

FABIANA PUCCI LEONE

**Estudo Químico e Avaliação da Atividade
Biológica de *Alchornea sidifolia* Müll. Arg.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica
da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL
E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração
de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2005

FABIANA PUCCI LEONE

**Estudo Químico e Avaliação da Atividade
Biológica de *Alchornea sidifolia* Müll. Arg.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica
da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL
E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração
de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. MARIA CLÁUDIA MARX YOUNG

Agradecimentos

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado;

Aos meus pais, Walter e Linda pelo carinho, amor, apoio e incentivo ao estudo;

À Dra. Maria Cláudia Marx Young, pela paciência, carinho, orientação, incentivo e ensinamentos grandiosos, que contribuíram para minha aprendizagem acadêmica e pessoal;

À Dra. Luce Maria Brandão Torres, pela amizade, atenção, carinho, apoio e ensinamentos;

À Pós-Graduação do IBt;

À Dra. Cecília Blatt, pelos ensinamentos deixados;

Ao Dr. João Lago pela identificação espectrométrica das substâncias isoladas;

Ao Dr. Paulo Moreno pela realização dos bioensaios de atividade antimicrobiana;

À Dra. Elaine Lopes pela ajuda, paciência e amizade;

À Dra. Luciana Retz de Carvalho e à Dra. Rosemeire Aparecida Bom Personi pela participação na banca, atenção, sugestões e correções;

À minha irmã, Letícia pelo amor, colo sempre presente, pela ajuda na coleta e por tudo;

À Josimara Rondon, pela amizade, ajuda nas coletas, apoio e carinho, inclusive nos momentos mais difíceis;

À Kelly, pela amizade e ajuda incondicional;

À Silvia Sollai, my teacher, pela amizade e por todos os ensinamentos em inglês;

À Débora Agripino, pela amizade e pela ajuda em ter realizado os bioensaios antifúngicos;

Ao Dr. Alberto Cavalheiro, do Instituto de Química da Unesp de Araraquara, por ter me acolhido em seu laboratório e pela ajuda em CLAE. Ao Marcelo Telascrea pela amizade e ajuda;

À todo pessoal de apoio da seção de Fisiologia e Bioquímica do IBt e ao pessoal da biblioteca;

À Marcinha e funcionários da Pós-Graduação do IBt;

À Rosana, Márcia Débora, Marina, Vanessa, Ludmila, Aline, Ana Má, Rodrigo, Tiné e Danilo pela força e a todas as pessoas do IBt que contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

1. Introdução	1
1.1 Fitoquímica Biomonitorada.....	4
1.1.1 Técnicas de difusão em meio sólido.....	6
1.1.2 Técnicas de diluição.....	6
1.1.3 Técnicas de bioautografia.....	6
1.2 Local de coleta.....	6
1.3 A família Euphorbiaceae e sua representação no PEFL.....	8
1.4 Usos populares e atividades farmacológicas de <i>Alchornea</i>	11
1.5 Perfil químico de <i>Alchornea</i>	12
1.6 Atividade Antimicrobiana.....	15
1.7 Atividade Antitumoral.....	16
2. Objetivos.....	17
3. Material e Métodos.....	18
3.1 Coleta do Material botânico.....	18
3.2 Obtenção dos extratos brutos.....	18
3.3 Triagem fitoquímica de <i>A. sidifolia</i>	19
3.3.1 Análise em cromatografia em camada delgada (CCD) para caracterização de classes de substâncias com reveladores específicos.....	19
3.3.2 Determinação de fenóis totais em caules e folhas de <i>A. sidifolia</i>	20
3.3.3 Determinação quantitativa de flavonóides em caules e folhas de <i>A. sidifolia</i>	22
3.3.4 Extração e determinação de taninos em caules e folhas de <i>A. sidifolia</i>	23
3.3.5 Extração de óleo essencial de folhas, flores e raízes de <i>A. sidifolia</i>	23
3.4 Fitoquímica.....	24
3.4.1 Cromatografia em coluna (CC).....	24
3.4.2 Cromatografias em camada delgada analítica (CCD) e preparativa (CCDP).....	24
3.4.3 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	24
3.4.4 Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM).....	25
3.4.5 Ressonância Magnética Nuclear.....	25
3.5 Fitoquímica Biomonitorada.....	26
3.5.1 Atividade Antimicrobiana.....	26
3.5.2 Atividade Antitumoral.....	26
4. Resultados.....	28
4.1 Obtenção de Extratos Brutos de raiz, caules e folhas de <i>A. sidifolia</i>	28
4.2 Triagem Fitoquímica de <i>A. sidifolia</i>	28
4.2.1 Análise em CCD para caracterização de classes de substâncias com reveladores específicos.....	28
4.2.2 Estudo de fenóis totais de caules e folhas de <i>A. sidifolia</i>	31
4.2.3 Determinação de flavonóides de caules e folhas de <i>A. sidifolia</i>	31
4.2.4 Extração e determinação de taninos de <i>A. sidifolia</i>	32
4.2.5 Extração de óleo essencial.....	32
4.3 Fitoquímica.....	33
4.3.1 Isolamento, purificação e identificação da quercitrina do EAcOEt das folhas de <i>A. sidifolia</i>	33
4.3.2 Isolamento, purificação e identificação do diterpeno isolado do ECHC ₃ das folhas de <i>A. sidifolia</i>	39
4.4 Fitoquímica biomonitorada.....	51
5. Discussão e Conclusão.....	63
6. Resumo.....	66
7. Abstract.....	68
8. Referências Bibliográficas.....	70

Símbolos e Abreviaturas

Abs	absorbância
AcOEt	acetato de etila
AlCl ₃	cloreto de alumínio
ax	axial
BSA	bovine serum albumin (albumina de soro bovino)
CCD	cromatografia em camada delgada
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
CD ₃ OD	metanol deuterado
CIM	concentração inibitória mínima
CG/EM	cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas
CH ₂ Cl ₂	diclorometano
CHCl ₃	clorofórmio
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
cm	centímetros
d	dubleto
DMSO-d ₆	dimetil sulfóxido deuterado
DNA	ácido desoxirribonucléico
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer
(aumento sem distorção por transferência de polarização)	
E	extrato
EM	espectrometria de massas
eq	equatorial
EtOH	etanol
eV	eletron volts
FAB	Fast Atom Bombardment (bombardeamento de átomos
rápidos)	
Fig.	Figura
g	gramas
H	hidrogênio
ha	hectare
H ₂ O	água
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
H ₃ PO ₄	ácido fosfórico
Hex	hexano
Hid	hidroalcoólico
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation (correlação
heteronuclear de múltiplas ligações)	
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence (coerência
heteronuclear quântica múltipla)	
h	hora
Hz	Hertz
IE	impacto eletrônico
IBt	Instituto de Botânica
int.rel.	intensidade relativa
IQ	Instituto de Química
J	constante de acoplamento
kg	kilogramas
L	litros
d	deslocamento químico

l	comprimento de onda
D	variação
mg	miligramas
min	minutos
mm	milímetros
mM	milimolar
mL	mililitros
µm	micrometros
µg	microgramas
µL	microlitros
µM	micromolar
m/z	relação massa/carga
[M⁺]	íon molecular
Me	metila
Me₂CO	acetona
MeOH	metanol
MHz	mega Hertz
N	normal
NaOH	hidróxido de sódio
Na₂WO₄	tungstato de sódio
Na₂CO₃	carbonato de sódio
nm	nanômetros
NP	difenilborico
PND	Próton Noise Decoupled (ruído de desacoplamento de
prótons)	
pág.	Página
PEFI	Parque Estadual das Fontes do Ipiranga
PEG	polyietilenogicol
ppb	precipitado branco
%	porcentagem
Rf	fator de retenção
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
Si	sílica
sl	singleto largo
TIC	total íon
TMS	tetrametilsilano
Tr	tempo de retenção
UV	ultra-violeta
v/v	volume/volume

Figuras, tabelas e esquemas

Fig.1: Vista aérea do PEFL.....	7
Fig.2: Aspecto geral de uma planta adulta de <i>A. sidifolia</i>	10
Fig.3: Aspecto das folhas de <i>A. sidifolia</i>	11
Fig.4: 1 β -sitosterol, 2 estigmasterol, 3 <i>N</i> -1, <i>N</i> -2, <i>N</i> -3-triisopentenilguanidina, 4 loliolida.....	13
Fig.5: 5 corilagina, 6 <i>seco</i> -3,4 friedelina, 7 <i>seco</i> -3,4 taraxerona, 8 pentatronol.....	14
Fig.6: <i>C. sphaerospermum</i>	16
Fig.7: Substâncias anticarcinogênicas de origem vegetal: 9 vincristina e vimblastina e 10 taxol.....	17
Fig.8: Esquema geral de obtenção dos extratos brutos.....	18
Fig.9: Cromatoplaça do resíduo hexânico de folhas.....	29
Fig.10: Cromatogramas das frações obtidas de CC do AcOEt de folhas.....	30
Fig.11: Cromatoplaça das subfrações 1 a 16.....	35
Fig.12: Cromatoplaça das subfrações 20 a 29.....	35
Fig.13: 11 Quercitrina.....	37
Fig.14: Espectro de RMN ¹ H da quercitrina.....	38
Fig.15: Espectro de RMN ¹³ C da quercitrina.....	38
Fig.16: Espectro de massas do ppb (IE).....	42
Fig.17: Espectro de massas do ppb (FAB).....	42
Fig.18: Espectro de RMN ¹ H do ppb.....	43
Fig.19: Ampliação do espectro de RMN ¹ H do ppb.....	44
Fig.20: Espectro de RMN ¹³ C do ppb.....	45
Fig.21: DEPT 135° do ppb.....	46
Fig.22: Expansão do espectro DEPT 135° do ppb.....	47
Fig.23: Espectro de HMQC do ppb.....	48
Fig.24: Espectro de HMBC do ppb.....	49
Fig.25: Espectro ampliado de HMBC do ppb.....	50
Fig.26: Fração 11, placas de CCD.....	53
Fig.27: Fração 6 cromatoplaça revelada com <i>C. sphaerospermum</i>	53
Fig.28: Cromatograma de íons totais (TIC) da fração 11 (halo 1).....	54
Fig.29: Espectro de massas: A-componente da fração 11 e B-difenilsulfeto.....	55
Fig.30: Espectro de massas: A-do componente da fração 11 e B-do α -amorfenol.....	56
Fig.31: Substâncias com atividade antifúngica contra <i>C. sphaerospermum</i> 13 difenilsulfeto e 14 α -amorfenol.....	52
Fig.32: Bioautografia da fração 3.....	58
Fig.33: Cromatograma de íons totais (TIC) da fração 3 do ECHCl ₃ de raiz.....	59
Fig.34: Espectro de massas: A-do componente da fração 3 do ECHCl ₃ de raiz, B- β -cariofileno.....	60
Fig.35: Espectro de massas: A-do componente da fração 3 do ECHCl ₃ de raiz, B- α -humuleno.....	61
Fig.36: Substâncias com atividade antifúngica contra <i>C. sphaerospermum</i> 15 α -humuleno e 16 β -cariofileno.....	58
Fig.37: Bioautografia do flavonóide glicosilado (quercitrina) isolado do EAcOEt de folhas.....	62
Fig.38: 12 corimbol.....	65
Fig.I: Curva padrão de fenóis totais.....	31
Fig.II: Curva padrão de concentração de rutina.....	31
Fig.III: Curva padrão de ácido tânico.....	32
Tabela 1: Relações das frações obtidas por CC.....	34
Tabela 2: Dados de RMN ¹ H para o flavonóide isolado.....	36
Tabela 3: Dados de RMN ¹³ C do flavonóide isolado.....	36
Tabela 4: Dados espectrais do ppb de RMN de ¹ H, de ¹³ C e do corimbol.....	41
Esquema 1: Fracionamento do EAcOEt de folhas.....	33
Esquema 2: Fluxograma do fracionamento do ECHCl ₃ de folhas.....	40
Esquema 3: Fluxograma do fracionamento do ECHCl ₃ de caules.....	51
Esquema 4: Fluxograma do fracionamento do ECHCl ₃ de raízes.....	57

1. INTRODUÇÃO

As plantas contêm milhares de constituintes com consideráveis diferenças em suas propriedades biológicas (Hostettmann *et al.*, 1997). Por milênios, drogas de plantas superiores (Gimnospermas e Angiospermas) têm sido usadas para curar ou aliviar doenças humanas e, até recentemente, foram a maior fonte de remédios. Durante os dois últimos séculos, muitos metabólitos secundários foram purificados e caracterizados estruturalmente, fornecendo numerosos compostos de importância medicinal (Bruneton, 1995).

Os produtos vegetais derivados do metabolismo secundário das plantas têm sido historicamente definidos como constituintes químicos que parecem não ter um papel bioquímico vital no processo de construção e manutenção das células vegetais, mas pesquisas recentes mostraram que eles têm uma função pivô na ecofisiologia das plantas. Embora eles possam ter uma variedade de funções nas plantas, é provável que sua principal função seja a ecológica e que sejam estes os constituintes que apresentam potenciais efeitos medicinais para humanos. Por exemplo, produtos secundários envolvidos na defesa da planta através da citotoxicidade contra patógenos microbianos podem ser úteis como remédios antimicrobianos em humanos, se não forem muito tóxicos; da mesma forma, produtos secundários envolvidos em defesa contra herbívoros, através de atividade neurotóxica, podem ter efeitos benéficos no ser humano como antidepressivos, sedativos, relaxantes musculares ou anestésicos (Brinskin, 2000).

Muitas das drogas naturais usadas atualmente foram obtidas de plantas e usadas como toxinas nos seus habitats nativos, como a fisostigmina, d-tubocurarina e alguns glicosídeos cardíacos. Outras drogas de origem vegetal têm sido obtidas como resultado do uso folclórico para propósitos medicinais, por exemplo a digitoxina, morfina, pilocarpina e quinina. Metabólitos secundários de plantas têm duas importantes funções adicionais, uma servindo de modelo para a estrutura e síntese de drogas inteiramente novas, e a outra servindo de fonte de material para semi-síntese de agentes medicinais (Kinghorn & Seo, 1996). Talvez os melhores exemplos para o primeiro caso sejam a cocaína e a morfina, as quais, por sua vez, têm servido

como modelos para a síntese de novos anestésicos e analgésicos locais. Outros exemplos são a atropina, fisostigmina e a quinina, as quais têm sido utilizadas como modelos químicos para o design e a síntese de anticolinérgicos, anticolinesterásicos e antimaláricos, respectivamente. No segundo caso, constituintes de plantas podem ser empregados como matéria bruta para a produção comercial de drogas pela síntese parcial, como exemplificado pela produção de hormônios de diosgenina, hecogenina e estigmasterol, para o uso em formulações de contraceptivos orais (Kinghorn & Seo, 1996).

Entre os produtos naturais encontrados em plantas, os flavonóides e seus glicosídeos são comuns em todas as plantas terrestres e constituem uma das maiores classes de compostos naturais conhecidos. Os flavonóides são difenilpropanos ($C_6C_3C_6$) com variações nos números de hidroxilas fixadas aos anéis. Eles ocorrem primariamente em forma conjugada, com um ou mais resíduos de açúcar ligados a grupos hidroxílicos, embora ligações diretas de uma unidade de açúcar com um carbono aromático também ocorram. Associações com outros compostos, tais como ácidos orgânicos e carboxílicos, aminas e lipídios e ligações com outros fenóis são também comuns. São atribuídas aos flavonóides das plantas, entre outras, as funções de proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias e atração de animais com finalidade de polinização (Harborne & Williams, 2000). Os flavonóides podem agir como agentes redutores, doadores de hidrogênio e antioxidantes (Hvattum & Ekeberg, 2002) e podem proteger o corpo humano de radicais livres (Peng *et al.*, 2003).

Nas plantas, os flavonóides ocorrem na forma gliocosilada e são alguns dos compostos que possuem melhor estabilidade química e hidrofiliabilidade. São considerados ingredientes ativos num grande número de plantas medicinais, inclusive nas utilizadas na medicina tradicional chinesa (Peng *et al.*, 2003). Quercitrina, um flavonol glicosilado, comum em muitas famílias de plantas, inclusive Euphorbiaceae (Penna *et al.*, 2001), Polygonaceae (Peng *et al.*, 2003),

Leeaceae (Beck *et al.*, 2003), Leguminosae (Kang *et al.*, 2000), apresenta atividade antioxidante (Peng *et al.*, 2003), sedativa em ratos (Kang *et al.*, 2000) e antimicrobiana (Penna *et al.*, 2001).

Alguns sulfetos e polissulfetos foram descritos na literatura como fortes agentes antimicrobianos. Exemplos já consagrados são os di e trissulfetos de dialila presentes no alho (*Allium sativum*, Liliaceae) e na cebola (*Allium cepa*) (McElmay, 1991 *apud* Benevides, 2001); substâncias como o ajoeno e 2-vinil 1, 3-ditiina são fortes inibidores de agregação de plaquetas e apresentam atividade antitrombótica potente (Lawson, 1993 *apud* Benevides, 2001 & Benevides *et al.*, 2001).

Os sesquiterpenos tem importantes atividades biológicas. Nos óleos essenciais das folhas de *Annona cherimola* (Annonaceae) há presença de sesquiterpenos de esqueleto cariofileno, além de α -amorfenos e α -humuleno, entre outras substâncias. Estes óleos apresentaram atividade antimicrobiana fraca após bioensaio contra os microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei* e *Candida albicans* (Rios *et al.*, 2003). Flores frescas e secas de *Pelargonium endlicherianum* (Geraniaceae) são usadas como anti-helmintico na medicina popular da Turquia. Após estudo do óleo essencial das flores verificou-se a presença de várias substâncias entre elas α -humuleno e β -cariofileno (Bozan *et al.*, 1999). Rauter *et al.* (2001) isolaram do extrato clorofórmico da parte aérea de *Asteriscus vogelii* (Compositae), derivados bioativos de humuleno. Foram observadas atividades fitotóxicas e antitumorais em ratos e em humanos.

Podemos destacar também a importância dos taninos e suas atividades biológicas. Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional no tratamento de diversas moléstias, tais como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, queimaduras entre outros. Possuem atividades antimicrobianas, antiviral e antioxidante. Acredita-se que nas plantas eles estejam envolvidos na defesa química contra o ataque de herbívoros vertebrados ou invertebrados e contra microorganismos patogênicos. Os taninos das plantas, tornam-as indigestas ao complexarem com as proteínas salivares dos herbívoros, interferindo na digestão. Eles também

são utilizados no curtimento do couro desde a antiguidade (Santos & Mello, 1999 apud Simões *et al.*, 1999; Raven *et al.*, 1999).

Apenas uma pequena porção, provavelmente cerca de 10-15% das 250.000 ou mais espécies de angiospermas, foram investigadas de forma sistemática quanto à química e à atividade biológica de seus metabólitos secundários (Kinghorn *et al.*, 1996). Isto é especialmente verdadeiro quando se refere a plantas dos ecossistemas brasileiros como o cerrado e as florestas equatoriais e tropicais onde se encontra metade de toda biodiversidade de plantas superiores (aproximadamente 125.000 espécies). Estima-se que apenas um oitavo (cerca de 375) das substâncias potencialmente ativas foram descobertas (Mendelsohn, *et al.*, 1995; Kinghorn, 1996) e que as plantas de ambientes tropicais constituem um mercado bastante valioso.

A prospecção para a descoberta de novos agentes antimicrobianos a partir de plantas vem atraindo a atenção de laboratórios ligados às universidades e às indústrias (Adelson, 1990). Este interesse crescente deve-se a vários fatores, dentre os mais significantes: a indiscutível eficácia de derivados de plantas, a diversidade de mecanismos de ação biológica destas substâncias, a descoberta de novos bioensaios eficientes e rápidos e os métodos cada vez mais sensíveis de elucidação estrutural. Além disso, a pesquisa por novos compostos antimicrobianos a partir de plantas superiores tem sido estimulada tendo em vista, o aumento da ocorrência de micoses oportunistas e sistêmicas, a resistência de diversos patógenos a ação dos antimicrobianos em uso atualmente e a necessidade de novos agentes antifúngicos para agricultura (Hufford *et al.*, 1988; Mitscher *et al.*, 1987; Rahalison *et al.*, 1993).

1.1 FITOQUÍMICA BIOMONITORADA

Como em muitas áreas da ciência, o enfoque da fitoquímica também segue a tendência da época. Assim, até poucos anos atrás, o foco principal da fitoquímica era a quimiotaxonomia, sendo gradativamente substituída pela busca de produtos biologicamente ativos (Grayer & Harborne, 1994). Assim, o trabalho fitoquímico guiado por bioensaios, conhecido como

fitoquímica biomonitorada se estabeleceu como um dos mais importantes ramos da química de produtos naturais.

Graças ao desenvolvimento de técnicas analíticas mais precisas para isolamento, purificação e elucidação estrutural, nas últimas três décadas, conhecem-se hoje cerca de 50.000 metabólitos secundários isolados de angiospermas. No contexto da evolução das plantas terrestres, estima-se atualmente que, cerca de 400.000 espécies ocupem todo o planeta, sendo que mais de 50% (250.000) são constituídas pelas angiospermas (Brito, 1986 *apud* Benevides, 2001). Analisando-se as plantas neste contexto evolutivo, as angiospermas são consideradas o grupo mais desenvolvido e, sem dúvida, desempenham papel fundamental para o equilíbrio dos ecossistemas, dada a ocorrência de grupos de micromoléculas distintos e de estruturas complexas com inúmeras finalidades alelopáticas e biológicas (Rosenthal *et al.*, 1979 *apud* Benevides, 2001). Assim, podemos considerar as plantas como uma enorme “biblioteca” viva de moléculas e modelos bioativos, fruto de milhões de anos de evolução e adaptação.

O estudo fitoquímico biomonitorado envolve o fracionamento e purificação de compostos guiados por bioensaios. Para que uma triagem fitoquímica biomonitorada tenha sucesso, é imprescindível a escolha de um bioensaio simples, seletivo, eficaz e passível de ser incorporado como metodologia de rotina para o monitoramento das etapas de trabalho fitoquímico. As técnicas de triagem rápida de substâncias antimicrobianas podem ser classificadas em três grupos: métodos de difusão, diluição e bioautográficos (Rios *et al.*, 1988). No entanto, alguns autores consideram as técnicas de bioautografia as mais importantes técnicas de detecção de substâncias antimicrobianas novas (Betina, 1973).

1.1.1 TÉCNICAS DE DIFUSÃO EM MEIO SÓLIDO

Este tipo de técnica não requer dispersão homogênea dos extratos ou substâncias em água, o que facilita o trabalho com substâncias e/ou extratos menos polares. Consiste em semear num meio de cultura sólido (geralmente em Placas de Petri) os organismos alvos (fungos, leveduras ou bactérias) e colocar as substâncias a serem testadas em contato com este meio, por meio de um disco de papel impregnado, ou diretamente em uma cavidade cilíndrica escavada no próprio meio. Após um período de incubação, o halo de inibição é medido, e normalmente o seu diâmetro está relacionado com a atividade da substância ou extrato testado.

1.1.2 TÉCNICAS DE DILUIÇÃO

Estas técnicas requerem dispersão homogênea das substâncias a serem testadas em água. São usadas para se determinar a concentração inibitória mínima (CIM). Neste tipo de ensaio pode ser necessário o uso de agentes dispersores como polissorbatos tipo Tween 20 ou 80. A turbidez do meio líquido, após incubação (maior ou menor desenvolvimento de colônias de leveduras ou bactérias-alvo) é o parâmetro utilizado para se determinar a atividade da substância ou extrato testado. Aparelhos como leitor de placas tipo ELISA facilitam bastante o trabalho, reduzindo a quantidade de amostra a ser ensaiada e possibilitando a leitura rápida de inúmeras amostras.

1.1.3 TÉCNICAS DE BIOAUTOGRAFIA

Em um procedimento de bioautografia direta, extratos ou frações contendo as substâncias a serem testadas são cromatografadas em CCD (cromatografia em camada delgada) e após remoção completa do solvente de eluição e marcação das substâncias fluorescentes por exposição à luz UV (ultra-violeta) a cromatoplaca é borrifada com o agente revelador (esporos de um fungo, uma substância facilmente oxidável, um antígeno fluorescente, etc.). Após incubação, pode-se observar ou não zonas de inibição onde se encontram as substâncias ativas.

1.2 LOCAL DE COLETA

A Reserva Biológica do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga é representada por cobertura vegetal do tipo Floresta Estacional Sempre-verde Sub-montana (Mueller-Dombois & Ellenberg, 1974), que se apresenta bastante degradada, com diminuição de vigor e rarefação da maior parte das espécies arbustivas e arbóreas de um lado, e proliferação anormal de trepadeiras do outro (Struffaldi de Vuono *et al.*, 1984).

O Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, conhecido como PEFI (23°39'S e 46°37'W), compreende uma área de aproximadamente 549 ha, estando localizado na região sudeste do município de São Paulo (Fig. 1), fazendo divisa com o município de Diadema e com diversos bairros do município de São Paulo (Reis, 1998). No PEFI encontra-se o Instituto de Botânica (IBt), no qual este projeto foi desenvolvido. A sua vegetação nativa pode ser caracterizada como uma extensão da floresta atlântica de encosta, sem predomínio de qualquer família (Struffaldi de Vuono, 1985). O seu relevo é suave e o solo predominantemente do tipo latossolo vermelho-amarelo fase rasa (Comissão de Solos, 1960). Destaca-se por abrigar as nascentes do “Riacho do Ipiranga”, que tem um papel histórico ímpar para o Brasil. Outro aspecto muito importante é o fato de haver aproximadamente 300 ha de Mata Atlântica nativa, no seio de uma área altamente urbanizada do município de São Paulo, sendo um dos últimos remanescentes de Mata Atlântica dentro do município .



Fig.1: Vista aérea do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI). Foto: www.ibot.sp.gov.br

1.3 A FAMÍLIA EUPHORBIACEAE E SUA REPRESENTAÇÃO NO PEFI

A família Euphorbiaceae consiste de aproximadamente 300 gêneros e 7.500 espécies, de distribuição cosmopolita, mas ocorrendo em maior profusão em regiões tropicais e subtropicais (Cronquist, 1981). No Brasil ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies difundidas em todos os tipos de vegetação (Barroso, 1984). A família, bem representada na flora brasileira (Joly, 1976), é rica em espécies úteis ao homem como alimento (*Manihot utilissima*), como produtora de óleo (*Ricinus communis*), como produtora de borracha (*Hevea brasiliensis*) (Mors & Rizzini, 1966), como fitoterápico (*Phyllanthus niruri*) (Sousa *et al.*, 1991) e também como ornamentais (algumas espécies de *Euphorbia*, *Acalypha*) (Joly, 1976).

