



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**ANÁLISE DE ESTERÓIDES EM EXTRATOS VEGETAIS
E ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO PRELIMINAR DE
Brunfelsia uniflora.**

Relatório apresentado ao
Departamento de Química da Universidade
Federal de Santa Catarina, como requisito
parcial da disciplina de Estágio
Supervisionado II (QMC 5512)

Aluno: Gustavo Silva Queiroz

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Inês Maria Costa Brighente

Florianópolis, novembro de 2009.

GUSTAVO SILVA QUEIROZ

**ANÁLISE DE ESTERÓIDES EM EXTRATOS VEGETAIS
E ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO PRELIMINAR DE
Brunfelsia uniflora.**

Relatório apresentado ao
Departamento de Química da Universidade
Federal de Santa Catarina, como requisito
parcial da disciplina de Estágio
Supervisionado II (QMC 5512)

Profa. Dra. INÊS MARIA COSTA BRIGHENTE
Orientadora

Florianópolis
Novembro/2009

GUSTAVO SILVA QUEIROZ

**ANÁLISE DE ESTERÓIDES EM EXTRATOS VEGETAIS
E ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO PRELIMINAR DE
Brunfelsia uniflora.**

Profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente
Coordenadora de Estágios do Curso de Química - Bacharelado

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente
Orientador

Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti

Dr. Jacks Patrick Priebe

Florianópolis
Novembro/2009

DEDICATÓRIA

*"Se não houver frutos, valeu a
beleza das flores. Se não houver
flores, valeu a sombra das
folhas. Se não houver folhas,
valeu a intenção da semente."*

(Henfil)

*Dedico este trabalho aos meus pais
e meus tios de Florianópolis por
acreditarem no meu trabalho e por
sempre me incentivarem a continuar.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à CAPES, ao CNPq e à UFSC pelo auxílio financeiro e oportunidade de desenvolver esta pesquisa.

Agradeço a Deus por me ajudar a encontrar estímulo sempre, a meus pais, Isabel e Enedino, meus irmãos (Elaine, Ismar, Priscyla e Laize), meus tios, principalmente Áurea, Pio e Marizete, meus primos Marcos e Mauro, meus principais incentivadores e ouvintes das minhas reclamações e festejos.

Aos professores do departamento de Química, especialmente à minha orientadora Dr^a Inês Maria Costa Brighente, ao Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti, Dr^a Maria da Graça Nascimento e a Dr^a Dilma M. O. Marconi.

Aos Meus colegas/amigos do grupo de pesquisa LQPN Andressa Gilioli, Cristian Soldi, Guilherme Colla, Henrique Moresco, Heros Horst, Juliana Dalmarco e Leandro Espíndola.

Ao Professor Dr. Daniel Falkenberg pela identificação da planta e ao Msc. Eduardo Monguilhott Dalmarco pelas análises antibacterianas.

Aos servidores técnicos do departamento de Química, especialmente a Marilene, Salete e Nezi.

Às professoras e amigas Angela Campos e Ana Lúcia do CIF/CCS e à Prof^a Dr^a Neide Bitencourt do MEN/CED, todas da UFSC.

Aos meus colegas do curso, especialmente os que estiveram mais presentes: Rodrigo Silva, Daiane Quadros, Raquel Medeiros, Graziela Salvador, Julisse Savi, Edna Pereira, Glaucia Perez, Simone Farias e Américo Cruz Júnior.

Meus amigos de Florianópolis que também me incentivaram e contribuíram para meu crescimento: Diogo Souza, Tiago Tamagusko, Diogo Pereto, Veridiana Berteli, Jonathan Wilhelm, Bruna Roncato e Nádia Ramos.

Meu grande amigo de Itajuípe-BA, Alex Souza, que, mesmo longe, sempre esteve presente quando precisei.

Aos grupos que faço parte: Coral da UFSC e grupo vocal Nós & Vozes pelo ambiente saudável de música e amigos que tornam minha vida mais emocionante.

E a todos os que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação acadêmica e pessoal.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Biosíntese de esteróides	3
2.2 Gênero <i>Brunfelsia</i>	6
2.2.1 <i>Brunfelsia uniflora</i> (Pohl) D. Don	8
3. OBJETIVOS	10
4. METODOLOGIA.....	11
4.1 Materiais e reagentes	11
4.2 Protocolo de análise de fitoesteróides em extratos vegetais.....	11
4.3 Obtenção e particionamento do extrato bruto hidroalcoólico (EBH)	12
4.4 Análise fitoquímica preliminar do extrato bruto (EBH)	12
4.5 Ensaio biológicos.....	13
4.5.1 Teste de toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>.....	14
4.5.2 Teste de atividade antioxidante	14
4.5.2.1 Determinação do conteúdo de fenólicos totais	14
4.5.2.2 Determinação do conteúdo de flavonóides.....	15
4.5.2.3 Determinação do poder redutor	16
4.5.2.4 Determinação da ação sequestradora do radical livre DPPH	16
4.5.3 Alelopatia	17

4.5.4 Determinação da atividade antibacteriana.....	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5.1 Análise de fitoesteróides em extratos vegetais.....	19
5.2 Estudos fitoquímico e biológico de <i>Brunfelsia uniflora</i>	27
5.2.1. Análise fitoquímica preliminar	27
5.2.2. Análise através de espectroscopia de infravermelho (IV).....	28
5.2.3. Análise através de cromatografia em camada delgada (CCD).....	30
5.2.4. Avaliação da toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	31
5.2.5. Avaliação da atividade antioxidante.....	31
5.2.6. Avaliação da atividade alelopática	34
5.2.7. Avaliação da atividade antibacteriana.....	36
6. CONCLUSÕES	37
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Biosíntese de unidades isoprênicas.....	3
Figura 2. Biosíntese de monoterpenos	4
Figura 3. Biosíntese de esteróides à partir do esqualeno	5
Figura 4. Estrutura básica dos esteróides com sua respectiva numeração	5
Figura 5. Alguns compostos isolados de espécies de <i>Brunfelsia</i>	7
Figura 6. <i>Brunfelsia uniflora</i>	8
Figura 7. Alguns compostos encontrados em <i>Brunfelsia uniflora</i>	9
Figura 8. Fluxograma do fracionamento do extrato bruto das folhas de <i>B. uniflora</i>	12
Figura 9. Fluxograma da marcha analítica aplicada ao extrato bruto (EBH) de <i>B. uniflora</i>	13
Figura 10. Curva de calibração para a determinação do conteúdo de fenólicos.....	15
Figura 11. Curva de calibração para determinação do conteúdo de flavonóides.....	15
Figura 12. Curva de calibração para determinação do poder redutor	16
Figura 13. Determinação CE ₅₀ da fração acetato de etila de <i>B. uniflora</i>	17
Figura 14. Representação da estereoquímica dos principais fitoesteróides	20
Figura 15. Reação de Liebermann-Burchard, detecção de esteróides	21
Figura 16. Espectro de infravermelho do β -sitosterol em pastilha de KBr (Weng <i>et al.</i> , 2003).....	22
Figura 17. Espectros de RMN do β -sitosterol. RMN de (a) ^1H e (b) ^{13}C . (Dalmarco, 2009)	25
Figura 18. Espectro de massas do β -sitosterol (Weng <i>et al.</i> , 2003).....	26
Figura 19. Espectro de IV do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) de <i>B. uniflora</i>	28
Figura 20. Espectro de IV da Resina (Res) <i>B. uniflora</i>	29

Figura 21. Espectro de IV da fração hexânica (FH) de <i>B. uniflora</i>	29
Figura 22. Espectro de IV da fração acetato de etila (FAe) de <i>B. uniflora</i>	29
Figura 23. Espectro de IV da fração n-butanólica (FB) de <i>B. uniflora</i>	30
Figura 24. Cromatograma do extrato bruto (EBH) e frações de <i>B. uniflora</i> reveladas com vapor de iodo	30
Figura 25. Formação do complexo entre Al^{3+} e o flavonóide	32
Figura 26. Reação entre um flavonóide e o radical livre DPPH	32
Figura 27. Velocidade de germinação de sementes de <i>L. sativa</i> na presença do extrato bruto (EBH) e frações	35
Figura 28. Comprimento da radícula (CR) e do hipocótilo (CH) de <i>L. sativa</i> na presença do extrato bruto (EBH) e frações (acetato de etila, FAe; butanólica, FB e resina, Res) de <i>B. uniflora</i>	35

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Dados de constantes físicas dos principais fitoesteróides.....	21
Tabela 2. Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C para os principais fitoesteróides	24
Tabela 3. Dados espectrais de massas referentes às fragmentações dos principais fitoesteróides	26
Tabela 4. Análise fitoquímica preliminar do extrato bruto hidroalcoólico de <i>B. uniflora</i>	27
Tabela 5. Atividade Antioxidante do extrato bruto e frações de <i>B. uniflora</i>	33
Tabela 6. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) para o extrato bruto e frações de <i>B. uniflora</i>	36

RESUMO

Brunfelsia uniflora, é uma planta nativa, conhecida popularmente como manacá, pertencente à família Solanaceae. É encontrada no sul e sudeste do Brasil e países limítrofes sendo frequentemente cultivada como planta ornamental. Na medicina tradicional é usada como abortiva, purgativa, emética e antiblenorrágica (raízes); Contra artrite, reumatismo, febres e mordedura de cobras (folhas). Devido aos escassos estudos fitoquímicos e biológicos desenvolvidos com esta planta, foram feitos ensaios para avaliar a atividade antioxidante do extrato bruto e das frações de *B. uniflora* utilizando o radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) e por determinação de grupos fenólicos totais e de flavonóides. Também foram avaliadas as atividades alelopática e antibacteriana e a toxicidade frente à *Artemia salina*. As folhas desta espécie após a coleta foram secas, trituradas e extraídas por maceração em solução hidroetanólica 96% por 15 dias obtendo-se o extrato bruto hidroalcoólico (EBH). O EBH foi suspenso em etanol 20% de onde se obteve um precipitado, denominado de resina (Res), que foi filtrado. O filtrado foi particionado com solventes de polaridade crescente, rendendo as frações hexânica (FH), acetato de etila (FAe), n-butanólica (FB) e aquosa. A avaliação da ação seqüestradora de radicais livres foi baseada na medida da extinção da absorbância do DPPH em 517 nm na presença de diferentes concentrações de amostra vegetal em comparação com um branco para se obter a concentração efetiva 50% (CE₅₀), concentração necessária para diminuir em 50% a absorbância do DPPH. Para o teste que avalia o teor de compostos fenólicos, utilizou-se o reativo de Folin-Ciocalteu. O aparecimento de uma coloração azul ($\lambda = 725$ nm) indica a presença de compostos fenólicos. A quantificação de compostos flavonóides foi feita misturando-se cloreto de alumínio (AlCl₃) 2% a uma solução de 1000 ppm de amostra vegetal. A absorbância é medida em 415 nm após uma hora. A atividade alelopática é avaliada através da germinação de sementes de *Lactuca sativa* (alface) e posteriores medidas de comprimento de radícula e hipocótilo da plântula em presença da amostra. A atividade antibacteriana foi avaliada pela medida da concentração inibitória mínima. A FAe apresentou os melhores resultados em todos os testes antioxidantes seguida da fração FB obtendo-se CE₅₀ de 90,2 ppm e 133,2 ppm respectivamente. A FAe também apresentou melhores resultados no teste alelopático, porém somente o EBH e a Res apresentaram atividade antibacteriana moderada frente à bactéria *Bacillus cereus*. Nenhuma das amostras apresentou atividade frente à *A. salina*.

Palavras-chave: *Brunfelsia uniflora*, antioxidantes, esteróides, alelopatia.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os fitoesteróides compreendem uma grande classe de compostos encontrados em diversas partes das plantas sendo, no reino vegetal, o equivalente ao colesterol entre os mamíferos. Há evidências de que alguns fitoesteróides são eficazes contra doenças cardiovasculares, reduzindo os níveis de colesterol sendo, por isso, considerados alimentos funcionais e usados atualmente em alguns alimentos industrializados. No Brasil a empresa Becel é pioneira no enriquecimento de margarina com fitoesteróides, a margarina Becel pró-activ[®] (Becel, 2009).

A partir de plantas tuberosas conhecidas como inhame (gênero *Dioscoria*) e sisal (gênero *Agave*) foram obtidos compostos esteroidais que, através de uma semi-síntese economicamente viável pode ser transformada em progesterona (hormônio sexual) e cortisona (um corticosteróide). A mepiprestona, primeiro abortivo da classe dos esteróides, foi descoberta por acaso a partir de um composto contendo o sistema esteroidal. Este fármaco é conhecido como a pílula do dia seguinte e é empregado em diversos países em programas de planejamento familiar.

Em um laboratório de fitoquímica, os esteróides livres ou ligados a açúcares ou ácidos são normalmente os primeiros a serem isolados como compostos cristalinos. Isto leva a certa apreensão por parte do aluno pesquisador, em relação a ter encontrado algum composto inédito. Por serem comumente encontrados nas frações menos polares de extratos vegetais, os artigos normalmente não publicam dados espectroscópicos apenas comparando com dados da literatura, que são antigos e de difícil acesso. Isto torna difícil a identificação de compostos simples e comuns como estes. Para se ter uma idéia, nos últimos sete anos, dos 79 artigos publicados na revista **Química Nova** que abordavam constituintes químicos em plantas, 59,5% relatou a presença de esteróides em seus extratos dos quais 40,5% identificaram o β -sitosterol e 26,6% identificaram uma mistura binária comum de β -sitosterol e estigmasterol, enquanto que 22,8% também relataram a presença de esteróides na forma glicosilada. Apesar de serem comuns e abundantes nas plantas não são menos importantes.

Considerando que os fitoestóides são, de uma maneira geral, os compostos naturais mais comuns e que são os primeiros compostos a serem separados e identificados em espécies vegetais, pretende-se fazer um estudo sobre os principais métodos para análise destes em plantas a fim de obter uma identificação rápida deste grupo de compostos.

Além disso, as indústrias farmacêuticas nacionais e internacionais, especialmente esta última, vêm buscando nas plantas da Mata Atlântica e da região Amazônica, essências, produtos e formulações para produção de medicamentos, vacinas e outras formas de terapia, visando a industrialização e comercialização em larga escala de princípios ativos identificados nestas plantas. Neste contexto, a espécie nativa *Brunfelsia uniflora*, conhecida como manacá, será alvo de um estudo preliminar segundo seus aspectos biológicos e fitoquímicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biosíntese de esteróides

Biosíntese refere-se à formação de qualquer substância por um organismo vivo. Os terpenóides formam uma grande e estruturalmente diversa família de produtos naturais, derivada de unidades isoprênicas. Dependendo da quantidade de unidades isoprênicas, os compostos terpênicos podem ser classificados como monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), sesterterpenos (C₂₅), triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀). Os esteróides são triterpenóides modificados (Dewick, 2002).

As unidades isoprênicas bioquimicamente ativas são dois ésteres difosfato (pirofosfato - OPP): difosfato de dimetilalila (DMAPP) e difosfato de isopentenila (IPP). Estas unidades são derivadas do metabolismo do acetato advindos da rota do ácido mevalônico (MVA), que por sua vez é formado por três moléculas de acetil-coenzima A (**Figura 1**) (Dewick, 2002).

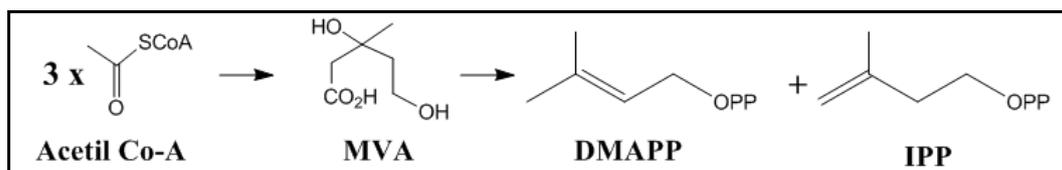


Figura 1. Biosíntese de unidades isoprênicas

Para a biosíntese dos monoterpenos ocorre a combinação de DMAPP e IPP via a enzima preniltransferase originando o difosfato de geranila (GPP). Acredita-se que esta etapa envolva primeiramente a formação do cátion alílico a partir da saída do ânion pirofosfato do DMAPP, seguida da adição da ligação dupla do IPP gerando um carbocátion terciário e por último, perda estereoespecífica de um próton formando uma ligação dupla. Esta seqüência de reações produz um difosfato de monoterpeno, o geranil pirofosfato GPP (**Figura 2**) (Dewick, 2002).

A química da formação dos terpenóides é essencialmente baseada na reatividade do carbocátion, que pode sofrer reações de adição de água ou de eliminação, funcionalizando estes compostos formando alcoóis, aldeídos, cetonas e mais raramente acetatos. A adição posterior de uma unidade IPP (C₅) ao geranildifosfato sob ação da enzima preniltransfertase leva ao precursor fundamental dos sesquiterpenos, o farnesildifosfato FPP (**Figura 2**). Diterpenos originam-se a partir de reações

intramoleculares do geranylgeranilpirofosfato GGPP, que por sua vez é formado a partir da adição de IPP a farnesilpirofosfato (Dewick, 2002).

