

Avaliação do perfil químico e quantificação do potencial antioxidante e antibacteriano da espécie ameaçada de extinção *Paratecoma peroba* (Record e Mell) Kuhlmann (peroba do campo)

LARISSA ZAMBE PINHEIRO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2014

Avaliação do perfil químico e quantificação do potencial antioxidante e antibacteriano da espécie ameaçada de extinção *Paratecoma peroba* (Record e Mell) Kuhl (peroba do campo)

LARISSA ZAMBE PINHEIRO

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestrado em Produção Vegetal.

Orientadora: Prof. Dr^a. Daniela Barros de Oliveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 064/2014

Pinheiro, Larissa Zambe

Avaliação do perfil químico e quantificação de potencial antioxidante e antibacteriano da espécie ameaçada de extinção *Paratecoma peroba* (Record e Mell) Kuhim (peroba do campo)/ Larissa Zambe Pinheiro. – 2014.

112 f. : il.

Orientador: Daniela Barros de Oliveira
Dissertação (Mestrado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2014.

Bibliografia: f. 97 – 112.

1. Constituintes químicos 2. Bignoniaceae 3. Paratecoma 4. Flavonoide I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 634.97

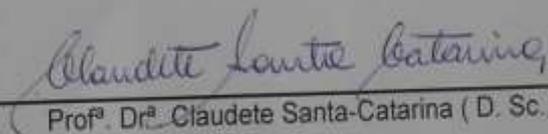
Avaliação do perfil químico e quantificação do potencial antioxidante e antibacteriano da espécie ameaçada de extinção *Paratecoma peroba* (Record e Mell) Kuhl (peroba do campo)

LARISSA ZAMBE PINHEIRO

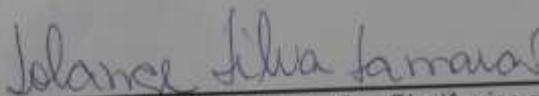
Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestrado em Produção Vegetal.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2014.

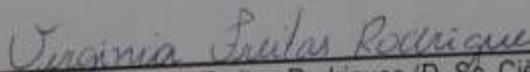
Comissão Examinadora



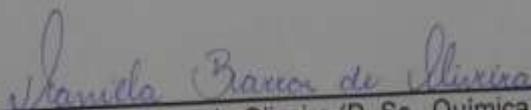
Prof^ª. Dr^ª. Claudete Santa-Catarina (D. Sc., Biotecnologia) UENF



Prof^ª. Dr^ª. Solange Silva Samarão (D. Sc., Biotecnologia) UENF



Prof^ª. Dr^ª. Virginia Freitas Rodrigues (D. Sc., Ciências Naturais) UNESA



Prof^ª. Dr^ª. Daniela Barros de Oliveira (D. Sc., Química de Produtos Naturais) UENF (Orientadora)

Aos meus amados pais
João Baptista e Eliana,
e minha irmã Gabrielly.

“Não tirarei de vosso aprendizado a conclusão de que sabeis tudo, mas sim a de que vos resta infinitamente a saber”.

Pascal

AGRADECIMENTOS

Que delícia é poder agradecer!

Primeiramente, agradeço a Deus por ter sempre iluminado e guiado meus caminhos. Sem Deus nada seria possível e esta conquista nunca teria sido alcançada.

À UENF que me permitiu desenvolver aqui esse trabalho.

À FAPERJ pelo suporte financeiro.

Agradeço à professora Daniela Barros de Oliveira que, desde o início, esteve sempre de portas abertas para mim, confiando no meu trabalho e me dando esperanças para seguir em frente. Agradeço por toda sua dedicação, companheirismo, ensinamento e paciência. Com certeza você mudou pra sempre minha vida acadêmica e pessoal. Muito obrigada por tudo.

Agradeço às professoras Claudete Santa Catarina, Solange Silva Samarão e Virginia Freitas Rodrigues por aceitarem fazer parte da banca avaliadora deste trabalho.

Agradeço a professora Solange por ter aceitado participar deste trabalho. Muito obrigada pelos seus ensinamentos, dedicação, conversas e apoio, sempre tão solícita e amiga todas as vezes que lhe procurei, com quem tenho a honra de compartilhar momentos da minha vida acadêmica desde meu curso de Bacharelado em Farmácia.

Agradeço ao professor Olney Vieira da Motta que me abriu as portas de seu laboratório possibilitando a realização da parte biológica desse trabalho. Muito obrigada pela sua confiança, suas ideias, sua disponibilidade e competência. Seus ensinamentos foram fundamentais para o desfecho dessa dissertação.

Agradeço a doutoranda Luciana, orientada do professor Olney, por toda ajuda e dedicação nos experimentos da parte biológica.

Agradeço a professora Claudete que me abriu as portas de seu laboratório cedendo os calos de peroba. Muito obrigada pela sua confiança e suas ideias.

Agradeço, em especial, aos meus grandes ídolos, minha base, minha fortaleza: meus pais João Baptista e Eliana que sempre me incentivaram a realizar esse sonho e me fortaleceram nos momentos de aflição. Vocês me fizeram acreditar que sou capaz e se hoje estou me tornando Mestre, é por vocês! Amo muito vocês!

A minha irmã Gabrielly muito obrigada pelo amor, por me proporcionar prazerosos momentos de descontração e por acreditar em mim. Te amo irmã!!!

Às minhas amigas de laboratório, Natalia Ribeiro Bernardes e Lorena de Lima Glória, que são muito mais que parceiras de trabalho, minhas companheiras. Não sei o que seria de mim sem vocês me apoiando e me dando forças nos momentos difíceis. Vocês tornaram essa caminhada bem mais branda e feliz. Obrigada por toda ajuda, paciência, risadas, carinho e amizade. Vocês são mais que especiais pra mim!

Agradeço também aos colegas Silvia, Lucy, Clara, Isabela, Simone, João, Raphael, Patricia, Lara e Pollyane pelo companheirismo e momentos de distração. Agradeço a Natiele, principalmente pelos estudos de estatística. Não teria conseguido sem vocês.

Às minhas tias Lislei, Marlene, Elizabeth, Kátia e Elizete, que são minhas mães do coração, a quem eu recorro nos momentos de dúvidas, e que sempre estão dispostas a me ouvir e aconselhar, obrigada por tudo, por cada abraço, carinho e amor! Amo muito vocês!

Agradeço as minhas grandes amigas Laura, Camila, Mariane e Sinéia, que mesmo distantes nunca deixaram de me apoiar e me aconselhar no momentos oportunos. Vocês são como irmãs, pessoas mais que especiais em minha vida e, com quem eu quero sempre estar. Amo vocês!

Às minhas companheiras, amigas, que me aturaram durante essa parte de minha vida acadêmica, Adriele e Lais Velasco, pessoas com quem aprendi muito e que sempre estarão em meu coração, vocês são mais que especiais! A dupla, as irmãs que tanto amo!

Enfim, a todos que me ajudaram, cada um do seu modo, de maneira direta ou indireta, a conquistar esta vitória. Meu muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE ABREVIACÕES	xviii
RESUMO	xix
ABSTRACT	xxi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo geral	4
2.2. Objetivos específicos	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1. Biodiversidade brasileira	5
3.2. A família Bignoniaceae	8
3.3. Constituintes químicos da família Bignoniaceae	11
3.3.1. Constituintes químicos do gênero <i>Tabebuia</i>	17
3.3.2. Constituintes químicos do gênero <i>Zeyheria</i>	21
3.3.3. Constituintes químicos do gênero <i>Arrabidaea</i>	22
3.3.4. <i>Paratecoma peroba</i> (Record e Mell) Kuhlmann	23
3.4. Propagação de espécies vegetais	24
3.5. Substâncias químicas a serem investigadas	25

3.5.1. Compostos fenólicos	25
3.6. Equilíbrio oxidativo <i>versus</i> antioxidantes	28
3.6.1. Radicais livres	28
3.6.2. Formação dos RLs	29
3.6.2.1. Espécies reativas de oxigênio (EROs)	29
3.6.6.2. Espécies oriundas dos metais	30
3.7. Inibição do desenvolvimento bacteriano	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. Coleta de material vegetal	33
4.2. Preparo dos extratos metanólicos	34
4.2.1. Extrato metanólico dos calos de peroba do campo	34
4.2.2. Extrato metanólico das folhas de peroba do campo.....	34
4.3. Parte química	35
4.3.1. Fracionamento dos extratos e identificação das frações	35
4.3.2. Atividade antioxidante	40
4.3.2.1. Atividade antioxidante por sequestro do radical DPPH	40
4.3.2.2. Atividade antioxidante por CCD	41
4.3.2.3. Atividade antioxidante pelo FRAP	41
4.3.3. Método para dosagem de fenóis totais por Folin Denis	41
4.3.4. Método para dosagem de fenóis totais por Folin Ciocalteau	42
4.4. Parte biológica	42
4.4.1. Micro organismos	42
4.4.1.1. Preparo dos inóculos	43
4.4.2. Avaliação da atividade antibacteriana	43
4.4.3. Ensaio com Sytox Green	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1. Parte química	47
5.1.1. Extratos metanólicos	47
5.1.2. Fracionamento dos extratos metanólicos	52
5.1.3. Substância isolada	59
5.1.3.1. Elucidação estrutural da substância SC2aa	63
5.1.3.1.1. Técnicas monodimensionais	63
5.1.3.1.1.1. RMN ¹ H	64
5.1.3.1.1.2. Técnica bidimensional	67

5.1.3.1.3. Proposta estrutural	69
5.1.3.2. Quantificação do flavonol Tiliosídeo nos extratos	69
5.1.4. Atividade antioxidante	71
5.1.5. Quantificação dos compostos fenólicos	78
5.2. Parte biológica	83
5.2.1. Ensaio em meio líquido	83
5.2.1.1. <i>Erwinia carotovora</i>	83
5.2.1.2. <i>Xanthomonas campestris</i>	87
5.2.1.3. <i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 17759	88
5.2.2. Ensaio com Sytox Green	91
6. RESUMO E CONCLUSÕES	94
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Percentual de citações para os gêneros da família Bignoniaceae quanto ao estudo químico	10
Figura 2: Peroba do campo (<i>Paratecoma peroba</i>)	10
Figura 3: Metabólicos representativos da família Bignoniaceae	11
Figura 4: Núcleo fundamental dos flavonoides	26
Figura 5: Biossíntese geral dos flavonoides	26
Figura 6: Estrutura química dos flavonóides quercetina (A), rutina (B) e apigenina (C)	27
Figura 7: Mecanismo de ação antioxidante (composto aromático aceitando elétron não emparelhado)	28
Figura 8: Esquema da obtenção do extrato metanólico dos calos de peroba do campo	34
Figura 9: Esquema da obtenção do extrato metanólico das folhas de peroba do campo	35
Figura 10: Gráfico da área do pico x massa (ug) injetada de SC2aa obtida a partir dos valores apresentados na tabela 4	38
Figura 11: Esquema do fracionamento e purificação do extrato metanólico dos calos	38
Figura 12: Esquema do fracionamento e purificação do extrato metanólico das folhas de peroba	39

Figura 13: Esquema da atividade antibacteriana dos extratos metanólicos e das frações das folhas de peroba pelo método da diluição em meio líquido	45
Figura 14: Cromatoplaça dos extratos metanólicos das folhas e dos calos realizado em CCD	47
Figura 15: Cromatograma 1, perfil químico do extrato metanólico dos calos avaliado por CLAE	49
Figura 16: Cromatograma 2, perfil químico do extrato metanólico das folhas avaliados por CLAE	50
Figura 17: Esquema do flavonoide e suas porções que geram as bandas de absorção características no UV	51
Figura 18: Espectro de Ultravioleta do pico de tempo de retenção (TR) igual a 18,8 minutos correspondente a extrato metanólico dos calos	51
Figura 19: Espectro de Ultravioleta do pico de tempo de retenção (TR) igual a 16,7 minutos correspondente ao extrato metanólico das folhas	52
Figura 20: Cromatoplaça dos conjuntos SC1, SC2, SC3, SC4 e SC5 obtidos do extrato dos calos realizado em CCD.....	53
Figura 21: Cromatograma 3, perfil químico do conjunto SC2 avaliado por CLAE	54
Figura 22: Cromatoplaça das frações hexânica (H), diclorometano (D), acetato de etila (A) e butanólica (B)	55
Figura 23: Cromatoplaça dos conjuntos SB1, SB2, SB3, SB4 e SB5 obtidos da fração butanólica do extrato das folhas realizado em CCD	56
Figura 24: Cromatograma 4, perfil químico do conjunto SB2 avaliado por CLAE	57
Figura 25: Cromatograma 5, perfil químico do conjunto SB3 avliado por CLAE	58
Figura 26: Cromatoplaça da fração SC2a realizada em CCD	59
Figura 27: Cromatoplaça da substância SC2aa realizada em CCD	60
Figura 28: Cromatograma 6, perfil químico da substância SC2aa avaliado por CLAE	61
Figura 29: Espectro de UV do pico de tempo de retenção (TR) igual a 17,820 minutos, correspondente a amostra SC2aa	62

Figura 30: Espectro de RMN ¹ H de SC2aa (500 MHz)	64
Figura 31: Espectro de RMN ¹ H de SC2aa (500MHz), com expansão da região dos sinais dos hidrogênios aromáticos	65
Figura 32: Estrutura do flavonol Tilirosídeo (SC2aa)	67
Figura 33: Espectro de RMN-2D HMBC para SC2aa (porção aromática correspondente a aglicona)	68
Figura 34: Espectro de RMN-2D HMBC para SC2aa (porção do açúcar)	68
Figura 35: Espectro de RMN-2D HMBC para SC2aa (porção do ácido <i>p</i> -cumárico)	69
Figura 36: Curva padrão do Tilirosídeo (SC2aa)	70
Figura 37: Cromatografia em Camada Delgada do padrão fenólico quercetina (Q) do extrato metanólico das folhas (EMF) e do extrato metanólico dos calos (EMC) de <i>Paratecoma peroba</i> reveladas com 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH)	71
Figura 38: Coloração durante o ensaio FRAP	76
Figura 39: Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico tetraciclina, do controle negativo (DMSO) frente à cepa <i>Erwinia carotovora</i>	84
Figura 40: Atividade antibacteriana do extrato metanólico dos calos e das folhas de <i>Paratecoma peroba</i> (peroba do campo) frente à cepa <i>Erwinia carotovora</i>	84
Figura 41: Atividade antibacteriana da fração diclorometano oriunda do extrato metanólico das folhas de <i>Paratecoma peroba</i> (peroba do campo) frente à cepa <i>Erwinia carotovora</i>	85
Figura 42: Atividade antibacteriana da fração hexânica oriunda do extrato metanólico das folhas de <i>Paratecoma peroba</i> (peroba do campo) frente à cepa <i>Erwinia carotovora</i>	85
Figura 43: Atividade antibacteriana da fração acetato de etila oriunda do extrato metanólico das folhas de <i>Paratecoma peroba</i> (peroba do campo) frente à cepa <i>Erwinia carotovora</i>	86
Figura 44: Atividade antibacteriana da fração butanólica oriunda do extrato metanólico das folhas de <i>Paratecoma peroba</i> (peroba do campo) frente à cepa <i>Erwinia carotovora</i>	86
Figura 45: Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico penicilina + estreptomicina), do controle negativo (DMSO) frente à cepa <i>Xanthomonas</i>	

<i>campestris</i>	87
Figura 46: Atividade antibacteriana dos extrato metanólico dos calos e das folhas de <i>Paratecoma peroba</i> (peroba do campo) frente à cepa <i>Xanthomonas campestris</i>	87
Figura 47: Atividade antibacteriana das frações oriundas do extrato metanólico das folhas frente à cepa <i>Xanthomonas campestris</i>	88
Figura 48: Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO) frente à cepa <i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 17759	89
Figura 49: Atividade antibacteriana do extrato metanólico das folhas e as respectivas frações, frente à cepa <i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 17759.....	89
Figura 50: Atividade antibacteriana do extrato metanólico dos calos de <i>Paratecoma peroba</i> , frente à cepa <i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 17759	90
Figura 51: Microscopia de fluorescência frente à cepa <i>E. carotovora</i> . (A) controle positivo (Tetraciclina) visto por DIC, (B) controle positivo (Tetraciclina) visto por fluorescência, (C) controle negativo visto por DIC, (D) controle negativo visto por fluorescência, (E) fração em diclorometano visto por DIC, (F) fração em diclorometano visto por fluorescência, (G) fração em hexano visto por DIC, (H) fração em hexano visto por fluorescência, (I) fração em butanol visto por DIC, (J) fração em butanol visto por fluorescência, (L) extrato metanólico dos calos visto por DIC, (M) extrato metanólico dos calos visto por fluorescência	92
Figura 52: Microscopia de fluorescência frente à cepa <i>B. cepacia</i> . (A) controle positivo (Gentamicina) visto por DIC, (B) controle positivo (Gentamicina) visto por fluorescência, (C) controle negativo visto por DIC, (D) controle negativo visto por fluorescência, (E) extrato metanólico dos calos visto por DIC, (F) extrato metanólico dos calos visto por fluorescência	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies brasileiras ameaçadas de extinção	7
Tabela 2: Gêneros da família Bignoniaceae encontrados em regiões subtropicais do Brasil	9
Tabela 3: Estrutura química dos constituintes característicos da família Bignoniaceae	12
Tabela 4: Estrutura química dos constituintes característicos isolados do gênero Tabebuia	17
Tabela 5: Estrutura química dos constituintes característicos isolados do gênero Zeyheria	21
Tabela 6: Estrutura química dos constituintes característicos isolados do gênero Arrabidaea	23
Tabela 7: Sistema de gradiente utilizado na CLAE	37
Tabela 8: Dados de massa (ug) injetada da amostra SC2aa isolada e as respectivas áreas obtidas	37
Tabela 9: Micro organismos utilizados nos ensaios biológicos	43
Tabela 10: Concentração das amostras iniciais	44
Tabela 11: Tempo de retenção e área obtidos por CLAE dos picos do extrato metanólico dos calos, do conjunto SC2, precursores da amostra isolada SC2aa	62
Tabela 12: Sinais listados de ¹ H para substância SC2aa	63
Tabela 13: Comparação dos sinais de ¹ H da amostra SC2aa e os sinais do Tiliosídeo descritos na literatura	66

Tabela 14: Quantificação do Tilirosídeo presente nos extratos metanólicos dos calos e das folhas de peroba	70
Tabela 15: Atividade antioxidante por sequestro do radical livre DPPH do extrato metanólico dos calos, dos conjuntos e dos padrões fenólicos quercetina, rutina e apigenina	73
Tabela 16: Atividade antioxidante por sequestro do radical livre DPPH do extrato metanólico das folhas, das frações, dos conjuntos e dos padrões fenólicos quercetina, rutina e apigenina	74
Tabela 17: Atividade antioxidante por redução do ferro do extrato metanólico dos calos, dos conjuntos e dos padrões fenólicos quercetina e rutina	76
Tabela 18: Atividade antioxidante por redução do ferro do extrato metanólico das folhas, das frações, dos conjuntos e dos padrões fenólicos quercetina e rutina	77
Tabela 19: Percentual de compostos fenólicos avaliados pelo método de Folin Denis dos extratos dos calos e das folhas	78
Tabela 20: Percentual de compostos fenólicos avaliados pelo método de Folin Ciocalteau	80
Tabela 21: Amostras que apresentaram os melhores resultados para atividade antioxidante relacionado com a presença de compostos fenólicos	82
Tabela 22: Extratos e frações que apresentaram inibição no crescimento bacteriano e respectivas bactérias fitopatogênicas	91

LISTA DE ABREVIações

AA	Atividade Antioxidante
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDB	Convenção sobre a Diversidade Biológica
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DMSO	Dimetil sulfoxido Deuterado
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EM	Espectrometria de Massas
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
IV	Infravermelho
McF	McFarland
MH	Müller Highton
MMA	Ministério do Meio Ambiente
RL	Radicais Livres
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Tr	Tempo de Retenção
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UV	Ultravioleta

RESUMO

Pinheiro, L.Z. M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, fevereiro de 2014. Avaliação do perfil químico e quantificação do potencial antioxidante e antibacteriano da espécie ameaçada de extinção *Paratecoma peroba* (Record e Mell) Kuhlmann (peroba do campo). Orientadora: Prof. Dr^a. Daniela Barros de Oliveira.

A espécie vegetal *Paratecoma peroba* (Record e Mell) Kuhlmann, popularmente conhecida como peroba do campo, é pertencente à família Bignoniaceae e apresenta grande importância econômica por ser muito utilizada para revestimentos e uso mobiliário, e por essa razão está ameaçada de extinção, que é um dos fatores que ocasionam a destruição e a fragmentação da biodiversidade. O objetivo desse trabalho foi conhecer o perfil químico do extrato metanólico dos calos e das folhas dessa espécie, a atividade antioxidante e a capacidade de inibir o crescimento de cepas da bactéria fitopatogênicas, o que evidenciou a efetividade da indução dos calos da espécie vegetal. Para a obtenção do extrato dos calos e das folhas, estes foram submetidos, em separado, à maceração exaustiva com metanol. Os fracionamentos cromatográficos foram realizados com o intuito de se obter a substância purificada. Após a purificação do extrato metanólico dos calos, obteve-se uma substância isolada (SC2aa), que foi enviada para análise por Ressonância

Magnética Nuclear (RMN) para sua elucidação estrutural, que a partir de dados espectroscópicos o flavonol Tilirosídeo foi identificado e quantificado nos extratos dos calos e das folhas, através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Com a quantificação do teor de compostos fenólicos totais foi possível observar que o extrato metanólico das folhas, bem como suas respectivas frações e conjuntos apresentam a maior concentração de fenóis totais. Os extratos metanólicos, frações e conjuntos, bem como a substância isolada e padrões químicos foram avaliados quanto sua atividade antioxidante por duas metodologias, pelo método do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilidrazila e pelo método de redução do ferro, que se baseia na redução do Fe^{3+} para Fe^{2+} , onde se verificou que ocorreu um aumento da capacidade antioxidante com a purificação, uma vez que as frações em diclorometano, acetato de etila e butanol, e os conjuntos SC2 e SB3 apresentaram um poder antioxidante superior a 50% até mesmo na menor concentração testada (10 $\mu\text{g/mL}$) para o método do radical livre estável. Essas mesmas frações e conjuntos mostraram melhor capacidade de redução do ferro. Na análise microbiológica, verificou-se que o crescimento de *Erwinia carotovora* foi inibido pelo extrato metanólico dos calos e pelas frações do extrato metanólico das folhas. Frente às espécies *Xanthomonas campestris* e *Burkholderia cepacia* as frações analisadas apresentaram crescimento bacteriano semelhante ao controle negativo, DMSO, onde não houve inibição das espécies avaliadas. As amostras que se mostraram ativas na inibição do crescimento bacteriano dessas bactérias fitopatogênicas foram submetidas ao ensaio com Sytox Green, onde se pode observar que a inibição do crescimento bacteriano possivelmente está relacionada a alteração da integridade da membrana das bactérias. Desta forma, este trabalho corroborou para o conhecimento químico e biológico dessa espécie vegetal ameaçada de extinção, sendo que é a primeira vez que o flavonol Tilirosídeo foi identificado para a espécie *Paratecoma peroba*, sendo as análises dos extratos, frações e conjuntos dos calos e das folhas frente a atividade antioxidante e a atividade antibacteriana para cepas fitopatogênicas pioneiras no que se refere a espécie vegetal.

ABSTRACT

PINHEIRO, L.Z. M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, february de 2014. Assessment of the chemical profile and quantification of antioxidant and antimicrobial potential of endangered species *Paratecoma peroba* (Record e Mell) Kuhl (peroba do campo). Advisor: Prof. Dr^a. Daniela Barros de Oliveira;

The plant species *Paratecoma peroba* (Record and Mell) Kuhl, popularly known as peroba do campo is belonging to Bignoniaceae family and has a great economic importance to be very utilized coverings and furniture use, and for that reason is an endangered species, which is one of the factors that cause the destruction and fragmentation of biodiversity. The aim of this study was to know the chemical profile of the methanol extract of the callus and leaves of this species, the antioxidant activity and ability to inhibit the growth of strains of plant pathogenic bacteria, which showed the effectiveness of induction of callus on plant species. To obtain the callus extract and leaves, these were submitted separately, the exhaustive maceration with methanol. The chromatographic fractionations were carried out in order to obtain purified substance. After purification of the

methanol extract of the callus, obtained a substance (SC2aa), which was sent for analysis by nuclear magnetic resonance (NMR) for structural elucidation, the spectroscopic data from the flavonol Tilirosídeo was identified and quantified in extracts of callus and leaves by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). By quantifying the content of phenolic compounds was observed that the methanol extract of the leaves as well as their respective sets and fractions having the highest concentration of total phenols. The methanolic extracts, fractions, and sets, as well as the chemical substance isolated and their patterns were evaluated for antioxidant activity by two methods, the method of the stable free radical 2,2-diphenyl-1-picrilidrazila and the method of reducing the iron which is based on the reduction of Fe^{+3} to Fe^{+2} , which was found that there was an increase in antioxidant capacity with the purification, since the fractions in dichloromethane, ethyl acetate and butanol and SC2 and SB3 set showed a higher antioxidant capacity 50 % even at the lowest concentration tested (10 ug / ml) for the method of stable free radical. These same fractions and sets showed better ability to reduce iron. The microbiological analysis, it was found that the growth of *Erwinia carotovora* was inhibited by the methanol extract of the callus and the fractions of the methanol extract of the leaves. Front species *Xanthomonas campestris* and *Burkholderia cepacia* fractions analyzed were similar to the negative control, DMSO, which showed no inhibition of bacterial growth. The samples that showed active in inhibiting bacterial growth of these plant pathogenic bacteria were tested, with Sytox Green, where you can observe that the inhibition of bacterial growth is possibly related to the change of membrane integrity of bacteria. Thus, this study corroborated for chemical and biological knowledge of this plant species threatened with extinction, and is the first time that the flavonol Tilirosídeo was identified to the species *Paratecoma mahogany*, and the analysis of the extracts, fractions and units of callus and front leaves the antioxidant activity and antibacterial activity phytopathogenic strains for pioneers in relation to plant species.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a União Internacional para a Conservação da Natureza (UICN) vem realizando a análise do risco de extinção de espécies de plantas em escala global. A lista vermelha sobre a flora brasileira de 2008 apresenta a avaliação do estado de conservação de 44.937 espécies, das quais pelo menos 38% foram classificadas como ameaçadas e 804 foram consideradas extintas (MMA, 2008).

O Brasil está no centro das controvérsias e das ações ligadas à questão da biodiversidade e por volta de 1990 assinou a Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB), ao qual o país possui a responsabilidade de realizar estudos sobre o conhecimento da diversidade da fauna e da flora. Desde então a pesquisas passaram a ser em regiões cujas espécies vegetais são pouco estudadas ou referente àquelas consideradas em nível de extinção (Filho *et. al.* 2009).

De maneira geral, a taxa de extinção das espécies ou a colonização pode ser alterada devido aos efeitos diversos sobre habitat remanescente como o uso indevido da espécie, bem como o efeito do desmatamento e das queimadas (Piqueray *et. al.*, 2011).

Neste contexto, pesquisas voltadas para o conhecimento do perfil químico dessas espécies vem ganhando grande foco, através da busca por meios de propagação *in vitro* a partir de fontes vegetais.

As plantas em desenvolvimento geralmente possuem concentrações adversas de gases nas regiões radiculares. Dióxido de carbono e outros gases

podem acumular-se na raiz da planta, aumentando a susceptibilidade desta a doenças de raiz, como a podridão causada por bactérias (Soares, et al., 2007; Sturz *et. al.*, 1997).

Desta forma, o estresse gerado em uma planta sob condições anaeróbicas ou aeróbicas no desenvolvimento ocasiona a redução do metabolismo celular, originando uma perda de integridade da membrana celular, oriunda do processo oxidativo advindo da formação de radicais livres, que podem levar a morte da espécie (Sturz *et. al.*, 1997).

Esse processo de oxidação está presente na produção de energia celular, sendo importante para a vida. No entanto, a proteção antioxidante torna-se necessária em casos de estresse oxidativo. Plantas são mais suscetíveis ao ataque oxidativo devido a disponibilidade de carbono para assimilação, alta temperatura e redução parcial da concentração de CO₂, que são condições desfavoráveis para a fotossíntese (Oncel *et. al.*, 2004) .

Compostos como alcalóides e fenóis podem atuar como antibacterianos, por atuarem na regulação da peroxidação lipídica, inibindo a formação de peróxido (Oliveira et al., 2007). Essas substâncias também conhecidas como antioxidantes são compostos que auxiliam na proteção dos organismos contra os efeitos destrutivos de radicais livres (RL) (Morais, et al.,2007).

Atualmente compostos derivados de plantas com potencial antioxidante estão sendo isolados em inúmeras famílias herbáceas (Carvalho et. al., 2009). No que se refere à família Bignoniaceae existem trabalhos que avaliam a capacidade de captura do radical livre em nível das folhas e, em nível das cascas, para capacidade antibacteriana (Carvalho *et. al.*, 2009; Lima *et. al.*, 2003).

A *Paratecoma peroba* (Record e Mell) Kuhl, popularmente conhecida como peroba do campo, é pertencente à família Bignoniaceae e apresenta grande importância econômica por ser muito utilizada para revestimentos e uso mobiliário, e por essa razão está ameaçada de extinção, que é um dos fatores que ocasionam a destruição e a fragmentação da biodiversidade (OBMG, 2012).

Desta forma, a busca por alternativas de propagação de espécies vegetais tem sido aprimorada, como a indução de calos de peroba em etapa evolutiva, dado que os calos são tecidos diferenciados capazes de se reproduzirem em partes da planta, como raízes e folhas (Grando *et. al.*,1993). Assim, torna-se evidente a importância de uma pesquisa com enfoque na avaliação da

composição química da peroba do campo, a fim de se identificar o possível potencial antioxidante e antibacteriana desta espécie, ainda não estudada sob o ponto de vista químico e biológico.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

O objetivo deste trabalho foi conhecer o perfil químico das folhas e dos calos da *Paratecoma peroba* (peroba do campo), que é uma espécie vegetal considerada em grau de extinção, muito encontrada no município de Campos dos Goytacazes – Rio de Janeiro, a fim de ampliar o conhecimento químico de seus extratos, bem como investigar sua atividade antimicrobiana e antioxidante.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil químico dos extratos e das frações das folhas e dos calos de peroba do campo (*P. peroba*);
- Avaliar a atividade antioxidante frente a duas metodologias;
- Testar o efeito *in vitro* dos extratos e frações sobre espécies de bactérias fitopatogênicas;
- Isolar e identificar substâncias fenólicas;
- Determinar os teores de fenóis totais.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Biodiversidade brasileira

O debate sobre o meio ambiente no Brasil surge nos anos 70, época em que entidades ambientalistas começaram a desenvolver trabalhos pioneiros em defesa das reservas naturais, como na Amazônia e na Mata Atlântica (Simiqueli, 2013).

A Conferência sobre a Biosfera realizada em Paris, em 1968, mesmo sendo uma reunião de especialistas em ciências, marcou o despertar de uma consciência ecológica internacional. Essa Conferência resultou no lançamento, em 1971, do Programa o Homem e a Biosfera, também conhecido como o Projeto MAB da UNESCO, com a finalidade da promoção do conhecimento, da prática e dos valores humanos para implementação nas boas relações entre as populações e o meio ambiente em todo o planeta (Simiqueli, 2013).

O termo desenvolvimento sustentável surge então, pela primeira vez, em 1980, publicado pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), pelo Fundo Mundial de Vida Selvagem (WWF) e pelo Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) (IBGE, 1993).

Na década de 90 o Brasil assina a Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB), que foi o tratado da Organização das Nações Unidas considerado importante instrumento internacional relacionado ao meio ambiente, em que o

país possui a responsabilidade de realizar estudos sobre o conhecimento da diversidade da fauna e da flora (Ferro et. al., 2006).