Euphorbiaceae é representada no PEFI principalmente por espécies não conhecidas popularmente. São exceção o quebra-pedra (*Phyllanthus niruri* e *Phyllanthus tenellus*), muito utilizado na medicina popular e a mamona (*Ricinus communis*), de cujas sementes é obtido um óleo utilizado na produção de óleos lubrificantes para motores de alta rotação (Sousa *et al.*, 1991).

São descritos 16 gêneros e 28 espécies para o PEFI. Alguns, como *Phyllanthus*, *Ricinus* e *Croton*, são gêneros mais conhecidos e suas espécies, com algumas exceções, são invasoras. Euphorbiaceae é especialmente bem representada na farmacopéia indígena sul-americana, com um amplo leque de usos, incluindo o tratamento de feridas, infecções de pele, inflamações, sendo também utilizada como tônico e afrodisíaco (Macrae *et al.*, 1988). Em oposição ao grande número de espécies usadas empiricamente na medicina popular, apenas um número reduzido delas teve os seus constituintes biologicamente ativos examinados. Espécies conhecidas popularmente como quebra-pedra são muito estudadas fitoquímica e farmacologicamente. O gênero *Phyllanthus* é representado no Brasil, principalmente por cinco espécies, sendo *P. niruri* a mais comum no sul do Brasil e também a mais citada para fins terapêuticos (Sousa *et al.*, 1991). Como o nome sugere, ela é usada como desobstruente de cálculos renais, além de ser ativa como diurética, sudorífera, entre várias outras indicações (Lorenzi, 1991). Fazendo jus ao

conhecimento empírico, são inúmeras as referências de resultados de ensaios para espécies de *Phyllanthus* (Unander *et al.*, 1991) e *Croton* (Peres *et al.*, 1997; Hiruma-Lima *et al.*, 2000), entre outros exemplos.

Quimicamente, a família Euphorbiaceae é muito diversificada (Cronquist, 1981) e muitos de seus metabólitos secundários são tóxicos (Kinghorn, 1979), o que pode ser o fator que contribui para o amplo uso desta família na etnomedicina amazônica (Macrae *et al.*, 1988). A família é uma rica fonte de terpenóides, com muitas espécies do gênero *Euphorbia* apresentando esses compostos, seguidas de *Phyllanthus* e *Croton*, entre outras (Mukherjee *et al.*, 1990). Numa revisão feita entre 1980 a 1989, estes autores levantaram 107 diferentes esqueletos de triterpenóides na família.

O gênero *Alchornea* (Euphorbiaceae), incluído na subfamília Acalyphoideae, tribo Alchorneae, subtribo Alchorneinae e próximo de *Aparisthium* Endl. é um táxon de distribuição pantropical, com 41 espécies encontradas na Ásia, África, Malásia, Madagascar, Antilhas, México, América Central e América do Sul (exceto no Chile e Uruguai). Das 22 espécies neotropicais de *Alchornea*, 16 ocorrem na Colômbia, centro da diversidade do gênero (Secco, 1997).

A. sidifolia (Fig.2), uma das espécies representantes do gênero no PEFI, apresenta distribuição restrita às orlas e interiores dos seguintes tipos de matas: Mata Atlântica, mata ciliar, mata serrana (plúbio-nebulares), capoeirões e mata de araucária. Ocorre do sudeste ao sul do Brasil, incluindo os Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, estendendo-se até a Argentina (Secco, 1997). Seu nome popular é tapiá-guaçú.

Esta espécie é arbórea, de 3-40 m de altura, dióica e facilmente reconhecível, pela aparência sempre murcha de suas folhas (Fig.3), devido à posição deflexa do limbo em relação ao pecíolo (Cordeiro, 1989).



Fig.2: Aspecto geral de uma planta adulta de *A. sidifolia*



Fig.3: Aspecto das folhas de *A. sidifolia*

A floração desta planta ocorre de julho a novembro, enquanto a frutificação ocorre de julho a dezembro. Entre os meses de fevereiro a julho, verifica-se um período de queda de folhas e rebrotamento característico desta espécie, dando-se nos meses seguintes um reinício da floração (Secco, 1997).

1.4 USOS POPULARES E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE *Alchornea*

Espécies do gênero *Alchornea* têm sido usadas popularmente como agente antidiarréico, antiinflamatório, anti-reumático e no tratamento de lepra e de doenças cutâneas. Estudos farmacológicos realizados com extratos brutos e compostos isolados revelaram atividades antibacteriana, antiinflamatória, antiespasmódica, antitripanossômica e antidiarréica bem como inibidora de células cancerosas Hep-G2 (carcinoma hepatocelular), MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário) e A-431 (carcinoma epidermóide) (Tona *et al.*, 1999; Setzer *et al.*, 2000 apud Conegero, 2003).

Alchornea cordifolia é usada na medicina tradicional para o tratamento de doenças infecciosas, tendo apresentado resultado bastante promissor em uma triagem do extrato etanólico 50 % contra 74 microorganismos (Okeke *et al.*, 1999). *Alchornea triplinervia* também apresentou atividade positiva contra alguns fungos e vírus (Macrae *et al.*, 1988) e Miles *et al.*, 1985, isolaram alguns constituintes com atividade antiherbívoria nesta espécie.

Na medicina popular nigeriana, folhas novas e frescas de *Alchornea cordifolia* são maceradas com água fria e o suco extraído é usado para promover cicatrização de feridas (Agbe & Oguntimein, 1987). Ebi (2000) relata também que as folhas e os caules da espécie acima citada são utilizados para o tratamento de hemorróidas. O decocto das folhas é usado para lavar os olhos, como banho frio em estado febril e dores reumáticas, para lavar feridas, para o tratamento de infecções urinárias e disenteria.

1.5 PERFIL QUÍMICO DE *Alchornea*

Os estudos químicos com espécies do gênero *Alchornea* descrevem o isolamento e a identificação de alcalóides hexaidroimidazo-pirimidínicos e guanidínicos, como principais constituintes, além de triterpenos, flavonóides e outros compostos fenólicos (Hart *et al.*, 1970 apud Conegero, 2003). O fracionamento do extrato metanólico das folhas de *A. glandulosa* resultou no isolamento de uma mistura dos esteróides β -sitosterol (1) e estigmasterol (2), do alcalóide guanidínico *N*-1, *N*-2, *N*-3- triisopentenilguanidina (3), da loliolida (4) (Fig.4) e da corilagina (5) (Fig.5). Setzer *et al.* (2000) isolaram do extrato clorofórmico de folhas de *A. latifolia* triterpenos como: *seco*-3,4-Friedelina (6) e *seco*-3,4-Taraxerona (7) (Fig.5). Outros triterpenos como: taraxerona, epifriedelinol e taraxerol também já haviam sido isolados desta planta.

Alchornea sidifolia apresenta em sua constituição química β - sitosterol e pentatronol (8) (Fig.5) (Barbo *et al.*, 2002). O pentatronol é um triterpenóide relativamente raro, tendo sido encontrado anteriormente apenas em *Pentatropis spiralis*, uma Asclepiadaceae (Rasool *et al.*, 1992).

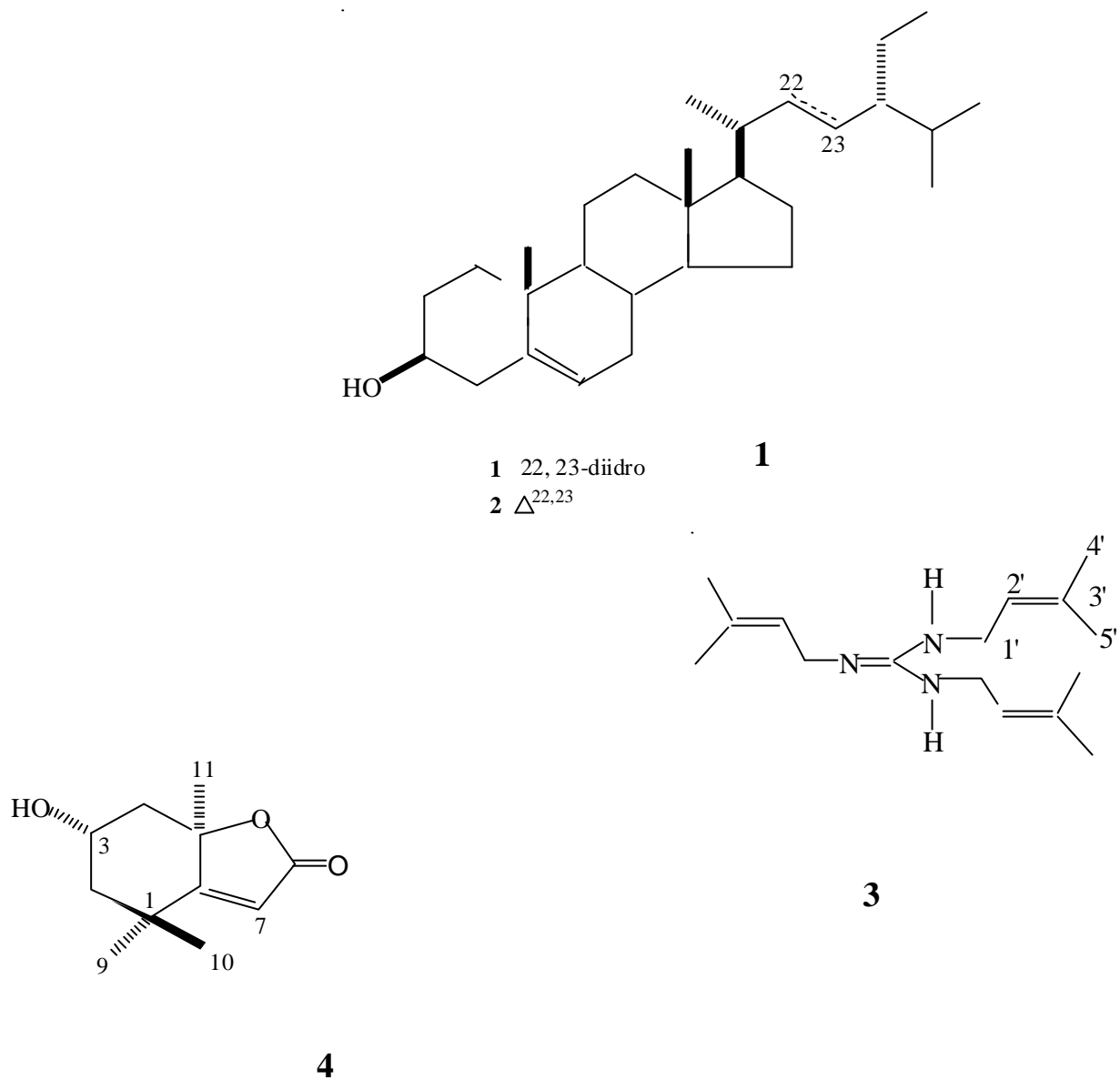


Fig.4: (1) β -sitosterol, (2) stigmasterol, (3) *N*-1, *N*-2, *N*-3- triisopentenilguanidina, (4) loliolida

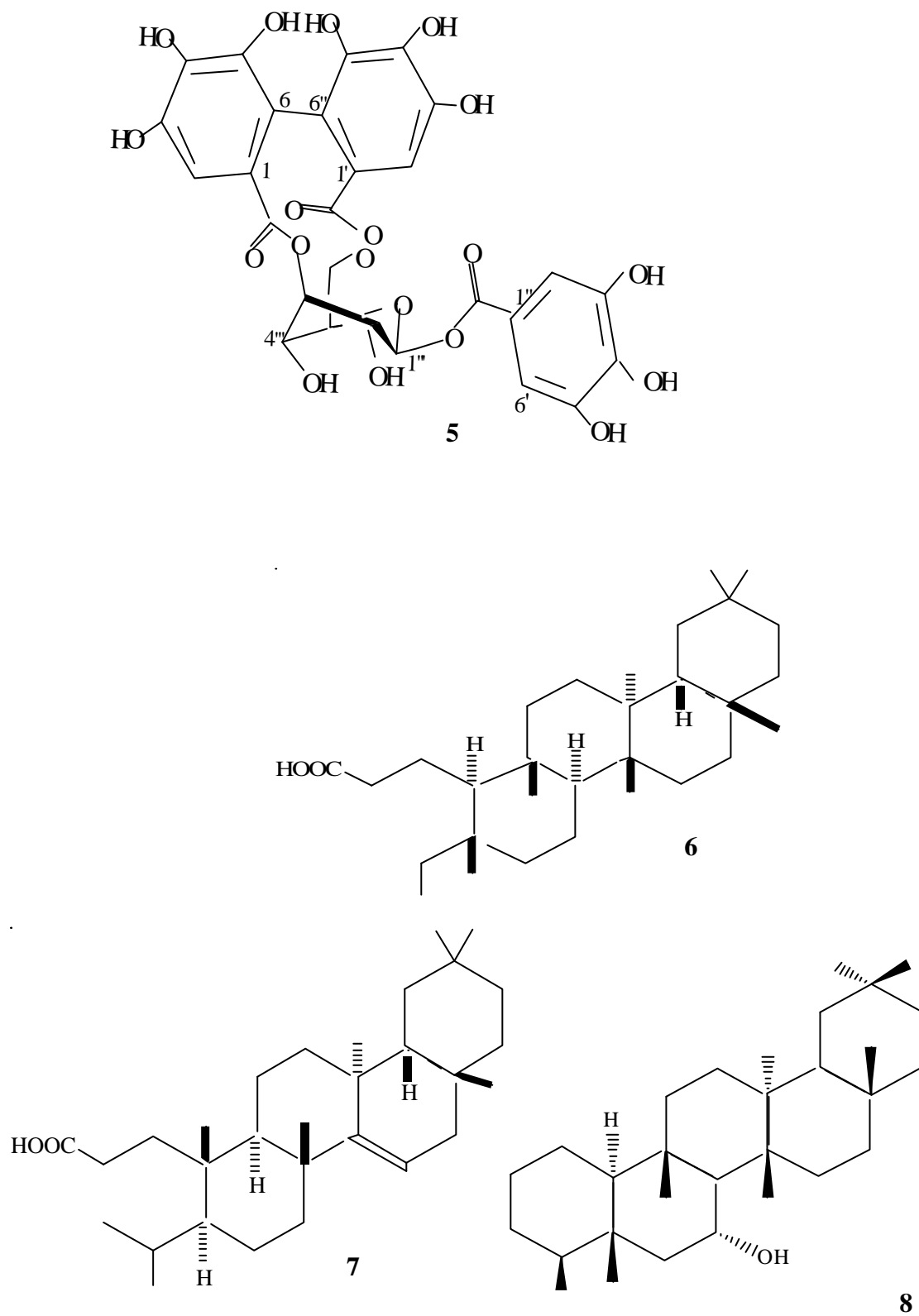


Fig.5: (5) corilagina, (6) *seco*-3,4-Friedelina, (7) *seco*-3,4-Taraxerona e (8) pentatronol

1.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O arsenal de armas de defesa contra microorganismos e herbívoros inclui barreiras físicas e químicas como cutícula espessa e a presença ou acúmulo de metabólitos secundários respectivamente. Quando esses metabólitos são antifúngicos pré-formados, são chamados de substâncias antifúngicas constitutivas. Existem também as substâncias induzidas (fitoalexinas) após a infecção e que envolvem a síntese *de novo* de enzimas para a sua formação. Essas substâncias também podem ser induzidas em plantas pela ação de fatores abióticos, como radiação UV, congelamento, etc. (Grayer & Harborne, 1994).

O fungo deuteromiceto, *Cladosporium sphaerospermum* Penzig (Fig.6) é uma espécie sapróbia, comum e cosmopolita, ocorrendo como invasor secundário em diversas partes das plantas, como a rizosfera do feijão e as sementes de arroz e milho. Ocasionalmente é isolado de homens e animais, principalmente em doenças da córnea (Shukla *et al.*, 1985, Hoog & Garro, 1995), podendo ser considerado potencialmente patogênico. É encontrado também em ambientes como ar, solo, comidas e tinturas (Hoog & Garro, 1995). As colônias, cuja cor varia de verde-escura para marrom-oliva, medem 1.2 cm a 2.0 cm de diâmetro e tem aspecto aveludado ou pulverulento. Os conidióforos medem até 300 μm , mas são geralmente mais curtos e 3-5 μm de largura com várias cadeias de conídios (Domsch *et al.*, 1993). Um resultado positivo no bioensaio fungitóxico com *C. sphaerospermum* pode ser uma indicação de possível atividade da amostra contra fungos patogênicos humanos, uma vez que espécies do gênero *Cladosporium* são sensíveis a substâncias quimicamente diversas e, por essa razão, muito utilizadas na triagem de compostos antifúngicos.

Agentes fungitóxicos provenientes de plantas superiores são utilizados tanto na clínica humana quanto na veterinária, e para avaliação das atividades, realiza-se um ensaio para detecção do efeito inibitório das substâncias sobre o crescimento de fungos (Hoog & Garro, 1995).

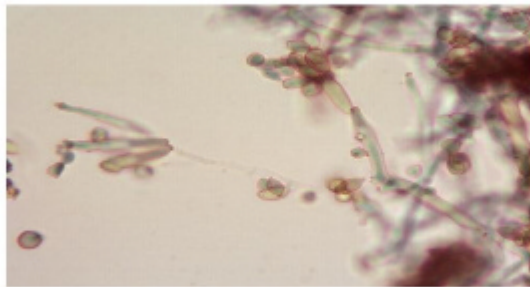


Fig.6: *C. sphaerospermum*, conídios e conidióforos X650.
Site: www.micrologylab.com/cladosporium_sphaerospermum.html

1.7 ATIVIDADE ANTITUMORAL

O isolamento de metabólitos secundários ativos tem sido de grande importância para o descobrimento de substâncias que apresentam atividade antineoplásica. Estas substâncias podem servir como modelo para a obtenção de medicamentos semi-sintéticos ou sintéticos utilizados em quimioterapia, caso dos sintéticos derivados dos alcalóides bisindólicos, vincristina e vimblastina (Fig.7: 9) constituintes das folhas de *Catharanthus roseus* e do diterpeno nitrogenado, paclitaxel ou Taxol (Fig.7: 10), que é utilizado no tratamento de câncer de ovário. Este composto é obtido da casca de *Taxus brevifolia* e sua ação é antimitótica (Kinghorn & Seo, 1996). Para detectar possíveis agentes antitumorais em extratos vegetais, é utilizado o bioensaio com linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, que foram desenvolvidas através de engenharia genética por pesquisadores da Smithkline and Beecham Pharmaceutical Co. dos Estados Unidos da América e que são deficientes em uma via de reparação do DNA (Jonsson *et al.*, 1986) é utilizado para detectar possíveis agentes antitumorais em extratos vegetais (Meda, 1998).

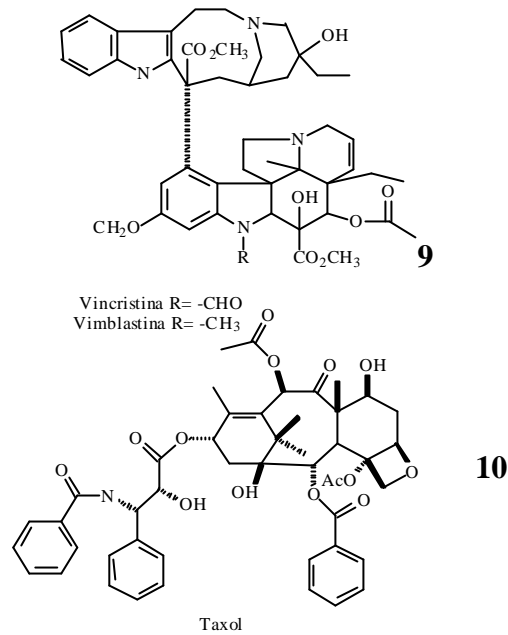


Fig.7: Substâncias anticarcinogênicas de origem vegetal: (9) vincristina e vimblastina e (10) taxol

O princípio do bioensaio com linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* está fundamentado no fato que células tumorais são deficientes nas vias de reparação e/ou recombinação do DNA danificado. Baseado nesta constatação, agentes ou drogas com toxicidade seletiva dirigida para células deficientes em uma das vias de reparação do DNA podem agir como agentes antitumorais (Jonsson *et al.*, 1986).

Dentre as espécies de Euphorbiaceae, *A. sidifolia* foi escolhida para estudo químico por apresentar atividade antifúngica, pela disponibilidade de material vegetal no PEFI, além da escassez de estudos químicos e da necessidade de estabelecer relações químicas comparativas entre espécies do mesmo grupo taxonômico.

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo o estudo químico biomonitorado de *Alchornea sidifolia* com ensaios antifúngicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

Foram feitas 5 coletas de folhas e caules de *A. sidifolia* no Instituto de Botânica (IBt), localizado no PEFI, no mês de dezembro de 2002. Para extração de óleo essencial foram coletadas flores (masculinas e femininas) e folhas frescas nos meses de agosto a outubro de 2003. As raízes foram coletadas em maio de 2004 e janeiro de 2005 para extração de óleo essencial. A identificação desta espécie foi feita pela Dra. Inês Cordeiro e um voucher, Silvestre, M.S.F. 227 (SP 169388), encontra-se depositado no Herbário Maria Eneida P. K. Fidalgo (SP) do Instituto de Botânica.

3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

O material vegetal seco a 40 °C em estufa por sete dias, foi moído e extraído com etanol até exaustão. O extrato obtido foi concentrado em evaporador rotatório fornecendo o concentrado etanólico. Este concentrado foi suspenso em MeOH: H₂O e particionado sucessivamente com hexano, clorofórmio e acetato de etila. As fases resultantes foram concentradas a vácuo fornecendo os respectivos extratos (Fig.8).

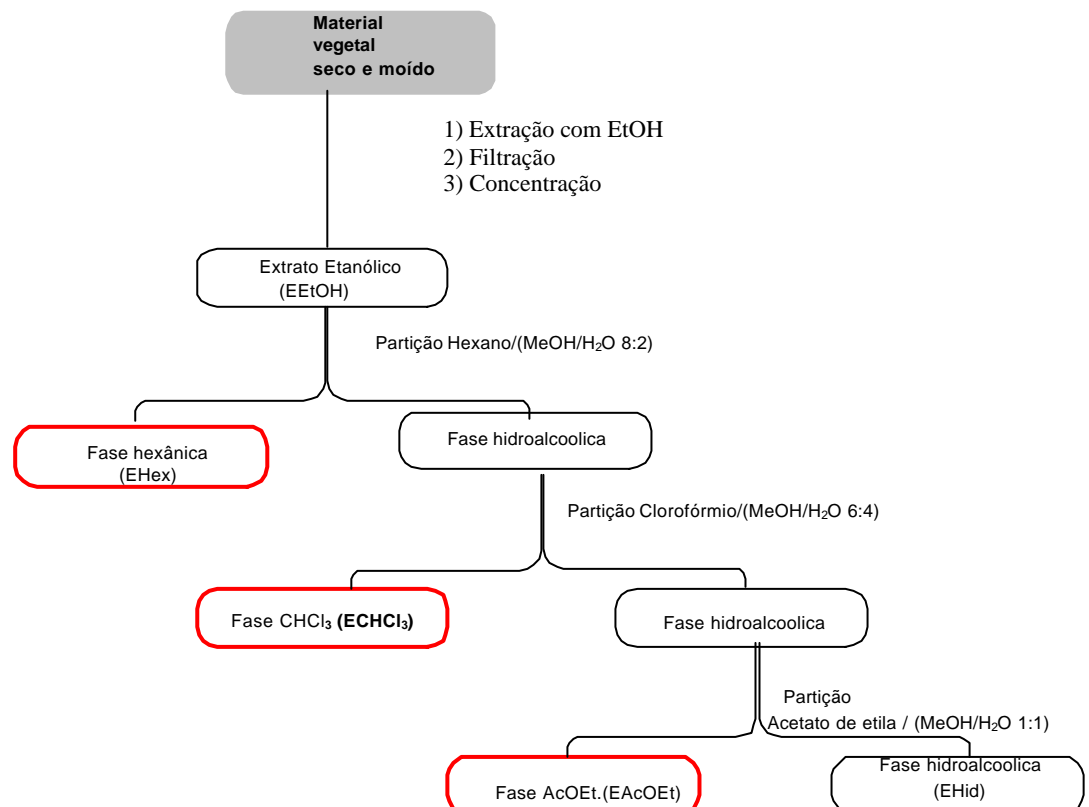


Fig.8: Esquema geral de obtenção dos extratos brutos

3.3 TRIAGEM FITOQUÍMICA DE *A. sidifolia*

3.3.1 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD), COM REVELADORES ESPECÍFICOS PARA CARACTERIZAÇÃO DE CLASSES DE SUBSTÂNCIAS

Para a cromatografia em camada delgada analítica (CCD), foram utilizadas placas de gel de sílica (Sthal, 1969). Os cromatogramas obtidos foram observados sob luz ultravioleta de comprimentos de onda 254 e 366 nm e fotografados com equipamento Camag Reprostar. Foram empregados também, os seguintes reveladores:

- Reagente de Liebermann-Burchard: para a detecção de triterpenos e esteróides (saponinas e princípios amargos) (Costa, 1972). Preparo do revelador: 1 mL de anidrido acético e 1 mL de ácido sulfúrico foram adicionados cuidadosamente a 10 mL de etanol absoluto, resfriado em banho de gelo. A placa borrifada com o reagente e aquecida a 100°C por 5 a 10 minutos é então observada na luz visível; o aparecimento de mancha roxa indica o presença de triterpeno e de mancha verde, a de esteróide.
- Reagente Dragendorff: para a detecção de alcalóides e compostos com nitrogênio heterocíclico (Wagner & Bladt, 2001). Preparo do material a ser testado: O pó de folhas (1g) foi misturado completamente com 1 mL de solução de amônia 10% e então extraído por 10 minutos com 5 mL de metanol sob refluxo. O filtrado foi concentrado até 500-1000 µL.

Preparo do revelador:

Solução A: foram dissolvidos 0,85 g de nitrato básico de bismuto em 10 mL de ácido acético glacial e 40 mL de água destilada sob aquecimento. Para solução B foram dissolvidos 8 g de iodeto de potássio em 30 mL de água destilada. Para solução estoque foram misturados A + B (1:1). Para o reagente spray 1 mL da solução estoque foi misturado com 2 mL de ácido acético glacial e 10 mL de água destilada. As cromatoplasas após eluídas com tolueno: acetato de etila: dietilamina (70:20:10) foram

reveladas com este reagente específico para alcalóides e foram observadas sob luz UV de comprimento curto e sob luz visível. O aparecimento de manchas nas cores marrom e laranja, sob luz visível, indicam a presença de alcalóides.