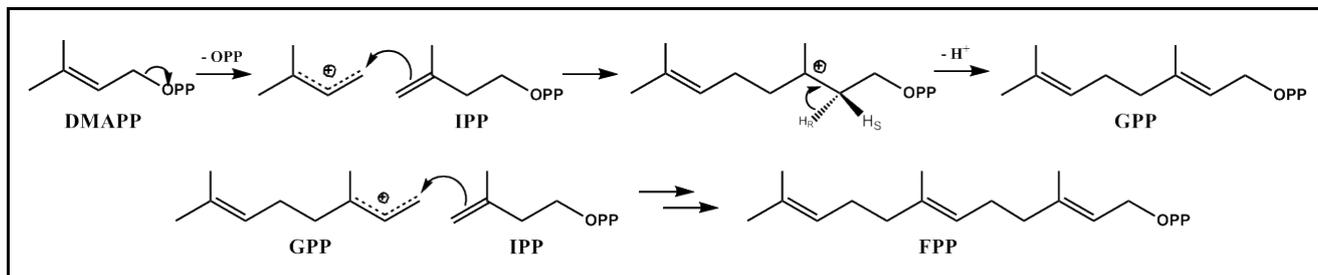


Figura 2. Biosíntese de monoterpêneos

Os triterpenos e esteróides são formados pela união de duas moléculas de FPP (C₁₅) unidas cauda-cauda para formar o esqualeno que sofre uma epoxidação catalisada por enzima gerando o esqualeno-2,3-óxido. A protonação do epóxido permite a abertura do anel para formar um cátion terciário, que sofre adição da ligação dupla C6–C7 formando um anel de seis membros e um novo cátion terciário. Através de novas adições das ligações duplas ocorrem ciclizações com formação de três anéis de seis membros e um anel de cinco membros gerando o cátion terciário protosteril que, em plantas, pode formar um anel ciclopropano através da perda de um próton da metila ligada em C10 originando o cicloartenol ou, em animais e fungos, o alceno lanosterol pela perda de um próton. A formação dos triterpenos através da ciclização do esqualeno segue a estereoquímica cadeira-bote-cadeira-bote (**Figura 3**) (Dewick, 2002).

Os fitoesteróides são triterpenóides modificados contendo o sistema tetracíclico do ciclopentanoperidrofenantreno (anéis A, B, C e D da estrutura 1) e derivam-se do cicloartenol, mas sem as metilas no C4 e C14.

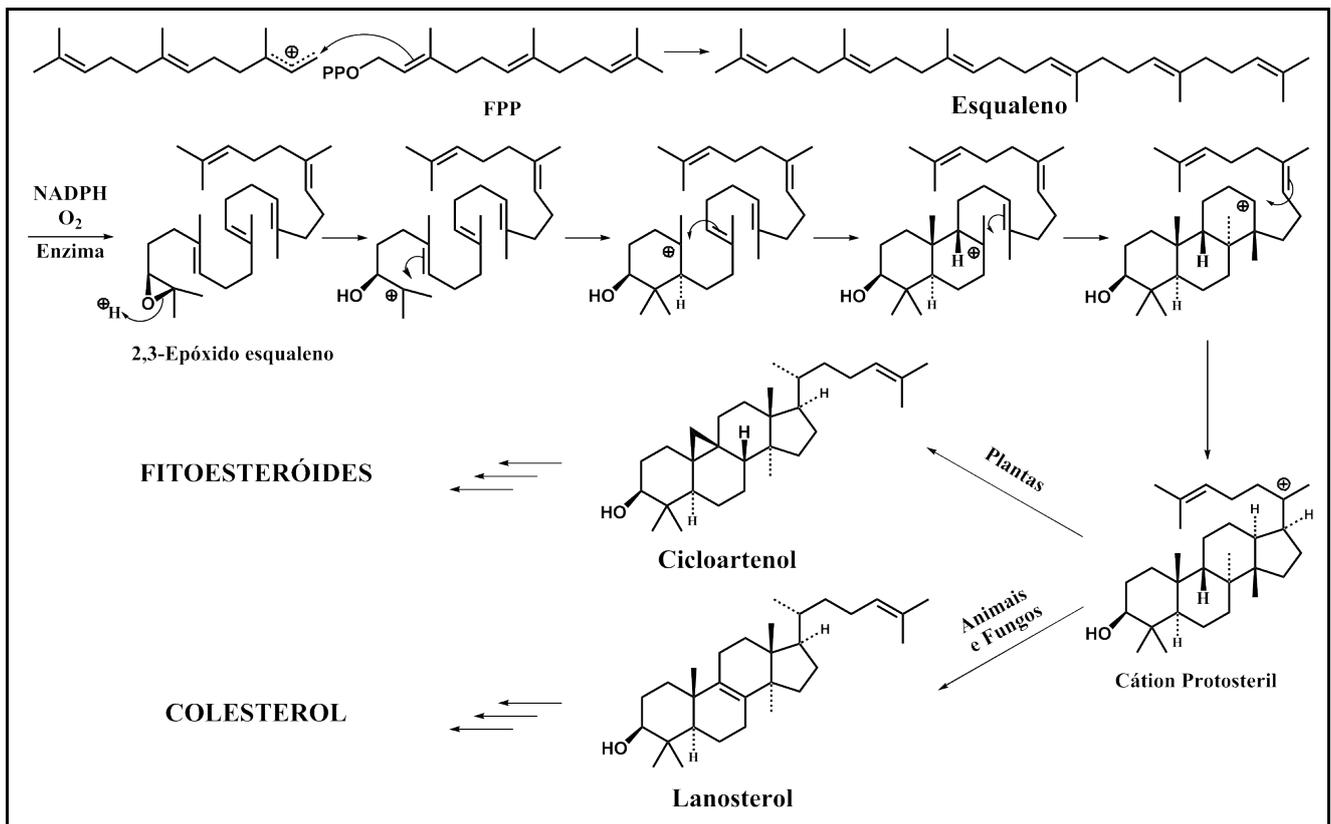


Figura 3. Biossíntese de esteróides à partir do esqualeno

Os esteróides de plantas, fungos e algas podem ter um ou dois carbonos extras ligados ao C24 da cadeia lateral (1). A estereoquímica dos esteróides é representada por α , substituinte na face inferior da molécula, ou β , substituinte na face superior da molécula sendo representadas por linhas grossas, como é o caso das metilas ligadas em C10 e C13. O núcleo esteroidal apresenta sete centros estereogênicos (C3, C8, C9, C10, C13, C14, C17), que originariam 128 estereoisômeros muitos dos quais não podem existir por limitações estéricas (Figura 4).

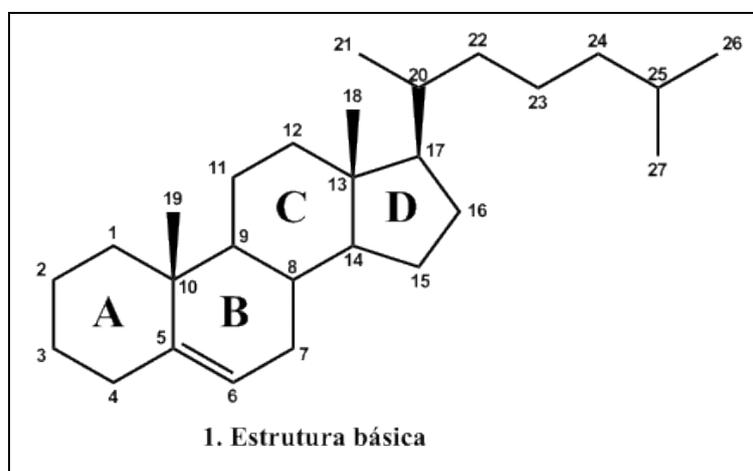


Figura 4. Estrutura básica dos esteróides com sua respectiva numeração

Os esteróides são encontrados como álcool livre (3 β -OH), esterificados a ácidos graxos ou como glicosídeos. São constituintes das membranas em plantas, algas e fungos e afetam a sua permeabilidade (Dewick, 2002; Gros, 1985).

2.2 Gênero *Brunfelsia*

Brunfelsia (*Solanaceae*) é um gênero de arbustos que compreendem aproximadamente 40 espécies nativas da Bacia Amazônica (Plowman, 1977; Bertrand *et al.* 2006) assim como espécies tropicais americanas, as quais são importantes fontes de alcalóides e flavonóides (Brunner *et al.*, 2000). Por ser um gênero rico em alcalóides, muitas espécies podem ter atividade farmacológica. As espécies *Brunfelsia grandiflora* e *B. uniflora* apresentaram atividade contra picada de cobra (Mors *et al.* 2000). O extrato alcoólico das folhas de *Brunfelsia pauciflora* apresentou atividade tóxica contra larvas de *Artemia salina*. Esta espécie contém alcalóides e cumarinas em sua composição fitoquímica (Moreno-Murillo *et al.* 2001). O extrato das raízes de *Brunfelsia grandiflora* apresentou fraca atividade frente a bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas (Kloucek *et al.* 2005).

Análises fitoquímicas de tecidos de várias espécies de *Brunfelsia* indicaram a presença de alcalóides como manaceína e manacina e de cumarinas como escopoletina ou 6-metoxi-7-hidroxycumarina (**2**) e aesculetina (**3**) (Mors & Robeiro, 1957; Ruppelt *et al.*, 1991). Das partes aéreas de *B. grandiflora* foi isolado o flavonóide glicosilado canferol-3-O-[6-Gcl-2-O-feruloil]- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)]- β -D-galactopiranosideo (**4**) (Brunner *et al.*, 2000). Estudos fitoquímicos de espécies de *Brunfelsia* evidenciaram ainda, outras classes de metabólitos secundários como saponinas esteroidais, ácidos graxos, ciclopropenóides, alcalóides, cumarinas e ácido clorogênico (**5**) (Martins *et al.*, 2009).

2.2.1 *Brunfelsia uniflora* (Pohl) D. Don

Brunfelsia uniflora (**Figura 6**) é conhecida popularmente como manacá, jasmim do Paraguai, manacá-cheiroso, romeu-e-julieta, etc. Possui folhas simples, cartáceas, quase glabras. Flores grandes tubulosas, solitárias, muito perfumadas, de cor inicialmente violeta e branca após a fecundação, por isso são conhecidas como “ontem-hoje-e-amanhã” (Bertrand *et al.*, 2006). É uma planta nativa do sul e sudeste do Brasil e dos países limítrofes como Bolívia, Peru, Equador e Venezuela. No Brasil, a Mata Atlântica é o principal local de ocorrência dessa espécie (Lorenzi & Moreira, 2001).

Classificação botânica	
Reino	<i>Plantae</i>
Divisão	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliophida</i>
Ordem	<i>Solanales</i>
Família	<i>Solanaceae</i>
Gênero	<i>Brunfelsia</i>
Espécie	<i>Brunfelsia uniflora</i>
Sinônimos^a	<i>Brunfelsia hopeana</i> (Hook.) Benth., <i>Franciscea hopeana</i> Hook., <i>Franciscea uniflora</i> Pohl.

^a DUKE *et al.* (1929)



Figura 6. *Brunfelsia uniflora*

Brunfelsia uniflora apresenta registros de uso medicinal por algumas comunidades nativas. Na medicina popular, suas folhas são empregadas contra artrite, reumatismo, sífilis, picadas de cobra, febre amarela, e ainda como diurética e antitérmica. Há relatos de que a planta seja utilizada como anestésica, abortiva, hipertensiva, laxativa e alucinógena quando utilizadas em altas concentrações (Agra *et al.*, 2007). Suas raízes são usadas ainda como diuréticas e antisifilítica (Costa, 1933). Brandl (1894) isolou a manacina, $C_{22}H_{33}N_6O_{10}$, e manaceína, $C_{15}H_{25}N_2O_9$. Manacina é convertível em manaceína pela ação de determinados microorganismos. A mais marcante atividade fisiológica da manacina é uma ação estimulante dos terminais das placas motoras e de glândulas secretoras. Manaceína provoca resultados muito semelhantes (Brandl, 1894).

Iyer *et al.* (1977) encontrou atividade antiinflamatória no extrato das raízes de *B. hopeana*, assim como também atestou a presença de escopoletina (**2**). Gellert *et al.* (1978) observaram a presença de alcalóides em *Brunfelsia hopeana*, sinônimo botânico de *B. uniflora*. Ainda em 1978, Iyer isolou hopeamina (**6**) do extrato das raízes desta espécie.

Birkner *et al.* (1986) extraíram a hopamidina (**7**) das folhas, caules e raízes, enquanto Ichiki *et al.* (1994) isolaram das cascas das raízes de *B. uniflora*, um derivado da escopoletina, a escopoletina- β -D-xilopiranosil-(1-6)- β -D-glucopiranosídeo (**8**).

Martins *et al.* (2009) observaram a ocorrência de derivados do ácido caféico como, por exemplo, o ácido clorogênico (**5**) assim como a presença de cumarinas através da análise de extratos foliares por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Das raízes de *Brunfelsia hopeana* foram extraídos dois alcalóides manacina (também chamado de francisceína) e brunfelsina, e a cumarina aesculetina (**3**), uma substância fluorescente (Costa, 1933). Estudos desenvolvidos em ratos através da administração oral de extratos aquosos de *B. uniflora*, comprovaram sua atividade analgésica (Bettina *et al.*, 1991).

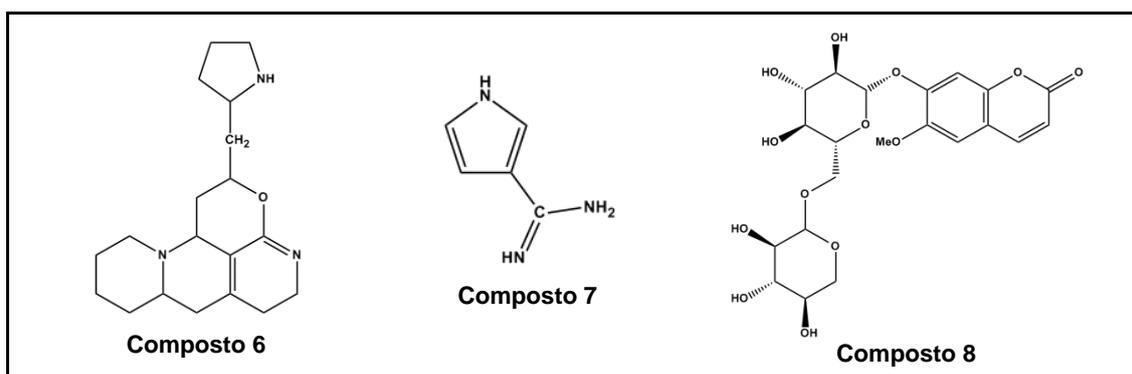


Figura 7. Alguns compostos encontrados em *Brunfelsia uniflora*

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Fazer um estudo sobre os principais métodos para análise de esteróides em plantas e posteriormente realizar uma análise fitoquímica e biológica prévia da espécie vegetal *Brunfelsia uniflora*.

Objetivos Específicos

- 1- Realizar um estudo teórico sobre a biosíntese de esteróides;
- 2- Estabelecer um protocolo de análise reunindo os principais testes para detecção de esteróides em plantas;
- 3- Compilar e organizar didaticamente as constantes físicas e dados espectroscópicos e espectrométricos que auxiliem na identificação dos diferentes fitoesteróides;
- 4- Obter as frações lipofílica e hidrofílica das folhas de *Brunfelsia uniflora* através do particionamento líquido-líquido com solventes de diferentes polaridades;
- 5- Aplicar uma marcha analítica preliminar ao extrato bruto de *Brunfelsia uniflora*;
- 6- Obter o perfil cromatográfico por cromatografia em camada delgada e espectroscopia de infravermelho do extrato bruto e frações obtidas no item 4;
- 7- Monitorar o fracionamento líquido-líquido do extrato bruto de *Brunfelsia uniflora* através de testes biológicos como teste de toxicidade frente à *Artemia salina* e as atividades antioxidante, alelopática e antibacteriana.

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais e reagentes

Os solventes utilizados foram etanol, metanol, acetona, hexano, acetato de etila, n-butanol e ácido acético. Todos obtidos comercialmente. Utilizou-se sulfato de sódio anidro, como sal dessecante (Cromaline). Tween 80 (polioxietilensorbitano monooleato), DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) e reagente de Folin-Ciocalteu foram fornecidos pela Aldrich. Os demais reagentes químicos utilizados na realização da marcha analítica e testes biológicos eram de pureza analítica e foram utilizados sem tratamento prévio.

Para cromatografia em camada delgada analítica foram usadas cromatoplaças de alumínio cobertas com sílica gel 60 em uma camada de 0,2 mm de espessura (Merk). Os reveladores utilizados foram: iodo, soluções reagentes de anisaldeído sulfúrico 5% em metanol, sulfato de cério 2% em ácido sulfúrico 2N e cloreto férrico 5% em etanol.