A Convenção foi estabelecida durante a ECO-92, a Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento (CNUMAD), realizada no Rio de Janeiro em 1992. Atualmente é o principal fórum mundial para questões relacionadas ao tema (Simiqueli, 2013; Filho et al., 2009).

Com a normatização de tratados e programas em contexto brasileiro, passa-se a se preocupar com dinamização do processo de conservação da flora, onde espécies pouco estudadas e consideradas em grau de extinção são o foco de pesquisas.

As amplas transformações ocorridas nas paisagens evidenciam o grau de ameaça de muitas espécies vegetais, o que acarreta no surgimento de iniciativas de conservação por parte do governo, de organizações não governamentais (ONGs) e de pesquisadores do setor público e privado, que buscam por meios de minimizar o estágio de extinção vegetal (Klink, 2005).

A demanda para a elaboração de estudos surge da necessidade de informações sobre a ocorrência de formações vegetais ameaçadas de extinção (Salis, 2006). Assim, surgiram pesquisas voltadas para estudos a partir dos gêneros da família Bignoniaceae: *Zeyeria*, *Arrabidaea* e *Tabebuia*, consideradas em grau de extinção (Tabela 1) (Dousseau, 2007; Puletti, 2003; Luz, 1985).

Pode-se observar também na tabela 1 outras espécies ameaçadas de extinção como as pertencentes a família Asteraceae, que engloba o maior quantitativo de gêneros considerados em grau de extinção, totalizando seis gêneros. Há também a família Annonaceae, representada por três gêneros em grau de extinção.

Com representativo de dois gêneros considerados em grau de extinção se encontram as famílias Bromeliaceae e Leguminosae, e com um gênero as famílias Burseraceae e Cactaceae.

Tabela 1: Espécies brasileiras ameaçadas de extinção.

Família	Espécie
ASTERACEAE	<i>Acritopappus subtomentosa</i> <i>Actinoseris polymorpha</i> <i>Actinoseris polyphylla</i> <i>Baccharidiopsis pohlii</i> <i>Baccharis dentata</i>
ANNONACEAE	<i>Annona cornifolia</i> <i>Annona crassiflora</i> <i>Annona tomentosa</i>
BURSERACEAE	<i>Trattinnickia tomentosa</i>
BROMELIACEAE	<i>Aechmea maculata</i> <i>Bilbergia minarum</i>
	<i>Arrabidea platyphylla</i>
BIGNONIACEAE	<i>Paratecoma peroba</i> <i>Tabebuia botelhensis</i> <i>Zeyheria Montana</i>
CACTACEAE	<i>Cipocereus laniflorus</i>
LEGUMINOSAE	<i>Acosmium cardenasii</i> <i>Chamaecrista anceps</i>

(Fonte: OBMG, 2012; MMA, 2008).

Para muitas espécies florestais de importância econômica ou que se encontram em extinção como espécies do gênero *Tabebuia*, a conservação da semente em nitrogênio líquido é a possibilidade de conservação, já que a semente é a forma pela qual a planta sobrevive o máximo de tempo com o mínimo de atividade fisiológica (Martins, 2009).

Como alternativa para minimizar a problemática da extinção há a micropropagação, utilizada para espécies do gênero *Tabebuia* e *Zeyheria*. Por apresentar germinação rápida, para o gênero *Arrabidea* a propagação é sexuada. Estes tem sido instrumentos úteis para a obtenção de mudas mais uniformes em

larga escala, em tempo e espaço físico reduzidos (Dousseau, 2008; Zamith et al., 2004).

A *Paratecoma peroba* (Record e Mell) Kuhlmann popularmente conhecida como peroba do campo é uma espécie nativa e integrante da diversidade biológica da região norte do Rio de Janeiro e em ameaça de extinção (Tabela 1) (Lins et al., 2010).

A importância de maiores estudos químicos sobre essa espécie, aliada a importância do registro químico de espécies endêmicas dos biomas brasileiros, motivaram o presente trabalho, que descreve o estudo da peroba do campo.

3.2. A família Bignoniaceae

A família Bignoniaceae compreende, aproximadamente, 120 gêneros e 800 espécies de plantas arbustivas. No Brasil está distribuída em 24 gêneros, encontrados desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul, sem habitat único (Tabela 2) (Junior, et al., 2010; Pauletti et al., 2003). Entre os gêneros brasileiros mais estudados destacam-se *Tabebuia*, *Arrabidaea* e *Zeyheria*, devido ao grau de extinção que se encontram (Junior, et al., 2010; Dousseau et al., 2007; Jácome, et al., 2001 ; Rizzini et al., 1997).

Tabela 2: Gêneros da família Bignoniaceae encontrados em regiões subtropicais do Brasil.

Gêneros da Família Bignoniaceae	Nº de espécies
<i>Adenocalymma</i>	80
<i>Amphilophium</i>	05
<i>Anemopaegma</i>	29
<i>Arrabidaea</i>	15
<i>Bignonia</i>	05
<i>Cuspidaria</i>	03
<i>Cybistax</i>	04
<i>Dolichandra</i>	05
<i>Fridericia</i>	08
<i>Handroanthus</i>	07
<i>Jacaranda</i>	40
<i>Lundia</i>	30
<i>Paratecoma</i>	20
<i>Mansoa</i>	05
<i>Oroxylum</i>	10
<i>Pyrostegia</i>	17
<i>Pleonotoma</i>	04
<i>Stizophyllum</i>	04
<i>Tabebuia</i>	40
<i>Tanaecium</i>	03
<i>Tecoma</i>	02
<i>Tynanthus</i>	05
<i>Xylophragma</i>	02
<i>Zeyheria</i>	18

(Fonte: Crepaldi et. al., 2013; Junior et. al., 2010; Rizzini et. al. 1997).

A espécie vegetal brasileira peroba do campo, que é encontrada em regiões tropicais e subtropicais, de madeira nobre, levemente pesada, é muito utilizada ornamentalmente e passou a ser foco de estudo desse trabalho (Junior et. al., 2010).

Esta família é representada por plantas lenhosas, de folhas opostas compostas, com folíolos frequentemente modificado em gavinhas, estames epipétalos, didínamos, gineceu bicarpelar, fruto do tipo cápsula e sementes aladas.

Trata-se de uma família de estudos etnobotânicos e econômicos, principalmente no que se refere ao uso na indústria de madeiras. Os dados de estudos químicos e etnobotânicos de alguns gêneros destacam-se nessa família

quanto o percentual de citações quanto ao estudo químico (Gráfico 1) (Arruda et al, 2012, Cipriani, 2012; Guimarães, 2011; Seito et al, 2011; Cipriani et al, 2007; Batistini, 2006; Pauletti et al, 2003) .

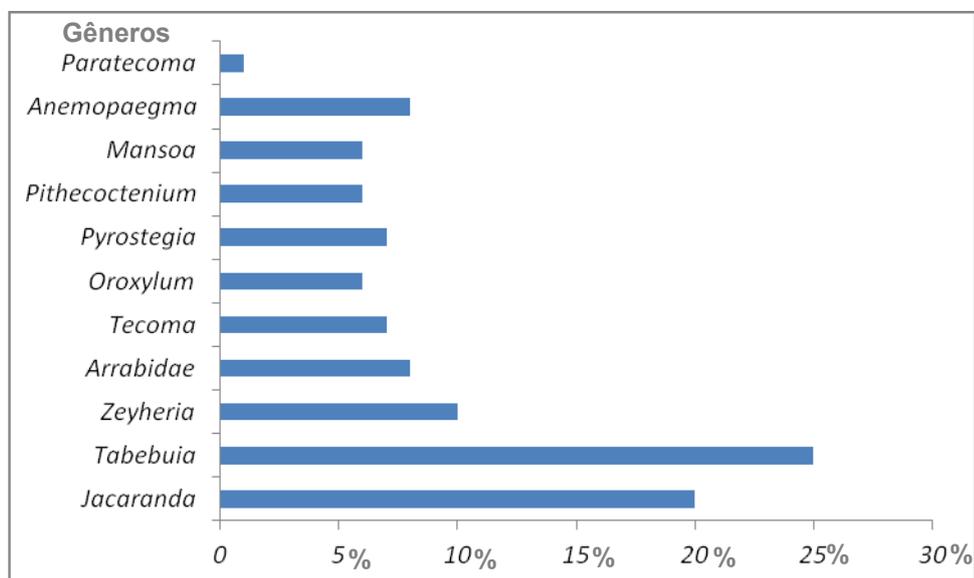


Figura 1: Percentual de citações para os gêneros da família Bignoniaceae quanto ao estudo químico.

O primeiro estudo caracterizado para o gênero *Paratecoma* foi relatado em 1955 com identificação de alguns constituintes químicos, as quinonas, sendo essas novamente identificadas em 1968 e 2012 para a espécie *Paratecoma peroba* (Figura 2). Esta espécie é caracterizada por possuir folhas completamente expandidas, nativa da costa leste do Brasil, entre Bahia e Rio de Janeiro (Lins et al., 2010; Silva et. al., 2001). O amadurecimento dos frutos da peroba do campo tem ocorrência de fevereiro a julho, e durante os meses de agosto a outubro há a dispersão de sementes (Lins et. al., 2010).



Figura 2: Peroba do campo (*Paratecoma peroba*).

Sabe-se que o processo de extinção acaba por fragmentar a biodiversidade, com base nisso atualmente pesquisadores voltam-se para a micropropagação em *in vitro*, a fim de se conservar a biodiversidade nativa das regiões (Nogueira *et. al*, 2007).

3.3. Constituintes químicos da família Bignoniaceae

A família Bignoniaceae é de ampla disseminação, compreende aproximadamente 120 gêneros, distribuídos pelos continentes. Quimicamente caracterizada por apresentar metabólicos secundários bioativos em espécies dessa família possui flavonóides, quinonas, terpenos, alcalóides, compostos fenólicos (Figura 3) (Cipriani *et al*, 2012; Pauletti *et. al.*, 2003).

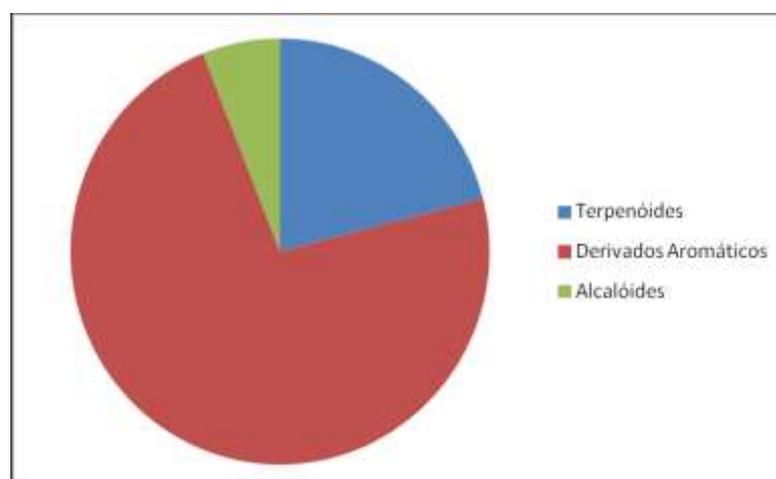
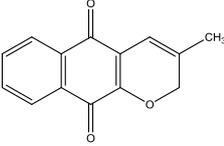
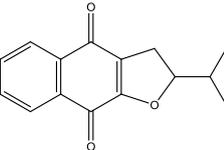
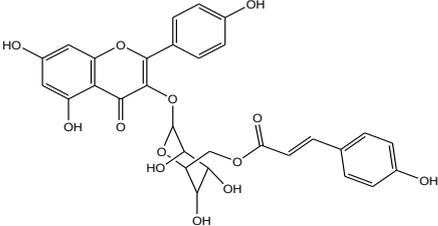
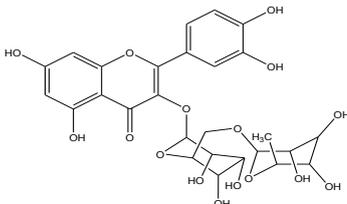
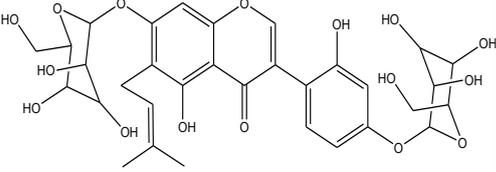
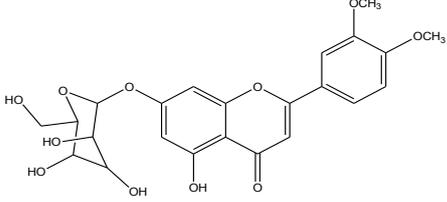
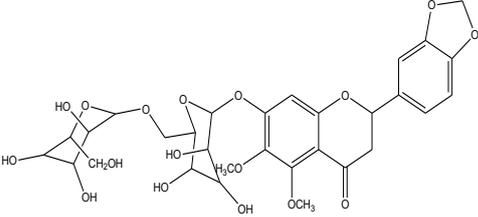
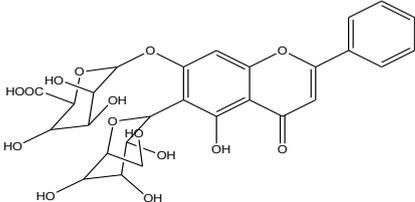


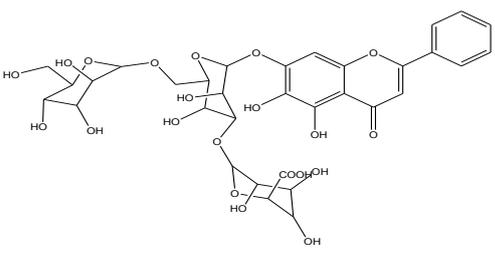
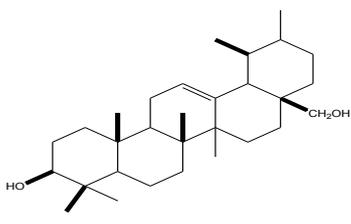
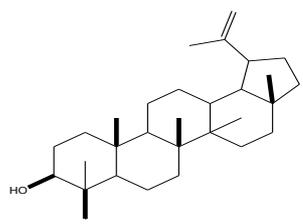
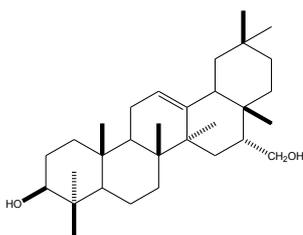
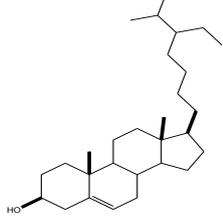
Figura 3: Metabólicos representativos da família Bignoniaceae.

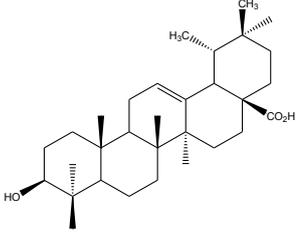
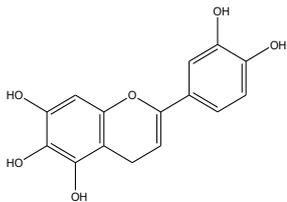
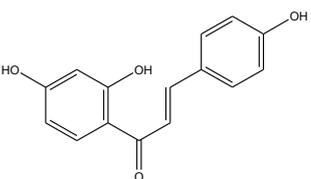
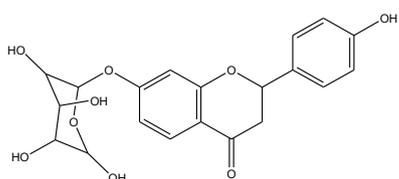
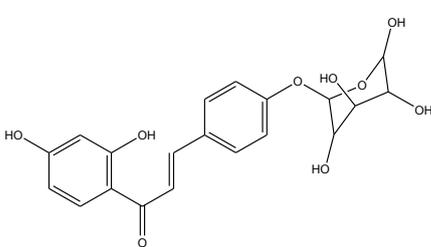
Entre os metabólicos secundários destacam-se nessa família a presença de terpenos, iridoides e derivados aromáticos (Tabela 3).

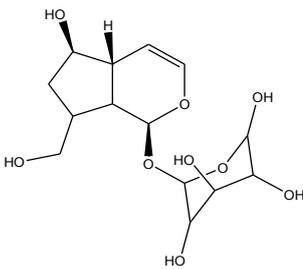
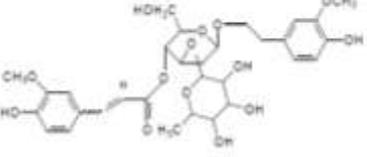
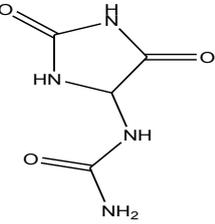
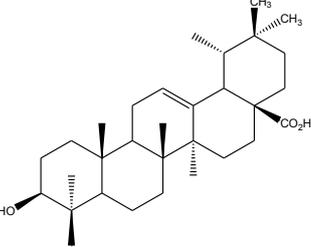
Tabela 3: Estrutura química de constituintes químicos característicos da família Bignoniaceae.

Espécie	Substância isolada	Referência
<i>Paratecoma peroba</i>	 <p>B-metilpirano-naftaquinona</p>	Sandermann et al. 1955.
<i>Paratecoma peroba</i>	 <p>A-isopropiril-naftaquinona</p>	Sandermann et al. 1955.
<i>Tecomella undulata</i>	 <p>Tilirosídeo</p>	Laghari et al. 2013.
<i>Tecomella undulata</i>	 <p>Rutina</p>	Laghari et al. 2013.

<p><i>Tecomella undulata</i></p>	 <p>Luteone 4',7-O-diglucosideo metilmalonilato</p>	<p>Laghari et al., 2013.</p>
<p><i>Tecomella undulata</i></p>	 <p>Luteolina 3',4'-dimetil-7-O-β-D- glicosideo</p>	<p>Laghari et al. 2013.</p>
<p><i>Tecomella undulata</i></p>	 <p>Flavanona 5,6-dimetoxi-3',4'- dioximetileno-7^o-(6''-β-D- glucopironosil-β-D-glucopiranosil)</p>	<p>Laghari et al. 2013.</p>
<p><i>Oroxylum indicum</i></p>	 <p>Crisina 6-C-β-D-glucopironosil-8- O-β-D-glucopiranosideo</p>	<p>Yan et al. 2011.</p>

<p><i>Oroxylum indicum</i></p>	 <p>Crisina 7-O-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosideo</p>	<p>Yan et al. 2011.</p>
<p><i>Arrabidaea samydoides</i></p>	 <p>Uvaol</p>	<p>Pauletti et. al. 2003.</p>
<p><i>Arrabidaea samydoides</i></p>	 <p>Lupeol</p>	<p>Pauletti et. al. 2003.</p>
<p><i>Arrabidaea samydoides</i></p>	 <p>Eritrodiol</p>	<p>Pauletti et. al. 2003.</p>
<p><i>Arrabidaea samydoides</i></p>	 <p>Estigmasterol</p>	<p>Pauletti et. al. 2003.</p>

<p><i>Arrabidaea samydoides</i></p>	 <p>Ácido ursólico</p>	<p>Pauletti et. al. 2003.</p>
<p><i>Tecoma australis</i></p>	 <p>6-hidroxluteotina</p>	<p>Harborne, 1967.</p>
<p><i>Jacaranda obtusifolia</i></p>	 <p>Isolequitigenina</p>	<p>Khamsan et al. 2012.</p>
<p><i>Jacaranda obtusifolia</i></p>	 <p>Neolequitirina</p>	<p>Khamsan et al. 2012.</p>
<p><i>Jacaranda obtusifolia</i></p>	 <p>Isolequitirina</p>	<p>Khamsan et al. 2012.</p>

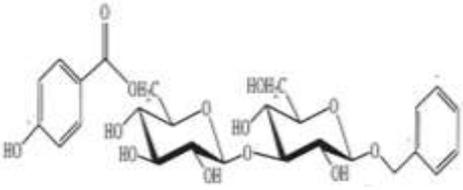
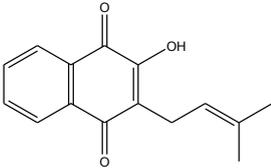
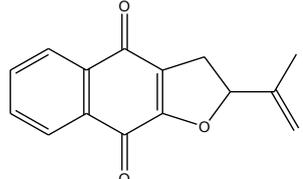
<p><i>Tabebuia heptaphylla</i></p>	 <p>Catalpol</p>	<p>Poser et al. 2000.</p>
<p><i>Pithrcoctenium crucigerum</i></p>	 <p>Orobanchin</p>	<p>Guimarães, 2011.</p>
<p><i>Pithrcoctenium crucigerum</i></p>	 <p>Alantofina</p>	<p>Guimarães, 2011.</p>
<p><i>Pithrcoctenium crucigerum</i></p>	 <p>Ácido oleonólico</p>	<p>Guimarães, 2011.</p>

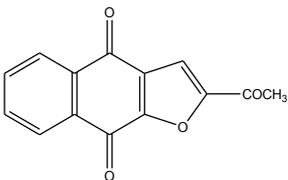
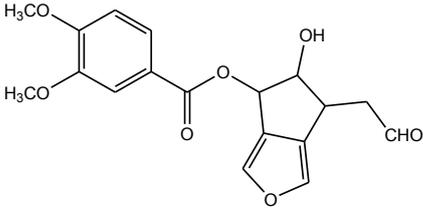
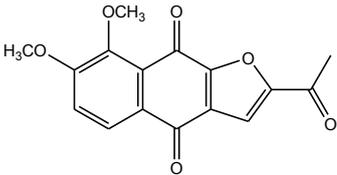
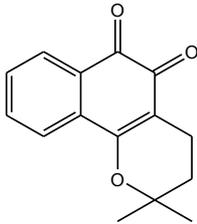
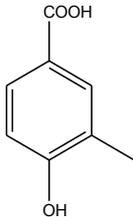
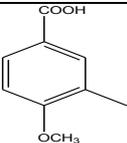
3.3.1. Constituintes químicos do gênero *Tabebuia*

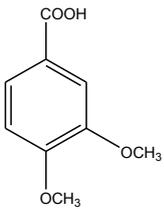
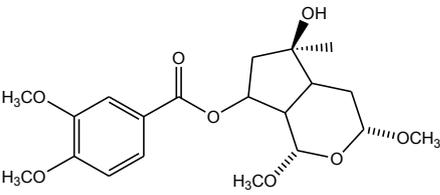
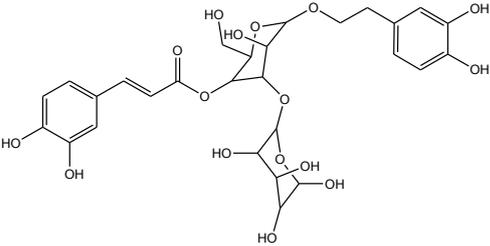
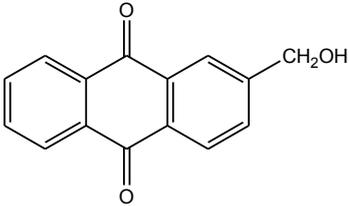
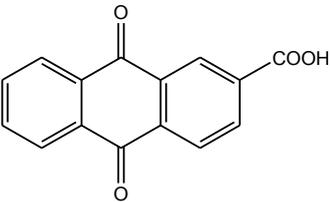
Este gênero pertencente à família Bignoniaceae é formado por árvores nativas ornamentais, a partir de programas voltados para propagação, uma vez que estão em grau de extinção (Garcia, et. al., 2012; OBMG, 2012; MMA, 2008).

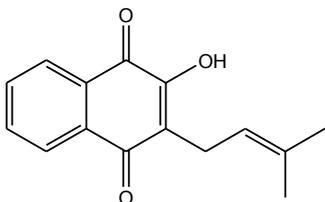
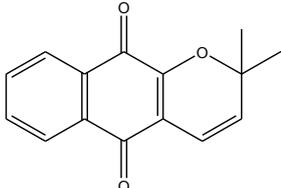
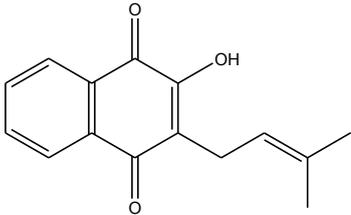
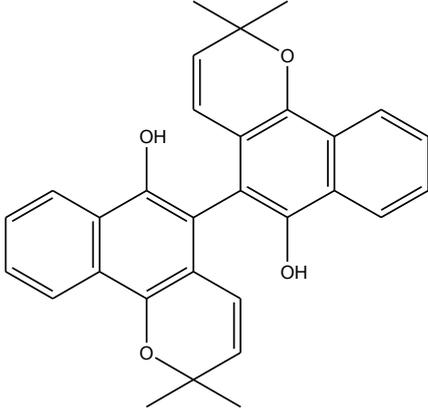
Constituído por cerca de setenta espécies descritas, sendo a espécie *Tabebuia roseo-alba*, (ipê branco) a mais conhecida delas. Destacam-se, neste gênero a presença do triterpeno $3\beta,6\beta,21\beta$ -trihidroiolean-12-eno, ácidos e de naftaquinonas, capazes de potencializar a atividade antioxidante da espécies vegetal (Tabela 4).

Tabela 4: Estrutura química de constituintes químicos isolados do gênero *Tabebuia*.

Espécie	Substância isolada	Referência
<p><i>Tabebuia argentea</i></p>	 <p>1-benzyl-[6-p-hydroxybenzoyl]-b-D-glucopyranosyl-(1-3)-b-D-glucopyranoside.</p>	<p>Abreu ET AL., 2014.</p>
<p><i>Tabebuia argentea</i></p>	 <p>Lapachol</p>	<p>Guimarães, 2011.</p>
<p><i>Tabebuia rosea</i></p>	 <p>2,3-dihidroxi-2-(1-metil-etil)-nafto(2,3-b)furano-4,9-dione</p>	<p>Sichaem et al., 2012.</p>

Tabebuia rosea	 <p>Nafto(2,3-b)furano-4,9-dione</p>	Sichaem et al., 2012.
Tabebuia avellaneda	 <p>Furano 3,4-disubstituido</p>	Suo et al., 2012.
Tabebuia avellaneda	 <p>Furanoquinona</p>	Suo et al., 2012.
Tabebuia avellaneda	 <p>β-lapachona</p>	Queiroz et al., 2008.
Tabebuia heptaphylla	 <p>Ácido p-hidroxibenzóico</p>	Garcez et. al., 2007.
Tabebuia heptaphylla	 <p>Ácido p-metaxibenzóico</p>	Garcez et. al., 2007.

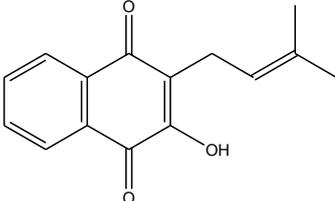
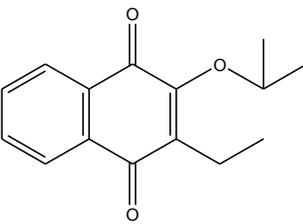
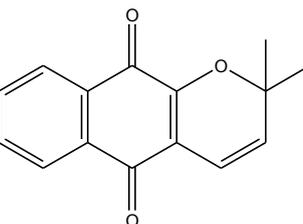
<p>Tabebuia heptaphylla</p>	 <p>Ácido 3,4-dimetoxibenzóico</p>	<p>Garcez <i>et. al.</i>, 2007.</p>
<p>Tabebuia heptaphylla</p>	 <p>Iri dóide</p>	<p>Garcez <i>et. al.</i>, 2007.</p>
<p>Tabebuia heptaphylla</p>	 <p>Glicosídeo fenil etanóide</p>	<p>Garcez <i>et. al.</i>, 2007.</p>
<p>Tabebuia impetiginosa</p>	 <p>2-hidrometil-antraquinona</p>	<p>Park <i>et al.</i>, 2006.</p>
<p>Tabebuia impetiginosa</p>		<p>Park <i>et al.</i>, 2006.</p>

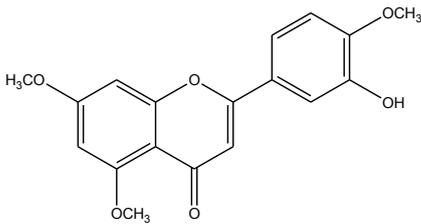
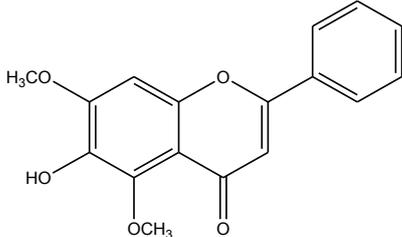
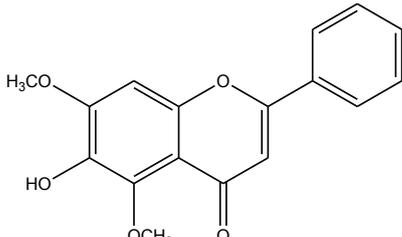
	Antraquino-2-ácido carboxílico	
Tabebuia impetiginosa	 <p>2-hidroxi-3(3-metil-2-butano-)1,4-naftaquinona</p>	Park et al., 2006.
Tabebuia Avellanadae	 <p>Desidro-α-lapachona</p>	Steinert et al, 1995.
Tabebuia Avellanadae	 <p>Lapachol</p>	Steinert et al, 1995.
Tabebuia guayacan	 <p>Tectol</p>	Manners et al., 1975.

3.3.2. Constituintes químicos do gênero *Zeyheria*

O gênero *Zeyheria* é constituído por 18 espécies distribuídas pelos continentes, sendo a *Z. montana* popularmente conhecida na região brasileira como bolsa de pastor, devido ao grau de extinção que se encontra. Destacam-se nesse gênero abundante presença de naftaquinonas, como o lapachol, o α -lapachona e o desidro- α -lapachona e de flavonóides como o 4,5,7-trimetoxiluteolina, o 6-hidroxi-6,7-dimetoxiflavona e o 5-hidroxi-6,7-dimetoxiflavona, todos com atividade biológica comprovada (Seito et al., 2011; Jácome et al., 1998).

Tabela 5: Estrutura química de constituintes químicos isolados de raízes e de folhas do gênero *Zeyheria*.

Espécie	Substância isolada	Referência
Zeyheria montana	 <p style="text-align: center;">Lapachol</p>	Jácome et al., 1998.
Zeyheria montana	 <p style="text-align: center;">α-lapachona</p>	Jácome et al., 1998.
Zeyheria montana	 <p style="text-align: center;">desidro-α-lapachona</p>	Jácome et al., 1998.

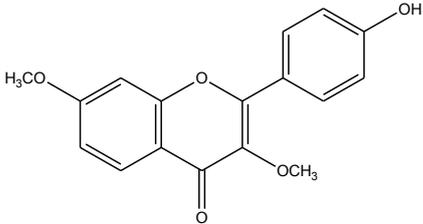
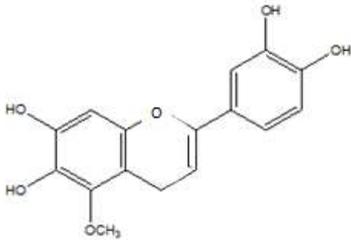
Zeyheria montana	 <p>4,5,7-trimetoxi-luteolina</p>	Seito et al., 2011.
Zeyheria montana	 <p>6-hidroxi-6,7-dimetoxiflavona</p>	Seito et al., 2011.
Zeyheria montana	 <p>5-hidroxi-6,7-dimetoxiflavona</p>	Seito et al., 2011.

3.3.3. Constituintes químicos do gênero *Arrabidea*

Este gênero é constituído por quinze espécies descritas pelos continentes, sendo a espécie *Arrabidea chica* a mais estudada, pelo fator de impacto ambiental gerado pelo uso da madeira. Para o gênero há presença de xantonas, flavonas e triterpenos com atividade antioxidante (Pauletti et. al., 2003).

As folhas dessa espécie são utilizadas por indígenas contra pragas e mosquitos. Neste gênero são observadas majoritariamente a substância 4-hidroxi-3,7-dimetoxiflavona (Barbosa et. al., 2008; Takemura et al, 1994).

Tabela 6: Estrutura química de constituintes químicos de folhas e de caules do gênero *Arrabidaea*.