Reagente para a detecção de flavonóides:

- Solução de cloreto de alumínio a 1% em etanol: A placa foi borrifada com esta solução e então inspecionada em luz UV longo para detecção de flavonóides.
- Reagente NP/PEG: para a detecção de ácidos carboxílicos, fenóis e cumarinas. Preparo: 1% de difenilborico (NP) em metanol e 5% de polietilenoglicol (PEG) em etanol. A placa foi borrifada com 10 mL de NP e depois 8 mL de PEG e foi observada sob luz UV longo (366 nm) para detecção de flavonóides. A cor azul brilhante indica a presença de ácidos carboxílicos fenólicos e cumarinas. As cores laranja, amarelo, alaranjado e verde amarelado indicam a presença de flavona e flavonol (Wagner & Blatt, 2001).

3.3.2 DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS EM CAULES E FOLHAS DE *A. sidifolia*

500 mg de galhos e folhas secas, moídos, foram extraídos 5 vezes com 25 mL de solução MeOH: H₂O (1: 1) em ebulição. Os extratos foram filtrados e diluídos em água 15 vezes.

Reagente Folin-Denis:

Para 750 mL de água foram adicionados 100 g de tungstato de sódio. 2H₂O, 20 g de ácido fosfomolibdico e 50 mL de ácido fosfórico. A mistura foi refluxada por 2 horas e após resfriada, diluída para 1 litro.

Solução saturada de carbonato de cálcio:

Foram adicionados 35 g de carbonato de cálcio anidro a 100 mL de água, dissolveu-se a 70-80°C e resfriou-se por uma noite. A solução saturada foi semeada com um cristal carbonato de cálcio. 10 H₂O e após cristalização, filtrada com lã de vidro. 100 mg de ácido tânico foram dissolvidos em um litro de água (1 µg/10 µL⁻¹). A solução foi recém-preparada para obtenção da curva padrão.

Curva Padrão:

Para obtenção da curva padrão, 12 alíquotas da solução de ácido tânico, em várias concentrações foram adicionados ao reagente de Folin-Denis à solução de carbonato de cálcio. A mistura reacional foi bem homogeneizada e após 30 minutos, a absorbância a 730 nm, foi lida em espectrofotômetro UV-1201, UV-Vis Shimadzu. Para a determinação dos teores de fenóis solúveis nos caules e folhas foram utilizados 100 µL das soluções hidrometanólicas obtidas e as absorbâncias medidas conforme descrito acima. A curva padrão (Fig.14) foi obtida no programa Excel em μg ácido tânico $10 \mu\text{L}^{-1}$ x absorbância e o resultado expresso em porcentagem (%).

3.3.3 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE FLAVONÓIDES EM CAULES E FOLHAS DE *A. sidifolia*

Os flavonóides foram quantificados de acordo com Stahl & Schild, 1981 apud Santos *et al.*, 2002 modificado, em que se utilizou rutina como padrão em solução de cloreto de alumínio. A curva padrão foi construída a partir de soluções crescentes de rutina, preparadas com metanol aquoso 70%. Para tanto, 100 mg de rutina em 500 mL de MeOH foram diluídos para $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, tomando-se 25 mL da solução estoque, completando-se a seguir para 50 mL com MeOH 70%. A solução de cloreto de alumínio foi preparada colocando-se 5 g de AlCl_3 em 100 mL de MeOH. Alíquotas de 3,5 mL (350 µg) a 7,5 mL (750 µg) com intervalos de 0,5 mL foram utilizadas para a confecção da curva padrão, acrescidas de 1 mL de cloreto de alumínio e completadas para 50 mL com MeOH 70% em balão volumétrico.

As amostras de folhas e caules de *A. sidifolia* foram preparadas a partir de dois gramas de pó com 150 mL de metanol 70% em Soxhlet, por três horas. O extrato foi filtrado em papel de filtro e o volume completado para 250 mL. Uma alíquota de 15 mL foi colocada em balão volumétrico com 1 mL de cloreto de alumínio e o volume completado para 50 mL. A leitura foi feita a 425 nm em espectrofotômetro de UV/visível (Shimadzu). Para se obter a concentração de flavonóides nas amostras ($\mu\text{g mL}^{-1}$) as absorbâncias foram lidas e estes dados foram inseridos na curva padrão de rutina. A análise foi feita em triplicata e os dados expressos em porcentagens.

3.3.4 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE TANINOS EM CAULES E FOLHAS DE *A. sidifolia*

Segundo Hagerman (1987), foi preparada uma solução de agarose 1% em tampão contendo ácido acético e ácido ascórbico nas concentrações de 50 mM e 60 μ M respectivamente, ajustando-se o pH para 5,0 com NaOH 1N. Deixou-se ferver a solução até a agarose dissolver totalmente. Posteriormente, a solução foi resfriada a 45°C num banho de água e então adicionou-se o BSA (Soro de Albumina Bovina) 0,1%, agitando-se até total homogeneização. Foram colocados 9,5 mL desta solução em placas de Petri (8,5 cm de diâmetro) pré aquecidas.

Os tecidos vegetais, 500 mg de galhos e folhas secas, moídos, foram extraídos 5 vezes com 5 mL de solução MeOH: H₂O (1: 1) em ebulição. Foram retiradas alíquotas de 3 mL dos extratos que foram secas e retomadas em 300 μ L de MeOH: H₂O (1: 1), dos quais foram utilizados 20 μ L para a realização do teste.

Com o auxílio de um furador de rolhas de 6 mm de diâmetro, foram feitas cavidades no gel de agarose, com espaços de cerca de 1,5 cm entre elas. Os extratos (20 μ L) foram então depositados nas cavidades. Paralelamente, fez-se uma placa em cujas cavidades depositaram-se 4, 8, 12, 16, 20 e 24 μ L de uma solução de ácido tânico (25 mg mL⁻¹) em metanol 50% para obtenção de curva padrão. Estas placas foram incubadas a 30°C por 48 horas. Os diâmetros dos halos (mm), de precipitação de proteínas, foram medidos e todos os dados foram obtidos em triplicata.

3.3.5 EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS, FLORES E RAÍZES DE *A. sidifolia*

Foram coletadas 250 g de folhas e flores frescas de *A. sidifolia* e 700 g de raízes frescas. Estes materiais foram submetidos a arraste por vapor d'água por duas horas em aparelho tipo Clevenger.

3.4 FITOQUÍMICA

3.4.1 CROMATOGRAFIA EM COLUNA (CC)

Como fases estacionárias para cromatografia em coluna foram utilizados Sephadex LH-20 com o eluente metanol; sílica (CCSi) gel de 70-230 e 230-400 mesh 60 Å (flash) com eluentes: Éter de Petróleo, Clorofórmio, Acetona e Metanol; resina Diaion HP-20 com eluentes: H₂O 100%, H₂O/MeOH 8: 2, H₂O/MeOH 6: 4, H₂O/MeOH 4: 6, H₂O/MeOH 2: 8 e MeOH 100%. As colunas de vidro utilizadas foram de diferentes diâmetros, variando de acordo com a quantidade de amostra em relação a fase estacionária (Sthal, 1969).

3.4.2 CROMATOGRAFIAS EM CAMADA DELGADA ANALÍTICA (CCD) E PREPARATIVA (CCDP)

As cromatografias em camada delgada analítica e preparativa foram feitas em cromatoplasmas de alumínio e de vidro, recobertas com sílica gel 60 F₂₅₄ e PF₂₅₄ Merck, respectivamente. As cromatoplasmas foram observadas sob luz ultra-violeta nos comprimentos de onda (λ) 254 e 366 nm ou reveladas com H₂SO₄ 10% em EtOH.

3.4.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Para a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em escala analítica foi utilizado o cromatógrafo Varian Pro Star modelo 330, série 00368, equipado com detector de arranjo de diodo (DAD), coluna C18 Phenomenex 250X 4.60 mm. Para a obtenção dos cromatogramas, 10 mg de amostra foram ressuspensos em 1 mL min⁻¹ de MeOH e uma alíquota de 50 μ L foi diluída com 1 mL de MeOH/H₂O 1: 1. Foram injetados 20 μ L e as amostras foram analisadas em comprimento de onda de 254 nm, fluxo 1 mL minuto. Utilizou-se o gradiente tempo zero: 5% MeOH e 95% H₂O com 1% de ácido acético, tempo 30 até 45 minutos: 100% MeOH. Os espectros no UV, dos picos registrados nos cromatogramas, foram observados nos comprimentos de onda 254 nm a 280 nm. Foi utilizado também o equipamento Varian Prostar, modelo 310, série 252, detector UV- Visível, coluna analítica C18 Phenomenex 250X 4.60 mm, fluxo 1 mL min⁻¹. As amostras (20 μ L) foram analisadas no comprimento de onda 280 nm na condição

tempo 0: 20% MeOH e 80% H₂O com 1% de ácido acético, tempo 30 minutos até 60 minutos: 70% MeOH e 30% H₂O com 1% de ácido acético.

Para a CLAE em escala semipreparativa foi utilizado o equipamento Varian Prostar, modelo 310, série 252, detector UV-Visível, coluna semipreparativa Supelcosil LC-18, 250X10mm, fluxo 1 ml min⁻¹. As amostras foram filtradas em cartuchos Sep-Pak da marca Waters e injetados 500 µL de amostra por vez (comprimento de onda foi 280nm, no sistema 11% acetonitrila e 89% H₂O, 30 minutos).

3.4.4 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (CG-EM)

O CG-EM utilizado foi o Agilent 5973 Network, Mass Seletive Detector, 6890 series CG System ionização por impacto eletrônico (IE) a 70 eV e coluna HP (5MS). A biblioteca de banco de dados para comparação dos espectros de massas das amostras injetadas foi Wiley 275L. O gás de arraste utilizado foi o hélio. Foi injetado 1 µL de amostra.

As condições utilizadas foram:

- 1) Temperatura da coluna variou de 40°C a 290°C, aumentando 10°C por minuto, temperatura do injetor 250°C e temperatura do detector 290°C;
- 2) Temperatura inicial da coluna 50°C (um minuto), aumentando até 200°C, com variação 11°C por minuto, permanecendo por um minuto nesta temperatura. A partir dessa temperatura, a variação de 20°C por minuto até 300°C por três minutos. Temperatura do injetor de 250°C e do detector de 275°C.

3.4.5 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros de RMN ¹H e de ¹³C foram obtidos em espectrômetro Bruker DX 300 e AC 200, operando a 500, 300, 125 e 75 MHz, para hidrogênio e para carbono 13, respectivamente. O padrão utilizado como referência interna foi TMS, marca Aldrich. Como solvente foi utilizado, DMSO-d₆ e CD₃OD, marca Merck. Os deslocamentos químicos foram expressos em unidades δ e as constantes de acoplamento (*J*) em Hz.

3.5 FITOQUÍMICA BIOMONITORADA

3.5.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os extratos de acetato de etila, clorofórmico e hexânico (2 mg) foram ressuspensos em uma mistura de metanol e dimetilsulfóxido (1:1, V/V) para obter uma solução de 20 mg mL⁻¹. Como controle positivo das bactérias foi utilizada uma solução de Cloranfenicol (1mg mL⁻¹) no mesmo solvente das amostras e para as leveduras foi utilizada uma solução de Nistatina (1mg mL⁻¹). A atividade antimicrobiana frente a *Escherichia coli* (ATCC 10531), *Staphylococcus aureus* (ATCC 9027) e *Candida albicans* (ATCC 10231) foi avaliada pelo método de difusão em ágar em meio Antibiótico No 1 (Merck) e Ágar Sabouraud (Difco), para a levedura, pela adição de 40 µL da solução dos extratos vegetais em poços perfurados nas placas de Petri. As placas foram incubadas a 35°C e 28°C, para as bactérias e leveduras respectivamente, durante 24 h. Os resultados foram avaliados medindo-se os halos de inibição dos extratos, do controle positivo (20 µL) e do solvente (Japanese Pharmacopoea, 2000). Para a verificação de atividade antifúngica, os extratos foram submetidos à bioautografia direta em cromatografia em camada delgada com o fungo *Cladosporium sphaerospermum* SPC- 1485, (Homans & Fuchs 1970). Após desenvolvimento da cromatografia, secagem e localização dos compostos fluorescentes sob luz UV, a mesma foi borrifada com uma suspensão de esporos do fungo revelador e incubada em ambiente úmido, por 2-4 dias, à temperatura ambiente. Neste teste, a presença de zona de inibição de crescimento de fungo indica a ocorrência de compostos com atividade antifúngica. Foram aplicados de 100 a 400 µg de amostras nas cromatoplacas.

3.5.2 ATIVIDADE ANTITUMORAL

A metodologia básica para avaliação dos resultados do bioensaio com as linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* está fundamentada na resposta diferencial entre linhagens capazes (Rad +) e não capazes (Rad52Y e RS321) de reconstituir a seqüência do DNA, frente à uma determinada amostra (extrato bruto, suas frações e/ou substância pura). Uma amostra será considerada com atividade antitumoral (potencial), quando apresentar um halo de inibição com

uma diferença de pelo menos 6 mm a favor de pelo menos uma das linhagens deficientes em comparação com a linhagem selvagem (Rad +) (Jonsson *et al.*, 1986). Para a triagem antitumoral, foram utilizadas três linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo a linhagem Rad + proficiente e as linhagens Rad 52Y e RS 321 deficientes nas vias de reparação e/ou recombinação do DNA. Estas linhagens foram cedidas pela Profa Dra Vanderlan da Silva Bolzani (IQ/UNESP-Araraquara) e estão sendo mantidas na Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, IBt, sob responsabilidade da pesquisadora Dra Maria Cláudia Marx Young e da técnica do projeto Biota/FAPESP, a bióloga Débora Gomes Agripino. As culturas estoques foram preparadas a partir de leveduras mantidas em erlenmeyers contendo 50 mL de meio líquido YPD estéril (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de dextrose) e incubadas sob agitação por 48 horas a 30°C. Para o desenvolvimento do bioensaio foram utilizadas suspensões celulares da cultura estoque de cada linhagem. Foi feita diluição na proporção de 1 mL da cultura de levedura para 50 mL de água destilada estéril, acrescida de 50 µg mL⁻¹ do antibiótico gentamicina para evitar possíveis contaminações por bactérias. As concentrações das suspensões celulares de cada linhagem foram padronizadas pela leitura de densidade óptica em espectrofotômetro calibrado em 600 nm. Foram adicionados 30 mL do meio YPD com 2% de ágar em placas de Petri com 9 cm de diâmetro. Após gelificação do meio, acrescentou-se 2 mL da suspensão celular de cada linhagem sobre a superfície da placa. Após inoculação das leveduras, sete cavidades de 6 mm de diâmetro foram escavadas no meio de cultura e as amostras (2 mg), dissolvidas em DMSO: MeOH (1:1) foram depositadas. As placas foram incubadas por 48 horas a 30°C, após este período os diâmetros dos halos de inibição foram medidos e comparados com os dos padrões utilizados para cada linhagem (Camptotecina para Rad+ e Rad 52Y; Streptonigrina para RS 321). (Bioensaio desenvolvido pela SmithKline Beecham Pharmaceutical Company, PA, USA. Colaboração foi negociada entre Dr D.G. Kingston, Virginia Polytechnic Institute and State University, VA e Dra Vanderlan da Silva Bolzani (UNESP/Araraquara).

4. RESULTADOS

4.1 OBTENÇÃO DE EXTRATOS BRUTOS DE RAIZ, CAULES E FOLHAS DE *A. sidifolia*

O procedimento padrão para obtenção dos extratos brutos está descrito na Fig.8. Das raízes (1000g de pó), obteve-se o extrato EEtOH (2,8g), que após partição forneceu os EHex (0,0587g), ECHCl₃ (0,136g), EAcoEt (0,0653g) e EHid (1,657g) com os seguintes rendimentos: 0,28%, 0,006%, 0,013%, 0,0065% e 0,165% respectivamente. Das folhas (6000g de pó) obteve-se 0,94% (56,3g) do EEtOH, que submetido ao mesmo processo de partição produziu: 0,21% (EHex, 12,69g), 0,22% (ECHCl₃, 13,37g), 0,097% (EAcoEt, 5,8g) e 0,41% (EHid, 24,3g). Dos caules (2000g de pó) obteve-se: 0,68% de EEtOH (13,55g) que após partição produziu 0,043% (EHex, 0,86g), 0,038% (ECHCl₃, 0,752g), 0,24% (EAcoEt, 4,8g) e 0,32% (EHid, 6,34g).

4.2 TRIAGEM FITOQUÍMICA DE *A. sidifolia*

4.2.1 ANÁLISE EM CCD PARA CARACTERIZAÇÃO DE CLASSES DE SUBSTÂNCIAS COM REVELADORES ESPECÍFICOS

Os testes fitoquímicos em CCD realizados com EHex de folhas apresentaram quatro manchas roxa após revelação com o Reagente de Liebermann-Burchard, indicando a presença de triterpenos (Costa, 1972) (Fig.9). Os outros extratos brutos de *A. sidifolia* testados com este reagente nas mesmas condições não foram sensíveis ao método.

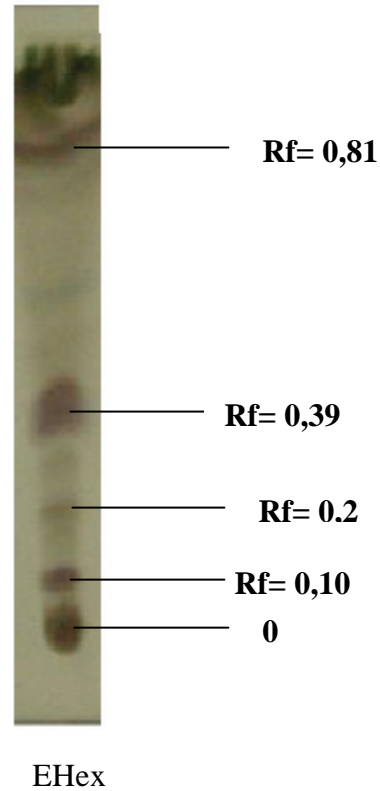


Fig. 9 Cromatoplate do resíduo hexânico (Hex) de folhas de *A. sidifolia*. Sistema de eluição: CHCl_3 /MeOH (95: 5). 200 μg . Revelador: Reagente de Liebermann-Burchard.

Os extratos brutos de raiz, caules e folhas de *A. sidifolia* testados para verificar a presença de alcalóides com o Reagente Dragendorff foram todos negativos.

A presença de flavonóides foi observada nas frações obtidas de CC (Diaion HP20) e CC Sephadex LH-20 do EAcOEt de folhas reveladas com Reagente NP/PEG (Fig.10) e com AlCl_3 a 1% em EtOH (Figs.11 e 12). As manchas alaranjadas ($R_f = 0,55$ e $0,71$) e amarelas ($R_f = 0,50$, $0,61$, $0,82$) são características de flavonas e flavonóis (Wagner & Bladt, 2001).

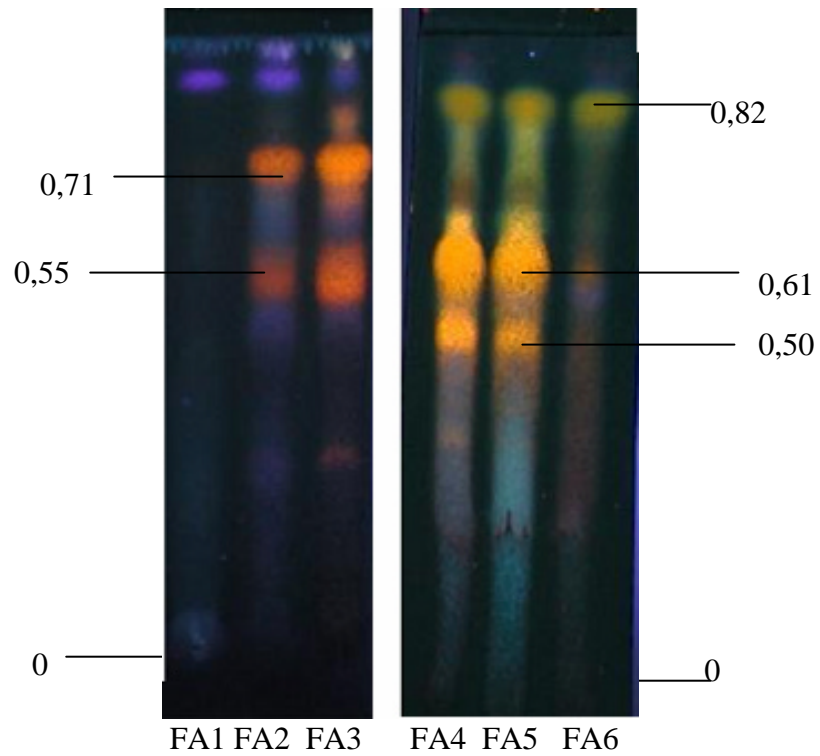


Fig. 10: Cromatogramas das frações obtidas de CC (Diaion HP20) do EAcOEt de folhas de *A. sidifolia*. Sistema de eluição: Acetato de Etila/Ác.Acético/Ác. Fórmico/H₂O (100: 11: 11: 26). 200µg. Esquema 1. Revelador: Reagente NP/PEG.

4.2.2 ESTUDO DE FENÓIS TOTAIS DE CAULES E FOLHAS DE *A. sidifolia*

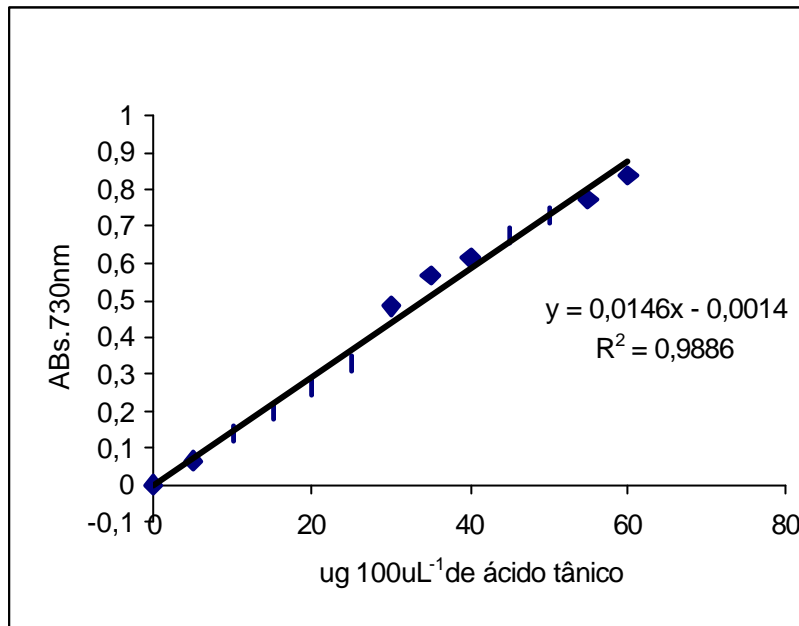


Fig.I: Curva Padrão de ácido tânico

As médias das absorções, após leitura em espectrofotômetro a 730 nm, para folhas foi 0,619 e para caules 0,176. A determinação quantitativa de fenóis totais em caules foi 9,8% (12 µg 100 µL⁻¹) e em folhas foi 32,6% (42 µg 100 µL⁻¹). Estas porcentagens foram obtidas com base nas medidas feitas utilizando a curva padrão (Fig.I).

4.2.3 DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES DE CAULES E FOLHAS DE *A. sidifolia*

As médias das absorções, após leitura em espectrofotômetro a 425 nm, para folhas foi 0,690 e para caules 0,187. A determinação quantitativa de flavonóides totais foi de 22% (531µg mL⁻¹) nas folhas e de 6% (144µg mL⁻¹) nos caules de acordo com a curva padrão de concentração de rutina (Fig.II).

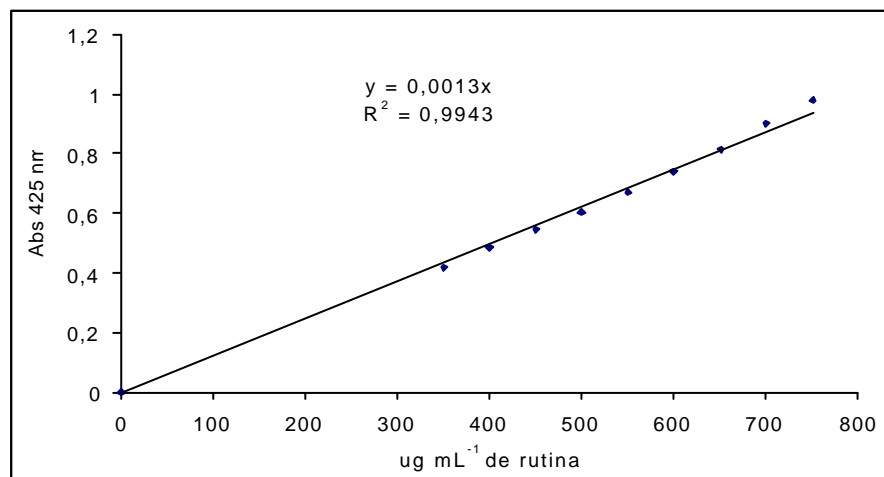


Fig.II: Curva padrão de concentração de rutina

4.2.4 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE TANINOS EM *A. sidifolia*

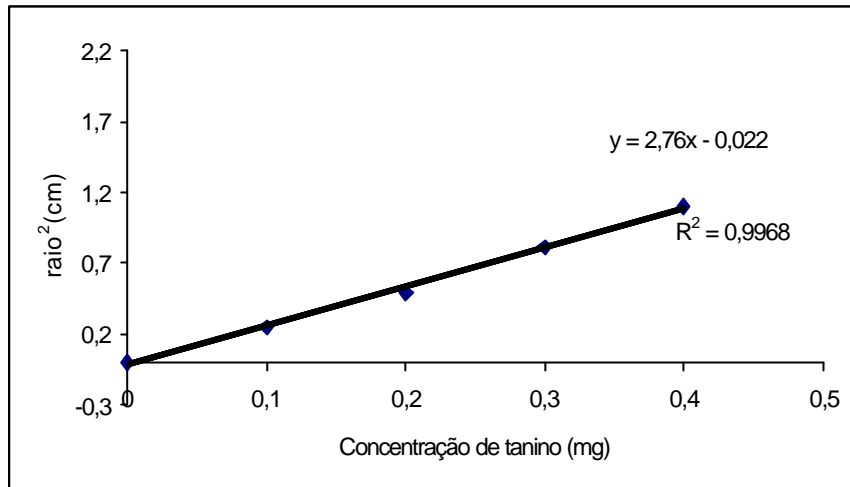


Fig.III: Curva Padrão de ácido tânico

As folhas apresentaram halo de precipitação de proteínas (raio) de 0,330 cm e os caules de 0,2025 cm. A quantidade de taninos nas folhas foi 0,110 mg (2,75%) e nos caules 0,065 mg (1,62%) (Fig.III)

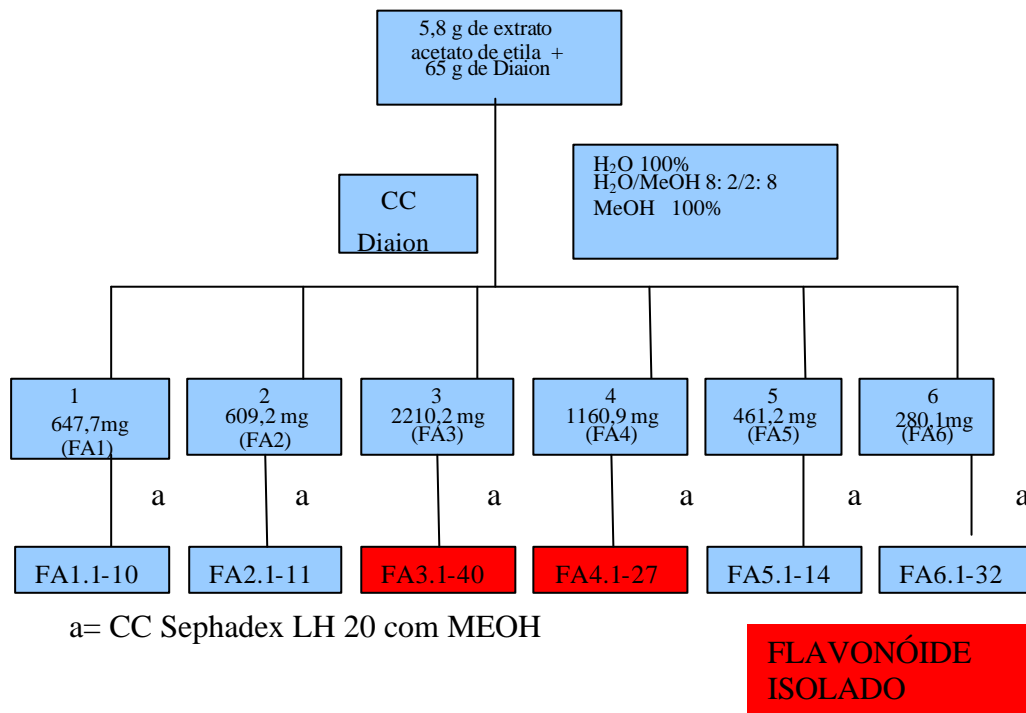
4.2.5 EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL

Foram feitas extrações de óleo essencial de folhas, flores e raízes de *A. sidifolia* por arraste de vapor d'água por duas horas em aparelho Clevenger. Não foi obtido óleo essencial de folhas, flores e raízes.

