

SUZANE VIRTUOSO

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DAS CASCAS DE *Erythrina velutina*
Willd. - FABACEAE (LEGUMINOSAE - PAPILIONOIDEAE)**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, curso de Pós - Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel
Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Marilis Dallarmi Miguel

CURITIBA

2005

This document has been created with a DEMO version of PDF Create Convert
(http://www.equinox-software.com/products/pdf_create_convert.html)
To remove this message please register.

Pelo amor, união, apoio e paciência
em todos os momentos,
dedico este trabalho à minha preciosa família
Luiz, Leonilda e Luiz Aurélio.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel pela confiança, paciência, estímulo à pesquisa e pelo seu modo especial de ver a vida e as pessoas.

À minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Marilis Dallarmi Miguel pelo dinamismo, entusiasmo, prontidão em ajudar e encaminhar e, pela confiança depositada.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná pela liberação em afastamento parcial, à coordenadora e vice do curso de Farmácia, Nadir Marcondes e Nereida Gioppo pelo apoio e compreensão, a todos os (as) professores (as) e funcionários (as) do curso de Farmácia, em especial aos amigos da Farmácia Escola pelo excelente relacionamento de trabalho, ajuda, momentos alegres e ao meus queridos e compreensivos alunos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR, que direta ou indiretamente participaram da evolução do trabalho e aos funcionários, especialmente Regina, Hilda e Geni pela ajuda, cafés e bons momentos, também ao Dr. Maurício e a Graça da Central Analítica pela ajuda.

Ao Departamento de Química da UFPR especialmente a Prof^a. Dr^a. Ana Luísa pelas análises de RMN e fundamental ajuda, ao Tiago pela importante colaboração com análises de IV.

A Andrezza, Karina, Mariana, Milena e aos alunos do curso de Farmácia da UFPR que ajudaram com entusiasmo e responsabilidade nas pesquisas.

A empresa As Ervas Curam Ltda pelo apoio e abertura, especialmente ao Robson e Sr. Aldo e ao Dr. Viseldo da EMBRAPA SEMI-ÁRIDO pela grande ajuda.

Ao João Carvalho e Miriam C. Machado pela grande ajuda, ensinamentos e discussões científicas altamente produtivas, aos colegas do Mestrado pelos bons (e as vezes não tão bons) momentos compartilhados e todas as pessoas que colaboraram na execução deste trabalho.

A Josiane de F. G. Dias pela amizade, convivência, demonstração de força e determinação, pelas boas conversas em tantas atividades realizadas juntas ou vizinhando a bancada de trabalho.

A Aline Davet, agradeço a amizade espontânea e sincera, escuta, ajuda, novas idéias e maneiras de perceber as coisas, lanches, cafés e risadas durante o mapa metabólico e em tantas outras situações, enfim uma presença que ajudou a tornar mais leve o grande desafio!!!

A minha família que me deu amor e apoio para que eu pudesse ter a tranqüilidade necessária durante o turbilhão de atividades e viagens semanais entre Cascavel e Curitiba.

Ao meu querido e amado Eduardo Dutra Infante Vieira por todas as vezes que me levou e buscou, pelos ótimos momentos, segurança, fotos, paciência e ajuda. Seu apoio constante, compreensão, dedicação e amor foram fundamentais.

E finalmente a Deus pela força, proteção e presença real em minha vida, pela oportunidade de enxergar outra face da grandeza da Sua obra e pela sutil abertura de um novo caminho.

NOTA BIOGRÁFICA

A autora graduou-se em Farmácia Industrial pela Universidade Federal do Paraná – UFPR em 1998. Em 1999 cursou especialização em Administração de Empresas com ênfase em Gestão de Negócios pelo extinto Instituto Paranaense de Gestão de Recursos – INSPAGER.

Atuou profissionalmente nas Farmácias Schaffer Ltda. de 1998 a 1999 e Magistral Ltda., de 1999 a 2001.