Espécie	Substância isolada	Referência
Arrabidaea chica	 <p>4-hidroxi-3,7-dimetoxiflavona</p>	Barbosa et al., 2008.
Arrabidaea chica	 <p>6,7,3',4'-tetra-hidoxi-5-metoxiflavona</p>	Takemura et al., 1994.

Quanto ao estudo da peroba-do-campo (*Paratecoma peroba*), há descrito na literatura a identificação de quinonas em 1968, devido a isto torna-se de extrema importância a potencialização dos estudos a respeito desta espécie ameaçada de extinção (OBMG, 2012; Sanderman et al., 1968).

3.3.4. *Paratecoma peroba* (Record e Mell) Kuhlm

A *Paratecoma peroba* possui floração de outubro a novembro. O amadurecimento do fruto tipo cápsula pode ser observado de fevereiro a julho, com dispersão das sementes em agosto (Lins *et. al.*, 2010).

Pertencente ao grupo dos Ipês, a peroba do campo é alvo da economia brasileira, o que maximiza sua extinção, por ser de madeira nobre, muito requisitada na fabricação de móveis. Esse setor consome aproximadamente 59%

da madeira maciça, que é composta por 33% da madeira de floresta natural (Junior, et al., 2010; Rosa et. al., 2007).

A literatura não apresenta relatos sobre o potencial antioxidante e antibacteriano para essa espécie, e no que se referem às substâncias químicas presentes foi apenas identificadas quinonas, em estudos realizados em 1955 e 2012 (Tabela 3). No entanto, para a família Bignoniaceae, a qual pertence, existem relatos de tais potenciais químicos e biológicos.

Nesse contexto, o avanço no conhecimento químico e biológico a partir dos extratos e frações das folhas e dos calos de peroba, com enfoque para o potencial de inibição para bactérias fitopatogênicas, que é característica de mecanismos de defesa de espécies vegetais, certamente se mostra necessário, devido a ausência de estudos, e o que certamente contribuirá para um melhor entendimento desta planta, e a partir daí a possibilidade de minimizar os impactos quanto a sua provável extinção.

3.4. Propagação de espécies vegetais

Há muitos anos técnicas de biotecnologias são aplicadas em programas de melhoramento de plantas através do resgate de embriões, cultivo de protoplastos, produção de sementes artificiais e micropropagação (Almeida *et. al.*, 2001).

A micropropagação possui como ponto principal o aumento rápido do número de indivíduos, garantindo deste modo a preservação da biodiversidade. Entre as técnicas de micropropagação, tem-se a organogênese indireta, ao qual passa-se pela fase de calo, que são células diferenciadas capazes de se reproduzir em qualquer parte da planta (Nogueira *et. al.*, 2007). Para que ocorra a indução de calos qualquer tecido vegetal pode ser utilizado, como tecidos florais imaturos e pétalas (Fukuda *et. al.*, 2011; Melo *et. al.*, 2008; Silva *et. al.*, 2006).

A micropropagação também conhecida como multiplicação vegetativa *in vitro* tem por finalidade reproduzir plantas idênticas à planta-matriz, a partir da qual foram retirados os explantes. Este termo foi originalmente definido por Hartmann e Kester (1984), como todo o processo, em condições assépticas ou não, utilizando tecidos ou células vegetais com a finalidade de produzir novas

plantas, sem a utilização da via sexuada (Pinheiro et al., 2012; Fukuda et. al., 2011).

Desta forma, a multiplicação pode ser realizada através da proliferação de gemas apicais ou axilares, da indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta e da embiogênese somática (Pinhal et al., 2011; Fukuda et. al., 2011; Droste et al., 2005).

Durante o processo de micropropagação a oxidação fenólica é altamente dependente da espécie e do genótipo. Em geral, explantes jovens oxidam menos que os velhos, outro fator que influencia a oxidação *in vitro* é a época do ano. Nos períodos do ano mais favoráveis ao crescimento, a oxidação fenólica dos explantes *in vitro* é menor, entretanto pode haver a oxidação danificando o explante, conseqüentemente impossibilitando a perfeita indução dos calos (Batista, 2012; Flores et. al., 2007).

Danos físicos e químicos são evitados com adição de compostos antioxidantes, como cisteína e ácido ascórbico, bem como a presença dos próprios compostos fenólicos de espécies vegetais, como rutina e quercetina, pode ser decisiva na prevenção à oxidação, a qual é mais acentuada nas fases iniciais de cultivo (EMBRAPA, 2006).

3.5. Substâncias químicas a serem investigadas

3.5.1. Compostos fenólicos

A presença de compostos fenólicos em espécies vegetais tem sido alvo de pesquisadores por apresentarem propriedades antioxidantes e antimicrobianas (Abe et. al., 2007).

Os compostos fenólicos são substâncias polifenólicas presentes nas fontes vegetais, como quercetina e antocianinas. Esses compostos apresentam efeitos relevantes para as plantas e os animais (Bernardes, 2010).

Quimicamente, os flavonóides podem ser identificados como uma substância de baixo peso molecular formado por dois anéis benzênicos (A e B) que são conectados por um anel de três carbonos contendo um oxigênio (anel C) (Harborne, 1977).

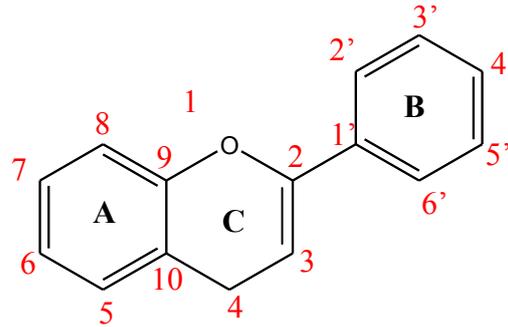
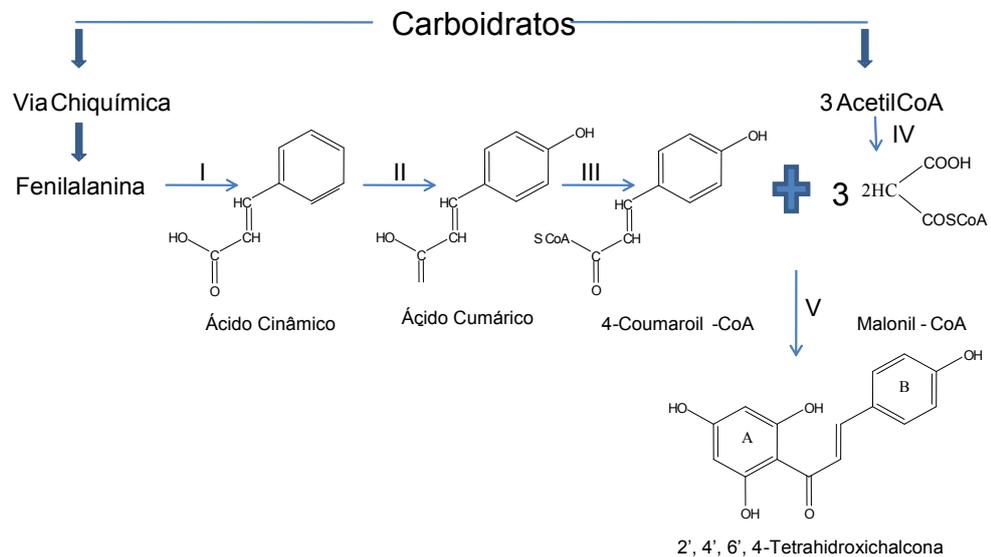


Figura 4: Núcleo fundamental dos flavonoides.

O metabolismo das plantas é dividido em metabolismo primário e secundário, mas, na realidade, não existe uma divisão exata entre os dois tipos. Admite-se, porém, que os lipídios, as proteínas, os carboidratos e os ácidos nucléicos, que são comuns aos seres vivos e essenciais para a manutenção das células, são originados do metabolismo primário. E as substâncias originadas a partir de rotas biossintéticas diversas, são produtos do metabolismo secundário, como os flavonoides (Bernardes, 2010).



(Fonte: Ribani, 2006)

Figura 5: Biossíntese geral dos flavonoides

Nas espécies vegetais, os compostos fenólicos, como por exemplo, quercetina, rutina e apigenina (Figura 6) podem atuar como antioxidantes pela capacidade de doar elétrons, proporcionando as espécies vegetais proteção

contra os radicais livres produzido sobre condições de estresse (Sakihama *et. al*, 2002).

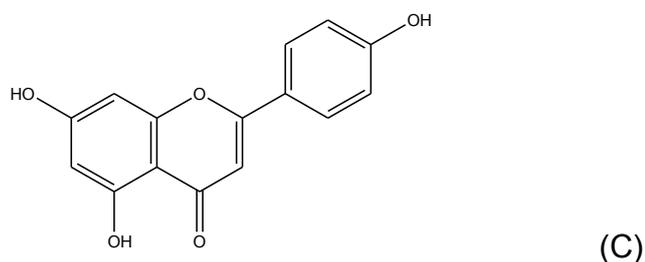
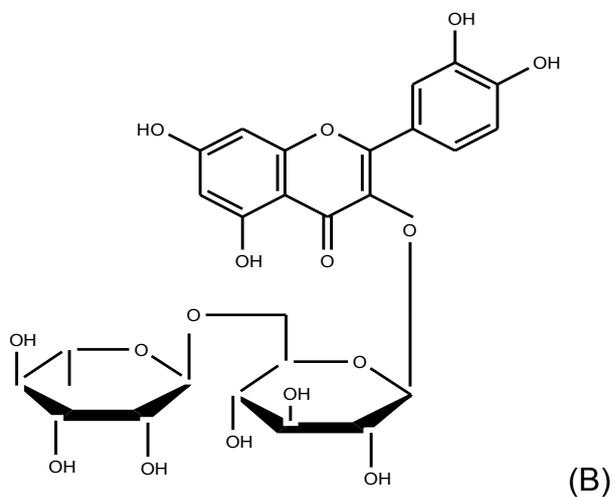
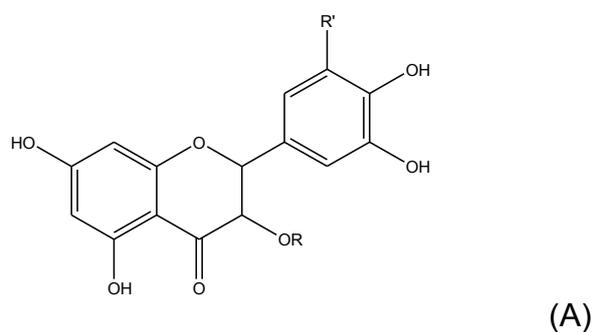


Figura 6: Estrutura química dos flavonoides quercetina (A), rutina (B) e apigenina (C).

Segundo Amma (2009) e Aimé (2003) a variação na capacidade antioxidante dos padrões fenólicos quercetina, rutina e apigenina são estabelecidos pelas estruturas químicas dos mesmos, pois a relação esta diretamente inclusa na

presença de maior número de hidroxilas e ligações insaturadas na estrutura da molécula, assim flavonóides que se apresentam hidroxilados, principalmente nas posições com os grupos 3-OH, 5-OH, 7-OH, 4'-OH e 3'-OH são os que apresentam maior propriedade antioxidante. Com isso, o poder antioxidante desses metabólitos se deve a facilidade com que um átomo de hidrogênio, a partir de uma hidroxila do anel aromático, pode ser doado para um radical livre. E a capacidade de um composto aromático em estabilizar um elétron não emparelhado (Figura 7).

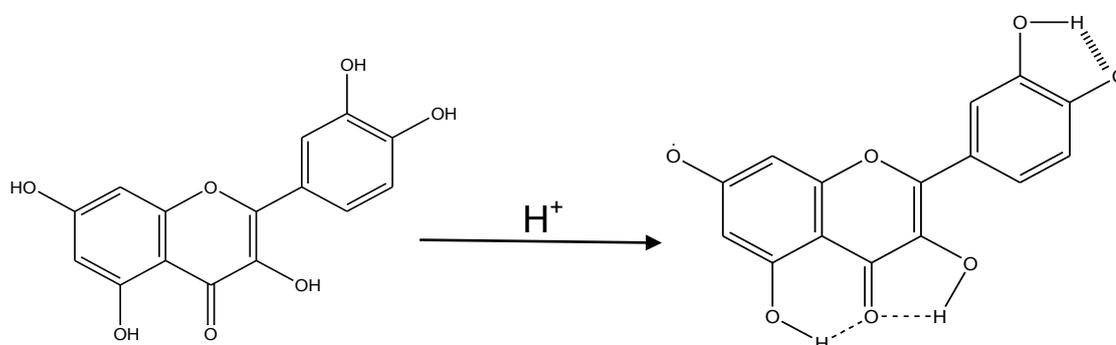


Figura 7: Mecanismo de ação antioxidante (composto aromático aceitando elétron não emparelhado)

3.6. Equilíbrio oxidativo *versus* antioxidantes

3.6.1. Radicais Livres

Vários fatores podem levar à superprodução de espécies reativas de oxigênio em plantas, que uma vez formados ocasionam danos altamente reativos e tóxicos para plantas, causando danos na estruturas de proteínas, lipídios, carboidratos e DNA, quadro este conhecido como estresse oxidativo (Gill et. al., 2010; Shah, 2009).

Os radicais livres (RL) podem ser caracterizados como moléculas orgânicas e inorgânicas, que possuem átomos contendo um ou mais elétrons desemparelhados, ou seja, elétrons isolados ocupando um orbital atômico ou

molecular (Halliwell, 2011; Bernardes, 2010). Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são as oriundas do oxigênio molecular (O_2) e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) do nitrogênio (N), estas espécies são capazes de propagar as reações de cadeia que envolvem a formação de espécies radicalares (Cerqueira *et al.*, 2007). Os antioxidantes são substâncias capazes de inibir ou retardar o processo de oxidação da espécie vegetal no meio ambiente (Bernardes, 2010).

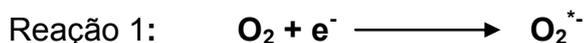
3.6.2. Formação dos RLs

3.6.2.1. Espécies reativas de oxigênio (EROs)

Entre as principais EROS encontram-se os radicais hidroxila (HO^*) e superóxido ($O_2^{\bullet-}$), altamente tóxicos e os não radicalares como oxigênio (O_2) e peróxido de Hidrogênio (H_2O_2).

O oxigênio singlete (1O_2) e o radical hidroxila (HO^*), ambos de alto teor tóxico são os que causam maiores danos nos organismos, isto por terem tempo de meia vida curto, o que dificulta sua captura *in vivo*. (David *et. al.*, 2006).

O oxigênio é um átomo divalente e possui a capacidade de receber elétrons, um de cada vez, desta forma tem-se que a formação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é dada pelo mecanismo ao qual o oxigênio recebe um elétron no seu estado fundamental (Reação 1).



Algumas proteínas da parede celular, formam ligações cruzadas após a presença do agente invasor, mediadas pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A formação do radical hidroxila (HO^*) ocorre quando o peróxido de hidrogênio recebe mais um elétron e um íon hidrogênio (Taiz, 2009) (Reação 2).



O radical hidroxila (HO^*) é o oxidante mais forte dessa espécie ativas de oxigênio, podendo iniciar reações em cadeias, levando a peroxidação lipídica, capaz de inativar enzimas e degradar ácidos nucleicos (Taiz, 2009).

Os radicais $\text{O}_2^{\bullet-}$ e HO^* são chamados radicais livres por terem elétrons não pareados em sua órbita externa, no entanto o peróxido de hidrogênio não é um radical livre, mas apresenta um metabólico de oxigênio parcialmente reduzido (David *et. al.*, 2006; Schneider *et. al.*, 2004).

3.6.2.2. Espécies oriundas dos metais

As plantas obtêm o ferro do solo, onde está presente como ferro férrico (Fe^{+3}) e óxidos ($\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$). Em pH neutro, o Fe^{+3} é insolúvel, as raízes acidificam o solo aumentando a disponibilidade de ferro pela exsudação de prótons durante a assimilação e absorção dos cátions (Taiz, 2009).

Compostos secretados pela raiz como ácido málico formam quelatos estáveis com o ferro. O ferro livre, que não está complexado com compostos de carbono podem interagir com o oxigênio para formar ânions superóxidos (O_2^-), que por sua vez acarretam a degradação de componentes lipídicos das membranas da célula vegetal (Taiz, 2009).

O ferro ferroso (Fe^{+2}) pode reagir com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) originando o radical hidroxil (OH^*) e Fe^{+3} , este considerado prejudicial por ser considerado um radical livre (Reação 3) (David *et. al.*, 2006).

Reação 3:



Assim, se pode observar que a presença de compostos antioxidantes favorecem o crescimento de espécies vegetais, uma vez que estas moléculas auxiliam no combate de radicais livres.

Desta forma, a capacidade antioxidante da planta pode estar diretamente relacionada com capacidade de inibição de micro organismos. Os compostos fenólicos presentes em tecidos vegetais podem inibir o desenvolvimento

bacteriano e a produção de toxinas que se localizam especialmente nos tecidos externos, o que possibilita a proteção da estruturas vegetais (Souza, et al., 2012).

3.7. Inibição do desenvolvimento bacteriano

Há muitos indícios que compostos fenólicos apresentam comprovada ação antibacteriana e esta pode ocorrer, entre outros mecanismos, pela inativação de sistemas enzimáticos dos microrganismos envolvidos na produção de energia e na síntese de componentes estruturais (Taiz, 2009). O principal grupo de compostos com atividade antimicrobiana, extraídos de plantas incluem terpenóides, óleos essenciais, alcalóides, quinonas e flavonóides (Gonçalves et al, 2005)

A inibição da síntese das toxinas pelos compostos fenólicos pode ser atribuída à diminuição do estresse oxidativo, que é um pré-requisito para a produção, além da diminuição da peroxidação lipídica e a formação de radicais livres geradas por esses compostos (Höfling et. al., 2010)

Para a família Bignoniaceae existem relatos de inibição para *Saccharomyces cerevisiae* rad pelo gênero *Arrabidea*, e espécies de *Candida* pelo gênero *Tabebuia* (Junior et. al., 2010; Höfling et. al., 2010; Pauletti et. al., 2003 Portillo et. al., 2001). Porém são raros os trabalhos observados na literatura que versam sobre a inibição bacteriana frente a micro-organismos fitopatogênicos, no entanto, a contaminação de espécies vegetais por bactérias do gênero *Erwinia* que apresentam-se sob forma de bastonete provida de flagelos peritricos e de coloração gram negativa é comum, o que acarreta danos no desenvolvimento da planta, podendo acarretar na morte da muda (Barras et. al., 1994; Galli et al, 1980).

Entre outras bactérias fitopatogênicas responsáveis por morte de mudas estão as espécies do gênero *Xanthomonas*, que apresentam-se sob a forma de bastonetes gram negativos, que formam, em meio de carne, colônias com pigmentos amarelos típicos do gênero; e as do gênero *Burkholderia*, que se apresentam também como bastonetes gram negativos (Filho et al., 2007; Tebaldi et al., 2007; Romeiro, 2005; Barras et al., 1994; Galli et al, 1980).

Pesquisas revelaram a importância de lipopolissacarídeos e do ferro no sistema de adaptação das bactérias (Gomes *et al*, 2005). A utilização de sais de cálcio é uma alternativa para inibir o desenvolvimento bacteriano, dado que esses sais complexam com o ferro dificultando o crescimento bacteriano, outro efeito fisiológico gerado pela adição de sais de cálcio é dada pela interação desses sais (íons) às pectinas presentes na parede celular do vegetal, impedindo que as enzimas pectinolíticas liberadas pelo patógeno degradem a parede celular da espécie vegetal (Gomes et al, 2005).

Não foi encontrado nenhum relato na literatura que mencione os constituintes químicos e a capacidade de proteção fisiológica do gênero *Paratecoma*, com isso, esse é o primeiro trabalho a abordar a capacidade antioxidante relacionada com a potencial antibacteriano de acordo com os compostos fenólicos presentes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos relacionados a parte química como, Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografica em Coluna (CC) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, RJ e a parte biológica, que envolve a avaliação antimicrobiana, foi realizada no Laboratório de Sanidade Animal (LSA) do CCTA no setor de Microbiologia do Hospital Veterinário, sob a supervisão da Professor Doutor Olney Vieira da Motta.

4.1 Coleta de Material Vegetal

As folhas de peroba foram coletados no campus da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - RJ, localizada no município de Campos dos Goytacazes (Latitude = 21° 48' S. Longitude 41° 20'. Altitude = 11 m ao nível do mar), no mês de fevereiro de 2012. A exsicata encontra-se depositada no Herbário do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) sob o número 5588 (09/03/2010).

Os calos foram cedidos pelo Laboratório de Biologia Celular Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro pela Professora Doutora Claudete Santa Catarina.

4.2. Preparo dos extratos metanólicos

4.2.1. Extrato metanólico dos calos de peroba do campo

Os calos foram triturados com o auxílio de grau e pistilo em meio alcoólico, utilizando o solvente metanol absoluto (CH_3OH), na proporção de 10% peso/volume de calos (Figura 8). Este extrato foi evaporado em banho-maria a 35°C , ao abrigo da luz (Oliveira, 2005).

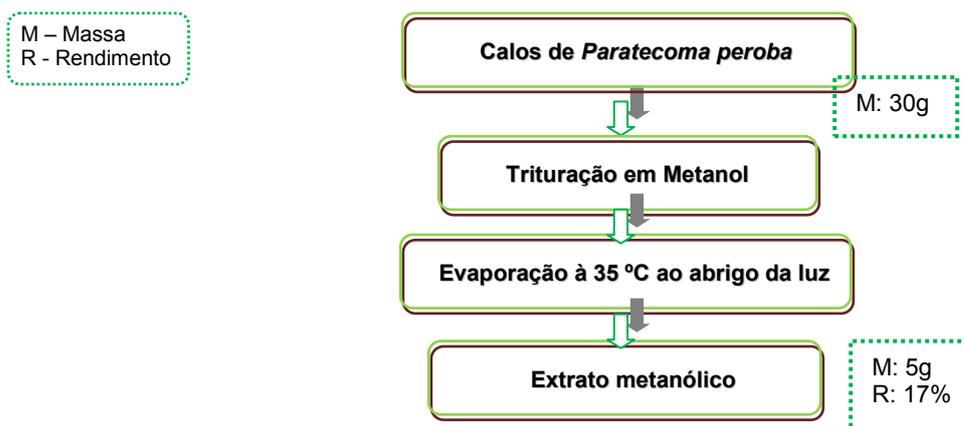


Figura 8: Esquema da obtenção do extrato metanólico dos calos de peroba do campo.

4.2.2. Extrato metanólico das folhas de peroba do campo

As folhas foram limpas e secas em estufa à 25°C . Em seguida, as folhas foram submetidas à trituração e maceração exaustiva em meio alcoólico por 20 dias, utilizando o solvente Metanol absoluto (CH_3OH), na proporção de 10% peso/volume das folhas maceradas, sendo que, a cada 3 dias, foi trocado o solvente (Figura 9). Este extrato foi evaporado em banho-maria a 35°C , ao abrigo da luz (Oliveira, 2005).

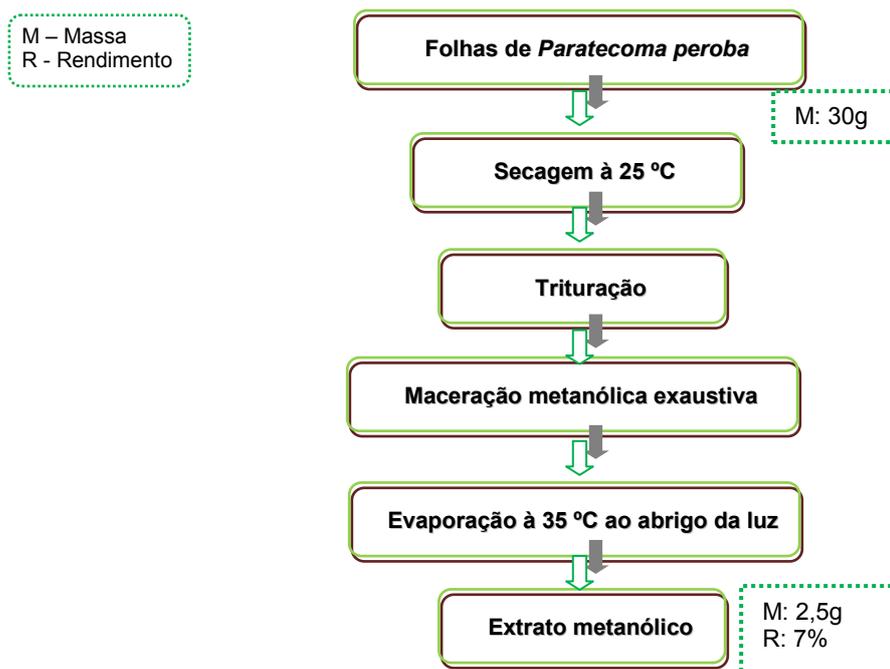


Figura 9: Esquema da obtenção do extrato metanólico das folhas de peroba do campo.

4.3. Parte Química

4.3.1. Fracionamento dos extratos e identificação das frações

Em princípio os extratos foram avaliados, em separado, por Cromatografia de Camada Delgada (CCD), onde foram utilizadas placas cromatográficas de sílica gel 60 F₂₅₄ em Alumínio, espessura 0,2 mm da MERCK (20x20 cm), cortadas na medida de 4X6 cm de comprimento e as aplicações das amostras feitas a aproximadamente 0,5 cm acima da borda do inferior da placa e de distância das bordas laterais. Para a caracterização da composição da amostra usou-se fase móvel butanol:ácido acético glacial:água (BAW) na proporção de 8:1:1 (Rodrigues *et. al.*, 2004; Okumura *et. al.*, 2002).

O processo de cromatografia para que seja eficaz é preciso utilizar reveladores químicos e/ou físicos para se verificar os constituintes do extrato (Sabudak *et. al.*, 2008). Para este caso, as placas utilizadas estavam pré-impregnadas com material fluorescente, e, portanto, foram reveladas sob lâmpada UV nos comprimentos de onda de 254 e 350 nm (método físico). Como revelador químico utilizou-se a solução ácida de sulfato sérico, preparado com ácido

sulfúrico concentrado e água (5:5). Após o preparo do revelador este foi aplicado sobre a placa cromatográfica e depois aquecido para o aparecimento das manchas, que apresentam coloração amarela característica para compostos fenólicos, que são as substâncias de interesse. Com a finalidade de realçar a tonalidade das cores das CCDs, utilizou-se o programa de edição de imagens Nero Photo Snap Essentials 7.02. 9491.

Com avaliação da CCD, o extrato metanólico dos calos foi submetido a Cromatografia em Coluna com Lipofílica Sephadex LH-20, e aos demais testes (Figura 13).

Para o extrato metanólico das folhas, após a avaliação da CCD, foi submetido ao processo de partição líquido-líquido utilizando solventes de diferentes polaridades, como segue: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol (Richter *et. al.*, 2002; Hostettmann *et. al.*, 1990). Após a evaporação dos solventes, foram obtidas as frações: fração hexânica, fração em diclorometano, fração acetato de etila e fração butanólica. O extrato metanólico e as frações obtidas foram submetidos à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), a fim de avaliar o perfil químico destes e submetidos aos testes antioxidantes e antibacterianos (Figura 14).

As análises por CLAE foram realizadas no aparelho Shimadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT. A detecção feita nos comprimentos de onda fixos de 254 nm e 332 nm (detector por varredura de espectro ao ultravioleta por arranjo de fotodiodos SPD-M10A) e injetor Rheodyne 7725i com volume de injeção de 20 µL. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5µm, 4,0 x 250mm). O sistema de solvente foi água acidificada com ácido fosfórico (pH 3,2) e acetonitrila, a eluição foi utilizado gradiente, conforme ilustrado na tabela 3, com fluxo de 1 ml/min. Os extratos e frações foram preparados na concentração de 5 mg/ml (p/v).

Tabela 7: Sistema de gradiente utilizado para realização de CLAE.

Tempo (min)	Concentração de A (água acidificada)	Acetonitrila
0	100	0
5	75	15
10	80	20
15	70	30
20	60	40
25	59	41
30	58	42
40	50	50
45	100	0

Para a quantificação do flavonoide isolado nos extratos foi realizada uma curva padrão (área do pico x massa em ug) utilizando a amostra isolada SC2aa (Tabela 8).

Tabela 8: Dados de massa (ug) injetada da amostra SC2aa isolada e as respectivas áreas obtidas.

Massa SC2aa injetada (ug)	Área correspondente ao pico
1000	20891347
500	11001301
200	2904787
100	691658
50	101332

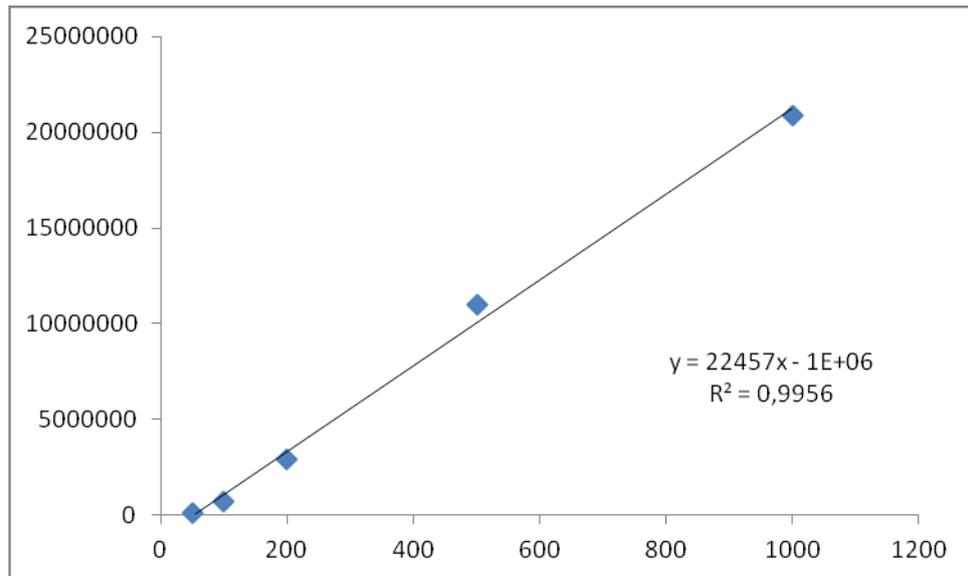


Figura 10: Gráfico da área do pico x massa (ug) injetada de SC2aa obtida a partir dos valores apresentados na tabela 8.

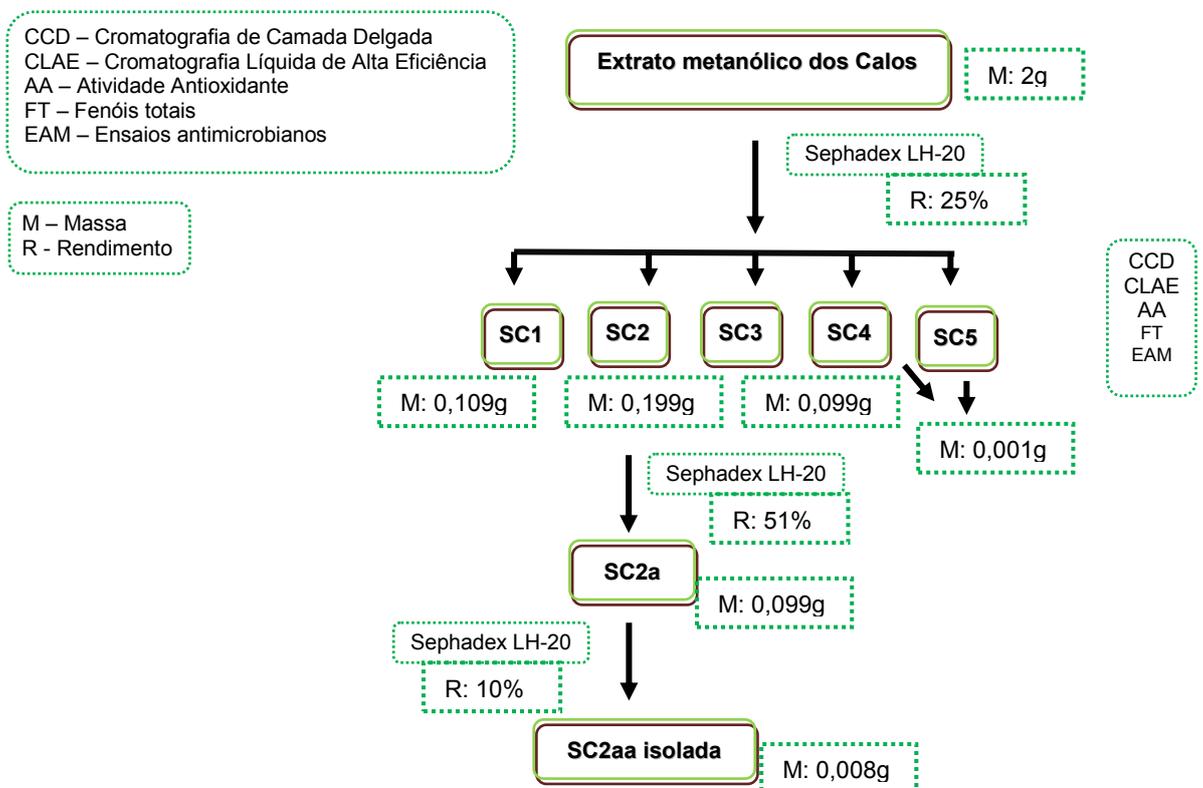


Figura 11: Esquema do fracionamento e purificação do extrato metanólico dos calos de peroba e isolamento da substância SC2aa com eluente Etanol.