4.3 FITOQUÍMICA

4.3.1 ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA QUERCITRINA DO EAcOEt DAS FOLHAS DE *A. sidifolia*

O EAcOEt das folhas foi submetido ao fracionamento (esquema 1) em CC de Diaion HP-20. As frações obtidas foram monitoradas em CCD e reveladas com NP/PEG (Fig.10) e reunidas conforme valores de Rf e submetidas a novos fracionamentos em Sephadex LH-20 com MeOH. As frações que apresentaram resposta positiva a revelação com cloreto de alumínio em CCD e fatores de retenção semelhantes foram reunidas (Figs.11 e 12) em 32 grupos conforme indicado na Tabela 1. As frações FA3.7 e FA4.6, apresentaram-se como um sólido amarelo, com massa de 196 mg e após CCD e revelação com $AlCl_3$ apresentaram manchas amarelas de $R_f=0,85$ (Figs.11 e 12). Estas frações foram submetidas por RMN 1H e de ^{13}C e foram identificadas como o flavonóide glicosilado: quercitrina (Fig.13).



Esquema 1: Fracionamento do EAcOEt de folhas de *A. sidifolia*. Frações reunidas da CC em Diaion e da CC em sephadex LH-20 eluída com metanol.

Tabela 1: Relação das frações obtidas por CC em sephadex LH-20 eluídas com MeOH.

FRAÇÕES	GRUPOS DE SUBFRAÇÕES REUNIDAS	MASSA (mg)
FA1	FA1.1 (1)	44
FA2	FA2.2 (2-3)	97
	FA2.3 (4-5)	67
	FA2.4 (6-7)	76
	FA2.5 (8-13)	288
	FA2.6 (14)	18
	FA2.7 (15-17)	62
	FA2.8 (18)	9
FA3	FA3.1 (1-2)	46
	FA3.2 (3)	32
	FA3.3 (4)	32
	FA3.4 (5-6)	77
	FA3.5 (7)	89
	FA3.6 (8-9)	160
	FA3.7 (10-12)	96
	FA3.8 (13-14)	170
FA4	FA4.1 (1)	40
	FA4.2 (2)	46
	FA4.3 (3)	33
	FA4.4 (4-5)	110
	FA4.5 (6)	10
	FA4.6 (6-8)	100
FA5	FA5.1 (1)	20
	FA5.2 (2)	31
	FA5.3 (3)	18
	FA5.4 (4-5)	54
	FA5.5 (6-9)	65
	FA5.6 (10-19)	268
	FA5.7 (20-27)	39
FA6	FA6.7 (7-8)	20
	FA6.8 (9-12)	23
	FA6.9 (13)	17

■ Flavonóide isolado (Quercitrina)

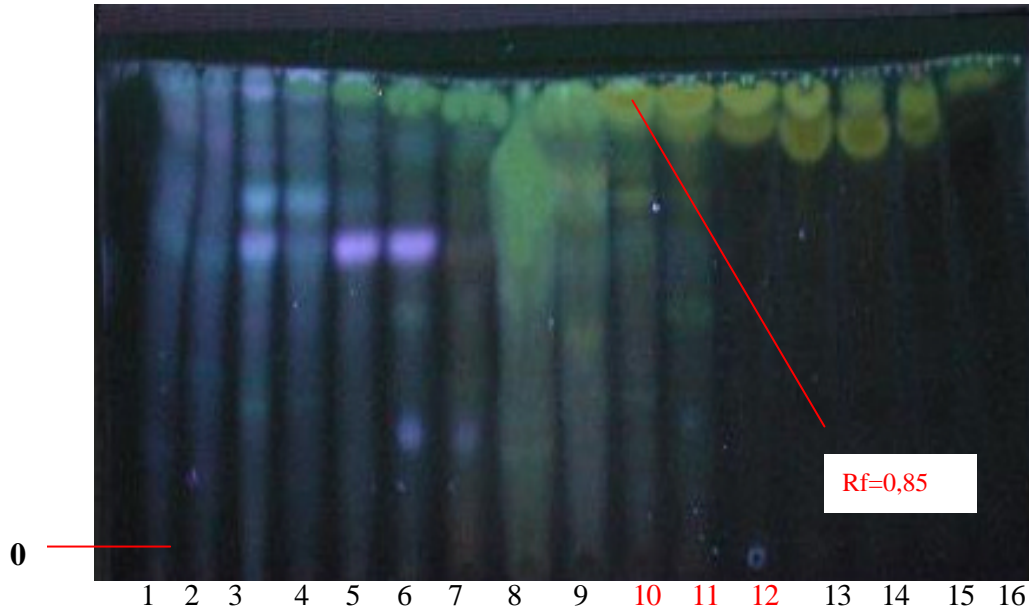


Fig. 11: Cromatoplaça das subfrações 1 a 16 (fração 3) obtidas de CC em sephadex LH-20 do EAcOEt de folhas de *A. sidifolia*. Sistema de eluição: Acetato de Etila/Ác.Acético/Ác. Fórmico/H₂O (100: 11: 11: 26). 200µg. Revelador: AlCl₃

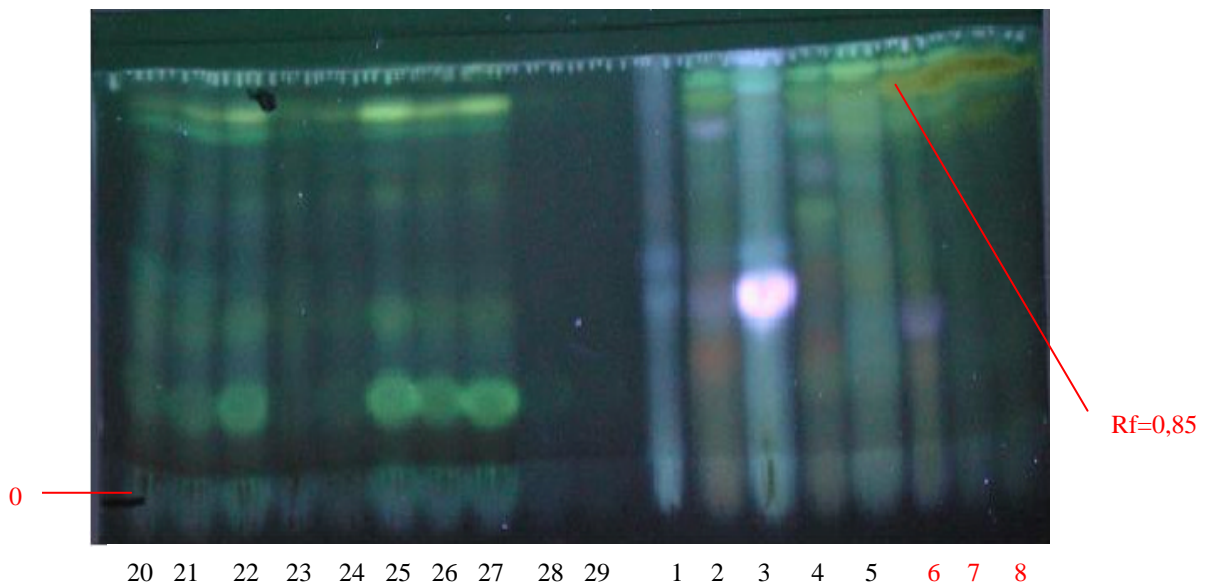


Fig. 12 Cromatoplaça das subfrações 20 a 29 (fração 5) e subfrações 1 a 8 (fração 4) obtidas de CC em sephadex LH-20 do EAcOEt de folhas de *A. sidifolia*. Sistema de eluição: Acetato de Etila/Ác.Acético/Ác. Fórmico/H₂O. (100: 11: 11: 26). 200µg. Revelador: AlCl₃

Tabela 2: Dados de RMN de ^1H para o flavonóide isolado (DMSO- d_6 , 300MHz; δ , J em Hz).

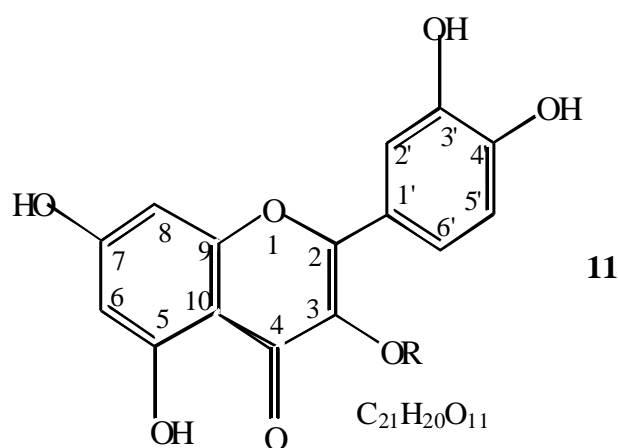
POSIÇÃO ^1H	DESLOCAMENTO QUÍMICO $d\ ^1\text{H}$
6	6,31
8	6,11
2'	7,27; sl
3'	—
5'	6,83, d, 7,4
6'	7,22, d, 7,4
Ramnose:	
1''	5,24
2'',3'',4'',5''	3,1-4
6''	0,79

Tabela 3: Dados de RMN de ^{13}C do flavonóide isolado (DMSO- d_6 , 75 MHz)

Posição C	Flavonóide isolado Deslocamento químico $d\ ^{13}\text{C}$	Quercitrina (Markhan <i>et al.</i> , 1978) $d\ ^{13}\text{C}$
2	156,58	156,4
3	133,99	134,4
4	177,35	177,7
5	161,17	161,2
6	99,22	98,6
7	166,32	164,0
8	93,90	93,5
9	156,83	157,0
10	103,25	104,2
1'	120,56	121,0
2'	115,49	115,4
3'	145,34	145,1
4'	148,76	148,3

5'	115,49	115,8
6'	121,01	121,0
1''	101,78	101,9
2''	70,05	70,4
3''	70,36	70,6
4''	71,23	71,5
5''	70,51	70,1
Me(6'')	17,47	17,3

O espectro de RMN de ^1H (Fig.14) do flavonol isolado mostra absorções em δ 3-4, sugerindo a presença de açúcar nesta substância e absorção em δ 5,24 sugerindo a presença de um hidrogênio anomérico e do sinal a 101,78 atribuído ao carbono anomérico do açúcar (Tabela 2). Os espectros de RMN ^{13}C PND (Fig.15) mostram um sinal de 17,47 (grupo metílico) e absorções em torno de δ 70 (4 sinais) e δ 100 (carbono anomérico), confirmando a presença de ramnose nesta substância. Estes dados são semelhantes aos descritos por Markhan *et al.* (1978), para a quercitrina (Tabela 3)



R = α -L-Ramnose

Fig.13: (11) Quercitrina

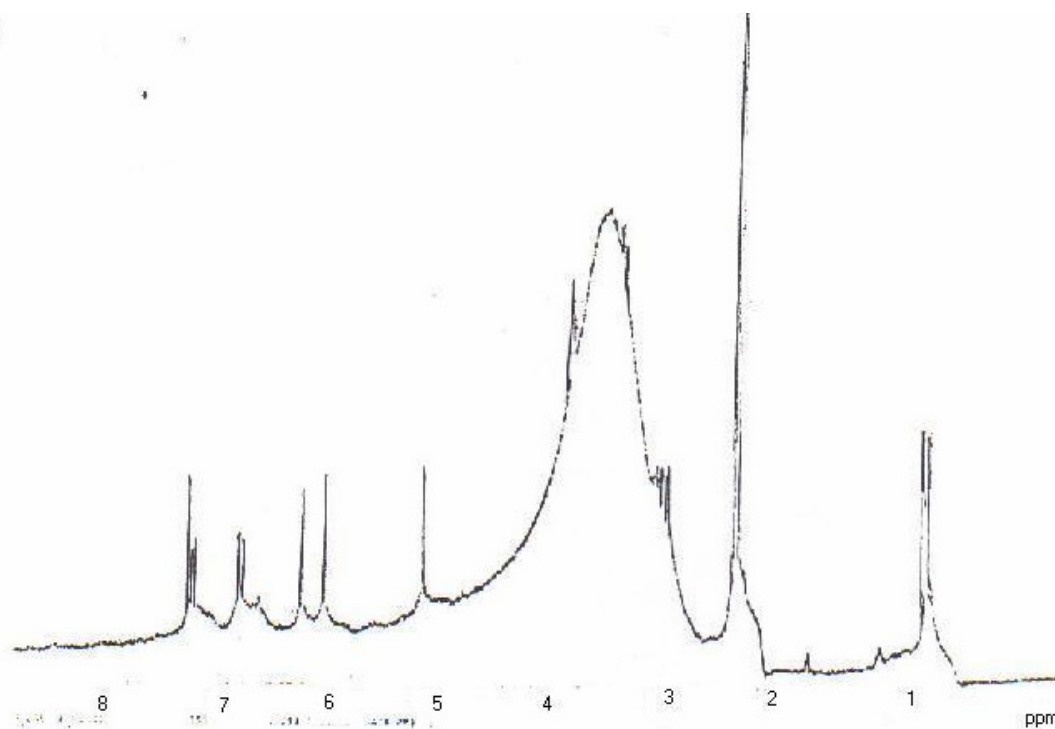


Fig.14: Espectro de RMN ^1H do flavonóide isolado, DMSO-d₆, 300 MHz.

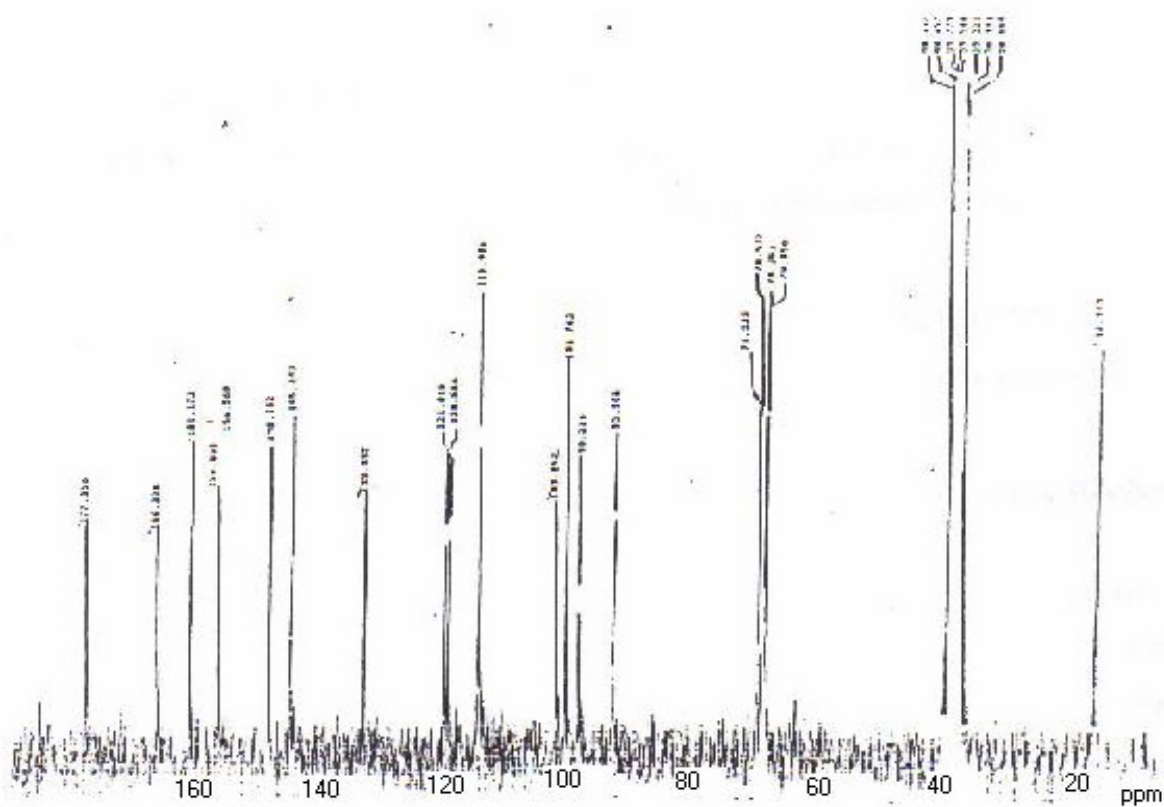
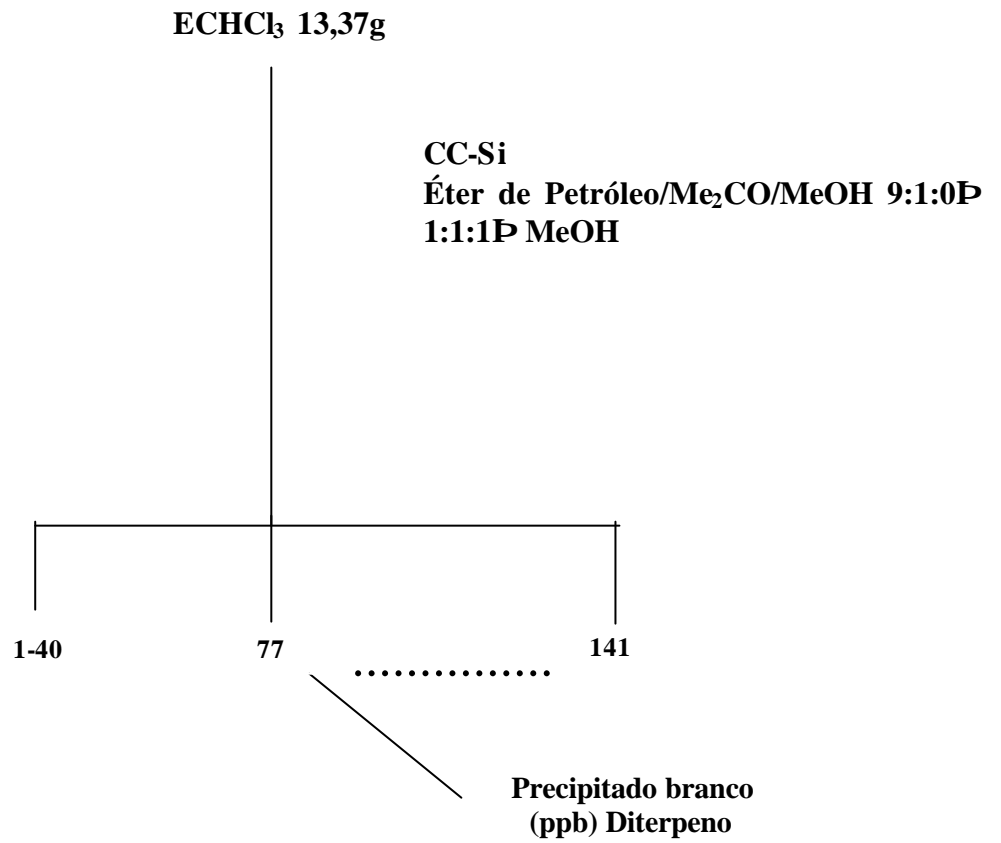


Fig.15: Espectro de RMN ^{13}C do flavonóide isolado, DMSO-d₆, 75 MHz

4.3.2 ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO DITERPENO ISOLADO DO ECHCl₃ DAS FOLHAS DE *A. sidifolia*

O ECHCl₃ de folhas foi fracionado em coluna de Sílica gel de 70-230 Mesh (Esquema 2, pág. 40). A fração 77, eluída com Éter de Petróleo/Me₂CO (3:1) apresentou-se na forma de um precipitado branco (ppb), de massa 5 mg. Análise desse precipitado pôr CG/EM, utilizando o método 1 apresentou um constituinte majoritário com o espectro de massas compatível com a de um diterpeno (C₂₀H₃₄O₃), CG/EM (IE) Tr=22.338 min, *m/z* (%): 304 [M⁺-H₂O] (5), 291(35), 271(33), 230(25), 215(12), 189(23), 153(32), 121(22), 109(38), 91(45), 55(42), 28(55). Para essa mesma amostra foram obtidos os espectros de massas por IE (injeção direta) e FAB: IE: 322 (não observado), 304[M⁺-H₂O](5), 291[M⁺-CH₂OH] (100), 273(10), 230(37), 215(18), 149(190, 121(19,5), 109(49) (Fig.16) e FAB: 415(5) [M+glicerol+H⁺], 361[M+K⁺] (4), 305(10) [M⁺-H₂O+H⁺], 287(100) [304-H₂O+H⁺], 269(61) [286-H₂O+H⁺] (Fig.17)

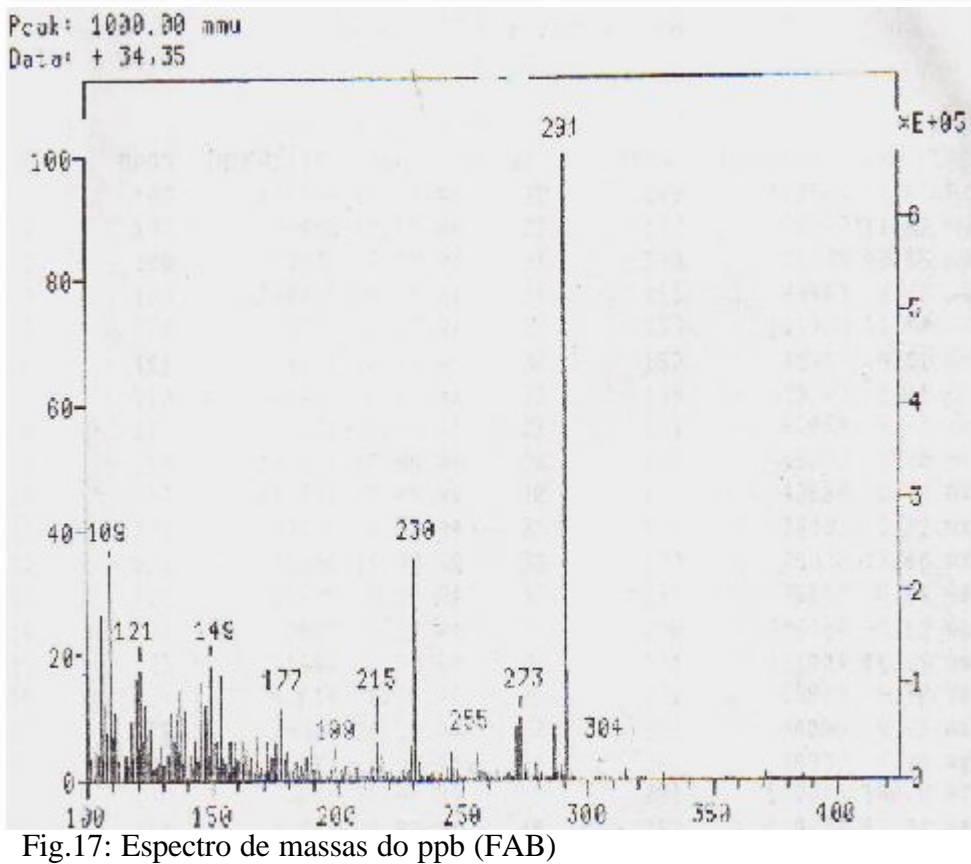
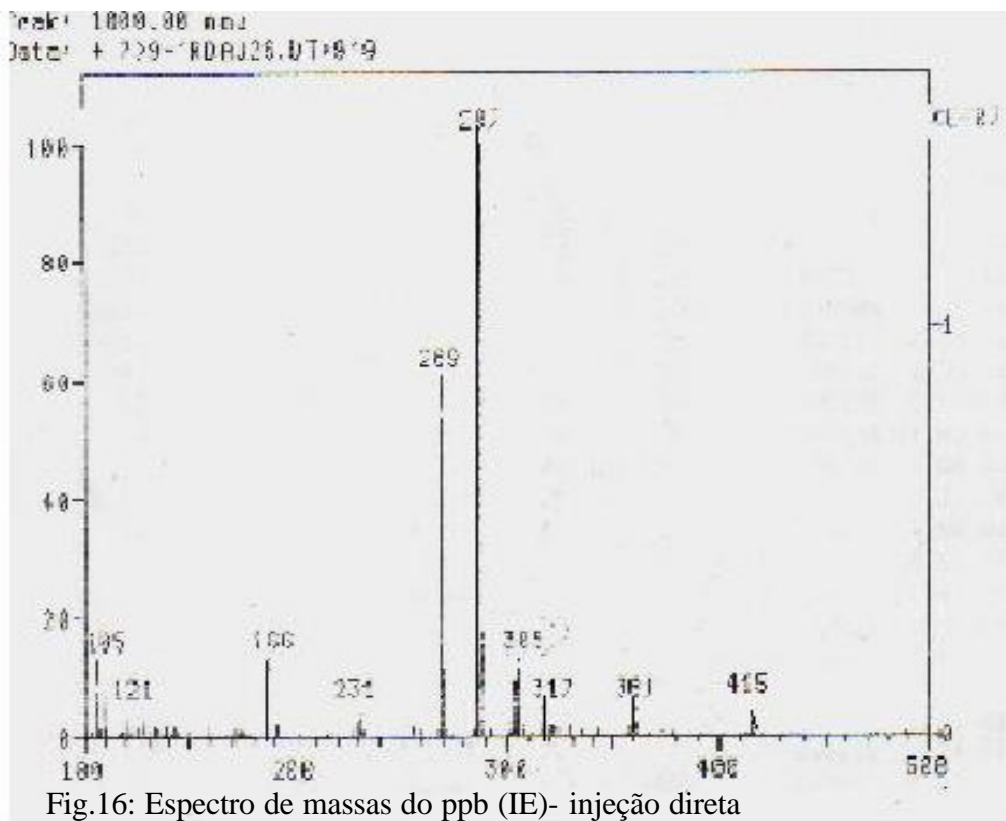
Dados de espectrometria de RMN de ¹H, (Fig.18), ¹³C (Fig.20), DEPT 135° (Figs.21 e 22) e espectrometria bidimensional de HMQC (Fig.23) e HMBC (Fig.24), foram usados para atribuição dos hidrogênios e carbonos da molécula (Tabela 4). Para estudo de configuração relativa foram usados estudos de correlação J_{C-H} (n=2 e n=3) do espectro de HMBC e medidas de J_{H-H} no espectro de RMN de ¹H. Com base nestes dados identificou-se este composto como com um diterpeno de esqueleto do tipo caurano, de nome corimbol ou ent-6β, 16α, 17-trihidroxicaurano (Fig.38).