As sementes de *Lactuca sativa* variedade *Grand rapids* (pureza 100,0 % e germinação 95 %) foram obtidas em lojas agropecuárias. O sal marinho e cistos de *Artemia salina* foram obtidos em loja de aquários.

Os equipamentos utilizados para a realização deste projeto foram os mais diversos, tais como: estufa, rota- evaporador, balança analítica, gabinete revelador cromatográfico com luz ultravioleta, lavadora ultra-sônica, espectrofotômetro UV/VIS PERKIN ELMER Lambda2S e estufa com fotoperíodo. Os espectros de Infravermelho foram analisados em aparelho PERKIN ELMER – FT 16 PC.

4.2 Protocolo de análise de fitoesteróides em extratos vegetais

Para compilação e organização das constantes físicas (ponto de fusão e rotação ótica) e dados espectroscópicos (espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C) e espectrométricos (espectrometria de massas) dos fitoesteróides foram consultadas as seguintes ferramentas de buscas bibliográficas:

- 1) Science direct (<http://www.sciencedirect.com/>);
- 2) Web of Science (<http://www.isiknowledge.com/>);
- 3) SciFinder;
- 4) Dictionary of Organic Compounds;

4.3 Obtenção e particionamento do extrato bruto hidroalcoólico (EBH)

As folhas de *Brunfelsia uniflora* foram coletadas em março de 2009 no bairro Campeche, sul da ilha de Santa Catarina. Após a coleta, o material vegetal foi seco em estufa e triturado obtendo-se uma massa de 228,8g que foi mantido sob maceração exaustiva em álcool etílico 96 % por quinze dias. O extrato bruto hidroalcoólico (EBH) foi filtrado e o solvente evaporado sob pressão reduzida num rotoevaporador a temperatura de aproximadamente 60° C. Após ser concentrado, o EBH foi dissolvido em 1L de etanol 20% onde se obteve um precipitado, denominado de resina (Res), que foi separado por filtração. O filtrado foi particionado com solventes de polaridade crescente rendendo as frações hexânica (FH), acetato de etila (FAe), n-butanólica (FB) e aquosa. A **Figura 8** mostra detalhadamente o fracionamento assim como os respectivos rendimentos.

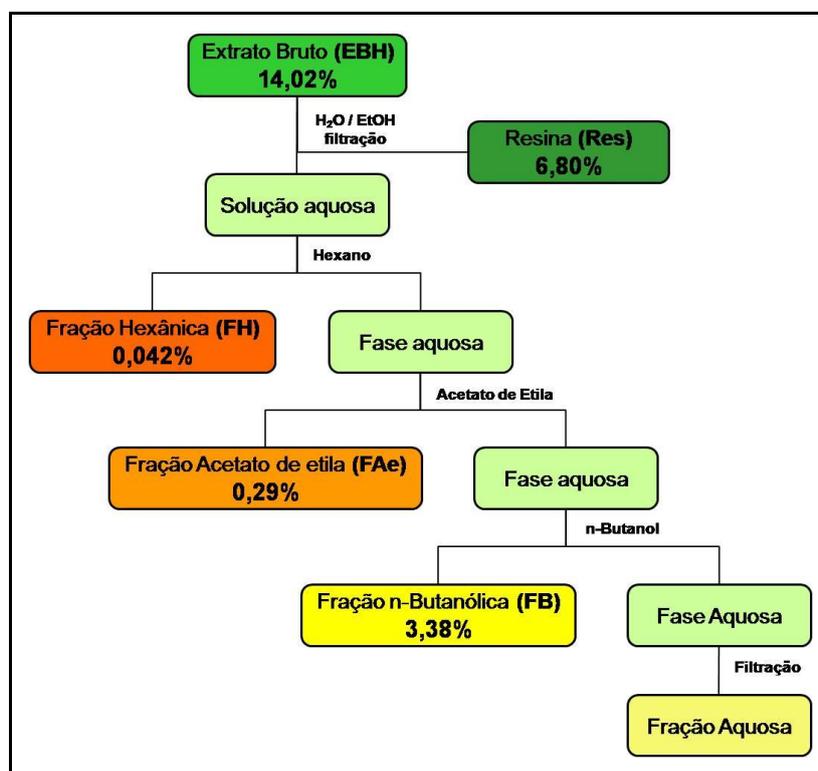


Figura 8. Fluxograma do fracionamento do extrato bruto das folhas de *B. uniflora*

4.4 Análise fitoquímica preliminar do extrato bruto (EBH)

Uma análise do extrato bruto e frações de *B. uniflora* foi feita por cromatografia em camada delgada e espectroscopia de infravermelho a fim de obter o perfil micromolecular dos constituintes químicos presentes nesta espécie.

No extrato bruto foi aplicada uma marcha analítica, conforme preconizado por Matos (1997), para detectar a presença das diferentes classes de metabólitos secundários presentes em plantas. A **Figura 9** mostra um fluxograma resumido da marcha analítica onde os balões em azul representam os testes qualitativos para detectar as respectivas classes de metabólitos.

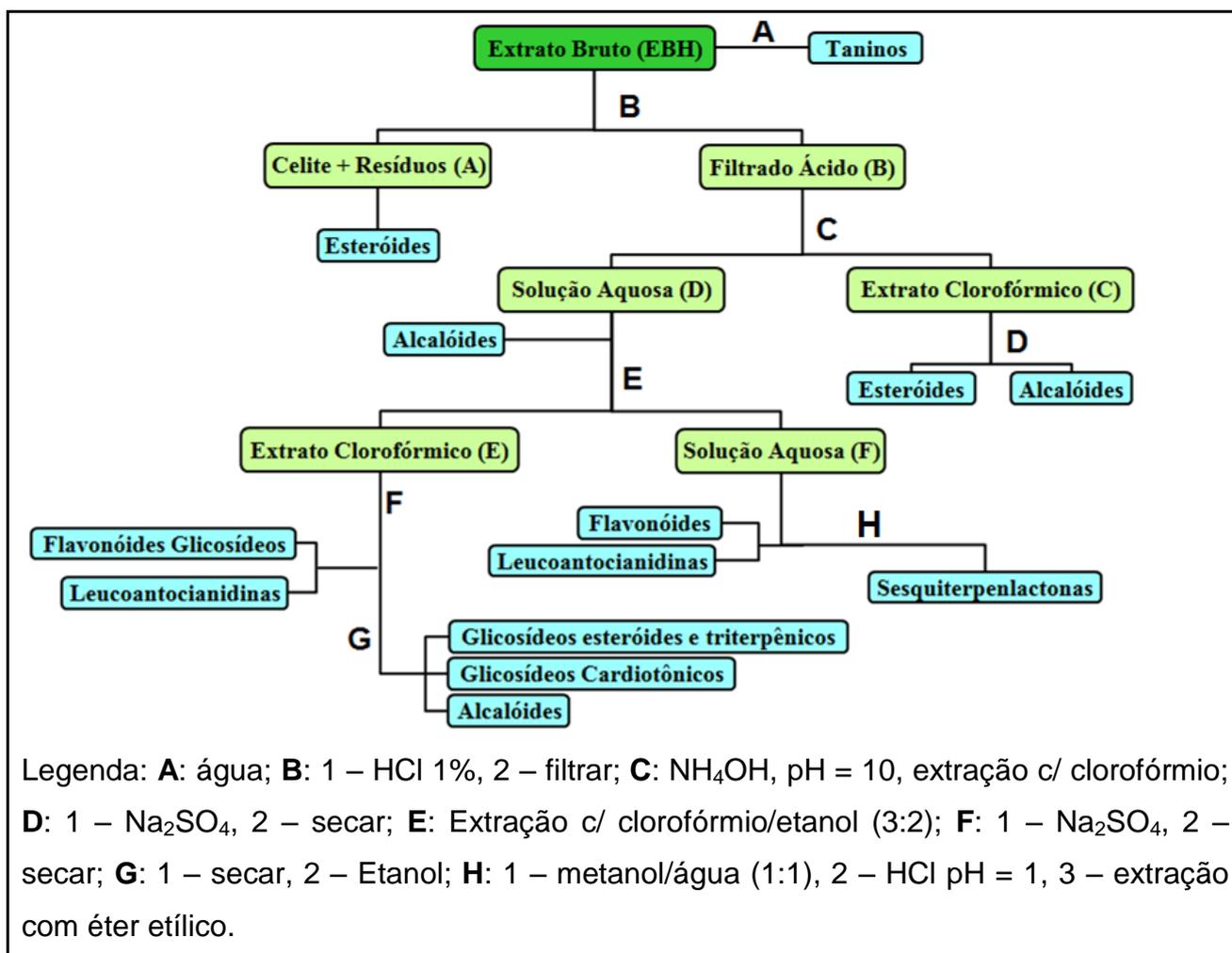


Figura 9. Fluxograma da marcha analítica aplicada ao extrato bruto (EBH) de *B. uniflora*

4.5 Ensaio biológicos

O extrato bruto e frações de *B. uniflora* foram submetidos a ensaios de atividade biológica, dentre eles o teste de toxicidade frente a *A. salina*, testes antioxidantes, teste alelopático e teste antibacteriano. Os testes foram realizados no Laboratório de química de Produtos Naturais deste departamento (LQPN), exceto os experimentos para a determinação da atividade antibacteriana, que foram realizados no laboratório de

Microbiologia Clínica da Universidade Regional de Blumenau, sob a supervisão do Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco.

4.5.1 Teste de toxicidade frente à *Artemia salina*

No teste de letalidade frente à *Artemia salina*, foi utilizada a metodologia de Meyer *et al.* (1982) com algumas modificações. O extrato bruto da planta foi diluído em solvente apropriado (de acordo com a solubilidade da amostra) a fim de se obter uma concentração final de 10.000 ppm. Utilizou-se como meio para o cultivo das larvas de *A. salina* água salgada (19g de sal marinho/L de água) em aquário improvisado no laboratório. As larvas foram utilizadas nos ensaios 48h após a eclosão dos cistos, em fase náuplio. Aproximadamente 10 larvas de *A. salina* foram transferidas para placas de células contendo 1 mL de água salgada e o extrato ou fração a ser testada, em cinco diferentes concentrações (10 a 1000 ppm). Os testes foram feitos em triplicata. A contagem dos animais mortos e vivos foi realizada após 24h. A DL₅₀ foi obtida através do gráfico da % de animais sobreviventes em função do logaritmo da dose testada, com um intervalo de confiança de 95%.

4.5.2 Teste de atividade antioxidante

4.5.2.1 Determinação do conteúdo de fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos foi determinada de acordo com o método descrito por Anagnostopoulou *et al.* (2006) utilizando o reativo de Folin-Ciocalteu. A cada 0,5 mL de uma solução de extrato ou frações (1000 ppm), foram adicionados 5,0 mL de água destilada e 0,25 mL do reativo de Folin-Ciocalteu. Após três minutos foi adicionado 1,0 mL de solução saturada de Na₂CO₃ e a solução foi deixada em repouso por uma hora. As absorbâncias destas soluções foram determinadas em um espectrofotômetro a 725 nm. Como branco utilizou-se uma solução preparada conforme descrito acima, porém sem a presença do extrato vegetal. Um aparecimento da coloração azul-escuro é o indicativo da presença de compostos fenólicos na amostra testada. Foi construída uma curva de calibração com solução padrão de ácido gálico, nas concentrações de 50 a 1000 mg/mL, para comparação ($y = 5,60x - 21,83$; $R^2 = 0,999$). Todos os testes foram realizados em triplicata. O teor de compostos fenólicos totais foi expresso em equivalente de ácido gálico (EAG), ou seja, mg AG / g de amostra (**Figura 10**).

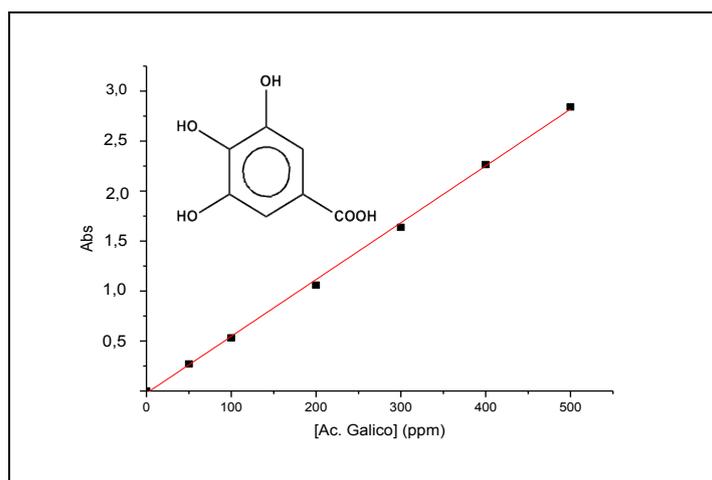


Figura 10. Curva de calibração para a determinação do conteúdo de fenólicos

4.5.2.2 Determinação do conteúdo de flavonóides

A determinação do conteúdo de flavonóides baseia-se no método descrito por Woisky e Salatino (1998). A 0,5 mL da amostra vegetal (1000 ppm) foram adicionados 2,5 mL de etanol e 0,5 mL de uma solução de AlCl_3 2 %. Após uma hora de repouso, foram feitas as leituras das absorvâncias das misturas em um espectrofotômetro UV/VIS a 415 nm. Como branco, foi utilizada uma solução preparada conforme o procedimento acima, sem a adição da solução de AlCl_3 . Um aparecimento de coloração verde fluorescente é indicativo da presença de flavonóides. Foi construída uma curva de calibração com solução de quercetina nas concentrações de 2,5 a 100 mg/mL, para comparação ($y = 10,57x - 2,29$; $R^2 = 0,999$). Os testes foram feitos em triplicata. O teor de flavonóides foi expresso em equivalentes de quercetina (EQ), ou seja, em mg EQ / g de amostra vegetal (Figura 11).

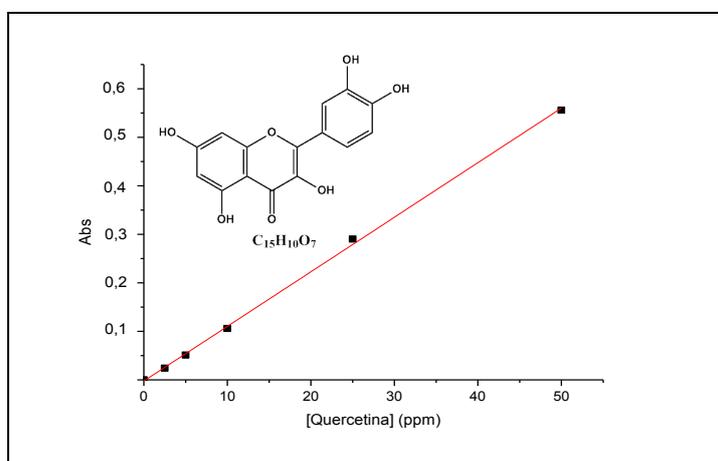


Figura 11. Curva de calibração para determinação do conteúdo de flavonóides

4.5.2.3 Determinação do poder redutor

O ensaio para a análise da atividade antioxidante através da determinação do potencial redutor baseia-se no método de Price e Butler, proposto por Waterman e Mole (1994), com adaptações. Neste teste foram preparadas, em triplicata, misturas reacionais contendo 100 µL de solução de amostra vegetal (1000 ppm), 8,5 mL de água deionizada e 1,0 mL de uma solução de FeCl₃ 0,1 mol.L⁻¹. Após três minutos adicionou-se 1,0 mL de uma solução de ferricianeto de potássio 0,08 mol.L⁻¹ e, após 15 minutos, foram feitas as leituras da absorbâncias das misturas em espectrofotômetro a 720 nm. O aparecimento da cor azul da Prússia é indicativo de potencial redutor. Como branco, foi utilizada uma solução preparada conforme o procedimento acima, sem amostra vegetal. Foi construída uma curva de calibração utilizando solução de ácido ascórbico nas concentrações de 150 a 1000 ppm, para comparação ($y = 2,33x + 39,63$; $R^2 = 0,998$). O potencial redutor das amostras foi expresso em equivalente de ácido ascórbico (EAA), mg AA / g de extrato ou fração (**Figura 12**).

