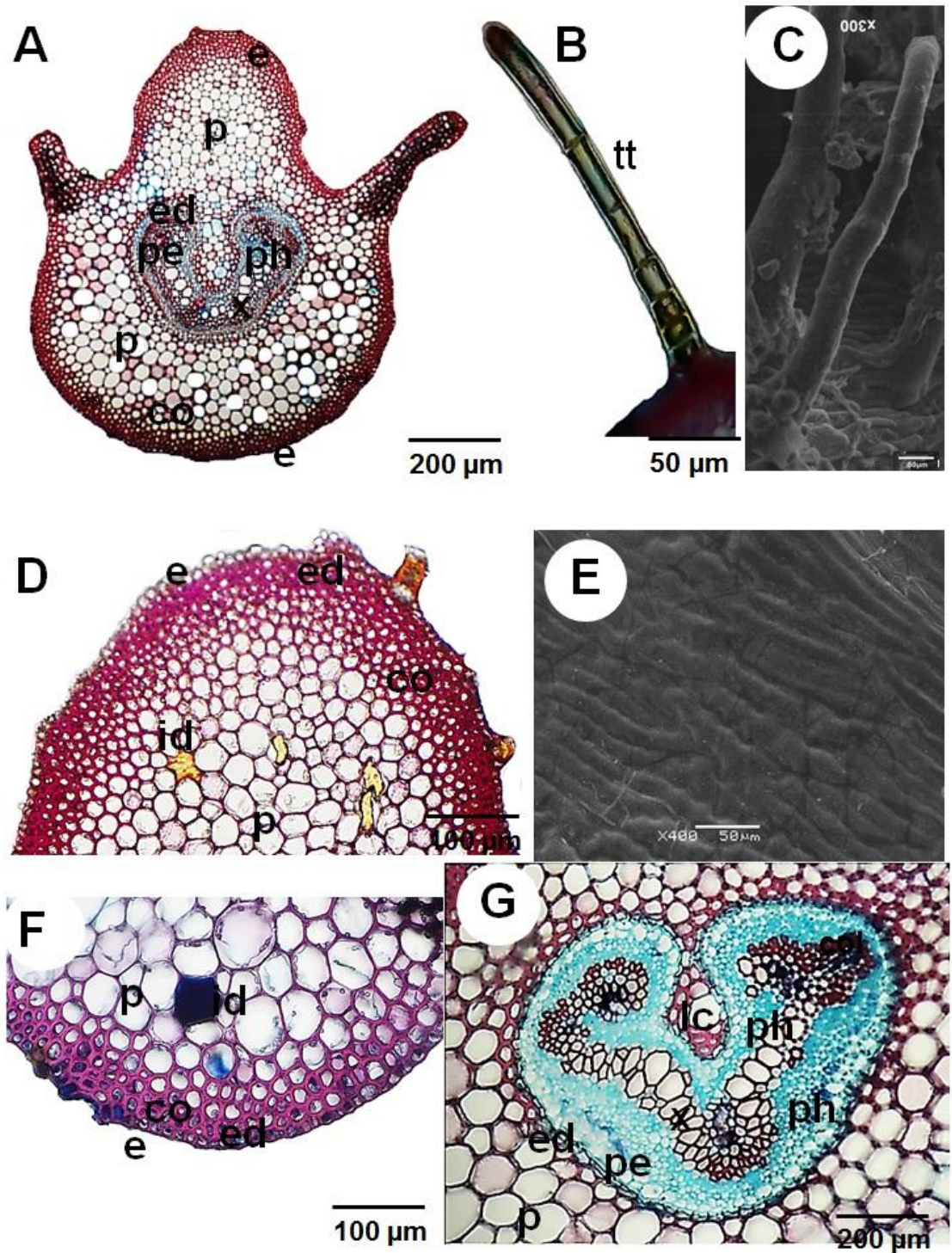


Figura 19 - A. Secção transversal do pecíolo; B. Tricoma tector; C. Detalhe do tricoma tector; D. Parênquima contendo idioblastos; E. Epiderme do pecíolo; F. Região do parênquima da face abaxial; G. Detalhe do feixe vascular.

5.1.2.2 Raque

A raque apresenta epiderme uniestratificada com células pequenas e arredondadas, seguidas de vários extratos de células colenquimáticas (figura 20 A e B). O parênquima de reserva, contém idioblastos com células similares à descrição das células do caule. A região vascular se dispõe de forma sinuosa ao longo de toda a raque e o xilema é envolto por células de floema, caracterizando o feixe como anficrival (figura 20 C e D). Uma fina camada de células da endoderme circunda ambas as faces do floema, arcos com 2-3 camadas de células de colênquima são visualizados (figura 20 C). A região central da raque é preenchida por parênquima com algumas células de metaxilema distribuídas por todo o parênquima (figuras 20 C, D). A região basal da raque, próxima ao caule possui pelos de cor castanho-escuro, unisseriados, medindo 5-10 mm (figura 20 E). Este possui epiderme estriada, sendo possível visualizar tricomas tectores unisseriados de ápice agudo (figuras 20 F).

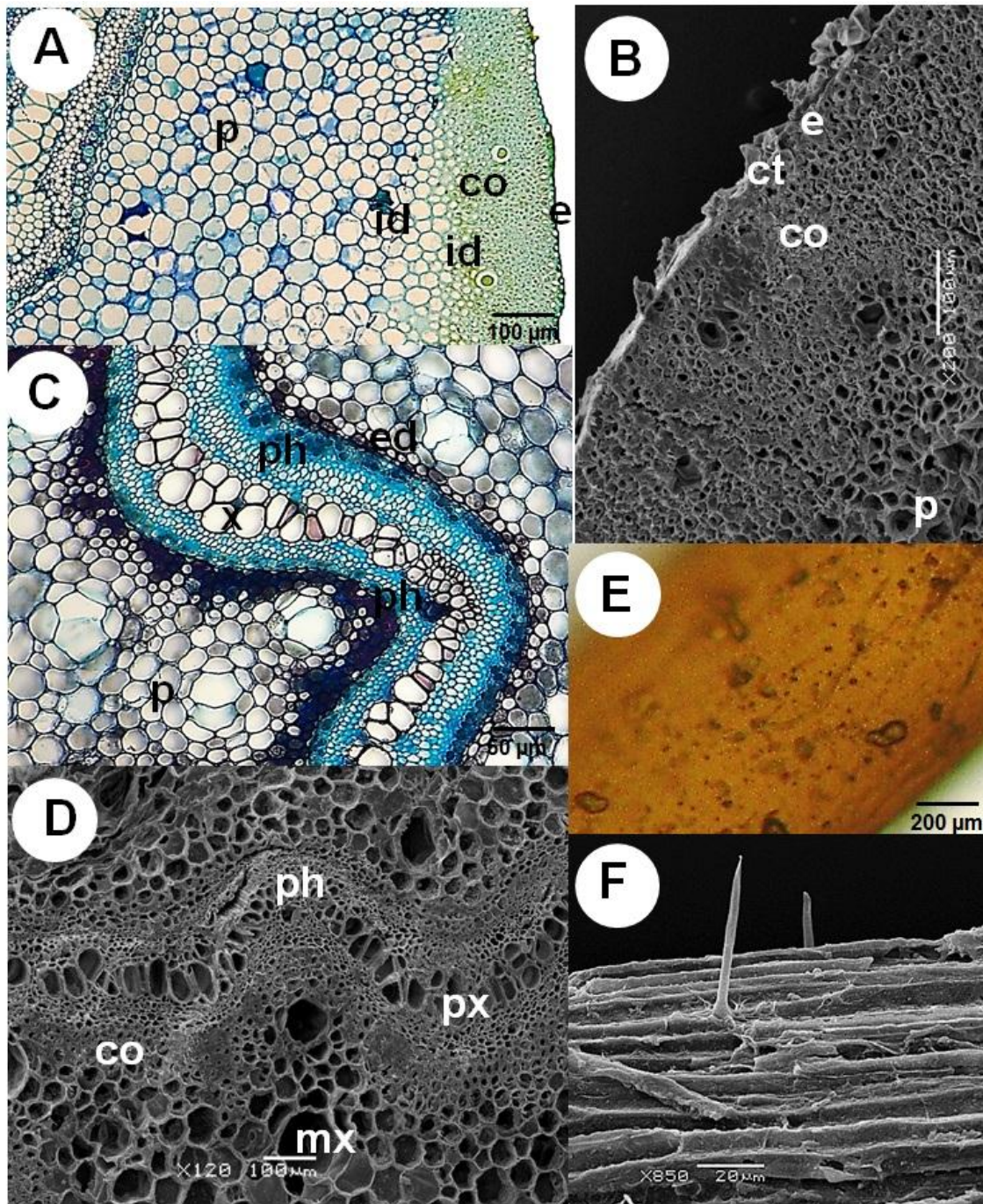


Figura 20 - A. Secção transversal da raque; B. Detalhe da cutícula e endoderme Da raque; C. Feixe vascular; D. Detalhe do floema e xilema com células cúbicas; E, F. detalhe ds pelos presentes na raque, com tricomas.

5.1.2.3 Cáudice

O cáudice possui faixas escuras de esclerênquima bem como, lacunas foliares, meristelo, pecíolo e uma medula central (figura 21 A). Se caracteriza por apresentar duas regiões distintas: uma mais periférica, contendo parênquima envolvendo grupos de esclerênquima associados ao sistema vascular, e região central com parênquima de reserva (Figuras 21 B, C). A região periférica possui células de esclerênquima e o parênquima é constituído de células poliédricas a levemente arredondadas, com espaços intercelulares, apresentando grande quantidade de amido (Figuras 21 B, C). Na região periférica mais interna, ocorre um sistema vascular bem característico, constituído por 3 camadas de células de floema que se intercalam com as primeiras camadas de xilema. No parênquima próximo ao sistema vascular, há presença de idioblastos com mucilagem (Figura 21 C).

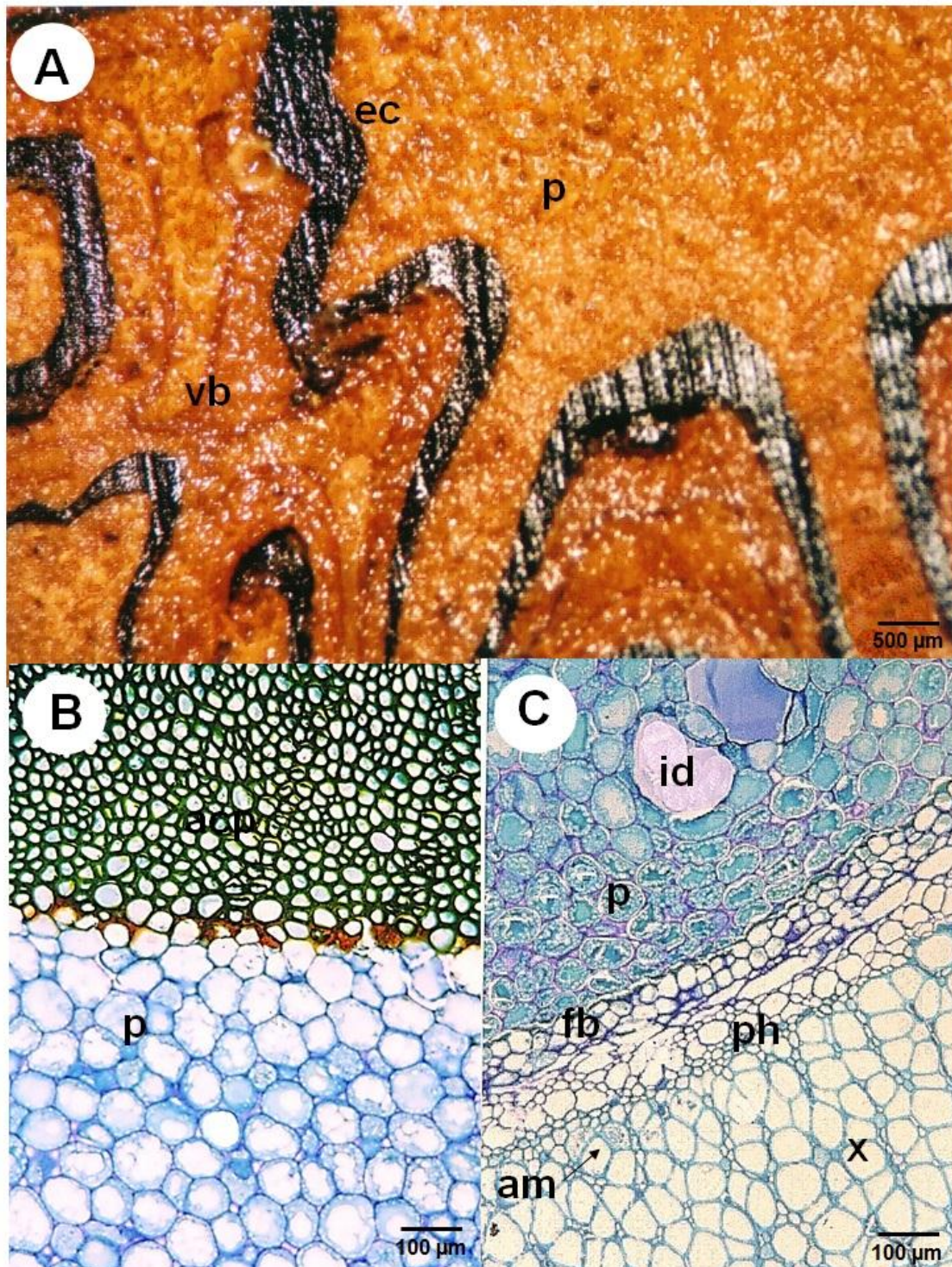


Figura 21 - A. aspecto do Cádudice em corte transversal; B. Aspecto do parênquima contendo amido; C. Aspecto do sistema vascular, contendo floema primário e secundário.

5.1.3 Testes histoquímicos

A presença de amido é observada no parênquima de preenchimento das folhas (figura 22 A), e com poucos grãos no parênquima do pecíolo (figura 23

A). Na raque, vários grãos de amido são observados, sendo esta parte morfológica mais rica em reservas, quando comparada às pinulas e pecíolo (figura 24 A).

Os idioplastos presentes no parênquima de preenchimento das folhas e pecíolo contêm substâncias fenólicas e flavonoides (figuras 22 B e C; 23 B e C).

No pecíolo, flavonoides também estão presentes nos tricomas tectores em cada série de células e ainda na região do parênquima esponjoso (figura 23 B). Na raque, substâncias fenólicas e flavonoides foram detectadas na região do colênquima, floema e xilema, que contêm pequenas células de armazenamento. Algumas células contendo flavonoides são vistas na região do parênquima medular (figura 24 B).

A presença de substâncias de caráter lipídico e terpenóides é observada nas células da endoderme, epiderme e cutícula da folha e pecíolo (figuras 22 D, E; 23 D, E). Na raque, substâncias de caráter lipídico estão em toda a epiderme, colênquima e nas fibras de colênquima próximas ao feixe vascular (figura 24 D). Os terpenóides estão presentes nas fibras de colênquima, xilema e próximas à endoderme (figura 24 F).

A presença de lignina foi confirmada nas células do xilema da raque e na região da epiderme e colênquima (figura 24 G e H). Polissacarídeos neutros são observados na região da epiderme, colênquima e meristelo, com maior intensidade no xilema, e algumas células do floema próximas ao periciclo da folha e pecíolo (figuras 22 G, H; 23 G). Na raque, polissacarídeos neutros são evidenciados na região central, presentes nas células de colênquima e xilema (figura 23 G, H). Uma atividade protéica é observada no colênquima, endoderme e epiderme da folha, na região do meristelo (figura 22 I), xilema, floema e endoderme da região do meristelo no pecíolo e da raque (figuras 23 H e 24 I).

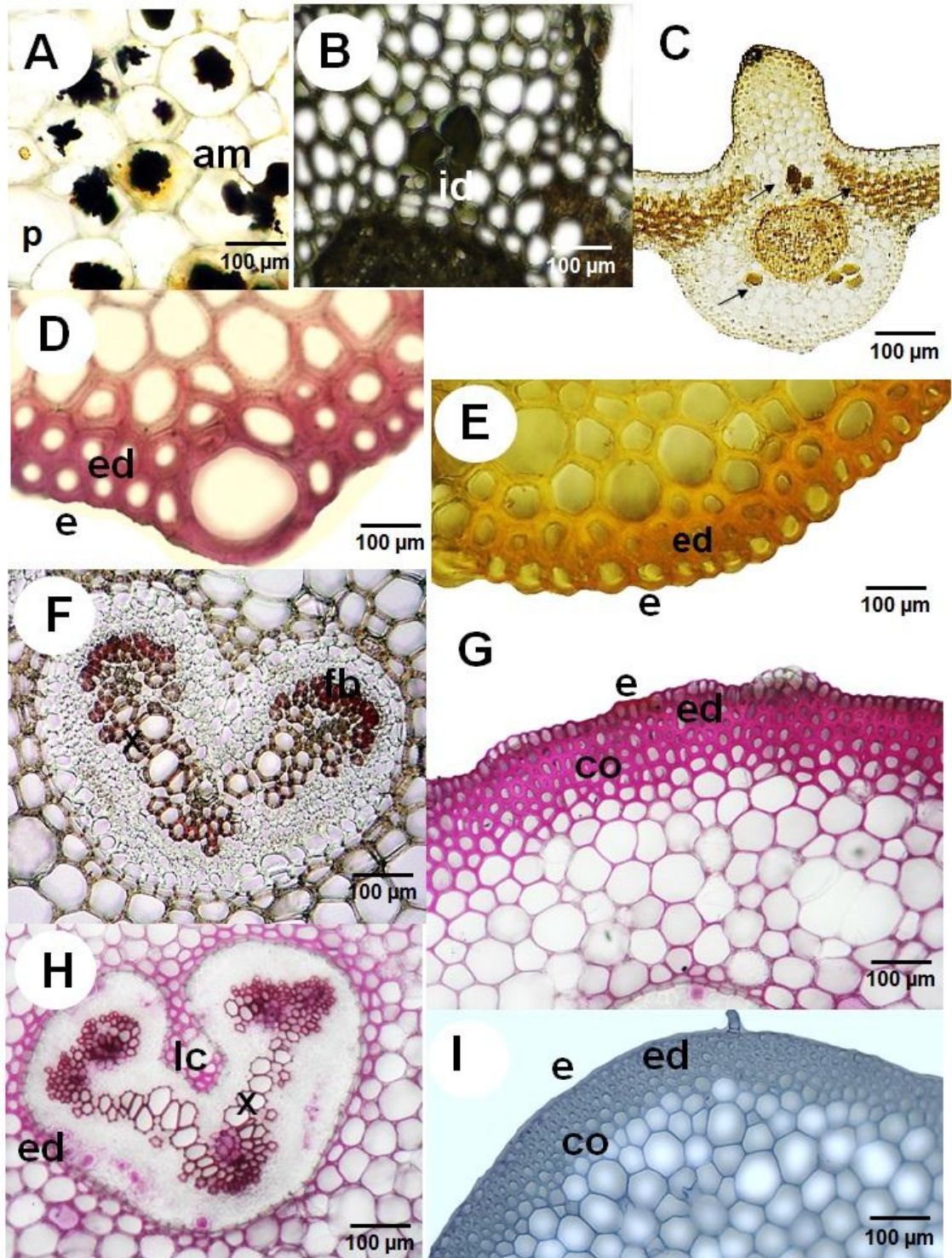


Figura 22 - Pínula. Testes histoquímicos demonstrando a presença de A. amido; B. Compostos fenólicos, C. Flavonoides, D. Lipídios, E. Terpenóides neutros; F. Lignina, G, H. Polissacarídeos neutros; I. Proteínas.

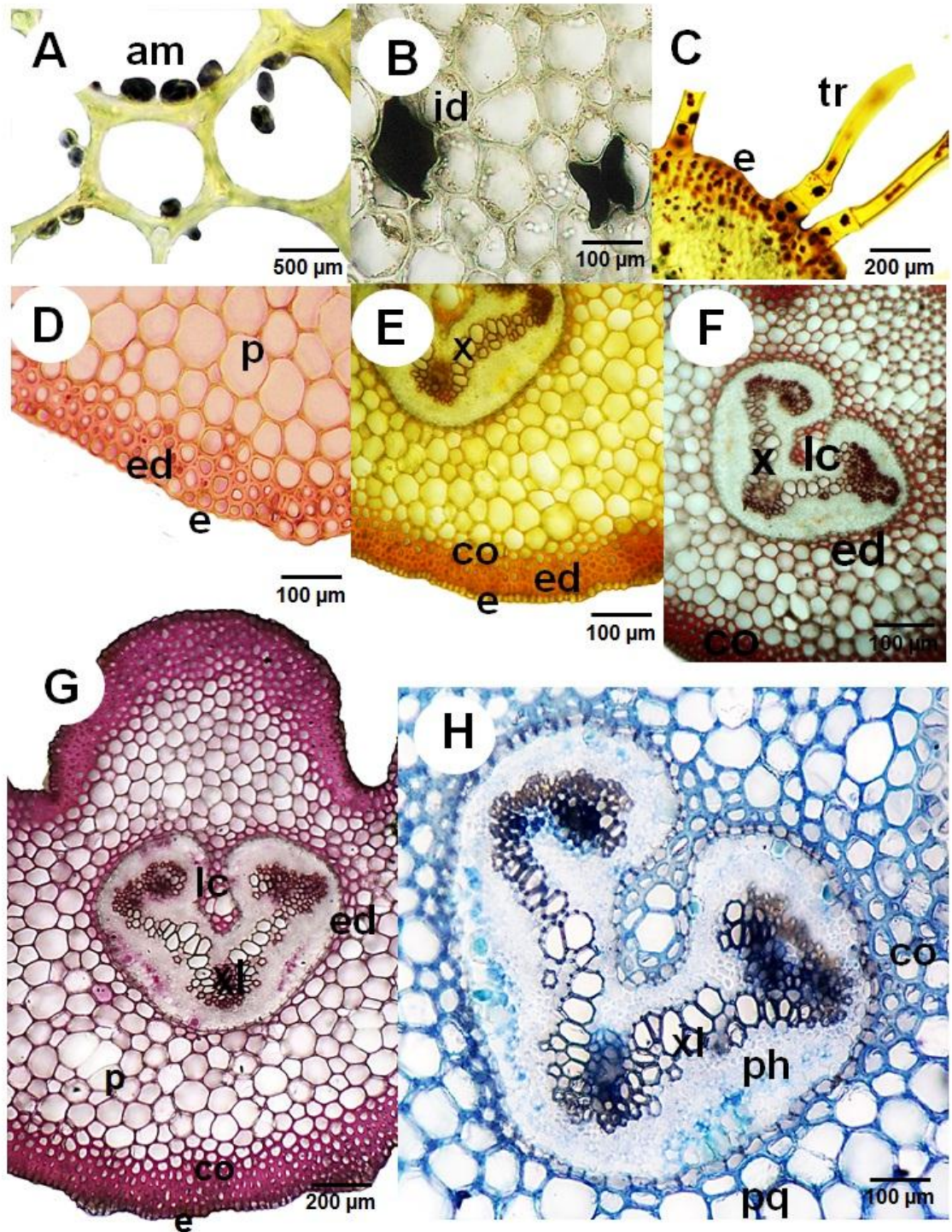


Figura 23 - Pecíolo. Testes histoquímicos demonstrando a presença de A. amido; B. Compostos fenólicos, C. Flavonoides, D. Lipídios, E. Terpenóides neutros; F. Lignina, G. Polissacarídeos neutros; H. Proteínas.

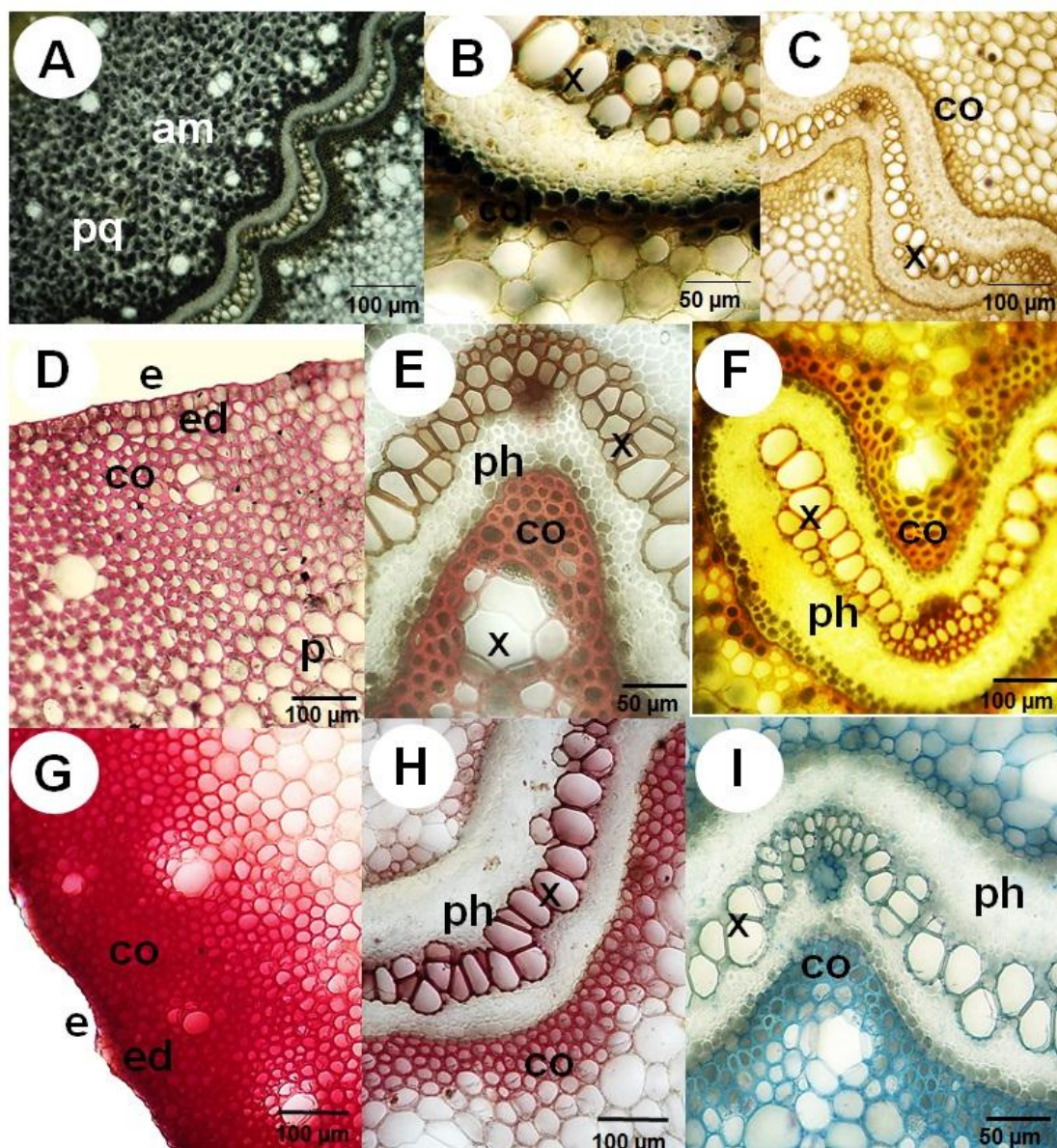


Figura 24 - Raque . Testes histoquímicos demonstrando a presença de A. amido; B. Compostos fenólicos, C. Flavonoides, D, E. Lipídios, F. Terpenóides neutros; G. Lignina, H. .Polissacarídeos neutros; I. Proteínas.

5.1.4 Discussão

A descrição morfológica de *D. sellowiana* agregada à ilustração botânica apresentada neste estudo auxiliam na identificação, uma vez que esta espécie é muito semelhante a outros representantes do gênero. *D. sellowiana* pode ser distinguida de outras espécies relacionadas pelos seguintes caracteres morfológicos: Presença de soros marginais, folhas opostas, e esporos assimétricos.

Outros trabalhos que caracterizem o aspecto morfológico não são recentes (Chandra, 1970; Croft, 1986) e descrevem o gênero por possuir porte arbóreo-arbustivo (fetos arborescentes), cáudice, engrossado pela densa trama de raízes adventícias e frondes muitas vezes maiores que um metro de comprimento, além de possuírem indumento dourado na base dos pecíolos, considerado característico da espécie (Gasper, 2013), sendo estas características comumente utilizadas para identificação do gênero.

Assim, a descrição da presença de tricomas peltados na face abaxial, lâmina foliar anfiestomática e estômatos do tipo anomocítico são características morfológicas que podem ser utilizadas para caracterizar *D. sellowiana*. Outras características como a presença de um meristelo altamente ondulado e acompanhado por camadas de células esclerótidas que formam um tecido em ambos os lados que seguem as ondulações e têm uma função de reforço são descritos para o gênero. Além disso, a presença de células cúbicas associadas ao xilema e estas acompanham massas de células escleróticas (Tryon e Tryon, 1982). Todas estas características conferem sustentação à esta espécie.

Os testes microquímicos indicaram a presença de várias classes metabólicas, sendo dada especial atenção aos compostos fenólicos, em especial aos flavonoides e terpenos presentes nas pinas e raque. Portanto, *D. sellowiana* é uma nova fonte de compostos com propriedades biológicas importantes, existindo relatos do uso desta espécie na medicina tradicional.

5.2 CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICO DO MATERIAL VEGETAL

5.2.1 Material Vegetal

O material vegetal utilizado nos experimentos químicos e biológicos está descrito na metodologia no item 4.1 sob o título Material Botânico.