Esquema 2: Fluxograma do fracionamento do ECHCl₃ de folhas em CCSi de *A. sidifolia*

Tabela 4: Dados espectrais de ppb (CD₃OD) de RMN de ¹H (500 MHz) e de ¹³C (125 MHz) incluindo resultados de experimentos DEPT 135°, HMQC J_{CH} (n=1) e HMBC J_{CH} (n=2 e 3) e do corimbol (DMSO-d₆).

C	δ _C DEPT (135°)	δ _H HMQC	HMBC(δ _H)	δ _C corimbol (Elliger <i>et al.</i> , 1992)
1	41.7 (CH ₂)	1.69 e 0.69	H20(1.00)	obscured
2	19.5 (CH ₂)	1.34		17.9
3	45.1 (CH ₂)	1.21 e 1.08	H18(1.05),H19(0.92)	43.5
4	34.7 (C)	-----	H5(0,81),H18(1.05), H19(0.92)	33.3
5	61.8 (CH)	0.81	H18(1.05),H19(0.92),H20 (1)	59.8
6	69.8 (CH)	3.75	H5(0.81),H7(1.72 e 1.54)	67.1
7	53.3 (CH ₂)	1.72 e 1.54		52.7
8	45.9 (C)			44.1
9	57.7 (CH)	0.91	H7(1.54),H11(1.60), H20(1)	55.9
10	42.2 (C)	-----	H2(1.3),H5(0.81), H9(0.91),H20(1.00)	obscured
11	19.3 (CH ₂)	1.54		18.1
12	27.2 (CH ₂)	1.58		25.9
13	46.4 (CH)	1.93	H11(1.54), H16(1.35)	44.8
14	38.8 (CH ₂)	1.82 e 1.60	H7(1.54)	37.5
15	54.2 (CH ₂)	1.35 e 1.48	H14(1.82 e 1.60)	53.2
16	82.6 (C)	-----	H16(1.48),H14(1.82),H17 (3.51)	80.2
17	66.9 (CH ₂)	3.51 e 3.59	H16(1.48)	65.3
18	37.3 (CH ₃)	1.05	H19(0.92)	36.7
19	22.6 (CH ₃)	0.92	H18(1.05)	22.1
20	19.7 (CH ₃)	1.00	H5(0.81),H9(0.91)	19.0



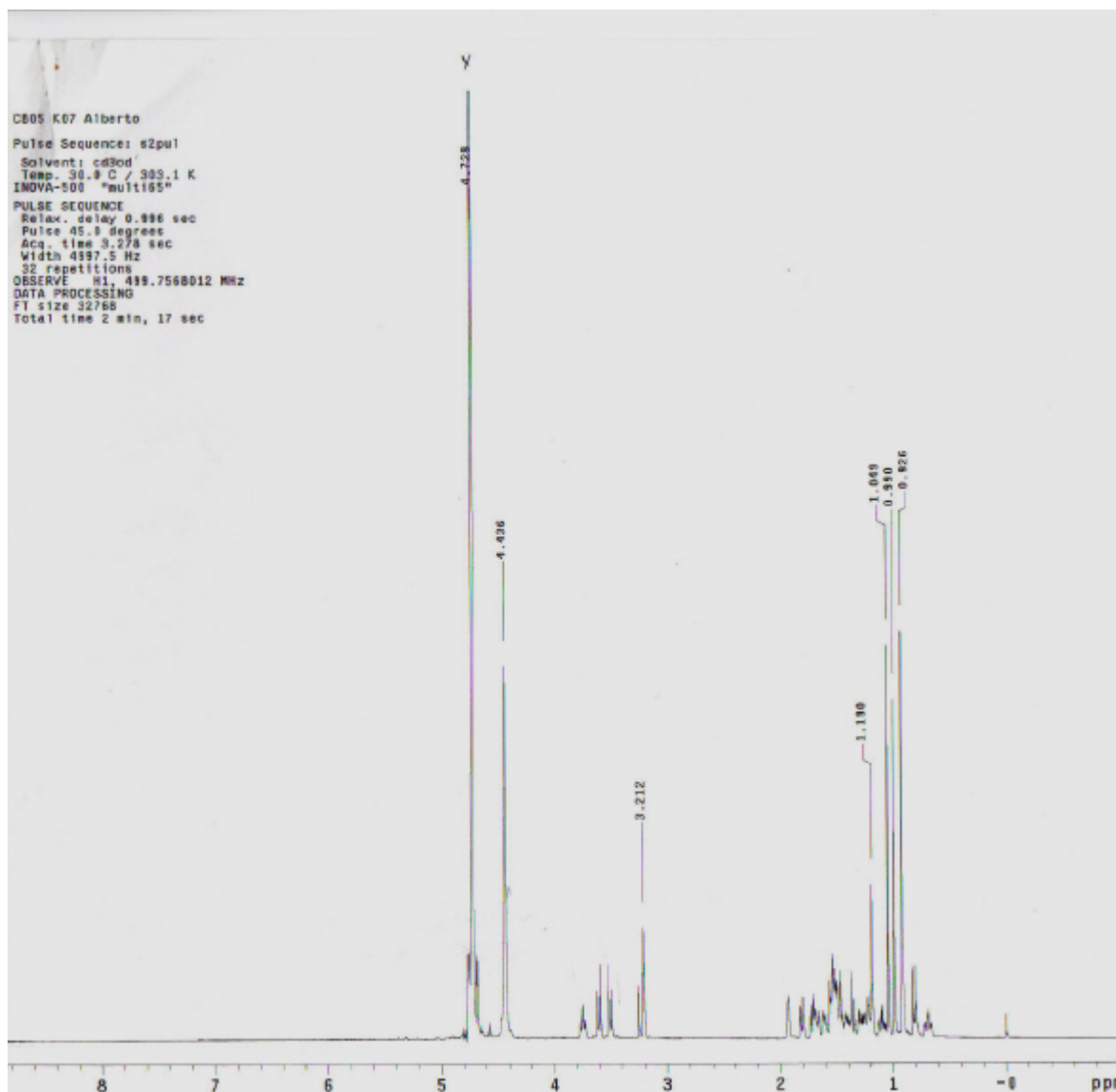


Fig.18: Espectro de RMN ^1H do ppb, CD_3OD , 500 MHz

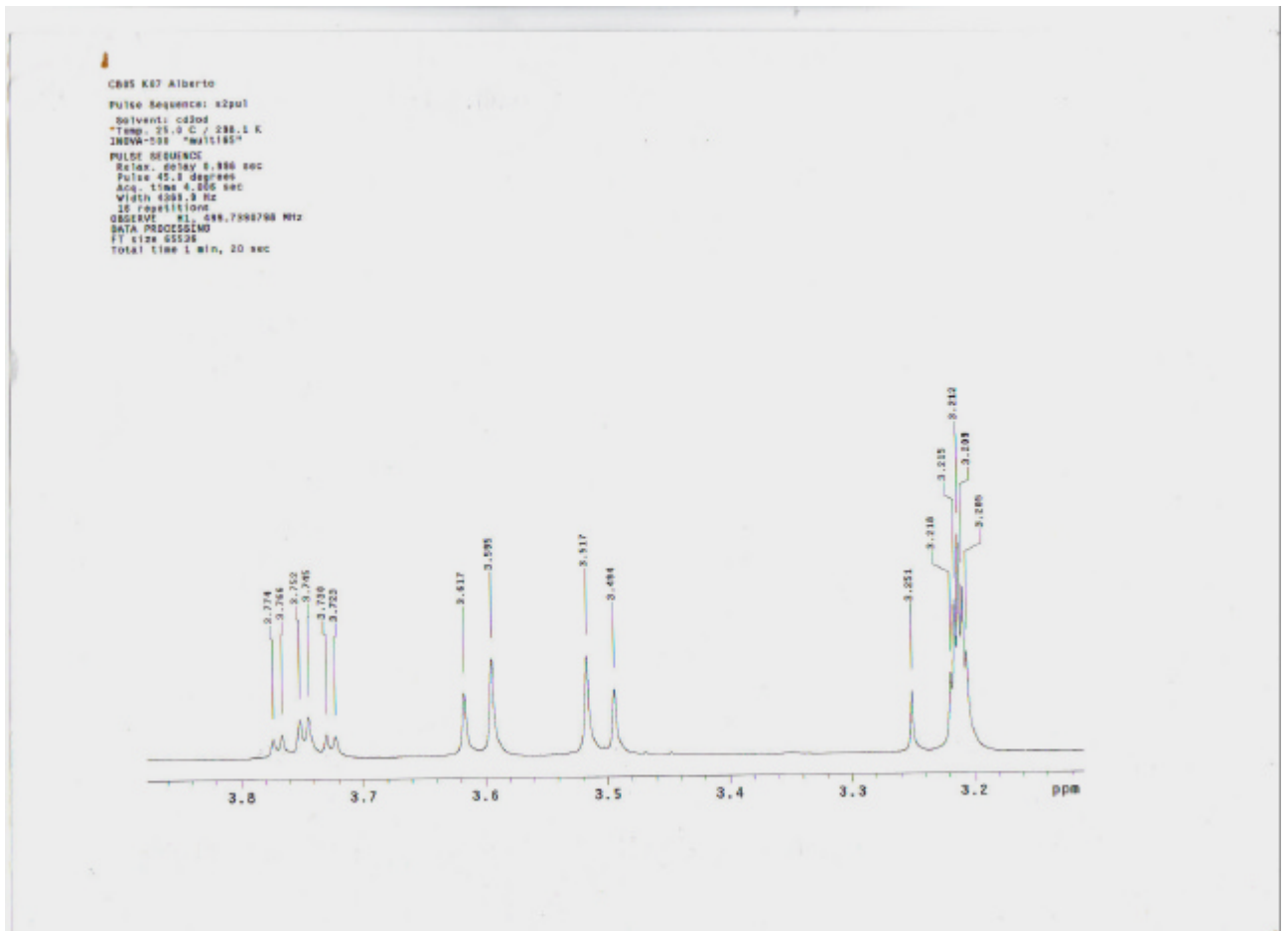


Fig.19: Ampliação do espectro de RMN de ^1H do ppb (CD_3OD), 500MHz.