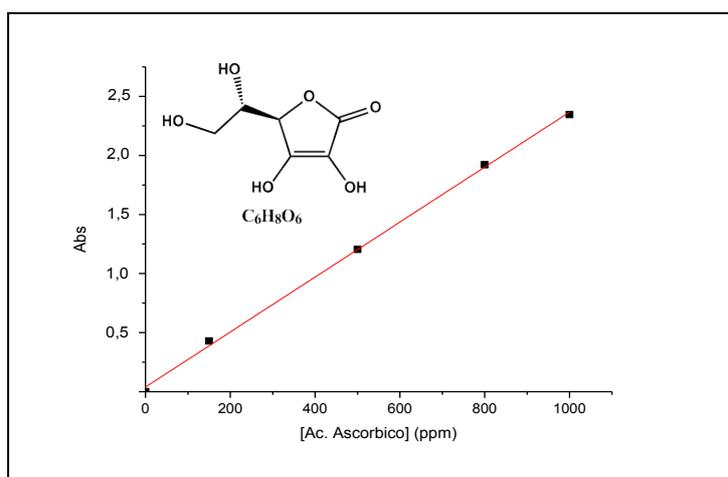


Figura 12. Curva de calibração para determinação do poder redutor

4.5.2.4 Determinação da ação sequestradora do radical livre DPPH

A avaliação da ação sequestradora de radicais livres usando o DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil), baseia-se no método descrito por Cavin *et al.* (1998), com modificações. Uma solução de DPPH 4×10^{-3} % foi adicionada às amostras vegetais nas concentrações de 1 a 200 ppm. A absorbância do DPPH nas soluções foi determinada em um espectrofotômetro a 517 nm após 30 minutos. Através da leitura da absorbância de uma solução de DPPH (2 mL) acrescentado de 1 mL de MeOH, obteve-se a absorbância no

tempo inicial. A cada uma das concentrações da solução teste em análise (1 mL) foram adicionados 2 mL de solução de DPPH, obtendo-se a absorbância de cada amostra nas diferentes concentrações. A absorbância de uma solução teste (1 mL) em metanol (2 mL), foi descontada da absorbância das amostras analisadas, a fim de descontar a possível interferência do extrato nesse comprimento de onda. A análise foi feita em triplicata. Os valores obtidos foram graficados na forma de % de decréscimo da absorbância de DPPH em função da concentração da solução teste, onde se determinou a concentração necessária para diminuir em 50% a absorbância do DPPH, ou seja, a concentração efetiva 50 % (CE₅₀), conforme mostra o exemplo da determinação da CE₅₀ da fração acetato de etila (**Figura 13**).

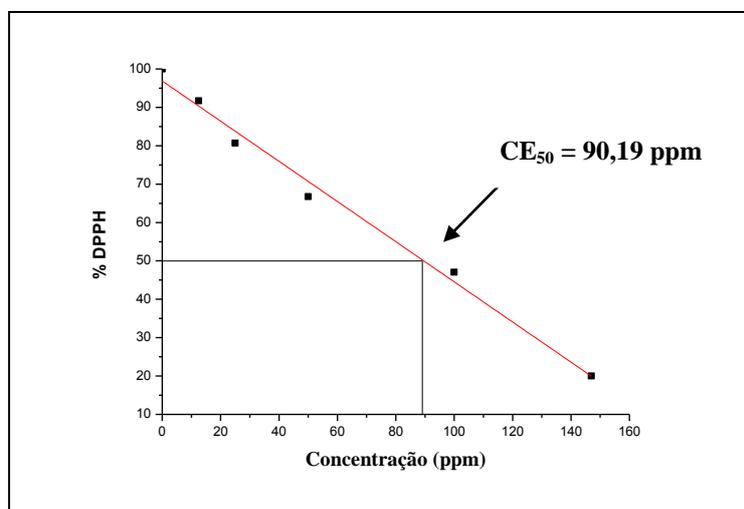


Figura 13. Determinação CE₅₀ da fração acetato de etila de *B. uniflora*

4.5.3 Alelopatia

O teste alelopático tem como propósito avaliar a germinação de sementes e o desenvolvimento da plântula. Estes bioensaios foram realizados conforme metodologia utilizada por Nishimura *et al.* (1984). Em placas de Petri foram colocados discos de papel-filtro Whatmann n^o 1 (5,0 cm de diâmetro), impregnados com 1,0 mL de solução da amostra vegetal nas concentrações de 0,25 a 2,0 % (m/v). Após a evaporação do solvente, adicionou-se 1,0 mL de Tween 80 (100 ppm). As placas com o papel impregnado foi deixado em repouso por 24h. Em seguida, cada disco de papel recebeu 25 sementes de *Lactuca sativa* (alface), distribuídas aleatoriamente. O teste foi feito em triplicata para cada concentração de amostra vegetal. Como controle negativo foi utilizado procedimento similar, porém sem a adição de amostra vegetal. A germinação das sementes foi conduzida em estufa com fotoperíodo (12h claro / 12h escuro) a 25°C. Como

critério de germinação foi estabelecido a protusão radicular. Os discos de papel filtro foram mantidos úmidos por meio de regas diárias com água destilada. As leituras das sementes germinadas foram diárias e o experimento foi considerado concluído quando a germinação foi nula por três contagens consecutivas, ou seja, após cinco dias. Após o término do experimento foram feitas as medidas do comprimento da radícula e do hipocótilo (ou caulículo) de cinco plântulas por placa utilizando-se papel milimetrado. Os dados obtidos para os extratos em diferentes concentrações foram sempre comparados com o controle negativo (testemunha). O tratamento estatístico segue o modelo ANOVA – O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com três repetições cada. Os dados foram submetidos à análise de variância. Em um nível de confiança de 1%, se o coeficiente de Fisher (F) calculado for maior que o tabelado, então a variação dos parâmetros avaliados é significativa (Vieira, 1989).

4.5.4 Determinação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi avaliada através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM). As amostras vegetais foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) para se ter soluções-mãe contendo 50 mg/mL. Posteriormente foram realizadas diluições seriadas em caldo nutritivo, Brain Heart Infusion (BHI), produzindo concentrações variando de 25 mg/mL a 1,5 µg/mL, distribuídas em volumes de 100 µL em cada poço da placa de microdiluição estéril. Utilizaram-se neste teste os microorganismos *Staphylococcus aureus* – ATCC – 6538 (coco Gram positivo), *Escherichia coli* – ATCC – 25922 (bacilo Gram negativo) e *Pseudomonas aeruginosa* (bacilo Gram negativo) e *Bacillus cereus* – ATCC – 11778 (bacilo Gram positivo). Os experimentos foram realizados em triplicata e as placas incubadas em aerobiose a 36°C ± 1°C por 24h. Após esta incubação inicial, a cada micropoço da placa, adicionaram-se 10 µL de cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazolio 5% (v/v) em metanol, conforme recomendado pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Em seguida, realizou-se outra incubação em aerobiose por 30 minutos à temperatura de 36°C ± 1°C, onde foi possível verificar a mudança de coloração para vermelho nos micropoços onde houve crescimento de bactérias, ou seja, onde os extratos ou frações não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano. Então, a concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada como sendo a menor concentração de extrato ou fração onde não se observou o crescimento bacteriano. Para a classificação da atividade antibacteriana, foi utilizado o critério proposto por Machado e colaboradores (2005).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise de fitoesteróides em extratos vegetais

O isolamento e estudo de substâncias naturais têm sido uma preocupação central das ciências químicas e biológicas por mais de duzentos anos. O *Dictionary of Natural Products* e seus quatro suplementos descrevem dados químicos, estruturais e bibliográficos para mais de cem mil produtos naturais e substâncias relacionadas (Buckingham, 1993; Buckingham *et al.*, 1995; Buckingham *et al.*, 1996; Thompson. Roberts, 1997; Buckingham *et al.*, 1998).

Moreau, Whitaker e Hicks (2002) citam que, atualmente, há mais de 200 tipos de esteróides identificados. Os mesmos são distribuídos em três categorias: 4-desmetilesteróis, 4-monometilesteróis e 4,4-dimetilesteróis (IFST, 2009). Embora comumente agrupados como fitosteróis, na realidade há os esteróis, com uma dupla ligação no C5 e os estanóis, que são esteróides saturados na posição 5 α , bem menos abundante (Law, 2000; Jones *et al.*, 2000). Os fitoesteróis mais encontrados são os 4-desmetilesteróis como o β -sitosterol (**9**), o mais abundante, estigmasterol (**10**), campesterol (**11**) e brassicasterol (**12**) (IFST, 2009; Law, 2000; Lichtenstein; Deckelbaum, 2001; Jones *et al.*, 2000; Plat; Mensink, 2001) (**Figura 14**).

Várias ações terapêuticas dos fitosteróis vêm sendo estudadas nos últimos anos (The Peanut Institute, 2000; Bouic; Lamprecht, 1999). A abordagem mais frequente refere-se ao efeito indireto dos fitoesteróis na redução das doenças cardíacas, através da diminuição dos níveis plasmáticos de colesterol total e LDL – colesterol (National Cholesterol Education Program, 2001). Ações imunomoduladoras ao nível celular também vêm sendo exploradas, além de possíveis propriedades cosméticas em pele e cabelos e melhora sintomática da hiperplasia prostática benigna (De Stefani *et al.*, 2000; Klippel; Hiltl; Schipp, 1997; Prager *et al.*, 2002). Dentre as atividades citadas, seus efeitos hipocolesterolemiantes têm sido amplamente comprovados, inclusive com mecanismo de ação mais elucidado e definição de doses terapêuticas (National Cholesterol Education Program, 2001).

Fitoesteróis, como componentes naturais dos óleos vegetais, têm recebido atenção especial devido à sua capacidade de baixar os níveis séricos de colesterol em humanos (Hicks & Moreau, 2001; Jones, MacDougall, Ntanios, & Vanstone, 1997), resultando em redução significativa do risco de doenças cardíacas. A sua inclusão em produtos comerciais destinados para esse fim, como a margarina Becel pró-active[®] (Becel, 2009),

ratifica sua importância. No entanto, fitoesteróis também são considerados importantes por terem atividades anti-inflamatória, antibacteriana, antiulcerativa e antitumoral (Beveridge, Li, & Drover, 2002).

Os fitoesteróides possuem o sistema tetracíclico do ciclopentanoperidrofenantreno possuindo orientação *trans* entre os anéis A–B, B–C e C–D e geralmente com uma insaturação em C5. Em quase todos os produtos naturais os substituintes em C9–C10 e C8–C14 se encontram orientados *trans*. A maioria deles possui a hidroxila do C3 orientado β , assim como sua cadeia lateral (**R**). O núcleo esteroidal apresenta sete centros estereogênicos sendo que muitos dos estereoisômeros não podem existir por limitações estéricas (**Figura 14**).

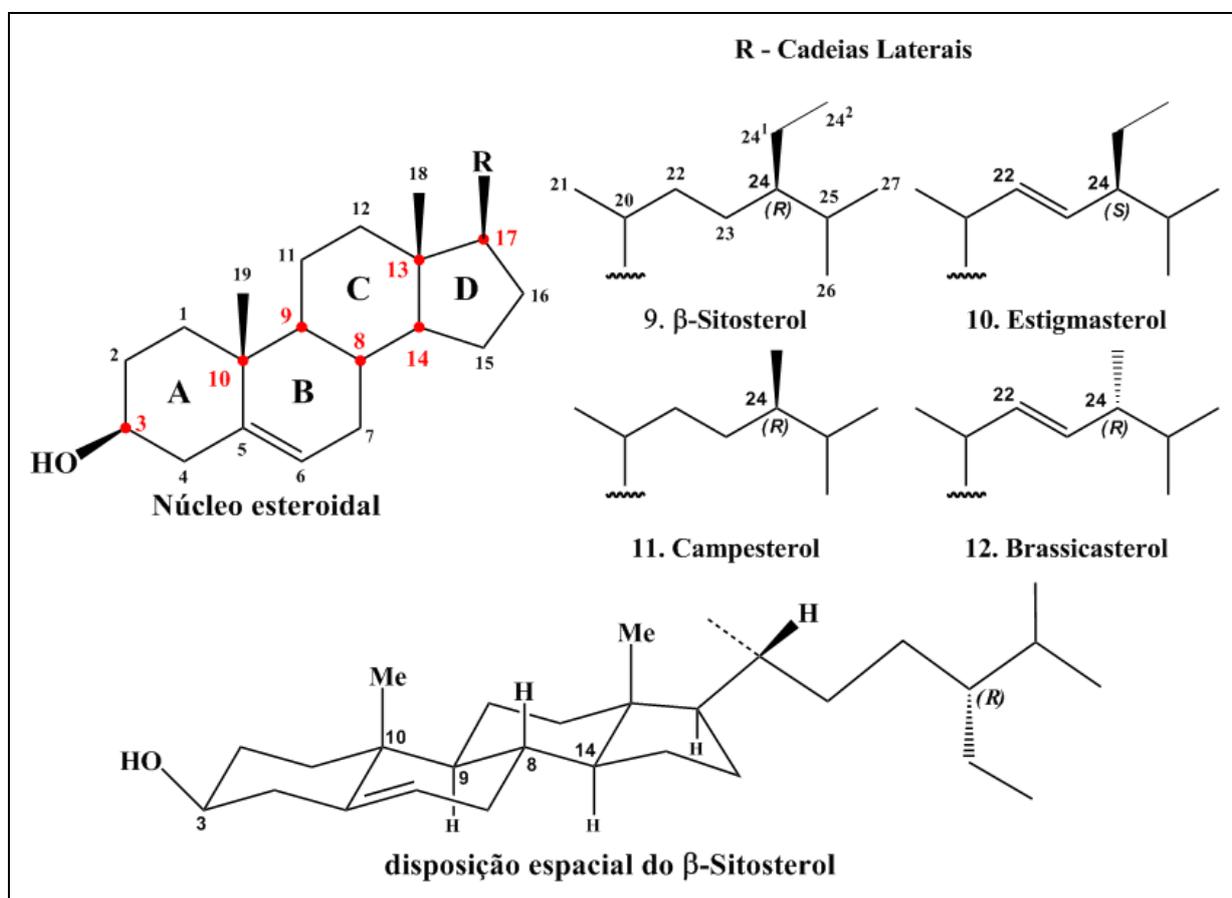


Figura 14. Representação da estereoquímica dos principais fitoesteróides

A análise dos compostos naturais é iniciada pela medida das constantes físicas como: ponto de fusão e atividade óptica, entre outras com posterior comparação com a literatura. Os dados para os principais fitoesteróides encontram-se na **Tabela 1**.

Tabela 1. Dados de constantes físicas dos principais fitoesteróides

Nome	pf / °C	$[\alpha]_D$
β -Sitosterol	137 ^(a) 136 – 137 ^(b)	$[\alpha]_D^{22} = - 35^\circ$ (CHCl ₃) ^(b)
Estigmasterol	170 ^(a)	$[\alpha]_D = - 42,9^\circ$ (CHCl ₃) ^(e)
Campesterol	157,5 ^(a) 157 – 158 ^(d)	$[\alpha]_D^{20} = - 34^\circ$ (CHCl ₃) ^(d)
Brassicasterol	157–158 ^(b) 149–151 ^(c)	$[\alpha]_D^{19} = - 39,4^\circ$ (CHCl ₃) ^(b)

^(a) Lide, 2006; ^(b) Buckingham, 1998; ^(c) Thompson et al., 1972;

^(d) Zhang et al., 2006; ^(e) Wei-Yu et al., 2003.

O principal teste analítico para detecção de esteróides em plantas é a prova de Liebermann-Burchard, que consiste no tratamento da amostra com anidrido acético em presença de ácido acético e algumas gotas de ácido sulfúrico ocorrendo a desidratação seguida de oxidação do sistema de anéis do ciclopentanoperidrofenantreno formando um esteróide aromático que é evidenciada pelo aparecimento de uma coloração azul-esverdeada (Burke, 1974; Xiong, 2007) (**Figura 15**).

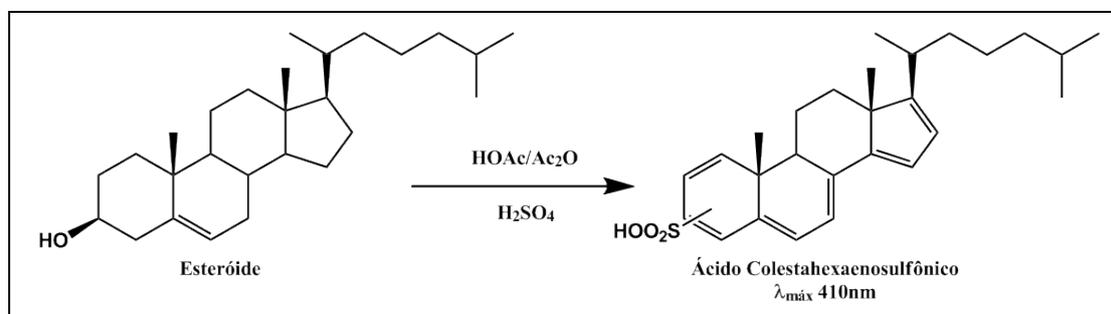


Figura 15. Reação de Liebermann-Burchard, detecção de esteróides

A técnica de cromatografia tem simplificado a caracterização e separação cromatográfica dos esteróides. Como adsorventes tem se utilizado sílica gel ou alumina misturada a 10-20% de nitrato de prata para melhorar a resolução na separação de misturas de esteróides. Os agentes cromogênicos normalmente usados em cromatografia em camada delgada são sulfato de cério, iodo e o reagente de Liebermann-Buchard. Também se utiliza a observação visual com luz ultravioleta de placas previamente tratadas com substâncias inorgânicas fluorescentes (Dominguez, 1973; Matos, 1997; Collins, 1990).