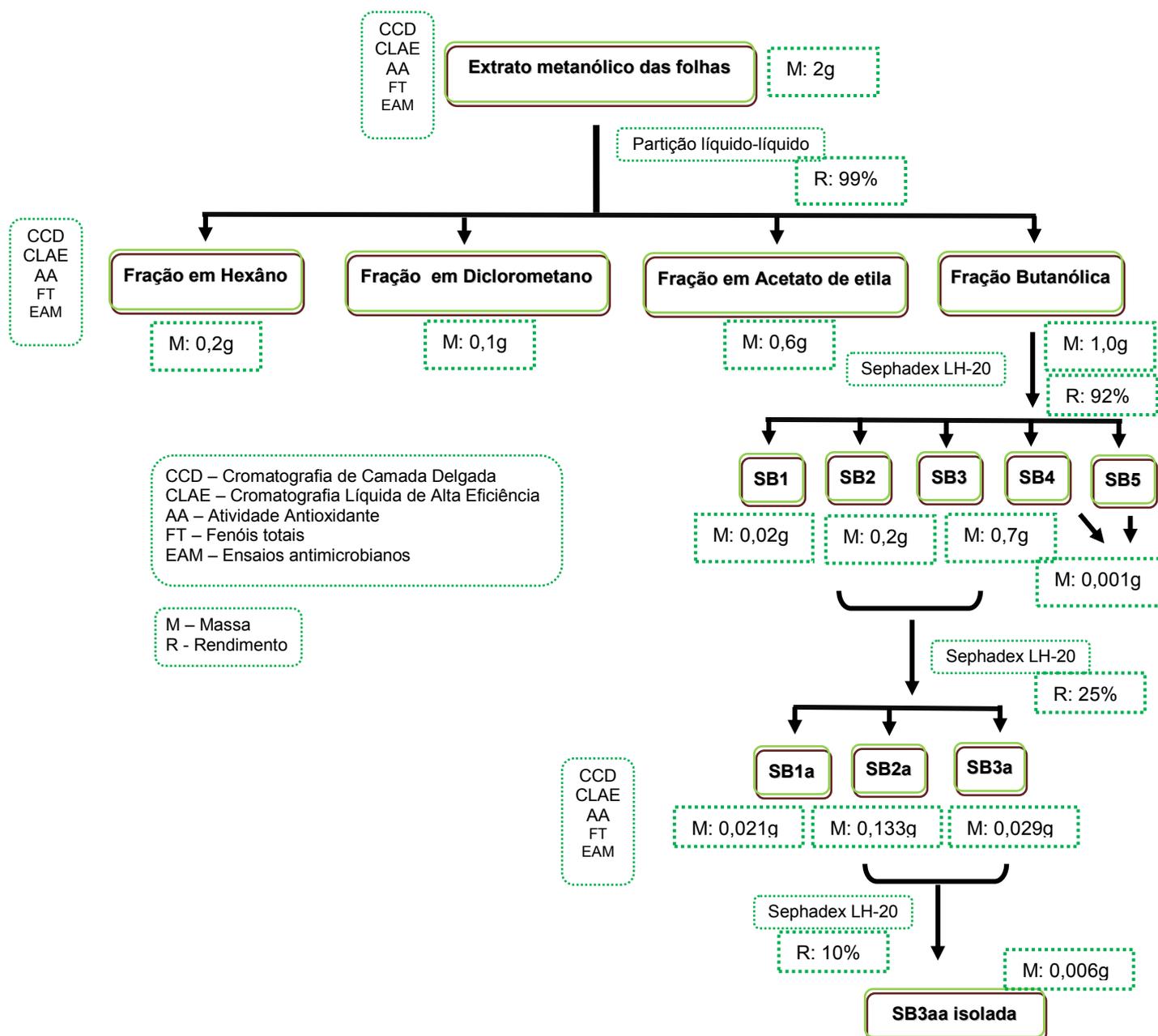


Figura 12: Esquema do fracionamento e purificação do extrato metanólico das folhas de peroba.

Para a identificação e caracterização das substâncias isoladas foram necessários a utilização de métodos espectroscópicos como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C , que é uma técnica espectroscópica primordial para a elucidação estrutural da molécula. O espectro de RMN fornece um mapa do esqueleto de carbono-hidrogênio de uma molécula orgânica. A amostra foi solubilizada em DMSO deuterado.

O equipamento utilizado foi o Varian 500 MHz, do LAMAR - NPPN/ UFRJ (Laboratório de Análises Multiusuários por RMN).

4.3.2. Atividade antioxidante

4.3.2.1. Atividade Antioxidante por sequestro do radical DPPH

Para avaliação da atividade antioxidante pelo método fotolorimétrico do radical livre estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) adicionou-se 0,5 ml do extrato em concentrações que variam de 10 - 1000 µg/ml. A este foi adicionado 0,5 ml de uma solução metanólica de DPPH (0,1 mM), a reação foi processada por 1h à temperatura ambiente. Em seguida, a absorção do DPPH foi verificada em 515 nm em um espectrofotômetro UV-Vis. O espectrofotômetro utilizado foi o UV-VIS Shimadzu Mini 1240. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

A atividade seqüestradora de radicais livres de cada extrato foi expressa pela relação da absorção de DPPH, baseado na solução de DPPH ausente do extrato (controle negativo) e uma solução de um padrão de substância aromática (controle positivo), a quercetina. Posteriormente, foi calculado o percentual seqüestrador (PS%) de radicais livres (Koleva *et. al.*, 2002; Tait *et. al.*, 1996). A capacidade de seqüestrar radical livre foi expressa como percentual de inibição de oxidação do radical e calculado conforme fórmula abaixo.

$$\% \text{ Inibição} = ((A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Extr}})/A_{\text{DPPH}}) * 100$$

Onde A_{DPPH} é a absorbância da solução de DPPH e A_{Extr} é a absorbância da amostra em solução (Roesler *et. al.*, 2007).

Este método se baseia no seqüestro do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) pelos antioxidantes, que por vez produzem uma diminuição de absorção em 515 nm. Quando uma solução de DPPH é adicionada à uma substância que pode doar um átomo de hidrogênio, a forma reduzida do radical gerado é acompanhada de perda de cor (Ali *et. al.*, 2009).

4.3.2.2. Atividade antioxidante por Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

O extrato bruto das folhas e dos calos foram avaliados quanto à capacidade seqüestradora do radical livre DPPH por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando amostras na concentração de 6 mg/ml (aplicação de 120 µg).

As amostras foram submetidas à revelação com DPPH. Esse processo consiste em borrifar as cromatoplacas com a solução de 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) e após 10 minutos de secagem a temperatura ambiente, obsevou-se as manchas amarelas, que correspondem às substâncias capazes de seqüestrar os radicais livres (Oliveira, 2005).

4.3.2.3. Atividade Antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada pelo método de fotolorimétrico de redução do ferro (FRAP).

A técnica do FRAP consiste inicialmente em preparar a amostra com uma concentração de 2 mg/mL. Logo após, transfere-se 90 µL para tubos de ensaio e adiciona-se 270 µL de água destilada. A estes adiciona-se 2,7 mL do reagente FRAP, a reação é processada em banho-maria à 37°C por 30 minutos ao abrigo da luz. Em seguida a leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis a 515 nm. Foi realizada uma curva padrão com o padrão Trolox nas concentrações que variam de 50 a 2000 µM. A capacidade de reduzir o ferro do extrato e frações foi expressa por µM Trolox/ mg de extrato. Também foram utilizados os padrões quercetina e rutina (flavonóides com alta capacidade antioxidante).

Para todas as amostras o espectrofotômetro utilizado foi da marca UV-VIS Shimadzu Mini 1240 e todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3.3. Método para Dosagem de Fenóis Totais por Folin Denis

O extrato metanólico das folhas e calos da peroba-do-campo (500 mg) foram macerados por quatro vezes com 5 mL de solução de acetona/ água (7:3).

As porções foram unidas em balão volumétrico e o volume completado para 25 mL. Em seguida, o reagente de Folin-Denis foi adicionado a 0,5 mL dos extratos das amostras e 3 mL de água destilada, e posteriormente avolumado para 10 mL. Posteriormente 1 mL da solução de carbonato de cálcio saturada foi adicionado, e as amostras positivas desenvolveram coloração azul intensa. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 760 nm (Moreira, 2000).

Para todas as amostras o espectrofotômetro utilizado foi da marca UV-VIS Shimadzu Mini 1240 e todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3.4. Método para Dosagem de Fenóis Totais por Folin Ciocalteau

As amostras foram preparadas na concentração de 1,0 mg/mL em metanol. Foram retirados 30 µL dessas amostras e transferidas para placa de 96 poços. Em seguida foram adicionados 50 µL do reagente de Folin- Ciocalteau (1 N) e acrescentados 100 µL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 7,5% após 10 min. A leitura da absorvância foi realizada a 760 nm após 2 h de incubação à temperatura ambiente. A curva padrão foi realizada com ácido gálico, em concentrações que variavam de 5,0 a 500 µg/mL.

O experimento foi realizado em triplicata.

Através de uma curva de calibração de ácido gálico foi possível correlacionar a intensidade da cor à concentração de fenóis presentes na amostra, sendo o resultado expresso em equivalente de ácido gálico (GAE) (Zimmer, et al; 2012).

4.4. Parte biológica: Ensaio microbiológicos dos extratos metanólicos, frações e substâncias isoladas.

4.4.1 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados neste trabalho foram as bactérias *Burkholderia cepacia*, *Xanthomonas campestris* e *Erwnia carotovora*, cujas caracterizações estão descritas na Tabela 9.

Tabela 9: Micro-organismos utilizados nos ensaios biológicos.

Micro-organismo	Grupo	Cepa	Procedência
<i>Burkholderia cepacia</i>	Gram-negativa	ATCC 17759	Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz – RJ
<i>Xanthomonas campestris</i>	Gram-negativa	Isolado	Isolado de maracujá
<i>Erwnia carotovora</i>	Gram-negativa	Isolado	Isolado de couve

4.4.1.1. Preparo dos inóculos

As cepas das bactérias foram distintamente cultivadas, em separado, em agar estoque (BHA-Brain Heart agar, Himedia, Índia), previamente reativadas em tubos de ensaio contendo caldo BHI (Himedia, Índia) e levadas à estufa de crescimento bacteriológico (Quimis) a 37°C por 24 horas. A concentração inicial de cada inóculo foi obtida através da transferência de colônias ativadas para caldo BHI estéril até atingir uma turbidez equivalente a uma concentração de 0,5 McF em fotômetro (Densimat®, bioMérieux, França), equipado com leitor para comprimento de onda 550 nm (Araújo et al., 2004).

4.4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

4.4.2.1. Concentração mínima inibitória (Diluição em Caldo)

Para a avaliação da atividade antibacteriana dos extratos metanólicos e das frações de *P. peroba*, foi empregado o método da diluição em meio líquido, baseado na metodologia descrita por Lemos 1997.

O extrato metanólico e as frações foram solubilizados em DMSO P.A. nas seguintes concentrações descritas na tabela 10.

Tabela 10: Concentração das amostras iniciais.

Amostra	Concentração
Extrato MeOH Folhas	100 mg/100 μ L
Extrato MeOH Calos	100 mg/100 μ L
Fração solúvel dos Calos	11 mg/100 μ L
Fração Diclorometano Folhas	11 mg/100 μ L
Fração Hexano Folhas	11 mg/100 μ L
Fração Acetato de Etila Folhas	11 mg/100 μ L
Fração Butanólica Folhas	11 mg/100 μ L

Em seguida, os extratos e frações foram diluídos em água estéril na concentração de 10mg/mL e 10 μ L de cada amostra diluída, em separado, foi adicionada a 170 μ L do meio Müller Highton (MH) líquido (Himedia, Índia) em tubos tipo eppendorfs, juntamente com um volume de 20 μ L de suspensão da bactéria utilizada, padronizada pela turvação equivalente a 0,5 da escala de MacFarland (inóculo). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Após a incubação dos eppendorfs em estufa de crescimento bacteriano a 37°C por 6 horas, uma alíquota de 30 μ L do conteúdo de cada eppendorf foi semeado em placas de Petri contendo meio MH sólido (Himedia, Índia), conforme ilustra o esquema mostrado na Figura 5. Após o período de incubação das placas (em estufa de crescimento bacteriológico a 37°C por 24 horas), foi identificada a presença ou não de UFCs (Unidades Formadoras de Colônias) obtidas em cada experimento, com subsequente comparação com o controle.

Os controles foram preparados de maneira similar ao extrato e frações, sendo que foi adicionado à 170 μ L de meio MH líquido e 20 μ L de inóculo, 10 μ L do antibiótico, sendo a gentamicina na concentração de 2 μ g/mL o controle positivo para *Burkholderia*, a tetraciclina na concentração de 40 μ g/mL o controle para a *Erwinia* e uma solução penicilina/estreptomicina para *Xanthomonas*. Como controle negativo utilizou-se 10 μ L do solvente DMSO P.A. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

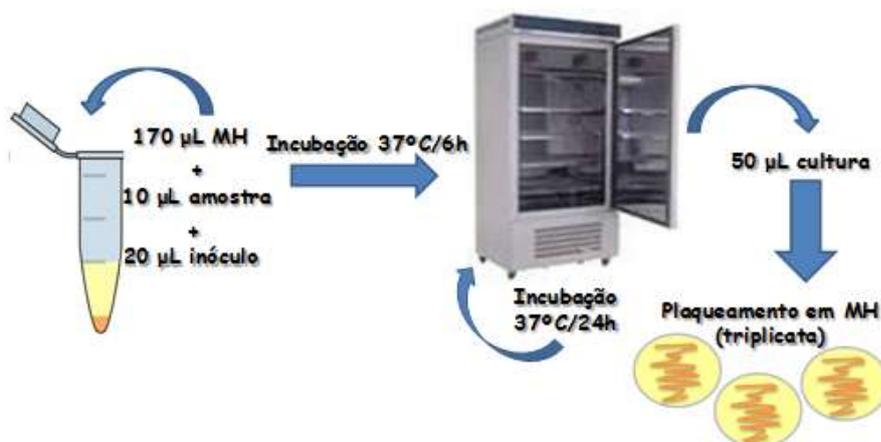


Figura 13: Esquema da atividade antibacteriana dos extratos metanólicos e das frações das folhas de peroba pelo método da diluição em meio líquido.

4.4.3. Ensaio com Sytox Green (Permeabilização das membranas)

O ensaio avalia a integridade da membrana plasmática de bactérias. O reagente Sytox Green é um corante com cargas positivas, que é repelido por membrana de células eucarióticas e procarióticas. Quando a membrana do microorganismo está comprometida há a ligação do reagente com ácidos nucleicos, que resulta na emissão de fluorescência (Roth et al., 1997).

Usou-se a metodologia descrita por Agizzio e colaboradores (2006) com modificações, onde as bactérias padronizadas pela turvação equivalente a 0,5 da escala de MacFarland foram incubadas, em separado, em 170 µL de meio Müller Highton durante 24 horas. Após incubação foi adicionado 10 µL os extratos e frações ativos para ensaio em meio líquido e eppendorfs incubados por mais 24 horas.

Após a incubação, realizou-se a centrifugação (Centrífuga 5415D) rotação de 10 RCF por 7 minutos. Em seguida a lavagem com 200 µL de PBS.

Adicionou-se 100 µL o reagente Sytox Green na concentração de 0,5 µM SYTOX e 100 µL de PBS ao abrigo da luz e aguardou-se a reação por 30 minutos.

Observou-se os resultados em um microscópio Axioplan DIC (AxioCan MRc5, Zeiss) equipado com um conjunto de filtros de fluorescência

(comprimentos de onda de excitação , 450 a 490 nm ; comprimento de onda de emissão de 500 nm (Agizzio et al., 2006).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Parte química

5.1.1. Extratos metanólicos

Inicialmente o perfil cromatográfico dos extratos metanólicos das folhas e dos calos (Figura 14), foram submetidos à Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

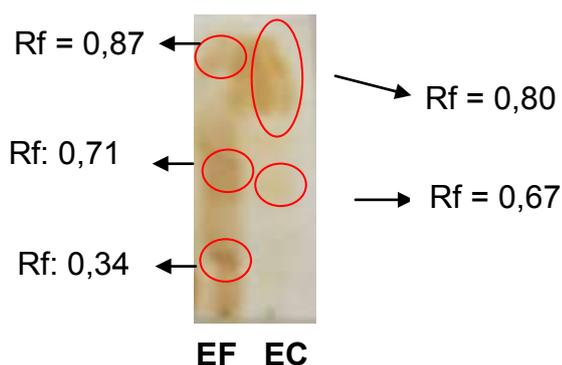


Figura 14: Cromatoplaça dos extratos metanólicos das folhas (EF) e dos calos (EC) realizado em CCD. Fase móvel: butanol:acetato:água (8:1:1) e revelado com sulfato cérico.

Verifica-se na figura 14 que o sistema de solventes utilizado mostrou-se satisfatório, pois houve separação de algumas manchas, assim se pode verificar que a concentração de substâncias fenólicas é elevada no extrato metanólico das

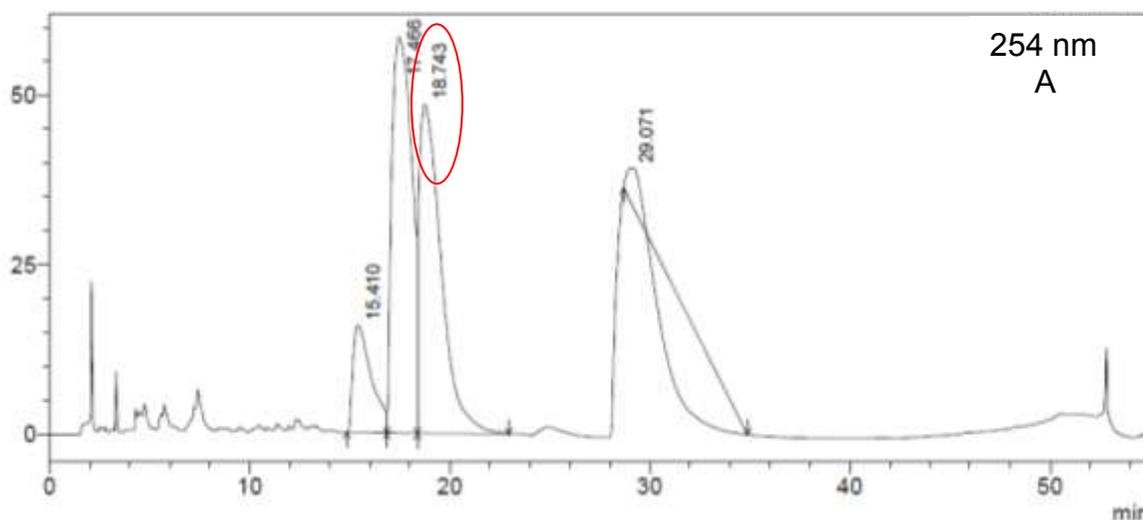
folhas, uma vez que é possível notar três manchas majoritárias características para tais substâncias (Sabudak et al, 2005)

Para o extrato dos calos pode-se observar a presença de duas manchas bem pronunciadas, características de compostos fenólicos, cujo respectivos fatores de referência (Rf), são 0,67 e 080.

Para o extrato das folhas têm-se três manchas majoritárias com os valores de Rf de 0,34, 0,71 e 0,87. Essas manchas características de compostos fenólicos sob revelação em luz UV (332 nm) apresentam coloração azul.

Nota-se então na figura (16) que as manchas com os valores mais altos de Rf são as mais polares, e se apresentam com coloração amarela mais intensa em luz visível. Devido às características observadas (manchas largas, intensa e com arraste), nos sugere ser uma mistura de substâncias que correspondem aos fenólicos (Sabudak et al., 2005).

Com o intuito de conhecer o perfil químico destes extratos, estes foram submetidos a outra técnica cromatográfica, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), para conhecer as substâncias presentes. Essa técnica desempenha um papel central na separação de misturas complexas, como por exemplo, os flavonóides e as substâncias fenólicas (Oliveira, 2005).



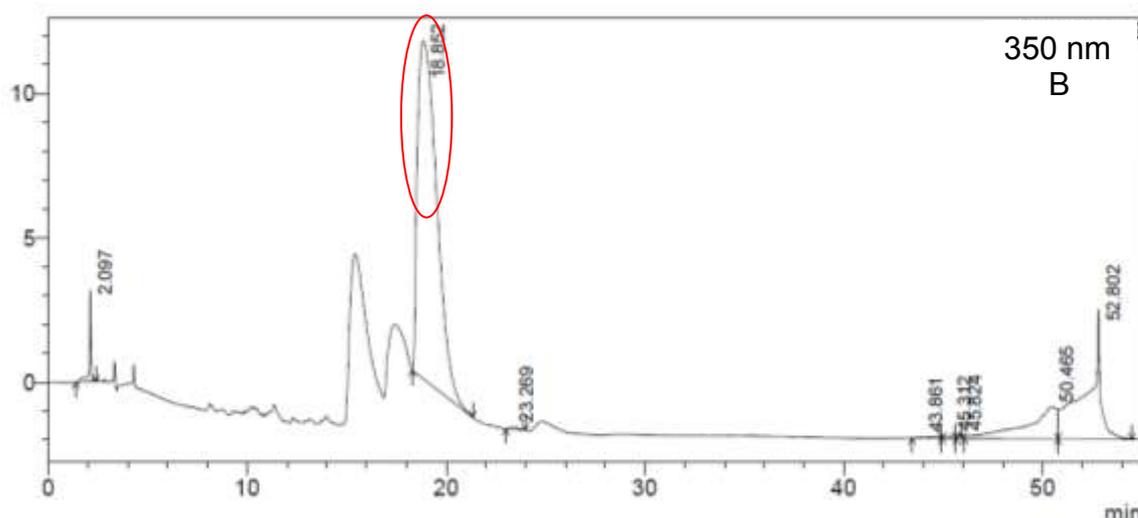


Figura 15: Cromatograma 1, perfil químico do extrato metanólico dos calos avaliado por CLAE. O equipamento utilizado foi da marca Shumadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de 254 nm e 350 nm com volume de injeção de 20 μ L. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5 m, 4,0 x 250mm). C= 1mg/mL.

Nota-se no Cromatograma 1 (Figura 15) que o extrato metanólico dos calos apresentam quatro picos majoritários no comprimento de onda de 254 nm e três picos majoritários no comprimento de onda de 350 nm, sendo o pico de tempo de retenção de aproximadamente 18 minutos observado em ambos comprimentos de onda.

Para o perfil do extrato metanólico das folhas, analisado por CLAE (Figura 16), nota-se a prevalência de seis picos majoritários no comprimento de onda de 254 nm e de três picos majoritários no comprimentos de onda de 350 nm.

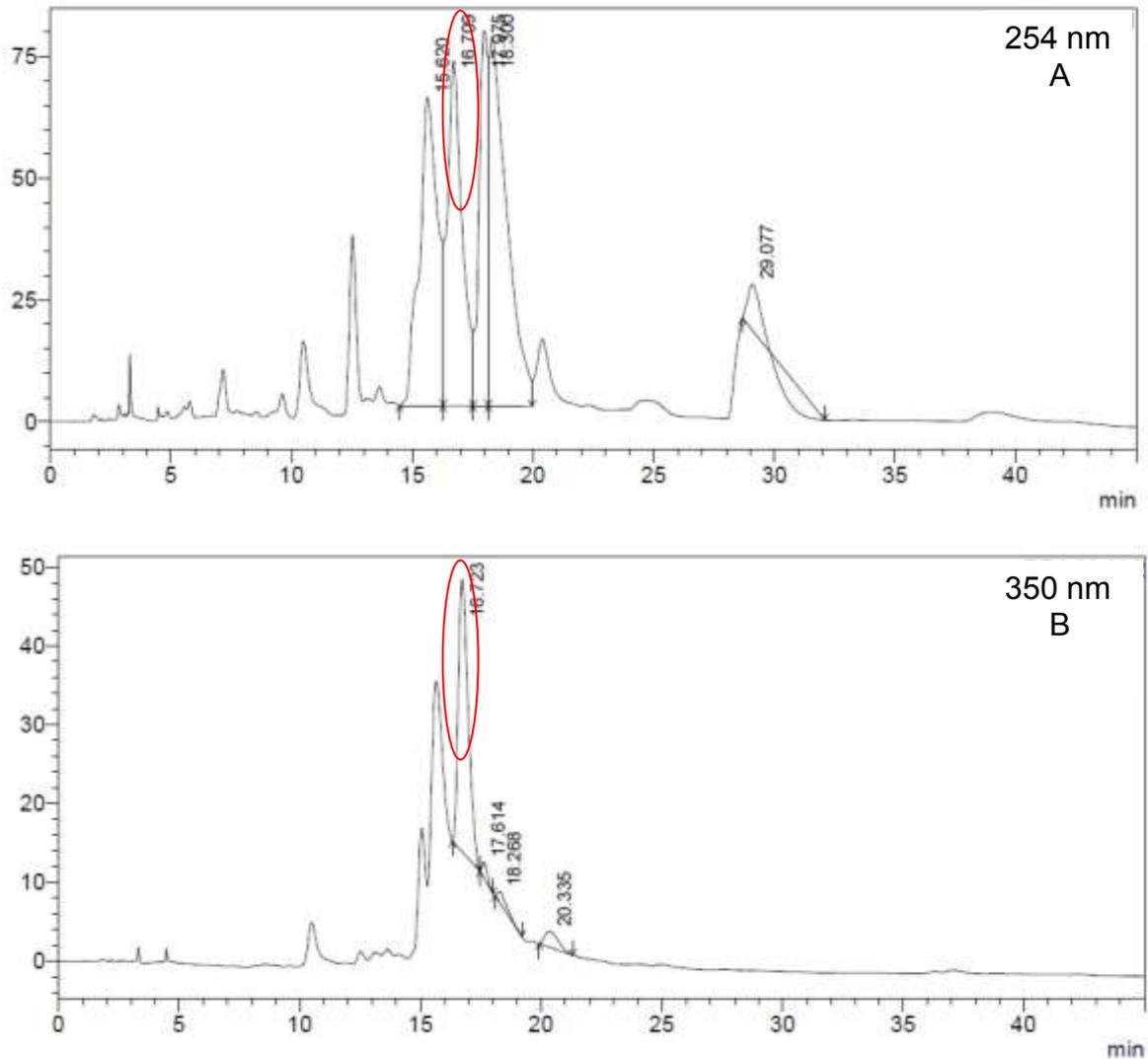


Figura 16: Cromatograma 2, perfil químico do extrato metanólico das folhas avaliado por CLAE. O equipamento utilizado foi da marca Shimadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de 254 nm e 350 nm com volume de injeção de 20 μ L. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5 m, 4,0 x 250mm). C= 1mg/mL.

Depois de realizada a CLAE com os extratos metanólicos pode-se notar que tanto na figura 15 quanto na figura 16 nota-se a presença de picos com tempos de retenção próximos, em ambos os comprimentos de onda analisados, para o extrato metanólico dos calos o pico com tempo de retenção de aproximadamente 18 minutos e para o extrato metanólico das folhas o pico com tempo de retenção de aproximadamente 17 minutos.

Os espectros de UV para esses picos (Figura 18 e Figura 19) revelam as bandas em aproximadamente 240 e 350 nm, o que em tese confirmam a

presença de flavonoides com características para as bandas I (Cromatograma B) e II (Cromatograma A) (Figura 17).

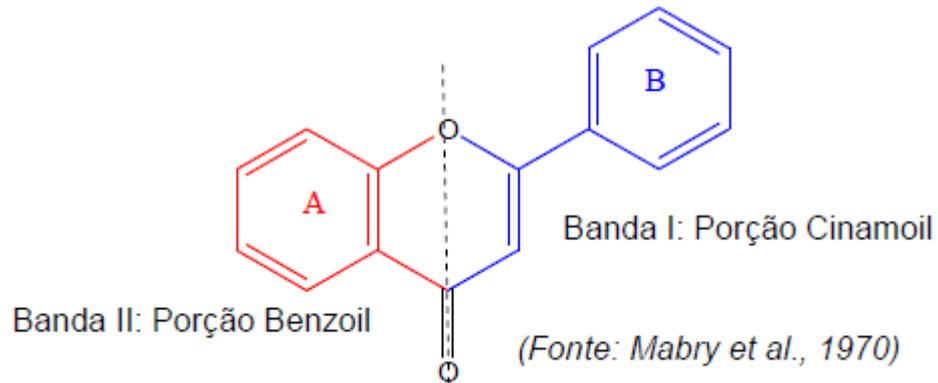


Figura 17: Esquema do flavonoide e suas porções que geram as bandas de absorção características no UV.

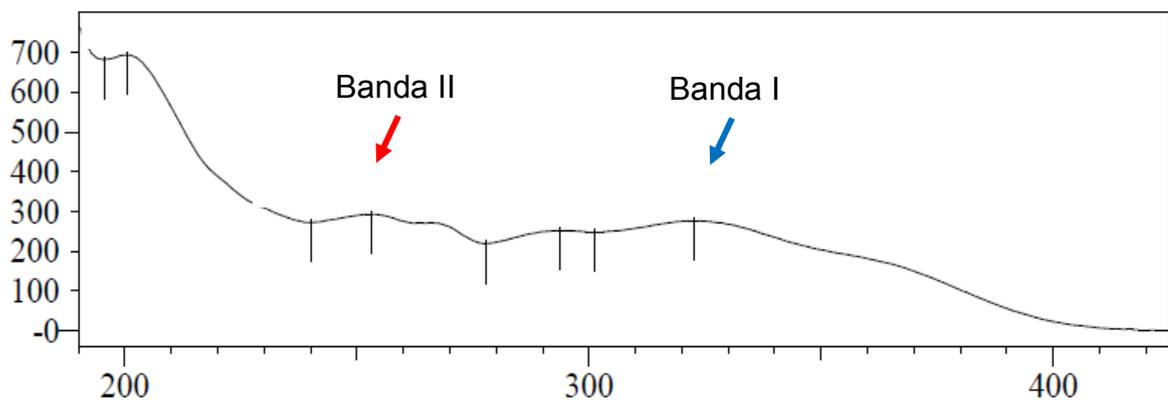


Figura 18: Espectro de Ultravioleta do pico de tempo de retenção (TR) igual a 18,8 minutos correspondente ao extrato dos calos.