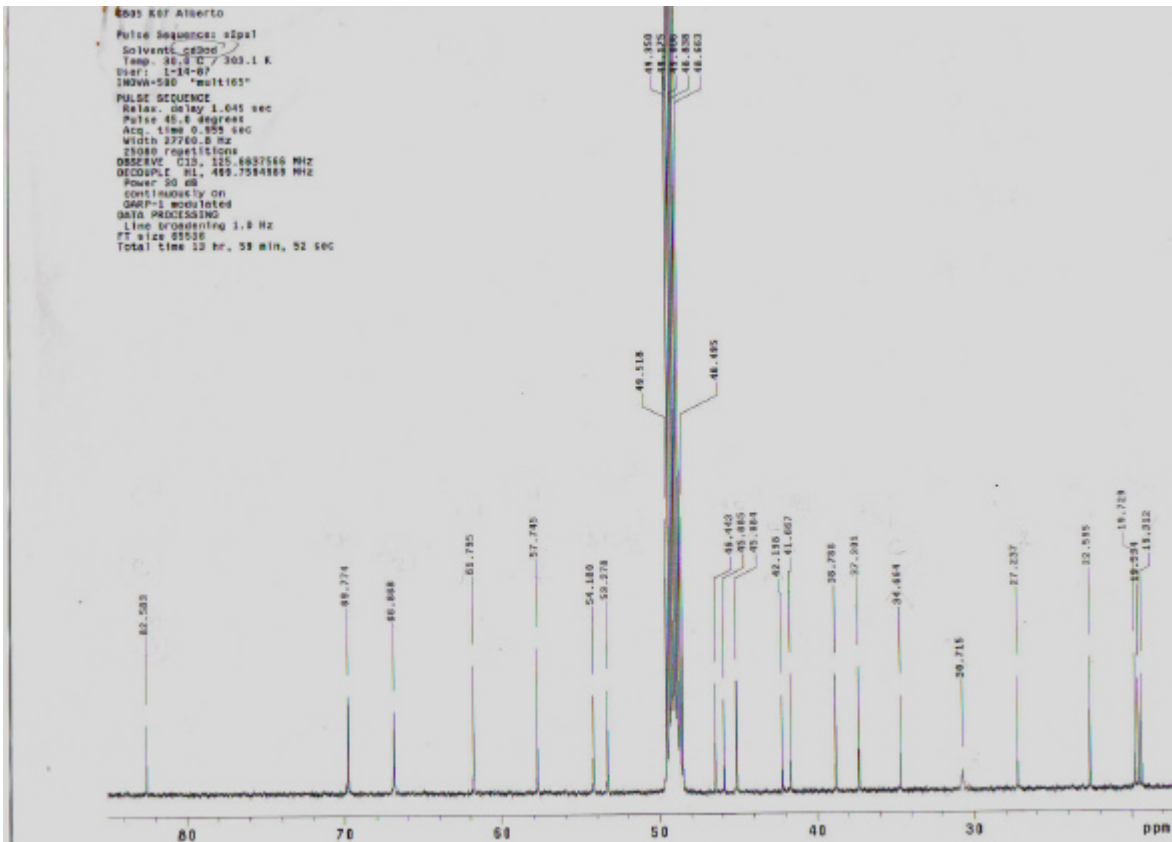


Fig.20: Espectro de RMN ^{13}C do ppb, CD_3OD , 125 MHz

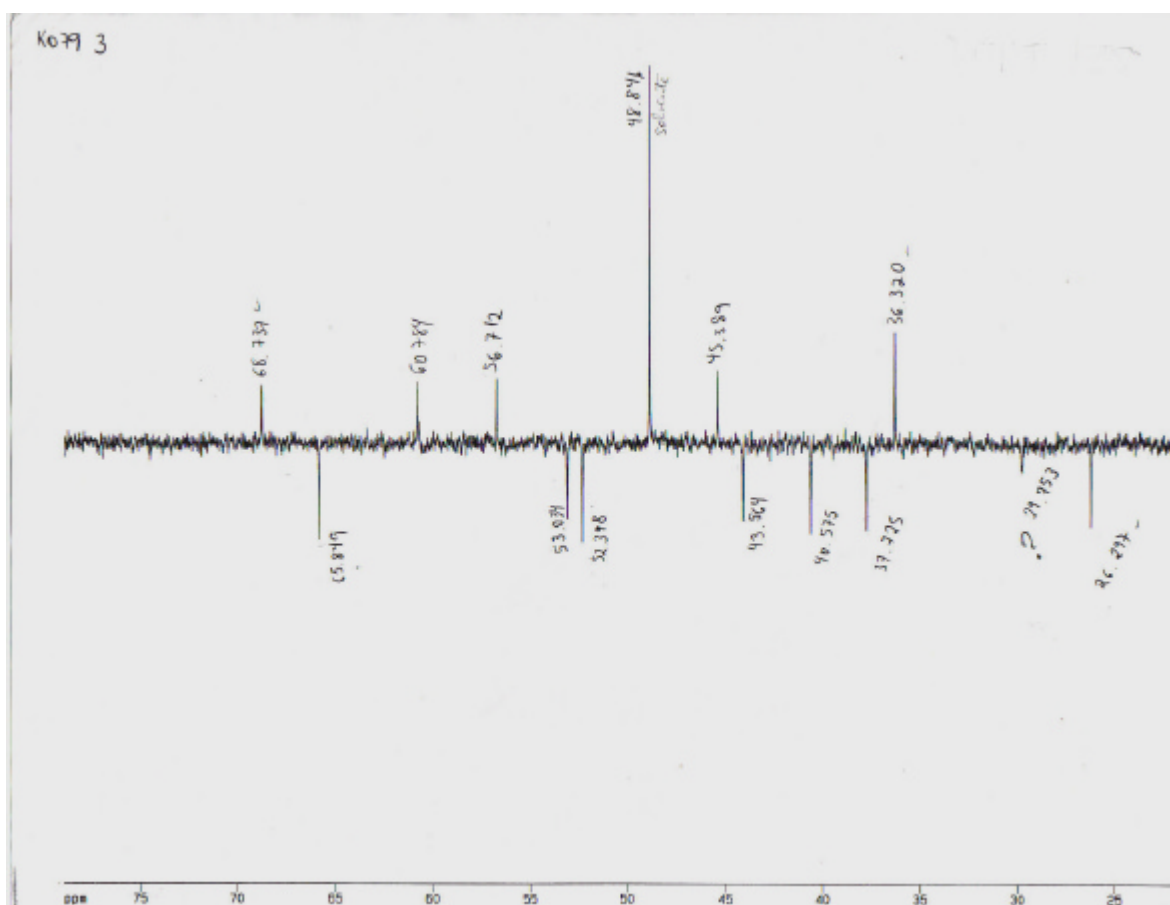


Fig.21: DEPT 135° do ppb, CD₃OD, 125 MHz

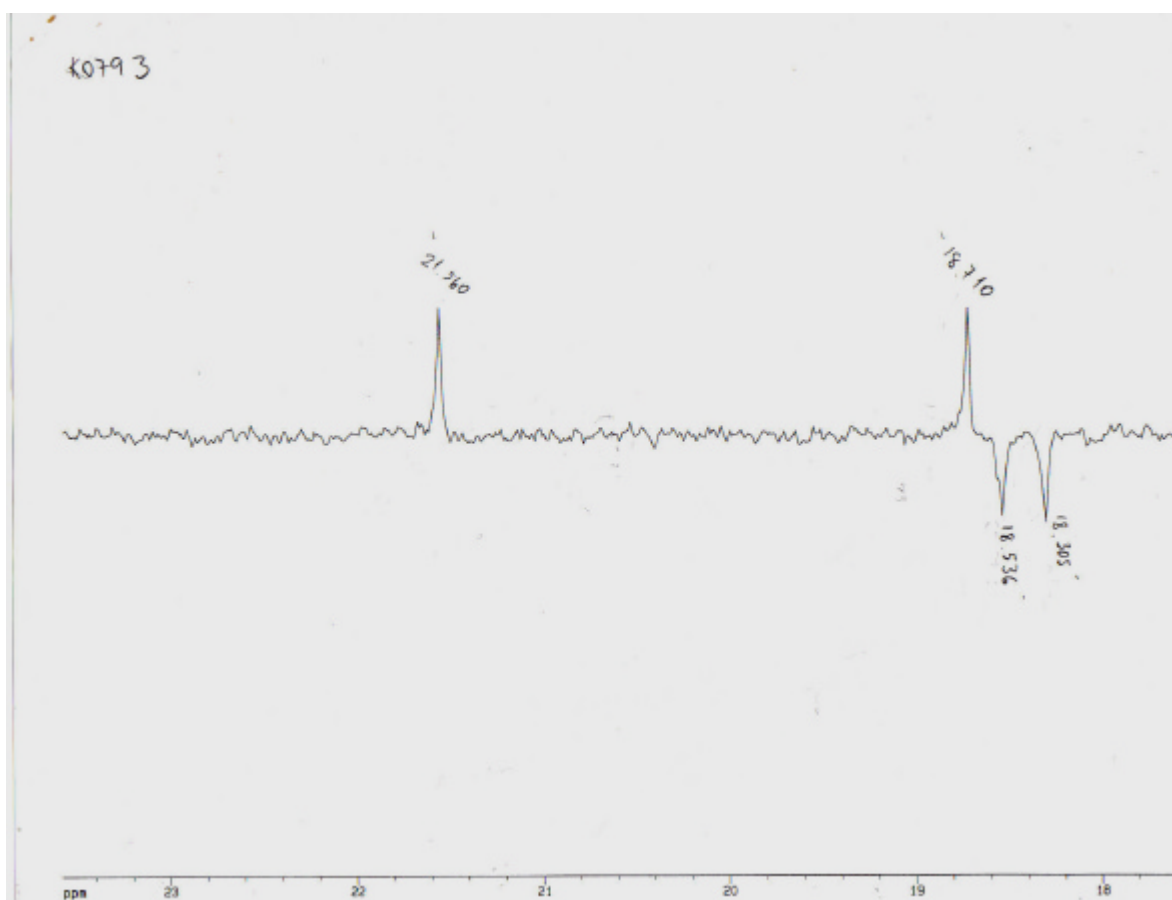


Fig.22: Expansão do espectro DEPT 135° do ppb, CD₃OD, 125 MHz

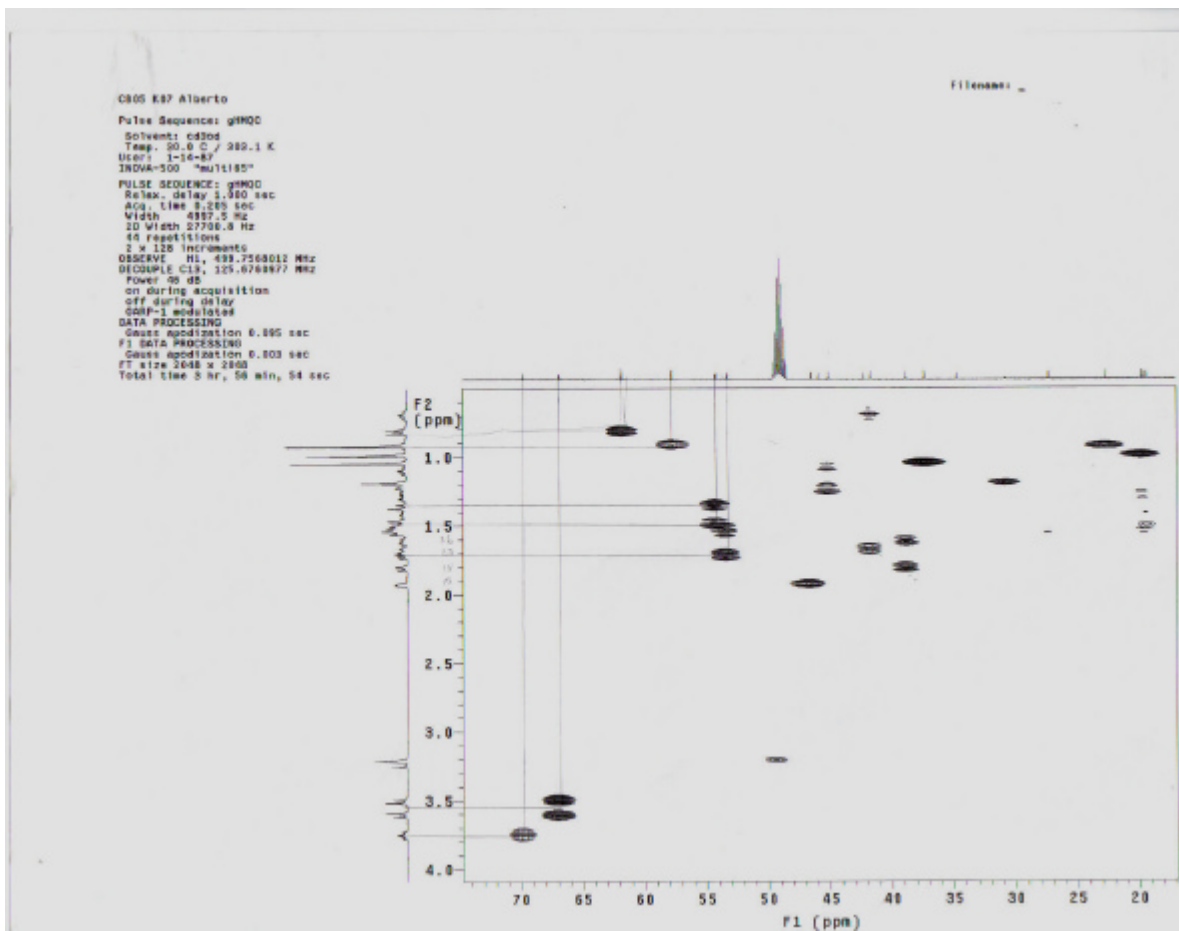


Fig.23: Espectro de HMQC do ppb, CD₃OD, 500 MHz

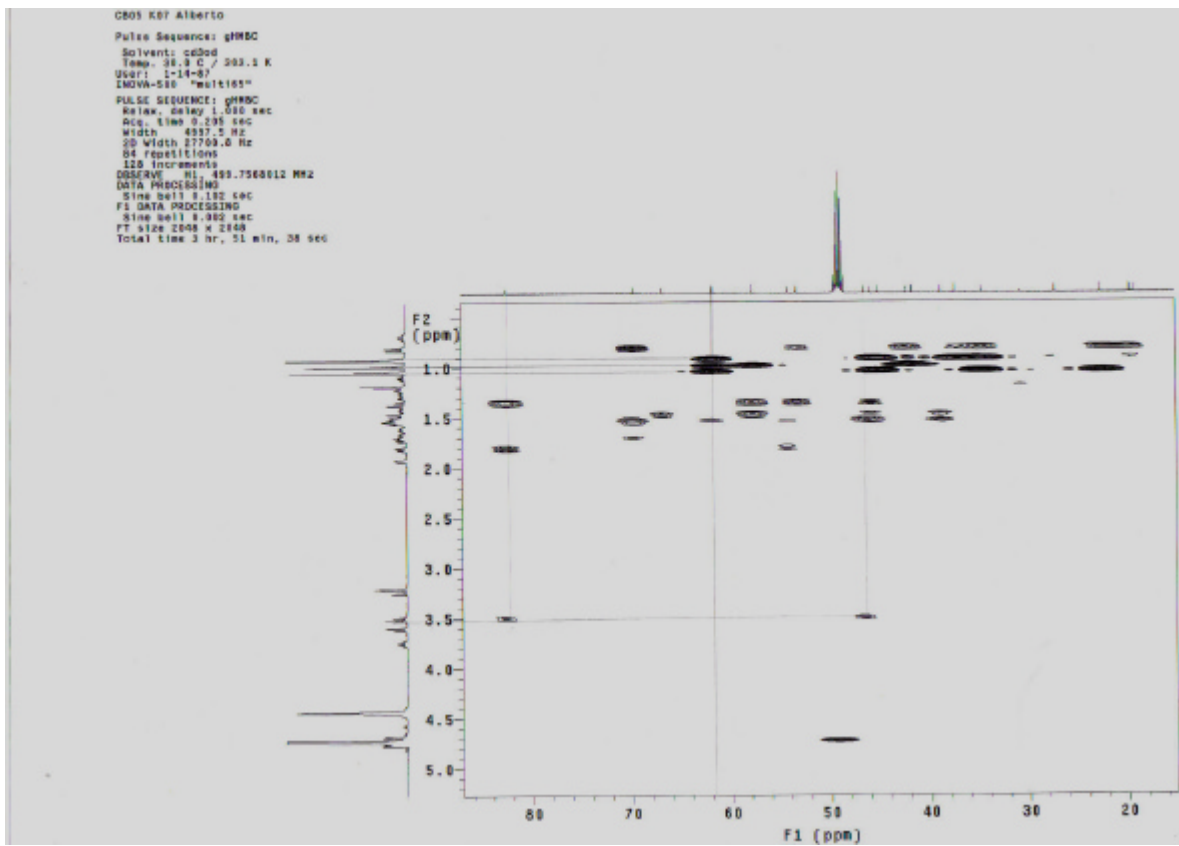


Fig.24: Espectro de HMBC do ppb, CD₃OD, 500 MHz

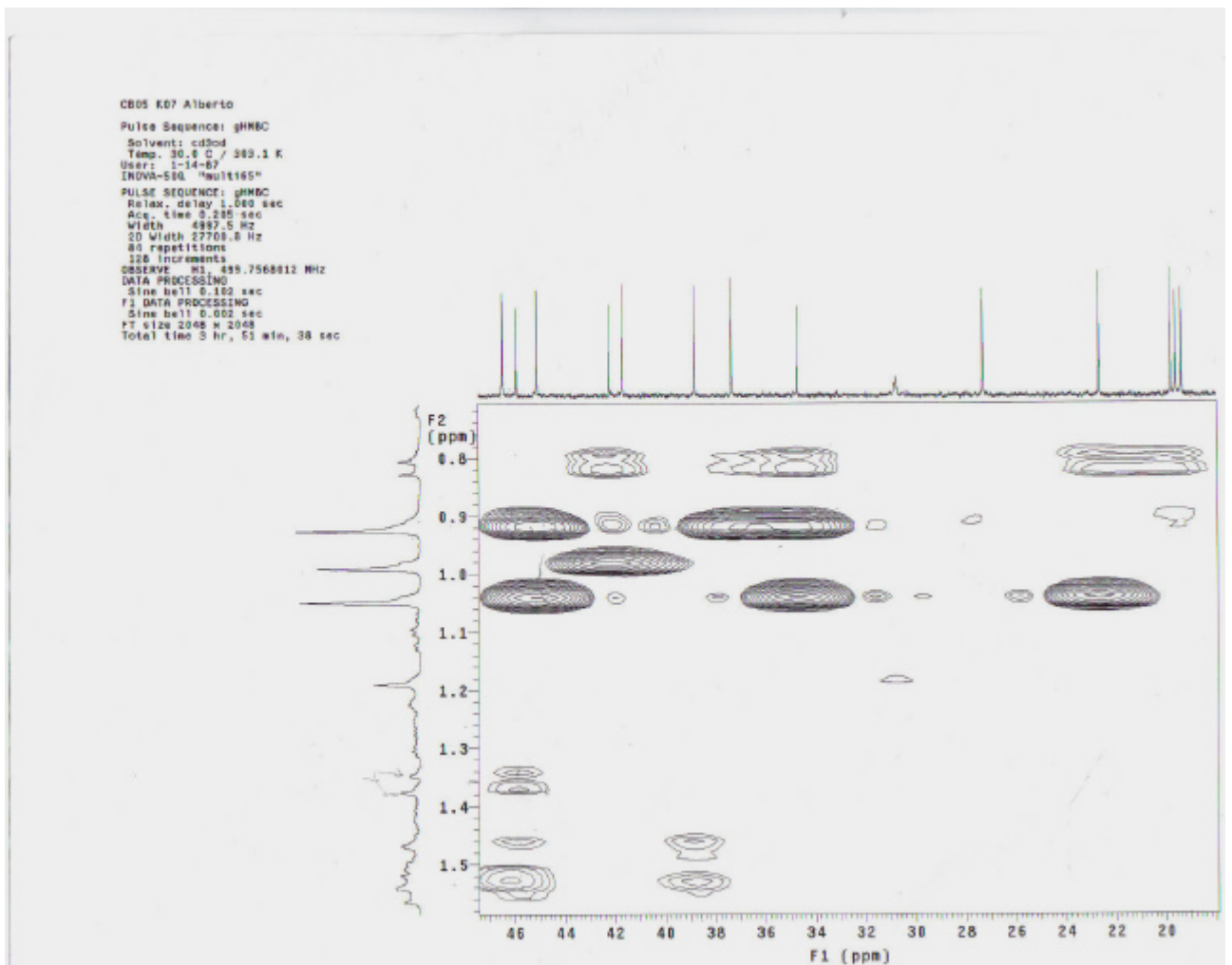
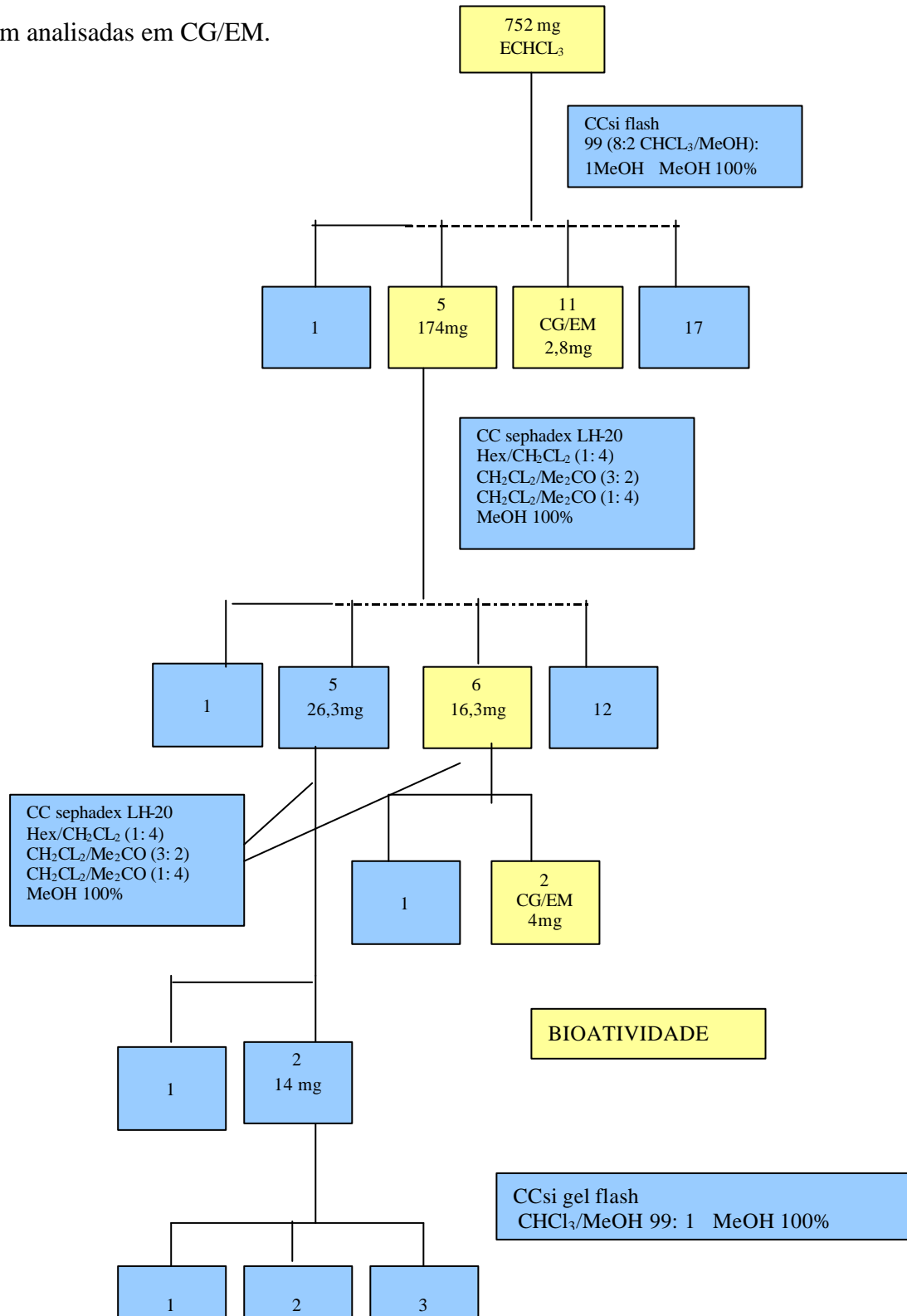


Fig.25: Espectro ampliado de HMBC de ppb, CD₃OD, 500 MHz

4.4 FITOQUÍMICA BIOMONITORADA

A atividade antifúngica contra *C. sphaerospermum* foi observada nos ECHCL₃ de caules (Esquema 3) e raízes (Esquema 4) de *A. sidifolia* Esquema 3. O ECHCL₃ de caules foi fracionado em CCSi flash e em Sephadex LH-20. Foram detectadas atividades antifúngicas em duas frações que foram analisadas em CG/EM.



Esquema 3: Fluxograma do fracionamento do ECHCL₃ de caules de *A. sidifolia*

A fração 11, após submetida a bioautografia com *C. sphaerospermum*, apresentou dois halos de inibição, halos 1 e 2 (Rfs=0,8 e 0,6) (Fig.26). A fração 6 após submetida a bioautografia com o mesmo fungo, apresentou um halo de inibição, halo 3, (Rf=0,5) (Fig.27). Os materiais correspondentes a estes halos (59 µg, 83 µg e 89 µg) foram analisados em CG/EM pelo método 1. Os cromatogramas e os espectros de massas (Figs.28, 29 e 30) mostraram que no halo 1, há presença do sesquiterpeno: α -amorfenos e difenilsulfeto (Fig.31) com 95% de semelhança no padrão de fragmentação em comparação com a biblioteca do CG/EM. Os halos 2 e 3 apresentaram em sua constituição uma mistura de hidrocarbonetos com 90% de semelhança no padrão de sua fragmentação em comparação com a biblioteca do CG/EM.

Dados de CG/EM da fração 11 (halo 1, Rf=0,8) difenilsulfeto (C₁₂H₁₀S) IE *m/z* (int.rel.): 186(100), 171(8), 160(0,5), 152(10), 145(0,1), 139(1), 128(0,2), 121(0,5), 115(1), 109(6), 102(1), 92(8), 84(1), 77(10), 71(0,5), 65(13), 58(1), 51(31), 45(2), 39(10), 33(0,5), 27(1) e α -amorfenos (C₁₅H₂₄) IE, *m/z* (int.rel.): 204(30), 189(7), 176(2), 161(100), 148(7), 133(33), 127(2), 119(55), 105(72), 91(52), 79(42), 67(13), 55(18), 49(1), 41(35), 32(1).

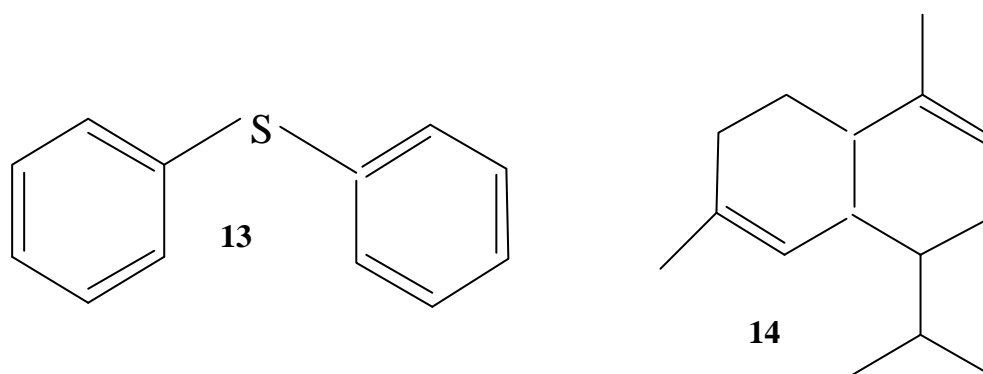


Fig.31: Substâncias com atividade antifúngica contra *C. sphaerospermum* presentes na fração 11 (halo 1), (13) difenilsulfeto e (14) α -amorfenos

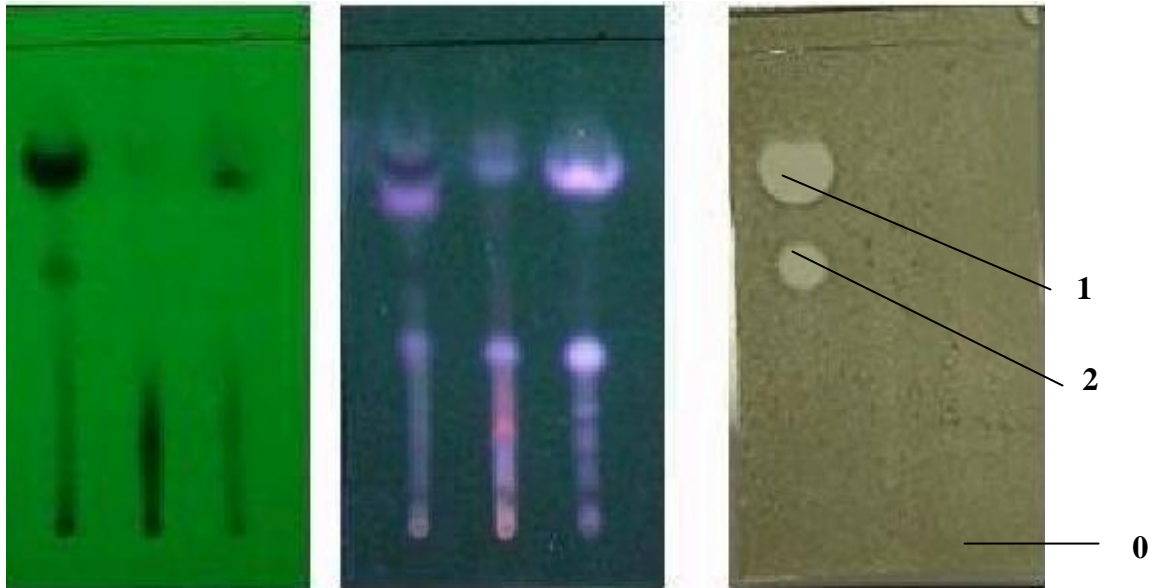


Fig.26: Fração 11, placas de CCD observadas em luz UV nos comprimentos curto (254 nm) e longo (366 nm), antes e depois da revelação com *Cladosporium sphaerospermum*. Sistema de eluição: 80 (CHCl₃/ Éter de Petróleo 8: 2): 20 MeOH. 200 µg. Halos 1 e 2, Rfs: 0,8 e 0,6.

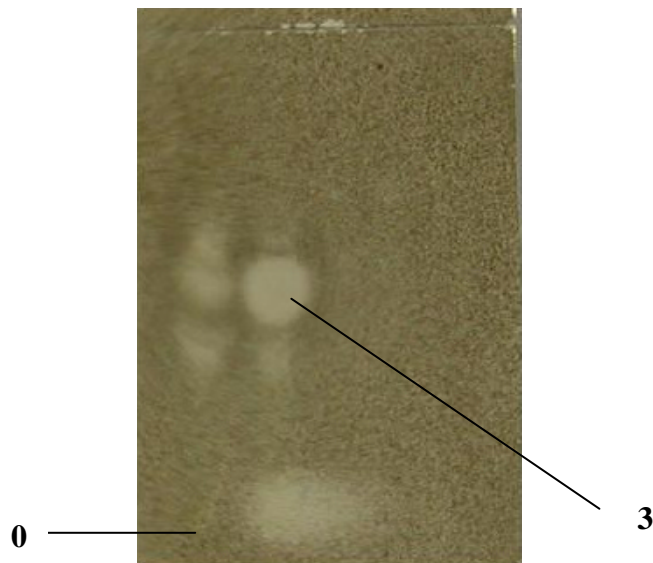


Fig.27: Fração 6: Cromatoplaça revelada com *Cladosporium sphaerospermum*. Sistema de eluição: Diclorometano/Acetona (3: 2), 200 µg. Halo 3 Rf: 0,5.

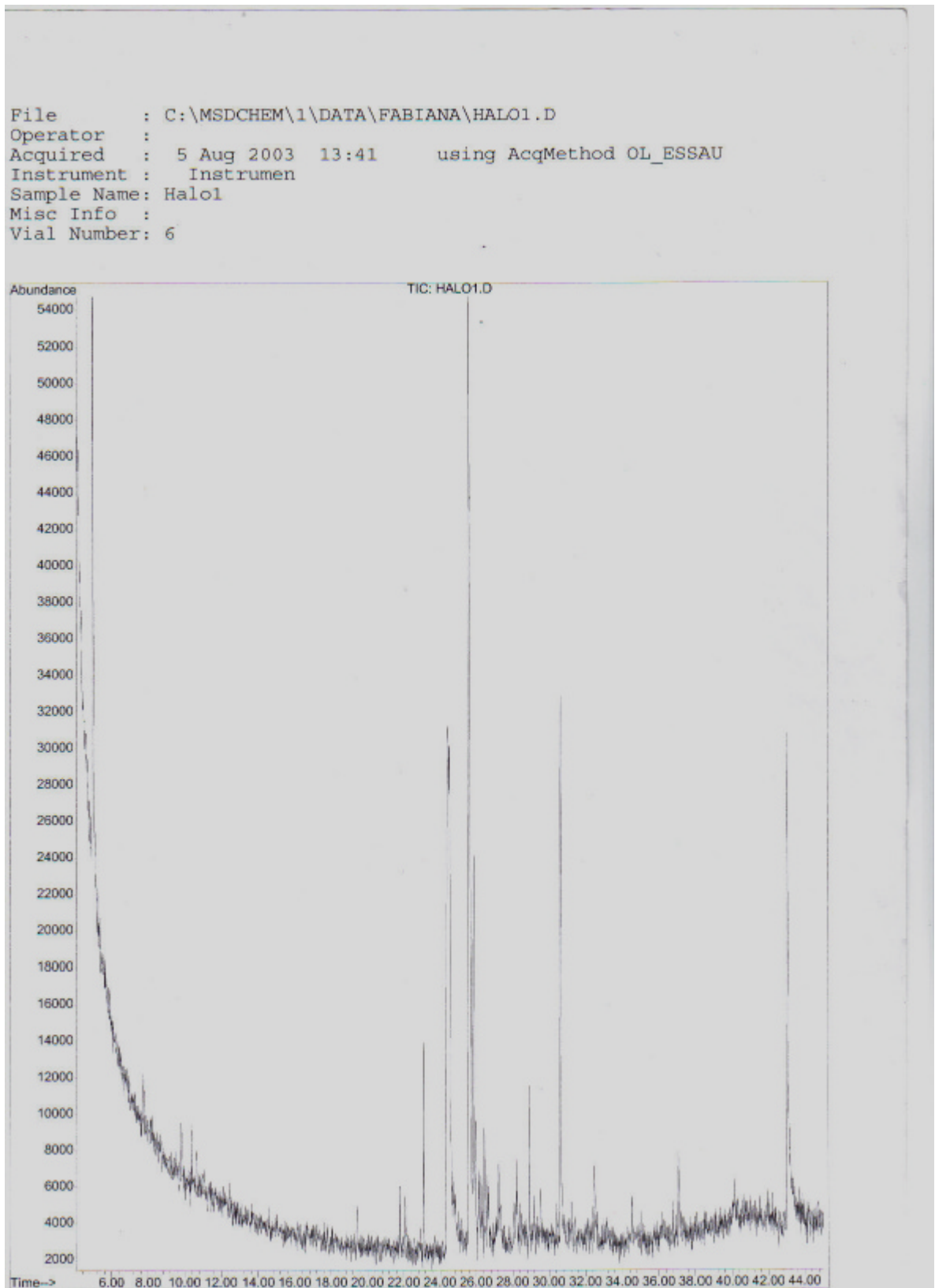


Fig.28: Cromatograma de íons totais (TIC) da fração 11 (halo 1) do ECHCl₃ de caules analisado em CG/EM pelo método 1.

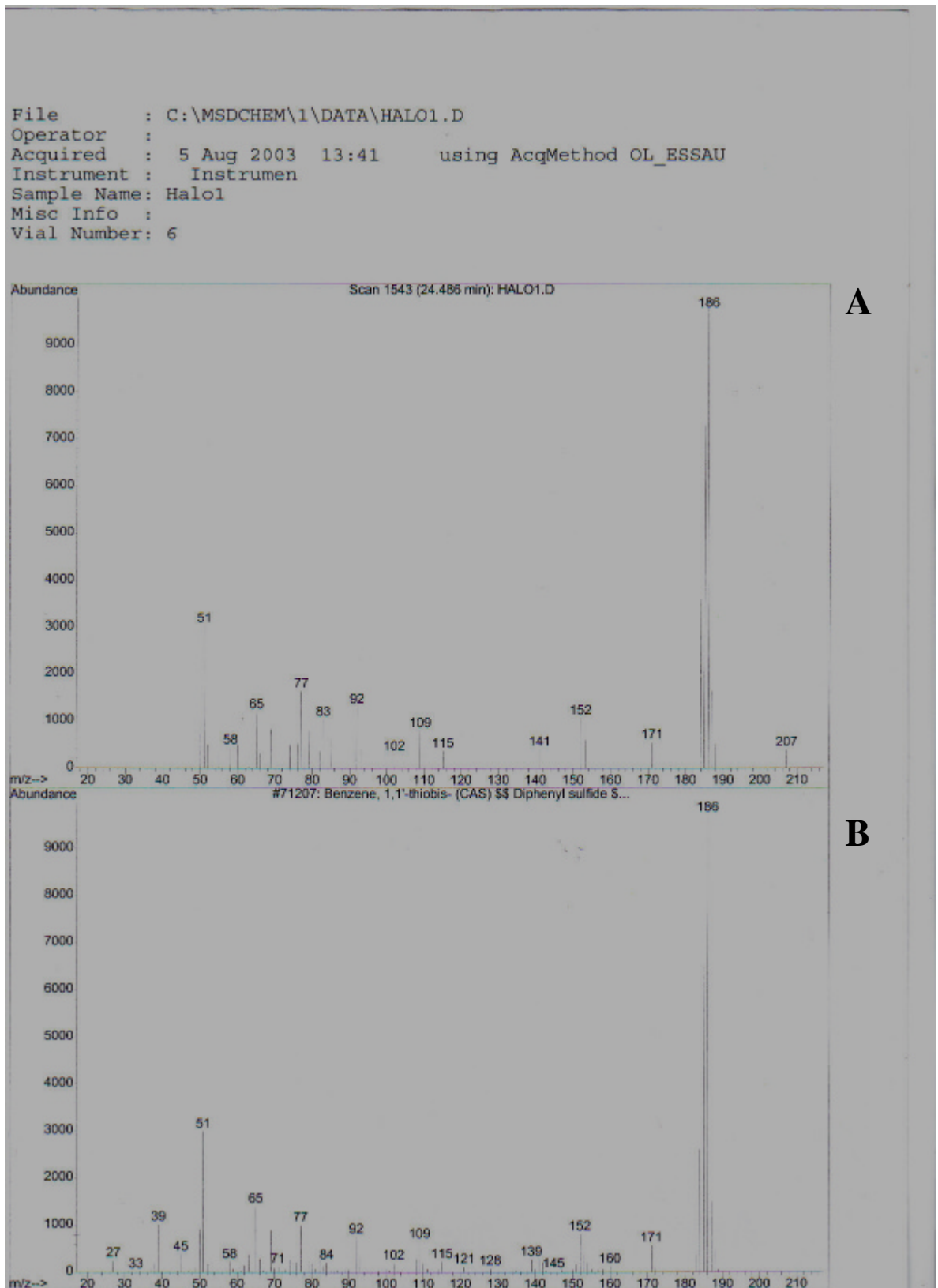


Fig.29: Espectro de massas: A-do componente (Tr=24.486min.) da fração 11 (halo 1) do ECHC₃ de caules de *A. sidifolia* feito em CG-EM Agilent 5973 Network e B-do difenilsulfeto