A espectroscopia de infravermelho é um método de análise que fornece informações quanto aos grupos funcionais dos compostos. Os esteróides exibem uma banda intensa e larga de absorção em torno de 3400 cm^{-1} característica do estiramento da ligação O–H, uma banda intensa em $2960\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$ correspondentes a estiramentos de C–H. Os estiramentos C=C aparecem em $1680\text{--}1620\text{ cm}^{-1}$. Considerando os esteróides mais comumente mencionados, quase não se nota diferença entre seus espectros de infravermelho, exceto numa maior intensidade na banda referente à dupla ligação para os que possuem insaturação em C22. O espectro de infravermelho do β -sitosterol é mostrado na **Figura 16**.

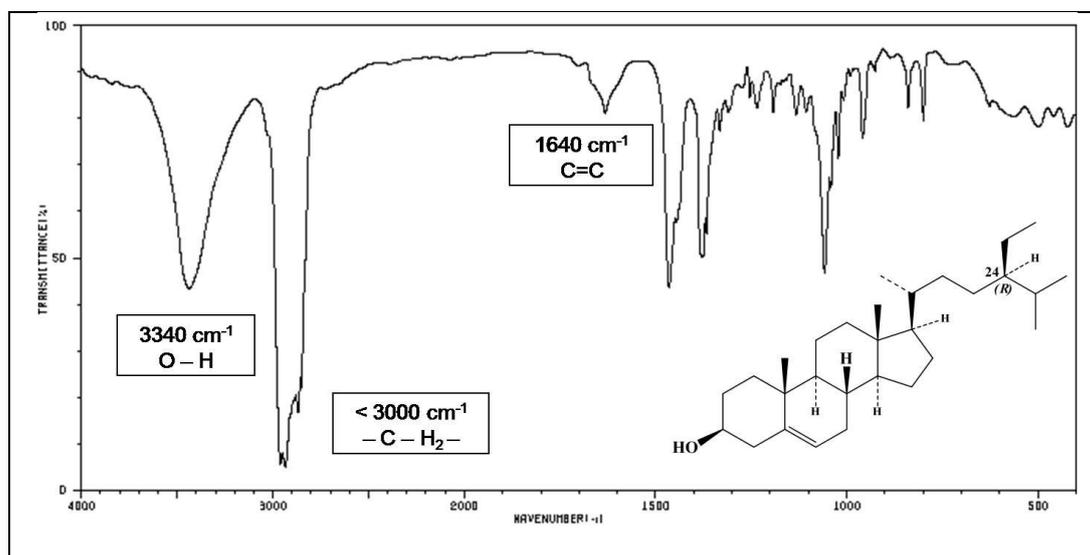


Figura 16. Espectro de infravermelho do β -sitosterol em pastilha de KBr (Weng *et al.*, 2003)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear, tanto de ^1H quanto de ^{13}C , indica a disposição do esqueleto hidrocarbônico, ou seja, as diferentes situações de ambientes químicos dos átomos de hidrogênio e carbono na estrutura. É muito utilizado na elucidação estrutural de esteróides devido à regularidade nos deslocamentos químicos das metilas angulares C18 e C19. Pode-se usar a Ressonância Magnética Nuclear ainda para observar os diferentes hidrogênios e carbonos que participam de duplas ligações com diferentes graus de substituição em distintas posições da molécula através da determinação de constantes de acoplamento e para observar o hidrogênio carbinólico ligado ao C3, que apresenta um multiplete nos esteróides, mas um duplo duplete em triterpenos devido à presença das duas metilas ligadas ao C4.

Tendo em vista que o núcleo básico é o mesmo para os principais esteróides, proveniente da biosíntese, o espectro de RMN tanto de ^1H quanto de ^{13}C apresenta sinais característicos atribuídos ao carbono carbinólico (C3), às metilas angulares e aos

carbonos da dupla ligação em C5–C6. No espectro de RMN de ^1H é esperada uma grande quantidade de sinais em campo alto devido à sua cadeia hidrocarbonada e um multiplete próximo de 3,5 ppm referente ao hidrogênio ligado ao carbono carbinólico. Hidrogênios de ligações duplas são observados pela presença dos sinais entre 5,1-5,3 ppm. No espectro de RMN de ^{13}C podem-se diferenciar os quatro principais fitoesteróides: (β -sitosterol (**9**), estigmasterol (**10**), campesterol (**11**) e brassicasterol (**12**), **Figura 14**), pela presença dos sinais dos carbonos (28 ou 29) e a presença ou ausência da ligação dupla em C22, na cadeia lateral. A **Figura 17** mostra os espectros de RMN ^1H e de ^{13}C do β -sitosterol e a **Tabela 2** mostra os valores de deslocamentos químicos para os principais fitoesteróides.

Tabela 2. Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C para os principais fitoesteróides

C	β - Sitosterol		Estigmasterol		Campesterol		Brassicasterol	
	^{13}C (a)	^1H (b)	^{13}C (c)	^1H (c)	^{13}C (d)	^1H (b)	^{13}C (d)	^1H (e)
01	37,3		37,6		37,31		37,36	
02	31,6		31,9		31,57		31,69	
03	71,8	3,51 (1H, m)	72,0	3,51 (1H, m) ^(h)	71,69	3,53 (1H, m)	71,76	
04	42,3		42,5		42,25		42,30	
05	140,8	(m)	140,8	(m)	140,76	(m)	140,79	(m)
06	121,7	5,34 (1H, br d)	121,8	5,34 (1H, m) ⁽ⁱ⁾	121,59	5,35 (1H, br d)	121,60	(m)
07	32,1		32,1		31,92		31,97	
08	32,1		32,2		31,92		31,97	
09	50,2		50,5		50,17		50,27	
10	36,5		36,5		36,51		36,58	
11	21,1		21,2		21,11		21,13	
12	39,8		40,0		39,81		39,77	
13	42,3		42,2		42,33		42,35	
14	56,8		57,1		56,79		56,96	
15	24,3		24,5		24,32		24,39	
16	28,3		28,9		28,26		28,58	
17	56,1		56,3		56,11		56,06	
18	12,0	0,68 (3H, s)	12,2	0,70 (3H, s)	11,87	0,68 (3H, s)	12,09	0,69 (3H, s)
19	19,1	1,00 (3H, s)	19,5	1,01 (3H, s)	19,40	1,01 (3H, s)	19,42	1,01 (3H, s)
20	36,2		40,4		36,17		40,24	
21	18,8	0,92 (3H, d) ^(f)	21,4		18,82	0,91 (3H, d) ^(f)	21,06	
22	34,0	(m)	138,3	5,17 (1H, dd) ^(j)	33,95	(m)	135,83	5,19 (2H, m) ^(l)
23	26,2	(m)	129,7	5,04 (1H, dd) ^(k)	26,13	(m)	131,76	(m)
24	45,2		51,5		45,85		42,90	
25	29,2		32,2		29,18		33,16	
26	18,9	0,83 (3H, d) ^(g)	21,2		19,84	0,85 (3H, d) ^(f)	20,02	0,82 (3H, d) ^(l)
27	19,1	0,80 (3H, d) ^(g)	19,2		19,07	0,80 (3H, d) ^(f)	19,69	0,83 (3H, d) ^(l)
28	23,1		25,4		23,09		17,68	0,90 (3H, d) ^(l)
29	11,9		12,2					

(a) Kovganko, 2000; (b) Zhang et al., 2006; (c) Forgo & Kövér, 2004; (d) Wright et al., 1978; (e) Thompson et al., 1972; (f) $J=6,5$ Hz; (g) $J=6,6$ Hz; (h) $J_{3\alpha,4\alpha}=4,8$ Hz e $J_{3\alpha,4\beta}=11,2$ Hz (i) $J_{6,7\beta}=5,3$ Hz e $J_{6,7\alpha}=1,9$ Hz; (j) $J=15,2$ Hz; (k) $J=8,6$ Hz; (l) $J=7,0$ Hz; (m) não encontrado.

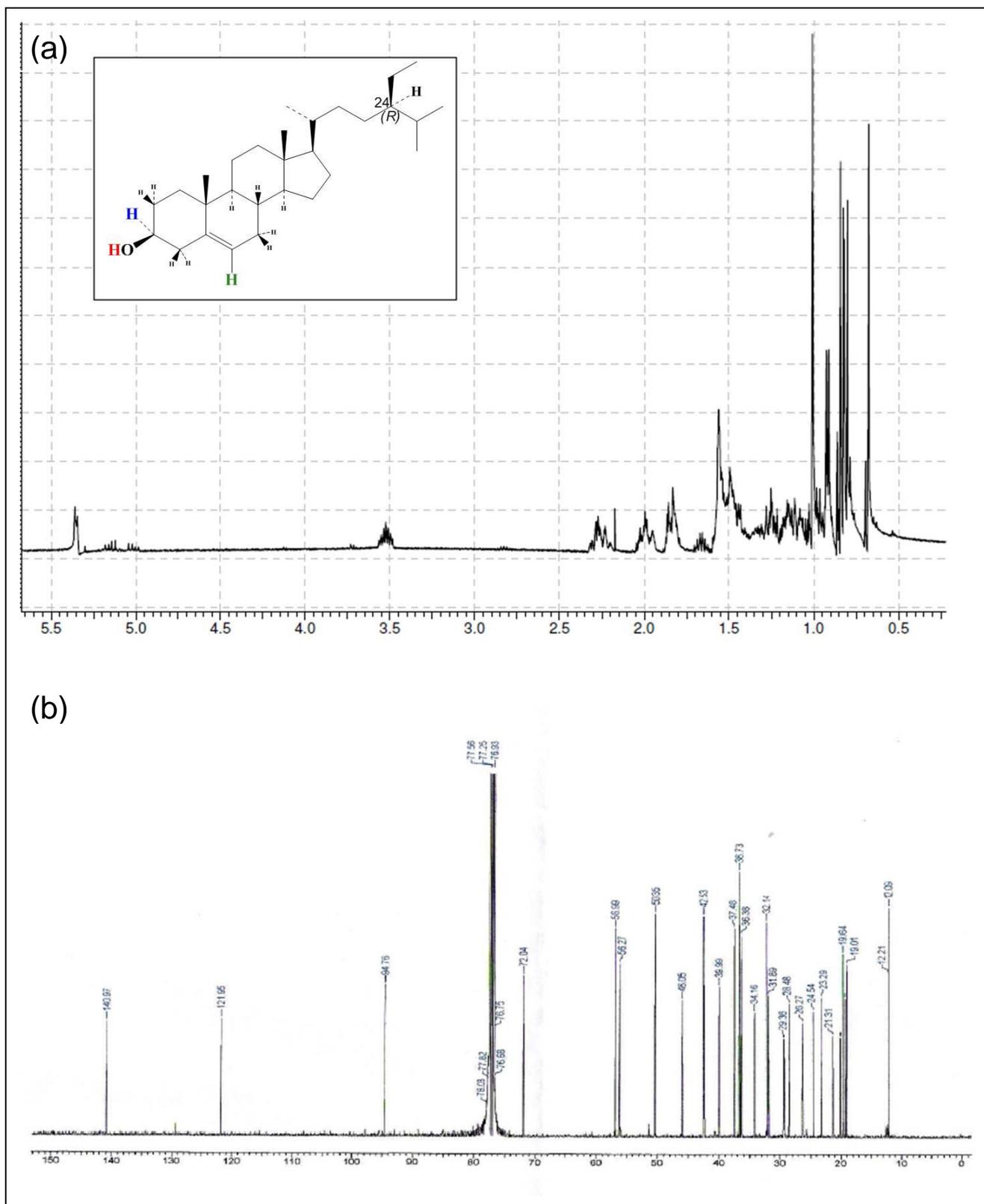


Figura 17. Espectros de RMN do β -sitosterol. RMN de (a) ^1H e (b) ^{13}C . (Dalmarco, 2009)

A espectrometria de massas, além de fornecer dados que permitem determinar a fórmula molecular, pode contribuir na elucidação estrutural através de padrões de fragmentação inerente às diferentes funções orgânicas. Nos fitoesteróides, o impacto de

elétrons promove a clivagem da ligação C17–C20 produzindo o fragmento ($M^+ - R = 273$) (**Tabela 3**). Além disso, pode haver a clivagem no anel **D** formando um fragmento composto pelos átomos C15, C16 e C17 do anel **D** juntamente com a cadeia lateral R ($M^+ - 42 - R$), comumente o pico base. A clivagem da ligação C3–OH provoca a eliminação de água ($M^+ - 18$). Também podem ocorrer fragmentações sucessivas, por exemplo, perda da cadeia lateral e de água ($M^+ - R - 18$). O estigmasterol e o brassicasterol apresentam também um pico intenso em m/z 217, correspondente à perda da cadeia lateral juntamente com dois átomos de hidrogênio do núcleo esteroidal após um rearranjo do íon molecular (Tökes *et al.*, 1968; Ericsson & Ivonne, 2009; Darnet & Rahier, 2004; Dominguez, 1973; Wyllie *et al.*, 1967). A **Tabela 3** mostra os sinais das massas referentes às fragmentações mais importantes dos fitoesteróides e a **Figura 18** mostra o espectro do mais abundante dos fitoesteróides, o β -sitosterol.

Tabela 3. Dados espectrais de massas referentes às fragmentações dos principais fitoesteróides

Nome	Massas dos principais fragmentos (EI, 70 eV), m/z (I_{rel} , %)
β -Sitosterol ^(a)	414*, 396($M^+ - 18$), 273($M^+ - 141$), 255($M^+ - 141 - 18$), 231($M^+ - 42 - 141$), 213($M^+ - 42 - 141 - 18$)
Estigmasterol ^(a)	412*, 394($M^+ - 18$), 273($M^+ - 139$), 271 ($M^+ - 139 - 2H$); 255($M^+ - 139 - 18$), 231($M^+ - 42 - 139$), 213($M^+ - 42 - 139 - 18$)
Campesterol ^(a)	400*, 382($M^+ - 18$), 273($M^+ - 127$), 255($M^+ - 127 - 18$), 231($M^+ - 42 - 127$), 213($M^+ - 42 - 127 - 18$)
Brassicasterol ^(b)	398*, 380($M^+ - 18$), 273($M^+ - 125$), 271 ($M^+ - 125 - 2H$); 255($M^+ - 125 - 18$), 231($M^+ - 42 - 125$), 213($M^+ - 42 - 125 - 18$)

(a) Darnet & Rahier, 2004; (b) Ericsson & Ivonne, 2009. * íon molecular (M^+).

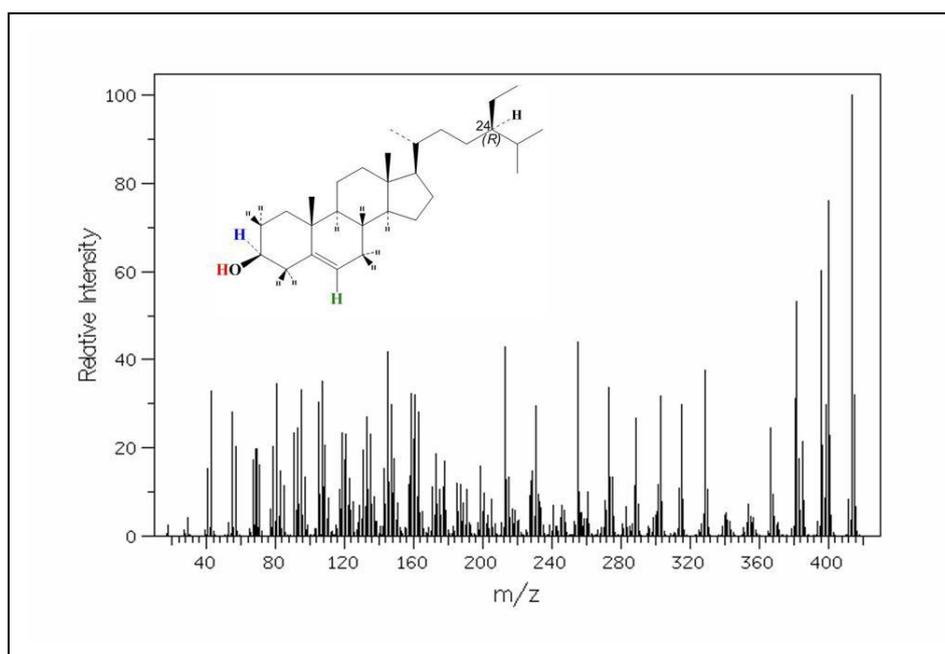


Figura 18. Espectro de massas do β -sitosterol (Weng *et al.*, 2003)

5.2 Estudos fitoquímico e biológico de *Brunfelsia uniflora*

Com o objetivo de traçar o perfil micromolecular do extrato e frações das folhas de *B. uniflora* foram feitas análises através da aplicação de uma marcha analítica, de análises por espectroscopia de infravermelho (IV) e análises por cromatografia em camada delgada. Da mesma maneira, o perfil biológico foi avaliado através de testes que determinam a atividade antioxidante, alelopática, antibacteriano e de toxicidade frente a *A. salina*.