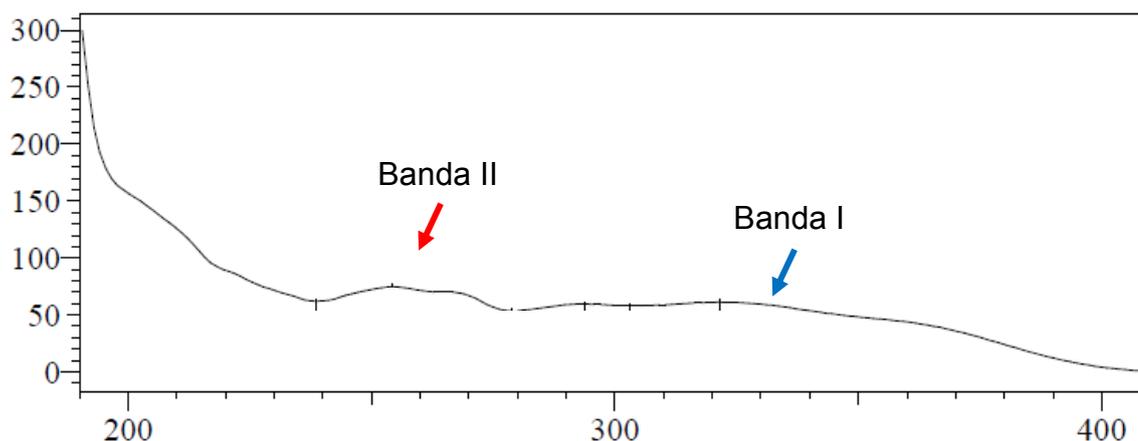


Figura 19: Espectro de Ultravioleta do pico de tempo de retenção (TR) igual a 16,70 minutos correspondente ao extrato das folhas.

Logo, a fim de confirmar a presença de flavonóides nos extratos metanólicos, em separado, foi realizado o fracionamento dos extratos como descreve o item 4.3.1.

5.1.2. Fracionamento dos extratos metanólicos

Após o fracionamento do extrato metanólico dos calos por cromatografia em coluna aberta com suporte em Gel em Sephadex LH-20 (Figura 13, item 4.3.1), foram formados cinco conjuntos (SC1, SC2, SC3, SC4, SC5) em que as frações foram unidas de acordo com o perfil cromatográfico observado em CCD. A figura 20 mostra a CCD destes grupos.

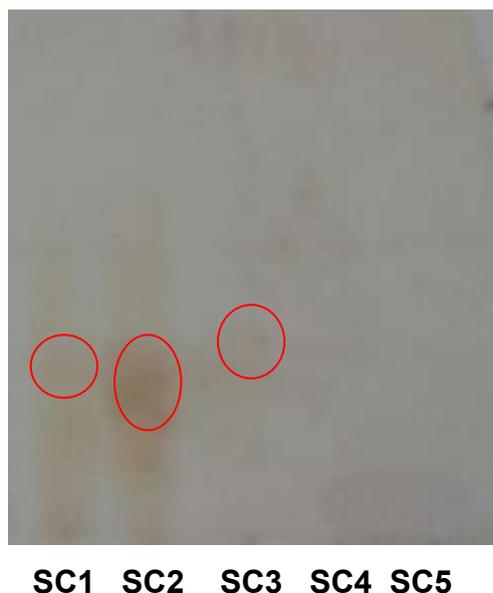


Figura 20: Cromatoplate dos conjuntos SC1, SC2, SC3, SC4 e SC5 obtidos do extrato dos calos realizado em CCD. Fase móvel: butanol:acetato:água (8:1:1) e revelado com sulfato cérico.

De acordo com a CCD (Figura 20) realizada logo após o primeiro fracionamento (Sephadex LH-20), notou-se que as manchas amarelas de interesse se concentravam nos conjuntos SC1, SC2 e SC3, no entanto, devido a massa obtida dos conjuntos apenas o conjunto SC2 foi escolhido para dar continuidade ao processo de purificação.

Com o intuito de verificar se o processo de fracionamento foi eficiente, ou seja, se as manchas das substâncias de interesse foram separadas, foi realizada a CLAE para o conjunto SC2 (Figura 21).

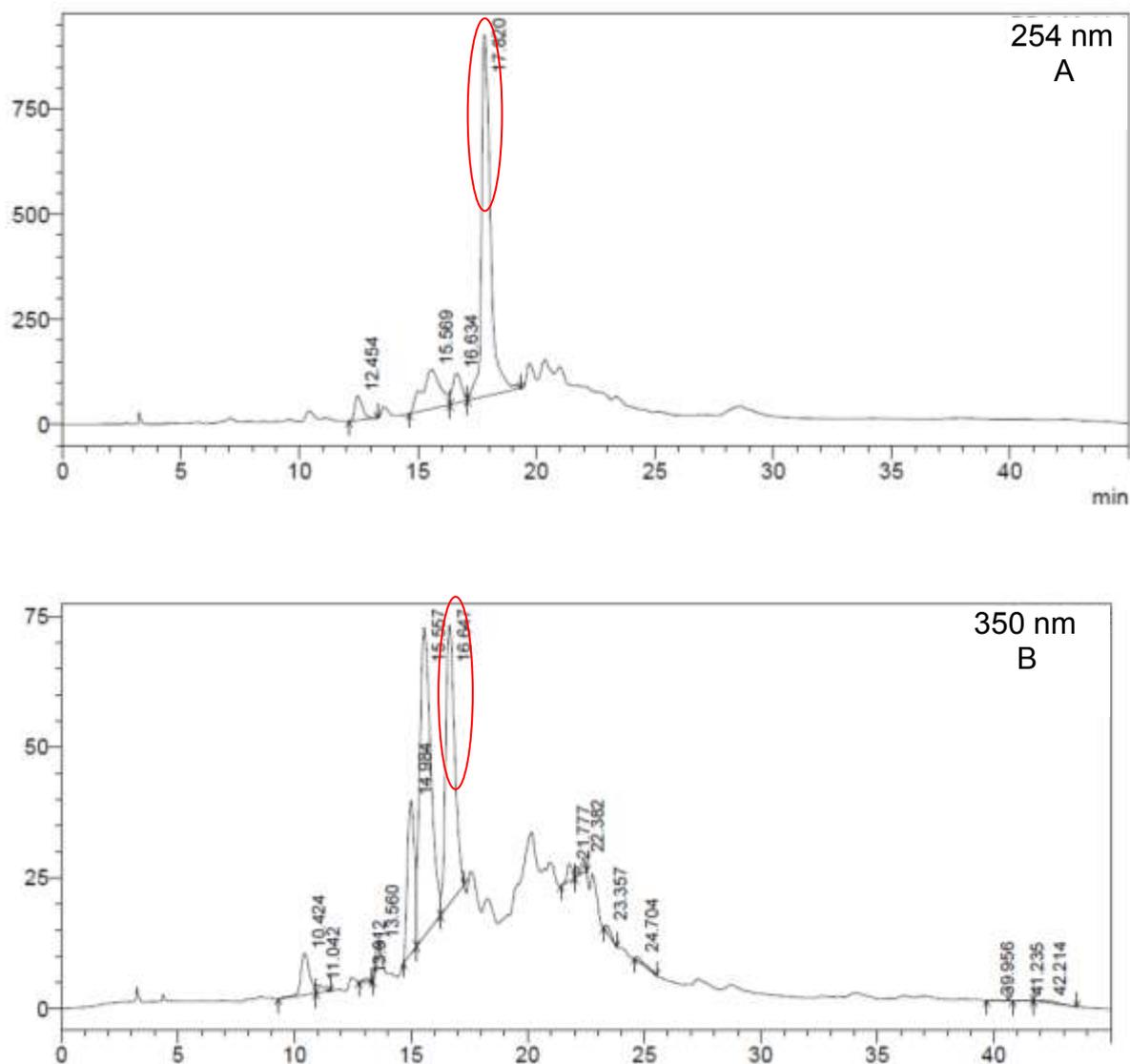


Figura 21: Cromatograma 3, perfil químico do conjunto SC2 avaliado por CLAE. O equipamento utilizado foi da marca Shimadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de 254 nm e 350 nm com volume de injeção de 20 μ L. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5 m, 4,0 x 250mm). C= 1mg/mL.

Nota-se na figura 21 que há um pico majoritário no tempo de retenção próximo de 17 minutos no Cromatograma A, sendo esse mesmo pico observado no Cromatograma B, o que evidencia a eficiência no processo de purificação.

Para o extrato metanólico das folhas, após o fracionamento por partição líquido líquido, obteve-se quatro frações: Hexânica, Diclorometano, Acetato de Etila e Butanólica (Figura 22).



Figura 22: Cromatoplaça das frações Hexânica (H), Diclorometano (D), Acetato de etila (A) e Butanólica (B) realizado em CCD. Fase móvel: butanol:acetato:água (8:1:1) e revelado com sulfato cérico.

Pode-se notar na figura 22 que as frações em acetato de etila e butanol apresentaram manchas majoritárias características de compostos fenólicos (Sabudak, 2005). Desse modo a fração butanólica foi escolhida para dar continuidade ao processo de purificação devido a massa ser superior a da fração acetato de etila, 1,0 g e 0,6 g respectivamente.

A fração butanólica foi submetida a cromatografia em coluna cromatográfica aberta com suporte em Gel em Sephadex LH-20, originando cinco conjuntos em que as frações foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico observado em CCD. A figura 25 mostra a CCD destes grupos.

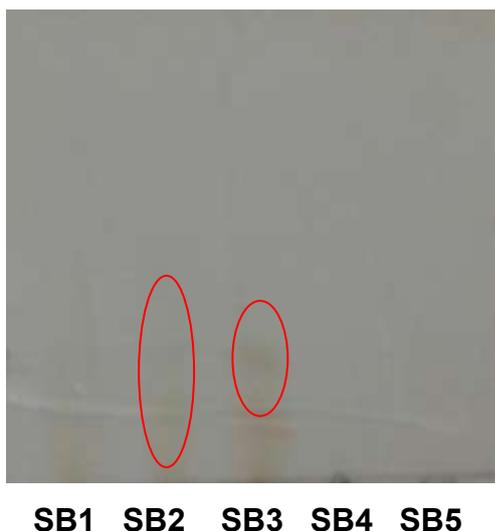


Figura 23: Cromatoplaça dos conjuntos SB1, SB2, SB3, SB3, SB4 e SB5 obtidos da fração butanólica do extrato das folhas realizado em CCD. Fase móvel: butanol:acetato:água (8:1:1) e revelado com sulfato cérico.

De acordo com a CCD (Figura 23) realizada logo após o primeiro fracionamento (Sephadex LH-20), notou-se que as manchas características para substâncias fenólicas, e de interesse, se concentravam nos conjuntos intermediários (SB2 e SB3), logo estes foram reunidos, devido a similaridade e cujo Rf são 0,63 e 0,70.

Com o intuito de verificar se o processo de fracionamento foi eficiente, ou seja, se as manchas das substâncias de interesse foram separadas, foi realizada a CLAE para os conjuntos SB2 (Figura 24) e SB3 (Figura 25).

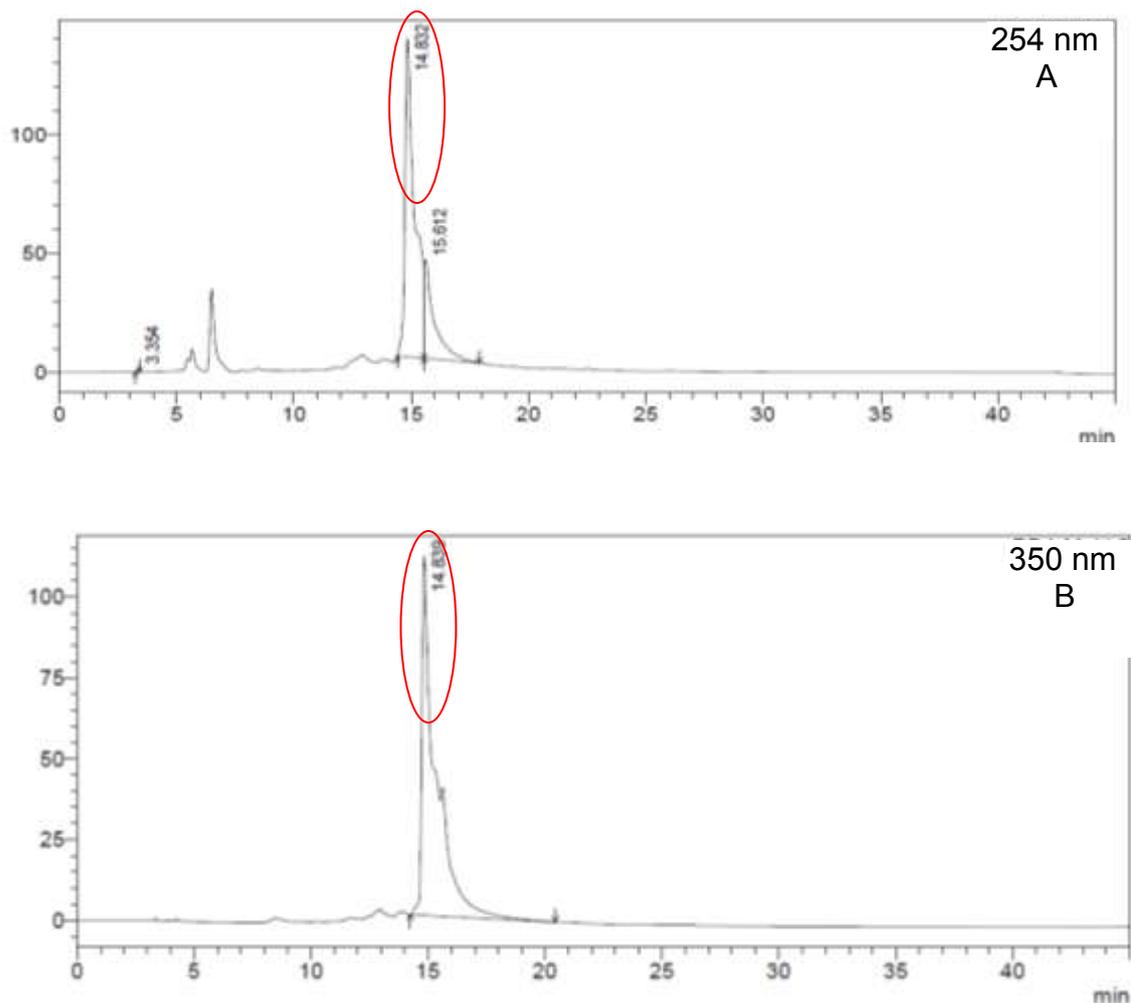


Figura 24: Cromatograma 4, perfil químico do conjunto SB2 avaliado por CLAE. O equipamento utilizado foi da marca Shimadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de 254 nm e 350 nm com volume de injeção de 20 μ L. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5 m, 4,0 x 250mm). C= 1mg/mL.

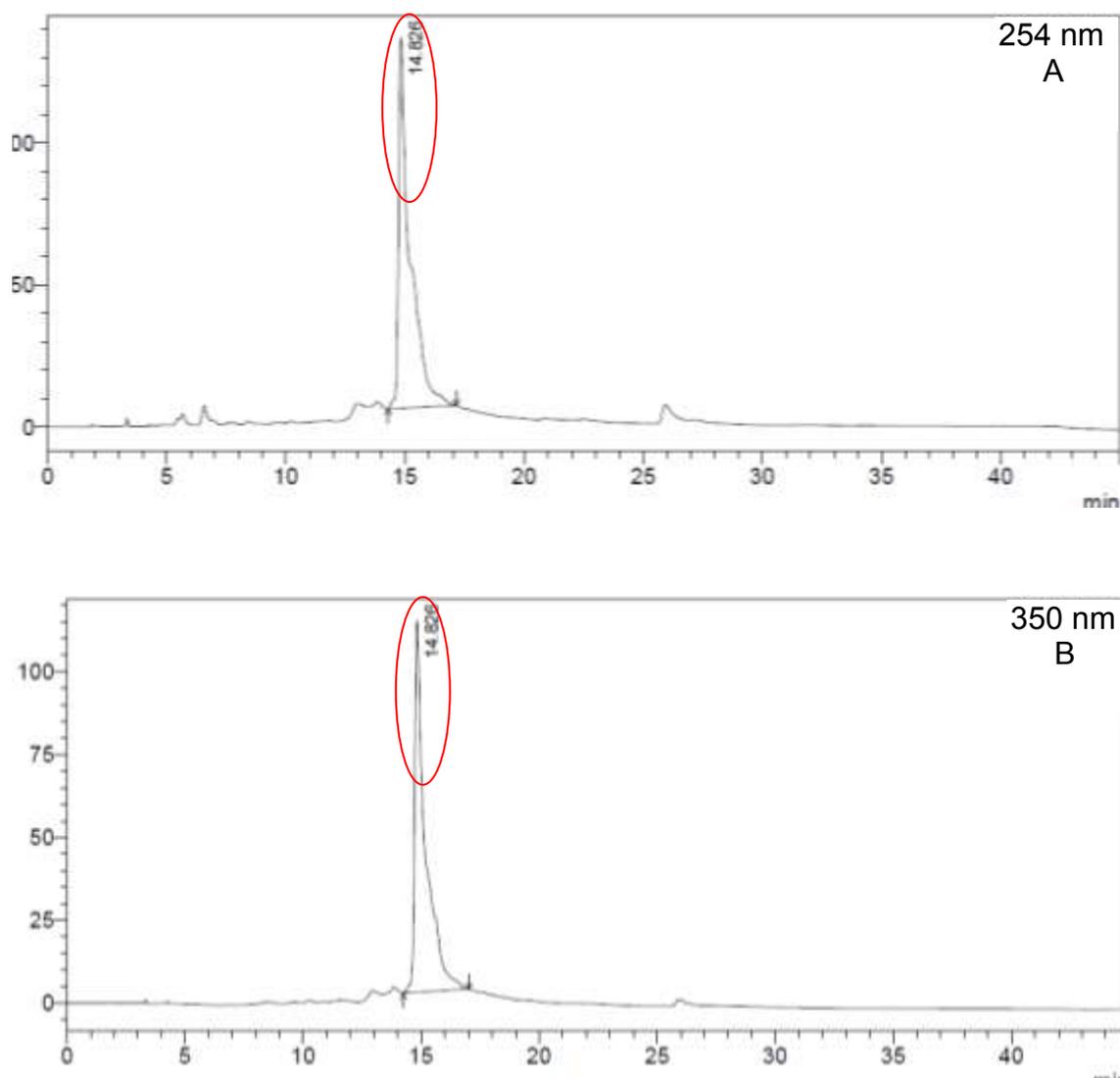


Figura 25: Cromatograma 5, perfil químico do conjunto SB3 avaliado por CLAE. O equipamento utilizado foi da marca Shumadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de 254 nm e 350 nm com volume de injeção de 20 μ L. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5 m, 4,0 x 250mm). C= 1mg/mL.

Nota-se na figura 24 e na figura 25, em contraste uma com a outra para os conjuntos SB2 e SB3, a presença de um pico bem pronunciado com tempo de retenção de aproximadamente 14 minutos para ambos os conjuntos, que correspondem a flavonoides.

É possível notar que o conjunto SB3 se apresentou como o mais purificado que o conjunto SB2, sendo possível observar apenas os picos com tempo de retenção em 14,8 minutos para SB3.

5.1.3. Substância isolada

O conjunto SC2 foi submetido a uma purificação em coluna cromatográfica aberta com suporte em Gel em Sephadex LH-20, o que originou a fração SC2a (Figura 28).

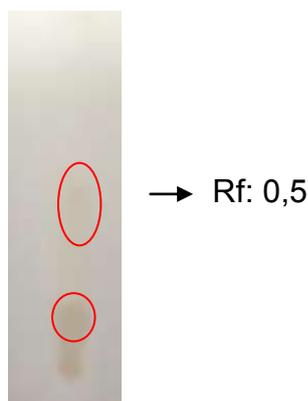


Figura 26: Cromatoplate da fração SC2a realizada em CCD. Fase móvel: butanol:acetato:água (8:1:1) e revelado com sulfato cérico.

Pode-se observar na figura 26 que a fração SC2a possui uma única mancha característica de substâncias fenólicas (Rf:0,5). Nota-se também a efetividade da fase móvel utilizada, uma vez que houve a separação dos compostos presentes.

Desta forma, SC2a, pela presença da mancha característica para fenólicos, foi escolhida para nova purificação, e assim submetida ao fracionamento em coluna aberta em Sephadex LH-20. Foi obtido a fração SC2aa, que mostrou-se purificado (Figura 27), cujo Rf foi 0,7.



Figura 27: Cromatoplaça da substância SC2aa realizada em CCD. Fase móvel: butanol:acetato:água (8:1:1) e revelado com sulfato cérico.

De acordo com a CCD, mostrada na figura 27, há uma mancha marjoritária característica de flavonoide que possui R_f de 0,7. Esta mancha quando submetida a revelação sob luz UV apresenta coloração azul, característica de substâncias fenólicas e, neste caso, de flavonoide.

De acordo com a CLAE (Figura 28), esta substância se mostrou isolada, com um pico com tempo de retenção de aproximadamente 17 minutos.

Cabe ressaltar que a substância isolada é o pico marjoritário em relação aos cinco picos observados no conjunto SC2, mostrando que o fracionamento em coluna aberta com suporte em Gel de Sephadex LH-20 foi satisfatório ao se isolar a substância majoritária.

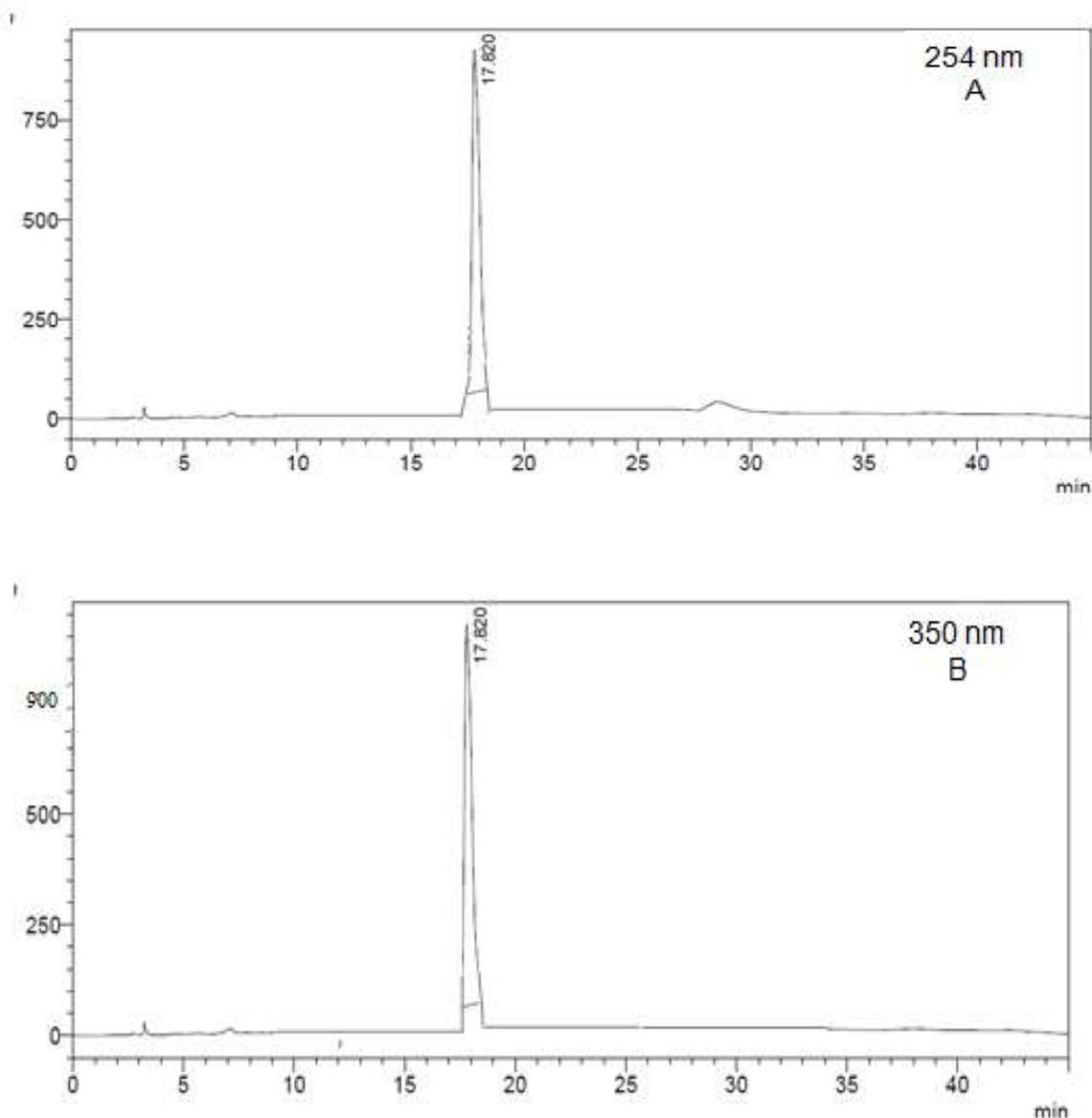


Figura 28: Cromatograma 6, perfil químico da substância SC2aa avaliado por CLAE. O equipamento utilizado foi da marca Shimadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de 254 nm e 350 nm com volume de injeção de 20 μ L. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5 m, 4,0 x 250mm). C= 1mg/mL.

O espectro de UV para este pico (Figura 29) revela uma banda em aproximadamente 250 e outra em 350 nm, o que tese confirma a presença de flavonoide com características para as bandas I e II, sistemas cinamoil e benzoil, respectivamente.

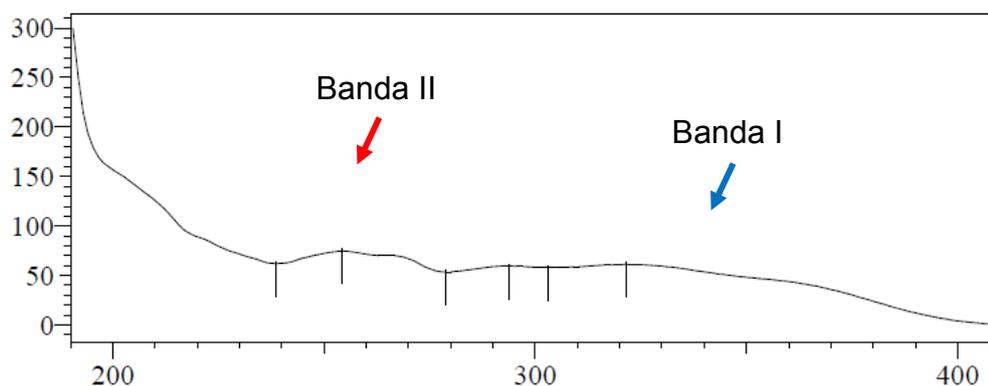


Figura 29: Espectro de UV do pico de tempo de retenção (TR) igual a 17,820 minutos, correspondente a amostra SC2aa.

A tabela 11 apresenta um resumo do tempo de retenção e da área dos cromatogramas realizados por CLAE para o extrato metanólico dos calos, do conjunto SC2 e da substância isolada SC2aa, destacando a purificação do flavonoide e o aumento da área de concentração.

Tabela 11: Tempo de retenção e área obtidos por CLAE dos picos do extrato metanólico, do conjunto SC2, precursores da amostra isolada SC2aa.

Extrato Metanólico			Conjunto SC2			SC2aa		
Tempo (min)	Área	Área (%)	Tempo (min)	Área	Área (%)	Tempo (min)	Área	Área (%)
18.753	7.044.153	62,8	17.820	9.538.331	79,1	17.820	20.891.347	99,7
18.852	7.023.250	68,7	16.647	8.328.571	76,3	17.820	20.689.741	98,9

Como se pode observar o pico correspondente a substância isolada apresenta maior área que o extrato metanólico, e do que o conjunto do qual foi originado.

5.1.3.1. Elucidação estrutural da substância SC2aa

5.1.3.1.1. Técnicas unidimensionais

A purificação do conjunto SC2, que nos conduziu a substância SC2aa, foi submetida à espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , cujos dados estão listados na tabela 12.

Tabela 12: Sinais listados de ^1H para a substância SC2aa.

RMN ^1H (DMSO- d_6) PPM
H-6 (7,0; s)
H-8 (7,0; s)
H-2',6' (7,66; d; J=10,2)
H-3', 5' (7,54; d; J=7,2)
H-1'' (5,16; d; J=3,4)
H-2'' (3,26; s)
H-3'' (3,17; s)
H-4'' (3,16; s)
H-5'' (3,27; s)
H-6'' (4,25; d; J=7,1)
H-2''',6''' (7,37; d; J=8,5)
H-3''',5''' (6,77; d; J=8,2)
H-7''' (7,30; d; J=15,7)
H-8''' (6,40; d; J=16,0)

5.1.3.1.1.1. RMN ^1H

Inicialmente, foi analisado o espectro de RMN ^1H do flavonoide SC2aa obtido em $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz) (Figura 30).

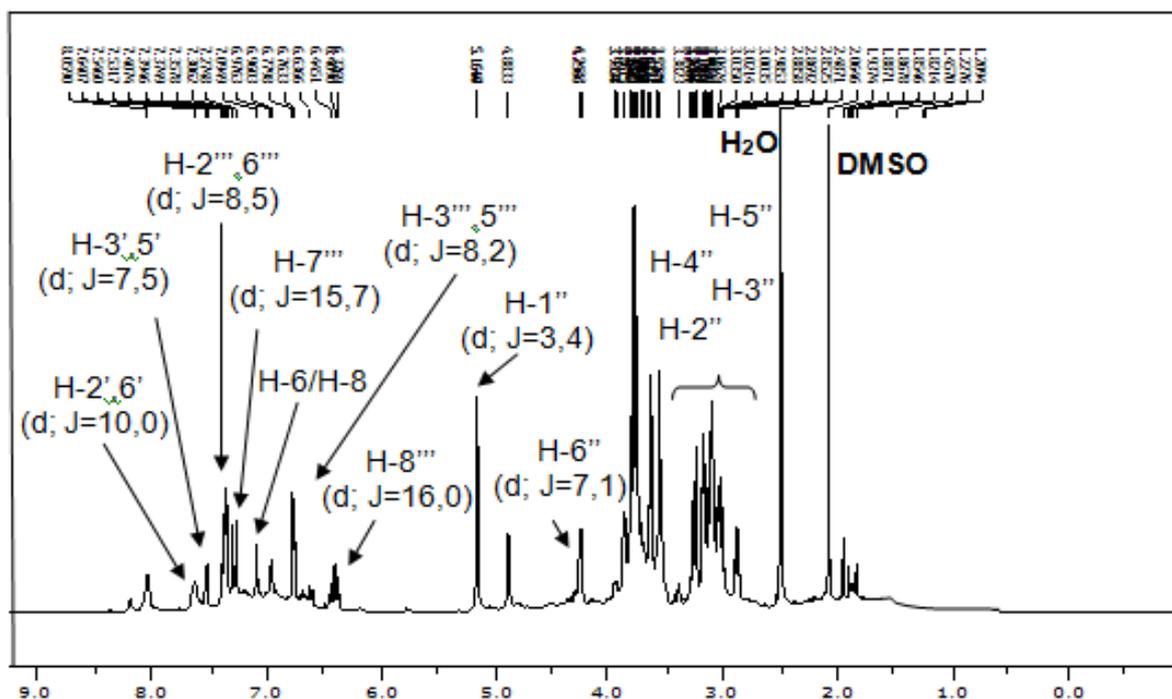


Figura 30: Espectro de RMN ^1H de SC2aa (500 MHz).

Na região do espectro correspondente aos núcleos aromáticos (6,0 – 8,0 ppm) pode-se observar a presença de sete sinais, sendo um correspondente ao anel A (δ_{H} 7,10 ppm; núcleo mais desprotegido) e dois para região do anel B (δ_{H} 7,54 e 7,66 ppm; núcleo mais desprotegido) (Mabry et al., 1970). Os demais quatro sinais observados na região aromática (δ_{H} 7,37; 6,77; 7,30 e 6,40 ppm) correspondem ao resíduo do ácido *p*-cumárico, ligado ao açúcar (Silva et al., 2005; Lencina et al., 2001). O valor pequeno de constante de acoplamento para o H-1'' sugere uma relação diequatorial com o H-2''. O deslocamento químico deste anomérico é compatível com uma *O*-glicosilação direta no anel da aglicona, evidenciando a presença de uma unidade de glicose na forma β -*D*-glicopiranosídeo no anel C (Junior^a et al., 2010).