5.2.2 Parâmetros Físicos do Material Vegetal

A distribuição granulométrica da moagem em moinho de facas e martelo foi determinada com o objetivo de conhecer a capacidade física das frondes na etapa de granulação para futuras preparações de extratos vegetais. Os resultados permitiram classificar o pó de *Dicksonia sellowiana* como um pó semelhante ao considerado pó grosso, que é aquele cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 1,70 mm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 355 μ m (Anvisa, 2010).

Os resultados de densidade aparente e por compactação do pó grosso de xaxim foi realizada em triplicata e forneceu valores semelhantes que atribuíram o resultado médio de 0,18g/mL ($\pm 0,016$). O pó de *Dicksonia sellowiana* possui uma menor densidade comparada com outros pós, por ser considerado um pó grosso e possuir espaços entre as partículas (Solon, 2009).

A determinação da perda por secagem impede que o material permaneça úmido devido a uma secagem ineficiente ou que haja degradação de compostos por secagem excessiva (Maciel *et al.*, 2002). A finalidade da secagem é impedir reações de hidrólise e contaminação microbiana, além de reduzir volume e peso facilitando a moagem do material (Lacerda, Freitas e Da Silva, 2009). A perda por dessecação das frondes de *Dicksonia sellowiana* apresentou um teor de umidade abaixo de 14% que é o limite máximo recomendado para drogas vegetais.

A determinação de teor de cinzas permite a verificação de impurezas inorgânicas não-voláteis na droga vegetal como metais pesados, areia ou pedra, e é importante esta determinação para o controle de qualidade da droga vegetal (De Souza Araújo *et al.*, 2006). Os valores encontrados nesta análise

encontram-se dentro dos limites preconizados pela farmacopeia (Anvisa, 2010). O quadro 5 demonstra todos os valores obtidos como parâmetros físicos das frondes de *Dicksonia sellowiana*.

Quadro 5 - Parâmetros Físicos das frondes de *Dicksonia sellowiana*

Parâmetros de Qualidade	Resultados obtidos (média ± DP)
Perda por dessecação em estufa	87,89% ± 0,4683
Teor de cinzas totais	5,47% ± 0,1933
Teor de cinzas insolúveis em ácido	0,09 % ± 0,112

Em 1998, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reuniu procedimentos no documento “*Quality control methods for medicinal plant materials*”, que podem ser tomados como base para que auxiliem as nações, a partir de sua legislação, a formar padrões de controle de qualidade de drogas vegetais e produtos (Souza-Moreira, Salgado e Pietro, 2010). A partir desta data, 3 legislações referentes a controle de qualidade e produção de medicamentos fitoterápicos foram elaboradas. A legislação atual é a RDC 26 de 13 de maio de 2014, dispendo sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos (De Abreu e De Moura, 2014), Estes ensaios de determinação do teor de umidade e teor de cinzas fazem parte do controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos.

5.2.3 PESQUISAS DE GRUPOS FITOQUÍMICOS

5.2.3.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA CLÁSSICA

Esta análise é fundamental como um guia para o isolamento de substâncias (Moreira, E. A., 1979). Algumas classes de substâncias podem ser caracterizadas diretamente em tecidos vegetais através de ensaios microquímicos, porém, na maioria das vezes é necessário realizar a extração de um determinado grupo de compostos com solvente adequado, e então caracterizá-lo. Geralmente essa caracterização é realizada pelo emprego de reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitação (Moreira, E., 1979; Moreira, E. A., 1979; Simoes, 2001). O quadro

6 e 7 representam qualitativamente os resultados obtidos no extrato aquoso e hidroalcoólico.

Na análise fitoquímica do extrato aquoso, foi verificada a presença de taninos hidrolisáveis (reação azul) e taninos condensados devido à cor verde obtida no resíduo do papel de filtro. Verificou-se também a presença dos aminogrupos, devido à coloração violácea. Heterosídeos antociânicos, saponinas, heterosídeos cianogénéticos, ácidos voláteis, ácidos fixos não foram encontrados.

Quadro 6 - Análise Fitoquímica do Extrato Aquoso de *Dicksonia sellowiana*

Análises	Extrato Aquoso
Taninos Hidrolisáveis	+
Taninos Condensados	+
Aminogrupos	+

Nota: + = positivo

Como pode ser observado nos dados do quadro 7, a análise fitoquímica do extrato hidroalcoólico a 20%, a indicação positiva da presença de leucoantocianidas e de flavonoides, no teste de oxálico bórico com presença de fluorescência, indica reação positiva especialmente para flavonóis, pois as flavanonas e isoflavonas não possuem esta propriedade e os derivados antociânicos coram-se, mas não produzem fluorescência.

Para esteróides e triterpenos a reação de Libermann Bouchard indicou a presença de triterpenos nas frações hexano e clorofórmio. A coloração esverdeada nesta reação indica função hidroxila em 3 e dupla ligação entre 5 e 6 ou 7 e 8 no anel aromático. Na reação de Keller-Kelliani as frações hexano e clorofórmio obtiveram resultado positivo com coloração verde indicando a presença de esteroides / triterpenos.

Não houve reação positiva para os grupos alcaloides, antraquinonas e cumarinas. Os resultados positivos podem ser analisados no quadro 7.

Quadro 7 - Análise Fitoquímica do Extrato Hidroalcoólico de *Dicksonia sellowiana*.

Grupos Fitoquímicos	Análises	Fração Hexano	Fração Clorofórmio	Fração Acetato de Etila	Extrato Hidroalcoólico
Flavonoides	Leucoantocianidinas	-	-	+	+
	Oxálico bórico	-	-	+	+
Esteróides / Triterpenos	Reação Liberman-Bouchard	Verde	Verde	-	-
	Reação Kelliani	Verde	Verde	-	-

Nota: + = positivo e - = negativo

Os ensaios fitoquímicos preliminares foram realizados com o objetivo de servirem de guia para o isolamento de substâncias e demais testes biológicos a serem realizados. A partir destes ensaios foi possível estabelecer estratégias para a realização de ensaios antioxidantes e atividades farmacológicas levando em consideração a ação biológica dos polifenóis.

5.2.3.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA POR CCD

A técnica por CCD é utilizada na identificação de grupos de metabólitos secundários em extratos vegetais, através de reveladores específicos para cada grupo de metabólito onde este apresentará uma mudança de coloração através da reação entre a substância e a solução reagente em iluminação ambiente ou em ultravioleta, auxiliando na identificação específica destes grupos de metabólitos (Costa, 2001)

Através desta análise pode-se estabelecer os metabólitos secundários presentes nas frações do extrato obtido em Soxhlet da espécie *Dicksonia sellowiana*. Foram encontrados na espécie flavonoides, taninos, esteróides, triterpenos e cumarinas, esses compostos estão presentes nas frondes de xaxim conforme está apresentado no quadro 8.

Quadro 8 - Análise fitoquímica por CCD do extrato bruto e frações de *Dicksonia sellowiana*

Extrato e Frações	Flavonoides	Taninos	Esteroides e Triterpenos	Alcaloides	Cumarinas
Extrato Bruto	+	+	+	-	-
Hexano	-	-	+	-	-
Clorofórmio	+	+	+	-	+
Acetato de Etila	+	+	-	-	-
Remanescente	+	+	-	-	-

Nota: + = positivo e - = negativo

Extratos brutos obtidos através de matéria-prima vegetal são preparações complexas derivadas do metabolismo primário e secundário. As técnicas cromatográficas são essenciais na separação dos constituintes químicos de extratos vegetais, podendo ser empregadas na separação dos constituintes químicos e na identificação de grupos de metabólitos secundários. Neste sentido, o screening fitoquímico por CCD é de fundamental importância no conhecimento dos grupos químicos pertencentes no extrato e na separação destes constituintes. Os resultados obtidos por esta técnica corroboram com os obtidos no item 5.2.3.1 na análise clássica fitoquímica, diferenciando apenas no resultado para cumarinas que foi positivo na técnica por CCD na fração clorofórmio.

5.3 ATIVIDADE ALELOPÁTICA

Citado pela primeira vez pelo alemão Hans Molish em 1937, o termo alelopatia é utilizado para indicar qualquer efeito causado por um ser vivo de forma benéfica ou prejudicial sobre outro, por meio da liberação de substâncias químicas e/ou produtos do metabolismo secundários por ele elaborados (Centenaro *et al.*, 2009). Este efeito benéfico ou prejudicial se dá por um tipo de interação bioquímica entre vegetais, considerada uma forma de adaptação química defensiva das plantas, além de ser um fator de estresse ambiental para muitas espécies (Maraschin-Silva e Aquila, 2006; Paula *et al.*, 2014).

As avaliações dos efeitos alelopáticos dos extratos e frações foram realizadas frente à germinação de sementes bem como no crescimento, respiração das raízes e o teor de fotossíntese. Os bioensaios de germinação de sementes foram monitorados por um período de 7 dias, com duas contagens diárias e eliminação das sementes germinadas. Foram consideradas sementes germinadas aquelas que apresentavam extensão radicular e esse bioensaio foi desenvolvido em condições de 25°C de temperatura constante e fotoperíodo de 12 h. Cada placa de Petri recebeu 50 sementes de *Lactuca sativa*, nas concentrações adotadas.

5.3.1 GERMINAÇÃO

No índice de velocidade de germinação (IVG) apenas o extrato bruto influenciou no desenvolvimento das sementes de *L. sativa*, diferenciando estatisticamente do controle. A concentração 1000 µg.mL⁻¹ desse extrato influenciou negativamente a germinação das sementes. O resultado do ensaio pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1 - Índice de velocidade de germinação de *L. sativa* submetidas ao extrato bruto etanólico e frações de *Dicksonia sellowiana* em ensaio alelopático

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA (µg/mL)	IVG (ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO)	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE SCOTT KNOTT*	
EXTRATO BRUTO	250	47.348	a1	a2
	500	45.696		a2
	1000	35.541		
F. HEXANO	250	45.917		a2
	500	48.875		a2
	1000	45.771		a2
F. CLOROFÓRMIO	250	47.500		a2
	500	48.967		a2
	1000	43.966		a2
F. ACETATO DE ETILA	250	48.683		a2
	500	48.592		a2
	1000	48.667		a2
F. RESIDUAL	250	49.000		a2
	500	48.708		a2
	1000	45.542		a2
CONTROLE	-	45.196		a2

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

FONTE: O autor (2015)

No Gráfico 1 estão representados os valores do ensaio de germinação através do número de sementes germinadas.

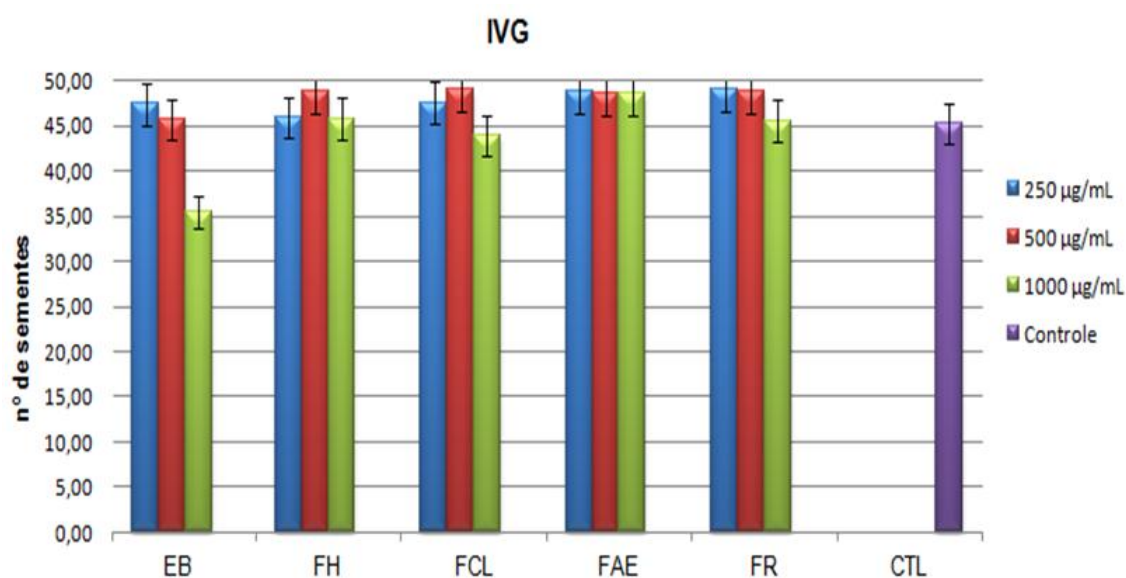


Gráfico 1 - Índice de velocidade de germinação (ivg) das sementes de *L. sativa* testadas com os extratos brutos e frações de *Dicksonia sellowiana*

NOTA: (1) EB 1 (Extrato Bruto 1); EB 2 (Extrato Bruto 2); FH (Fração Hexano); FCL (Fração Clorofórmio); FAE (Fração Acetato de Etila) E FR (Fração Residual) e CTL (Controle).

(2) ESTATÍSTICA REALIZADA PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT ($p < 0,05$)

FONTE: O autor (2015)

5.3.2 Fotossíntese

O conteúdo de clorofila nas folhas frequentemente é utilizado para estimar o potencial fotossintético das plantas, pela sua ligação direta com a absorção e transferência de energia luminosa. Uma planta com alta concentração de clorofila é capaz de atingir taxas fotossintéticas maiores (Rêgo e Possamai, 2004), conseqüentemente, o crescimento e adaptabilidade a diversos ambientes. Por outra perspectiva, uma redução no teor de clorofila promove uma redução nas taxas fotossintéticas.

A fotossíntese é o processo físico-químico de base para o crescimento das plantas, sendo fortemente influenciada por fatores ambientais e também por aleloquímicos (Reigosa, Sánchez-Moreiras e González, 1999). Algumas classes de aleloquímicos interferem na fotossíntese por induzir mudanças no conteúdo de clorofila das plantas, um exemplo são os ácidos fenólicos, às cumarinas, os polifenóis e flavonoides como os principais aleloquímicos responsáveis pela inibição da fotossíntese, alterando o transporte de elétrons e a fosforilação nos fotossistemas (Rizvi *et al.*, 1992).

No ensaio de fotossíntese nenhum valor de clorofila total foi estatisticamente diferente ao do controle. Dessa forma, todas as frações e o extrato bruto nas três concentrações estudadas não alteraram o padrão de fotossíntese das sementes de *L. sativa*. Os valores do ensaio estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 - Ensaio de fotossíntese das plântulas de *L. sativa* submetidas ao extrato bruto etanólico e frações de *Dicksonia sellowiana*

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA (µg/mL)	CLOROFILA TOTAL	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE SCOTT KNOTT*
EXTRATO BRUTO	250	8,893	a1
	500	8,493	a1
	1000	8.490	a1
F. HEXANO	250	8,390	a1
	500	8,497	a1
	1000	8,157	a1
F. CLOROFÓRMIO	250	8,207	a1
	500	9,530	a1
	1000	9,233	a1
F. ACETATO DE ETILA	250	9,593	a1
	500	9,507	a1
	1000	8,013	a1
F. RESIDUAL	250	7,963	a1
	500	8,310	a1
	1000	9,437	a1
CONTROLE	-	9,330	a1

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

Clorofila total: (absorbância da clorofila **a** x 20,2) + (absorbância da clorofila **b** x 8,02)

FONTE: O autor (2015)

O Gráfico 2 apresenta os resultados obtidos no ensaio de fotossíntese através do resultado de clorofila total.

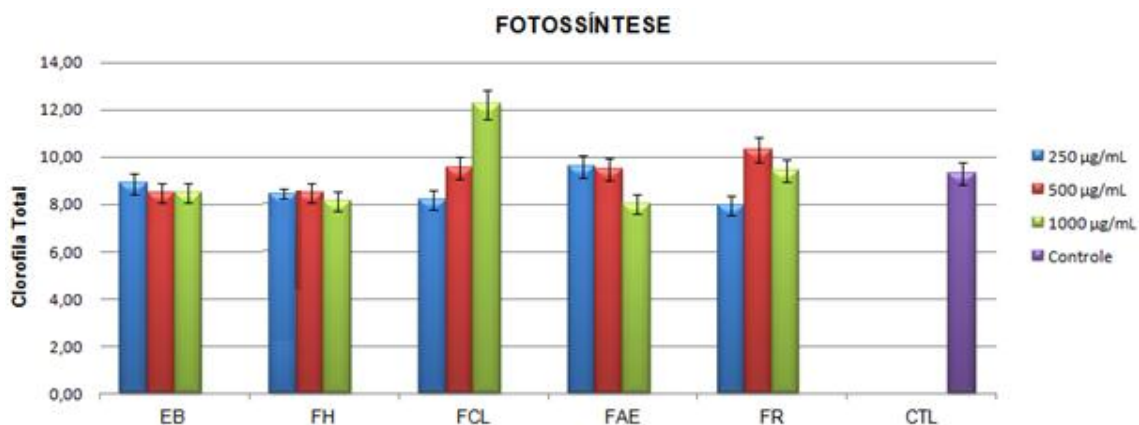


Gráfico 2 - Comparação da fotossíntese total das plântulas das sementes *L. sativa* testadas com o extrato bruto e frações de *Dicksonia sellowiana* comparadas ao controle água

NOTA: (1) EB (Extrato Bruto); FH (Fração Hexano); FCL (Fração Clorofórmio); FAE (Fração Acetato de Etila) E FR (Fração Residual) e CTL (Controle).

(2) ESTATÍSTICA REALIZADA PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT ($p < 0,05$)

FONTE: O autor (2013)

5.3.3 Respiração das raízes

Alguns autores relatam que os efeitos aleloquímicos sobre a germinação das sementes podem estar relacionados com alterações na respiração (Paula *et al.*, 2014). No ensaio de respiração radicular nenhuma fração e o extrato bruto influenciaram na respiração das raízes de *L. Sativa*, pois os valores das absorvâncias não diferenciaram estatisticamente da absorvância do controle. Dessa forma, todas as frações e o extrato bruto nas três concentrações estudadas não alteraram o padrão de respiração dessas sementes. Os valores do ensaio estão representados na Tabela 3

Tabela 3 - Ensaio de respiração das raízes de *L. sativa* submetidas ao extrato bruto etanólico e frações de *Dicksonia sellowiana*

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA (µg/mL)	ABSORBÂNCIA (530 nm)	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE SCOTT KNOTT*
EXTRATO BRUTO	250	0.191	a1
	500	0.181	a1
	1000	0.133	a1
F. HEXANO	250	0.277	a1
	500	0.268	a1
	1000	0.205	a1
F. CLOROFÓRMIO	250	0.243	a1
	500	0.217	a1
	1000	0.180	a1
F. ACETATO DE ETILA	250	0.271	a1
	500	0.234	a1
	1000	0.265	a1
F. RESIDUAL	250	0.190	a1
	500	0.202	a1
	1000	0.191	a1
CONTROLE	-	0.234	a1

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

FONTE: O autor (2015)

No Gráfico 3 pode-se observar o resultado dos valores das absorvâncias para a respiração das raízes.

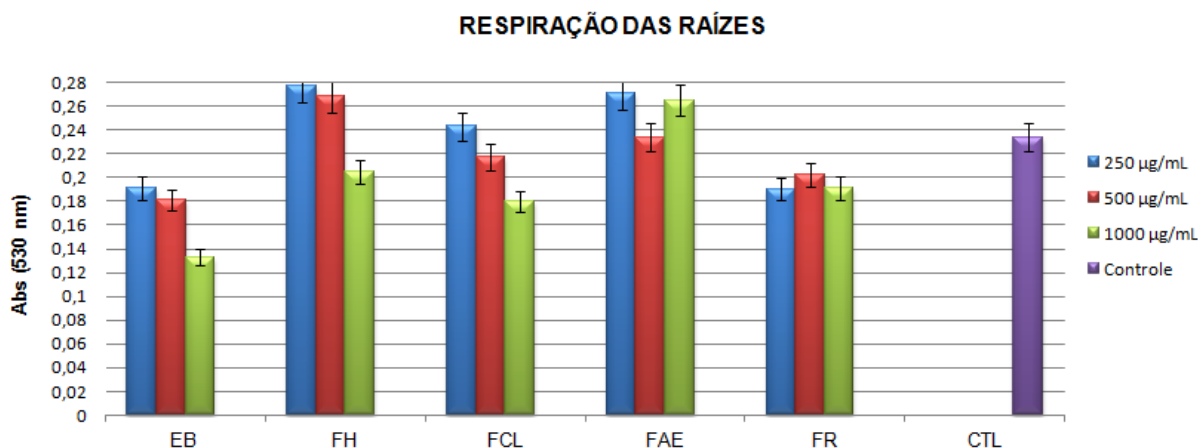


Gráfico 3 - Comparação das absorvâncias do ensaio de respiração das raízes das sementes *L. sativa* testadas com o extrato bruto e frações de *Dicksonia sellowiana*

NOTA: (1) EB (Extrato Bruto); FH (Fração Hexano); FCL (Fração Clorofórmio); FAE (Fração Acetato de Etila) E FR (Fração Residual) e CTL (Controle).

(2) ESTATÍSTICA REALIZADA PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT ($p < 0,05$)

FONTE: O autor (2015)

A germinação e o crescimento são alterados pelos aleloquímicos, mas eles também alteram a assimilação de nutrientes, a síntese de proteínas, a respiração, a fotossíntese, as atividades enzimáticas e a permeabilidade da membrana (Rice, 1984a).

5.3.4 Discussão

As substâncias aleloquímicas são liberadas pelas plantas através de lixiviação, exsudação radicular, volatilização, decomposição de seus resíduos ou outros processos, tanto em sistemas naturais quanto agrícolas (Souza Filho, Guilhon e Santos, 2010), causando diversos efeitos diretos e indiretos sobre outras plantas. Os efeitos indiretos compreendem alterações nas propriedades e características nutricionais do solo e, também, nas populações bem como nas atividades de microrganismos, nematoides e insetos. Já os efeitos diretos incluem alterações no crescimento e metabolismo vegetal (Rizvi *et al.*, 1992), englobando alterações em níveis celular, fitormonal, fotossintético e respiratório, bem como absorção de nutrientes e nas relações hídricas (Rice, 1984b; Rizvi *et al.*, 1992). Neste contexto, destaca-se a competição por elementos nutritivos, água e raios solares, causado pelas plantas daninhas em

áreas de cultivo comercial, afetando o desenvolvimento e reduzindo a produtividade e qualidade da cultura invadida (Tokura e Nóbrega, 2006).

Nos ensaios realizados na atividade alelopática apenas o extrato bruto na concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentou resultados na velocidade de germinação, os outros ensaios nenhuma fração nem o extrato bruto apresentou resultado. Estes resultados indicam que a espécie *Dicksonia sellowiana* não apresenta nenhuma substância com caráter aleloquímico com potencial biotecnológico.

5.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS POR DIVERSOS MÉTODOS EXTRATIVOS, DOSEAMENTOS TOTAIS E ATIVIDADES ANTIOXIDANTES

5.4.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

Os métodos de extração para obtenção de extratos vegetais incluem maceração, infusão, percolação, decocção, extração contínua quente (Soxhlet), extração em contra-corrente, extração assistida por microondas, ultra-som, fluido supercrítico e turbólise. Além dos métodos extrativos, são diversos os fatores que influenciam na extração, como a parte do material vegetal utilizada, a origem deste, o grau de processamento, o tamanho da partícula, o solvente utilizado, o tempo de extração, temperatura, polaridade e concentração do solvente (Mishra e Tiwari, 2011).

Muitos estudos vêm demonstrando a influência da extração no teor de metabólitos secundários (Vongsak *et al.*, 2013; Bampouli *et al.*, 2014; Karabegović *et al.*, 2014). Os extratos vegetais de *Dicksonia sellowiana* foram obtidos a partir do material coletado, triturado em moinho de facas e martelos e com granulometria abaixo de 500 μ , levando em consideração que quanto menor o tamanho da partícula, maior a facilidade do solvente permear a célula e extrair suas propriedades (Migliato *et al.*, 2011). A obtenção dos extratos vegetais está descrito no item 4.5, os extratos foram obtidos por ultrassom, turbólise, maceração, infusão, decocção e Soxhlet utilizando como solventes etanol e solução hidroalcoólica 70%. O quadro abaixo contém todos os extratos brutos obtidos pelos diversos métodos e as abreviaturas utilizadas nos resultados a seguir.

Quadro 9 - Extratos brutos obtidos e suas abreviaturas

	ABREVIATURA
Extrato Bruto Ultrassom Etanólico	US-E
Extrato Bruto Ultrassom Hidroalcoólico	US-HÁ
Extrato Bruto Turbólise Etanólico	TUR-E
Extrato Bruto Turbólise Hidroalcoólico	TUR-HÁ
Extrato Bruto Macerado Etanólico	MAC-E
Extrato Bruto Macerado Hidroalcoólico	MAC-HÁ
Extrato Bruto Decocção Etanólico	DEC-E
Extrato Bruto Decocção Hidroalcoólico	DEC-HA
Extrato Bruto Infusão Etanólico	INF-E
Extrato Bruto Infusão Hidroalcoólico	INF-HA
Extrato Bruto Soxhlet Etanólico	SOX-E
Extrato Bruto Soxhlet Hidroalcoólico	SOX-HÁ

5.4.2 TEOR DE SÓLIDOS TOTAIS DOS EXTRATOS BRUTOS

Os rendimentos de extração das frondes previamente secas e trituradas estão dispostos na figura 25 e nos quadros 10 e 11. Levando em consideração os resultados, pode ser visto que o método extrativo influencia diretamente nos rendimentos dos extratos e que, além do método utilizado, o solvente também influencia no conteúdo final da extração. O rendimento de extração utilizando etanol variou entre 365 mg (US-E) a 1540 mg (SOX-E) em 10 gramas de planta seca, uma diferença de $\pm 76\%$ entre as extrações, por outro lado utilizando solvente hidroalcoólico 70% o rendimento variou entre 1040 mg (US-HA) a 1480 mg (SOX-HA) uma diferença de $\pm 30\%$ entre os métodos. O método por Soxhlet mostrou a melhor eficiência de extração independente do solvente utilizado que variou $\pm 4\%$ em ambas as extrações, resultados semelhantes a outros estudos realizados (Karabegović *et al.*, 2014). Considerando que o método utilizando Soxhlet foi realizado até a exaustão completa do material vegetal, com tempo de ± 8 horas, estes rendimentos foram aceitos como teor total de extrato de frondes de *Dicksonia sellowiana*.

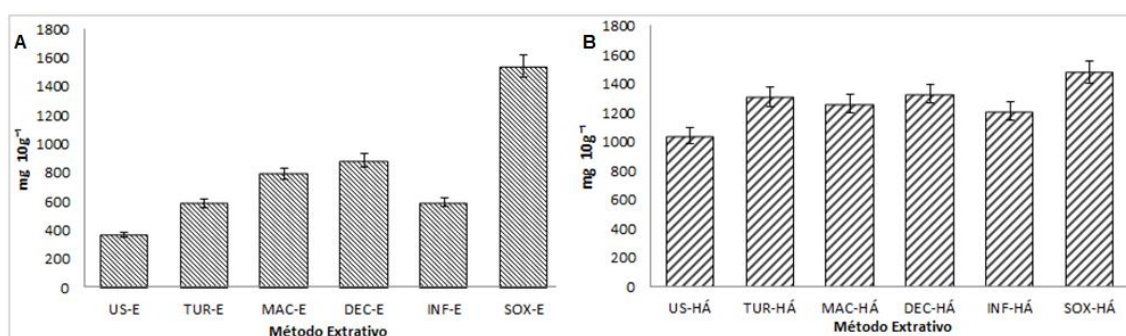


Figura 25 - Rendimento de extração obtidos por diferentes técnicas a partir de frondes de *Dicksonia sellowiana*. A) Extrações Etanólicas, B) Extrações hidroalcoólicas.

Quadro 10 - Parâmetros Físico-Químicos das diferentes extrações a frio

Parâmetros Físico-Químicos das diferentes extrações a frio						
	Ultrassom		Turbólise		Maceração	
	US-E	US-HÁ	TUR-E	TUR-HÁ	MAC-E	MAC-HÁ
Coloração	Esverdeada	Esverdeada	Esverdeada	Esverdeada	Esverdeada	Esverdeada
pH	5,1	5,9	5,1	5,9	5,0	5,8
Teor de Sólidos	365mg / 10g	1,04g / 10g	585mg / 10g	1,31g/ 10g	789mg / 10g	1,26g / 10g

Quadro 11 – Parâmetros Físico-Químicos das diferentes extrações a quente

Parâmetros Físico-Químicos das diferentes extrações a quente						
	Decocto		Infusão		Soxhlet	
	DEC-E	DEC-HÁ	INF-E	INF-HÁ	SOX-E	SOX-HÁ
Coloração	Esverdeada	Esverdeada	Esverdeada	Esverdeada	Esverdeada	Verde Musgo
pH	5,1	5,9	5,1	6,0	5,2	5,6
Teor de Sólidos	882mg / 10g	1,33g / 10g	588mg / 10g	1,21g / 10g	1,54g / 10g	1,48g / 10g

Levando em consideração ambos os solventes utilizados na extração, observa-se que o solvente hidroalcoólico a 70% possui melhor rendimento em praticamente todos os métodos extrativos, exceto por Soxhlet que variou em $\pm 4\%$. Este fator demonstra que o solvente hidroalcoólico é mais seletivo para a extração dos metabólitos presentes nas frondes de *Dicksonia sellowiana*, estudos anteriores identificaram a presença de taninos hidrolisáveis, taninos condensados e flavonoides, grupos de metabolismo secundário com caráter mais polar (Rattmann *et al.*, 2011).