5.2.1 Análise fitoquímica preliminar

Quando não se dispõe de estudos químicos prévios sobre a espécie de interesse, a análise fitoquímica preliminar pode indicar os grupos de metabólitos secundários relevantes. Sua aplicação se faz necessária no caso de misturas muito complexas como costumam ser, muitas vezes, os extratos de plantas. É também útil no exame preliminar destes extratos como método de prospecção dos constituintes mais abundantes ou mais facilmente caracterizáveis.

A separação dos constituintes em grupos de substâncias análogas ou homólogas é baseada nas propriedades destes compostos relacionados com suas funções químicas. A análise fitoquímica preliminar do extrato bruto de *B. uniflora*, revelou as classes de compostos apresentados na **Tabela 4**:

Tabela 4. Análise fitoquímica preliminar do extrato bruto hidroalcoólico de *B. uniflora*

Testes	Resultado
Esteróides	+
Esteróides glicosídeos	-
Flavonóides	-
Flavonóides glicosídeos	-
Alcalóides	-
Leucocianidinas	-
Glicosídeos Cardiotônicos	-
Sesquiterpenlactonas	-
Taninos	+

5.2.2 Análise através de espectroscopia de infravermelho (IV)

A análise do espectro de IV do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) de *B. uniflora* mostrou a presença de bandas intensas na região de 2826,6 e 2854,4 cm^{-1} características de estiramento de ligações C–H de carbono sp^3 , indicando a presença de compostos com uma longa cadeia hidrocarbonada. Além disso, o sinal em 3009,7 cm^{-1} sugere a presença de insaturação nesta cadeia. Observou-se ainda em 1739,6 cm^{-1} a presença de uma banda intensa correspondente a vibração da ligação C=O, típica de carbonila de éster que, juntamente com as absorções em 1162 e 1077,2 cm^{-1} para os estiramentos das ligações C–O conjugada e C–O isolada respectivamente, permite propor a presença de ésteres de ácidos graxos de cadeia longa ou estruturas triterpênicas (**Figura 19**).

Os espectros de IV da resina e fração hexânica (**Figuras 20 e 21**) mostram o mesmo perfil que o espectro do extrato bruto, indicando que nestas frações temos ainda composição semelhante em termos de classes de metabólitos secundários.

A fração acetato de etila (**Figura 22**) mostrou a presença de uma intensa banda em 3304,1 cm^{-1} devido a presença de grupo –OH que, juntamente com a banda intensa em 1162 e 1077,2 cm^{-1} , sugerem a presença de estruturas polihidroxiladas. Observa-se ainda a presença de bandas de absorção em 2932,5 e 2877,6 cm^{-1} correspondentes ao estiramento de ligação C–H e de bandas em 1713,6 e 1640 cm^{-1} correspondentes a carbonila de cetona e carbonila conjugada, respectivamente.

A fração n-butanólica (**Figura 23**) mostra, através de seu espectro de IV, um perfil de substâncias flavonóidicas com bandas de absorção intensas em 3390,6; 1630,7 e 1070,3 cm^{-1} correspondentes a estiramento de ligações –OH, C=O e C–O, respectivamente.

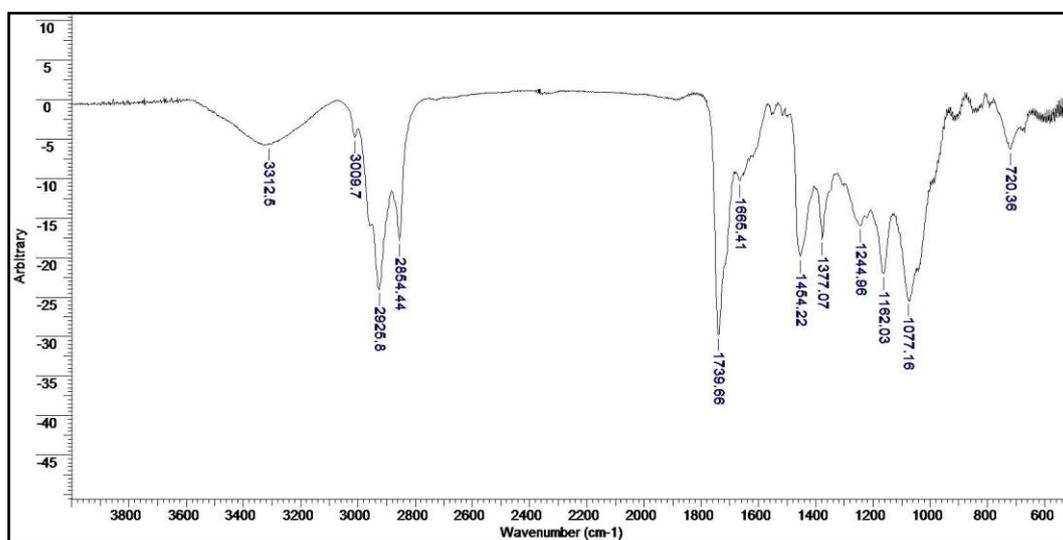


Figura 19. Espectro de IV do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) de *B. uniflora*

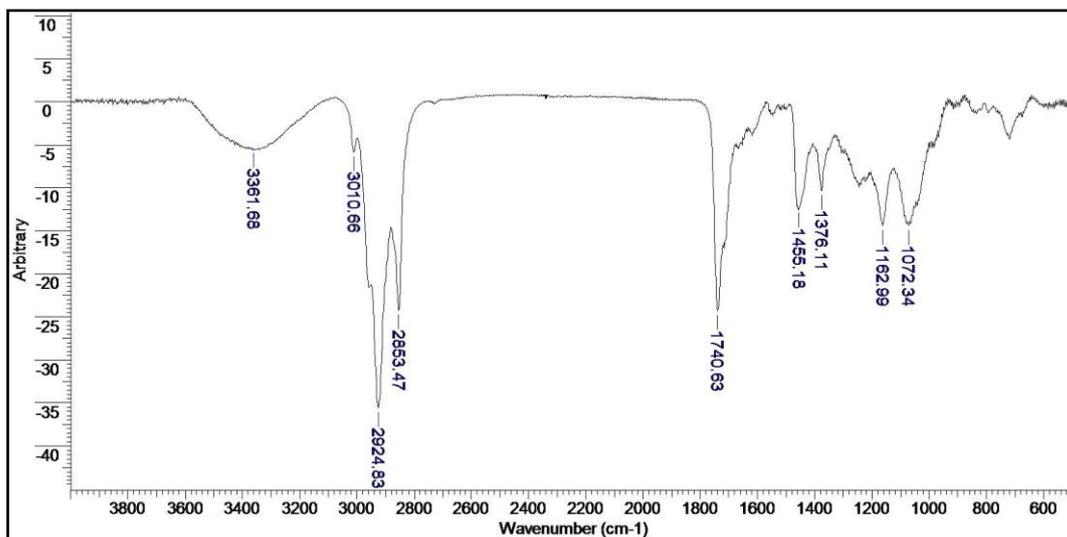


Figura 20. Espectro de IV da Resina (Res) *B. uniflora*

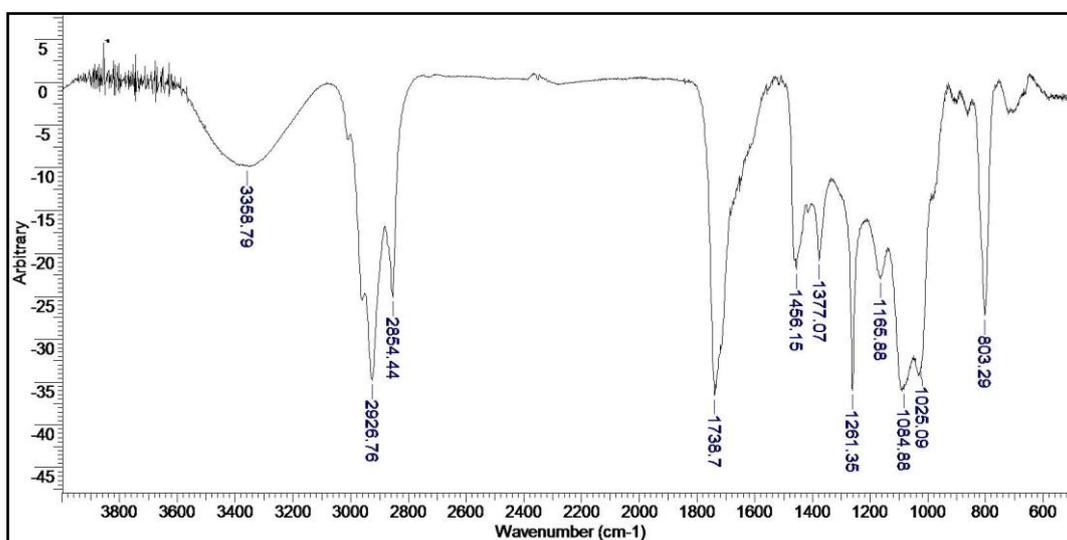


Figura 21. Espectro de IV da fração hexânica (FH) de *B. uniflora*

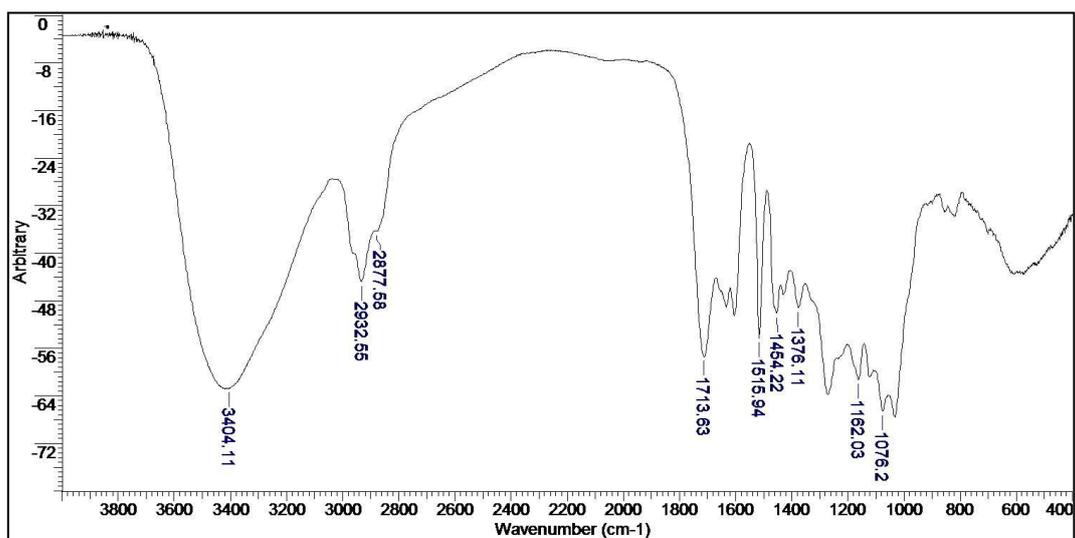


Figura 22. Espectro de IV da fração acetato de etila (FAe) de *B. uniflora*

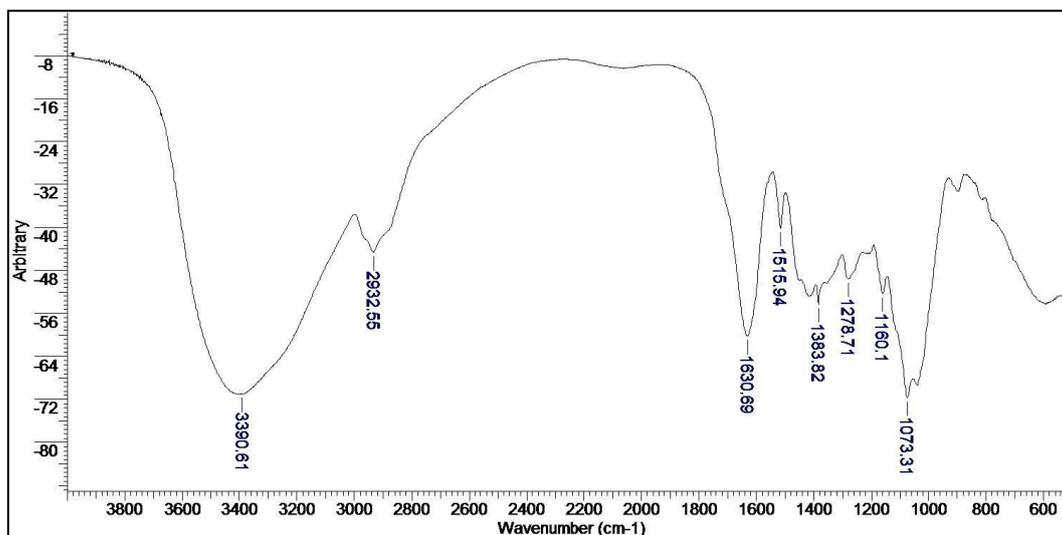


Figura 23. Espectro de IV da fração n-butanólica (FB) de *B. uniflora*

5.2.3 Análise através de cromatografia em camada delgada (CCD)

A análise do cromatograma (a) com manchas definidamente deslocadas indica novamente a baixa polaridade dos metabólitos analisados no extrato bruto (EBH), resina (Res) e fração hexânica (FH) (**Figura 24a**). O cromatograma (b) compara a polaridade dos compostos existentes no extrato bruto e nas frações mais polares (FAe e FB). Uma das manchas existente no extrato bruto é muito similar àquela apresentada na fração acetato de etila (FAe). A fração butanólica (FB) apresenta manchas com R_fs menores representando substâncias com maior polaridade (**Figura 24b**).

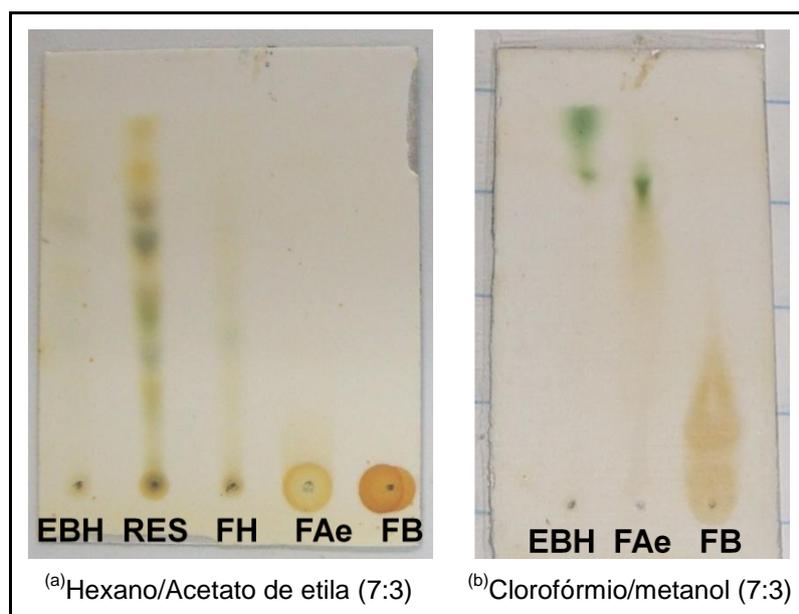


Figura 24. Cromatograma do extrato bruto (EBH) e frações de *B. uniflora* reveladas com vapor de iodo

5.2.4 Avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina*

Os ensaios de letalidade utilizando o microcrustáceo *Artemia salina* são amplamente usados como técnica de triagem para verificar a atividade biológica de toxinas naturais (Mohamed *et al.*, 2006; Baig *et al.*, 2006) e de extratos vegetais e seus compostos isolados (Luna *et al.*, 2005). As amostras vegetais são colocadas em incubação durante 24 horas com a larva do microcrustáceo e, após este período, conta-se o número de sobreviventes. Várias atividades biológicas podem estar relacionadas a este bioensaio, pois parte-se da premissa de que os compostos tóxicos podem ser potencialmente ativos em relação à dose (Meyer *et al.*, 1982). Existe boa correlação deste bioensaio com a atividade citotóxica *in vitro*, atividade larvicida e inseticida (McLaughlin *et al.*, 1991).

Através deste bioensaio são considerados ativos os extratos ou frações que apresentam valores da DL₅₀ de até 1000 µg/mL. No entanto, nenhuma das amostras apresentou toxicidade frente às larvas de *Artemia salina*, pois apresentaram valores de DL₅₀ maiores que 1000 µg/mL.

5.2.5 Avaliação da atividade antioxidante

Os antioxidantes são substâncias que, numa concentração menor que o substrato oxidável, retardam o processo oxidativo diminuindo a velocidade da reação ou prolongando o seu período de indução (Halliwell *et al.*, 1995). Tendo em vista uma rápida avaliação da capacidade e eficácia antioxidante de extratos vegetais, muitos ensaios estão descritos na literatura, como a oxidação forçada de um substrato lipídico, a co-oxidação de substratos (β-caroteno, por exemplo), atividade sequestrante de radicais livres como, por exemplo, o 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), potencial redutor, e outros (Silva, Borges e Ferreira, 1999).

Como a atividade antioxidante está geralmente relacionada à quantidade de compostos fenólicos nas plantas, entre eles os flavonóides, avaliou-se o teor destes compostos no extrato bruto e frações de *B. uniflora*.