Ao analisar o espectro ^1H fica evidenciado a presença de dupla ligação (δ_{H} 7,30, d; J=15,7 e δ_{H} 6,4, d; J=16,0), do resíduo do ácido *p*-cumárico, uma vez que

Tabela 13: Comparação dos sinais de ^1H da amostra SC2aa e os sinais do Tilirosídeo descritos na literatura.

RMN ^1H (DMSO- d_6) ppm	RMN ^1H (DMSO- d_6) PPM (Junior et al., 2010)
H-6 (7,0; s)	6,12
H-8 (7,0; s)	6,35
H-2',6' (7,66; d; J=10,2)	7,97 (d;J=8,9)
H-3', 5' (7,54; d; J=7,2)	6,84 (d;J8,9)
H-1'' (5,16; d; J=3,4)	5,43 (d;J=7,5)
H-2'' (3,26; s)	3,35
H-3'' (3,17; s)	3,19
H-4'' (3,16; s)	3,16
H-5'' (3,27)	3,38
H-6'' (4,25; d; J=7,1)	4,27
H-2''',6''' (7,37; d; J=8,5)	7,35 (d;J=8,5)
H-3''',5''' (6,77; d; J=8,2)	6,77 (d;J=8,5)
H-7''' (7,30; d; J=15,7)	7,33 (d;J=16,0)
H-8''' (6,40; d; J=16,0)	6,09 (d; J=16,0)

Desta forma, com os sinais de ^1H obtidos por este espectro e comparando com os dados da literatura, se pode deduzir que a estrutura é o Tilirosídeo (Figura 32).

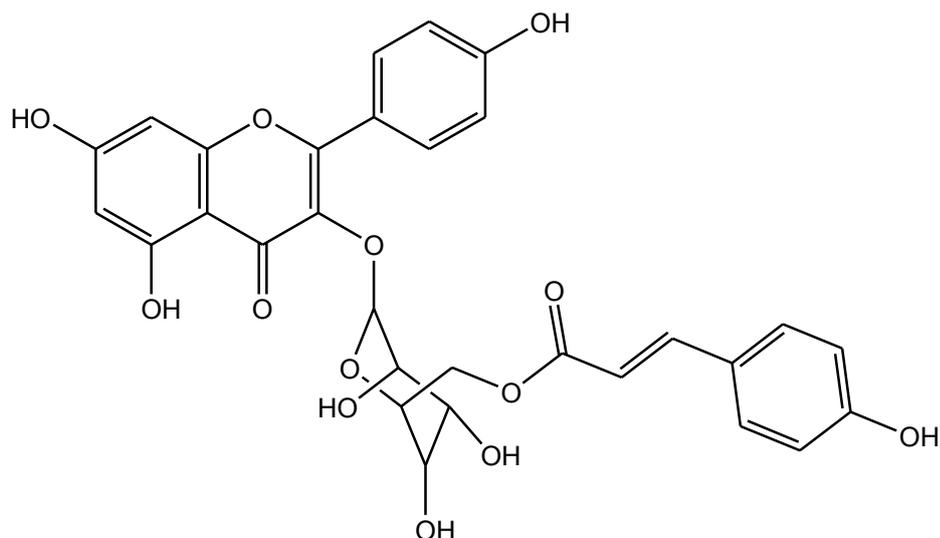


Figura 32: Estrutura do flavonol Tilirosídeo (SC2aa).

5.1.3.1.1.1. Técnica bidimensional (HMBC)

O quantitativo de massa da substância isolada não foi o suficiente para a boa visualização do ^{13}C , não sendo possível visualizar por APT as regiões do açúcar. Devido a isso as correlações foram realizadas a partir do espectro de RMN-2D HMBC.

A partir dos dados do espectro de HMBC (Figura 33 a Figura 35) foi possível estabelecer a correlação a longa distância entre os núcleos de ^1H com os núcleos de ^{13}C . Dessa forma, através da avaliação dos resultados desta análise foi possível confirmar os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos que possuíam um hidrogênio ligado a eles, à duas ou mais ligações de distância.

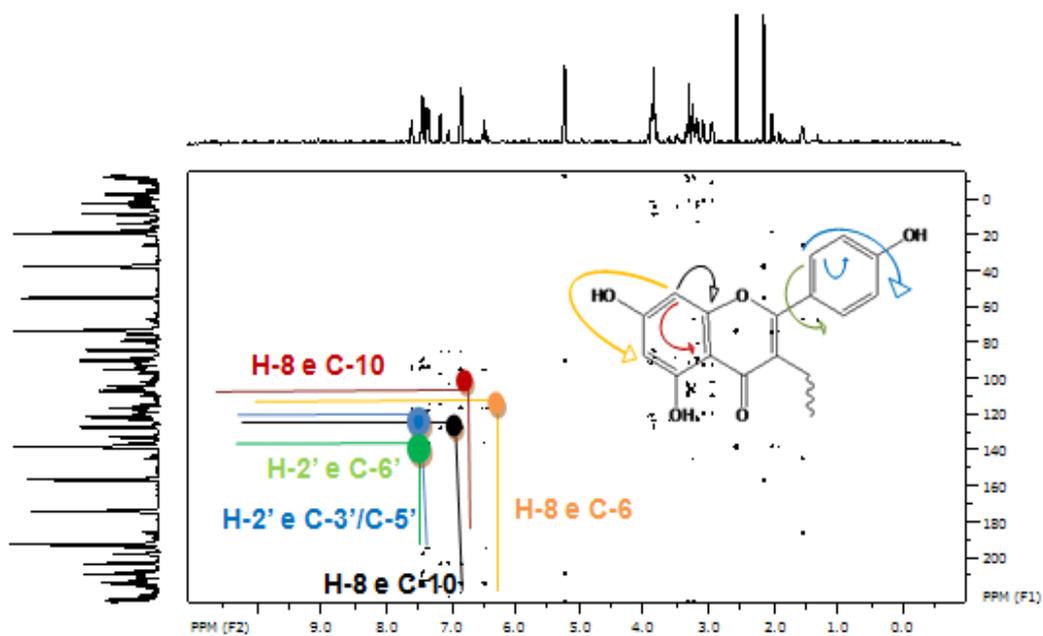


Figura 33: Espectro de RMN-2D HMBC para SC2aa (porção aromática correspondente a aglicona).

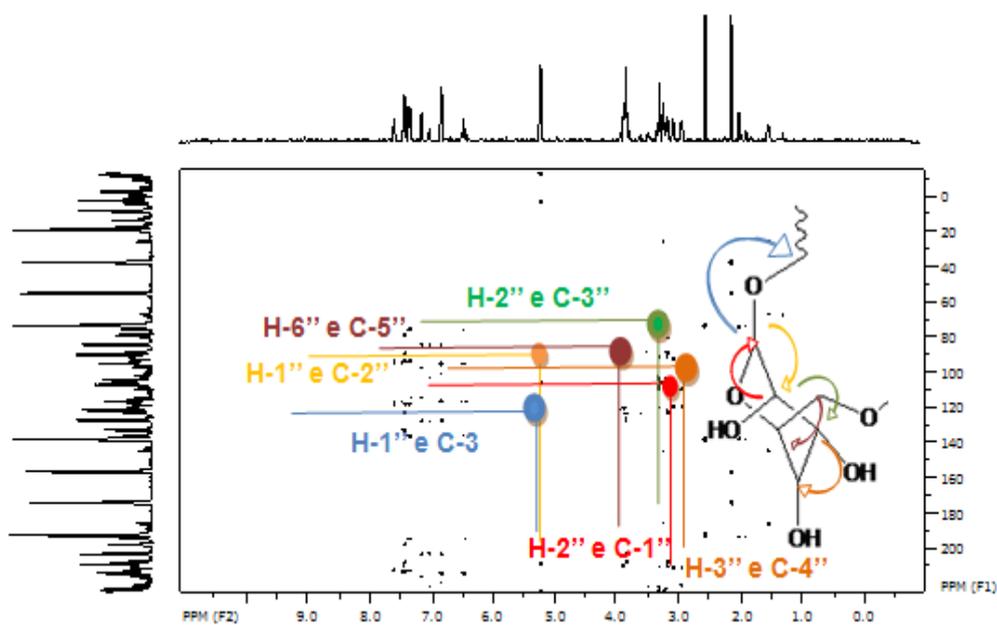


Figura 34: Espectro de RMN-2D HMBC para SC2aa (porção do açúcar).

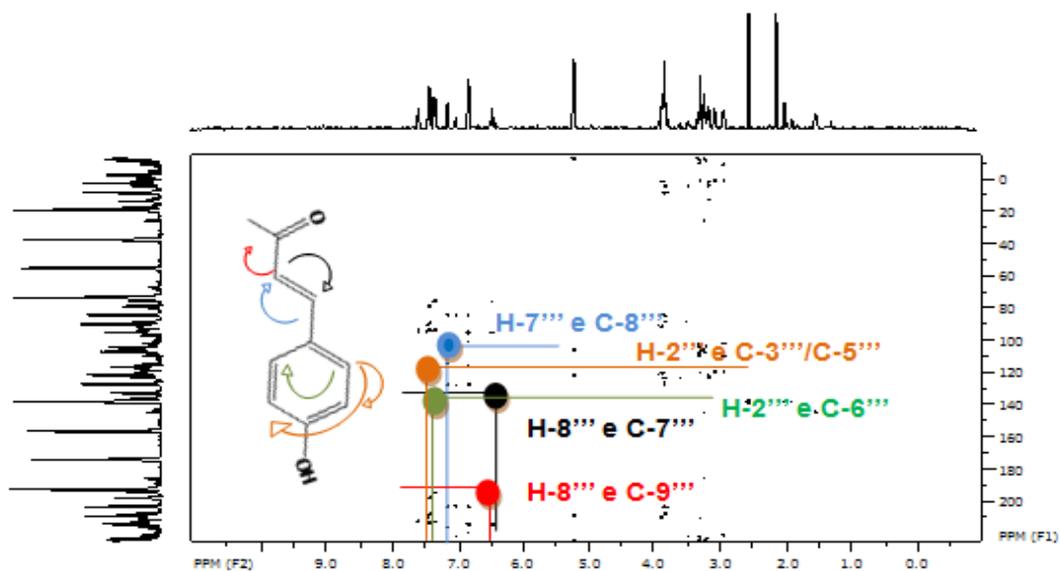


Figura 35: Espectro de RMN-2D HMBC para SC2aa (porção do ácido *p*-cumárico).

5.1.3.1.3. Proposta estrutural

As análises dos espectros mono e bidimensionais corroboram com a proposta do flavonol Tilirosídeo (Figura 32). Os sinais de ^1H estão listados na tabela 9 e com a comparação com os dados da literatura (Junior^a et al., 2010; Lencina et al., 2001).

Este flavonol foi identificado anteriormente nos extratos de folhas e flores para a *Tecomella undulata* da família Bignoniaceae (Laghari et al., 2013), porém a identificação dessa substância é pioneira no que se refere ao isolamento e elucidação estrutural para o gênero *Paratecoma*.

5.1.3.2. Quantificação do flavonol tilirosídeo nos extratos metanólicos dos calos e das folhas de peroba do campo

Tendo em vista a existência e elucidação do flavonol Tilirodideo nos calos de peroba optou-se por avaliar o quão representativo é essa substância nos extratos. Sendo assim, para a quantificação desse flavonol nos extratos dos calos

e das folhas por CLAE, foi realizada uma curva padrão (área do pico X massa em μg) utilizando-se a amostra isolada do Tilirosídeo (SC2aa) (Figura 36).

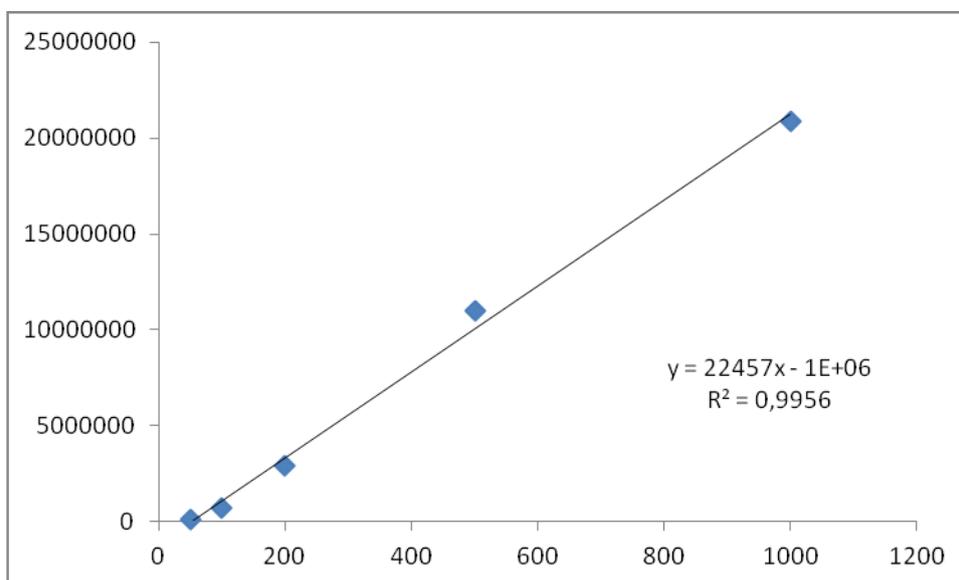


Figura 36: Curva padrão do Tilirosídeo.

Desta forma, a partir da curva padrão do tilirosídeo elaborada (Figura 36) foi possível quantificar esse flavonol presente nos extratos (Tabela 14).

Tabela 14: Quantificação do tilirosídeo presente nos extratos metanólico dos calos e das folhas de peroba.

Amostra	Tr (min)	Extrato MeOH Calos ($\mu\text{g/mL}$)	Extrato MeOH Folhas ($\mu\text{g/mL}$)
Tilirosídeo	17.8	313,60	489,00

Esse resultado demonstra o quão significativo é a presença desse flavonol nos calos e nas folhas de peroba. O trabalho de Laghari (2013) mostra a presença desse flavonol em extratos de folhas e de flores para a família Bignoniaceae, sendo este flavonol também muito encontrado em espécies da família Euphorbiaceae (Matos, 2011).

5.1.4. Atividade antioxidante

Nas espécies vegetais os compostos fenólicos, como os flavonoides, por exemplo, atuam na proteção contra radicais livres produzidos sobre condições de estresse, por sua capacidade de doar elétrons e estabilizar o radical livre.

Essas espécies reativas ocasionam danos altamente reativos e tóxicos para plantas, causando ruptura de estruturas de proteínas, de lipídios, de carboidratos e do DNA (Shah, 2009).

De forma qualitativa o perfil antioxidante por CCD foi avaliado para os extratos metanólicos dos calos e das folhas e do padrão fenólico quercetina (Figura 37).

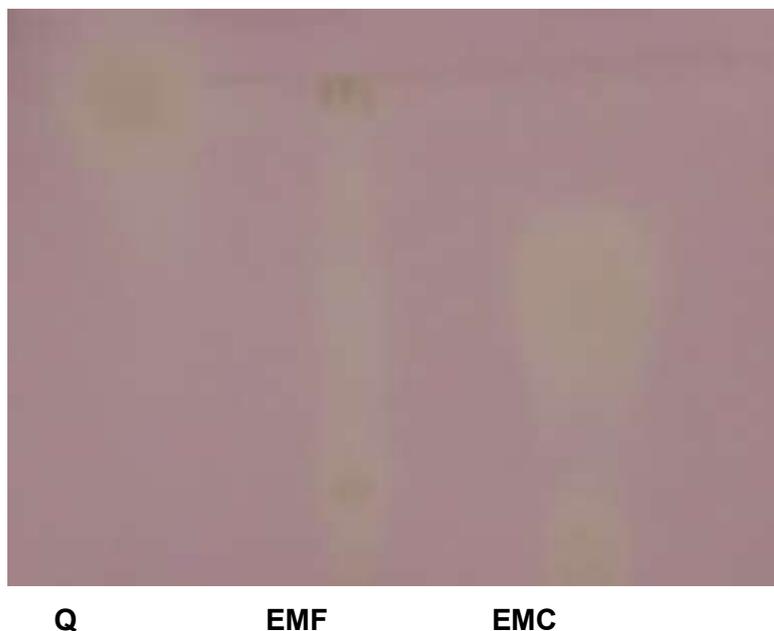


Figura 37: Cromatografia em Camada Delgada do padrão fenólico Quercetina (Q), do extrato metanólico das folhas (EMF) e do extrato metanólico dos calos (EMC) de *Paratecoma peroba* reveladas com 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH). Obs.: C= 6 mg/mL; Aplicação de 20 μ l; Cromatofolhas de sílica gel 60 F254 em Al, espessura 0,2 mm da MERCK (20X20); sistema de solvente BAW (8:1:1) butanol (3 mL); ácido acético glacial (1 mL) e água destilada (1 mL); Revelador: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).

O fundo da CCD que permanece lilás corresponde à superfície onde não houve reação de substâncias antioxidantes com o DPPH, desse modo pode-se notar na figura 37 que tanto o extrato metanólico das folhas quanto o extrato metanólico dos calos possuem atividade antioxidante, representada pelo arraste

amarelo intenso. Este fato indica que há um conjunto de substâncias que podem estar atuando como redutoras dos radicais livres (Oliveira, 2005).

De acordo com Aimé (2003), a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos é determinada pela sua estrutura, em especial com a facilidade com que um átomo de hidrogênio a partir de uma hidroxila do anel aromático pode ser doado para um radical livre.

A propriedade antioxidante dos flavonóides está relacionada com sua estrutura, sendo os flavonóides que se apresentam hidroxilados, principalmente os grupos 3-OH, 5-OH, 7-OH, 4'-OH e 3'-OH são os que apresentam maior propriedade antioxidante. Outro aspecto que intensifica a atividade antioxidante que está relacionada aos flavonóides é a presença de dupla ligação entre os carbonos C-2 e C-3 (Harborne, 1977). Essas características explicam a diferenciação do potencial antioxidante dos padrões utilizados, sendo a quercetina o padrão cuja capacidade sequestradora de radicais livres é superior a 90%, até na menor concentração.

A apigenina, apresenta a dupla ligação entre os carbonos C-3 e C-4, e a hidroxila no carbono 5, 7 e 4', porém esta aglicona não apresenta o grupo OH nos demais carbonos, fato este que pode explicar a capacidade antioxidante menor, quando comparada á literatura (Harborne, 1977).

A tabela 15 mostra os resultados do extrato metanólico dos calos, dos conjuntos (SC1, SC2, SC3, SC4, SC5) e dos padrões de referência submetidos ao ensaio antioxidante do radical livre estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) em três concentrações distintas.

Os padrões utilizados neste trabalho foram os flavonóides quercetina, rutina e apigenina devido aos seus efeitos protetores nos sistemas vegetais, que são atribuídos à sua capacidade de transferência de elétrons dos radicais livres, também ativam as enzimas antioxidantes e inibem as oxidases (Heim, 2002).

Tabela 15: Atividade antioxidante por sequestro do radical livre DPPH do extrato metanólico dos calos, dos conjuntos e dos padrões fenólicos quercetina, rutina, apigenina.

Amostras	Concentrações			EC ₅₀ µg/mL
	1000µg/mL	100µg/mL	10µg/mL	
Extrato metanólico calos	69,4 ± 0,6	44,4 ± 2,7	1,5 ± 2,0	190,1±0,2
SC1	93,2 ± 3,9	24,3 ± 1,0	10,0 ± 1,1	> 200
SC2	89,4 ± 1,1	73,0 ± 0,3	55,0 ± 0,1	160,0±0,8
SC3	90,7 ± 1,3	23,9 ± 1,4	0,2 ± 0,3	199,8±1,3
SC4	20,3 ± 1,3	12,0 ± 1,0	0,9 ± 0,2	> 200
SC5	15,0 ± 1,1	0,9 ± 0,9	0,1 ± 0,1	> 200
SC2aa	91,0±1,0	43,1±0,8	12,0±0,9	> 200
Quercetina	95,27 ± 0,9	93,4 ± 1,2	91,3 ± 3,0	1,0±0,5
Rutina	88 ± 0,9	87,4 ± 1,1	0,94 ± 0,9	39,9±0,1
Apigenina	60 ± 1,5	41,3 ± 2,7	99,5±1,100	> 200

*Média ± Desvio Padrão (n=3).

Notar-se que o extrato metanólico dos calos em relação com os demais conjuntos, apresenta atividade antioxidante inferior aos conjuntos (conjuntos SC1 e SC2) e a substância isolada SC2aa, ambos com atividade sequestradora de radicais livres superior a 90% na maior concentração testada (1000µg/mL).

Em comparação do extrato metanólico dos calos com o conjunto SC2, que deu origem a substância isolada SC2aa, nota-se que o conjunto apresenta atividade sequestradora de radicais livres nas três concentrações testadas (1000, 100 e 10 µg/mL). Sendo que até na menor concentração (10 µg/mL), este apresenta atividade superior ao extrato dos calos (50%). Tendo esse conjunto capacidade antioxidante superior aos padrões fenólicos Rutina e Apigenina.

Como pode-se observar na tabela 15 a substância isolada apresentou capacidade de sequestro de radical superior a 90% na maior concentração, no entanto não se observou a mesma atividade nas menores concentrações testadas. A capacidade antioxidante esta diretamente relacionada com a estrutura química das substâncias, uma vez que essa relação esta diretamente inclusa na presença de maior número de hidroxilas e ligações insaturadas na estrutura da molécula, assim flavonóides que se apresentam hidroxilados, principalmente nas posições com os grupos C-3, C-5, C-7, C-4' e C-3' são os que apresentam maior

propriedade antioxidante (Amma et al., 2009; Aimé et al., 2003). A substância isolada identificada como Tilirosídeo (Figura 32) apresenta na posição C-3 a substituição da hidroxila pela ligação com o açúcar, o que justifica a redução de sua atividade antioxidante comparada aos dos padrões e do conjunto que a originou.

A tabela 16 mostra os resultados do extrato metanólico das folhas, das frações (hexânica, diclorometano, acetato de etila, butanólica), dos conjuntos (SB1, SB2, SB3, SB4, SB5) e dos padrões de referência submetidos ao ensaio antioxidante em três concentrações distintas. Vale ressaltar que os testes foram realizados em triplicata e aqui estão apresentadas as médias aritméticas e o desvio padrão.

Tabela 16: Atividade antioxidante por sequestro do radical livre DPPH do extrato metanólico das folhas, das frações, dos conjuntos e dos padrões fenólicos quercetina, rutina, apigenina.

Amostras	Concentrações			EC ₅₀ µg/mL
	1000µg/mL	100µg/mL	10µg/mL	
Extrato metanólico folhas	88,4 ± 1,1	70,4 ± 0,7	30,5 ± 1,0	26,6±0,5
Fração hexânica	81,7 ± 2,1	30,5 ± 0,1	10,2 ± 1,1	15,4±0,6
Fração Diclorometano	87,3 ± 2,1	72,6 ± 2,5	50,1 ± 3,0	4,1±1,0
Fração Acetato de etila	94,2 ± 1,1	92,2 ± 2,1	87,3 ± 1,7	1,5±0,2
Fração Butanólica	92,1 ± 0,2	85,4 ± 1,2	51,2 ± 0,6	10,1±0,5
SB1	73,2 ± 3,9	22,3 ± 1,0	9,0 ± 1,1	> 200
SB2	23,4 ± 1,1	20,0 ± 0,3	0,9 ± 0,1	> 200
SB3	93,7 ± 1,3	86,9 ± 1,1	55,2 ± 0,5	8,84±0,5
SB4	20,3 ± 1,3	12,0 ± 1,0	0,9 ± 0,2	> 100
SB5	11,0 ± 1,1	0,6 ± 0,9	0,1 ± 0,1	> 100
Quercetina	95,27 ± 0,9	93,4 ± 1,2	91,3 ± 3,0	1,0±0,9
Rutina	88 ± 0,9	87,4 ± 1,1	0,94 ± 0,9	39,9±0,6
Apigenina	60 ± 1,5	41,3 ± 2,7	99,5 ± 1,00	> 100

*Média ± Desvio Padrão (n=3).

Nota-se na tabela 16 que o extrato metanólico das folhas, a fração hexânica, a fração em diclorometano, a fração em acetato de etila e a fração butanólica, o conjunto SB1 e o conjunto SB3 possuem capacidade antioxidante superior a 70% nas maiores concentrações testadas. Tendo apenas extrato, as

frações em diclorometano, em acetato e em butanol, e o conjunto SB3 atividade sequestradora de radicais livres na concentração intermediária (100µg/mL).

O potencial antioxidante é mantido superior a 50% na menor concentração testada (10 µg/mL), pela fração em diclorometano, em acetato de etila, butanol e pelo conjunto SB3. Possuindo o conjunto SB3 capacidade antioxidante superior aos padrões Rutina e Apigenina até na menor concentração testada.

Observa-se também (Tabela 16) que o conjunto SB3 possui atividade antioxidante muito próxima a fração que o originou (fração butanólica) e ao padrão fenólico Rutina, evidenciando que o processo de purificação manteve a atividade.

Os resultados mostraram que a capacidade antioxidante dos extratos, frações e conjuntos pelo método do DPPH possui significância quando comparado com os resultados da literatura, uma vez que os extratos brutos da família Bignoniaceae possuem capacidade sequestradora de radicais de 48%, e as frações possuem atividade antioxidante com variância de 89% a 31% (Carvalho et al., 2009).

Em termos de concentração efetiva (EC_{50}) os resultados apresentados por Santos (2010) e Silva (2011) para a família da espécie vegetal apresentam EC_{50} de 102,0 a 30,5 µg/mL para extratos metanólicos e uma variância de 25 a 79 µg/mL para frações. Nota-se que tanto para o extrato dos calos quanto para o extrato das folhas com os respectivos conjuntos e frações os resultados apresentam-se significantes quando comparados aos valores da literatura.

Para o extrato metanólico das folhas tem-se um EC_{50} de 26,6 µg/mL, sendo esse inferior ao EC_{50} do padrão fenólico Rutina. Quando comparamos o EC_{50} da fração butanólica e do conjunto SB3 pode-se notar que o conjunto possui uma concentração necessária para reduzir a concentração do radical livre inferior a da fração, 8,8 µg/mL e 10,1 µg/mL respectivamente, o que evidencia o potencial antioxidante dos mesmos.

Observa-se então, de acordo com a tabela 15 e a tabela 16, a relação da EC_{50} com a capacidade sequestradora de radicais livres, onde as amostras que apresentaram menores valores de EC_{50} mostraram melhor capacidade antioxidante, como o conjunto oriundo do extrato metanólico dos calos, SC2. Assim como as frações em diclorometano, acetato de etila, butanol e o conjunto SB3 oriundo do extrato metanólico das folhas.

Com o intuito de se confirmar a capacidade antioxidante dos extratos, frações e conjuntos, estes foram avaliados a capacidade antioxidante por redução do ferro (FRAP), sendo esta metodologia pioneira na avaliação da atividade antioxidante pela redução do ferro para a família Bignoniaceae.

Durante o experimento nota-se que a coloração de compostos redutores de ferro é um azul bem intenso (Figura 38), uma vez que os compostos formam quelatos estáveis com o ferro.



Figura 38: Coloração durante o ensaio FRAP.

A tabela 17 apresenta o potencial antioxidante avaliado pelo método do FRAP para extrato metanólico dos calos, dos conjuntos, bem como dos padrões fenólicos rutina e quercetina.

Tabela 17: Atividade antioxidante por redução do ferro do extrato metanólico dos calos, dos conjuntos e dos padrões fenólicos quercetina e rutina.

Amostras	μM Trolox/ mg Amostra
Extrato metanólico calos	139
SC1	90
SC2	118
SC3	23
SC4	46
SC5	67
SC2aa	100
Quercetina	401
Rutina	302

*(n=3).

Pode-se notar na tabela 17 que o extrato metanólico dos calos possui capacidade de redução do ferro moderada, próximo a 140 μM Trolox/mg amostra, quando comparada ao padrão Rutina (300 μM Trolox/mg amostra). Observa-se também que o conjunto SC2 e a substância isolada SC2aa apresentaram atividade próxima ao extrato metanólico dos calos, evidenciando a efetividade do processo de purificação.

Na tabela 18 tem-se a capacidade sequestradora de radicais livres avaliada pelo método do FRAP para o extrato metanólico das folhas, das frações, dos conjuntos e dos padrões.

Tabela 18: Atividade antioxidante por redução do ferro do extrato metanólico das folhas, das frações, dos conjuntos e dos padrões fenólicos quercetina e rutina.

Amostras	μM Trolox/ mg Amostra
Extrato metanólico folhas	290
Fração Hexânica	230
Fração Diclorometano	220
Fração Acetato de etila	185
Fração Butanólica	178
SB1	26
SB2	100
SB3	149
SB4	46
SB5	40
Quercetina	401
Rutina	302

*(n=3)

Para o extrato metanólico das folhas (Tabela 18) nota-se que o extrato metanólico das folhas e as frações, em especial as frações em hexano e diclorometano, possuem significativa capacidade de redução do ferro em comparação com o padrão fenólico Rutina. Em relação aos conjuntos, pode-se notar que apenas os conjuntos SB2 e SB3 apresentaram capacidade antioxidante significativa, 100 e 149 μM Trolox/mg amostra), respectivamente.

Os resultados da atividade antioxidante corroboram para evidenciar a capacidade de sequestro de radicais livres dos extratos, conjuntos e frações dos calos e das folhas de peroba, uma vez que as frações e conjuntos que mostraram melhor capacidade antioxidante pelo método do DPPH, também apresentaram melhor capacidade de reduzir o ferro.

Tendo em vista que a atividade antioxidante de espécies vegetais pode está relacionada aos flavonoides, em geral aos compostos fenólicos, a concentração destes também foi avaliada. Assim, foram quantificados os teores fenóis totais.

5.1.5. Quantificação dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são substâncias polifenólicas presentes nas fontes vegetais, como a quercetina. Esses compostos apresentam relevantes efeitos antioxidantes para as plantas (Bernardes, 2010).

A tabela 19 mostra o percentual de compostos fenólicos por Folin Denis presentes nos extratos dos calos e das folhas de peroba do campo.

Tabela 19: Percentual de compostos fenólicos avaliados pelo método de Folin Denis dos extratos dos calos e das folhas.

Amostras	Fenóis totais (gGAE/100g)
Extrato metanólico dos calos	0,174
Extrato metanólico das folhas	0,556

*(n=3).

Não há relatos na literatura para quantificação de compostos fenólicos pelo método do Follin-Denis para a família Bignoniaceae, mas pode-se notar que o extrato das folhas apresenta cerca de 50% de compostos fenólicos, enquanto o extrato dos calos 20%.

O reagente de Folin-Denis, embora não específico para uma determinada classe de metabólitos, detecta todos os fenóis, ácidos fenólicos, flavonóides e taninos presentes em uma matriz. Desta forma pode-se utilizar esta metodologia

para quantificação do total de fenóis, uma vez que ocorre a oxidação de qualquer fenol presente pela reação com o ácido fosfomolibdico e tungístico do reagente de Folin-Denis (Pereira, 2010).

O Folin-Denis é uma metodologia bastante semelhante ao Folin Ciocalteu, que se baseia na redução dos ácidos presentes na solução de Ciocalteu pela presença de ácidos fenólicos, com formação de complexos de coloração azul. No entanto o método de Folin Denis possui a desvantagem da formação de um precipitado que interfere nas leituras espectrofotométricas (Gallice et al., 2011; Pereira, 2010).

Desse modo, em paralelo ao ensaio para determinação dos compostos fenólicos por Folin Denis, o ensaio para determinação do teor de fenóis totais dos extratos e frações pelo método mais relevante do Folin Ciocalteu foi realizado, utilizando o ácido gálico como padrão de referência (Tabela 20).