Resultados semelhantes foram observados em outros estudos (Gnoatto *et al.*, 2007; Karabegović *et al.*, 2014), onde a extração por Soxhlet utilizando etanol obtiveram os melhores rendimentos extrativos. Os resultados demonstram que o método extrativo, o solvente utilizado, o tempo e a temperatura influenciam diretamente no rendimento total do extrato, porém é preciso levar em consideração que muitas substâncias são termo lábeis e outras podem sofrer modificações estruturais irreversíveis em altas temperaturas (Yamini *et al.*, 2008; Mishra e Tiwari, 2011). Estes resultados são de fundamental importância para controle de qualidade do extrato vegetal, mostrando a quantidade de sólidos extraídos do material vegetal seco, além de colaborar para o isolamento de substâncias.

5.4.3 ANÁLISE DOS EXTRATOS BRUTOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

O perfil cromatográfico dos extratos brutos foi analisado em 295 nm, comprimento de onda que a maioria dos picos cromatográficos apresentou maior intensidade. Através da análise dos cromatogramas é possível verificar uma similaridade entre os métodos a frio e a quente, variando na área de

determinados picos cromatográficos, principalmente na região entre 20 a 30 minutos. Observa-se na figura 26 que há diferença na área de diversos picos cromatográficos comparando os métodos extrativos a frio e o solvente utilizado. A principal diferença cromatográfica além da área dos picos cromatográficos está na região entre 35 a 45 minutos onde os métodos etanólicos apresentaram maior concentração de picos cromatográficos, devido a substâncias de caráter mais apolar, característica que nos métodos hidroalcoólicos foi minimizada pela polaridade mais alta do solvente.

Na figura 27, o perfil cromatográfico dos métodos obtidos a quente é possível verificar a mesma similaridade encontrada nos cromatogramas da figura 26, diferenças nas áreas dos sinais na região entre 20 a 30 minutos e na região de 35 a 45 minutos. Os cromatogramas que apresentaram maior área dos picos na região entre 20 e 30 minutos como as amostras TUR-HÁ, INF-HÁ e DEC-HÁ obtiveram os melhores resultados no doseamento de polifenóis e flavonoides totais, concluindo que este aumento de sinais deve-se a presença destes metabólitos.

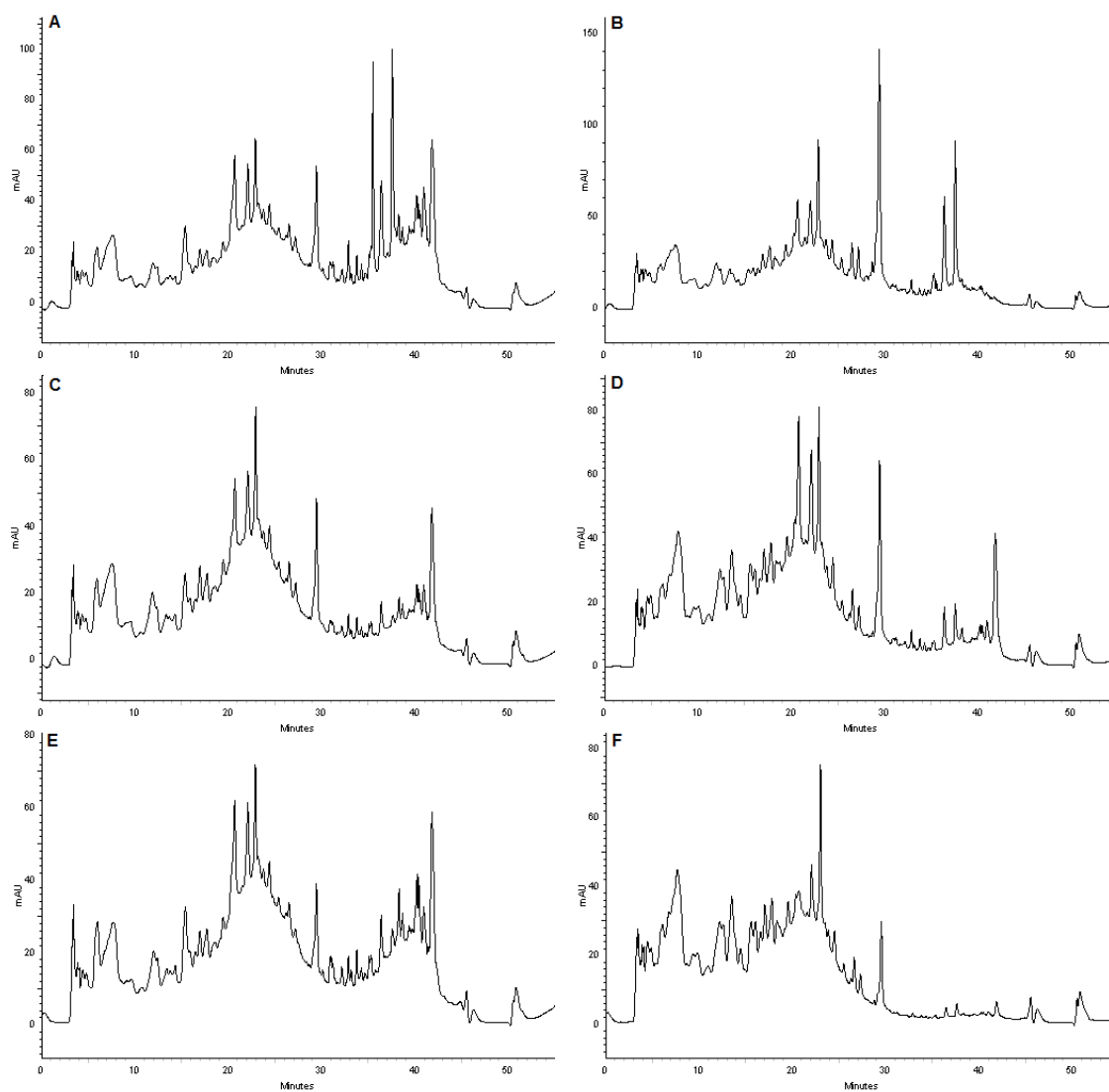


Figura 26 - Perfil cromatográfico das extrações a frio das frondes de *D. sellowiana*. A) MAC-E, B) MAC-HÁ, C) TUR-E, D) TUR-HÁ, E) US-E, F) US-HÁ

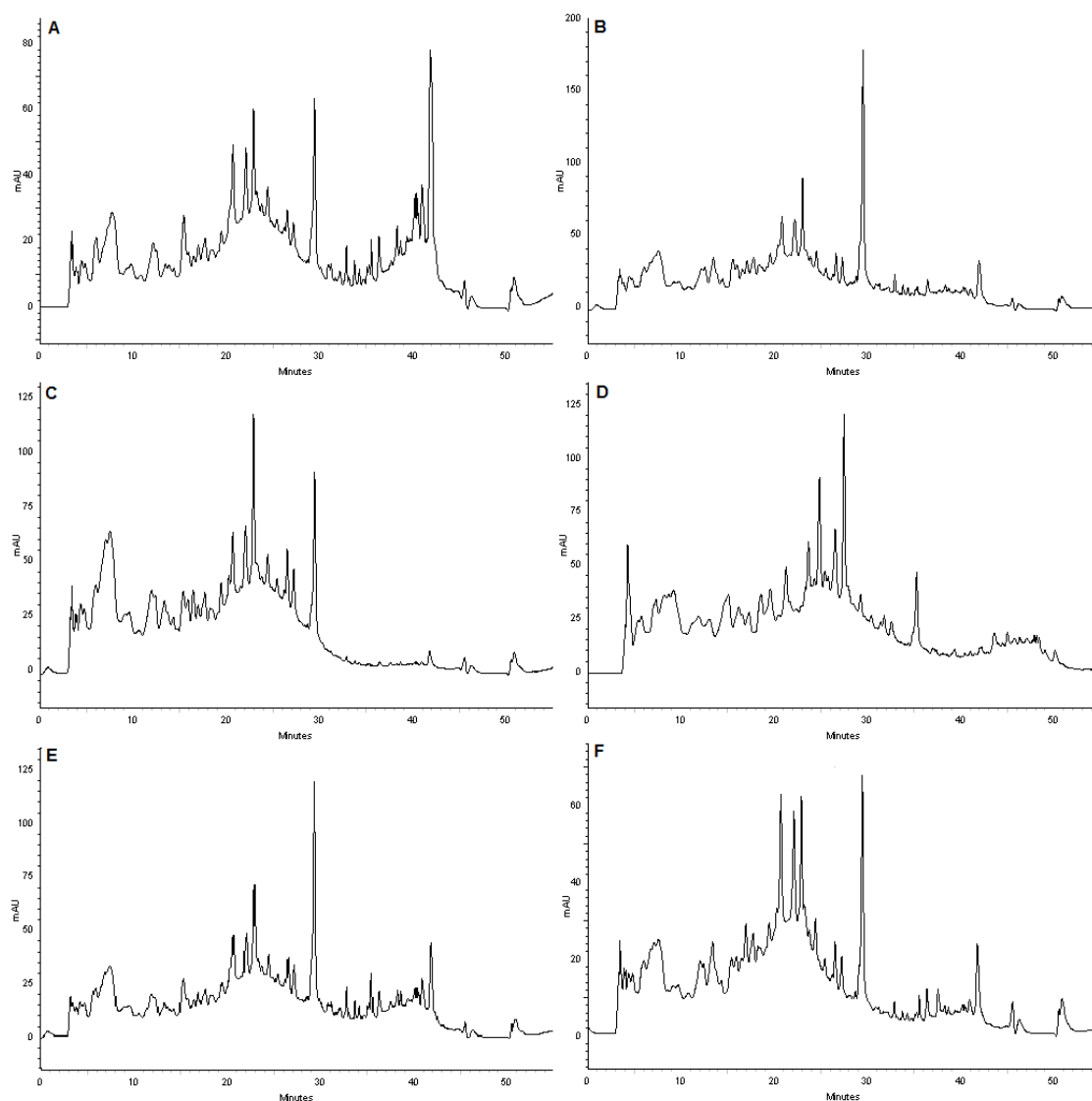


Figura 27 - Perfil cromatográfico das extrações a quente das frondes de *D. sellowiana*. A) INF-E, B) INF-HÁ, C) SOX-E, D) SOX-HÁ, E) DEC-E, F) DEC-HÁ

Estudo realizado por Herzi et al. (2013), demonstra diferenças significativas quanto a natureza dos componentes e a quantidade destes no que se diz respeito ao método de extração, além de detectar na extração por Soxhlet uma alta quantidade de substâncias de alta massa molecular.

5.4.4 DOSEAMENTOS E ATIVIDADES ANTIOXIDANTES POR MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

As técnicas espectrofotométricas na região do ultravioleta (UV), são amplamente aplicadas no doseamento de fármacos e na avaliação de atividades biológicas, sendo bastante utilizada no setor de controle de qualidade em indústrias farmacêuticas, uma vez que cumpre requisitos indispensáveis na rotina laboratorial como rapidez, baixo custo operacional e elevada confiabilidade de resultados (Borba *et al.*, 2013). Diversos ensaios biológicos envolvendo estas análises são realizados no setor da pesquisa científica.

Para os doseamentos totais nos extratos brutos foram elaboradas curvas de calibração para cada grupo químico conforme descrito no item 4.8 utilizando padrões para a construção da curva de calibração (anexo 1).

Na análise de doseamentos de grupos de metabólitos secundários utilizando métodos espectrofotométricos (tabela 4), observa-se que o extrato DEC-HÁ foi o que apresentou maior rendimentos de polifenóis ($256,5 \text{ mg EG g}^{-1}$), flavonoides ($44,8 \text{ mg EQ g}^{-1}$) e proantocianidinas ($140,4 \text{ mg EC g}^{-1}$), este alto teor de substâncias fenólicas estão relacionadas com a maior atividade antioxidante pelos métodos DPPH ($25,2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) e redução do complexo fosfomolibdênio (58,4%). Outros estudos demonstram esta correlação entre conteúdo de substâncias fenólicas e atividade antioxidante (Campos *et al.*, 2014; Veber *et al.*, 2015).

Na maioria das extrações a utilização do solvente hidroalcoólico favoreceu a extração de substâncias fenólicas diminuindo o IC_{50} no método DPPH e aumentando a atividade pelo método fosfomolibdênio. Na extração SOX-E os resultados de polifenóis totais ($180,4 \text{ mg EG g}^{-1}$) e flavonoides totais ($24,01 \text{ mg EQ g}^{-1}$) foram superiores ao SOX-HÁ, menos no teor de proantocianidinas ($67,0 \text{ mg EC g}^{-1}$), a atividade antioxidante em ambas as extrações foram semelhantes. Entre os métodos testados, o que mais se destacou nos doseamentos totais seguido pela atividade antioxidante foram às extrações por DEC-HA, TUR-HA e INF-HA. Outro fator analisado foi o teor de esteroides totais, que não está relacionado diretamente à atividade antioxidante. Na tabela 4 verifica-se que com os solventes etanólicos obteve-se teores superiores de esteroides que nas extrações com solvente hidroalcoólico,

fator que justifica-se pelas polaridades diferentes entre este grupo de substâncias e o solvente extrator.

Resultados semelhantes ao da atividade antioxidante pelo método fosfomolibdênio foram encontrados por (Bora *et al.*, 2005) com a mesma espécie, com uma atividade de 32,87% comparado com o padrão vitamina C, os resultados encontrados nas extrações padronizadas pelo diversos métodos demonstra que a variação do solvente e do método extrativo utilizado se consiga extratos com menor ou maior poder redutor.

Tabela 4 - Teor de fenóis totais, flavonoides totais, proantocianidinas totais, esteroides totais e atividade antioxidante frente ao radical DPPH e complexo fosfomolibdênio dos extratos brutos das frondes de *Dicksonia sellowiana* obtidos por diversos métodos.

	FenT (mg EG g ⁻¹) ± DP	FlavT (mg EQ g ⁻¹) ± DP	ProT (mg EC g ⁻¹) ± DP	EstT (mg EEg ⁻¹) ± DP	DPPH (IC50 ug ml ⁻¹) ± DP	Fosfo (% Vit C) ± DP
US-E	159,9 ^a ±0,03	21,1 ^b ±0,24	78,1 ^d ±0,05	29,4 ^b ±0,19	36,5 ^{ef} ±0,04	17,6 ^a ±0,20
US-HA	181,1 ^f ±0,06	22,7 ^c ±0,09	85,6 ^f ±0,16	26,5 ^a ±0,17	35,2 ^d ±0,65	28,8 ^f ±0,43
TUR-E	174,5 ^c ±0,02	29,2 ^e ±0,17	89,2 ^g ±0,15	65,8 ^j ±0,27	33,8 ^c ±1,17	24,2 ^{cd} ±0,27
TUR-HA	213,1 ⁱ ±0,165	38,6 ⁱ ±0,18	109,6 ^j ±0,23	37,9 ^d ±0,55	27,5 ^b ±0,13	39,7 ^g ±0,96
MAC-E	192,7 ^g ±0,12	34,3 ^g ±0,04	91,1 ^h ±0,09	52,8 ^g ±0,06	35,5 ^{de} ±0,21	25,9 ^{de} ±0,53
MAC-HA	180,7 ^{ef} ±0,45	33,5 ^g ±0,81	80,0 ^e ±0,90	48,1 ^f ±0,14	36,5 ^{ef} ±0,46	23,0 ^{bc} ±1,10
INF-E	178,2 ^d ±0,01	31,5 ^f ±0,05	76,3 ^c ±0,12	67,7 ^k ±0,75	37,3 ^f ±0,10	22,5 ^b ±0,61
INF-HA	215,8 ⁱ ±0,04	39,1 ⁱ ±0,62	113,1 ^k ±0,69	58,3 ^h ±0,03	37,0 ^f ±0,02	22,9 ^{bc} ±0,23
DEC-E	193,2 ^h ±0,05	35,7 ^h ±0,40	100,5 ⁱ ±0,11	73,2 ^l ±0,05	34,4 ^{cd} ±0,13	27,1 ^e ±0,46
DEC-HA	256,5 ^k ±0,10	44,7 ^j ±0,06	140,4 ^l ±0,12	59,3 ⁱ ±0,07	25,2 ^a ±0,20	58,4 ^h ±0,36
SOX-E	180,4 ^e ±0,07	24,1 ^d ±0,26	54,7 ^a ±0,23	39,4 ^e ±0,09	41,5 ^g ±0,07	22,7 ^{bc} ±0,41
SOX-HA	163,9 ^b ±0,12	18,7 ^a ±0,16	67,0 ^b ±0,06	34,4 ^c ±0,16	42,6 ^g ±0,17	22,2 ^b ±0,23

± DP= ± desvio padrão. *Resultados seguidos pela(s) mesma (s) letra (s) não difere estatisticamente (p < 0,05) entre si, pelo teste de Tukey.

As técnicas de doseamentos totais se baseiam em técnicas espectrofotométricas juntamente com um padrão, através da curva de calibração possível calcular a concentração destes metabólitos nas diversas técnicas realizadas. A técnica mais conhecida e utilizada para medir a concentração de grupos de metabólitos secundários é a técnica de Folin-Ciocalteu que mede a quantidade de polifenóis presentes no extrato utilizando como padrão o ácido gálico. O reagente consiste de mistura dos ácidos

fosfomolibdídico e fosfotunguístico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6^+ porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica.

Sobre as técnicas antioxidantes utilizadas, a atividade antioxidante pelo método de fosfomolibdênio baseia-se na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) que na presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, ocorre a formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V), em pH ácido, determinado espectrofotometricamente, a 695nm. A atividade antioxidante pelo método DPPH baseia-se na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), um radical livre e estável devido a presença de um elétron sobressalente ao longo da molécula, pois este elétron não dimeriza, o que normalmente ocorre com os demais radicais livres. Esta solução apresenta uma coloração violeta intensa, e quando em contato com uma substância antioxidante (doadora de hidrogênio) o radical passa para sua forma reduzida, passando da coloração violeta para amarela, produzindo um decréscimo da absorbância a 518 nm.

A variação dos resultados obtidos nas técnicas de conteúdos totais e nas atividades antioxidantes foi aplicado em um gráfico de box plot para estudo destas variações (gráfico 4). Esta metodologia permite uma visualização da variação dos resultados obtidos, o intervalo de variação dos dados, os valores médios, assim como as comparações entre a concentração dos diferentes conteúdos e dos resultados antioxidantes. O eixo horizontal corresponde ao fator de interesse e o eixo vertical a variável a ser analisada, e tanto a altura da caixa como o tamanho fornecem informações sobre a dispersão dos dados. Observa-se que a maior diferença entre os dados obtidos nas extrações com ambos os solventes está na quantidade de polifenóis, proantocianidinas e esteroides, este fator justifica-se pela escolha do solvente extrator onde a presença da água confere uma polaridade mais alta que no etanol.

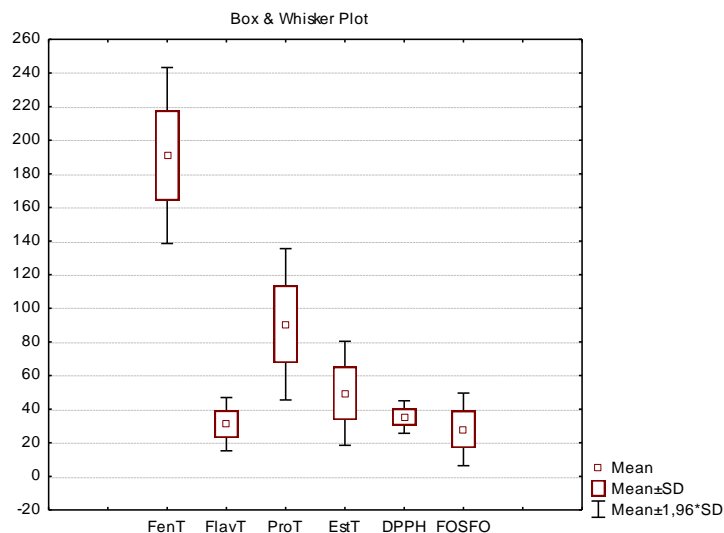


Gráfico 4 - Box-plot de média e variação dos fatores utilizados. FenT – Fenólicos totais. FlavT – Flavonoides totais. ProT – Proantocianidinas totais. EstT – Esteroides totais

A análise dos principais componentes (PCA) é uma análise multivariada que vem sendo muito utilizada em diversos estudos, mostrando a semelhança entre as amostras testadas através de uma matriz (Hossain *et al.*, 2011; Patras *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2014). Para esta análise utilizou-se todos os dados obtidos nos doseamentos totais e as atividades antioxidantes em triplicata. O fator 1 que explica 75,90% da análise refere-se aos doseamentos totais e o fator 2 que explica 19,47% refere-se as atividades antioxidantes e as amostras são consideradas semelhantes se estiverem no mesmo quadrante cartesiano ou a uma distância máxima de um quadrado, em todos os lados.

Analisando a figura 28 nota-se a diferença entre os diversos tipos de extratos, mostrando a semelhança entre alguns extratos como SOX-E, SOX-HA e US-E, mas também mostrando que os extratos TUR-HA e DEC-HA são os extratos que se diferenciam dos demais, por apresentarem maiores teores de polifenóis e melhores atividades antioxidantes em ambos os métodos.

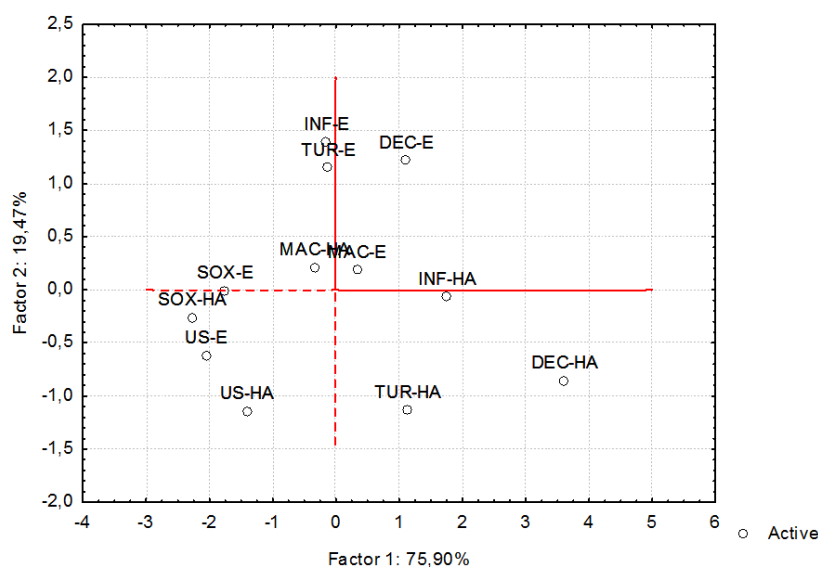


Figura 28 - Análise dos principais componentes (PCA) pela similaridade entre as características químicas e as propriedades antioxidantes dos extratos obtidos por diversas técnicas com dois solventes extrativos

5.4.5 DEFINIÇÃO DO EXTRATO BRUTO PARA A REALIZAÇÃO DOS TESTES BIOLÓGICOS

Para definição do extrato bruto que será utilizado nos ensaios farmacológicos foram utilizados três critérios. Primeiramente, foi avaliado na literatura quais os extratos mais utilizados para estes ensaios. O segundo critério baseou-se na análise do rendimento, e o terceiro critério avaliou os dados estatísticos, comparando entre os doze extratos vegetais os teores totais analisados com os parâmetros das atividades antioxidantes (DPPH e fosfomolibdênio).

Utilizando o programa STATISTICA®, criou-se uma matriz utilizando todos os resultados das triplicatas realizadas nos testes selecionados visando o maior número possível de amostras a serem analisadas. A partir desta matriz, foi realizada a análise estatística multivariada, conhecida como PCA (Principal Components Analysis). O PCA é um procedimento matemático muito utilizado na análise exploratória de dados. A análise de PCA dos dados dos extratos brutos pode ser verificado na figura 28.

Através do gráfico de PCA, é possível verificar quais extratos são semelhantes de acordo com os dados utilizados. Observa-se que há um

acúmulo de extratos (US-E, TUR-E, INF-E, MAC-E e DEC-E) em um mesmo quadrante, todos têm em comum o mesmo solvente extrator, no caso o álcool. É possível verificar também que os extratos que utilizaram solvente extrator o álcool 70%, variaram mais nos quatro quadrantes. Neste gráfico destaca-se o extrato decocto hidroalcoólico (DEC-HA), que demonstrou ser o extrato que apresentou maiores diferenças nesta análise.

Levando em consideração todos os critérios estabelecidos, e tendo em vista estudos farmacológicos, optou-se por trabalhar com extrato obtido por Soxhlet etanólico por ser considerado, segundo a literatura, o extrato total da espécie em questão e por apresentar os maiores rendimentos extraíveis. Apesar de não ter apresentado os melhores resultados nos ensaios realizados, vale ressaltar que os metabólitos estão presentes no extrato vegetal, porém diluídos em uma maior quantidade de material devido ao maior rendimento.

5.5 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS DAS PARTES DA FRONDE, ANÁLISE POR UPLC/MS, ¹H-RMN, DOSEAMENTOS TOTAIS E ATIVIDADES ANTIOXIDANTES.

As plantas produzem uma grande quantidade de compostos orgânicos que servem várias funções nas plantas (Zuiter, 2014). Por exemplo, eles fornecem proteção contra herbívoros não só atuando como toxinas e dissuasores de alimentação, mas também ao servir como sinais de inimigos herbívoros. Ambas as partes florais e vegetativas de muitas espécies produzem substâncias distintas em uma mesma espécie (Matarese *et al.*, 2014).

Diversos estudos vêm demonstrando que a composição química das diversas partes da planta se difere (Boscher *et al.*, 1995; Naidoo *et al.*, 2013; Matarese *et al.*, 2014), estando relacionado com o potencial biossintético das células de cada tecido vegetal (Riffault *et al.*, 2014). Neste sentido, estudos que demonstram as diferenças metabólicas de cada órgão vegetal são necessários com a finalidade de verificar a diferença química entre os tecidos e qual o órgão mais interessante farmacologicamente.

5.5.1 PREPARO DOS EXTRATOS VEGETAIS

Para avaliação das propriedades das partes das frondes, as mesmas foram secas em estufa de circulação de ar a 50°C por um período de 36 horas e, após este processo, foi realizado manualmente a separação das partes das frondes, resultando em três partes: a raque, a pínula e o folíolo.

O objetivo é verificar em qual parte da fronde que concentra maior rendimento de materiais sólidos, as substâncias presentes e as atividades biológicas. Para estas atividades, foi preparado extrato bruto hidroalcoólico a 70% por turbólise conforme descrito no item 4.5.1.2. Estes extratos foram concentrados em rota-evaporador e particionados em funil de separação com solventes de polaridade crescente (hexano, clorofórmio e acetato de etila), e após particionamento as frações secas em banho-maria a 50°C.

Os motivos pelos quais esta extração foi escolhida foram: a quantidade de material de cada parte da fronde e pelo fato de que a raque e a pínula apresentaram uma textura muito rígida, deste modo, o equipamento

empregado nesta técnica poderia romper este material e favorecer a extração do mesmo.

5.5.2 CONTROLE FÍSICO-QUÍMICO DOS EXTRATOS DAS PARTES DA FRONDE

Para o controle físico-químico dos extratos vegetais foram escolhidas quatro técnicas de avaliação. A primeira técnica empregada foi a avaliação dos rendimentos do material fresco, seco e do rendimento final de extração. A segunda técnica emprega a utilização de HPLC-DAD e HPLC-MS analisando a composição química das frações acetato de etila das partes e verificando a diferença entre as mesmas. A terceira técnica utilizou um screening por RMN de ^1H verificando a concentração dos sinais nas bandas e depois analisado por técnica quimiométrica por PCA verificando a semelhança entre os extratos. A quarta técnica utilizou doseamento de polifenóis pelo método de Folin-Ciocalteu e atividade antioxidante pelo método de DPPH, ambas as técnicas com avaliação espectrofotométricas.

5.5.2.1 Rendimento por parte da Fronde

Para avaliação dos rendimentos, inicialmente verificou-se o rendimento do material fresco de cada órgão do vegetal, do material seco e o rendimento do extrato seco de cada órgão em relação ao extrato bruto. Esta análise teve como finalidade verificar qual órgão possui o maior peso, tanto no material fresco quanto no material seco, com seu respectivo rendimento de extração.

Tabela 5 - Teor de material e de resíduo seco por órgão vegetal de *Dicksonia sellowiana*

	% do material fresco em relação a fronde	% do material seco em relação a fronde	% do rendimento de extrato seco
Fronde	100	100	7,09
Raque	52,39	39,06	3,99
Pínula	8,56	9,16	4,21
Folíolo	39,05	51,78	10,13

Através da obtenção de sólidos totais é possível interpretar quantitativamente a presença total de matéria que não seja água em uma amostra, seja na forma de substâncias dissolvidas, coloidais ou em suspensão. O teor de sólidos totais e da matéria seca é obtido pela pesagem do resíduo da evaporação de uma amostra, que corresponde ao resíduo da desidratação da amostra e é utilizado para calcular a quantidade de amostra para os ensaios sem a presença de água.

Em relação aos resultados obtidos em % de material fresco em relação com a fronde, a raque é a que apresenta o maior peso (52,39%) em relação ao material como um todo, porém quando seco os valores se invertem e o maior rendimento de material seco antes da extração é do folíolo (51,78%). Esta inversão de valores possivelmente se dá pela quantidade de água presente na raque antes da extração, pois este órgão apresenta uma maior quantidade de fibras também servindo de sustentação para a fronde.