Para a determinação do teor de fenólicos utilizou-se o reagente de Folin-Ciocalteu, que consiste em uma mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico que, em contato com agentes redutores como os compostos fenólicos em meio básico, se oxidam formando complexos de molibdênio e tungstênio azuis, cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras através de um

espectrofotômetro UV/VIS. Quanto mais intensa a coloração, maior o conteúdo de fenólicos nos extratos e/ou fração testada.

O teste para a determinação do conteúdo de flavonóides se fundamenta na formação de um anel estável de seis membros do átomo de alumínio, proveniente do reagente AlCl_3 , com o flavonóide (**Figura 25**). A formação do complexo entre o alumínio e o flavonóide provoca um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção quando analisado por espectrofotometria de UV/VIS. Desta maneira, é possível determinar a quantidade de flavonóides evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos que invariavelmente acompanham os flavonóides nos tecidos vegetais, pois estes apresentam comprimentos de onda bastante inferiores se comparados com o complexo flavonóide – Al.

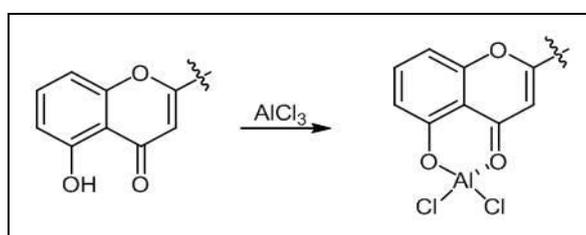


Figura 25. Formação do complexo entre Al^{3+} e o flavonóide

O teste que utiliza o radical livre DPPH determina a possível atividade antioxidante de extratos vegetais. Este radical é relativamente estável, de forte coloração azulada e suficientemente solúvel em álcoois miscíveis em água, como o metanol. A ação sequestrante de radicais livres pelos compostos presentes na amostra, geralmente fenólicos, deve-se a reação destes com o DPPH pela abstração de um átomo de hidrogênio, de acordo com a seguinte equação (**Figura 26**):

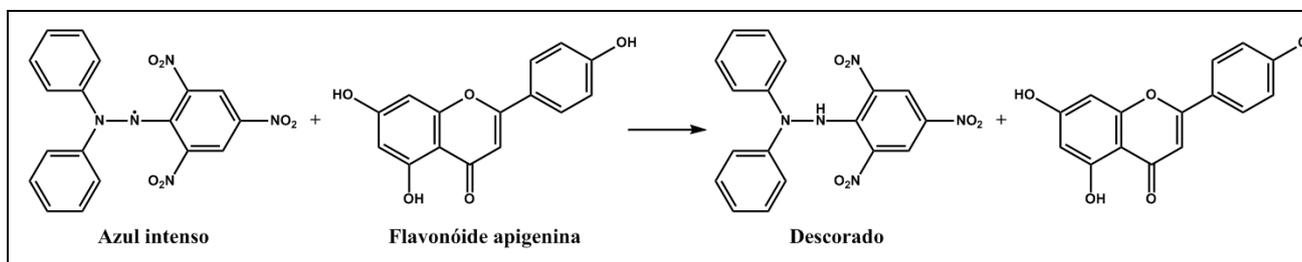


Figura 26. Reação entre um flavonóide e o radical livre DPPH

Os métodos baseados na redução do Fe^{3+} , que determinam o poder redutor são também utilizados para avaliação da atividade antioxidante. Tais métodos avaliam a capacidade de compostos fenólicos reduzirem o Fe^{3+} , com conseqüente formação de um

complexo colorido com Fe^{2+} (Roginsky *et al.* 2005). O poder redutor foi observado pela doação direta de elétrons na redução do ferricianeto de potássio $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ a ferrocianeto de potássio $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. O produto foi visualizado pela adição de íons Fe^{3+} , que após a reação de redução, forma o complexo azul da Prússia, $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$, que foi quantificado por medida de absorbância em 720 nm.

Na **Tabela 5** encontram-se os resultados dos testes antioxidantes realizados na espécie *B. uniflora* juntamente com os dados obtidos para a espécie *Eugenia brasiliensis* (Magina, 2009) para comparação.

Tabela 5. Atividade Antioxidante do extrato bruto e frações de *B. uniflora* e *E. brasiliensis*

Extrato / fração		Fenólicos totais ^(a)	Flavonóides ^(b)	Poder redutor ^(c)	DPPH, [CE ₅₀] ^(d)
<i>B. uniflora</i>	Extrato bruto	28,82 ± 0,75	28,19 ± 0,21	55,23 ± 0,03	> 200
	Resina	12,68 ± 0,11	49,81 ± 0,28	41,42 ± 0,00	> 200
	F. hexano	19,64 ± 0,79	16,04 ± 0,30	51,88 ± 0,01	> 200
	F. Ac. etila	89,11 ± 0,02	3,55 ± 0,12	167,36 ± 0,04	90,19
	F. butanólica	38,04 ± 0,15	2,18 ± 0,00	65,27 ± 0,01	133,23
<i>E. brasiliensis</i> ^(e)	Extrato bruto	162,65 ± 9,26	14,44 ± 1,08	318,33	27,6
	F. hexano	48,49 ± 2,91	35,19 ± 2,05	12,66	> 200
	F. Ac. etila	494,51 ± 1,18	54,12 ± 0,01	834,99	14,7
	F. butanólica	461,65 ± 2,09	12,44 ± 0,20	790,66	15,2
Ác. Ascórbico		-	-	989,43 ± 0,01	2,4
Ác. Gálico		-	-	674,19 ± 1,19	9,2

^(a) mg de ác. gálico/g de amostra, ^(b) mg de quercetina/g de amostra, ^(c) mg de ác. ascórbico/g de amostra,

^(d) Concentração Efetiva 50% em ppm, ^(e) Magina, 2009.

O extrato bruto e frações de *B. uniflora* são pobres em compostos fenólicos quando comparados com os resultados obtidos para a espécie *Eugenia brasiliensis*, sendo que na fração acetato de etila concentram-se os compostos fenólicos em maior quantidade e a resina possui a maior concentração de flavonóides.

Tanto a resina quanto a fração hexânica apresentaram conteúdo de flavonóides maior do que a fração acetato de etila. Para a resina, este fato pode ser explicado pela possível presença de taninos condensados e para a fração hexânica pela possível presença de flavonóides na forma de aglicona que formam o quelato com o alumínio dando origem ao complexo flavonóide – Al. Para ambos os casos também pode estar

ocorrendo um falso resultado positivo pela presença de grupos catecólicos que também formam o complexo quelato com o alumínio.

A fração acetato de etila apresentou os melhores resultados antioxidantes considerando os dois últimos testes, seguida da fração n-butanólica (**Tabela 5**). No teste que avalia a ação seqüestradora de radical livre com DPPH, para a fração acetato de etila e n-butanólica, obtiveram-se valores de CE_{50} de 90,19 ppm e 133,23 ppm respectivamente. Mesmo assim, a fração acetato de etila é cerca de dez vezes menos potente que o ácido gálico e trinta e seis vezes menos potente que o ácido ascórbico.

Observou-se ainda que uma maior quantidade de compostos fenólicos presentes na fração acetato de etila provavelmente deve ser responsável pela atividade antioxidante. Lembrando ainda que, nos espectros de IV das frações acetato de etila e n-butanólica observou-se um perfil de metabólitos secundários condizente com compostos polihidroxilados.

5.2.6 Avaliação da atividade alelopática

Alelopatia pode ser definida como um processo pelo qual produtos do metabolismo secundário de um determinado vegetal são liberados, impedindo a germinação e o desenvolvimento de outras plantas relativamente próximas. A resistência ou tolerância aos metabólitos secundários é uma característica espécie-específica, existindo aquelas mais sensíveis como *Lactuca sativa* L. (alface), *Lycopersicon esculentum* Miller (tomate) e *Cucumis sativus* L. (pepino), consideradas plantas indicadoras da presença de aleloquímicos. Um bioensaio útil para avaliar a atividade alelopática é a aplicação do teste de germinação de sementes.

De acordo com Rice (1984), as substâncias químicas identificadas como agentes alelopáticos se enquadram em quatorze categorias, destacando-se os terpenóides, saponinas, flavonóides (taninos, proantocianinas) e alcalóides.

O teste alelopático aplicado ao extrato e frações de *B. uniflora* foi avaliado através de germinação de sementes de *Lactuca sativa* e do desenvolvimento da plântula.

As amostras foram testadas em quatro diferentes concentrações. A germinação de sementes de *L. sativa* foi avaliada através do índice de velocidade de germinação ($IVG = \sum N_i/t_i$, onde "N" é o número de sementes germinadas após "t" horas a contar da semeadura). Quanto menor a percentagem de velocidade de germinação, maior o efeito alelopático inibitório. Através da **Figura 27** observa-se que a fração acetato de etila foi a mais eficaz em inibir a germinação de sementes de alface (90 %) sendo que, das

sementes que germinaram, praticamente não desenvolveram radícula ou hipocótilo nas concentrações de 1,0 e 2,0%. Outra fração de destaque é a n-butanólica, que inibiu a germinação de sementes de alface em cerca de 80 %.

O extrato bruto a 2,0% também apresentou atividade considerável inibindo em cerca de 80% a germinação de sementes e 70% o desenvolvimento da radícula. A resina também apresentou atividade inibitória relevante a 1,0 e 2,0%, inibindo cerca de 70% o desenvolvimento da radícula e do hipocótilo. Porém, a germinação de sementes foi pouco afetada, sendo inibida em média apenas 40 % (Figuras 27 e 28).

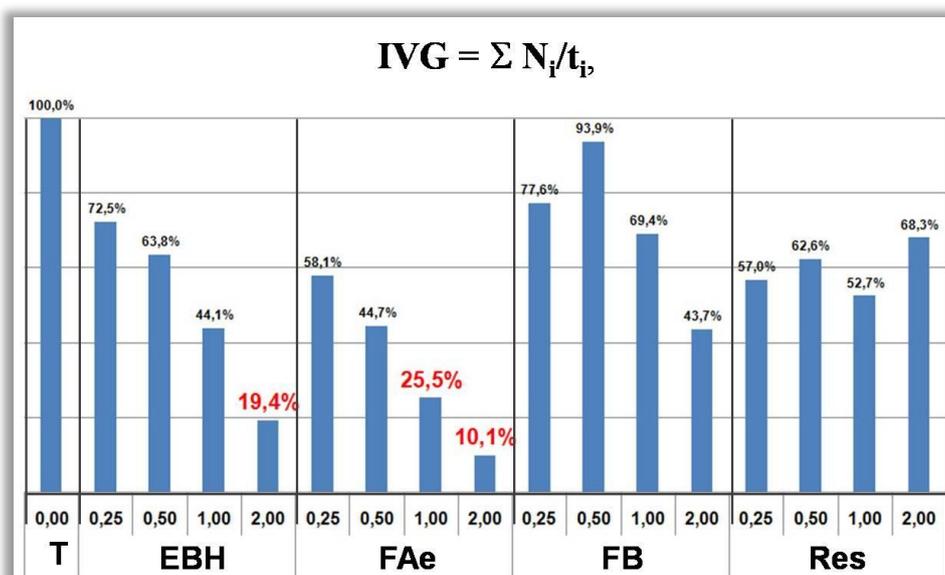


Figura 27. Velocidade de germinação de sementes de *L. sativa* na presença do extrato bruto (EBH) e frações (acetato de etila, FAe; butanólica, FB e resina, Res) de *B. uniflora*

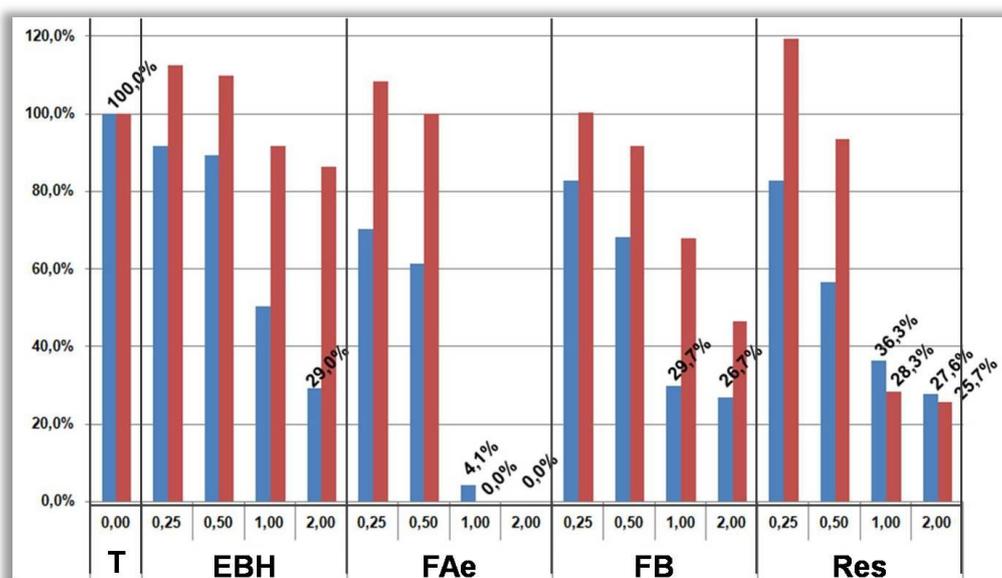


Figura 28. Comprimento da radícula (CR) e do hipocótilo (CH) de *L. sativa* na presença do extrato bruto (EBH) e frações (acetato de etila, FAe; butanólica, FB e resina, Res) de *B. uniflora*

5.2.7 Avaliação da atividade antibacteriana

O estudo da atividade antibacteriana é de suma importância, devido a certas bactérias como, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* serem consideradas patógenas causadores de infecção hospitalar, que se tornam resistentes progressivamente a um número cada vez maior de antibióticos (Machado *et al.* 2005). Baseado neste fato faz-se o incentivo à busca de compostos com potencial atividade antibiótica de ocorrência natural.

O teste antibacteriano aplicado a extratos e frações de *B. uniflora* foi avaliado através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), que é a concentração onde não se observa o crescimento bacteriano, indicado pelo aparecimento da coloração vermelha. Conforme o critério proposto por Machado e colaboradores (2005), as amostras que apresentarem valores de CIM menores que 0,01 mg/mL são consideradas com excelente atividade; valores entre 0,01 e 0,10 mg/mL são considerados de boa atividade; valores entre 0,10 e 0,50 mg/mL são considerados de atividade moderada; valores entre 0,5 e 1 mg/mL de atividade fraca, e para valores de CIM acima de 1 mg/mL, as amostras são consideradas inativas.

Conforme mostrado na **Tabela 6**, nenhuma das amostras apresentou atividade frente às bactérias Gram-negativas (*P. aeruginosa* e *E. coli*) assim como à bactéria Gram-positiva *S. aureus*. Porém, de acordo com o critério de classificação da atividade, o extrato bruto e a resina apresentaram atividade moderada frente à bactéria Gram-positiva *B. cereus*.

Tabela 6. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) para o extrato bruto e frações de *B. uniflora*

	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>
Gentamicina *	0,39	0,39	0,21	0,20
Extrato bruto **	3,125	3,125	3,125	0,19
Resina **	5,810	5,810	5,810	0,18
F. acetato de etila **	2,810	2,810	5,620	87,00
F. n-butanólica **	4,000	8,000	8,000	4,00

CIM: * µg/mL, ** mg/mL.

6. CONCLUSÕES

Considerando os objetivos propostos por este trabalho, pode-se concluir que:

1. A compilação das principais constantes físicas dos dados espectroscópicos e espectrométricos facilitará a identificação mais rápida e precisa dos diferentes esteróides isolados das plantas;

2. A marcha analítica preliminar aplicada ao extrato bruto de *Brunfelsia uniflora* indicou a presença de taninos e esteróides;

3. A análise por cromatografia em camada delgada do extrato bruto e frações de *B. uniflora* revelou a presença de compostos de diferentes polaridades dependendo da amostra;

4. Os espectros de infravermelho do extrato bruto e das frações menos polares indicaram a presença de estruturas com uma grande cadeia hidrocarbonada. As frações acetato de etila e butanólica exibiram bandas características de estruturas com cadeia polihidroxilada, mais polares.

5. A fração acetato de etila apresentou os melhores resultados quanto à atividade antioxidante seguida da fração n-butanólica sendo que no teste que avalia a ação seqüestradora de radical livre com DPPH obtiveram-se os valores de CE_{50} de 90,19 ppm e 133,23 ppm respectivamente. Mesmo assim, a fração acetato de etila é cerca de dez vezes menos potente que o ácido gálico e trinta e seis vezes menos potente que o ácido ascórbico.

6. Nenhuma das amostras apresentou toxicidade frente às larvas de *Artemia salina*, pois apresentaram valores de DL_{50} maiores que 1000 $\mu\text{g/mL}$.