Tabela 20: Percentual de compostos fenólicos avaliados pelo método de Folin Ciocalteu.

Amostras	Fenóis totais (gGAE/g de Extrato)
CALOS	
Extrato metanólico dos calos	0,153
SC1	0,248
SC2	0,554
SC3	0,235
SC4	0,200
SC5	0,100
FOLHAS	
Extrato metanólico das folhas	0,864
Fração hexânica	0,800
Fração diclorometano	0,708
Fração acetato de etila	0,901
Fração butanólica	0,979
SB1	0,408
SB2	0,201
SB3	0,976
SB4	0,091
SB5	0,070

*(n=3)

Pode-se notar na tabela 20 que o extrato metanólico dos calos apresentou concentração de compostos fenólicos inferior aos conjuntos SC1, SC2, SC3 e SC4. Observamos também que o conjunto SC2 concentrou essas substâncias de interesse, evidenciando a efetividade do processo de purificação.

Quando observamos o extrato metanólico das folhas nota-se que esse possui concentração superior quando comparado com as concentrações de compostos fenólicos para extratos hidroalcoolicos da literatura, que para o gênero *Fridericia* apresenta 0,039 gGAE/g de extrato e para o gênero *Arrabidaea* 0,112 gGAE/g de extrato (Paula et al., 2013; Port's et al., 2013).

Para as frações nota-se que exceto as frações em hexano e diclorometano, todas, apresentaram concentrações ligeiramente superiores aos do extrato metanólico das folhas. Sendo as frações em acetato de etila e butanólica as que evidenciaram maiores concentrações para essa classe de compostos.

Em relação aos conjuntos oriundos do extrato metanólico das folhas a partir da fração butanólica, apenas o conjunto SB3 manteve a concentração próxima aos dados da literatura, evidenciando a efetividade do processo.

Nota-se na tabela 20 que o extrato e frações oriundas dos calos apresentaram menor concentração de compostos fenólicos quando comparados com frações e conjuntos oriundos das folhas, uma vez que calos são oriundos tecidos vegetais induzidos, ou seja, não apresentam uma produção de substâncias protetoras, que, muitas vezes, são os compostos fenólicos, compatível com as espécies vegetais presentes no meio ambiente.

De acordo com Andrade e colaboradores (2007) espécies vegetais que possuem maior percentual de compostos fenólicos evidenciam a capacidade antioxidante. É possível também que a atividade antioxidante observada em extratos mais ativos possam estar relacionados com inúmeras substâncias, além das fenólicas presentes nos extratos.

Tabela 21: Amostras que apresentaram os melhores resultados para atividade antioxidante relacionado com a presença de compostos fenólicos.

Amostras	AA DPPH (\bar{x} %)	AA FRAP	CF (g/g)
CALOS			
Extrato metanólico calos	56,5	139	0,153
SC1	58,5	90	0,248
SC2	72,4	118	0,554
SC3	56,5	23	0,235
SC4	16,0	46	0,200
SC5	7,9	67	0,100
SC2aa	91,0	100	-
FOLHA			
Extrato metanólico Folhas	79,0	290	0,864
Fr. Hexânica	55,5	230	0,800
Fr. Diclorometano	69,6	220	0,708
Fr. Acetato de etila	91,0	185	0,901
Fr. Butanólica	80,0	178	0,979
SB1	47,5	26	0,408
SB2	21,5	100	0,201
SB3	78,0	149	0,976
SB4	15,0	46	0,091
SB5	9,5	40	0,070

*AA: atividade antioxidante - CF: compostos fenólicos.

Observou-se uma correlação entre os fenóis totais e a atividade antioxidante, nota-se na tabela 21 que quanto maior é a concentração de compostos fenólicos presentes maior é percentual antioxidante amostra, como observado no conjunto SC2, por exemplo, que possui 72% atividade sequestradora do radical livre DPPH e possui 0,554 g/g de extrato de compostos fenólicos presentes, bem como o conjunto SB3 que possui 78% de capacidade antioxidante e 0,976 g/g de extrato de compostos fenólicos.

Essa correlação já foi descrita por Sousa e colaboradores (2007) para as famílias Combretaceae, Arecaceae e Combretaceae, no entanto não há relatos para família Bignoniaceae.

5.2. Parte biológica

5.2.1. Ensaio em meio líquido (Atividade antibacteriana)

É importante ressaltar que esses são os primeiros ensaios realizados a partir de extratos de *Paratecoma peroba* (peroba do campo) utilizando seu extrato metanólico e frações oriundas desse extrato na inibição de *Erwinia carotovora*, *Xanthomonas campestris* e *Burkholderia cepacia* ATCC 17759. As amostras foram avaliadas quanto à atividade antibacteriana em diluição em meio líquido e foi observada se as mesmas atingiam a Concentração Mínima Inibitória (CMI ou CMI50), ou seja, que apresentem um número de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) entre trinta e trezentos.

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do micro organismo teste conhecida como Concentração Mínima Inibitória, de maneira geral, quanto menor o CMI, maior o potencial antimicrobiano do extrato e, conseqüentemente, maior a dificuldade da bactéria em se desenvolver (Ostrosky et al., 2008).

5.2.1.1. *Erwinia carotovora* isolada de couve

A primeira cepa bacteriana a ser analisada foi a cepa resistente isolada de couve *Erwinia carotovora*. Na Figura 39 é mostrado a atividade do controle negativo (DMSO), no qual o crescimento bacteriano foi de 100%, preenchendo por inteiro a placa de Petri. Em seguida é ilustrado o controle positivo (antibiótico tetraciclina), em que se observa que o crescimento bacteriano foi totalmente inibido (não há UFC na placa de Petri). Logo abaixo está representado a atividade do extrato metanólico dos calos onde se pode notar que houve um significativo crescimento bacteriano, porém, menor que o crescimento visto no controle

negativo, ou seja, no extrato metanólico dos calos ocorreu uma ligeira inibição do crescimento de *E. carotovora*. Para o extrato metanólico das folhas não houve inibição do crescimento bacteriano.

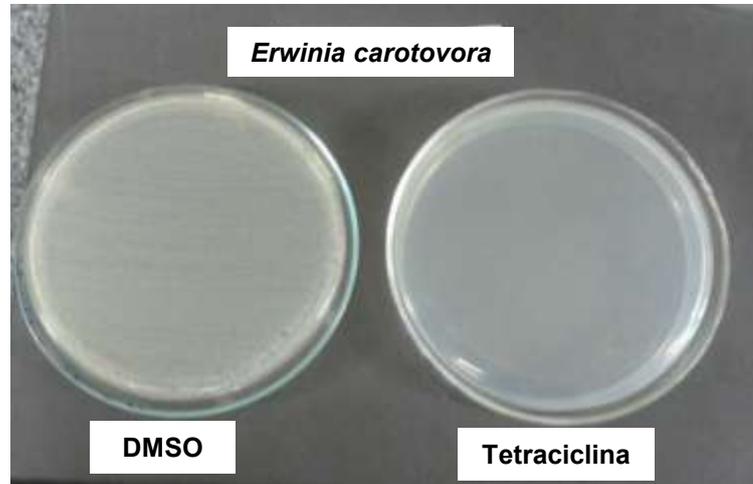


Figura 39: Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico tetraciclina), do controle negativo (DMSO) frente à cepa *Erwinia carotovora*.

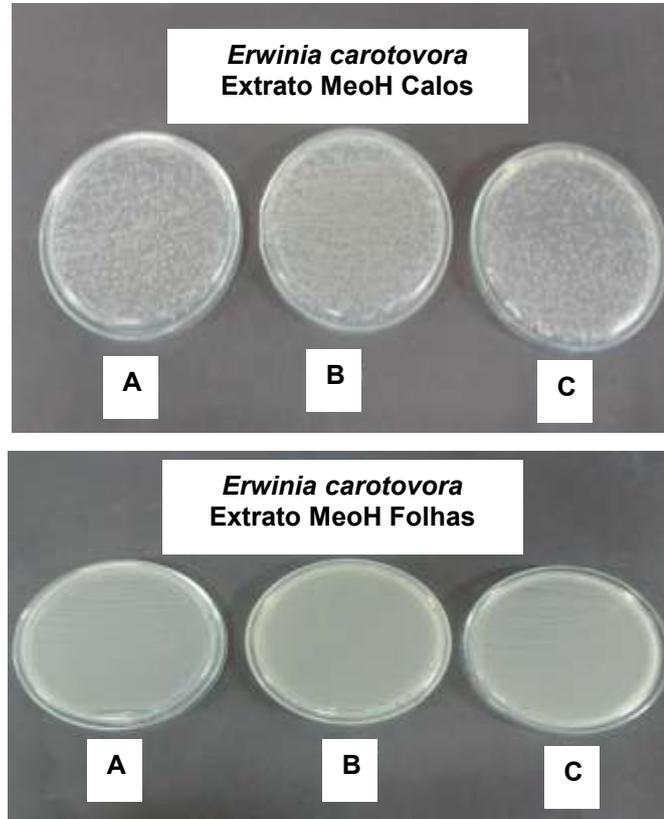


Figura 40: Atividade antibacteriana do extrato metanólico dos calos e das folhas de *Paratecoma peroba* (Peroba do campo) frente à cepa *Erwinia carotovora*.

Seguindo a ordem de fracionamento do extrato metanólico das folhas, as frações em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanólica foram avaliadas conforme mostra as Figuras de 41 a 44.

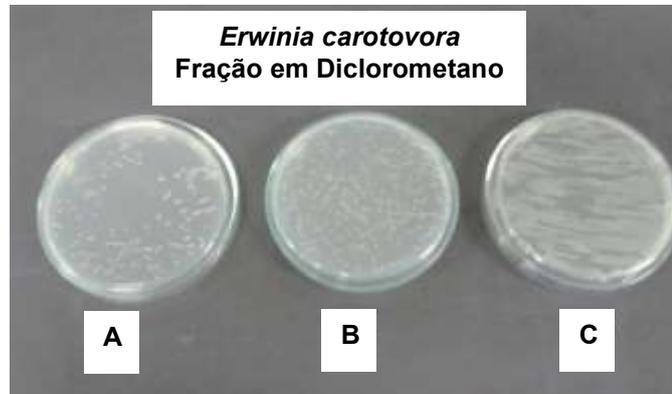


Figura 41: Atividade antibacteriana da fração diclorometano oriunda do extrato metanólico das folhas de *Paratecoma peroba* (Peroba do campo) frente à cepa *Erwinia carotovora*.

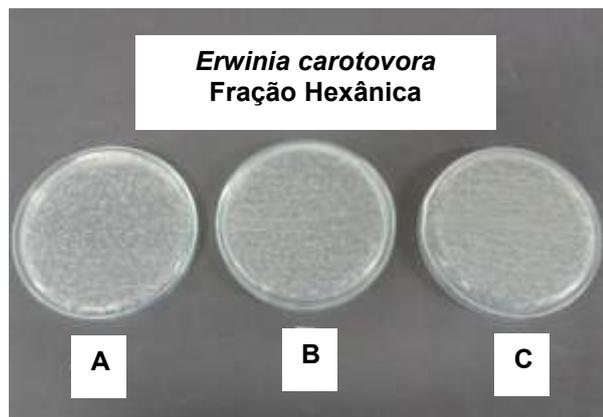


Figura 42: Atividade antibacteriana da fração hexânica oriunda do extrato metanólico das folhas de *Paratecoma peroba* (Peroba do campo) frente à cepa *Erwinia carotovora*.

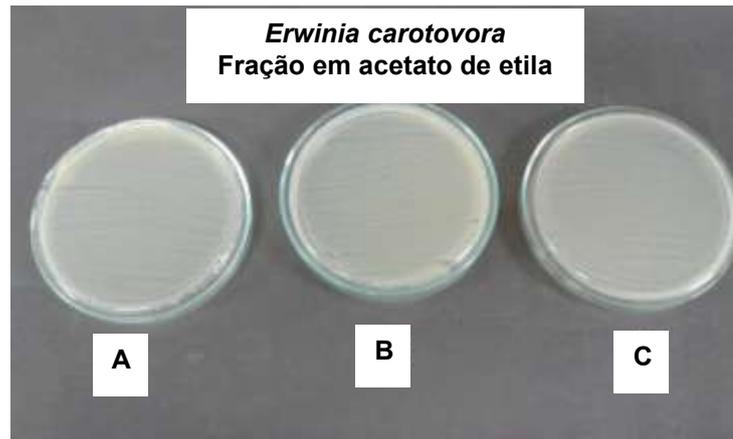


Figura 43: Atividade antibacteriana da fração em acetato de etila oriunda do extrato metanólico das folhas de *Paratecoma peroba* (Peroba do campo) frente à cepa *Erwinia carotovora*.

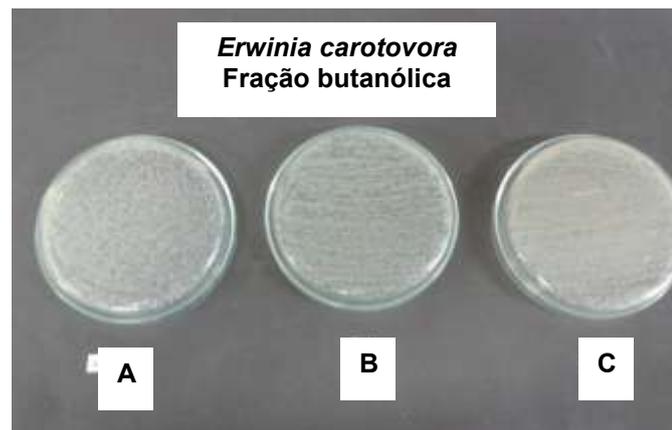


Figura 44: Atividade antibacteriana da fração butanólica oriunda do extrato metanólico das folhas de *Paratecoma peroba* (Peroba do campo) frente à cepa *Erwinia carotovora*.

Pode-se notar, analisando as figuras de 41 a 44, que as frações, exceto a fração em acetato de etila, foram mais eficazes na inibição do crescimento bacteriano que o extrato metanólico das folhas. Entretanto, algumas UFC são perceptíveis nas frações em hexano e butanol, não estando essas dentro da faixa da CMI (entre 30 e 300).

5.2.1.2. *Xanthomonas campestris*

A segunda cepa bacteriana a ser analisada foi a cepa isolada *Xanthomonas campestris*. Na Figura 45 é mostrado a atividade do controle negativo (DMSO), no qual o crescimento bacteriano foi de 100%, apresentando crescimento confluyente da placa de Petri. Em seguida é ilustrado o controle positivo (antibiótico Penicilina + Estreptomicina), em que se observa que o crescimento bacteriano foi totalmente inibido (não há UFC na placa de Petri). Logo abaixo está a atividade dos extratos metanólicos dos calos e das folhas.

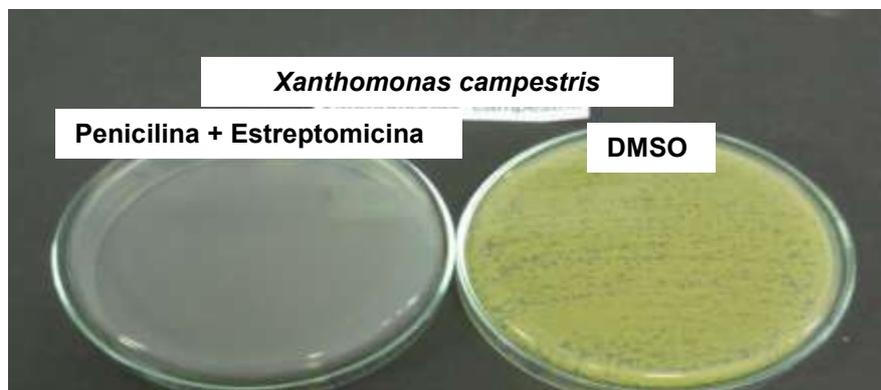


Figura 45: Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico penicilina + estreptomicina), do controle negativo (DMSO) frente à cepa *Xanthomonas campestris*.

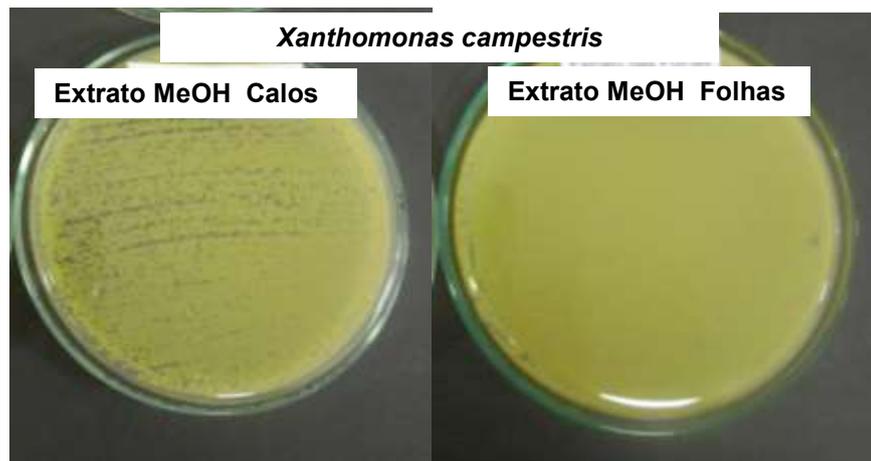


Figura 46: Atividade antibacteriana do extrato metanólico dos calos e das folhas de *Paratecoma peroba* (Peroba do campo) frente à cepa *Xanthomonas campestris*.

Nota-se na figura 46 que os extratos metanólicos dos calos e das folhas de *Paratecoma peroba* não apresentaram inibição frente à cepa *Xanthomonas campestris*.

Seguindo a ordem de fracionamento do extrato metanólico das folhas, as frações em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanólica foram avaliadas conforme mostra a Figura 47.

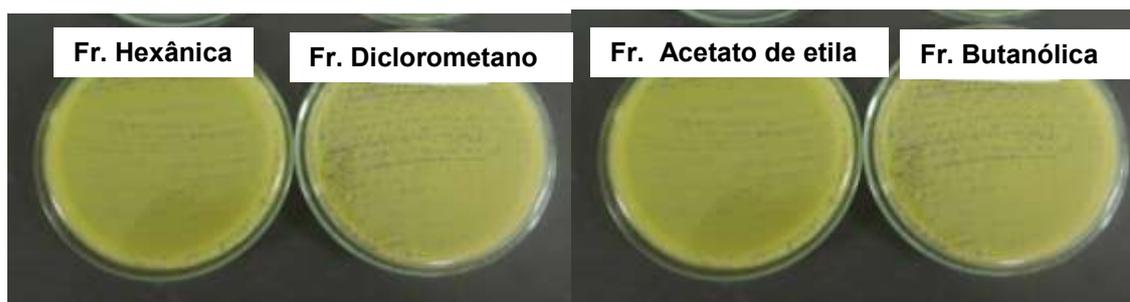


Figura 47: Atividade antibacteriana das frações em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol oriundas do extrato metanólicos das folhas de *Paratecoma peroba* (Peroba do campo) frente à cepa *Xanthomonas campestris*.

As frações analisadas apresentaram crescimento bacteriano semelhante ao do controle negativo, onde não ocorreu inibição no crescimento das cepas de *Xanthomonas campestris* avaliadas. Com isso pode-se afirmar que essas frações não são eficazes na inibição da bactéria em questão, por permitir o crescimento de mais de 300 UFCs.

5.2.1.3. *Burkholderia cepacia* ATCC 17759

A terceira cepa bacteriana a ser analisada foi a cepa padrão *Burkholderia cepacia* ATCC 17759. Na Figura 48 é mostrado a atividade do controle negativo (DMSO), no qual o crescimento bacteriano foi de 100%, apresentando crescimento confluyente nas placas de Petri, do controle positivo (gentamicina), no qual se observa que o crescimento bacteriano foi totalmente inibido (não há UFC na placa de Petri).

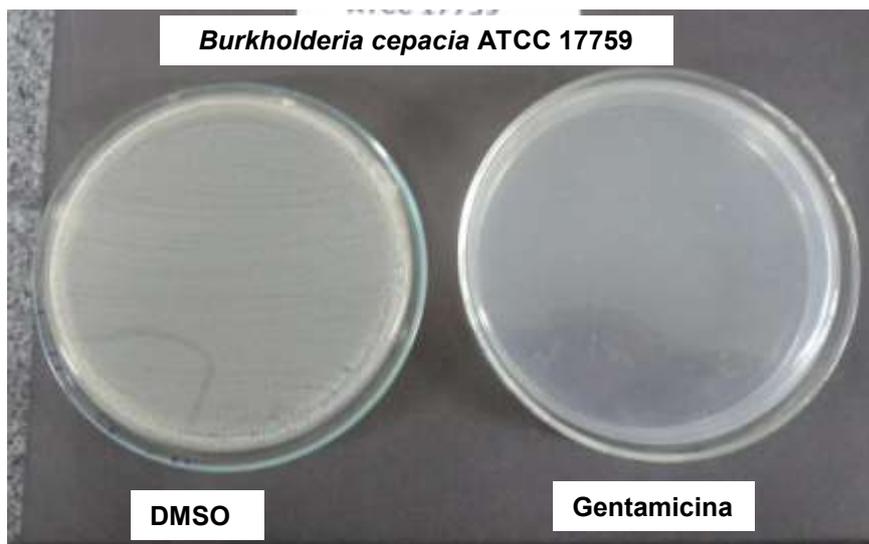


Figura 48: Atividade antibacteriana do controle negativo (DMSO) e do controle positivo (antibiótico gentamicina), frente à cepa *Burkholderia cepacia* ATCC 17759.

Para *B. cepacia* ATCC 17759 foram testados os extratos metanólicos dos calos e das folhas, bem como as respectivas frações oriundas do extrato das folhas. No entanto, exceto no extrato dos calos, não houve inibição do crescimento bacteriano, tendo essas frações crescimento similar ao controle negativo (Figura 49).



Figura 49: Atividade antibacteriana dos extratos metanólicos das folhas e as respectivas frações, frente à cepa *Burkholderia cepacia* ATCC 17759.

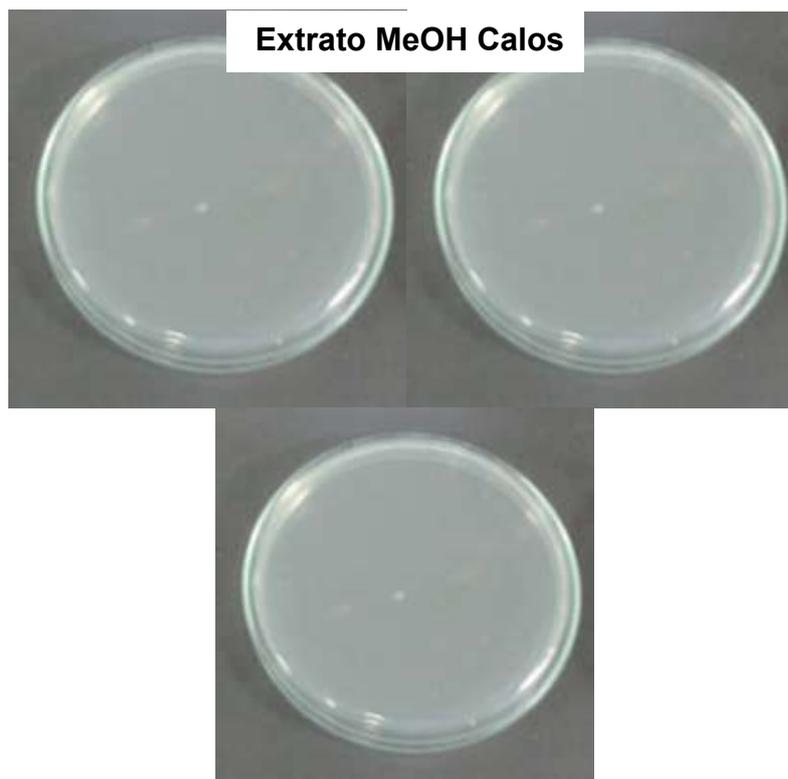


Figura 50: Atividade antibacteriana do extrato metanólico dos calos de *Paratecoma peroba*, frente à cepa *Burkholderia cepacia* ATCC 17759.

Pode-se notar pela figura 50 a seletividade desse extrato pela cepa de *B. cepacia* testada neste experimento. Embora o extrato metanólico das folhas e as respectivas frações não tenham apresentado resultados semelhantes.

Os resultados mostraram que os extratos e frações são capazes de inibir o crescimento bacteriano, uma vez que algumas amostras não apresentaram crescimento igual ao controle negativo (100%). Desse modo as amostras que se mostraram ativas na inibição do crescimento dessas bactérias fitopatogênicas foram submetidas ao ensaio com Sytox Green, no intuito de avaliar se houve ou não a perda da integridade da membrana celular da bactéria pela ação dos extratos e das frações.

Os ensaios com *E. carotovora*, *X. campestris* e *B. cepacia* foram pioneiros no que se refere ao teste com extratos de *P. peroba*. No entanto há descrito na literatura a inibição de cepas bacterianas por extratos de espécies vegetais da família Bignoniaceae.

O extrato de *Pyrostegia venusta* foi analisado frente a cepas de bactérias Gram negativas, sendo essas a *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 13388) e *Escherichia coli* (ATCC 11715). Os

resultados obtidos por Silva (2011) nesse ensaio foi relevante, sendo a concentração mínima inibitória (CMI) encontrada superior de 1 mg/mL de extrato de *P. venusta* para todas as cepas Gram negativas.

Em estudos realizados por Tresvenzol (2009) extratos de *Memora nodosa* foram analisados frente a cepas Gram negativas. Nesse estudo observou-se uma CMI igual a 12,5 mg/mL de extrato para as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Para as cepas *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) e *Escherichia coli* (ATCC 8739) a CMI foi superior a de 12,5 mg/mL de extrato.

Em outro estudo foi descrito atividade do extrato de *Jacaranda decurrens* frente a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (cepa clínica humana), onde foi observada a CMI de 4,37 mg/mL do extrato (Zatta et al., 2009).

5.2.2. Ensaio com Sytox Green

O reagente Sytox Green é um marcador fluorescente com cargas positivas que reage com os ácidos nucleicos de membranas comprometidas, resultando na emissão de fluorescência de coloração verde intenso (Roth et al., 1997).

Dos extratos e das frações testadas para cada cepa bacteriana foram escolhidas para o ensaio com o reagente Sytox Green as que apresentaram inibição do crescimento bacteriano no ensaio em meio líquido (Tabela 22).

Tabela 22: Extratos e frações que apresentaram inibição no crescimento bacteriano e respectivas bactérias fitopatogênicas.

Bactérias fitopatogênicas	Amostras ativas
<i>E. carotovora</i>	Extrato metanólico dos calos
	Fração em diclorometano oriunda do extrato metanólico das folhas
	Fração em hexano oriunda do extrato metanólico das folhas
	Fração em butanol oriunda do extrato metanólico das folhas
<i>B. cepacia</i>	Extrato metanólico dos calos

Na Figura 51 é mostrado a microscopia de fluorescência para as amostras que apresentaram inibição bacteriana frente à cepa *E. carotovora*.

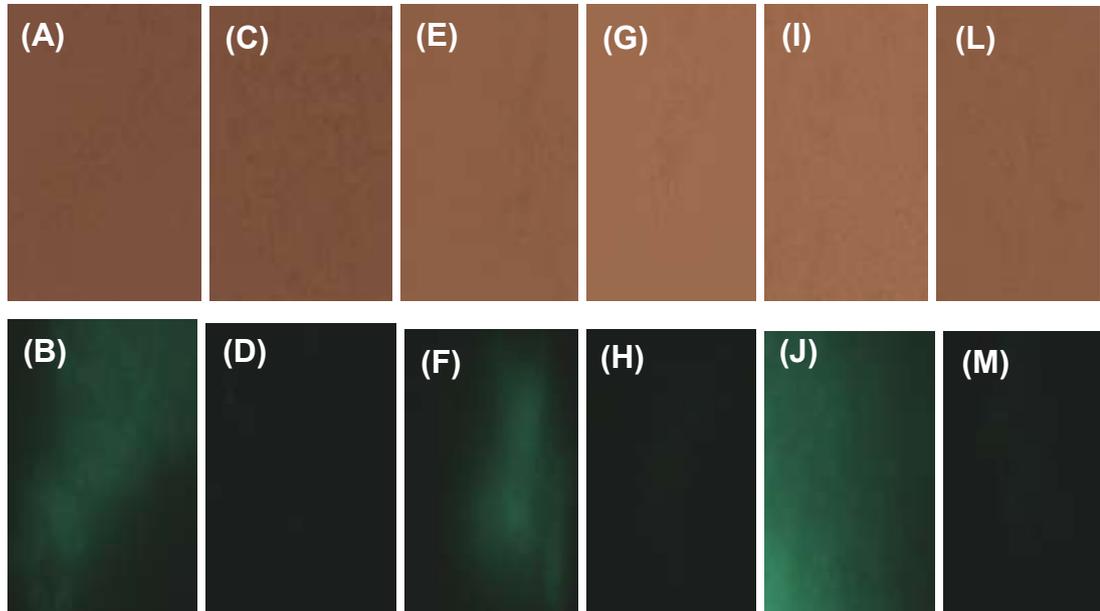


Figura 51: Microscopia de fluorescência frente à cepa *E. carotovora*. (A) controle positivo (Tetraciclina) visto por DIC, (B) controle positivo (Tetraciclina) visto por fluorescência, (C) controle negativo visto por DIC, (D) controle negativo visto por fluorescência, (E) fração em diclorometano visto por DIC, (F) fração em diclorometano visto por fluorescência, (G) fração em hexano visto por DIC, (H) fração em hexano visto por fluorescência, (I) fração em butanol visto por DIC, (J) fração em butanol visto por fluorescência, (L) extrato metanólico dos calos visto por DIC, (M) extrato metanólico dos calos visto por fluorescência.

Na Figura 52 é mostrado a microscopia de fluorescência para as amostras que apresentaram inibição bacteriana frente à cepa *B. cepacia*.

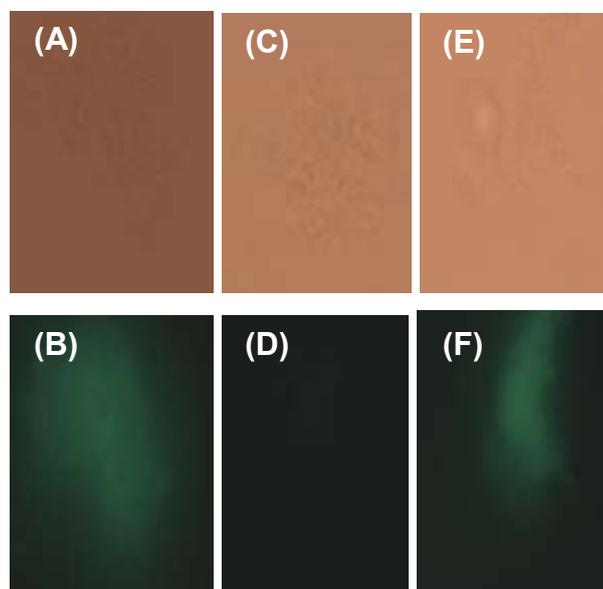


Figura 52: Microscopia de fluorescência frente à cepa *B. cepacia*. (A) controle positivo (Gentamicina) visto por DIC, (B) controle positivo (Gentamicina) visto por fluorescência, (C) controle negativo visto por DIC, (D) controle negativo visto por fluorescência, (E) extrato metanólico dos calos visto por DIC, (F) extrato metanólico dos calos visto por fluorescência.

Os resultados vistos nas figuras 51 e 52 corroboram com os resultados do ensaio em meio líquido, uma vez que as mesmas amostras que inibiram as cepas fitopatogênicas, foram capazes de permear a membrana celular das bactérias (amostras vistas por fluorescência). O rompimento da membrana celular oriundo da ação das amostras sobre as cepas bacterianas possibilita a interação das cargas positivas do reagente Sytox Green com os ácidos nucleicos da bactéria, interação essa responsável pela emissão de fluorescência (verde intenso) (Roth et al., 1997).