O rendimento de extrato seco foi maior para o folíolo (10,13%) em relação aos outros materiais, sendo superior que o rendimento da fronde inteira (7,09%). Este valor é possível pelo fato de que os rendimentos da raque e da pínula foram os menores, estes dois órgãos são mais fibrosos e com uma dureza maior. Outros trabalhos demonstram que materiais mais fibrosos como raiz, caule e casca apresentam rendimentos menores que de folhas (Kalegari, 2014; Paula, 2014)

5.5.2.2 Análise das frações acetato de etila das partes da fronde por UPLC-MS

O isolamento e caracterização estrutural na área de produtos naturais é essencial no conhecimento dos constituintes químicos presentes nas espécies vegetais. Na caracterização destes constituintes químicos existem diversas técnicas, entre elas a espectrometria de massa (MS) é um dos métodos mais importantes para a caracterização de compostos naturais, mesmo em uma mistura sem separação é possível obter diversas massas devido a sua sensibilidade e baixos níveis de consumo de amostra (Abu-Reidah *et al.*, 2015).

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) tem se tornado cada vez mais importante na rápida separação e análise de produtos naturais (Karioti *et al.*, 2014). Diversos estudos tem utilizado deste

recurso na tentativa de identificar os compostos fenólicos presentes no extrato e frações acetato de etila (González-Gómez *et al.*, 2010; Karioti *et al.*, 2014; Abu-Reidah *et al.*, 2015).

Os espectros de massas das substâncias presentes na fração acetato de etila do folíolo estão presentes nas figuras 29, 30 e 31.

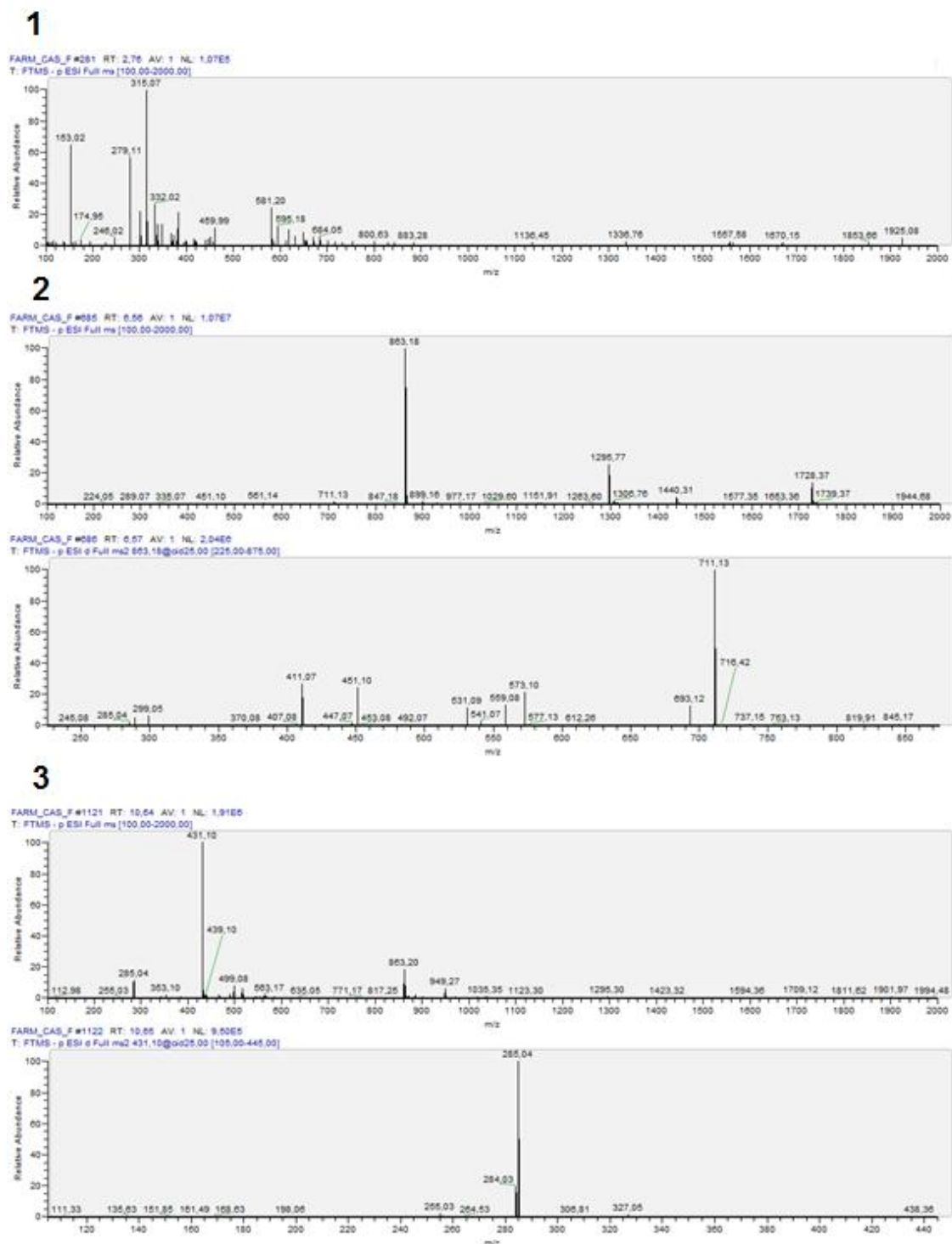
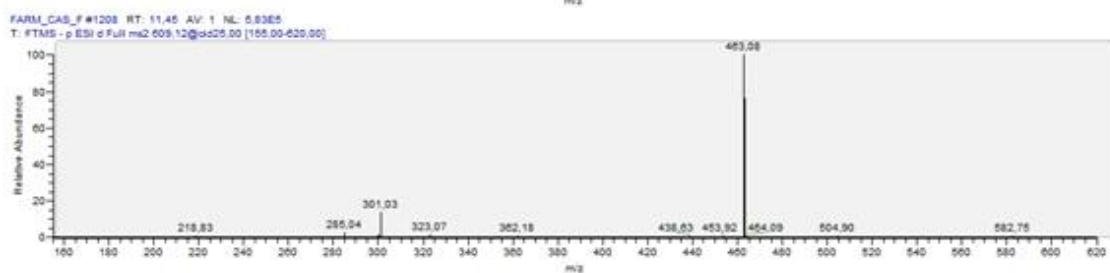
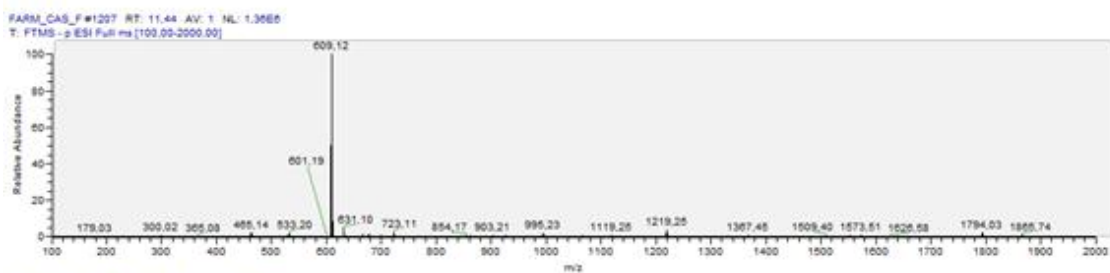
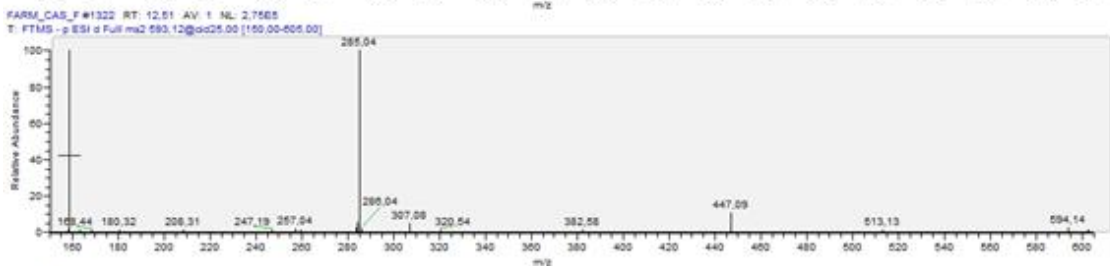
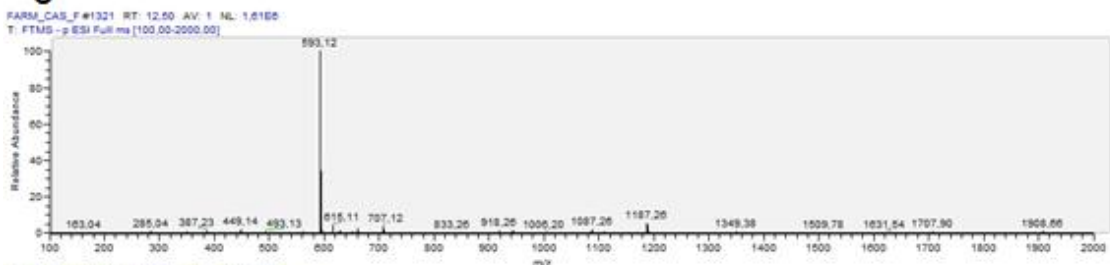


Figura 29 - Espectro de Massas das substâncias 1,2 e 3

4



5



6

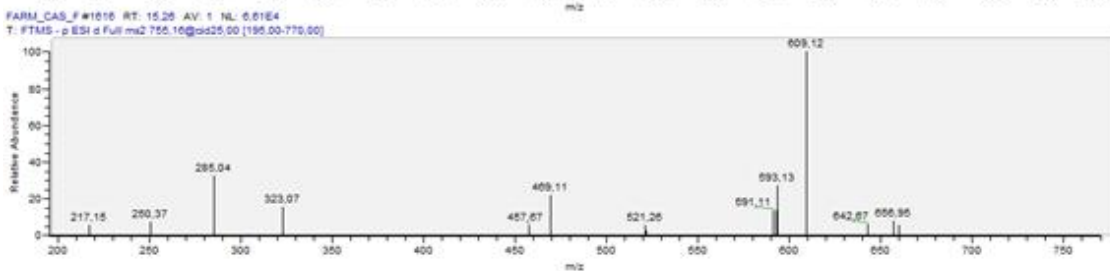
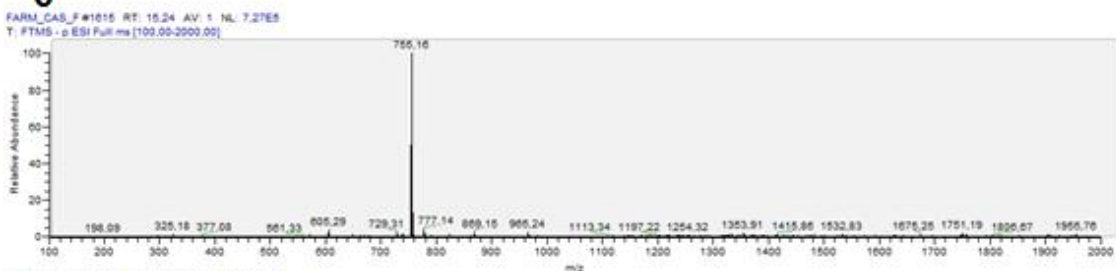


Figura 30 - Espectros de massas das substâncias 4, 5 e 6

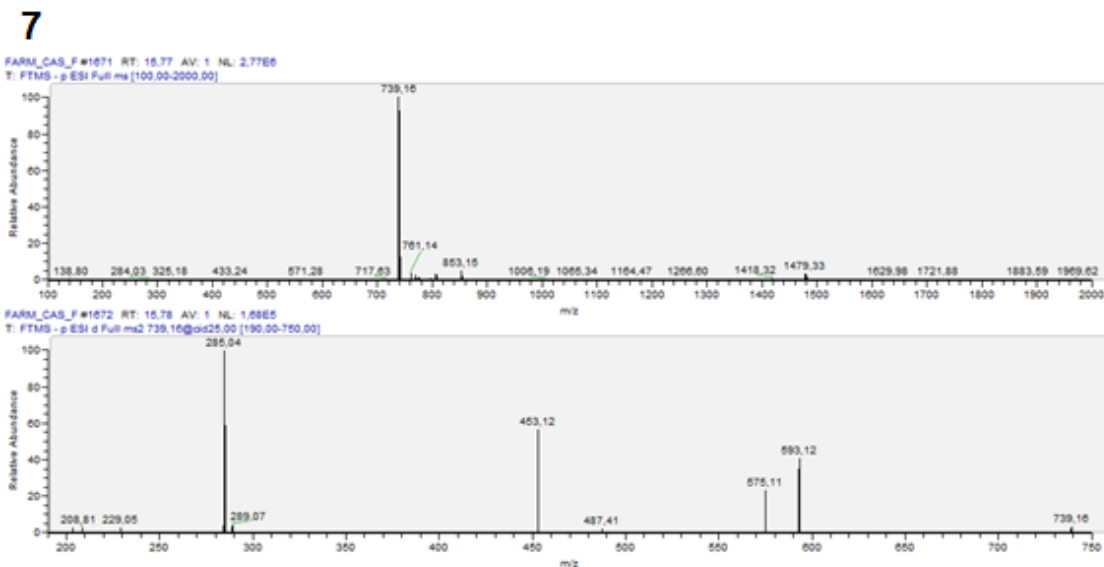


Figura 31 - Espectro de massas da substância 7

A partir da análise dos espectros de massas foi possível identificar sete substâncias relacionadas com as massas obtidas e com as fragmentações, como pode-se visualizar nas figuras anteriores. Das sete substâncias, quatro delas são derivadas do flavonoide Kaempferol.

Na identificação dos derivados do Kaempferol (substâncias 3,5, 6 e 7 conforme tabela 6), a perda das unidades de açúcares levou a formação do fragmento referente à aglicona desprotonada (m/z 285). As moléculas de açúcar foi levado em consideração as massas como na substância 3 que apresentou o íon molecular desprotonado $[M-H]^-$ em m/z 431 e a perda de uma unidade de rarnose levou a formação do fragmento referente à aglicona desprotonada (m/z 285).

Na identificação da substância 3 (Quercetina-3-O-glucoside-7-O-rhamnoside) apresentou $[M-H]^-$ em m/z 609. A perda de uma unidade de rarnose $[M-146+H]^+$ levou a formação do fragmento (m/z 463) e a perda de uma unidade de glicose $[M-162+H]^+$ levou a formação do fragmento referente a quercetina desprotonada (m/z 301).

Na tabela 6 encontram-se as sete substâncias identificadas bem como suas massas, fragmentos, tempo de retenção na cromatografia e intensidade no cromatograma referente a cada órgão avaliado.

Tabela 6 - Composição química da fração acetato de etila dos três órgãos de *Dicksonia sellowiana*

Pico	TR ^a (min.)	MS ¹ [M-H] ⁻	Fragmentos Negativos Relevantes	Fórmula Molecular	MS ¹ [M + Na] ⁺	Proposta de Identificação	Fronde	Raque	Pínula	Folíolo
1	2,76	153	-	C ₇ H ₆ O ₄	-	Ácido 3,4-dihidroxibenzóico				
2	6,61	863	711, 693, 573, 451, 411, 299	C ₄₇ H ₄₂ O ₁₈	-	Trimer-flavan-3-ol tipo A				
3	10,71	431	285	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	-	Kaempferol-3-O-Rhamnoside				
4	11,44	609	463, 301	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	633	Quercetin-3-O-glucoside-7-O-rhamnoside				
5	12,54	593	447, 285	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	617	Kaempferol-3-O-glucoside-7-O-rhamnoside				
6	15,24	755	609, 593, 469, 323, 285	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	779	Kaempferol-3-O-rhamnosyl(1->2)glucoside-7-O-rhamnoside				
7	15,69	739	593, 453, 285	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	763	Kaempferol-3-O-glucoside-2''-rhamnoside-7-O-rhamnoside				

Legenda:

Ausência de pico cromatográfico
 Média intensidade do pico cromatográfico
 Maior intensidade do pico cromatográfico

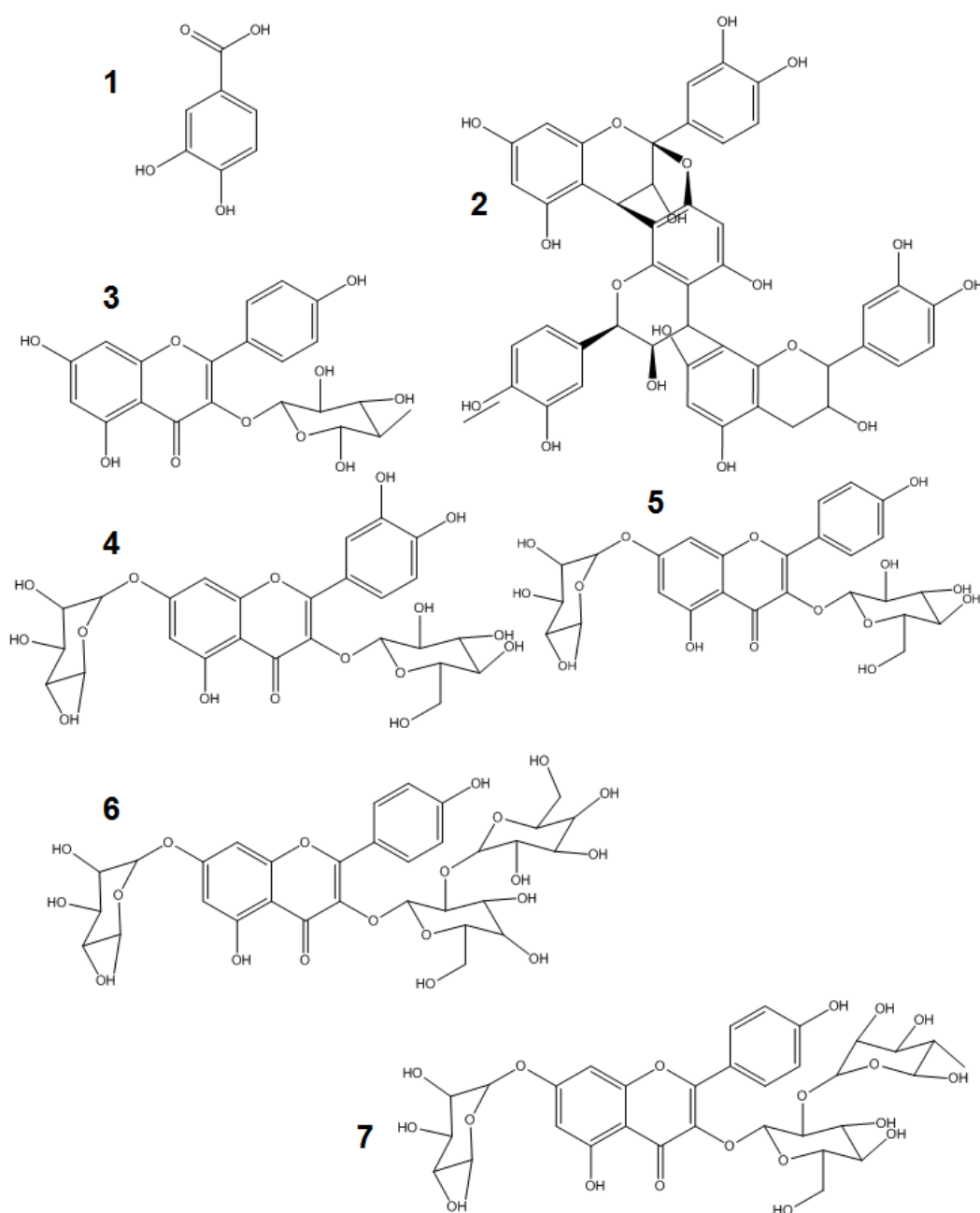


Figura 32 - Substâncias identificadas por espectroscopia de massas dos órgãos da espécie *Dicksonia sellowiana*.

Legenda: 1. Ácido 3,4-dihidroxibenzoico, 2. Trimer-flavan-3-ol tipo A, 3. Kaempferol-3-O-Rhamnoside, 4. Quercetin-3-O-glucoside-7-O-rhamnoside, 5. Kaempferol-3-O-glucoside-7-O-rhamnoside, 6. Kaempferol-3-O-rhamnosyl(1-2)glucoside-7-O-rhamnoside, 7. Kaempferol-3-O-glucoside-2''-rhamnoside-7-O-rhamnoside.

Para identificação da substância 3 com m/z 863 utilizou comparação com a literatura, levando em consideração a elevada massa molecular e os fragmentos de massa (Foo *et al.*, 2000). Os cromatogramas da fronde e dos

seus respectivos órgãos pode ser visualizado na figura 33, verificando também a intensidade dos picos cromatográficos.

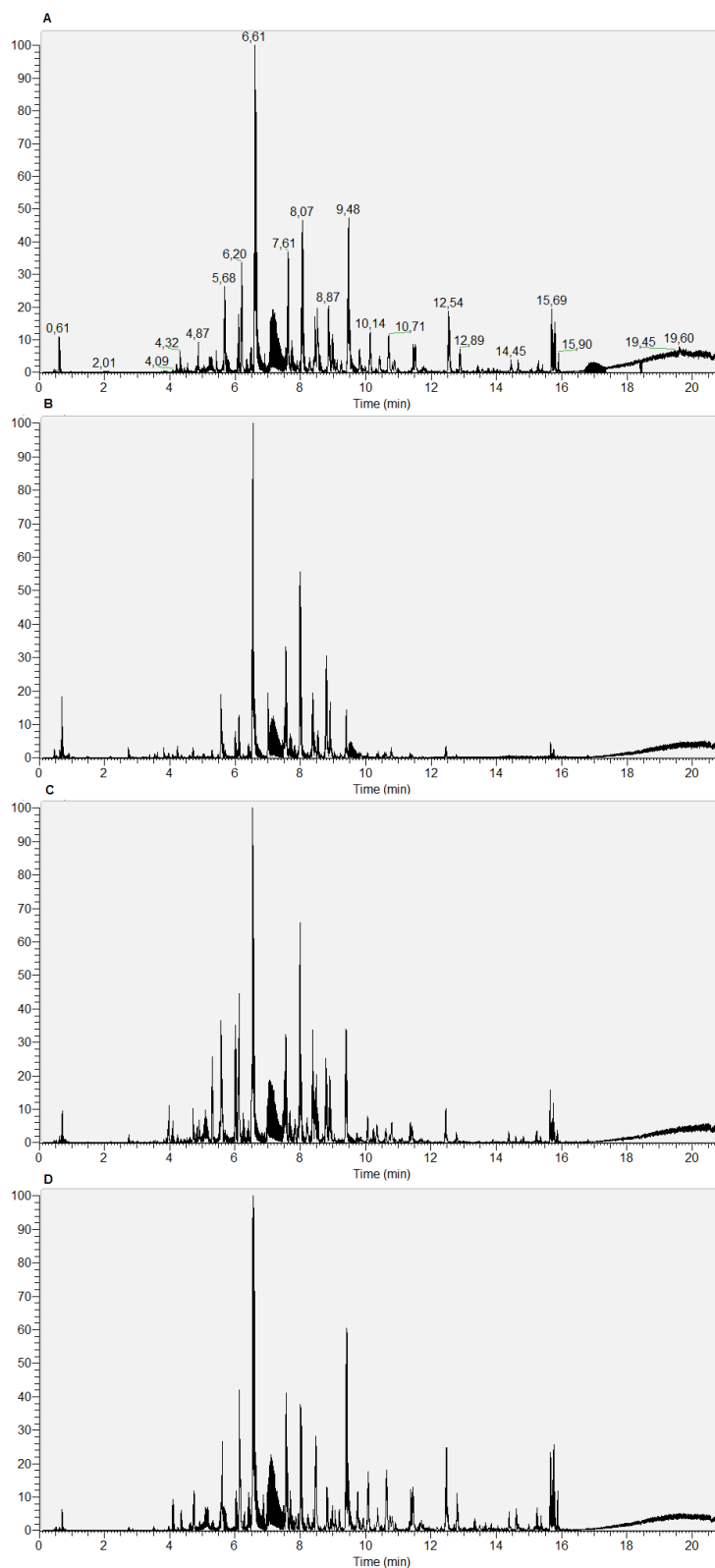


Figura 33 - Cromatogramas da fração acetato de etila dos órgãos da fronde de *Dicksonia sellowiana*. A) Cromatograma da Fronde, B)

Cromatograma da Raque, C) Cromatograma da Pínula, D) Cromatograma do Folíolo.

5.5.2.3 Screening por RMN de ^1H dos extratos brutos da fronde e das partes

Uma grande variedade de técnicas analíticas têm sido utilizadas com a finalidade de identificar os compostos presentes em matérias-primas complexas. Cada técnica tem as suas próprias vantagens e desvantagens. Entre as técnicas utilizadas, duas tem maior destaque, que são: a espectrometria de massa (MS) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) (De Combarieu *et al.*, 2015).

A análise por RMN é ideal para detectar uma grande variedade de metabólitos em uma mistura, de forma inerentemente, quantitativa e imparcial. Em comparação com MS, espectroscopia de RMN tem uma gama maior de detecção e é menos tendencioso uma vez que os resultados de análises baseadas em MS dependem muito da escolha das condições de ionização e a instrumentação utilizada (Mahrous e Farag, 2015). Embora RMN seja menos sensível do que outros métodos espectroscópicos além de poder sofrer sobreposição de sinal, o uso de espectros RMN multidimensional podem ajudar neste aspecto, além disto o RMN tem a vantagem de ser um detector universal podendo identificar as moléculas com a mesma eficiência (De Combarieu *et al.*, 2015).

Na técnica por RMN uma faixa de 30 a 150 metabólitos podem ser identificados ao mesmo tempo no espectro de ^1H , o que é muito útil na análise de extratos vegetais. O desvio químico e os valores de integração dos picos observados são usados para criar um conjunto de dados que pode ser utilizados em análises multivariadas tais como análise de agrupamento hierárquico (HCA) e análise do componente principal (PCA). Estes métodos quimiométricos executam a função de agrupar a maioria das amostras semelhantes, fornecendo informação entre os similares (Bhatia *et al.*, 2013).

Na análise de RMN do extratos brutos dos órgãos da fronde de *Dicksonia sellowiana*, observa-se um acúmulo de sinais na região entre 3,5 a 4,5ppm, sinais característicos da região de açúcares. Na região entre 0,5 a 2 ppm há também um acúmulo de sinais na pínula e no folíolo, estes sinais são

característicos de hidrogênios metílicos, metínicos e metilênicos referentes á ácidos graxos. Na figura 34 demonstra os quatro espectros de ^1H com a respectiva análise de PCA realizada.

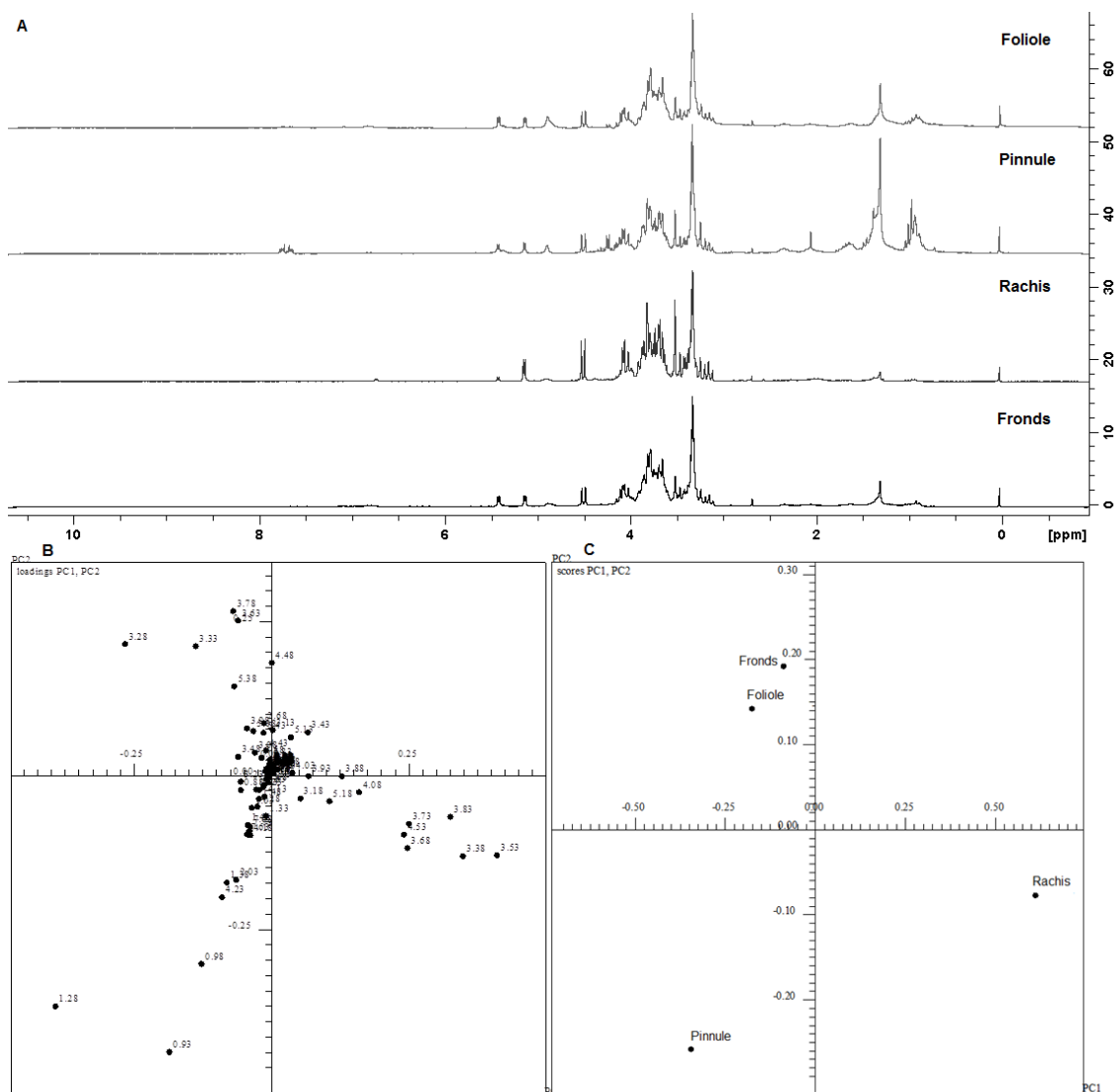


Figura 34 - A) Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto total e extratos brutos das partes da fronde; B e C) Análise quimiométrica por PCA do espectro de RMN de ^1H .