7. Todas as amostras apresentaram atividade inibitória na germinação de sementes e no desenvolvimento da radícula de *L. sativa*, sendo a fração acetato de etila a mais efetiva inibindo quase completamente a germinação das sementes nas concentrações de 1,0 e 2,0%.

8. Apenas o extrato bruto e resina apresentaram atividade moderada contra a bactéria *Bacillus cereus*.

Portanto, deve ser incentivado um estudo da fração acetato de etila, no sentido de isolar compostos que possuam atividade antioxidante e atividade herbicida evidenciada pela inibição na germinação de sementes de alface, assim como um estudo da resina por apresentar atividade antibacteriana.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRA, M. F., FRANÇA, P. F., BARBOSA-FILHO, J. M.; Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn*, 17,114–140, **2007**.
- ANAGNOSTOPOULOU, M. A.; KEFALAS, P.; PAPAGEORGIOU, V. P.; ASSIMOPOULOU, A. N.; BOSKOU, D. D. *Food Chemistry*, 14, 6820-6826, **2006**.
- BAIG, H.S.; SAIFULLAH, S.M.; DAR, A. Occurrence and toxicity of *Amphidinium carterae* Hulburt in the North Arabian Sea. *Harmful Algae*, 5, 133-140, **2006**.
- BECEL. **Becel** **pró-active**[®]. 2009. Disponível em: <http://www.qualeoseunumero.com.br/?utm_source=kylie_becel_site&utm_medium=dhtml&utm_content=kylie_produtos&utm_campaign=kylie#/entenda>. Acesso em: 27 out. **2009**.
- BERTRAND, C. COMTE, G. PIOLA, F.; Solid-phase microextraction of volatile compounds from flowers of two *Brunfelsia* species. *Biochemical Systematics and Ecology*. 34, 371–375, **2006**.
- BETTINA M.R., PEREIRA, E. F. R., GONÇALVES, L. C., PEREIRA, N. A.; Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom. I. analgesic and anti-inflammatory activities. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86, 203-205, **1991**.
- BEVERIDGE, T. H. J., LI, T. S. C., & DROVER, J. C. G. Phytosterol content in american ginseng seed oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 744–750, **2002**.
- BIRKNER, C.; STAPEL, G. LEYCK, S. FISCHER, H. CHRIST, B. KESSELRING, K.; Extraction of hopamidine. *Ger. Offen.*, 12 pp, **1986**.
- BOUIC, P. J.; LAMPRECHT, J. H.; Plant sterols and sterolins: a review of their immunomodulating proprieties. *Altern. Med. Rev.*, 4(3), 170-177, **1999**.
- BRANCO, A.; PIZZOLATTI, M. G.; CGAR E CGAR-EM na análise dos constituintes químicos isolados do extrato hexânico de *Sebastiania argutidens* (Euphorbiaceae). *Quím. Nova*, São Paulo, 25(1), 15-19, **2002**.
- BRANDL, J.; Pharmacological investigation of manaca roots. *Zeitschrift fuer Biologie* (Munich), 31, 251-92, **1894**.
- BRUNNER, G. BURGER, U. CASTIONI, P. KAPETANIDIS, I. CHRISTEN, P.; A novel acylated flavonol glycoside isolated from *Brunfelsia grandiflora* ssp. *grandiflora*.

- Structure elucidation by gradient accelerated NMR spectroscopy at 14T. ***Phytochemical Analysis*** 11, 29–33, 2000.
- BUCKINGHAM, J. (executive editor). ***Dictionary of natural products***. [S. l.: s.n.], v. 1 a 7. 1993.
- BUCKINGHAM, J.; BRADLEY, H. M.; THOMPSON, S. H. J.; ROBERTS, A. D. ***Dictionary of natural products***. (First supplement, v. 8), 1995.
- BUCKINGHAM, J.; MACDONALD, F. M.; BRADLEY, H. M.; MUNASINGHE, V. R. N.; PATTENDEN, C. F.; RHODES, P. H.; ROBERTS, A. D. ***Dictionary of natural products***. (Second supplement, v. 9), 1996.
- BUCKINGHAM, J.; THOMPSON, S. H. J.; MUNASINGHE, V. R. N.; PATTENDEN, C. F.; RHODES, P. H.; ROBERTS, A. D. ***Dictionary of natural products***. London: Chapman & Hall, (Fourth supplement, v. 11), 1998.
- BUCKINGHAM, J.; THOMPSON, S. H. J.; ROBERTS, A. D. ***Dictionary of natural products***. (Third supplement, v. 10), 1997.
- BURKE, R. W.; DIANONDSTONE, B. I.; VELAPOLDI, R. A.; MENIS, O. Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak Color Reactions for Cholesterol. ***Clin. Chem.*** 20(7), 794-801, 1974.
- CAVIN, A.; HOSTETTMANN, K.; DYATMYKO, W.; POTTERAT, O. ***Planta Medica***, 64, 393-396, 1998.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. ***Introdução a métodos cromatográficos***. 4a ed. rev. e ampl. Campinas: Ed. da UNICAMP, 279p, 1990.
- COSTA, O. A.; A pharmacologic study of manaca (*Brunfelsia hopeana*). ***Revista da Associação Brasileira de Farmacêuticos***, 14, 295-9, 1933.
- DALMARCO, J. B. ***Lotus corniculatus L. cv. São Gabriel: Análise fitoquímica e atividade biológica***. Florianópolis, Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2009.
- DARNET, S. & RAHIER, A. Plant sterol biosynthesis: identification of two distinct families of sterol 4 α -methyl oxidases. ***Biochem. J.***, 378, 889–898, 2004.
- DE STEFANI, E. BOFFETTA, P.; RONCO, A. L. *et al.* Plant sterol and risk of stomach cancer: a case-control study in Uruguai. ***Nutr. Cancer***, 37(2), 140-144, 2000.
- DEWICK, P. M. ***Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach***. 2nd Edition. John Wiley & Sons, Ltd. Capítulo 5, 167-289. 2002.
- DOMINGUEZ, X. A. ***Métodos de investigación fotoquímica***. Centro Regional de Ayuda Técnica – México/Buenos Aires. 1973.

- DUKE, J. A.; **Handbook of medicinal herbs** / James A. Duke, with Mary Jo Bogenschutz-Godwin, Judi duCellier, Peggy-Ann K. Duke. 2nd ed. **1929**.
- ERICSSON, C. B. D. & IVONNE, J. N. R. Sterol composition of the macromycete fungus *Laetiporus sulphureus*. **Chemistry of Natural Compounds**, 45(2), **2009**.
- FORGO, P. & KÖVÉR, K. E.; Gradient enhanced selective experiments in the ¹H NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol, a phytosterol derivative. **Steroids**, 69, 43-50, **2004**.
- GELLERT, E., CHAUBAL, M. G., IYER, R. P.; The alkaloids of *Brunfelsia hopeana* (Hock) Benth. **11 Symp. Pap. - Iupac Int. Symp. Chem. Nat. Prod.** Wollongong, Australia. **1978**.
- GROS, E. G. **Introducción al estudio de los productos naturales**. Secretaria geral de La Organización de los Estados Americanos. **1985**.
- HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Food chemistry and toxicology**, 33, 601, **1995**.
- HICKS, K. B., & MOREAU, R. A. Phytosterols and phytostanols: functional food cholesterol busters. **Food Technology**, 55(1), 63–67, **2001**.
- ICHIKI, H.; YAHARA, S.; NOHARA, T.; NAKASUMI, T.; IRINO, N.; TAKAOKA, T. Solonaceous plants. XXX. Studies on the constituents of *Brunfelsia hopeana* Benth. **Natural Medicines**, 48(4), 314-316, **1994**.
- INSTITUTE OF FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY (IFST). Phytosterol esters (plant sterol and stanol esters). 2009. Disponível em <http://www.ifst.org/science_technology_resources/for_food_professionals/information_statements/19514/Phytosterol_Esters_%28plant_sterol_and_stanol_esters%29>. Acesso em: 01 de nov. **2009**.
- IYER, R. P. *Brunfelsia hopeana* - pharmacologic screening: isolation and characterization of hopeanine. Univ. Pacific, **Stockton**, 131 pp, **1978**.
- IYER, R. P.; BROWN, J. K.; CHAUBAL, M. G.; MALONE, M. H. *Brunfelsia hopeana*. I: Hippocratic screening and antiinflammatory evaluation. **Lloydia**, 40(4), 356-60, **1977**.
- JONES, P. J.; RAEINI-SARJAZ, M.; NTANIOS, F. Y. *et al.* Modulation plasma lipid levels and cholesterol kinetics by phytosterol versus phytostanol ester. **J. Lipid. Res.**, 41, 697-704, **2000**.
- KLIPPEL, K. F.; HILT, D. M.; SCHIPP, B. A multicentric, placebo-controlled, double-blind clinical trial of beta-sitosterol(phytosterol) for the treatment of the hyperplasia. German BPH – Phyto Study Group. **Br. J. Uro.**, 80(3), 427-432, **1997**.

- KLOUCEK, P. *et al.*; Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Caller'ia District. ***Journal of Ethnopharmacology***, 99, 309–312, **2005**.
- KOYGANKO, N.V.; KASHKAN, N. Zh.; BORISOV, E.V. 13C NMR Spectra of functionally substituted 3-chloroderivatives of cholesterol and -sitosterol. ***Chemistry of Natural Compounds***, Vol. 36(6), **2000**.
- LAW, M. Plant sterol and stanol margarines and health. ***Br. Med. J.***, 30, 861-864, **2000**.
- LICHTENSTEIN, A. H.; DECKELBAUM, R. J.; Stanol/sterol ester-containing foods and blood cholesterol levels. ***Circulation***, 103, 1177-1179, **2001**.
- LIN, WEI-YU; KUO, YUEH-HSIUNG; CHANG, YA-LING; TENG, CHE-MING; WANG, ENG-CHI; ISHIKAWA, TSUTOMU; CHEN, IH-SHENG. Anti-platelet aggregation and chemical constituents from the rhizome of *Gynura japonica*. ***Planta Medica***, 69(8), 757-764, **2003**.
- LORENZI H. & MATOS F. J. A.; ***Plantas Medicinais No Brasil, Nativas e Exóticas***. Nova Odessa: Ed. Plantarum. **2002**.
- LORENZI, H. & MOREIRA, H.; ***Plantas ornamentais do Brasil***. 3ª Edição. Instituto Plantarum. Nova Odessa, **2001**.
- LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; LIMA, M.R.F.; OMENA, M.C.; MENDONÇA, F.A.C.; BIEBER, L.W. SANT'ANA, A.E.G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. ***Journal of Ethnopharmacology***, 97, 199–206, **2005**.
- MACHADO, K.E., CECHINEL FILHO, V., TESSAROLO, R., MALLMANN, C., MEYRESILVA, C., BELLA CRUZ, A. Potent antibacterial activity of *Eugenia umbelliflora*. ***Pharmaceutical Biology***, 43, 636-639, **2005**.
- MAGINA, M. D. A. ***Estudo fitoquímico e biológico de espécies do gênero Eugenia***. Florianópolis, Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química, **2008**.
- MARTINS, M. B. G.. GRAF, R. R., CAVALHEIRO, A. J., RODRIGUES, S. D.; Caracterização anatômica, química e antibacteriana de folhas de *Brunfelsia uniflora* (manacá). ***Brazilian Journal of Pharmacognosy***. 19(1A), 106-114, Jan./Mar. **2009**.
- MATOS, F. J. A. ***Introdução à Fitoquímica Experimental***. Fortaleza: UFC, 17-23, **1997**.
- McLAUGHLIN, J.L. ***Methods in plant biochemistry***. Vol. 6. Londres: Academic Press, **1991**.
- MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. ***Planta Medica***, 45(1), 31-34, **1982**.

- MEYER, B. N.; FERRIGINI, N. R.; PUTNAN, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45, 31-34, **1982**.
- MOHAMED, Z.A.; EL-SHAROUNY, H.M.; ALI, W.S.M. Microcystin production in benthic mats of cyanobacteria in the Nile River and irrigation canals, Egypt. *Toxicon*, 47(5), 584-590, **2006**.
- MORAIS, S. M.; BRAZ-FILHO, R. *Produtos naturais: estudos químicos e biológicos*. Fortaleza: EdUECE, **2007**.
- MORENO-MURILLOA, B. *et al.* Cytotoxicity screening of some South American *Solanaceae*. *Fitoterapia*, 72, 680–685, **2001**.
- MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PEREIRA, B. M. R.; PEREIRA, N. A.; Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. *Phytochemistry*, 55, 627–642, **2000**.
- MORS, W. G., ROBEIRO, O.; Occurrence of scopoletin in the genus *Brunfelsia*. *J Org Chem*, 22, 978, **1957**.
- NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM (NCEP). 2001. *Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert panel on Detection, Evaluation, and Treatment of high blood cholesterol in adults (Adult treatment Panel III), Final report*. Washington: National institute of Health/National Heart, Lung, and Blood institute, 284p. (NIH publications) 02, 5215, **2002**.
- NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. *Fifteenth Informational Supplement M100-S15*, Wayne, PA, **2005**.
- NISHUMA, H.; NAKAMURA, T.; MIZUTANI, *J. Phytochemistry*, 23, 2777-2779, **1984**.
- PLAT, J.; MENSINK, R. P.; Effects of plant sterols and stanols on lipid metabolism and cardiovascular risk. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 11, 31-40, **2001**.
- PLOWMAN, T.; *Brunfelsia* in Ethnomedicine. *Bot Mus Leaf*, 25, 289-319. **1977**.
- PRAGER, N.; BICKETT, K.; FRENCH, N *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled trial to determine the effectiveness of botanically derived inhibitors of 5-alpha-reductase in the treatment of androgenic alopecia. *J. Altern. Complement. Med.*, 8(2), 143-152, **2002**.
- RICE, E. L. *Allelopathy*. 2nd ed., New York: Academic Press, **1984**.
- ROGINSKY, V.; LISSI, E. A., *Food Chemistry*, 92, 235, **2005**.

- RUPPELT, B. M. et al.; Pharmacological screening of plants recommended by folkmedicine as anti-snake venom – I. analgesic and antiinflammatory activities. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 86(suppl. 2), 203–205, **1991**.
- SHUKLA, V.; NEGI, S.; RAWAT, M. S. M.; PANT, G.; NAGATSU, A.; Chemical study of *Ramalina Africana* (Ramalinaceae) from the Garhwal Himalayas. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 449–453, **2004**.
- SILVA, F.A.M; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação e da capacidade antioxidante. *Quím. Nova*, 22(1), 94–103, **1999**.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, **2000**.
- THE PEANUT INSTITUTE. *Food for Thought-Phytosterols & Health*, 4(3),1-4, **2000**. Disponível em: < http://www.peanut-institute.org/4-19-99_Phytosterol_PR.html>. Acesso em: 01 de Nov. 2009.
- THOMPSON, M. J.; DUTKY, S. R.; PATTERSON, G. W.; GOODEN, E. L. NMR spectra of C-24 isomeric sterols. *Phytochemistry* 11(5), 1781–1790. **1972**.
- TÖKES, L.; JONES, G.; DJERASSI, C.; Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. CLXI. Elucidation of the Course of the Characteristic Ring D Fragmentation of Steroids. *Journal of the American Chemical Society*. 90(20), september, **1968**.
- VIEIRA, S.; HOFFMANN, R. *Estatística Experimental*. Editora Atlas S.A. São Paulo-SP. **1989**.
- WATERMAN, P. G. & MOLE, S., *Blackwell Scientific Publications*, 238, **1994**.
- WENG, JING-RU; SU, HUEY-JEN; YEN, MING-HONG; WON, SHEN-JEU; LIN, CHUN-NAN. The cytotoxic constituents of *Euphorbia makinoi*. School of Pharmacy, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung, Taiwan. *Chinese Pharmaceutical Journal* (Taipei, Taiwan), 55(4), 267-272, **2003**.
- WOISKY, R. G.; SALATINO, A., *Journal of Apiculture Research*, 37, 99-105, **1998**.
- WRIGHT, J. L. C.; MCINNESS, A. G.; SHIMIZUD, S.; SMITH, G.; WALTER, J. A.; Khalil, W.; Identification of C-24 alkyl epimers of marine sterols by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Can. J. Chem.* 56, 1898-1903, **1978**.
- WYLLIE, S. G. & DJERASSI, C. Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. CXLVI. Mass Spectrometric Fragmentations Typical of Sterols with Unsaturated Side Chains. *The Journal of Organic Chemistry*. 33(1), jan. **1968**.
- XIONG, Q.; WILSON, W. K.; PANG, J. The Liebermann–Burchard Reaction: Sulfonation, Desaturation, and Rearrangement of Cholesterol in Acid. *Lipids*, 42, 87–96, **2007**.

ZHANG, X.; CAMBRAI, A.; MIESCH, M.; ROUSSI, S.; RAUL, F.; AOUDE-WERNER, D.; MARCHIONIJ, E.; Separation of Δ^5 - and Δ^7 -Phytosterols by Adsorption Chromatography and Semipreparative Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography for Quantitative Analysis of Phytosterols in Foods. ***Agric. Food Chem.***, 54(4), 2006.