Esses mesmos autores testaram suspensões de *E. coli* e *S. aureus* tratadas com antibióticos e concluíram que os antimicrobianos foram capazes de alterar a membrana das bactérias, deixando as células tratadas 10 vezes mais fluorescentes que as células não tratadas.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho, foram realizadas as análises para a quantificação de compostos fenólicos em extratos de calos e de folhas de *Paratecoma peroba* (peroba do campo). Verificou-se o perfil químico dos extratos metanólicos, das frações, dos conjuntos e da substância isolada, como também a medida da quantificação da atividade antioxidante, e a capacidade das amostras em inibir o crescimento de cepas bacterianas de espécies de *Erwinia carotovora*, *Burkholderia cepacia* e *Xanthomonas campestris*.

Para a obtenção dos extratos metanólicos dos calos e das folhas, estes foram submetidos, em separado, a maceração exaustiva em metanol. Os fracionamentos cromatográficos foram utilizados com o intuito de se obter uma substância mais purificada e para o conhecimento do perfil químico.

O extrato dos calos foi avaliado quanto ao seu teor compostos fenólicos através de metodologia preconizada na literatura. O teor de compostos fenólicos pelo método de Folin Ciocalteu para o extrato metanólico dos calos foi de 0,153 g/g de extrato, valor este ligeiramente superior aos relatados na literatura. O teor de compostos fenólicos para o extrato metanólico das folhas foi de 0,864 g/g de extrato, valor este superior aos relatados na literatura. Essa diferença pode ter sido ocasionada pelos calos serem células propagadas *in vitro*.

O extrato metanólico dos calos quando avaliado por CLAE, apresentou um pico majoritário no tempo de retenção em torno de 18 minutos. Para o extrato metanólico das folhas foi observado um pico com tempo de retenção próximo de 16 minutos. Desta forma, iniciou-se o fracionamento dos extratos metanólicos através de colunas cromatográficas abertas com suporte em Gel em Sephadex LH-20, no intuito de se isolar as substâncias referentes a esses picos majoritários. Após se realizar uma série de fracionamentos, de acordo com o perfil químico de cada fração analisada por CLAE e UV para o extrato metanólico dos calos, obteve-se uma substância isolada (SC2aa), que foi enviada ao RMN para sua elucidação estrutural, que a partir de dados espectrocópicos o flavonol Tilirosídeo foi identificado. Todavia, este constitui o primeiro relato para o gênero *Paratecoma*, uma vez que só foi isolado para a espécie *Tecomella undulata*, pertencente à família Bignoniaceae.

O extrato metanólico dos calos e das folhas, e suas respectivas frações e conjuntos, e os padrões químicos quercetina, rutina e apigenina, foram avaliados quanto sua atividade antioxidante por duas metodologias, pelo método do sequestro do radical livre estável DPPH em três concentrações distintas (1000, 100 e 10 µg/mL) e pelo método de redução do ferro. Em uma escala de capacidade de sequestro de radicais livres (DPPH), a sequência exata para o extrato metanólico dos calos e respectivos conjuntos e substância isolada foram: Extrato metanólico < SC1 = SC2 = SC3 < SC2aa. Para o extrato metanólico das folhas a sequência foi: Extrato metanólico = Fração hexânica = Fração em diclorometano < Fração em acetato de etila = Fração butanólica = Conjunto SB3. Merecem destaque os conjuntos SC2 e SB3, e as frações em diclorometano, acetato de etila e butanólica, as quais os resultados indicaram atividade antioxidante superior a 50% na menos concentração analisada.

Observou-se que houve uma correlação entre a concentração de compostos fenólicos e a capacidade sequestradora de radicais livres, uma vez que os extrato que apresentaram maior concentração de compostos fenólicos, mostraram melhor atividade antioxidante.

Os extratos e respectivos conjuntos e frações foram avaliados quanto à atividade antibacteriana pelo método de diluição em meio líquido. Para determinar se houve ou não inibição no crescimento das cepas bacterianas, foram utilizados um controle positivo (antibiótico) e controle negativo (solvente DMSO). De acordo

com os resultados encontrado notou-se que as amostras do extrato metanólico dos calos demonstraram ter os melhores resultados na inibição do crescimento da bactéria fitopatogênica *Erwinia carotovora* do que o extrato metanólico das folhas. Para a espécie *Xanthomonas campestris* foi observado crescimento confluyente para todas as amostras testadas e frente a espécie *Burkholderia cepacia* (ATCC 17759) apenas o extrato metanólico dos calos apresentou potencial de inibição.

Na microscopia ótica de fluorescência observamos que os compostos que apresentaram melhor atividade de inibição sobre os microrganismos foram capazes de permear a membrana plasmática, permitindo assim que o corante vital Sytox Green penetrasse na célula.

Comparando os resultados da atividade antioxidante com a atividade antibacteriana, observa-se que não houve uma correlação direta entre os mesmos conjuntos e frações que apresentaram os melhores resultados para essas duas metodologias. Esse estudo indica então que há uma intensa capacidade antioxidante para os extratos dos calos e para os extratos das folhas, no entanto, ainda não é possível definir qual o mecanismo de ação dos extratos e das frações frente às cepas de bactérias fitopatogênicas.

Todavia, este trabalho corroborou para o conhecimento químico e biológico dessa espécie vegetal ameaçada de extinção, uma vez que existem poucos relatos na literatura no que se refere ao gênero *Paratecoma*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, L. T.; MOTA, R. V.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. (2007) Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca L.* e *Vitis vinifera L.*. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, v. 27.

ABREU, M. B. DE; TEMRAZ, A.; VASSALLO, A.; BRACA, A.; TOMMASI, N. DE (2014) Phenolic glycosides from *Tabebuia argentea* and *Catalpa bignonioides*. *Phytochemistry Letters*, 7: 85–88.

AGIZZIO, A. P.; CUNHA, M. DA; CARVALHO, A. O.; OLIVEIRA, M. A.; RIBEIRO, S. F.F.; GOMES, V. M. (2006) The antifungal properties of a 2S albumin - homologous protein from passion fruit seeds involve plasma membrane permeabilization and ultrastructural alterations in yeast cells. *Plant Science*, 171: 515–522.

ALI, S. S.; KASOJU, N.; LUTHRA, A.; SINGH, A.; SHARANABASAVA, H.; SAHU, A.; BORA, U. (2009) Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*, vol. 41.

ALMEIDA, E. P.; OLIVEIRA, R. P.; DANTAS, J. L. L. (2001) Indução e desenvolvimento de calos e embriões somáticos em mamoeiro. *Scientia Agrícola*, vol. 58.

AMIÉ, D.; DAVIDOVIÉ-AMIÉ, D.; BESLO, D., TRINAJSTIÉ, N. (2003) Structure-radical scavenging activity relationships of Flavonoids. *Croatica Chemica Acta*. 76: 55-61.

AMMA, R. B.; BHOURI, W.; SGHAIER, M. B.; BOUBAKER, J.; SKANDRANI, I.; NEFFATI, A.; BOUHLEL, I.; KILANI, S.; ANNE-MARIE (2009) Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): A structure-activity relationship study. *Food Chemistry*, vol. 116.

ANDRADE, C. A. DE; COSTA, C. K.; BORA, K.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; KERBER, V. A. (2007) Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 17: 231-235.

ARAÚJO, R., RODRIGUES, A.G., PINA-VAZ, C. (2004) A fast, practical and reproducible procedure for the standardization of the cell density of an *Aspergillus* suspension. *J. Med. Microbiol.* 53:783-786.

ARRUDA, A.L.A.; SOUZA, D.G.; VIEIRA, C.J.B.; OLIVEIRA, R.F.; PAVAN, F.R.; FUJIMURA, C.Q.L.; RESENDE, U.M.; CASTILHO, R.O. (2012) Análise fitoquímica e atividade antimicrobiana de extratos metanólicos de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. (Bignoniaceae). *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, Botucatu, 14:276-281.

BARBOSA, W. L. R.; PINTO, L. N.; QUIGNARD, E.; VIEIRA, J. M. S.; JR., J. O. C. S.; ALBUQUERQUE, S. (2008) *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18(4): 544-548.

BARRAS, F.; GIJSEGEM, F. V.; CHATTERJEE, A. K. (1994) extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Revista Phytopathol*, .32:201-34.

BATISTA, T. R. (2012) Organogênese e embriogênese somática de híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. Dissertação apresentada à *Universidade Federal de Lavras*, 76 páginas.

BATISTINI, ANA PAULA (2006) Diversidade morfológica, genética e química de populações naturais de *Anemopaegma arvense* (VELL.) stellf. Tese apresentada à *Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal*, 95 páginas.

BERNARDES, N. R. Estudo da Composição química e dos efeitos imunofarmacológicos do extrato dos frutos da aroeira (*Schinus terebenthifolius*). (2010) Tese de Mestrado - *Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF Campos dos Goytacazes*, 108 páginas.

CARVALHO, C. A.; LOURENÇO, M. V.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, P. S.; FACHIN, A. L.; PEREIRA, A. M. S. (2009) Atividade antioxidante de *Jacaranda decurrens* Cham., Bignoniaceae. *Revista Brasileira de farmacognosia*, vol. 19.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. (2007) Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Revista Química Nova*, vol. 30.

CIPRIANI, F. A.; FIGUEIREDO, M. R.; SOARES, G. L. G.; KAPLAN, M. A. C. (2012) Implicações químicas na sistemática e filogenia de Bignoniaceae. *Química Nova*, 35: 2125-2131.

CIPRIANI, F. A.; CIDA, F. W. DE; SOARES, G. L. G.; KAPLAN, M. A. C. (2007) Similaridade Química entre as Tribos de Bignoniaceae. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, 5: 612-614.

CREPALDI, M. O. S.; PEIXOTO, A. L. (2013) Florística e fitossociologia em um fragmento manejado por quilombolas em Santa Leopoldina, Espírito Santo, Brasil: ferramentas para restauração no corredor central da mata atlântica. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão*. Nova série.

DAVID, J. M.; BARREIROS, A. L. B. S. (2006) Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Revista Química Nova*, vol. 29.

DOUSSEAU, S.; ALVARENGA, A. A. DE; CASTRO, E. M. DE; SOARES, R. P.; EMRICH, E. B.; MELO, L. A. DE (2008) Anatomia foliar de *tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. (Bignoniaceae) propagadas *in vitro*, *in vivo* e durante a aclimatização. *Ciências agrotecnicas*, Lavras, 32: 1694-1700.

DOUSSEAU, S.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; ARANTES, L. O.; NERY, F. C. (2007) Superação de dormência em sementes de *Zeyheria montana* mart. *Ciências agrotecnicas*, Lavras, 31: 6.

DROSTE, A.; SILVA, A. M.; MATOS, A. V.; ALMEIDA, J. W. (2005) *In Vitro* Culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: Two Vulnerable Bromeliads Native to Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48: 5.

EMBRAPA, Empresa brasileira de pesquisa agropecuária (2006) Fatores inerentes à micropropagação. Campina Grande, PB.

FERRO, A. F.; BONACELLI, M. B.; ASSAD, A. L. (2006) Uso da biodiversidade e acesso a recursos genéticos no Brasil: atual regulamentação dificulta pesquisa e desenvolvimento. *Inovação Uniemp - Campinas.*, 2 :2.

FILHO, J. A. W.; MARTINS, D. A.; STADNIK, M. J. (2007) Aplicação foliar de tratamentos para o controle do míldio e da podridão-de-escamas de bulbos de cebola. *Horticulturas. Brasileiras*, v. 25, n. 4,

FILHO, R. C.; BAITELLO, J. B.; PASTORE, J. A.; AGUIAR, O. T.; SOUZA, S. C. P. M.; TONIOTO, M. T. Z.; LIMA, C. R.; RIBEIRO, A. (2009) Ampliando a densidade de coletas botânicas na região da bacia hidrográfica do Alto Paranapanema: Caracterização florística da Floresta Estadual e da Estação Ecológica de Paranapanema. *Biota Neotropicalita*, vol. 9.

FLORES, H. R.; VASCONCELLOS, N. J. DE; MALDANER, J.; GARLET, T. M. B.; NICOLOSO, F. T. (2007) Embriogênese Somática e Organogênese Indireta em *Pfaffia tuberosa* (Spreng.). *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, 5: 993-995.

FUKUDA, W. S. (2011) Propagação *in vitro* de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae). Dissertação apresentada ao Departamento de Botânica, *Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília*, 125 páginas.

GALLI, F.; CARVALHO, P. C. T.; TOKESHI, H.; BALMER, E.; KIMATI, H.; CARDOSO, C. O. N.; SALGADO, C. L.; KRUGNER, T. L.; CARDOSO, E. J. B. N.; FILHO, A. B. (1980) Doenças das plantas cultivadas. *Manual de fitopatologia*. Editora Agronômica CERES LTDA, v. 2, 587 páginas.

GALLICE, W. C.; MESSERSCHMIDT, I.; PERALTA-ZAMORA, P. (2011) Caracterização espectroscópica multivariada do potencial antioxidante de vinhos. *Química Nova*, 34: 397-403.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; MAHMOUD, T. S.; FIGUEIREDO, P. O.; RESENDE, U. M. (2007) Novos constituintes químicos das cascas do caule de *Tabebuia heptaphylla*. *Química Nova*, vol. 30.

GARCIA, S. F.; OLIVEIRA, C.; SILVA E SILVA, B. M. (2012) Emergência de plântulas de *Tabebuia caraiba* (Mart.) Bureau. *Ciência Rural*, Santa Maria, 42: 1419-1422.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 48.

GOMES, ANDRÉA M.A.; SILVEIRA, ELINEIDE B.; MARIANO, ROSA L.R. (2005) Tratamento pós-colheita com cálcio e microrganismos para controle da podridão-mole em tomate. *Hortic. bras.*, v. 23, n. 1,

GONÇALVES, A.L.; FILHO, A. ALVES; MENEZES, H. (2005) Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 72: 353-358.

GRANDO, M. F.; EICHLER, L.; TANABE, C. R.; SANTOS, J. F.; SANTOS, C. M. (1993) Indução de calos e regeneração de plantas em três genótipos de aveia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, vol. 5.

GUIMARÃES, S. M. A. (2011) Análise química e biológica da casca do fruto de *Pithecoctenium crucigerum* (Bignoniaceae). Monografia apresentada ao curso de Química em Licenciatura da unidade *Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas* - UNUCET – da Universidade Estadual de Goiás, 60 páginas.

HALLIWELL, B. (2011) Free radicals and antioxidants – quo vadis? *Trends in Pharmacological Sciences*. 32:125-130.

HARNORNE, J. B. (1977) Flavonoids and the Evolution of the Angiosperms. *Biochemical Systematics and Ecology*, 5: 7- 22.

HARNORNE, J. B. (1967) Comparative flavonoid biochemistry of the flavonoids-vi. patterns in the Bignoniaceae and the Gesneriaceae. *Phytochemistry*, 6:1643-1651.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E. (1984) Plant propagation. Principles and Practices. Prentice Hall, Englewood Cliffs, 647páginas.

HEIM, K. E. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal Nutrition Biochemistry*, vol. 13.

HÖFLING, J. F.; ANIBAL, P. C.; OBANDO-PEREDA, G. A.; PEIXOTO, I. A. T.; FURLETTI, V. F.; FOGGIO, M. A.; GONÇALVES, R. B. (2010) Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. *Braz. J. Biol*, 70:1065-1068.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. (1990) Liquid-liquid partition chromatography in natural product isolation. *Analytica Chimica*, vol. 236.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (1993) Geografia e Questão ambiental. < http: .
<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/monografias/GEBIS%20-%20RJ/geografiaequestaoambiental.pdf>.> Acessado 07 de novembro de 2013

JÁCOME, R. L. R. P.; RASLAN, D. S.; WAGNER, H.; OLIVEIRA, A. B. DE. (1998) Estudo químico de *Zeyheria montana* M. (Bolsa-de-pastor). *Revista Brasileira de farmacognosia*, 11:5-12.

JUNIOR^a, H. M. S.; TIRELLI, A. A.; CARVALHO, H. W. P.; OLIVEIRA, D. F.; PRADO, N. R. T.; CAMPOS, V. P. (2010) Purificação do flavonóide trans tilirosídeo do extrato metanólico das folhas de *Gochnatia barrosii* Cabrera (Asteraceae) e avaliação da sua atividade nematicida. *Ciências Agrotecnicas*, Lavras, 34: 1224-1231.

JUNIOR, J. M. C.; CARVALHO, D. A.; MANSANARES, M. E. (2010) A família Bignoniaceae Juss (Ipês) no município de lavras, Minas Gerais. *Revista Cerne, Lavras*. Vol. 16.

KHAMSAN, S.; LIARUANGRATH, S.; TEERAWUTKULRAG, A.; PYNE, S. G.; GARSON, M. J.; LIARUANGRATH, B. (2012) The isolation of bioactive flavonoids from *Jacaranda obtusifolia* H. B. K. SSP. *Rhombifolia* (G. F. W. Meijer) Gentry. *Acta Pharma*, 62: 181-190.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. (2005) A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, 1:1.

KOLEVA, L. I.; VAN BEEK, T. A.; LINSSEN, J. P. H.; DE GROOT, A.; EVSTATIEVA, L. N. (2002) Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*. 13:8-17.

LAGHARI, A. Q.; MEMON, S.; NELOFAR, A.; LAGHARI, A. H. (2013) *Tecomella undulata* G. Don: a rich source of flavonoids. *Industrial Crops and Products*, 43: 213-217.

LEMOS, G.C.S (1997) Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de espécies vegetais frente a bactérias de mastite bovina. Dissertação (Mestrado em 1997) – Campos dos Goytacazes – RJ – UENF, 141p.

LENCINA, C.; PIRES, V. S.; GOSMANN, G.; TAKEDA, A. T. C.; SCHENKEL, E. P. (2001) Tilirosideo em *Croton gnaphalii* Baill. *Revista Brasileira de farmacognosia*, 11: 89-93.

LIMA, C. S. A.; AMORIM, E. L. C.; SENA, K. X. F. R.; CHIAPPETA, A. A.; NUNES, X. P.; AGRA, M. F.; CUNHA, E. . L.; SILVA, M. S.; FILHO, J. M. (2003) Antimicrobial activity of a mixture of two isomeric phenylpropanoid glycosides from *Arrabidaea harleyi* A. H. Gentry (Bignoniaceae). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 37: 1.

LINS, B. L. A.; NASCIMENTO, M. T. (2010) Fenologia de *Paratecoma peroba* (Bignoniaceae) em uma floresta estacional semidecidual do norte fluminense, Brasil. *Revista Rodriguésia* 61(3).

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R. THOMAS, M. B. (1970) The systematic identification of flavonoids. Nova York: Springer-Verlag.

MANNERS, G. D.; JURD, L.; WONG, R.; PALMER, K. (1975) Constituents of *Tabebuia guayacan* the structure of guayacanm. *TetrdAnm*.

MARTINS, L.; LAGO, A. A.; ANDRADE, A. C. S.; SALES, W. R. M. (2009) conservação de sementes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl.) em nitrogênio líquido. *Revista Brasileira de sementes*, 31:071-076.

MATOS, L. M. M. (2011) Química de espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae). Dissertação do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 132 páginas.

MORAIS, S. M.; BRAZ FILHO, R. (2007) Produtos Naturais: estudos químicos e biológicos. Fortaleza: *Eduece*.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M.; SOARES, G. A.; SOARES, F. P.; CASTRO, A. H. F.; PAIVA, P. D. O. (2007) Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). *Ciências Agrotécnicas*, vol. 31.

OBMG, Organização de Biodiversidade de Minas Gerais. (2012). 2ª Lista de Plantas em Extinção, Organização de Biodiversidade. < <http://www.biodiversitas.org.br/listas-mg/MG-especies-presumivelmente-ameaçadas.pdf> > Acessado em 20 de agosto de 2012.

OKUMURA, F.; SOARES, M. H. F. B. E CAVALEIRO, E. T. G. (2002) Identificação de pigmentos naturais de espécies vegetais utilizando-se cromatografia em papel. *Revista Química Nova*, vol. 25.

OLIVEIRA, M. S.; DORS, G. C.; SOUZA-SOARES, L. A.; BADIALE-FURLONG, E. (2007) Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. *Alim. Nutr.*, Araraquara. 18: n.3.

OLIVEIRA, D.B. (2005) Aspectos Químicos e Etnomedicinais de Plantas da Dieta de Cervídeos na Reserva Particular do Patrimônio Natural – SESC Pantanal.

Tese de Doutorado – Rio de Janeiro – RJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 206 páginas.

OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S.; OLIVEIRA, G. G. (1993) Lignans and naphthoquinones from *Tabebuia incana*. *Phytochemistry*, 34: 1409-1412.

ONCEL, I.; YURDAKULOL, E.; KELES, Y.; KURT, L.; YILDIZ, A. (2004) Role of antioxidant defense system and biochemical adaptation on stress tolerance of high mountain and steppe plants. *Acta Oecologica*, vol 26.

OSTROSKY, E. A., MIZUMOTO, M. K., LIMA, M. E. L., KANEKO, T. M., NISHIKAWA, S. O., FREITAS, B. R. (2008) Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18(2):301-307.

PARK, B.; LEE, H.; LEE, S.; PIAO, X.; TAKEOKA, G. R.; WONG, R. Y.; YOUNG-JOON A.; JEONG-HAN K. (2006) Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori*. *Journal of Ethnopharmacology*, 105:255–262.

PAULA, J. T.; PAVIANI, L. C.; FOGLIO, M. A.; SOUSA, I. M. O.; CABRAL, F; A. (2013) Extraction of anthocyanins from *Arrabidaea chica* in fixed bed using CO₂ and CO₂/ethanol/water mixtures as solvents. *The Journal of Supercritical Fluids*, 81:33-41.

PAULETTI, P. M.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M. (2003) Constituintes químicos de *Arrabidoca samydoides* (BIGNONIACEAE). *Química nova*, 26: 5.

PEREIRA, M. A. (2011) Perfil cromatográfico das substâncias fenólicas presentes em extratos de mel de assa peixe e avaliação de seu poder antioxidante. Monografia apresentada em Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 77 páginas.

PINHAL, H. F.; ANASTÁCIO, M. R.; CARNEIRA, P. A. P.; SILVA, V. J.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. (2011) Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. *Ciência Rural*, Santa Maria, 41: 7.

PINHEIRO, M. V. M.; SILVA, T. C. R.; LIMA, C. M. B. V.; MOTOIKE, S. Y. (2012) Propagação *in vitro* de genótipos de alface via embriogênese somática. *Ciência Rural*, Santa Maria, 42: 11.

PIQUERAY, J.; BISTEAU, E.; CRISTOFOLI, S.; PALM, R.; POSCHLOD, P.; MAHY, G. (2011) Plant species extinction debt in a temperate biodiversity hotspot: Community species and functional traits approaches. *Biological Conservation*, 144:1619-1629.

PORTILLO, A.; VILA, R.; FREIXA, B.; ADZET, T.; CAN-IGUERAL, S. (2001) Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional Medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 76: 93–98.

PORT'S, P. DA S.; CHISTÉ, R. C.; GODOY, H. T.; PRADO, M. A. (2013) The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. *Food Research International*, 53: 875-881.

POSER, G. L. V.; SCHRIPSEMA, J.; HENRIQUES, A. H. T.; JENSEN, S. R. (2000) The distribution of iridoids in Bignoniaceae. *Biochemical Systematics and Ecology* 28: 351-366.

QUEIROZ, M. L.S.; VALADARES, M. C.; TORELLO, C. O.; RAMOS, A. L.; OLIVEIRA, A. B.; ROCHA, F. D.; ARRUDA, V. A.; ACCORCI, WALTER R. (2008) Comparative studies of the effects of *Tabebuia avellanae* bark extract and α -lapachone on the hematopoietic response of tumour-bearing mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 117: 228–235.

RICHTER, A. M. B.; INTROVINI, R. J.; ALMEIDA, F. M. M.; SILVA, R. Z.; KOZLOWSKI JR, V. A. (2002) Obtenção de frações de *Mikania lanuginosa* DC

através de partição líquido-líquido. *Resumo do IX Encontro de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Maringá.*

RIZZINI, C. M.; AGAREZ, F. V.; ANDRADE, L. H.; AZEVEDO, A. P. (1997) A família Bignoniaceae na APA de Maricá Rio de Janeiro, Brasil. *Acta Botânica Brasileira* 11:2.

RODRIGUES, P. O.; GONÇALVES, T. C.; SILVA, W. B. (2004) Influência de diferentes sistemas de solventes no processo de extração de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). *Acta Farm. Bonaerense*, vol. 23.

ROESLER, R. et al. (2007) Atividade antioxidante de frutos do cerrado. *Ciências e Tecnologias de Alimentos*, vol. 27.

ROMEIRO, R. DA S. (2005) Bactérias Fitopatogênicas. 2ª edição, 417 p.; Ed. UFV.

ROSA, S. E. S.; CORREA, A. R.; LEMOS, M. L. F.; BARROSO, D. V. (2007) O setor de móveis na atualidade: uma análise preliminar. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, 25: 65-106. >
http://www.bndespar.com.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set2503.pdf > Acessado 07 de novembro de 2013.

ROTH, B. L.; POOT, M.; YUE, S. T.; MILLARD, P. J. (1997) Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with Sytox green nucleic acid stain. *Appl. Environ. Microbiol*, 63:2421.

SABUDAK, T. et al. (2008) Antiinflammatory and antioxidant activities of *Trifolium resupinatum* var. *microcephalum* extracts. *Asian Journal of Chemistry*, vol. 20.

SAKIHAMA, Y.; COHEN, M. F.; GRACE, S. C.; YAMASAKI, H. (2002) Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, vol 177.

SALIS, S. M.; CRISPIM, S. M. A. (2006) Densidades de Árvores Listadas como Ameaçadas de Extinção na Bacia do Alto Paraguai. Comunicado técnico 54, *Embrapa*.

SANDERMANN, W.; SIMATUPANG, M.H.; WENDEBORN, W. (1968) Neue chinone aus dem Kernholz Von *Paratecoma peroba* Kuhl. Die Naturwissenschaften, Vol.55(1), p.38.

SANTOS, P. M. L. DOS; JAPP, A. S.; LIMA, L. G.; SCHRIPSEMA, J.; MENEZES, F. DE S.; KUSTER, R. M. (2010) Antioxidant activity from the leaf extracts of *Jacaranda puberula* Cham., Bignoniaceae, a Brazilian medicinal plant used for blood depuration. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20: 147-153.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA A. R. (2004) Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Medicina e Esporte*, vol. 10.

SCOGIN, RON (1980) Anthocyanins of the Bignoniaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 8: 273-276.

SHAH, J. (2009) Plants under attack: systemaic signals in defence. *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 12.

SEITO, LEONARDO NOBORU; RUIZ, ANA LUCIA TASCA GOIZ; COSTA, DEBORA VENDRAMINI; TINTI, SIRLENE VALÉRIO; CARVALHO, JOÃO ERNESTO; BASTOS, JAIRO KENUPP; STASI, LUIZ CLAUDIO (2011) Antiproliferative Activity of Three Methoxylated Flavonoids Isolated from *Zeyheria montana* Mart. (Bignoniaceae) Leaves. *Phytotherapy Research*, Vol. 25, Pag. 1421–1578.

SICHAEM, J.; KAENNAKAM, S.; SIRIPONG, P.; TIP-PYANG, S. (2012) Tabebuialdehydes A–C, cyclopentene dialdehyde derivatives from the roots of *Tabebuia rósea*. *Fitoterapia*, 83: 1456–1459.

SILVA, P.B.; MEDEIROS, A.C.M.; DUARTE, M.C.T.; RUIZ, A.L.T.G.; KOLB, R. M.; FREI, F.; SANTOS, C. (2011) Avaliação do potencial alelopático, atividade antimicrobiana e antioxidante dos extratos orgânicos das folhas de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (Bignoniaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.13, n.4, p.447-455.

SILVA, M. B.; RAMOS, A. R.; VENTURIERI, G. A. (2006) Indução de calos em espécies amazônicas do gênero *Theobroma*. *Ciência Agrotécnica*, vol. 30.

SILVA, G. C.; NASCIMENTO, M. T. (2001) Fitossociologia de um remanescente de mata sobre tabuleiro no norte do estado do Rio de Janeiro (Mata do Carvão). *Revista Brasileira de Botânica*, vol 24.

SIMIQUELI, R. F. (2013). As empresas e a sustentabilidade: gestão e compromisso de conservação dos recursos naturais e da biodiversidade. Congresso Nacional de Excelência em gestão. < http://www.excelenciaemgestao.org/Portals/2/documents/cneg9/anais/T13_2013_0060.pdf > Acessado 07 de novembro de 2013.

SOARES, A. M.S E MACHADO, O. L.T. (2007) Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigenio. *Revista Ciências Agrárias e biológicas*, 1:9.

SOUZA, M. M. DE ; ROCHA, M. DA; OLIVEIRA , M. DOS S.; BADIALE-FURLONG, E. (2012) Avaliação das atividades antifúngica e antimicotoxina de extratos fenólicos de farelo de arroz. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 71:437-41.

SOUSA, C. M. DE M.; SILVA, H. R. E.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES , M. C. C.; COSTA, C. L. S. DA; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, PAULO B. DE M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. (2007) Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30:351-355.

STEINERT, J.; KHALAF, H.; RIMPLER, M. (1995) HPLC separation and determination of naphtho[2,3-b]furan-4,9-diones and related compounds in extracts of *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae). *Journal of Chromatography A*, 693:281-287.

STURZ, A. V.; CARTER, M. R.; JOHNSTON, H. W. (1997) A review of plant disease, pathogen interactions and microbial antagonism under conservation tillage in temperate humid agriculture. *Soil e Tillage Research*, vol 41.

SUO, M.; ISAO, HASEGAWA; K. H.; TAKANO, F.; OHTA, T. (2012) Anti-inflammatory constituents from *Tabebuia avellanedae*. *Fitoterapia*, 83: 1484–1488.

TAIT, A.; GANZERLI, S.; DI BELLA, M. (1996) Synthesis and free radical scavenging activity of 4-(2H-1,2,4-Benzothiadiazine-1,1-dioxide-3-yl)-2,6-bis(1,1-methylethyl) phenols. *Tetrahedron*, vol. 52.

TAIZ, L. E ZEIGER, E. (2009) *Fisiologia vegetal*. 4º edição, Porto Alegre: Artmed, 848 páginas.

TAKEMURA, O. S.; IINUMA, M.; TOSA, H.; MIGUEL, O. G.; MOREIRA, E.; NOZAWA, Y. (1995) A flavone from leaves of *Arrabidaea chica f. cupre*. *Phytochemistry*, 38: 1299-1300.

TRESVENZOL, L. M. F.; FIUZA, T. S.; PIMENTA, F. C. (2009) Composição Química do Óleo Essencial e Atividade Antimicrobiana da *Memora nodosa* (Bignoniaceae). *Latin American Journal of Pharmacy*, 28 (4), 513-9.

WARASHINA, T.; NAGATANI, Y.; NORO, T. (2004) Constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa*. *Phytochemistry*, 65: 2003–2011.

YAN, R.; CAO, Y.; CHEN, C.; DAI, H.; YU, S.; WEI, J. (2011) Antioxidant flavonoids from the seed of *Oroxylum indicum*. *Fitoterapia*, 82: 841-848.

ZAMITH, L. R.; SCARANO, F. R. (2004) Produção de mudas de espécies das Restingas do município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Acta bot. bras.* 18: 161-176.

ZATTA, D. T.; PIMENTA, F. C.; TRESVENZOL, L. M. F. (2009) Estudo da Atividade Antibacteriana contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e da Toxicidade Aguda das folhas da *Jacaranda decurrens*. *Latin American Journal of Pharmacy*, 28 (4) : 485-9.

ZIMMER, A. R.; LEONARDI, B.; MIRON, D.; SCHAPOVAL, E.; OLIVEIRA, J. R. DE; GOSMANN, G. (2012) Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capsicum baccatum*: From traditional use to scientific approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 139: 228– 233.