Analisando os dados obtidos pela análise de PCA, observa-se que o extrato bruto da fronde é mais similar ao extrato bruto da pínula, e os outros dois extratos se diferem entre si e das demais amostras. A análise de PC1 explica 79,10% dos dados obtidos.

Analisando os espectros de RMN, observa-se diferenças significativas entre os espectros de ^1H . Estas diferenças nos sinais correspondem a diferença de metabólitos que existem entre os extratos dos órgãos da fronde. Os extratos que mais se assemelham entre si é o extrato da fronde e do folíolo, possivelmente pela quantidade de metabólitos extraídos.

5.5.2.3 Doseamento de polifenóis e atividade antioxidante dos extratos brutos da fronde e suas partes

Os compostos fenólicos são comumente encontrados em plantas comestíveis e não comestíveis, e têm sido referidos como tendo múltiplos efeitos biológicos, incluindo a atividade antioxidante (Beara *et al.*, 2015). Os extratos brutos de frutas, ervas, vegetais, cereais e outros materiais vegetais ricos em compostos fenólicos são cada vez mais interessantes para as indústrias alimentícias com a finalidade de retardar a degradação oxidativa dos lipídios e, assim, melhorar a qualidade e valor nutricional dos alimentos (Kähkönen *et al.*, 1999). A importância dos componentes antioxidantes de materiais vegetais na manutenção da saúde e proteção contra doenças coronárias e câncer também aumentou o interesse entre os cientistas, fabricantes de alimentos e consumidores, como tendência em alimentos funcionais com efeitos específicos na saúde (Rice-Evans, Miller e Paganga, 1997; Zhu *et al.*, 2015).

A avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH e o doseamento de polifenóis pelo método de Folin-Ciocalteu foram realizados com a finalidade de verificar qual órgão da fronde com maior teor de compostos fenólicos, conseqüentemente com a maior atividade antioxidante.

Os resultados de fenólicos totais e da atividade antioxidante pelo método DPPH estão expostos na tabela 7.

Tabela 6 - Fenólicos totais e atividade antioxidante dos órgãos e da fronde de *Dicksonia sellowiana*

	FenT (mg.g ⁻¹)	DPPH (IC50 ug.mL ⁻¹)
Fronde	207,13 ± 0,346	42,89 ± 1,492
Raque	51,86 ± 0,127	156,28 ± 0,884
Pínula	174,05 ± 0,433	59,61 ± 0,227
Folíolo	217,84 ± 0,321	40,65 ± 0,346

Através dos resultados é possível verificar que o órgão que obteve melhor atividade antioxidante e maior teor de compostos fenólicos foi o folíolo seguido do extrato da fronde. Estes resultados corroboram com os obtidos anteriormente neste estudo, onde foi verificado a presença de flavonoides no folíolo e no extrato da fronde com maior intensidade do que na raque e na pínula, influenciando diretamente na atividade biológica.

A quantidade de compostos fenólicos está diretamente relacionada ao aumento da atividade antioxidante, neste sentido o folíolo foi o que apresentou os melhores resultados nesta atividade. A raque foi o órgão que apresentou os menores resultados, na análise de LC-MS foi verificado que este órgão era o que apresentava menor teor nos compostos estudados.

5.5.3 DISCUSSÃO

Todos os ensaios realizados com os órgãos da fronde de *Dicksonia sellowiana* corroboram na identificação do órgão responsável pelo potencial terapêutico da espécie. Em todos os ensaios o órgão que mais se destacou foi o folíolo, apresentando maior rendimento de extração, maiores teores de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu, maior atividade antioxidante, maior intensidade dos flavonoides identificados por espectroscopia de massas e na análise de PCA dos extratos brutos por RMN, o folíolo foi o extrato que mais ficou próximo do extrato bruto da fronde.

Analisando os resultados, observa-se que a raque é a que apresenta resultados menos expressivos, desde o rendimento de extração até a quantidade de fenólicos totais bem como a atividade antioxidante. Estes resultados corroboram com outros estudos em que materiais de sustentação como raque, caule, raízes, casca, etc, são ricos em fibras e água,

apresentando menor rendimento de extração e menor quantidade e variedade de metabólitos secundários (Sousa, C. D. M. *et al.*, 2007; Zanella *et al.*, 2012).

Através dos resultados obtidos por diversas técnicas analíticas é possível verificar que a atividade antioxidante da espécie vegetal *Dicksonia sellowiana*, se concentra nos folíolos seguido da pínula e da raque respectivamente. Porém, como trata-se de uma espécie ameaçada de extinção, elaborar apenas extratos do folíolo desprezando as demais partes colaboraria ainda mais com a extinção da espécie. Como os resultados entre a fronde e do folíolo são similares, e a análise por PCA do RMN demonstra este fato, a utilização da fronde inteira nos ensaios farmacológicos são reforçados pela semelhança química e biológica entre estas amostras.

5.6 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS DA FRAÇÃO HEXANO DA FRONDE

5.6.1 β -Sitosterol

A partir da fração hexano foi feita uma coluna cromatográfica e isolado um composto e este foi identificado por RMN de ^1H e ^{13}C . A substância denominada VBO1 extraída da fração hexânica, tem aparência de cristais esbranquiçados. Conforme pode ser visualizado na figura 35, a presença do H-3 (multiplete) na região de 3,55-3,51 ppm e do hidrogênio olefínico H-6 em δH 5,35 ppm ($J = 5,1$ Hz, d) e o acúmulo de sinais na região de 0,60 - 2,40 ppm atribuídos à presença de vários hidrogênios metílicos, metínicos e metilênicos são sinais característicos do esteróide β -sitosterol. Pela análise dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT135 (Figuras 37 e 38) pode-se observar entre outros, sinais de carbonos insaturados em δC 140,76 (C), 121,74 (CH). Os dados de RMN estão presentes na tabela 08 e figuras 35, 36 e 37.

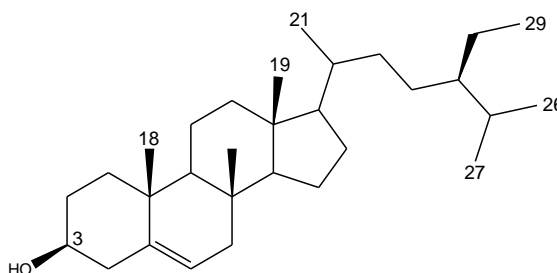


Figura 35 - Estrutura elucidada VBO1 (β -Sitosterol).

Com massa molecular de 414,71, ponto de fusão em 140°C e derivado da via do mevalonato, o β -sitosterol é uma esteroide presente em diversas espécies vegetais, estando presente nas membranas celulares das plantas como reforçador de membranas (Kongduang, Wungsintaweekul e De-Eknamkul, 2008). Entre estes fitoesteróis, o β -sitosterol tem sido principalmente o centro das atenções pelo cientistas e indústrias farmacêuticas.

Em uso humano, o β -sitosterol é utilizado como suplemento para o tratamento de hipercolesterolemia, hiperplasia benigna da próstata e também para proteger contra doenças cardiovasculares (Hamedi *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014). Além disso, devido à sua propriedade de redução do colesterol bem conhecido (Wong, 2014), esta substância sozinha ou em combinação com

outros fitoesteróis (na forma livre ou esterificado) é utilizado em uma variedade de alimentos, tais como suco de frutas, leite e iogurte (Hamedi *et al.*, 2014).

Tabela 7 - Comparação dos dados de deslocamentos químicos de RMN 13C (50,14 MHz em CDCl₃) de VBO1 com os dados da literatura para β-sitosterol.

C	VBO1	B-Sitosterol
1	37.26	37.25
2	31.68	31.64
3	71.82	71.81
4	42.32	42.29
5	140.76	140.73
6	121.74	121.72
7	31.92	31.89
8	31.92	31.89
9	50.15	50.12
10	36.53	36.40
11	21.10	21.08
12	39.79	39.78
13	42.33	42.29
14	56.77	56.75
15	24.33	24.30
16	28.26	28.24
17	56.06	56.05
18	11.88	11.87
19	19.42	19.38
20	36.17	36.16
21	19.04	19.03
22	33.96	33.94
23	39.79	39.12
24	45.85	45.83
25	26.08	26.03
26	18.78	18.76
27	19.82	19.81
28	23.07	23.06
29	11.99	11.99

Fonte do β-sitosterol: W. DAVID NES; ROBERT A. NORTON; MABRY BENSON (1992).

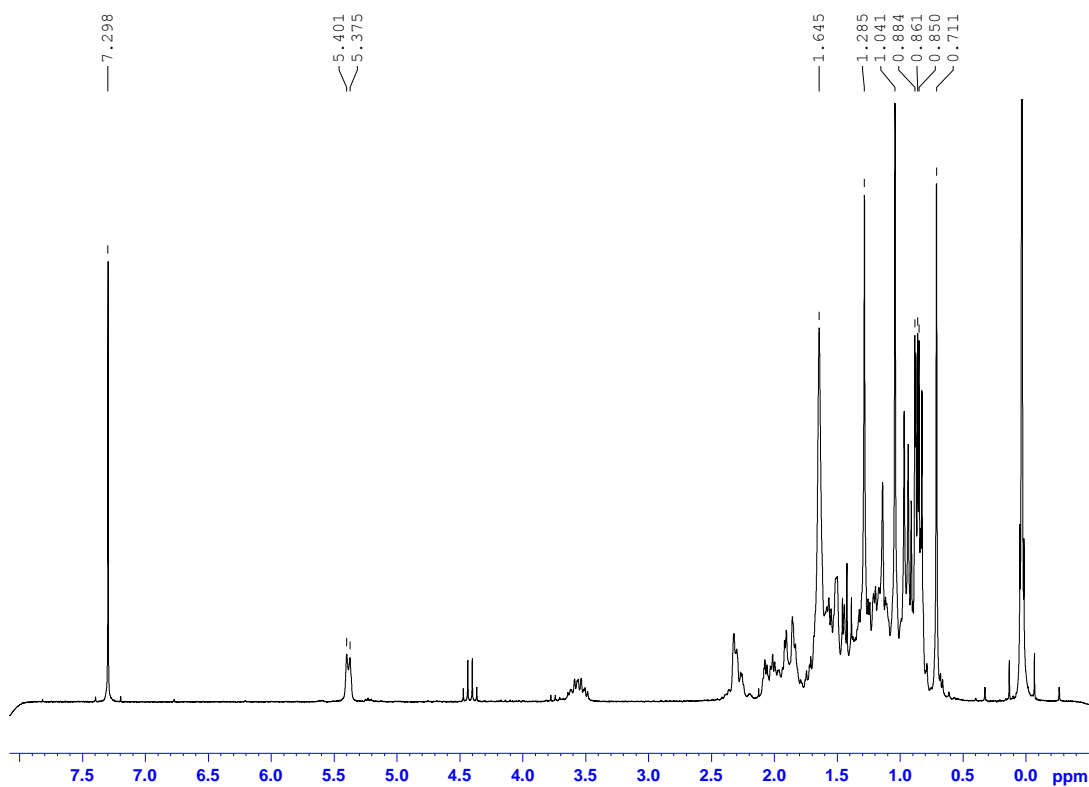


Figura 36 - Espectro de RMN ^1H para VBO1 (β -sitosterol) (200,12 MHz) em CDCl_3 .

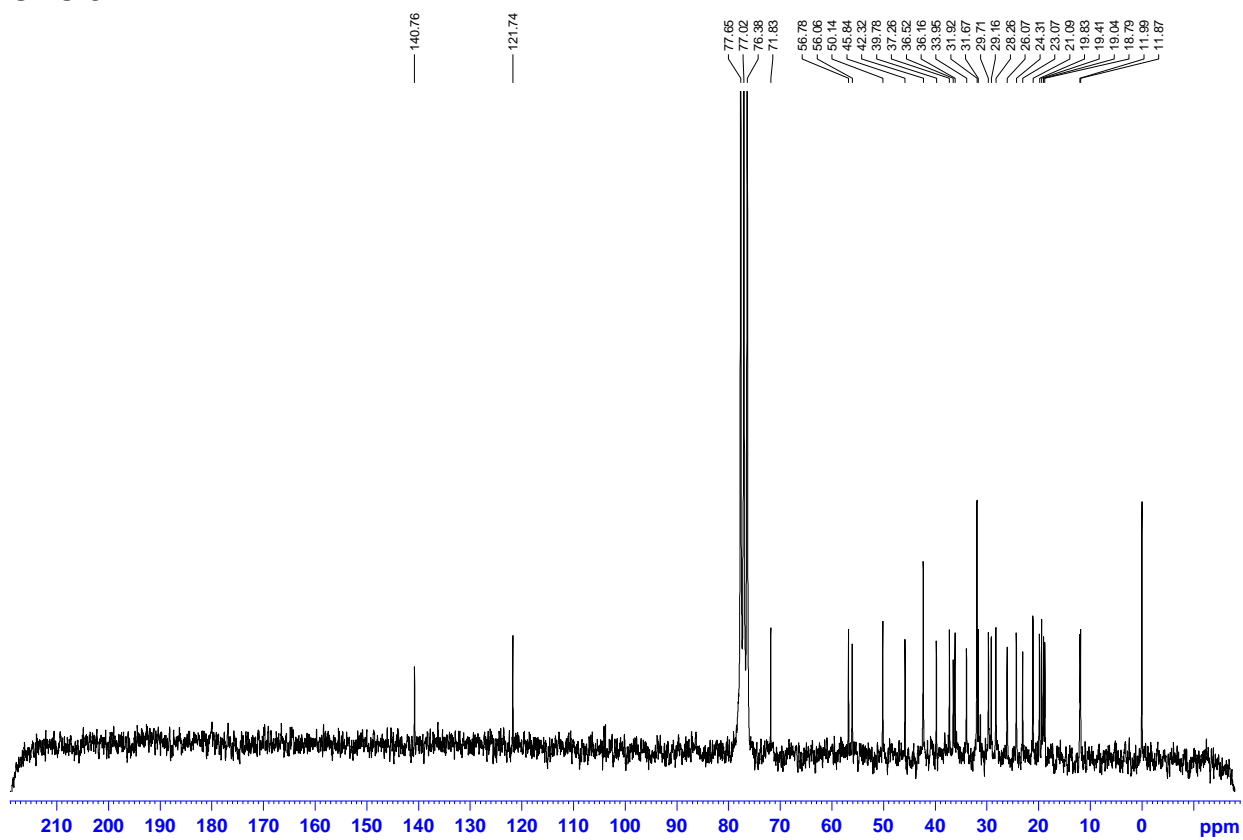


Figura 37 - Espectro de RMN ^{13}C para VBO1 (β -sitosterol) (50,56 MHz) em CDCl_3 .

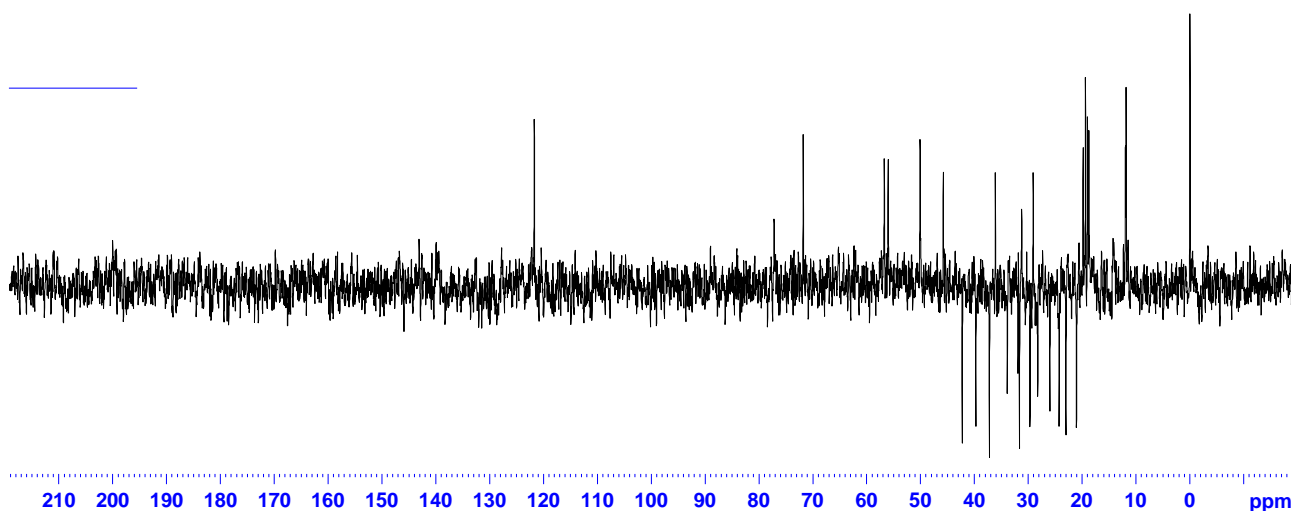


Figura 38 - Espectro de RMN ^{13}C /DEPT para VBO1 (β -sitosterol) em CDCl_3 .

Em relação à segurança ao uso de β -sitosterol como um suplemento disponível em farmácias e indústrias de alimentos, foram abordados em diferentes estudos *in vivo* e clínicos (Nestel *et al.*, 2001; Clifton *et al.*, 2004). A falta de quaisquer efeitos adversos nestes estudos levou à aprovação pelo FDA de segurança para a utilização de fitoesteróis e seus derivados esterificados nos EUA e do Comité Científico da União Europeia, exceto para os indivíduos com sitosterolemia, uma desordem autossômica recessiva rara (Lee, Lu e Patel, 2001).

5.6.2 MISTURA DE FITOSTERÓIS

No espectro de ^1H no RMN (Figura 39) observam-se sinais característicos de hidrogênios olefínicos trans em δH 5,15 ppm ($J = 8,2$ e $15,2$ Hz, dd) atribuído ao H-22 e δH 5,01 ppm ($J = 8,2$ e $15,2$ Hz, dd) atribuído ao H-23 do estigmasterol. A presença do H-3 (multiplete) na região de 3,52 ppm e do hidrogênio olefínico H-6 em δH 5,35 ppm ($J = 5,1$ Hz, d) e o acúmulo de sinais na região de 0,60 - 2,40 ppm atribuídos à presença de vários hidrogênios metílicos, metínicos e metilênicos são sinais característicos dos esteróides β -sitosterol, estigmasterol e campesterol. Pela análise dos espectros de RMN ^{13}C (Figura 40) e DEPT pode-se observar entre outros sinais de carbonos insaturados em δC 140,77 (C), 121,72 (CH), 138,33 (C) e 129,28 (CH). Baseado nos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C e por comparação destes com os dados encontrados na literatura (ANDRADE, 2003) (Tabela 9) a mistura de

fitosteróis foi identificado como uma mistura de β -sitosterol, estigmasterol e campesterol.

Tabela 8 - Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (50,14 MHz em CDCl_3) da mistura de fitosteróis

C	B-sitosterol	Campesterol	Estigmasterol
1	37,27	37,27	37,27
2	31,65	31,65	31,65
3	71,82	71,82	71,82
4	42,29	42,29	42,29
5	140,77	140,77	140,77
6	121,72	121,72	121,72
7	31,91	31,91	31,91
8	31,91	31,91	31,91
9	50,15	50,15	50,15
10	36,52	36,52	36,52
11	21,09	21,09	21,09
12	39,79	39,79	39,79
13	42,29	42,29	42,29
14	56,78	56,78	56,78
15	24,32	24,32	24,32
16	28,26	28,26	28,26
17	56,07	56,07	56,07
18	11,87	11,87	11,87
19	19,41	19,41	19,41
20	36,16	36,16	40,5
21	19,04	19,41	21,22
22	33,96	33,96	138,3
23	39,79	39,79	129,2
24	45,85	45,85	51,25
25	26,09	26,09	19,04
26	18,79	18,79	19,04
27	19,83	19,41	19,41
28	23,08	23,08	25,42
29	11,99	-	11,99

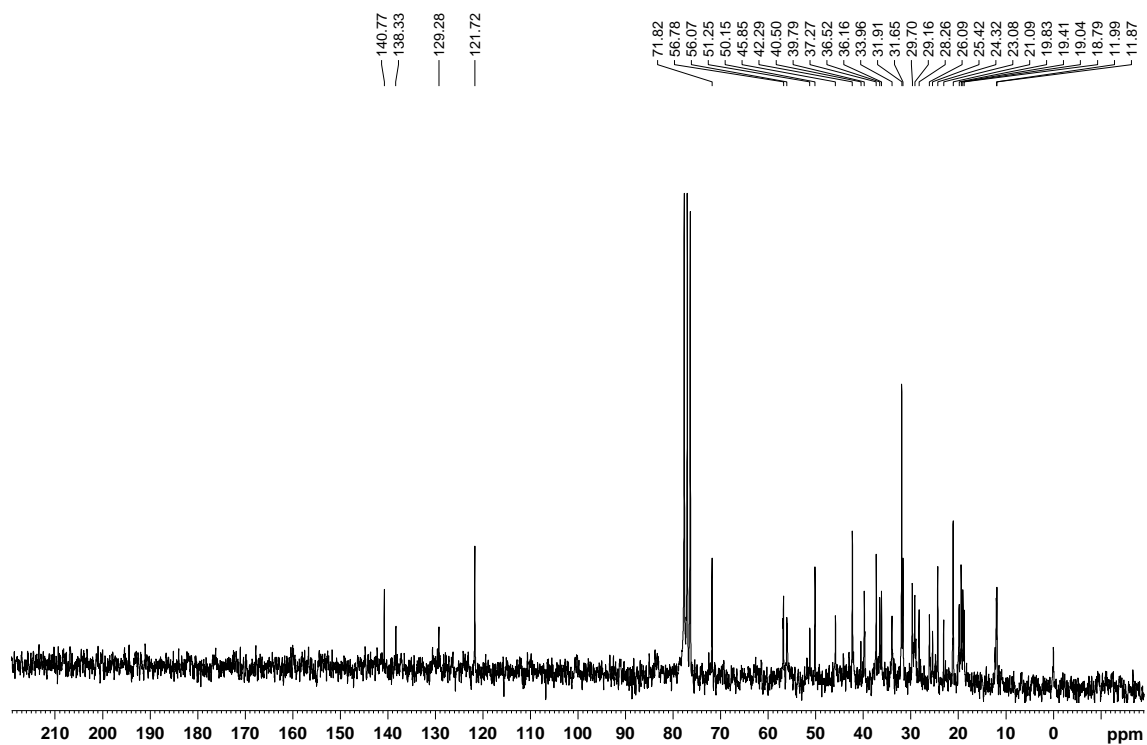


Figura 39 - Espectro de ^1H RMN da mistura de fitosteróis

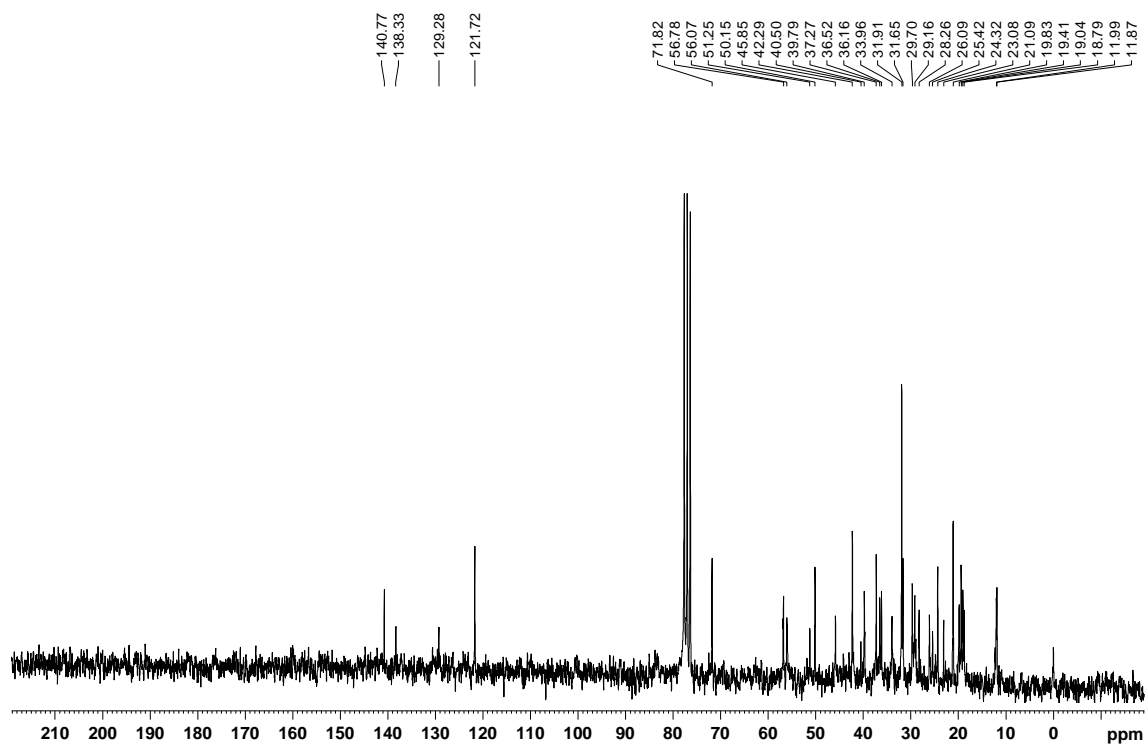


Figura 40 - Espectro de ^{13}C RMN da mistura de fitosteróis

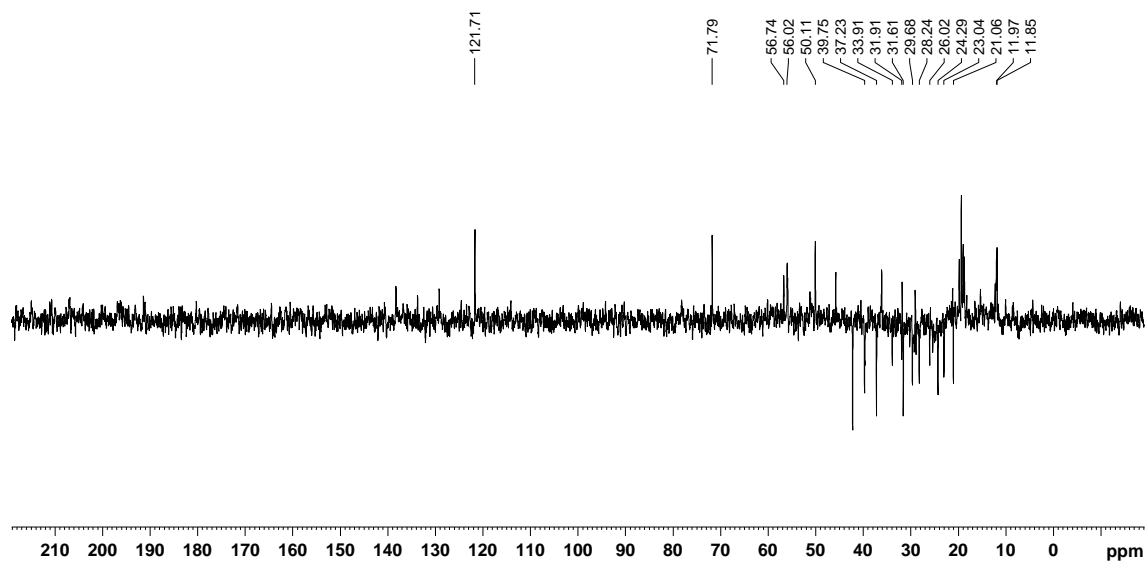


Figura 41 - Espectro de DEPT RMN da mistura de fitosteróis

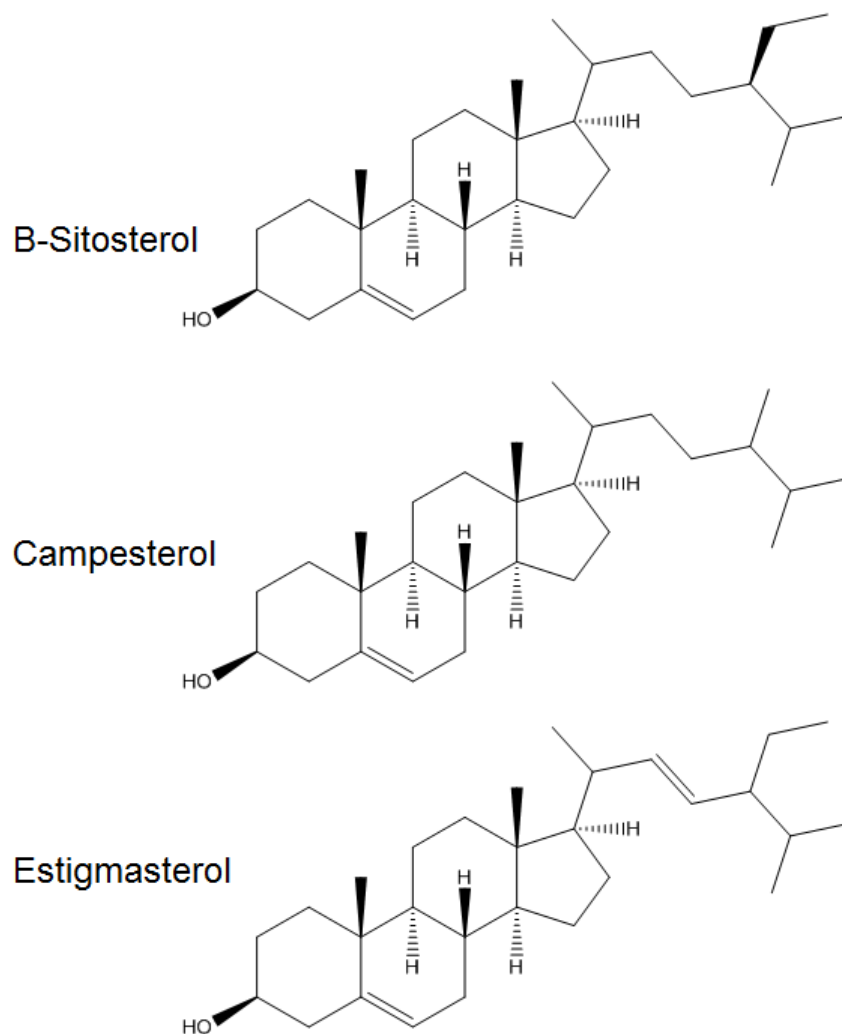


Figura 42 - Estruturas dos esteróides identificados na mistura

β -sitosterol (24 α -ethylcholesterol), campesterol (24 α -methylcholesterol), e estigmasterol (Δ 22, 24 α -ethylcholesterol) são exemplos de esteróis que são predominantemente encontrados em plantas superiores, bem como na alimentação humana (Kongduang, Wungsintaweekul e De-Eknamkul, 2008). Estes esteroides diferem quanto à configuração da cadeia lateral e ao padrão de ligação do anel esteroide. A hidrogenação dos fitosteróis forma fitosteróis saturados, tais como o campestanol e o sitostanol, denominados estanóis (Martins *et al.*, 2004).