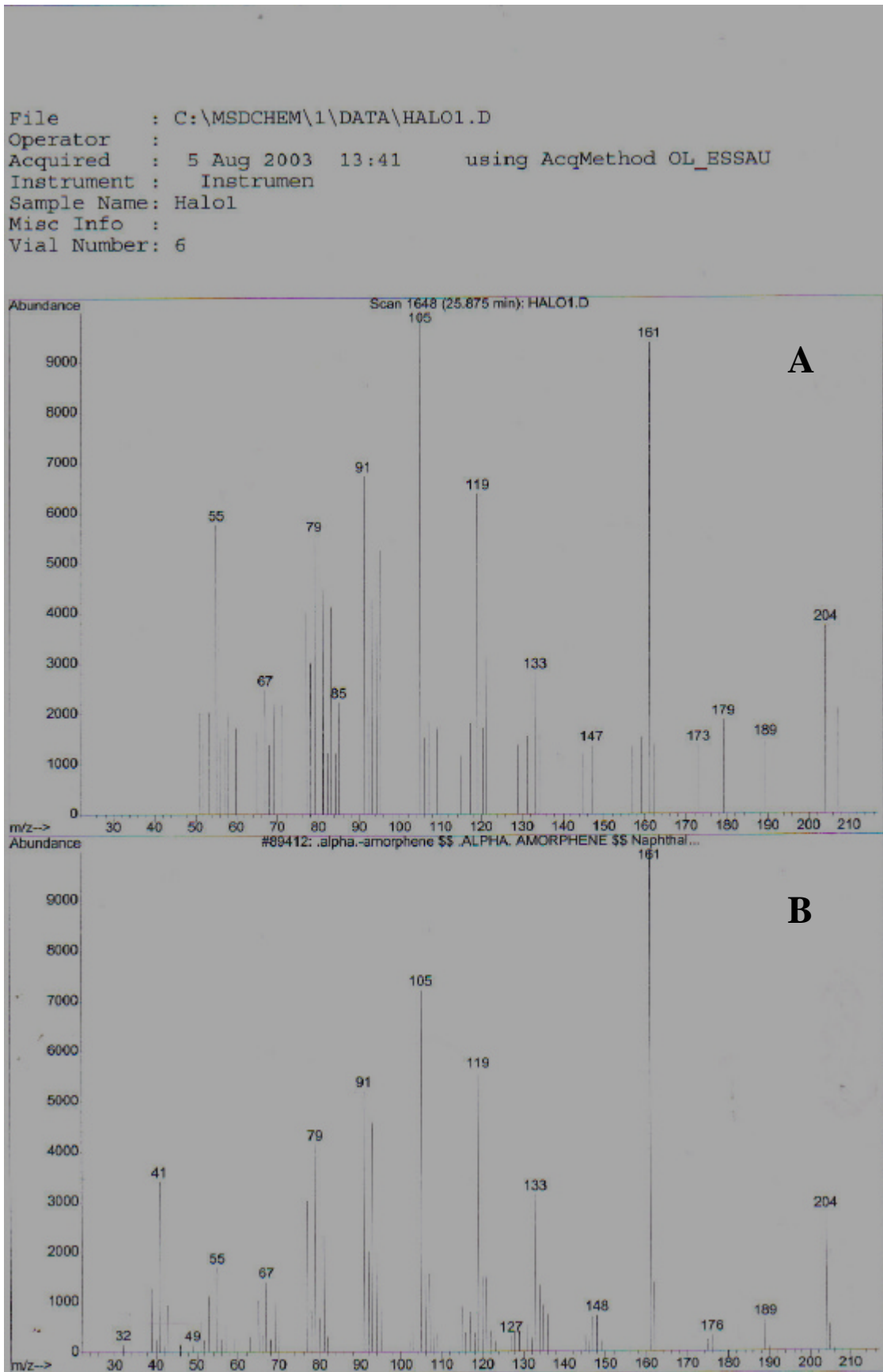
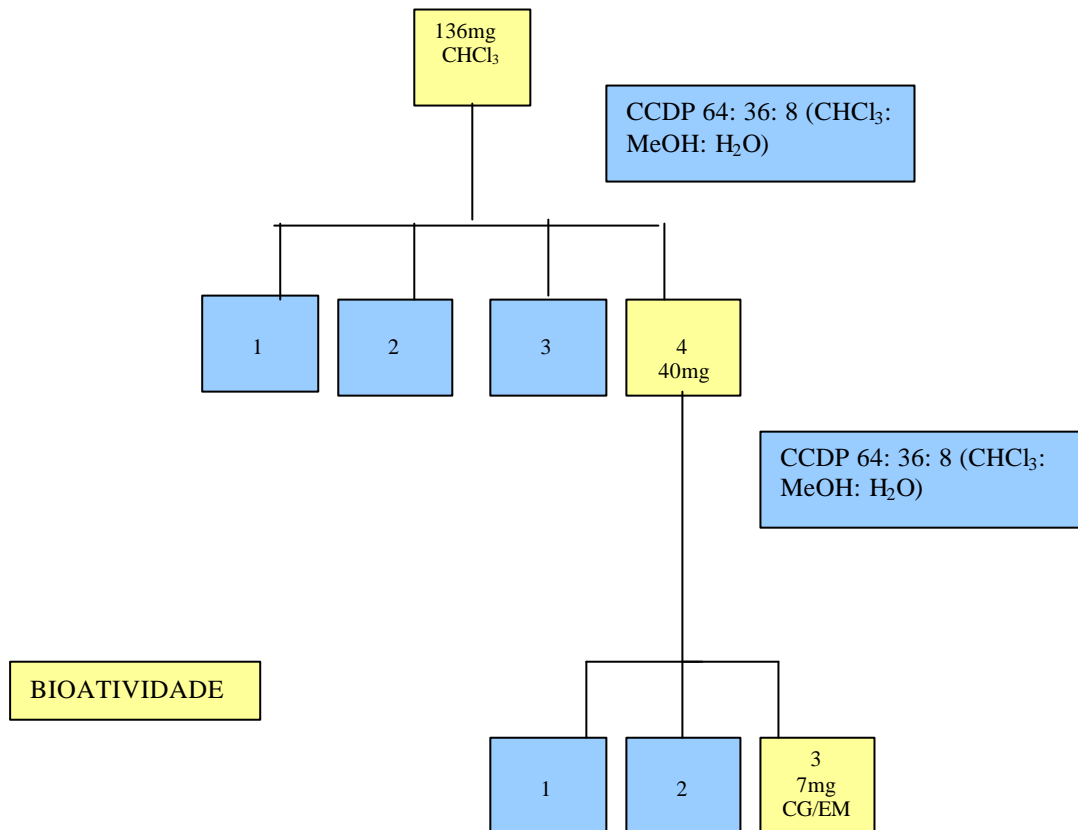


Fig.30: Espectro de massas A-do componente ($T_r=25.875\text{min.}$) da fração 11 (halo 1) do ECHC₃ de caules de *A. sidifolia* feito em CG-EM Agilent 5973 Network, B-do α -amorfo

O ECHCl₃ de raízes ativo contra *C. sphaerospermum* após submetido a CCDP, apresentou na fração 3 (Fig.32), de massa 7 mg, uma mancha (Rf=0,62) com atividade antifúngica. O esquema 4 mostra o fracionamento deste e a obtenção da fração com atividade antifúngica, que foi analisada em CG/EM pelo método 2.



Esquema 4: Fluxograma do fracionamento do ECHCl₃ de raízes de *A. sidifolia*

Os cromatogramas de íons totais (TIC) e os espectros de massas (Figs.33, 34 e 35) mostraram que na fração 3, há presença de dois sesquiterpenos: α -humuleno e de $\hat{\alpha}$ -cariofileno (Fig.36) com 97% e 99% de semelhança no padrão de fragmentação em comparação com a biblioteca do CG/EM. Dados de CG/EM da fração 3: α -humuleno ($C_{15}H_{24}$) IE m/z (int.rel.): 204(5), 147(22), 121(31), 107(18), 93(100), 80(32), 67(19), 53(12) e $\hat{\alpha}$ -cariofileno ($C_{15}H_{24}$) IE m/z (int.rel.): 204(5), 189(12), 175(18), 161(28), 147(27), 141(0,5), 133(83), 127(1), 120(42), 111(2), 105(68), 93(100), 85(0,5), 79(85), 69(68), 63(2), 53(35), 41(93).

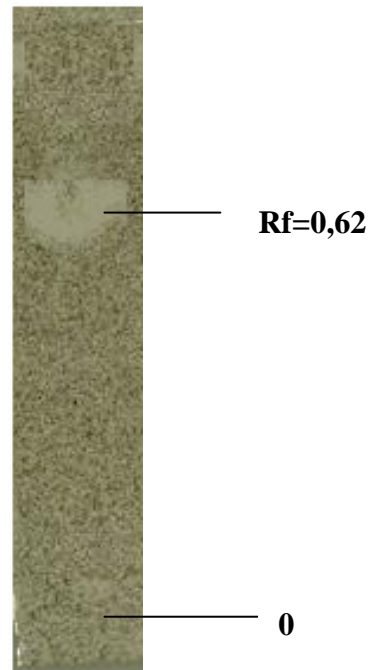


Fig.32: Bioautografia da fração 3, obtida de CCDP do $ECHCl_3$ de raiz revelada com o fungo *C. sphaerospermum*. Sistema de eluição: $CHCl_3$: MeOH (9:1).200 μ g. (7mg).

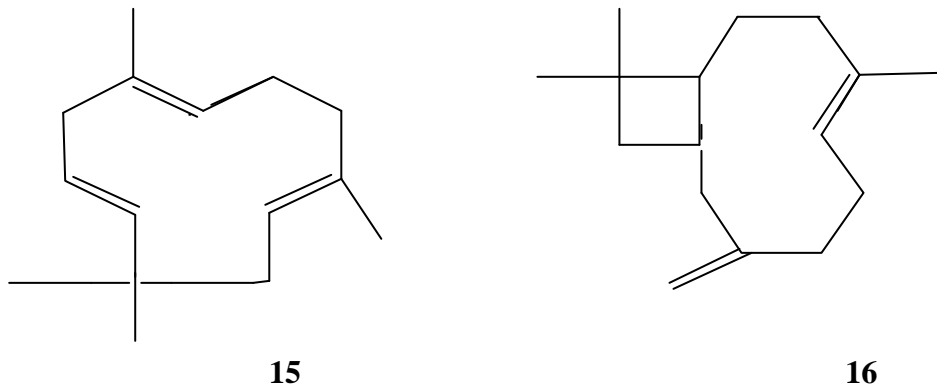


Fig.36: Substâncias com atividade antifúngica contra *C. sphaerospermum* presentes na fração 3 de raízes, (15) α -humuleno ($C_{15}H_{24}$) e (16) $\hat{\alpha}$ -cariofileno ($C_{15}H_{24}$).

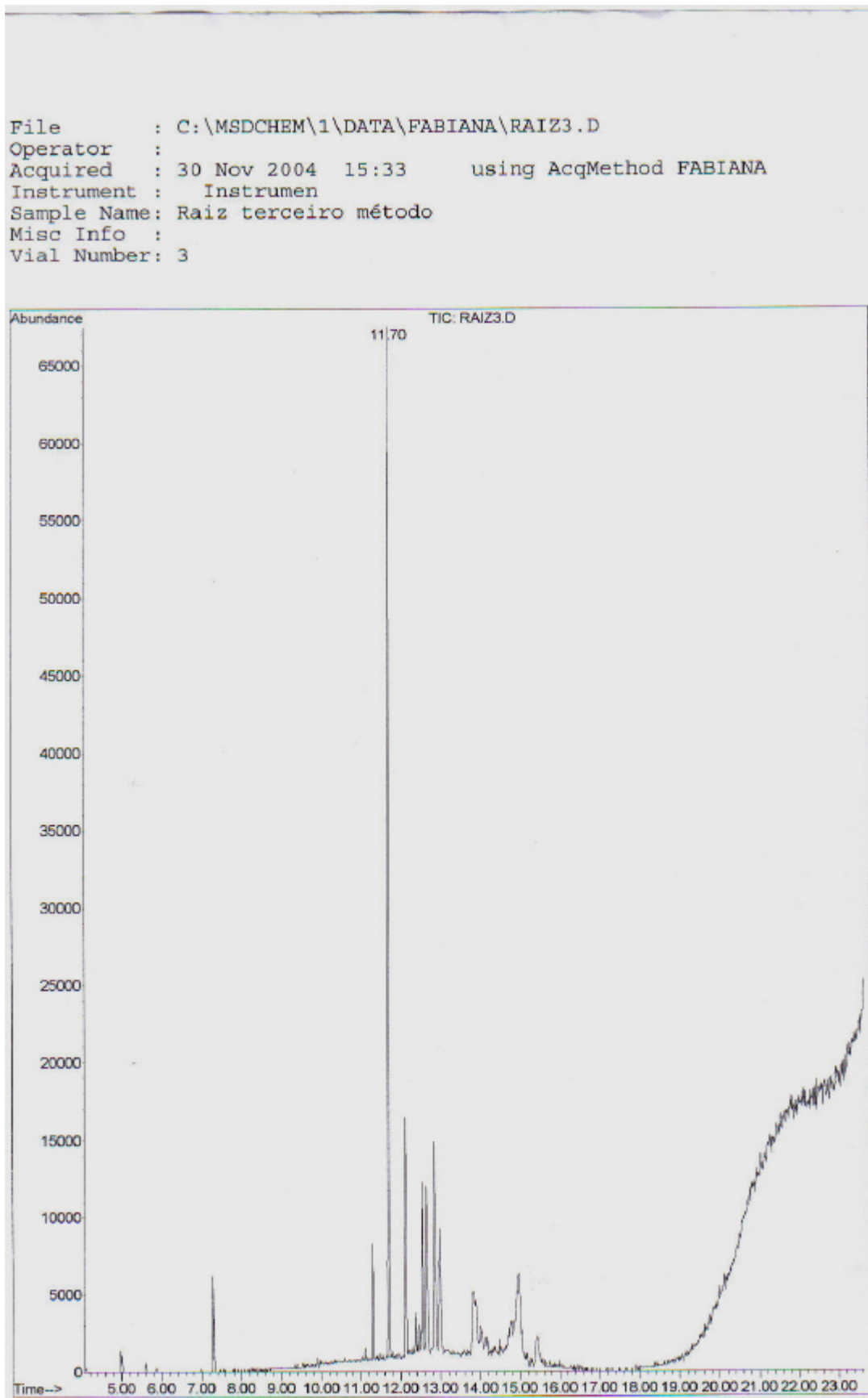


Fig.33: Cromatograma de íons totais (TIC) da fração 3 do ECHCl₃ de raiz analisado em CG/EM

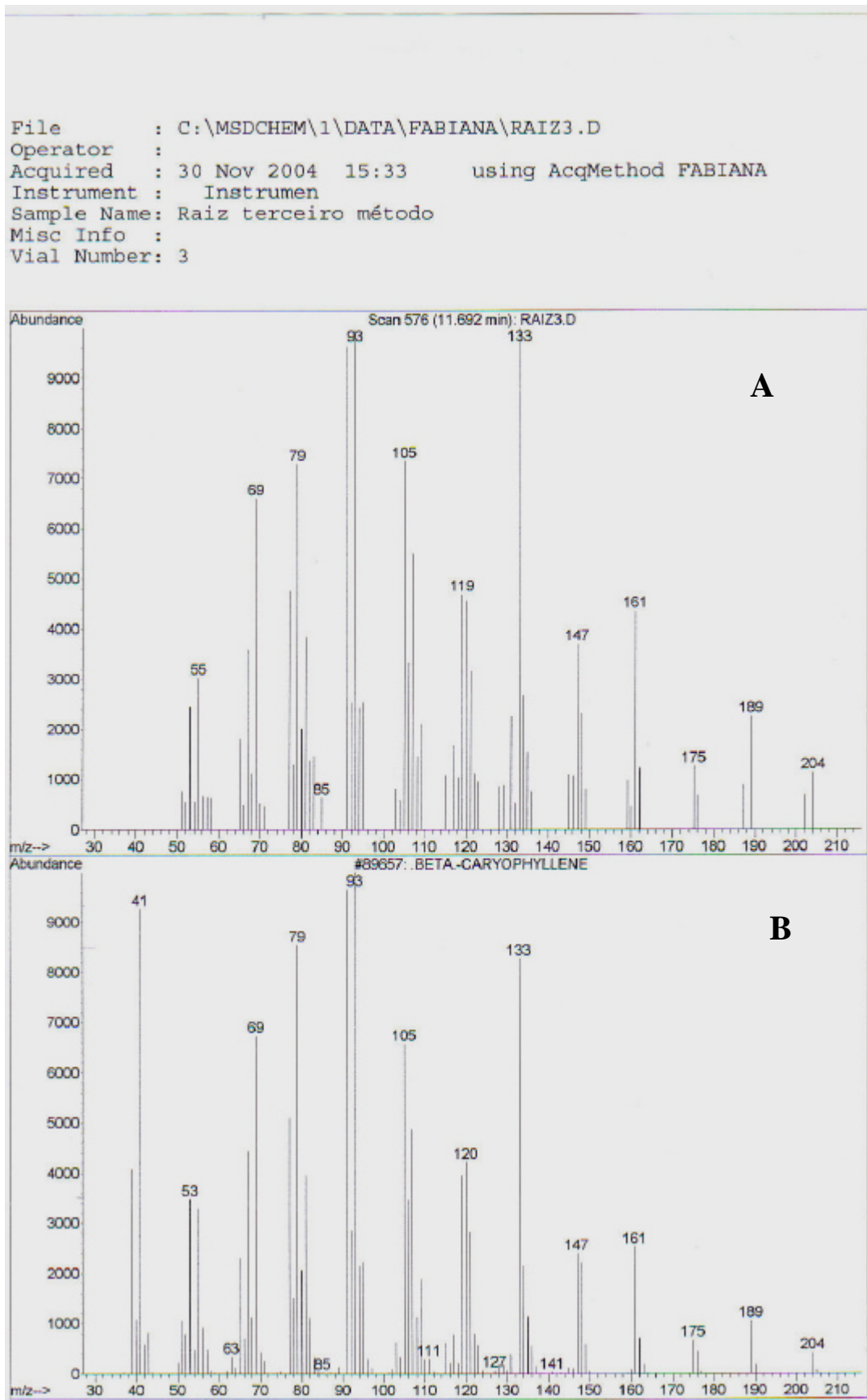


Fig.34: Espectro de massas:A-do componente da fração 3 do ECHC₃ de raízes de *A. sidifolia* (Tr=11.692min), feito em CG-EM Agilent 5973 Network e B-do β-cariofileno

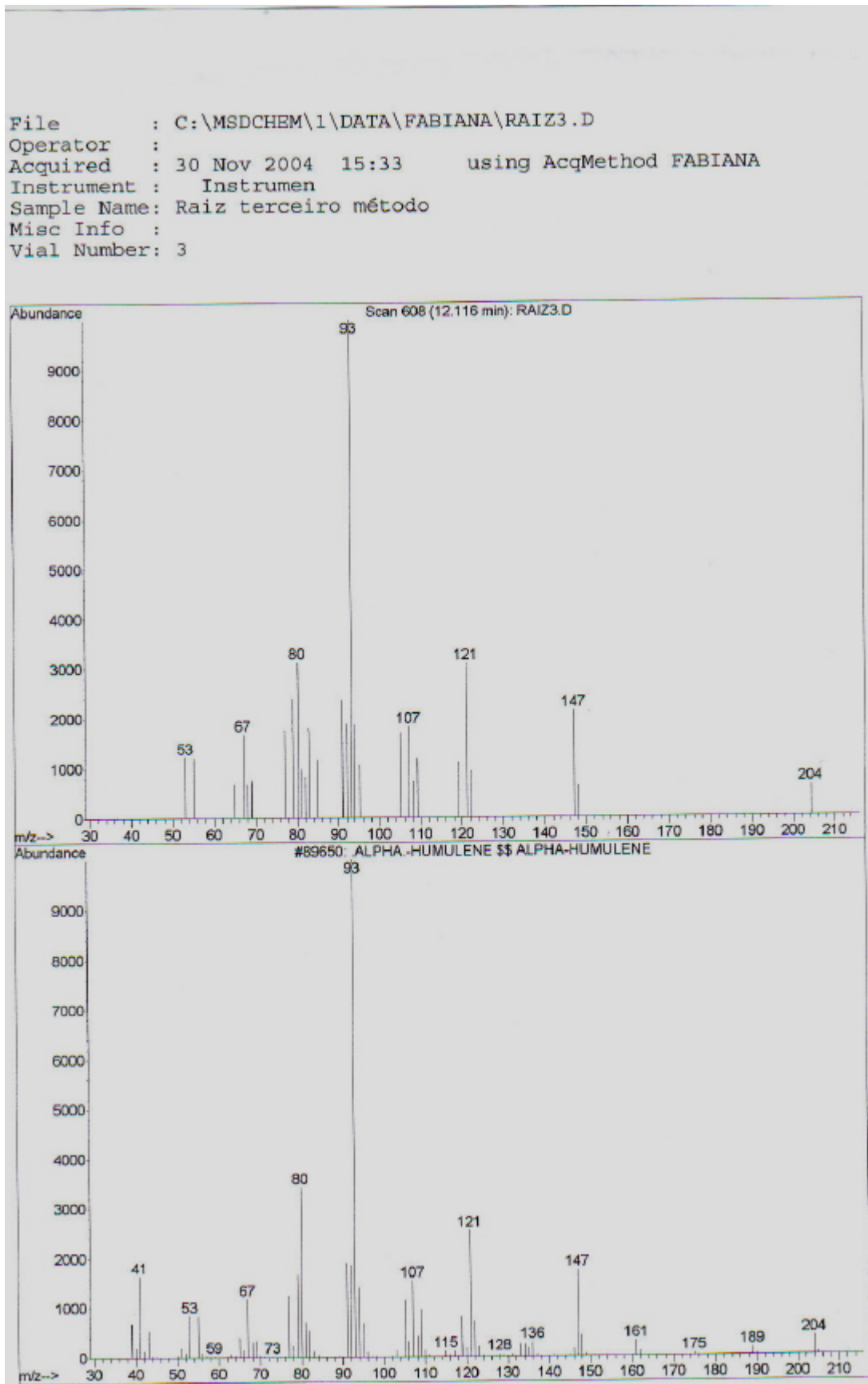


Fig.35: Espectro de massas A-do componente da fração 3 do ECHCl_3 de raízes de *A. sidifolia* (Tr=12.116min), feito em CG-EM Agilent 5973 Network e B-do α -humuleno

O EAcOEt de folhas apresentou atividade antifúngica contra *C. sphaerospermum*. Este extrato foi fracionado fornecendo o (Esquema 1, pág.33) flavonóide glicosilado quercitrina ($R_f=0,63$), que também apresentou atividade contra *C. sphaerospermum*, (Fig.37).

O diterpeno, corimbol, isolado do $ECHCl_3$ de folhas, quando testado nas mesmas condições, não apresentou atividade contra *C. sphaerospermum*.

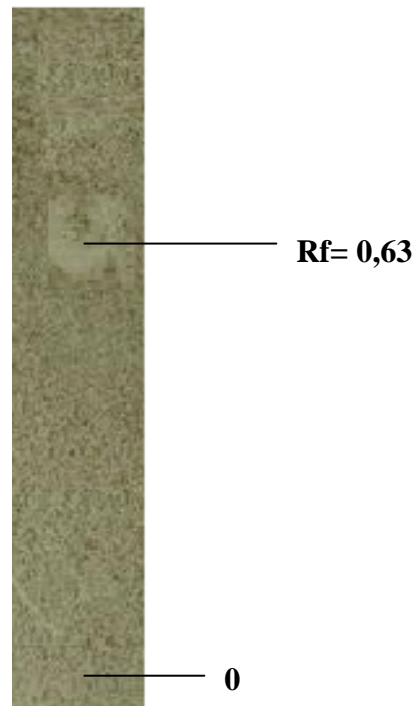


Fig.37: Bioautografia do flavonóide (quercitrina) isolado do EAcOEt de folhas de *A. sidifolia*, revelada com o fungo *C. sphaerospermum*. Sistema de eluição: $CHCl_3:MeOH:H_2O$ (64:36:8).200 μ g.

Os EEtOH, EHid, EAcOEt e EHex de folhas de *A. sidifolia* apresentaram atividade antitumoral fraca contra as linhagens mutantes de *S. cerevisiae* Rad 52Y com halo de inibição de 8 mm (atividade fraca). Estes mesmos extratos não apresentaram atividade antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Alchornea sidifolia, planta nativa comum no PEFI, uma reserva de Mata Atlântica, foi selecionada para estudo químico biomonitorado, através de uma triagem entre várias espécies de Euphorbiaceae, com o fungo *Cladosporium sphaerospermum* (Leone *et al.*, 2002).

Para este estudo, raízes, caules, folhas e flores da planta foram coletados no IBt. Os extratos etanólicos (raízes 0,28%, caules 0,68% e folhas 0,94%) obtidos seguindo a mesma metodologia e de acordo com a Fig. 8 (pág.18), foram particionados com solventes de polaridade crescentes (hexano, clorofórmio e acetato de etila) e os rendimentos de extrações foram diferentes. Os extratos de caules e folhas apresentaram massas relativas de 50% da parte menos polar e 50% da mais polar. A presença de óleo essencial não foi observada nas raízes, folhas e flores. Pode-se concluir que em *Alchornea sidifolia* não há presença de óleos essenciais.

Os resultados de bioautografia com o fungo *C. sphaerospermum* mostraram inibições mais nítidas no ECHC₃ dos caules (Figs.26 e 27) e das raízes (Fig.32). O fracionamento do ECHC₃ dos caules, forneceu frações ativas cuja composição química é de difenilsulfeto e α -amorfenol (Fig.31) e hidrocarbonetos. Nas raízes, os componentes majoritários da fração 3 ativa do ECHC₃ foram identificados como α -humuleno e β -cariofileno (Fig.36). A quercitrina isolada do EAcOEt das folhas apresentou atividade antifúngica fraca contra *C. sphaerospermum*.

Como relatado na literatura, sulfetos e polissulfetos são agentes antimicrobianos, inclusive alguns apresentam atividade contra *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides* (Benevides, 2001; Benevides *et al.*, 2001). Da mesma maneira, os sesquiterpenos α -amorfenol, α -humuleno e β -cariofileno, presentes nos óleos essenciais de *Annona cherimola* (Annonaceae), apresentaram atividade antimicrobiana (Rios *et al.*, 2003). A triagem fitoquímica de *A. sidifolia* para a caracterização de classes de substâncias, detectou a presença de terpenóides e flavonóides nos extratos e frações. O isolamento dos sesquiterpenos (Figs.31 e 36), corimbol (Fig.38) e quercitrina (Fig.13) confirmam esses dados de triagem. Neste mesmo estudo, a quantificação de fenóis totais nas folhas pelo método de Folin-Denis, foi de 32,6%, sendo que 22% destes fenóis

são flavonóides e 2,75% são taninos. Nos caules a porcentagem de fenóis totais foi de 9,8% sendo que 6% são flavonóides e 1,62% são taninos. Pode-se concluir que nas folhas há aproximadamente três vezes mais fenóis totais do que nos caules de *A. sidifolia*. A presença de maiores teores de substâncias fenólicas nas folhas de *A. sidifolia* pode estar associada a herbivoria e proteção contra a incidência de raios ultravioleta e visível (Harborne & Williams, 2000). Com relação a quercitrina, um flavonol glicosilado, comum em muitas famílias de plantas inclusive Euphorbiaceae também foi descrita atividade antimicrobiana (Penna *et al.* 2001). O diterpeno isolado das folhas, apresentou resposta negativa aos ensaios com o fungo *C. sphaerospermum*.