No organismo humano, os fitosteróis atuam na diminuição da absorção de colesterol no intestino delgado, através de um mecanismo de competição com conseqüente aumento na excreção fecal do colesterol. Esta competição ocorre porque a estrutura química dos fitosteróis é semelhante a do colesterol, diferindo no tamanho da cadeia (Wu *et al.*, 2014). Os fitosteróis saturados atuam com maior eficiência na absorção do colesterol do que os fitosteróis insaturados como o β -sitosterol (Martins *et al.*, 2004).

5.7 ESTUDOS REALIZADOS COM A SUBSTÂNCIA ÁCIDO GÁLICO

5.7.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICA DO ÁCIDO GÁLICO

O ácido gálico (figura 43) é um ácido orgânico, quimicamente conhecido como ácido 3,4,5-triidroxibenzoico, sendo encontrado em diversas espécies de vegetais. Com fórmula química é $C_6H_2(OH)_3COOH$, o ácido gálico é encontrado na forma livre e também como parte de taninos. Para os ensaios, foi utilizado o padrão ácido gálico (Sigma-Aldrich), para elucidação das características físico-químicas da substância foram utilizadas às técnicas de espectroscopia de absorção ultravioleta, ressonância nuclear magnética, ponto de fusão e através de técnica de HPLC.

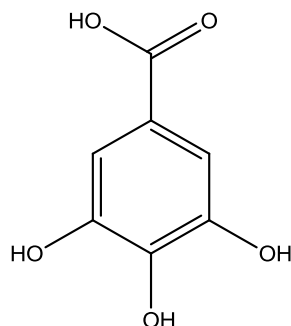


Figura 43 - Estrutura química do Ácido Gálico

O espectro de absorção na região do UV do ácido gálico (figura 44) apresentou bandas de absorção em 273 nm e 222 nm semelhante ao descrito por outros trabalhos (Takeshita, Sakagami e Itoh, 1969).

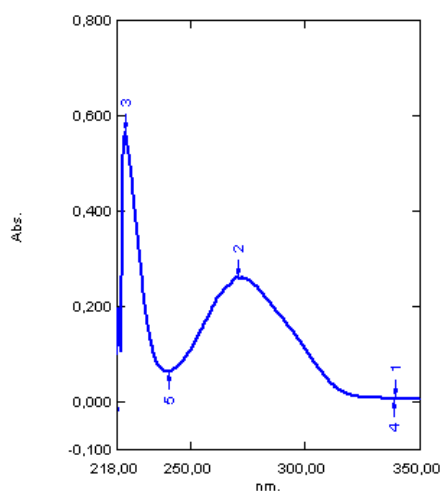


Figura 44 - Espectro de absorção no UV do ácido gálico

Analisando os espectros de RMN, verificou-se o aparecimento de sinais de $\delta = 5,10$ ppm no espectro ^1H -RMN, respectivo as 3 hidroxilas no anel aromático e um sinal em $\delta = 7,08$ ppm correspondente aos dois hidrogênios do anel aromático que são correspondentes, esses valores indicam a presença de núcleo aromático, que se confirmou pela presença de cinco sinais de carbono acima de $\delta = 100$ ppm, no espectro de ^{13}C -RMN, sendo que o sinal 169,05 ppm ocorreu em região típica para carbonila, restando os quatro sinais do núcleo aromático.

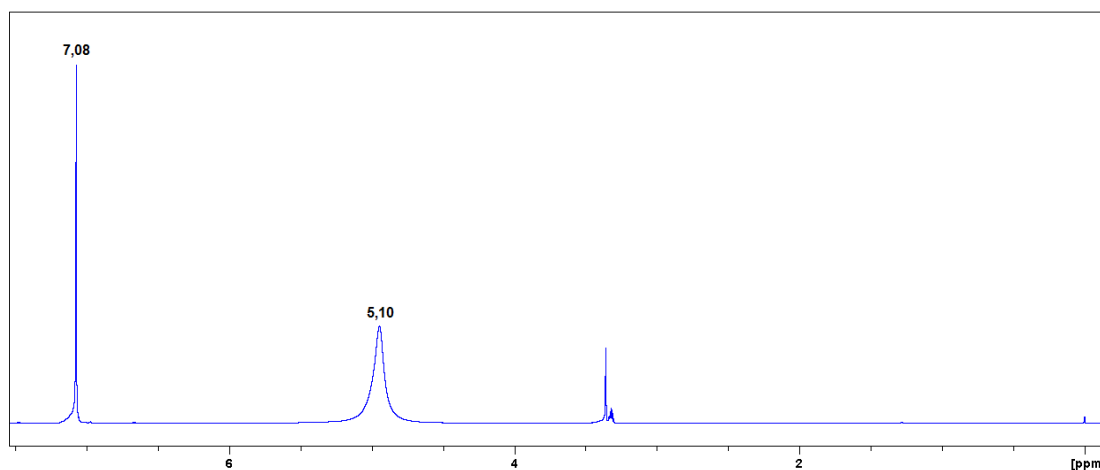


Figura 45 - Espectro de H-RMN do ácido gálico

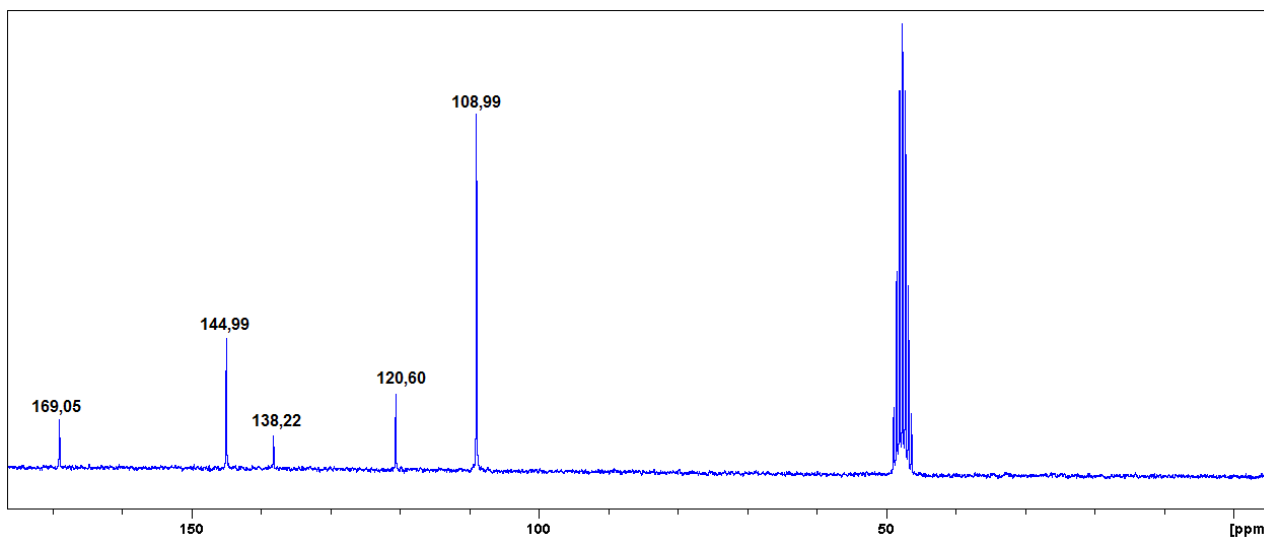


Figura 46 - Espectro de C-RMN do Ácido Gálico

O cromatograma do padrão Ácido Gálico demonstra a pureza da substância que será utilizada nos demais ensaios, conforme pode ser visualizado na figura 47.

Tabela 9 - Tempo de retenção e lambda máximo da substância ácido gálico

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

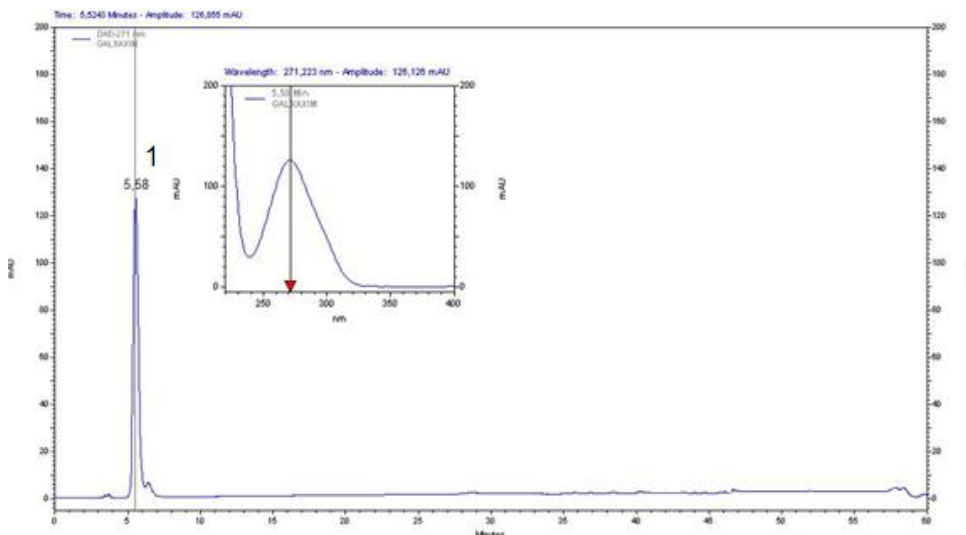


Figura 47 - Cromatograma do Ácido Gálico

Estes ensaios físico-químicos comprovam a pureza da substância para a realização das demais atividades biológicas.

5.7.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para avaliação da atividade antioxidante do ácido foi utilizado dois modelos de atividade antioxidante comparando com dois padrões reconhecidos por sua atividade antioxidante. Os modelos utilizados foram a redução do complexo fosfomolibdênio e por DPPH utilizando como padrões a vitamina C e rutina.

Na atividade antioxidante pelo método fosfomolibdênio o ácido gálico apresentou atividade superior ao padrão rutina e inferior ao padrão ácido ascórbico, como visualizado na tabela 11.

Tabela 10 - Atividade antioxidante do ácido gálico pelo método de fosfomolibdênio

Amostra	Atividade Antioxidante em relação à rutina (%)	Atividade Antioxidante em relação à vitamina C (%)
Ácido Gálico (200 µg/mL)	158,21	47,60
Rutina (200 µg/mL)	100	34,15
Vitamina C (200 µg/mL)	292,82	100

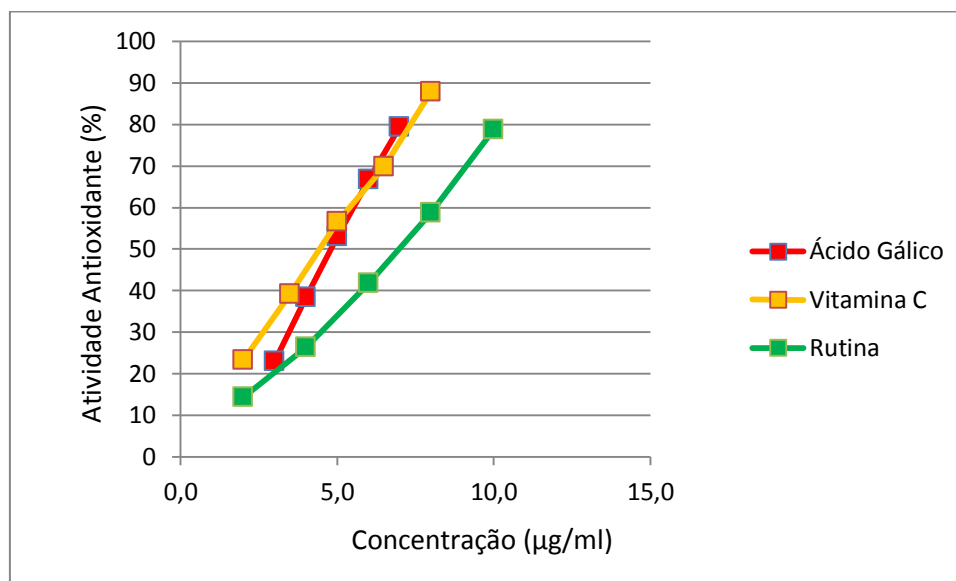
Resultados semelhantes foram encontrados na avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH, conforme pode ser visualizado na tabela 12.

Tabela 11 - Atividade antioxidante do ácido gálico pelo método DPPH

Amostra	IC50 (µg) ± DP	Classificação do Teste de Tukey
Vitamina C	4.4696 ± 0,029501	a1
Ácido gálico	4,850367 ± 0,003412	a1
Rutina	5.6510 ± 0,158521	a1

O gráfico 5 mostra a proximidade da porcentagem de atividade antioxidante em relação as concentrações do ácido gálico frente aos padrões vitamina C e rutina.

Gráfico 5 - Relação da atividade antioxidante do ácido gálico frente aos padrões vitamina C e Rutina



A atividade da substância ácido gálico é bem relatada na literatura científica (Inoue *et al.*, 2000; Ossipov *et al.*, 2003; Badhani, Sharma e Kakkar, 2015), e, através dos experimentos, é possível verificar que em ambos os ensaios realizados o ácido gálico obteve uma atividade entre os padrões testados, já conhecidos por sua atividade antioxidante.

A atividade da substância por ambos os modelos sugerem que a substância é versátil quanto a um mecanismo de ação. No ensaio de fosfomolibdênio é possível verificar o poder redutor da substância, já no modelo do DPPH verificou-se o sequestro do radical livre. Outros trabalhos sugerem ainda que o ácido gálico possui ação contra a peroxidação lipídica (Badhani, Sharma e Kakkar, 2015).

Estas atividades são de fundamental importância com a finalidade de verificar possíveis ações do ácido gálico, como por exemplo, em modelos de atividades antitumorais, onde esta substância tem demonstrado um potencial enorme com grande versatilidade (Chia *et al.*, 2010; Locatelli, C., Filippin-Monteiro, F. B. e Creczynski-Pasa, T. B., 2013; Subramanian *et al.*, 2014).

5.7.3 ATIVIDADES ANTINEOPLÁSICAS NO MELANOMA

O melanoma é um tipo de câncer de pele proveniente da transformação maligna de melanócitos, células responsáveis pela produção de melanina. Sua incidência é baixa quando comparada com a de outros tipos de tumores de pele, representando apenas 4% destes, mas é o mais letal de todos eles. A incidência deste tipo de câncer tem aumentado mais do que qualquer outro tipo de câncer. Apresentando taxa de sobrevida maior que 90% quando detectado precocemente, esta diminui para 60% em formas mais avançadas como melanoma estágio II, para 10% em melanoma estágio III, ou até para completa fatalidade em casos de melanoma estágio IV (Silva e Jasiulionis, 2014).

A radiação ultravioleta (UV) tem sido reconhecida como o principal fator ambiental implicado na alteração da síntese de melanina, regulados principalmente pela tirosinase nos melanócitos e/ou células de melanoma (Slominski *et al.*, 2004). Alguns efeitos nocivos sobre a pele devido à produção excessiva de melanina tem sido extensivamente estudados (Su *et al.*, 2013; Chaabane *et al.*, 2014), porque a melanina pode possuir propriedades tanto fotoprotetores ou fototóxicas e seu excesso pode ser biologicamente tóxico e mutagênico que provavelmente aumenta o risco de melanoma maligno, especialmente em indivíduos de pele clara (Panich *et al.*, 2012).

O melanoma é altamente resistente à quimioterapia convencional; é uma doença invasiva que mostra metástases preferencial para o cérebro, pulmão, fígado e pele (Chen *et al.*, 2009). A região do UVA (315-400 nm) tem sido demonstrado como desencadeador da melanogênese em associação com o aumento do estresse oxidativo causado por produção excessiva de oxidantes e/ou pela deterioração da rede de defesa antioxidante em melanócitos. Vários estudos têm demonstrado que células de melanoma têm uma diminuição da capacidade de lidar com o estresse oxidativo em comparação com melanócitos normais, resultando em uma contínua acumulação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Panich *et al.*, 2011; Silva e Jasiulionis, 2014).

O ácido gálico é um componente intermediário no metabolismo das plantas e tem sido associado a uma grande variedade de ações biológicas como antioxidante, antifúngica, antibacteriana, antimalárica e ação anti-herpética (Tragoolpua e Jatisatienr, 2007; Sharma *et al.*, 2013; Badhani, Sharma e Kakkar, 2015). No entanto, o principal interesse em ácido gálico e

seus derivados está relacionada com a sua atividade antitumoral (Ho *et al.*, 2013; Locatelli, Claudriana, Filippin-Monteiro, Fabíola Branco e Creczynski-Pasa, Tânia Beatriz, 2013). Tem sido demonstrado que o ácido gálico pode de induzir a apoptose em linhagens de células tumorais e inibir a proliferação de linfócitos (Liu *et al.*, 2014). Outros estudos sugerem que a apoptose induzida por ácido gálico e seus análogos está associada a alterações do metabolismo oxidativo, disfunção mitocondrial, um aumento em níveis de Ca_{2+} intracelulares causando ativação caspase, e fragmentação de DNA (Verma, Singh e Mishra, 2013). No entanto, o mecanismo de indução de apoptose por ácido gálico em células tumorais ainda não está bem definido, embora haja evidências de que a formação de radicais livres esteja envolvido (Badhani, Sharma e Kakkar, 2015).

A atividade citotóxica dos derivados fenólicos depende da sua taxa de incorporação em células, estando diretamente relacionada com a sua lipofilia, tanto quanto à sua atividade antioxidante. Ambas estas propriedades são afetadas pela presença de grupos hidroxila e por substituintes e o comprimento da porção éster, em ésteres fenólicos poli-hidroxilados (Fiuza *et al.*, 2004).

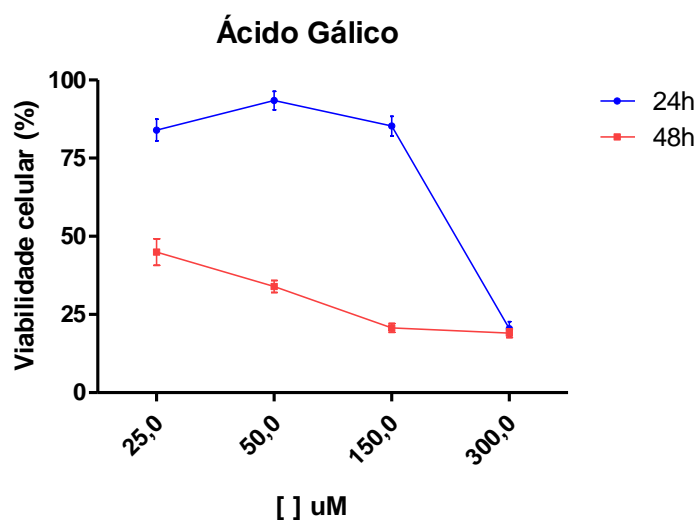


Figura 48 - Viabilidade celular das células após 24 e 48 horas em exposição ao Ácido Gálico

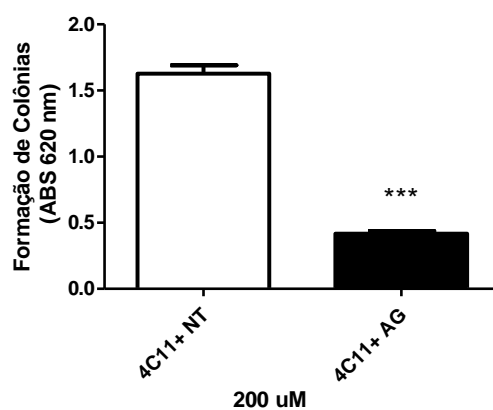


Figura 49 - Ensaio de formação de colônias na concentração de 200uM do Ácido Gálico e padrão

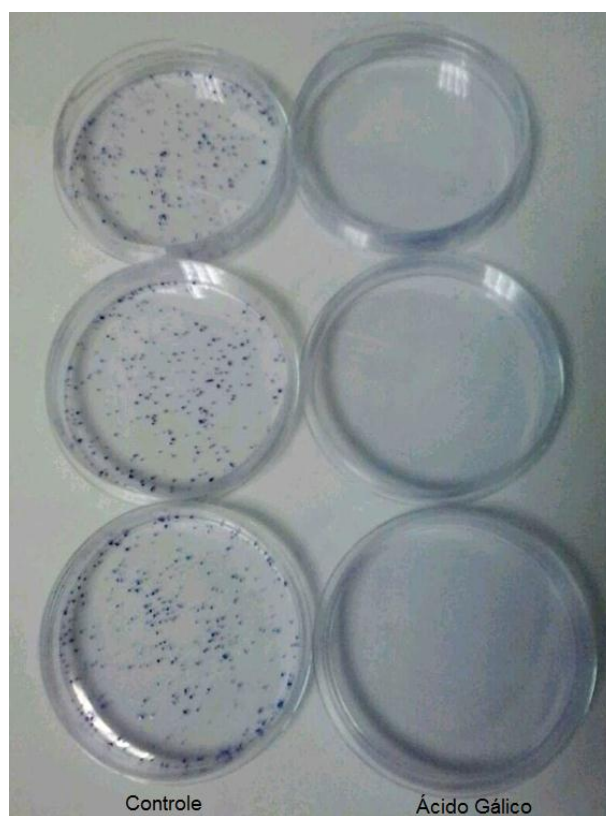


Figura 50 - Formação das colônias no controle negativo e na placa contendo ácido gálico

Conforme visualizado nas figuras 48 – 50 é possível verificar que a substância ácido gálico apresenta atividade contra esta linhagem de melanoma, porém ainda é necessário realizar mais ensaios para demonstrar

qual o mecanismo de ação e se esta substância não mata as células normais também. Os ensaios nas linhagens celulares estão em andamento.

5.7.4 ATIVIDADE SOBRE NEUTRÓFILOS HUMANOS

Este ensaio foi realizado após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFPR do projeto intitulado “Estudo de produtos naturais sobre a função dos neutrófilos humano” sob registro CEP/SD 1033.158.10.11/ CAAE 0090.0.091.000-10 (Anexo 2).

Os resultados observados com o ácido gálico estão representados na tabela 13 e figuras 51 e 52. Os resultados estão expressos como ativação positiva (+) e negativa (-).

Tabela 12 - Atividade do ácido gálico sobre neutrófilos humanos

Amostra	Controles			Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			
	SNBT	CNBT	PMA($10,0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) ¹⁾	2,5	5,0	10,0	15,0
Ácido Gálico	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

NOTA: SNBT = sem NBT; CNBT = com NBT; (-) = ativação negativa; (+) = ativação positiva.

É possível observar que a substância ácido gálico em todas as concentrações ativou os neutrófilos. Nas figuras 51 e 52 é possível observar fotos dos controles negativos (neutrófilos (A), neutrófilos com NBT (B) e positivo (neutrófilo com PMA) utilizados no experimento.

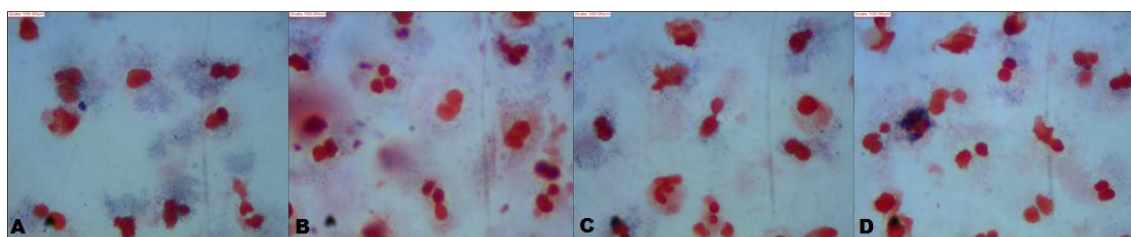


Figura 51 - Neutrófilos ativados com 2,5 (A), 5,0 (B), 10 (C) e 15 (D) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ácido gálico

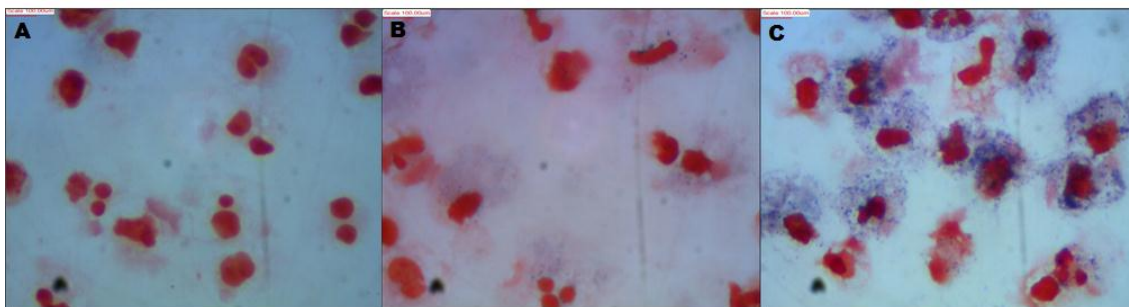


Figura 52 - Controles da atividade sobre neutrófilos humanos. A) Neutrófilos B) Neutrófilos com NBT C) Neutrófilos com PMA

Os neutrófilos fazem parte da porção do sangue responsável pela defesa ou imunidade do organismo, sendo especializadas no combate a bactérias e fungos. O aumento de neutrófilos no sangue está relacionado com diversas patologias como infecções, inflamações, diabetes, leucemia, câncer entre outros.

Quando estimulados, são capazes de produzir um metabolismo oxidativo caracterizado pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) que são essenciais para a defesa contra microrganismos na fagocitose (BRIHEIM et al., 1984). A produção destes radicais pode ser visualizada através da redução do azul p-Nitrotetrazólio (NBT) levando à formação de um produto de coloração azul (formazan) que se deposita no citoplasma do neutrófilo (FORTE et al., 1999), observado nas amostras que apresentaram ativação positiva, como o PMA.

A inflamação é uma resposta desencadeada por traumas, lesões teciduais ou invasão por agentes infecciosos, entre as características dos processos inflamatórios destaca-se o rubor (vermelhidão), tumor (edema), calor (hipertermia) e dor (Rang *et al.*, 2012). Entre as células presentes no sangue periférico, os neutrófilos possuem importante papel nas fases precoces nos processos inflamatórios, sendo sensíveis a agentes quimiotáticos e substâncias liberadas por mastócitos e basófilos (Haslett, 1997; Sreeramkumar *et al.*, 2014).

Substâncias que estimulam os neutrófilos a liberarem radicais ativos de oxigênio, podendo ser estudadas para a utilização em doenças que apresentam defeito funcional desses fagócitos, como por exemplo, a doença

granulomatosa crônica, ou em outras doenças como parasitárias e bacterianas, em que a ativação dos neutrófilos para liberação de espécies reativas de oxigênio seja necessária (DIAS, 2012).

O dano tecidual inicia uma sequência de eventos conhecidos como resposta inflamatória, sendo os neutrófilos as primeiras células a migrar para o sítio inflamatório (Haslett, 1997). Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes no sangue periférico, com importante papel nas fases precoces das reações inflamatórias e sensíveis a agentes quimiotáticos como produtos de clivagem de frações do complemento e substâncias liberadas por mastócitos e basófilos (Sreeramkumar *et al.*, 2014).

Os neutrófilos possuem a capacidade de fagocitar micro-organismo e/ou fragmentos, e neste processo ocorre uma série de eventos como a liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO) com o objetivo de eliminar o micro-organismo, neste processo dependendo da intensidade da ativação celular, os neutrófilos podem liberar grandes quantidades de ERO e os conteúdos dos grânulos no espaço extracelular, isto pode causar diferentes tipos de doenças, tais como: inflamação crônica (artrite reumatoide, vasculite e outras doenças autoimunes), doenças do sistema cardiovascular (arteriosclerose, isquemia miocárdica, lesão induzida por reperfusão), neurodegenerativas (esclerose múltipla, mal de Parkinson, Alzheimer), além de câncer, lesões hepáticas e doenças pulmonares obstrutivas crônicas (Fuzissaki; Mayer-Scholl, Averhoff e Zychlinsky, 2004; Fuzissaki, 2009).

A presença de ERO no espaço extracelular é controlada por moléculas antioxidante, impedindo que estes compostos reativos causem danos ao tecido (Brinkmann *et al.*, 2004). Neste sentido as espécies vegetais são potenciais fontes de substâncias antioxidante com a capacidade de sequestrar estes EROs minimizando os riscos a saúde (Beara *et al.*, 2015).

6 CONCLUSÃO

As amostras de *Dicksonia sellowiana* Presl. Hook coletadas na cidade de Inácio Martins – PR foram analisadas e encontram-se dentro dos parâmetros estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira quanto ao teor de umidade, cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido.

Na análise morfoanatômica, realizou-se os experimentos de microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura e os experimentos histoquímicos. Estas análises são fundamentais para futura identificação da espécie. Destaca-se a presença de compostos do metabolismo secundário identificados nos testes histoquímicos.

Nos ensaios fitoquímicos preliminares e com o auxílio de CCD utilizando reações específicas de caracterização foram identificados a presença de esteroides, flavonoides, taninos hidrolisáveis e condensados, cumarinas, ácidos fixos e aminogrupos.

No bioensaio da germinação da avaliação da atividade alelopática foi possível observar que somente o EB na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram capazes de inibir o IVG e o tamanho da radícula da alface mas não interferiu na massa seca.

Na avaliação dos métodos de extração foi verificado que o método de extração e o solvente utilizado interferem diretamente na qualidade do extrato vegetal. Nestas análises foi possível verificar que o extrato de *Dicksonia sellowiana* apresenta atividade antioxidante e que esta está diretamente relacionada com o alto teor de compostos fenólicos sendo principalmente as proantocianidinas. Os cromatogramas demonstraram diferenças na intensidade de picos cromatográficos ou a ausência de determinados sinais. O rendimento de extração foi melhor nos métodos a quente do que nos métodos a frio, com maior destaque para os solventes hidroalcoólicos. Concluindo, os melhores métodos foram o decocto e turbólise hidroalcoólicos levando em consideração os resultados obtidos, porém o soxhlet foi o que apresentou melhor rendimento, neste sentido os extratos obtidos por soxhlet foram considerados como extração total da espécie vegetal.

Analisando os órgãos da fronde de *Dicksonia sellowiana* foi possível identificar que a atividade se encontra nos folíolos, com maior presença de metabólitos secundários como taninos e flavonoides apresentando melhores

atividades nos modelos testados. Na análise das frações acetato de etila foi possível verificar por análise de UPLC-MS a presença de diversos flavonoides derivados da quercetina e kaempferol além de outras substâncias com alta massa molecular. Nesta análise verificou-se a presença e ausência de picos cromatográficos em determinados órgãos da fronde e os que apresentaram maior intensidade dos picos cromatográficos apresentou a maior atividade antioxidante. O experimento de ^1H -RMN com análise de PCA concluiu o que os demais experimentos demonstraram que as substâncias, as atividades e o maior rendimento está no folíolo e que este é o extrato mais parecido com o extrato bruto da fronde de xaxim.

Foram identificados três fitosteróis presentes na fração hexano da espécie vegetal estudada, os quais foram identificados como β -sitosterol, campesterol e estigmasterol.

Nos ensaios com a substância ácido gálico, verificou-se que a mesma está dentro dos padrões de pureza, apresentando atividade antioxidante, atividade contra células de melanoma e estimulam os neutrófilos humanos a liberar ânions superóxido, porém, mais estudos são necessários para verificar seu mecanismo de ação e sua toxicidade.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

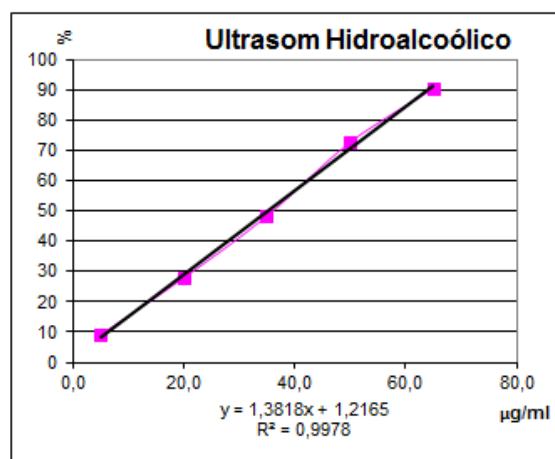
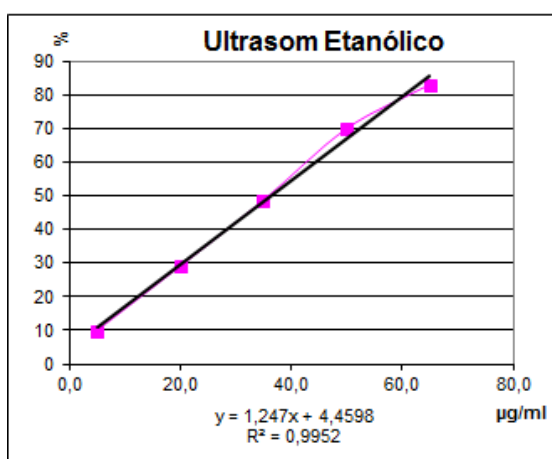
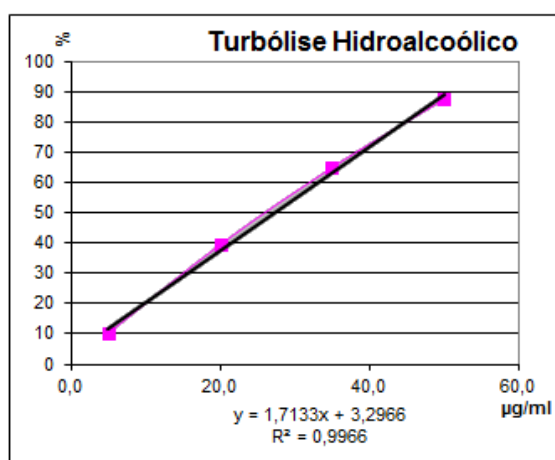
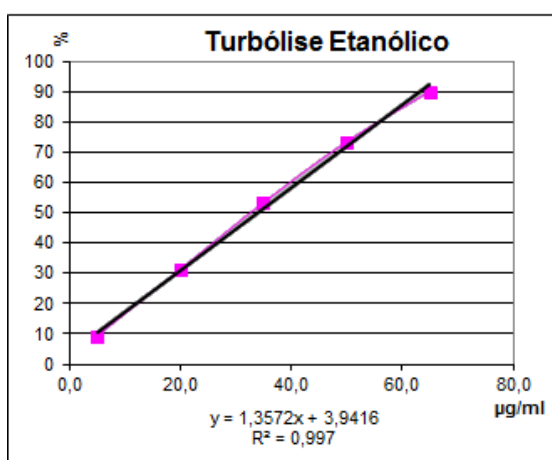
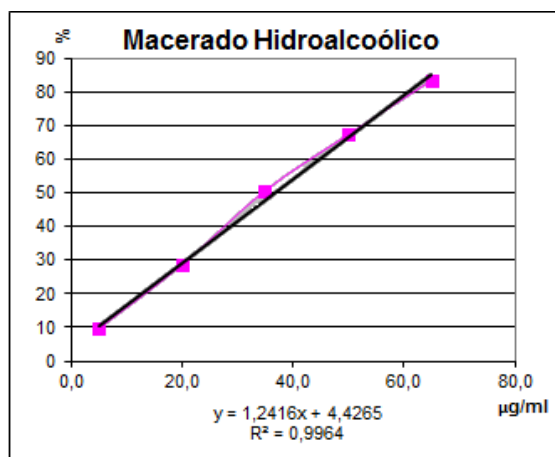
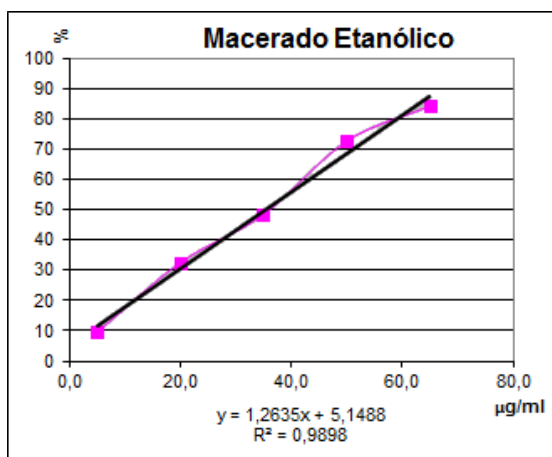
Os resultados apresentados neste trabalho juntamente com os realizados no mestrado, confirmam que a espécie vegetal *Dicksonia sellowiana* da família Dicksoniaceae, tem potencial de se tornar um medicamento fitoterápico. A espécie apresenta em sua constituição fitoquímica esteroides, flavonoides e uma grande quantidade de taninos e estes grupos são responsáveis por diversas atividades farmacológicas já reconhecidas cientificamente.

O ácido gálico é um tanino hidrolisável e demonstrou haver uma expressiva atividade antioxidante, além de possuir atividade contra o melanoma e como imunomoduladora, porém outros estudos ainda precisam ser realizados para a verificação do potencial tóxico da substância em questão.

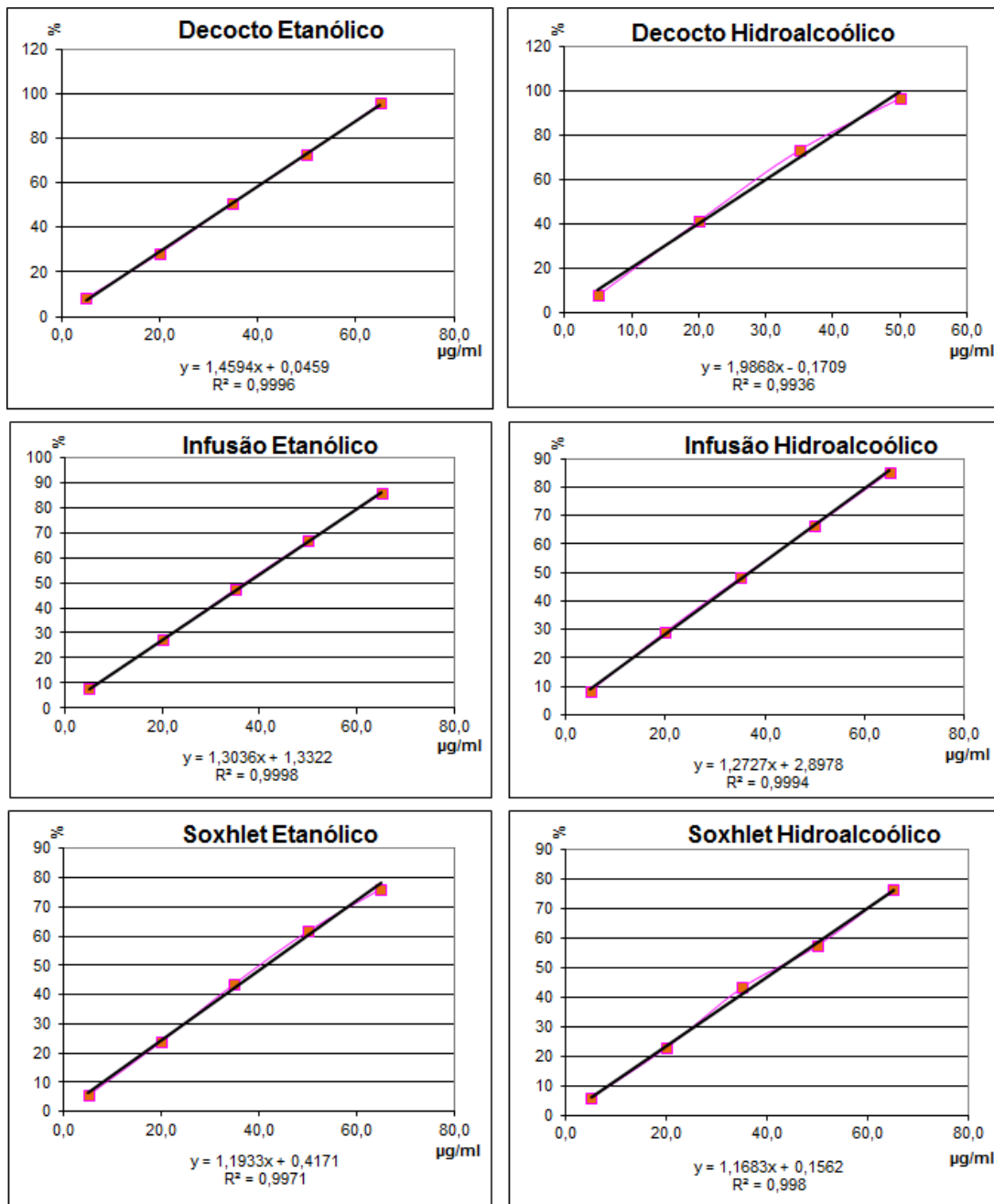
Diante dos resultados apresentados neste trabalho, através das análises realizadas nas frondes de *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook, é possível inferir à ela propriedades de influência em sistemas biológicos, sendo considerada uma espécie de interesse para futuras investigações de suas atividades farmacológicas e toxicológicas, com potencial desenvolvimento de futuros medicamentos.

ANEXOS

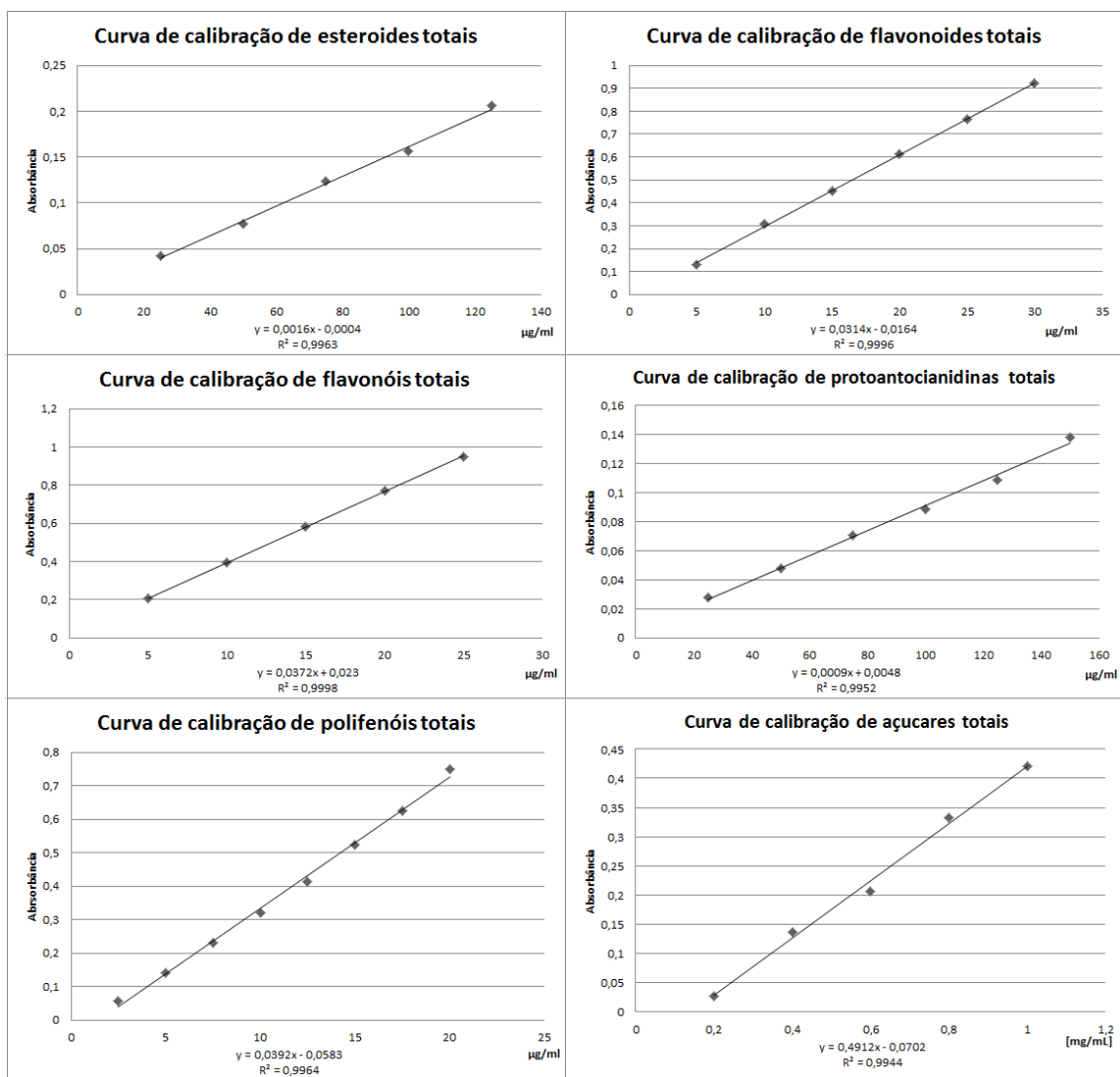
Anexo 1: Curvas dos extratos brutos a frio pela redução do radical DPPH



Anexo 2: Curvas dos extratos brutos a quente pela redução do radical DPPH



Anexo 3: Curvas de calibração dos doseamentos totais



REFERÊNCIAS

ABREU, J. et al. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, p. 1133-1139, 2009. ISSN 1519-6984. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842009000500018&nrm=iso >.

ABU-REIDAH, I. M. et al. HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. **Food Chemistry**, v. 166, p. 179-191, 1/1/ 2015. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614008978> >.

AMARAL, M. D. P. H. D. et al. Determinação do teor de cumarina no xarope de guaco armazenado em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 607-611, 2009. ISSN 0102-695X. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2009000400017&nrm=iso >.

ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. 5°. Brasília: Atheneu, 2010.

ARNON, D. I. COPPER ENZYMES IN ISOLATED CHLOROPLASTS. POLYPHENOLOXIDASE IN BETA VULGARIS. **Plant Physiology**, v. 24, n. 1, p. 1-15, 1949. ISSN 0032-0889 1532-2548. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC437905/> >.

BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **RSC Advances**, v. 5, n. 35, p. 27540-27557, 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C5RA01911G> >.

BAMPOULI, A. et al. Comparison of different extraction methods of *Pistacia lentiscus* var. chia leaves: Yield, antioxidant activity and essential oil chemical composition. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 1, n. 3, p. 81-91, 9// 2014. ISSN 2214-7861. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214786114000254> >.

BANERJEE, A. et al. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin: Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, n. 2, p. 134-139, 7/30/ 2008. ISSN 0009-2797. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279708002731> >.

BEARA, I. et al. Phenolic profile and anti-inflammatory activity of three *Veronica* species. **Industrial Crops and Products**, v. 63, n. 0, p. 276-280, 1// 2015. ISSN 0926-6690. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669014005792> >.

BEDNARCZUK, V. O. et al. **Testes in vitro e in vivo utilizados nas triagem toxicológica de produtos naturais.** Visão Acadêmica. 11 2010.

BERLYN, G. P.; MIKSCH, J. P. Reviews. **New Phytologist**, v. 78, n. 1, p. 245-254, 1977. ISSN 1469-8137. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.1977.tb01562.x> >.

BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos: 1976.

BHATIA, A. et al. Metabolic profiling for studying chemotype variations in *Withania somnifera* (L.) Dunal fruits using GC-MS and NMR spectroscopy. **Phytochemistry**, v. 93, p. 105-115, 9// 2013. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942213000897> >.

BORA, K. et al. **DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE POLIFENÓIS E DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DAS DIFERENTES FRAÇÕES DO EXTRATO DE FOLHAS DE *Dicksonia sellowiana*, (Presl.) Hook, DICKSONIACEAE.** Revista Visão Acadêmica. 6: 6-15 p. 2005.

BORBA, P. A. A. et al. desenvolvimento e validação de um método analítico por espectrofotometria UV para quantificação de carvedilol. **Quim. Nova**, v. 36, n. 4, p. 582-586, 2013.

BOSCHER, J. et al. Qualitative and quantitative comparison of volatile sulphides and flavour precursors in different organs of some wild and cultivated garlics. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 23, n. 7-8, p. 787-791, 11// 1995. ISSN 0305-1978. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0305197895000720> >. Acesso em: 1995/12//.

BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Vegetal. Coordenação de Laboratório Vegetal, 2009.

_____. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. 1. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2011a.

_____. **Resolução nº 35, de 27 de abril**. MMA. Ministério do meio ambiente 2011b.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, p. 229-239, 2010. ISSN 0100-4042. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000100040&nrm=iso >.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532-1535, 2004. Disponível em: < <http://www.sciencemag.org/content/303/5663/1532.abstractN2> >

BROOK, B. W.; SODHI, N. S.; BRADSHAW, C. J. A. Synergies among extinction drivers under global change. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 23, n. 8, p. 453-460, 2008. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2008.03.011> >. Acesso em: 2015/06/05.

BURNS, R. E. Method for Estimation of Tannin in Grain Sorghum. **Agronomy Journal**, v. 63, n. 3, p. 511-512, 1971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2134/agronj1971.00021962006300030050x> >.

CAMPOS, R. et al. Multivariate analysis between the phytochemical features and antioxidant properties of the stems of *Bauhinia glabra* jacq. (FABACEAE) **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 8, p. 151-155, 2014.

CAPUTO, F.; VEGLIANTE, R.; Ghibelli, L. Redox modulation of the DNA damage response. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, n. 10, p. 1292-1306, 11/15/ 2012. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295212005047> >.

CARMO, F. M. D. S.; BORGES, E. E. D. L. E.; TAKAKI, M. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, p. 697-705, 2007. ISSN 0102-3306. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062007000300016&nrm=iso >.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 1// 2013. ISSN 0278-6915. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691512006941> >.

CARVALHO, J. L. S. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico do *Nasturtium officinale* R. BR., BRASSICACEAE**. 2001. (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica, Universidade Federal do Paraná

CARVALHO, J. L. S. et al. Term-stability of extractive processes from *Nasturtium officinale* R. Br., brassicaceae for soxhlet modified system. São Paulo, v. 32, p. 1031-1035, 2009.

CENTENARO, C. et al. Contribution to the allelopathic study of *Erythrina velutina* Willd.; Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 304-308, 2009. ISSN 0102-695X.

CHAABANE, F. et al. Chloroform leaf extract of *Daphne gnidium* inhibits growth of melanoma cells and enhances melanogenesis of B16-F0 melanoma. **South African Journal of Botany**, v. 90, n. 0, p. 80-86, 1// 2014. ISSN 0254-6299. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629913003839> >.

CHANDRA, S. Vascular Organization of the Rhizome of *Cibotium barometz*. **American Fern Journal**, v. 60, n. 2, p. 68-72, 1970. ISSN 00028444. Disponível em: < <http://www.jstor.org/stable/1546933> >.

CHANG, C. C. et al. **Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods**. Journal of Food and Drug Analysis. 10: 178-182 p. 2002.

CHAO, C.-Y.; YIN, M.-C. Antibacterial Effects of Roselle Calyx Extracts and Protocatechuic Acid in Ground Beef and Apple Juice. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 2, p. 201-206, 2009/03/01 2008. ISSN 1535-3141. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2008.0187> >. Acesso em: 2015/08/05.

CHAPMAN, A. **Numbers of Living Species in Australia and the World**. Australian Biological Resources Study, 2009.

CHEN, L. G. et al. Melanogenesis inhibition by gallotannins from Chinese galls in B16 mouse melanoma cells. **Biol Pharm Bull**, v. 32, n. 8, p. 1447-52, Aug 2009. ISSN 1347-5215. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19652388> >.

CHIA, Y.-C. et al. Anti-Neoplastic Effects of Gallic Acid, a Major Component of *Toona sinensis* Leaf Extract, on Oral Squamous Carcinoma Cells. **Molecules**, v. 15, n. 11, p. 8377, 2010. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1420-3049/15/11/8377> >.

CHRISTENHUSZ, M. J. M.; CHASE, M. W. Trends and concepts in fern classification. **Annals of Botany**, February 13, 2014 2014. Disponível em: < <http://aob.oxfordjournals.org/content/early/2014/02/13/aob.mct299.abstract> >.

CHURCHILL, H.; TRYON, R.; BARRINGTON, D. S. Development of the sorus in tree ferns: Dicksoniaceae., v. 76, p. 1245–1252, 1998.

CLIFTON, P. M. et al. Cholesterol-lowering effects of plant sterol esters differ in milk, yoghurt, bread and cereal. **Eur J Clin Nutr**, v. 58, n. 3, p. 503-509, //print 2004. ISSN 0954-3007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601837> >.

CORDOVA, C. A. S. D. et al. Octyl and dodecyl gallates induce oxidative stress and apoptosis in a melanoma cell line. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 8, p. 2025-2034, 12// 2011. ISSN 0887-2333. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233311002165> >.

CORRÊA, P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Imprensa Nacional, Brasil. 1984.

COSTA, A. Farmacognosia. 3ª edição. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 3, 2001.

CROFT, J. R. The Stipe and Rachis Vasculature of the Dicksonioid Fern, *Cystodium sorbifolium* (Cystodiaceae). **Kew Bulletin**, v. 41, n. 4, p. 789-803, 1986. ISSN 00755974. Disponível em: < <http://www.jstor.org/stable/4102978> >.

DAOLIO, C. **Aplicação de técnicas espectrométricas, cromatográficas e quimiométricas na avaliação da autenticidade de plantas utilizadas como fitoterápicos**. 2006. (Doutorado). Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos

DE ABREU, F. S.; DE MOURA, R. B. FARMACOVIGILANCIA DE FITOTERÁPICOS EM UMA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA BRASILEIRA: MECANISMO DE APERFEIÇOAMENTO DOS PRODUTOS. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 26, n. 3, p. 149-156, 2014. ISSN 2318-9312.

DE COMBARIEU, E. et al. Metabolomics study of Saw palmetto extracts based on ¹H NMR spectroscopy. **Fitoterapia**, v. 102, p. 56-60, 4// 2015. ISSN 0367-326X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X15000404> >.

DE SOUZA ARAÚJO, A. A. et al. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, 2006.

DENDERZ, N.; LEHOTAY, J. Using of molecularly imprinted polymers for determination of gallic and protocatechuic acids in red wines by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1372, n. 0, p. 72-80, 12/12/ 2014. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967314016811> >.

DUARTE, T. L.; LUNEC, J. ReviewPart of the Series: From Dietary Antioxidants to Regulators in Cellular Signalling and Gene ExpressionReview: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. **Free Radical Research**, v. 39, n. 7, p. 671-686, 2005/01/01 2005. ISSN 1071-5762. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/10715760500104025> >. Acesso em: 2015/08/06.

ERBANO, M. **Estudos morfoanatômicos e genéticos de *Salvia lachnostachys* BENTH. (LAMIACEAE)**. 2014. (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná

FABIANI, R. et al. The production of hydrogen peroxide is not a common mechanism by which olive oil phenols induce apoptosis on HL60 cells. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1249-1255, 4/15/ 2011. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610013087> >.

FERNANDES, I. **Taxonomia e fitogeografia de Cytheacea e Dicksoniaceae nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil**. . 1997. (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo.

FERNANDES, N. F. et al. Supplementation with *Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen does not affect androgenic–anabolic parameters in male rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 161, p. 46-52, 2/23/ 2015. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874114008691> >.

FERREIRA, M. C.; SOUZA, J. R. P. D.; FARIA, T. D. J. Potenciação alelopática de extratos vegetais na germinação e no crescimento inicial de picão-preto e alface. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 1054-1060, 2007. ISSN 1413-7054. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542007000400017&nrm=iso >.

FIUZA, S. M. et al. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties—a structure–activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 13, p. 3581-3589, 7/1/ 2004. ISSN 0968-0896. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089604003153> >.

FLORA, S. J. S.; SHRIVASTAVA, R.; MITTAL, M. Chemistry and pharmacological properties of some natural and synthetic antioxidants for heavy metal toxicity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 36, p. 4540-4574, 2013. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84887966040&partnerID=40&md5=bd880f3575c84dc4543a8e28e7d1b08c> >.

FOO, L. Y. et al. A-Type Proanthocyanidin Trimers from Cranberry that Inhibit Adherence of Uropathogenic P-Fimbriated *Escherichia coli*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 9, p. 1225-1228, 2000/09/01 2000. ISSN 0163-3864. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/np000128u> >.

FORBES-HERNÁNDEZ, T. Y. et al. The effects of bioactive compounds from plant foods on mitochondrial function: A focus on apoptotic mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, v. 68, n. 0, p. 154-182, 6// 2014. ISSN 0278-6915. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S027869151400146X> >.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 627-641, 2008. ISSN 0102-695X. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000400022&nrm=iso >.

FURTADO, S. K. **Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do paraná: testes in vitro e in vivo**. . 2006. (Doutorado). Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná

FUZISSAKI, C. N. **Estudo da modulação de funoes efetoras de neutrofilos humanos por derivados cumarínicos: avaliação do efeito biológico sobre**

a produção de espécies reativas de oxigênio e a desgranulação. Universidade de São Paulo, 2009.

GALATI, G.; O'BRIEN, P. J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 3, p. 287-303, 8/1/ 2004. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584904003806> >.

GARCÍA-HUERTAS, P. et al. [Evaluation of cytotoxic effect and genetic damage of standardized extracts of *Solanum nudum* with antiplasmodial activity]. **Biomedica**, v. 33, n. 1, p. 78-87, 2013 Jan-Mar 2013. ISSN 0120-4157. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23715310> >.