Os EEtOH, EHid, EAcOEt e EHex de folhas de *A. sidifolia* apresentaram atividade seletiva contra a linhagem mutante de *S. cerevisiae* Rad 52Y. Os halos de inibições observados para os extratos estudados foram de aproximadamente 8 mm (atividade fraca) uma vez que na concentração testada, o halo deveria ser de cerca de 12 mm para o extrato ser considerado ativo. Os extratos EEtOH, EHid, EAcOEt e EHex de folhas de *A. sidifolia* não foram ativos frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.

O diterpeno isolado e identificado como corimbol, por métodos espectrométricos, inédito nesta espécie vegetal e que não apresentou atividade antifúngica, está sendo discutido porque alguns dados novos de espectrometria e complementares foram obtidos e auxiliaram na confirmação da estrutura proposta para o corimbol. Este diterpeno foi isolado primeiramente em *Turbina corymbosa* (Convolvulaceae) (Pérezamador *et al.*, 1965) e posteriormente em *Calibrachoa parviflora* (Solanaceae) (Elliger *et al.*, 1992). Em espécies de Euphorbiaceae esta substância não havia sido isolada.

Com relação aos carbonos metilênicos C2 e C11 com deslocamentos químicos próximos 19.5 e 19.3 δ , respectivamente, as atribuições sugeridas foram feitas com base nas correlações (JCH e n=3) observadas no espectro de HMBC do C13 (46.4) com o H do C11 (1.54) como mostrado abaixo:

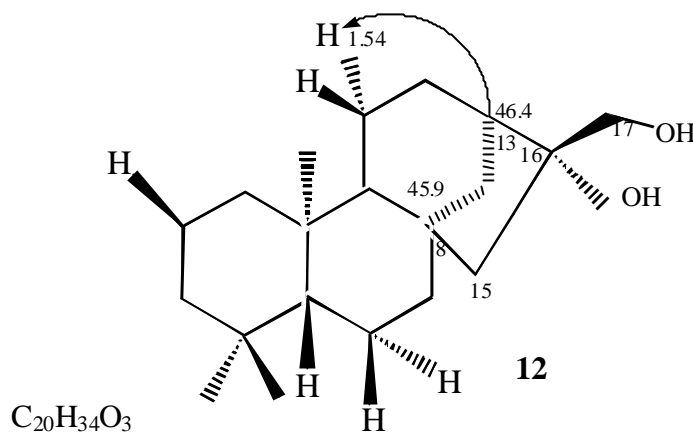


Fig.38: (12) Corimbol (ent-6 β , 16 α , 17- trihidroxicaurano)

A estereoquímica relativa para o carbono C-6, semelhante ao corimbol, foi corroborada pelas medidas de constante de acoplamento do triplo dubleto (δ 3.75) com J_{ax-ax} = 11.0 Hz e J_{ax-eq} =3.5 Hz do hidrogênio carbinólico, observado no espectro de hidrogênio ampliado (Fig.19) (Elliger *et al.*, 1992). Com estes dados pode-se confirmar que a estrutura proposta para o ppb é semelhante do corimbol (Fig.38-12). Na tabela 6 (pág.41) os carbonos C1 (CH₂) e C10 (C), que estavam obscuros no espectro feito em DMSO-d₆, foram atribuídos com base nos dados de RMN de ¹³C, DEPT 135° (Figs.21 e 22) e HMQC (Fig.23) cujos espectros foram feitos em CD₃OD. Nesta tabela onde são comparados os valores de deslocamentos químicos do corimbol (δ) e do ppb observa-se pequenas variações de δ que podem ser atribuídas ao efeito do solvente.

O estudo químico de *A. sidifolia*, contribuiu para um melhor conhecimento do táxon e mostrou a importância da preservação e conservação da Mata Atlântica e seus remanescentes, que abrigam uma enorme “biblioteca” viva de moléculas e modelos bioativos, fruto de milhões de anos de evolução e adaptação (Rosenthal *et al.*, 1979).

6. RESUMO

Alchornea sidifolia, planta nativa da Mata Atlântica, foi selecionada para este estudo por meio de uma triagem com várias espécies de Euphorbiaceae, coletadas na Reserva do PEFI, por apresentar atividade contra o fungo filamentosso *Cladosporium sphaerospermum*. Os objetivos deste trabalho foram: 1) o estudo químico monitorado por ensaios de atividade antifúngica com *C. sphaerospermum* como fungo revelador, para identificação tanto de substâncias com potencial atividade como de outros constituintes; 2) estabelecer relações químicas comparativas entre espécies do mesmo grupo taxonômico.

Para tanto, raízes, caules, folhas e flores da planta foram coletados no IBt. Os extratos etanólicos (raízes 0,28%, caules 0,68% e folhas 0,94%), obtidos do pó da planta foram particionados com solventes de polaridades crescentes (hexano, clorofórmio e acetato de etila) fornecendo os resíduos seguintes: caules 0,043% (EHex, 0,86g), 0,038% (ECHCl₃, 0,752g), 0,24% (EAcOEt, 4,8g) e 0,32% (EHid, 6,34g); folhas 0,21% (EHex, 12,69g), 0,22% (ECHCl₃, 13,37g), 0,097% (EAcOEt, 5,8g) e 0,41% (EHid, 24,3g); raízes 0,006% (EHex, 0,0587g), 0,013% (ECHCl₃, 0,136g), 0,0065% (EAcOEt, 0,0653g) e 0,165% (EHid, 1,657g). A utilização do método de Cleverger para a obtenção de óleos essenciais de raízes, folhas e flores mostrou-se ineficaz. A extração específica para alcalóides seguida de revelação com o reagente de Dragendorff apresentou resultados negativos para estes compostos.

A triagem fitoquímica de *A. sidifolia* para a caracterização de classes de substâncias, revelou a presença de terpenóides e de flavonóides nos extratos hexânico e de acetato de etila de folhas, respectivamente. O isolamento de sesquiterpenos, corimbol e quercitrina confirmam os dados da triagem fitoquímica. Neste mesmo estudo, a quantificação de fenóis totais nas folhas, pelo método de Folin-Denis, foi de 32,6%, sendo 22% de flavonóides e 2,75% de taninos. Nos caules, a porcentagem de fenóis totais foi de 9,8% sendo 6% de flavonóides e 1,62% de taninos. Estes dados sugerem que em *A. sidifolia* a presença de altos teores de fenóis nas folhas pode estar associada a herbivoria e proteção contra a incidência de raios ultravioleta e visível.

Os extratos EEtOH, EHid, EAcOEt e EHex de folhas de *A. sidifolia* apresentaram atividade seletiva contra a linhagem mutante de *S. cerevisiae* Rad 52Y em comparação com a linhagem selvagem Rad+. Os halos de inibições observados para os extratos estudados foram de aproximadamente 8mm, atividade considerada muito fraca, uma vez que na concentração testada o halo deveria ser de pelo menos 12 mm, para o extrato ser considerado ativo. Os mesmos extratos acima citados, quando testados frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* não apresentaram atividade antimicrobiana.

Os resultados de bioautografia com o fungo *C. sphaerospermum* mostraram inibições mais nítidas nos extratos em CHCl₃ dos caules e das raízes. O fracionamento do extrato CHCl₃ dos caules, forneceu duas frações ativas, nas quais foram identificados por CG/EM difenilsulfeto, α -amorfeno e hidrocarbonetos. Nas raízes, os componentes majoritários da fração ativa foram identificados por CG/EM como α -humuleno e β - cariofileno. A quercitrina, isolada do resíduo AcOEt das folhas apresentou atividade antifúngica fraca contra *C. sphaerospermum*. O diterpeno ent-6 β , 16 α , 17- trihidroxicaurano, conhecido como corimbol, isolado do extrato clorofórmico de folhas e identificado, por métodos espectrométricos, é inédito nesta espécie vegetal e não apresentou atividade antifúngica.

7. ABSTRACT

Alchornea sidifolia, a native plant from the Rain Forest, was selected from a screening for biological activities of Euphorbiaceae plants, collected in the Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), São Paulo, SP due to its activity against the filamentous fungus *Cladosporium sphaerospermum*. This work describes the activity-guided fractionation of *A. sidifolia* extracts using the *C. sphaerospermum* TLC bioautography.

The roots, stems and leaf crude ethanolic extracts were partitioned with hexane, chloroform, and ethyl acetate, respectively. The resulting solutions were concentrated in vacuo to afford the following extracts: stem 0,043% (EHex, 0,86g), 0,038% (ECHCl₃, 0,752g), 0,24% (EAcOEt, 4,8g) and 0,32% (EHid, 6,34g); leaves 0,21% (EHex, 12,69g), 0,22% (ECHCl₃, 13,37g), 0,097% (EAcOEt, 5,8g) and 0,41% (EHid, 24,3g) and roots 0,006% (EHex, 0,0587g), 0,013% (ECHCl₃, 0,136g), 0,0065% (EAcOEt, 0,0653g) and 0,165% (EHid, 1,657g).

Phytochemical screening with different detection methods revealed the presence of terpenes and flavonoids in both hexane and ethyl acetate extracts from the leaves of *A. sidifolia*. The isolation of sesquiterpenes, kaurenoid diterpene (corymbol) and quercitrin proved the nature of the constituents detected in the preliminary information. The amount of total phenol on the leaves according to the Folin-Denis method was 32,6%, from which 22% are flavonoids and 2,75% are tanins. For the stems, the percentage of total phenol was 9,8%, from which 6% are flavonoids and 1,62% are tanins. It has been admitted for a long time that phenols can act as a chemical barrier against herbivorous and protection against the ultraviolet rays. The high amount of phenols in *A. sidifolia*, may be associated to the ecological roles of these compounds.

EEtOH, EHid, EAcOEt and EHex extracts of the leaves of *A. sidifolia* had weak effect on DNA, as deduced by the selective inhibition zone (8mm) of the mutant strain Rad 52Y, relative to the wild strain Rad+. These extracts were evaluated for their activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* and did not show antimicrobial activity.

The CHCl_3 extracts of the stems and roots gave a positive response in the *C. sphaerospermum* TLC bioassay. Fractionation of the CHCl_3 extract of stems was performed by a combination of silica gel CC and TLC to give two active fractions. CG/MS analysis of these fractions showed the presence of diphenylsulfide, α -amorfene and hydrocarbons. Analysis of the CHCl_3 extract of the roots by CG/MS showed the presence of two major components identified as α -humulene and β -cariophyllene. The flavonoid quercitrin isolated from the AcOEt extract of the leaves presented weak antifungal activity against *C. sphaerospermum*. The diterpene ent-6 β , 16 α , 17-trihydroxykaurane, isolated from the chloroform extract of the leaves and identified by spectrometric methods as corymbol, did not show antifungal activity. This is the first report of corymbol in Euphorbiaceae.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELSON, P. H.1990. *Science*. 247, 513.

AGBE, S.A.O., OGUNTOMEIN, B. 1987. Anty-trypanosomal activity of *Alchornea cordifolia*.
Phytotherapy research. Vol.1, n.4.

BARROSO, G.M. Sistemática de Angiospermas do Brasil. 1984.UFV Imprensa Universitária:
Viçosa. Vol.2.

BARBO, F. E., MEDA, C. I., YOUNG, M. C. M., CORDEIRO, I & BLATT, C. T. T. 2002.
Pentatronol from *Alchornea sidifolia* (Euphorbiaceae). *Biochem. Syst. Ecol* 30(6): 109-
111.

BECK, O.P., CARTIER, G., DAVID, B., FRANCA, M.G.D., MARIOTTE, A.M. 2003.
Antioxidant flavonoids and phenolic acids from leaves of *Leea guineense* G. Don
(Leeaceae). *Phytotherapy Res.* 17: 345-347.

BENEVIDES, P.J.C. 2001. Estudo Químico guiado por bioensaios em algumas espécies da
Mata Atlântica e Floresta Amazônica. Tese de Doutorado. IQ-USP.

**BENEVIDES, P.J.C., YOUNG, M.C.M., GIESBRECHT, A.M., ROQUE, N.F., BOLZANI,
V. S.** 2001. Antifungal and cytotoxic polysulphides from *Petiveria alliacea* L.
Phytochemistry 57: 743-747.

BETINA, V. 1973. Bioautography in paper and thin layer chromatography and its scope in the
antibiotics. *J. Chromatogr.* 78:41-51.

BOZAN, B., OZEK, T., KURKCUOGLU, M., KIRIMER, N., BASER, K.H.C. 1999. The
Análisis of essential oil and headspace volatiles of the flowers of *Pelargonium
endlicherianum* used as an Anthilmintic in folk Medicine.

BRINSKIN, D. P. 2000. Medical Plants and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and
Physiology to human Health. *Pant Physiology* 124: 507-514.

BRITO, N.R.S. 1986. Perfil Químico de Famílias de Angiospermas. Tese de Doutorado. IQ-
USP. *In* BENEVIDES, P.J.C. 2001. Estudo fitoquímico guiado por bioensaios em algumas
espécies da Mata Atlântica e Floresta Amazônica. Tese de Doutorado. IQ-USP.

- BRUNETON, J.** 1995. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medical Plants. Lavoisier Publishing, Paris.
- COMISSÃO DE SOLOS. 1960. Levantamento de reconhecimento dos solos do Estado de São Paulo. Boletim do Serviço Nacional de Pesquisas Agronômicas, v. 12, 634 pp.
- CONEGERO, L. S., IDE, M. S., NAZARI, A. S., SARRAGIOTTO, M. H., FILHO, B. P. D., NAKARUMA, C. V., CARVALHO, J. E., FOGLIO, M. A.** 2003. Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). Química Nova, v. 26(6): 825-827.
- CRONQUIST, A.** 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia
- CORDEIRO, I.** 1989. Flora fanerogâmica da reserva do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (São Paulo, Brasil). Hoehnea 16: 11-29.
- COSTA, A.F.** 1972. Farmacognosia. Lisboa.: Calouste Gulbenkian. v.1.
- DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T. H.** 1993. Compendium of soil Fungi. 1: 201-210. IHW. Regensburg. Germany.
- EBI, G.C.** 2001. Antimicrobial activities of *Alchornea cordifolia*. Fitoterapia. Vol.72, p.69-72.
- ELLIGER, C.A., WONG, R.Y., BENSON, M., GAFFIELD, W., WAISS, A.C.** 1992. Diterpenes of *Calibrochoa parviflora*. Journal of natural products. 55: 1477-1487.
- GRAYER, J. R., HARBORNE, J. B.** 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants. 1982-1993. Phytochemistry 37:19-42.
- HAGERMAN, A.E.** 1987. Radical diffusion method for determining tannin in plant extracts. J. Chem. Ecol. 13: 437-449.
- HARBORNE, J.B., WILLIAMS, C.A.** 2000. Advances in flavonoid research since 1992.. Phytochemistry. 55: 481-504.
- HART, N.K., JOHNS, S.R., LAMBERTO, N.J.A., WILLING, R.J.** 1970. Australian J. Chem. Vol.23 p.1679. *In*: CONEGERO, L. S., IDE, M. S., NAZARI, A. S., SARRAGIOTTO, M. H., FILHO, B. P. D., NAKARUMA, C. V., CARVALHO, J. E., FOGLIO, M. A.. 2003. Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). Química Nova, v. 26(6): 825-827.

- HOOG, G. S. DE & GARRO, J.** 1995. Atlas of Clinical Fungi. CBS, Spain.
- HOMANS, A. L. & FUCHS, A.** 1970. Direct bioautography on thinlayer-chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *J. Chromatogr.* 51:327-329.
- HIRUMA-LIMA, C. A., GRACIOSO, J. S., RODRIGUEZ, J. A., HAUN, M., NUNES, D. S. & BRITO, A. R. M. S.** 2000. Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae). *J. Ethnopharmacol.* 69 (3):229-234.
- HOSTETTMANN, K., WOLFENDER, J. L. & RODRIGUEZ, S.** 1997. Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. *Planta Medica* 63:2-10.
- HVATTUM, E., EKEBERG, D.** 2003. Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry.* 38: 43-49.
- HUFFORD, A. & CLARK, A.** 1988. *Studies in Natural Products Chemistry*, Atta-ur-Rahman, ed, Elsevier, Amsterdam, 2v, 421.
- JAPANESE PHARMACOPOEA, Tokyo v. XIV 2000.
- JOLY, A. B.** 1976. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. 3. ed. Editora Nacional, São Paulo.
- JONNISON, R. K., BARTUS, H. F., HOFFMAN, G. A., BARTUS, J. O. L., MONG, S. M., FAUCETTE, L. F.; McCABE, J.A. C. & MIRABELLI, C. K.** (1986). *In*: HANKA, L. J., KONDO, T. & WHITE, R. J. (eds.). *In*: Vitro and Vivo models for detection of the new anti tumor drugs. Organizing Comitee of the 14th International Congress of Chemotherapy. Kyoto. P. 14-16.
- KANG, T.H., JEONG, S.J., KIM, N.Y., HIGUCHI, R., KIM, Y.C.** 2000. Sedative activity of two flavonol glycosides isolated from the flowers of *Albizia julibrissin* Durazz. *Journal of Ethnopharmacology* 71: 321-323.

- KINGHORN, A. D., SEO, E.K.** 1996. Plants as Sources of Drugs. *In: Agricultural Materials as Renewable Resources. Nonfood and Industrial Applications.* Fuller, G., Mckeon, T. A. & Bills, D. D. (ed.) ACS Symposium Series 647. Washington, DC.
- LAWSON, L.D.** 1993. Human medicinal agents from plants, ACS symposium Series, **534**, 306
In: BENEVIDES, P.J.C. 2001. Estudo fitoquímico guiado por bioensaios em algumas espécies da Mata Atlântica e Floresta Amazônica. Tese de Doutorado. IQ-USP.
- LEONE, F.P., AGRIPINO, D.G., CARVALHO, J.J., BLATT, C.T.T., YOUNG, M.C.M.** 2002. Triagem de atividade antifúngica e antitumoral de espécies de Euphorbiaceae do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga. Monografia apresentada a Faculdade de Ciências Exatas e Experimentais da Universidade Presbiteriana Mackenzie. São Paulo.
- LORENZI, H.** 1991. Plantas daninhas do Brasil. Terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. Editora Plantarum Ltda, Nova Odessa.
- MACRAE, W. D., HUDSON, J. B. & TOWERS, G. H. N.** 1988. Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. *J. Ethnopharmacol.* 22:143-172.
- MARKHAN, K. R., STANLEY, R., GEIGER, H., MABRY, T.J.** 1978. Naturally occurring flavonoid glycosilades and their acylated derivatives. *Tetrahedron.* 34: 1389-1397.
- McELMAY, J.C., LI, W.P.A.** 1991. *Pharm. J.* **246**, 324 *In: BENEVIDES, P.J.C.* 2001. Estudo fitoquímico guiado por bioensaios em algumas espécies da Mata Atlântica e Floresta Amazônica. Tese de Doutorado. IQ-USP.
- MEDA, I. C.** 1998. Avaliação de Atividades Biológicas (Alelopática, Antitumoral e fungitóxica) das folhas de *Eupatorium laevigatum*. Monografia de final de curso apresentada à Universidade Metodista de São Paulo. São Bernardo do Campo.
- MENDELSON, R.; BALICK, M.** 1995. *J. Econ. Bot.*, **49**, 223.
- MILES, D. H., HANKINSON, B. L. & RANDLE, S. A.** 1985. Insect antifeedants from the Peruvian plant *Alchornea triplinervia*. *ACS Symp. Ser.* 276 (Bioregul. Pest Control):469-476.

- MITSCHER, L. A., DRAKE, S., GOLLAPUDI, S. R., OKWUTE, S. K.** 1987. *J. Nat. Prod.*, **50**, 1025.
- MORS, W. & RIZZINI, C. T.** 1966. Useful plants of Brazil. Holden-Day Inc., London.
- MUELLER-DOMBOIS, D. & ELLENBERG, H.** 1974. Aims and methods of vegetation ecology. John Willey & Sons Co. New York.
- MUKHERJEE, K. .S., BHATTACHARJEE, P. & MEHROTRA, A.** 1990. Journal of Scientific and Industrial Research. 49 (9):449-456.
- OKEKE, I. N., OGRENDAINI, A. O., OGUNGBAMILA, F. O. & LAMIKANRA, A.** 1999. Antimicrobial spectrum of *Alchoernea cordifolia* leaf extract. Phytotherapy Research. 13:67-69.
- PENNA, C., MARINO, S., VIVOT, E., CRUANES, M.C., MUNOZ, J.D., CRUANES, J., FERRARO, G., GUTKIND, MARTINO, V.** 2000. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. Journal of Ethnopharmacology 77: 37-40.
- PENG, Z.F., STRACK, D., BAUMERT, A., SUBRAMANIAM, R., GOH, K.N., CHIA, T.F., TAN, S.N., CHIA, L.S.** 2003. Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L. PHYTOCHEMISTRY 62: 219-228.
- PERES, M. T. L. P., DELLEMONACHE, F., CRUZ, A. B., PIZZOLATTI, M. G. & YUNES, R. A.** 1997. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). J. Ethnopharmacol. 56 (3):223-226.
- PEREZAMADOR, M.C., JIMENEZ, G.F.** 1966. Corymbol, a new diterpenic alcohol. Tetrahedron. 22:1937-1942.
- RAHALISON, L.; HAMBURGER, M.; MONOD, M.; FRENK, E. & HOSTETTSMANN, K.** 1993. *Planta Med.* **60**, 41.
- RASOOL, N., AHMAD, V.U. & MALIK, A.** 1992. Two new triterpenoids from *Pentatropis spirales*. Fitoterapia 63:156-159.

- RAUTER, A.P., BRANCO, I., BERMEJO, J., GONZÁLEZ, A.G., GRÁVALOS, M.D.G., FELICIANO, A.S.** 2001. Bioactive humulene derivatives from *Asteriscus vogelii*. *Phytochemistry* 56: 167-171.
- RAVEN, P.H., EVERT, R.F., EICHHORN, S.E.** 1999. *Biology of Plants*. 6th ed. New York. 782.
- REIS, L. A. M.** 1998. Parque Estadual das Fontes do Ipiranga: utilização e degradação. Trabalho de Graduação Individual apresentado ao final da graduação em Geografia. Departamento de Geografia/FFLCH, Universidade de São Paulo.
- RIOS, J. L., RECIO, M. & VILLAR, A.** 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J. Ethnopharmacol.* 23:127-149.
- RIOS, M.Y., CASTREJÓN, F., ROBLEDO, N., LÉON, I., ROJAS, G., NAVARRO, V.** 2003. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from *Annona cherimola* (Annonaceae). *Revista de la sociedad Quimica de Mexico.* 47(2):139-142.
- ROSENTHAL, G.A., JANZEN, D.H.** 1979. Herbivores their interaction with secondary plant metabolites. Academic Press. *In*: BENEVIDES, P.J.C. 2001. Estudo fitoquímico guiado por bioensaios em algumas espécies da Mata Atlântica e Floresta Amazônica. Tese de Doutorado. IQ-USP.
- SANTOS, S. COSTA, MELLO, J.C.P.** Taninos *In*: SIMÕES, C.M., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. 1999. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5^oed. UFRGS editora.
- SECCO, R. S.** 1997. Revisão taxonômica das espécies neotropicais da tribo Alchorneae (Hurusawa) Hutchinson (Euphorbiaceae). Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Botânica, IBUSP.
- SETZER, W.N., SHEN, X..M., BATES, R.B., BURNS, J.R., McCLURE, K.J., ZHANG, P., MORIARITY, D.M., LAWTON, R.O.** 2000. *Fitoterapia*. Vol.71 p.195-198. *In*: CONEGERO, L. S., IDE, M. S., NAZARI, A. S., SARRAGIOTTO, M. H., FILHO, B. P.

- D., NAKARUMA, C. V., CARVALHO, J. E., FOGGIO, M. A. 2003. Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). *Química Nova*, v. 26(6): 825-827.
- SHUKLA, P. K., JAIN, M., LAL, B., AGRAURAL, P. K. & SRIVAATAVA, O. P.** 1985. A study on keratomycoses caused by the species of *Aspergillus*. *Biol. Mem.* 11:161-167.
- SIMÕES, C.M., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R.** (eds).1999. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ªed. UFRGS editora.
- SOUSA, M. P., MATOS, M. E. O., MATOS, F. J. A., MACHADO, M. I. L. & CRAVEIRO, A. A.** 1991. *Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras*. Edições UFC/Laboratório de Produtos Naturais, Fortaleza.
- STHAL, E.** *Thin layer chromatography*. 1969. New York: Springer Verlag.
- STHAL, E., SCHILD, W.** 1981. *Pharmazeutische biologie 4. Drogennalyse II. Inhaltsstoffe und Isolierungen*. Gustav Fischer: Verlag Stuttgart. p.126-127. *In*: SANTOS, M.D., BLATT, C.T.T., YOUNG, M.C.M. Determinação do teor de flavonóides em quatro espécies de *Plantago*. 2003. *Rev. Tecnologia e Ambiente*, Criciúma. V.8 n.2. p.73-82.
- STRUFFALDI DE VUONO, Y., MARTIN-SILVEIRA LOPES, M. I. & DOMINGOS, M.** 1984. Poluição atmosférica e elementos tóxicos na Reserva Biológica do Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil. *Revta. brasil. Bot.* 7:149-156.
- STRUFFALDI DE VUONO, Y.** 1985. *Fitossociologia do estrato arbóreo da floresta da Reserva Biológica do Instituto de Botânica (São Paulo – SP)*. Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biociências/ Departamento de Ecologia/USP.
- TONA, K., KAMBU, K., MESIA, K., CIMANGA, K., DE BRUYNE, T. PIETERS, L., TOTTE, J., VLIENTINCK, A.J.** 1999. *Phytochemistry*. vol.6 p.59. *In*: CONEGERO, L. S., IDE, M. S., NAZARI, A. S., SARRAGIOTTO, M. H., FILHO, B. P. D., NAKARUMA, C. V., CARVALHO, J. E., FOGGIO, M. A. 2003. Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). *Química Nova*, v. 26(6): 825-827.

- UNANDER, D. W., WEBSTER, G. L. & BLUMBERG, B. S.** 1991. Uses and bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) – A compilation. 2. The subgenus *Phyllanthus*. J. Ethnopharmacol. 34 (2-3):97-133.
- WAGNER, H., BLADT, S.** 2001. Plant Drug Analysis. Springer-Verlag.