GASPER, A. L. **Inventário florístico florestal de Santa Catarina: espécies da Floresta Ombrófila Mista.** *Rodriguesia*. 64: 201-210 p. 2013.

GAWLIK-DZIKI, U. et al. Antioxidant and anticancer activities of *Chenopodium quinoa* leaves extracts – In vitro study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, n. 0, p. 154-160, 7// 2013. ISSN 0278-6915. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691513002068> >.

GNOATTO, S. C. et al. INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO NOS TEORES DE METILXANTINAS EM ERVA-MATE (*Ilex*). **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 304-307, 2007.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007. ISSN 0100-4042. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000200026&nrm=iso >.

GONZÁLEZ-GÓMEZ, D. et al. Sweet cherry phytochemicals: Identification and characterization by HPLC-DAD/ESI-MS in six sweet-cherry cultivars grown in Valle del Jerte (Spain). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 6, p. 533-539, 9// 2010. ISSN 0889-1575. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157509000957> >.

GREGORIS, E. et al. Antioxidant properties of Brazilian tropical fruits by correlation between different assays. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 132759, 2013. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24106692> >.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos.** 6°. In: SIMÕES, C. M. O et al. (org). *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 6 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, 2007.

GUERRA, M. P. et al. A diversidade dos recursos genéticos vegetais e a nova pesquisa agrícola. **Ciência Rural**, v. 28, p. 521-528, 1998. ISSN 0103-8478.

Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84781998000300028&nrm=iso >.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 4, p. 561-564, 3/19/ 2010. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X10002913> >.

HALLIWELL, B. How to Characterize a Biological Antioxidant. **Free Radical Research Communications**, v. 9, n. 1, p. 1-32, 1990/01/01 1990. ISSN 8755-0199. Disponível em: < <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10715769009148569> >. Acesso em: 2015/08/05.

_____. The wanderings of a free radical. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 5, p. 531-542, 3/1/ 2009. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584908007156> >.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, n. 1, p. 125-126, 1// 1995. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0891584995914573> >.

HAMED, A. et al. Effects of β -sitosterol oral administration on the proliferation and differentiation of neural stem cells. **Journal of Functional Foods**, v. 8, p. 252-258, 5// 2014. ISSN 1756-4646. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464614001200> >.

HASLAM, E.; CAI, Y. Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. **Natural Product Reports**, v. 11, n. 0, p. 41-66, 1994. ISSN 0265-0568. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/NP9941100041> >.

HASLETT, C. Granulocyte apoptosis and inflammatory disease. **British Medical Bulletin**, v. 53, n. 3, p. 669-683, 1997. Disponível em: < <http://bmb.oxfordjournals.org/content/53/3/669.abstract> >.

HO, H.-H. et al. Gallic acid inhibits gastric cancer cells metastasis and invasive growth via increased expression of RhoB, downregulation of AKT/small GTPase signals and inhibition of NF- κ B activity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 266, n. 1, p. 76-85, 1/1/ 2013. ISSN 0041-008X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X12004619> >.

HOSSAIN, M. B. et al. Application of principal component and hierarchical cluster analysis to classify different spices based on in vitro antioxidant activity and individual polyphenolic antioxidant compounds. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 3, p. 179-189, 7// 2011. ISSN 1756-4646. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464611000363> >.

HUNT, M. A. et al. Ecophysiology of the Soft Tree Fern, *Dicksonia antarctica* Labill. **Austral Ecology**, v. 27, n. 4, p. 360-368, 2002. ISSN 1442-9993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1442-9993.2002.01190.x> >.

HÉBANT-MAURI, R. Apical segmentation and leaf initiation in the tree fern *Dicksonia squarrosa*. **Canadian Journal of Botany**, v. 53, n. 8, p. 764-772, 1975/04/15 1975. ISSN 0008-4026. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1139/b75-092> >. Acesso em: 2015/08/03.

INOUE, M. et al. Role of Reactive Oxygen Species in Gallic Acid-Induced Apoptosis. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, n. 10, p. 1153-1157, 2000.

JANG, A. et al. Biological functions of a synthetic compound, octadeca-9,12-dienyl-3,4,5-hydroxybenzoate, from gallic acid–linoleic acid ester. **Food Chemistry**, v. 112, n. 2, p. 369-373, 1/15/ 2009. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814608006353> >.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York; London: McGraw-Hill Book Company, Inc., 1940.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 7ª. São Paulo: Editora Nacional, 1985. 173-174.

KAKKAR, S.; BAIS, S. A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. **ISRN Pharmacology**, v. 2014, p. 9, 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2014/952943> >.

KALEGARI, M. Abordagem fitoquímica, avaliação farmacológica, antimicrobiana e toxicológica de *Rourea induta* Planch.(Connaraceae). 2014.

KARABEGOVIĆ, I. T. et al. The effect of different extraction techniques on the composition and antioxidant activity of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaf and fruit extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 142-148, 3// 2014. ISSN 0926-6690. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669013007371> >.

KARIOTI, A. et al. Combined HPLC-DAD–MS, HPLC–MSn and NMR spectroscopy for quality control of plant extracts: The case of a commercial blend sold as dietary supplement. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 88, p. 7-15, 1/25/ 2014. ISSN 0731-7085. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708513003464> >.

KHLEBNIKOV, A. I. et al. Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 4, p. 1749-1770, 2/15/ 2007. ISSN 0968-0896. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089606009795> >.

KIM, E.; GOLDBERG, M. Serum Cholesterol Assay Using a Stable Liebermann-Burchard Reagent. **Clinical Chemistry**, v. 15, n. 12, p. 1171-1179, 1969. Disponível em: < <http://www.clinchem.org/content/15/12/1171.abstract> >.

KONGDUANG, D.; WUNGSINTAWEEKUL, J.; DE-EKNAMKUL, W. Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol proceeds exclusively via the mevalonate pathway in cell suspension cultures of *Croton stellatopilosus*. **Tetrahedron Letters**, v. 49, n. 25, p. 4067-4072, 6/16/ 2008. ISSN 0040-4039. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403908007053> >.

KORALL, P. et al. Tree ferns: Monophyletic groups and their relationships as revealed by four protein-coding plastid loci. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 39, n. 3, p. 830-845, 6// 2006. ISSN 1055-7903. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1055790306000042> >.

KORE, K. J. et al. Evaluation of antiulcer activity of protocatechuic acid ethyl ester in rats. **International Journal of Pharmacy & Life Sciences**, v. 2, n. 7, p. 909-915, 2011. ISSN 09767126. Disponível em: < <http%3a%2f%2fsearch.ebscohost.com%2flogin.aspx%3fdirect%3dtrue%26db%3daph%26AN%3d69683100%26lang%3dpt-br%26site%3dedd-live> >.

KRIMMEL, B. et al. OH-radical induced degradation of hydroxybenzoic- and hydroxycinnamic acids and formation of aromatic products—A gamma radiolysis study. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 79, n. 12, p. 1247-1254, 12// 2010. ISSN 0969-806X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969806X10002768> >.

KUBITZKI, K., 1990. THE FAMILIES AND GENERA OF VASCULAR PLANTS. IN: KRAMER, K.U., GREEN, P.S. (EDS.), PTERIDOPHYTES AND GYMNOSPERMS, VOL. 1. SPRINGER-VERLAG, BERLIN, GERMANY. 1990.

KUTCHAN, T. M. Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher. The Paradigm of Secondary Metabolism. **Plant Physiology**, v. 125, n. 1, p. 58-60, January 1, 2001 2001. Disponível em: < <http://www.plantphysiol.org/content/125/1/58.short> >.

KÄHKÖNEN, M. P. et al. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 3954-3962, 1999/10/01 1999. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf990146l> >.

LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Secretaria-Geral da Organização dos Estados Americanos, Programa Regional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, 1983. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=8ZJcAAAAMAAJ> >.

LACERDA, M. J. R.; FREITAS, K. R.; DA SILVA, J. W. Determinação da matéria seca de forrageiras pelos métodos de microondas e convencional. **Bioscience Journal**, v. 25, n. 3, 2009. ISSN 1981-3163.

LEE, M.-H.; LU, K.; PATEL, S. B. Genetic basis of sitosterolemia. **Current opinion in lipidology**, v. 12, n. 2, p. 141, 2001.

LEICACH, S. R.; CHLUDIL, H. D. Chapter 9 - Plant Secondary Metabolites: Structure–Activity Relationships in Human Health Prevention and Treatment of Common Diseases. In: ATTA UR, R. (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**: Elsevier, v. Volume 42, 2014. p.267-304. ISBN 1572-5995.

LENDE, A. et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of protocatechuic acid in rats and mice. **Inflammopharmacology**, v. 19, n. 5, p. 255-263, 2011/10/01 2011. ISSN 0925-4692. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10787-011-0086-4> >.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. In: (Ed.). **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**: John Wiley & Sons, Inc., 2001. ISBN 9780471142911.

LIU, C. et al. Proteomic study reveals a co-occurrence of gallic acid-induced apoptosis and glycolysis in B16F10 melanoma cells. **J Agric Food Chem**, v. 62, n. 48, p. 11672-80, Dec 2014. ISSN 1520-5118. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25397718> >.

LOBO, V. et al. **Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health**. 2010. 118-126 Disponível em: < <http://www.phcogrev.com/article.asp?issn=0973-7847> >.

LOCATELLI, C. et al. Antimetastatic activity and low systemic toxicity of tetradecyl gallate in a preclinical melanoma mouse model. **Invest New Drugs**, v. 30, n. 3, p. 870-9, Jun 2012. ISSN 1573-0646. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21221709> >.

LOCATELLI, C.; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 233-239, 2013. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84871714485&partnerID=40&md5=81d40f3511920d1e0509af904f79fce8> >.

_____. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 0, p. 233-239, 2013. ISSN 0223-5234. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523412006642> >.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002. ISSN 0100-4042.

MACÍAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. G. Search for a Standard Phytotoxic Bioassay for Allelochemicals. Selection of Standard Target Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000/06/01 2000. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf9903051> >.

MAGUIRE, J. D. **Speed of Germination-Aid in Selection and Evaluation for Seedling Emergence and Vigor.** *Crop Science*. 2: 176-177 p. 1962.

MAHROUS, E. A.; FARAG, M. A. Two dimensional NMR spectroscopic approaches for exploring plant metabolome: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 1, p. 3-15, 1// 2015. ISSN 2090-1232. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S209012321400126X> >.

MANTOVANI, M. **Caracterização de populações naturais de Xaxim (*Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hooker), em diferentes condições edafo-climáticas no Estado de Santa Catarina.** 2004. (Mestrado). Recursos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MARASCHIN-SILVA, F.; AQUILA, M. Contribuição ao estudo do potencial alelopático de espécies nativas. **Revista Árvore**, v. 30, n. 4, p. 547-555, 2006. ISSN 0100-6762.

MARKHAM, K. Distribution of flavonoids in the lower plants and its evolutionary significance. In: HARBORNE, J. B. (Ed.). **The Flavonoids**: Springer US, 1988. cap. 12, p.427-468. ISBN 978-0-412-28770-1.

MARQUESINI, N. R. Plantas usadas como medicinais pelos índios do Paraná e Santa Catarina, Sul do Brasil: Guarani, Kaingãng, Xokleng, Ava-Guarani, Kraô e Cayua. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Brasil. . 1995.

MARTINS, S. L. et al. Efeitos terapêuticos dos fitosteróis e fitostanóis na colesterolemia. **Archivos latinoamericanos de nutrición**, v. 54, n. 3, p. 257-263, 2004. ISSN 0004-0622.

MATARESE, F. et al. Expression of terpene synthase genes associated with the formation of volatiles in different organs of *Vitis vinifera*. **Phytochemistry**, v. 105, p. 12-24, 9// 2014. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942214002581> >.

MAUNDER, M. et al. Saint Helena: Sustainable Development and Conservation of a Highly Degraded Island Ecosystem. In: VITOUSEK, P.; LOOPE, L., et al (Ed.). **Islands**: Springer Berlin Heidelberg, v.115, 1995. cap. 16, p.205-217. (Ecological Studies). ISBN 978-3-642-78965-6.

MAYER-SCHOLL, A.; AVERHOFF, P.; ZYCHLINSKY, A. How do neutrophils and pathogens interact? **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 62-66, 2// 2004. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527403001693> >.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001. ISSN 1099-1573. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.687> >.

MIELKE, E. J. C. **Análise da cadeia produtiva e comercialização do xaxim *Dicksonia sellowiana*, no Estado do Paraná**. 2002. (Master). Departamento de Engenharia Florestal, UFPR

MIGLIATO, K. F. et al. Planejamento experimental na otimização da extração dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) skeels. **Química Nova**, v. 34, p. 695-699, 2011. ISSN 0100-4042. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422011000400024&nrm=iso >.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4769-4807, 2011. ISSN 0223-5234.

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, p. 892-896, 2005. ISSN 0100-4042. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000500029&nrm=iso >.

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

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

NAIDOO, D. et al. Plants traditionally used individually and in combination to treat sexually transmitted infections in northern Maputaland, South Africa: Antimicrobial activity and cytotoxicity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 3, p. 656-667, 10/7/ 2013. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874113005072> >.

NESTEL, P. et al. Original Communications-Cholesterol-lowering effects of plant sterol esters and non-esterified stanols in margarine, butter and low-fat foods. **European journal of clinical nutrition**, v. 55, n. 12, p. 1084-1090, 2001. ISSN 0954-3007.

NOUBIGH, A.; AYDI, A.; ABDERRABBA, M. Experimental Measurement and Correlation of Solubility Data and Thermodynamic Properties of Protocatechuic Acid in Four Organic Solvents. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 60, n. 3, p. 514-518, 2015/03/12 2015. ISSN 0021-9568. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/je500519y> >.

NÚÑEZ SELLÉS, A. J. et al. Isolation and quantitative analysis of phenolic antioxidants, free sugars, and polyols from mango (*Mangifera indica* L.) stem

bark aqueous decoction used in Cuba as a nutritional supplement. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 4, p. 762-6, Feb 2002. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11829642> >.

OGDEN, J. STUDIES ON THE VEGETATION OF MOUNT COLENZO NEW ZEALAND 2. THE POPULATION DYNAMICS OF RED BEECH. **Proceedings (New Zealand Ecological Society)**, v. 18, p. 66-75, 1971. ISSN 00779946. Disponível em: < <http://www.jstor.org/stable/24061300> >.

OHNO, T.; INOUE, M.; OGIHARA, Y. Cytotoxic activity of gallic acid against liver metastasis of mastocytoma cells P-815. **Anticancer Res**, v. 21, n. 6A, p. 3875-80, 2001 Nov-Dec 2001. ISSN 0250-7005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11911262> >.

OLIVEIRA, C. F. et al. **PARÂMETROS DE CONTROLE DE QUALIDADE DE *Psychotria fractistipula* L.B. Sm., Klein & Delprete (RUBIACEAE): UMIDADE, CINZAS E PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA.** *Visão Acadêmica*. 15 17-23 p. 2014

OLIVEIRA SIMÕES, C. M.; UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO, S.; UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA, C. **Farmacognosia : da planta ao medicamento.** [Porto Alegre]; [Florianópolis]: Editora da UFRGS ; Editora da UFSC, 2003. ISBN 8570256825 9788570256829.

OLIVEIRA, V. B. **Estudo Fitoquímico e Atividades Biológicas da Espécie Vegetal *Dicksonia sellowiana* (DICKSONIACEAE).** 2012. (Mestrado). Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná

OLIVEIRA, V. B. et al. Avaliação do potencial antioxidante frente à oxidação lipídica e da toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das frondes de *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 614-621, 2015. ISSN 1516-0572. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722015000400614&nrm=iso >.

OLSEN, S. **Encyclopedia of Garden Ferns.** Timber Press, 2007. 446.

OSSIPOV, V. et al. Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of the shikimate pathway. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 1, p. 3-16, 1// 2003. ISSN 0305-1978. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305197802000819> >.

PAGE, C. N.; BROWNSEY, P. J. Tree-Fern Skirts: A Defence Against Climbers and Large Epiphytes. **Journal of Ecology**, v. 74, n. 3, p. 787-796, 1986. ISSN 00220477. Disponível em: < <http://www.jstor.org/stable/2260398> >.

PANICH, U. et al. UVA-induced melanogenesis and modulation of glutathione redox system in different melanoma cell lines: the protective effect of gallic acid.

J Photochem Photobiol B, v. 108, p. 16-22, Mar 2012. ISSN 1873-2682. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22244344> >.

_____. Inhibition of UVA-mediated melanogenesis by ascorbic acid through modulation of antioxidant defense and nitric oxide system. **Arch Pharm Res**, v. 34, n. 5, p. 811-20, May 2011. ISSN 0253-6269 (Print) 0253-6269.

PARK, B. H.; FIKRIG, S. M.; SMITHWICK, E. M. INFECTION AND NITROBLUE-TETRAZOLIUM REDUCTION BY NEUTROPHILS: A Diagnostic Aid. **The Lancet**, v. 292, n. 7567, p. 532-534, 9/7/ 1968. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673668924069> >.

PATRAS, A. et al. Application of principal component and hierarchical cluster analysis to classify fruits and vegetables commonly consumed in Ireland based on in vitro antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 2, p. 250-256, 3// 2011. ISSN 0889-1575. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157510002875> >.

PAULA, C. D. S. Estudo fitoquímico e propriedades biológicas das folhas de *Bauhinia unguolata* L., fabaceae. 2014.

PAULA, C. D. S. et al. Atividade alelopática do extrato e frações das folhas de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 1, p. 47-52, 2014. ISSN 2179-443X.

PEREIRA, A. M. S. Prefácio. In: FERRO, D. (Ed.). **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo, SP: Editora Atheneu, 2008.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337-341, 5/1/ 1999. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269799940198> >.

RANG, H. P. et al. **Rang and Dale farmacologia**. Churchill Livingstone Elsevier, 2012. ISBN 8535241728.

RATTMANN, Y. D. et al. Natural product extract of *Dicksonia sellowiana* induces endothelium-dependent relaxations by a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of eNOS in porcine coronary arteries. **J Vasc Res**, v. 49, n. 4, p. 284-98, 2012. ISSN 1423-0135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22538863> >.

_____. Activation of muscarinic receptors by a hydroalcoholic extract of *Dicksonia sellowiana* Presl. Hook (Dicksoniaceae) induces vascular relaxation and hypotension in rats. **Vascul Pharmacol**, v. 50, n. 1-2, p. 27-33, 2009 Jan-

Feb 2009. ISSN 1537-1891. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18805508> >.

_____. Standardized extract of *Dicksonia sellowiana* Presl. Hook (Dicksoniaceae) decreases oxidative damage in cultured endothelial cells and in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 3, p. 999-1007, 2/16/ 2011. ISSN 0378-8741. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874110008159> >.

REIGOSA, M. J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLEZ, L. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, n. 5, p. 577-608, 1999. ISSN 0735-2689.

REVEDIN, A. et al. Thirty thousand-year-old evidence of plant food processing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 44, p. 18815-18819, 2010. Disponível em: <
<http://www.pnas.org/content/107/44/18815.abstract> >.

RIBEIRO, K. J. C. **Ação do extrato de *Dicksonia sellowiana* na inflamação induzida por carregenina em camundongos com tumor de Ehrlich**. 2003. Ciências Biológicas, Universidade do Vale do Itajaí

RICE, E. L. 4 - Roles of Allelopathy in Plant Pathology. In: RICE, E. L. (Ed.). **Allelopathy (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 1984a. p.119-129. ISBN 978-0-12-587055-9.

_____. 12 - Evidence for Movement of Allelopathic Compounds from Plants and Absorption and Translocation by Other Plants. In: RICE, E. L. (Ed.). **Allelopathy (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 1984b. p.309-319. ISBN 978-0-12-587055-9.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152-159, 4// 1997. ISSN 1360-1385. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138597010182> >.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, // 1996. ISSN 0891-5849. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0891584995022279> >.

RIFFAULT, L. et al. Phytochemical analysis of *Rosa hybrida* cv. 'Jardin de Granville' by HPTLC, HPLC-DAD and HPLC-ESI-HRMS: Polyphenolic fingerprints of six plant organs. **Phytochemistry**, v. 99, p. 127-134, 3// 2014. ISSN 0031-9422. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942213004925> >.

RIZVI, S. et al. A discipline called allelopathy. In: (Ed.). **Allelopathy**: Springer, 1992. p.1-10. ISBN 9401050481.

ROESER, K. Die nadel der schwarzkiefer-massenprodukt und kunstwerk der natur. **Mikrokosmos**, v. 61, n. 2, p. 33-36, 1972.

RÊGO, G. M.; POSSAMAI, E. Avaliação dos teores de clorofila no crescimento de mudas do jequitibá-rosa (*Cariniana legalis*). 2004. ISSN 1517-5030.

SAIKAT, S.; RAJA, C. The Role of Antioxidants in Human Health. In: (Ed.). **Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy**: American Chemical Society, v.1083, 2011. cap. 1, p.1-37. (ACS Symposium Series). ISBN 0-8412-2683-0.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, // 1991. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/003194229183426L> >.

SCAZZOCCHIO, B. et al. Cyanidin-3-O- β -Glucoside and Protocatechuic Acid Exert Insulin-Like Effects by Upregulating PPAR γ Activity in Human Omental Adipocytes. **Diabetes**, v. 60, n. 9, p. 2234-2244, September 1, 2011 2011. Disponível em: < <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/60/9/2234.abstract> >.

SCHEFFERS, B. R. et al. What we know and don't know about Earth's missing biodiversity. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 27, n. 9, p. 501-510, 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2012.05.008> >. Acesso em: 2015/06/05.

SCHMITT, J. L.; SCHNEIDER, P. H.; WINDISCH, P. G. Crescimento do cáudice e fenologia de *Dicksonia sellowiana* Hook. (*Dicksoniaceae*) no sul do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, p. 283-291, 2009. ISSN 0102-3306. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062009000100030&nrm=iso >.

SCHMITT, J. L.; WINDISCH, P. G. Growth Rates and Age Estimates of *Alsophila setosa* Kaulf. in Southern Brazil. **American Fern Journal**, v. 96, n. 4, p. 103-111, 2006. ISSN 00028444. Disponível em: < <http://www.jstor.org/stable/4496863> >.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1-2, p. 21-40, 5/16/2001. ISSN 0377-8401. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840101002280> >.

SEHNEM, A. **Ciateáceas. Flora Ilustrada Catarinense-CIAT**. 1978.

SHARMA, R. et al. Antibacterial and anti-inflammatory effects of *Syzygium jambos* L. (Alston) and isolated compounds on *acne vulgaris*. **BMC Complement Altern Med**, v. 13, p. 292, 2013. ISSN 1472-6882.

SILVA, C. T. D.; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, p. 38-42, 2014.

ISSN 0009-6725. Disponível em: <
http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252014000100015&nrm=iso>.

SIMOES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. v. 28, n. 1, p. 49-55, 1977.

SLOMINSKI, A. et al. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. **Physiol Rev**, v. 84, n. 4, p. 1155-228, Oct 2004. ISSN 0031-9333 (Print) 0031-9333.

SMITH, A. R. et al. A classification for extant ferns. **Taxon**, v. 55, n. 3, p. 705-731, // 2006. Disponível em: <
<http://www.ingentaconnect.com/content/iapt/tax/2006/00000055/00000003/art00017>>.

SOLON, S. **Análises fitoquímica e farmacognóstica da raiz de Cochlospermum regium (Mart. et Schr.) Pilger, Cochlospermaceae**. 2009. (Tese de Doutorado). Universidade de Brasília

SOUSA, C. D. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, C. M. D. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007. ISSN 0100-4042. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000200021&nrm=iso>.

SOUZA, A. M. et al. **In vitro effects of Eugenia pyriformis Cambess., Myrtaceae: Antimicrobial activity and synergistic interactions with Vancomycin and Fluconazole**. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 8: 862-867 p. 2014.

SOUZA FILHO, A. P. S.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, L. S. Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório: revisão crítica. **Planta Daninha**, v. 28, p. 689-697, 2010. ISSN 0100-8358. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-83582010000300026&nrm=iso>.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R.; PIETRO, R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.

SREERAMKUMAR, V. et al. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. **Science**, v. 346, n. 6214, p. 1234-1238, 2014. Disponível em: < <http://www.sciencemag.org/content/346/6214/1234.abstract> >.

SROKA, Z.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 6, p. 753-758, 6// 2003. ISSN 0278-6915. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691502003290> >.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 18, p. 3268-3295, 2007. ISSN 1615-9314. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200700261> >.

STEPONKUS, P. L.; LANPHEAR, F. O. Refinement of the Triphenyl Tetrazolium Chloride Method of Determining Cold Injury. **Plant Physiology**, v. 42, n. 10, p. 1423-1426, 1967. ISSN 0032-0889 1532-2548. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1086741/> >.

SU, T. R. et al. Inhibition of melanogenesis by gallic acid: possible involvement of the PI3K/Akt, MEK/ERK and Wnt/ β -catenin signaling pathways in B16F10 cells. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 10, p. 20443-58, 2013. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24129178> >.

SUBRAMANIAN, V. et al. Topical application of Gallic acid suppresses the 7,12-DMBA/Croton oil induced two-step skin carcinogenesis by modulating antioxidants and MMP-2/MMP-9 in Swiss albino mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 66, n. 0, p. 44-55, 4// 2014. ISSN 0278-6915. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691514000313> >.

TAKESHITA, R.; SAKAGAMI, Y.; ITOH, N. Separation and detection of gallic acid and its alkyl esters by polyamide thin-layer chromatography. **J Chromatogr**, v. 45, n. 2, p. 269-77, Dec 2 1969.

TENG, C.-L. J. et al. Mechanistic aspects of lauryl gallate-induced differentiation and apoptosis in human acute myeloid leukemia cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 71, n. 0, p. 197-206, 9// 2014. ISSN 0278-6915. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691514003123> >.

THOMAS, C. D. et al. Extinction risk from climate change. **Nature**, v. 427, n. 6970, p. 145-148, 01/08/print 2004. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature02121> >.

TOKURA, L. K.; NÓBREGA, L. H. P. Alelopatia de cultivos de cobertura vegetal sobre plantas infestantes. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 28, n. 3, p. 379-384, 2006. ISSN 1679-9275.

TRAGOOLPUA, Y.; JATISATIENR, A. Anti-herpes simplex virus activities of *Eugenia caryophyllus* (Spreng.) Bullock & S. G. Harrison and essential oil, eugenol. **Phytother Res**, v. 21, n. 12, p. 1153-8, Dec 2007. ISSN 0951-418X (Print) 0951-418x.

TRYON, R. M.; TRYON, A. F. Ferns and Allied Plants. With Special Reference to Tropical America. . Springer-Verlag, New York, 1982.

VEBER, J. et al. Determinação dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante de extratos aquosos e etanólicos de Jambolão (*Syzygium cumini* L.). **Rev. bras. plantas med**, v. 17, n. 2, p. 267-273, 2015. ISSN 1516-0572.

VERMA, S.; SINGH, A.; MISHRA, A. Gallic acid: Molecular rival of cancer. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 35, n. 3, p. 473-485, 5// 2013. ISSN 1382-6689. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668913000276> >.

VONGSAK, B. et al. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 566-571, 1// 2013. ISSN 0926-6690. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669012005286> >.

WERNER, I.; BACHER, A.; EISENREICH, W. Retrobiosynthetic NMR studies with ¹³C-labeled glucose. Formation of gallic acid in plants and fungi., v. 272, n. 41, 1997.

WONG, A. Chemical and microbiological considerations of phytosterols and their relative efficacies in functional foods for the lowering of serum cholesterol levels in humans: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 6, p. 60-72, 1// 2014. ISSN 1756-4646. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S175646461300251X> >.

WU, A. H. B. et al. Biological variation of β -sitosterol, campesterol, and lathosterol as cholesterol absorption and synthesis biomarkers. **Clinica Chimica Acta**, v. 430, p. 43-47, 3/20/ 2014. ISSN 0009-8981. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898113005354> >.

YAMINI, Y. et al. Comparison of essential oil compositions of *Salvia mirzayanii* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. **Food Chemistry**, v. 108, n. 1, p. 341-346, 5/1/ 2008. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814607010588> >.

YEN, G.-C.; DUH, P.-D.; TSAI, H.-L. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. **Food Chemistry**, v. 79, n. 3, p. 307-313, 11// 2002. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814602001450> >.

ZANELLA, M. S. et al. 089-Rendimento de óleo essencial de folhas de Cordia verbenacea DC. expostas ao sol, à sombra e ao ambiente natural. **Cadernos de Agroecologia**, v. 7, n. 2, 2012. ISSN 2236-7934.

ZHOU, L.; ZUO, Z.; CHOW, M. S. S. Danshen: An Overview of Its Chemistry, Pharmacology, Pharmacokinetics, and Clinical Use. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 45, n. 12, p. 1345-1359, 2005. ISSN 1552-4604. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1177/0091270005282630> >.

ZHOU, Z. et al. Protocatechuic aldehyde inhibits hepatitis B virus replication both in vitro and in vivo. **Antiviral Research**, v. 74, n. 1, p. 59-64, 4// 2007. ISSN 0166-3542. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354206003603> >.

ZHU, Q. et al. In vitro bioactivities and phytochemical profile of various parts of the strawberry (Fragaria × ananassa var. Amaou). **Journal of Functional Foods**, v. 13, n. 0, p. 38-49, 3// 2015. ISSN 1756-4646. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464614004058> >.

ZUITER, A. S. Proanthocyanidin: Chemistry and Biology: From Phenolic Compounds to Proanthocyanidins. In: (Ed.). **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**: Elsevier, 2014. ISBN 978-0-12-409547-2.