Em maio de 2001 foi aprovada em Teste Seletivo para as disciplinas de Química Farmacêutica e Atenção Farmacêutica no curso de Farmácia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE onde permaneceu até maio de 2003 também com as disciplinas de Administração e Economia, Estágio Supervisionado em Farmácia de Dispensação.

Em novembro de 2001 foi aprovada em concurso público para o cargo de docente da disciplina de Atenção Farmacêutica da UNIOESTE sendo efetivada em junho de 2003. Atua como docente das disciplinas Atenção Farmacêutica I e II e como Responsável Técnica Auxiliar da Farmácia Escola e no curso de Especialização em Farmacologia da mesma Instituição. Em 2004 lecionou as disciplinas de Farmacotécnica Alopática, Atenção Farmacêutica e Estágio Supervisionado em Procedimentos Assistenciais Básicos, dentre outras atividades.

Em março de 2003 foi aprovada na seleção do curso de Pós-graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da UFPR, em nível de Mestrado onde desenvolveu um estudo fitoquímico e biológico das cascas de *Erythrina velutina* Willd., FABACEAE (LEGUMINOSAE), conhecida como mulungu.

Com os resultados obtidos pretende-se continuar o trabalho aprofundando técnicas de separação, identificação e aplicação biológica dos compostos obtidos.

Ao estudo da sabedoria jamais haveis de pôr termo;
 não acabe ele antes de acabada a vossa vida.
Em três coisas cumpre ao homem pensar e exercitar-se
enquanto viva: em saber bem, em bem falar e em bem obrar.
 Desterra dos teus estudos a arrogância;
 não fiques presumido pelo que sabes, porque tudo
quanto sabe o mais sábio homem do mundo nada é
em comparação com o muito que lhe falta saber.
 Mui escasso é, e muito obscuro e incerto,
 tudo quanto os homens alcançam nesta vida;
e os nossos entendimentos, detidos e presos neste cárcere do corpo,
estão oprimidos por grandíssima escuridão, trevas e ignorância,
e o corte ou fio do engenho é tão cego que não pode cortar,
nem passar-lhe de raspão sequer, coisa alguma.
Afora isto, a arrogância faz com que não possas tirar proveito do estudo;
 creio que terá havido muitos que não chegaram a sábios
e que poderiam tê-lo sido se não dessem a entender que já o eram.
 Deveis guardar-vos, também, de porfias, de competências,
 de menosprezar ou amesquinhar o que os
outros sabem ou não sabem, de desejar vanglórias.
 Para isto, principalmente, servem os estudos:
para nos ensinarem a fugir de tais vícios e de outros semelhantes.

Juan Luis Vives

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE QUADROS E TABELAS	Xii
LISTA DE ABREVIATURAS E DE SIGLAS	Xiv
LISTA DE SÍMBOLOS	Xv
RESUMO	Xvi
ABSTRACT	Xvii
.....	
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVO GERAL.....	4
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
2 REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA FABACEAE.....	5
2.1.1 Descrição da Família Fabaceae.....	6
2.1.2 Distribuição Geográfica da Família Fabaceae.....	7
2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO E A ESPÉCIE.....	8
2.2.1 Sinonímia da Espécie.....	9
2.2.1.1 Sinonímia vulgar.....	9
2.2.1.2 Sinonímia científica.....	10
2.2.2 Distribuição Geográfica da Espécie.....	10
2.2.3 Aspectos Ecológicos da Espécie.....	11
2.2.4 Enquadramento Taxonômico da Espécie.....	12
2.2.5 Morfologia da Espécie.....	12
2.2.6 Aspectos Etnobotânicos da Espécie.....	12
2.2.7 Aspectos Químicos das Espécies do Gênero <i>Erythrina</i>	13
2.2.7.1 Biossíntese dos alcalóides do gênero <i>Erythrina sp.</i>	19
2.2.8 Aspectos Farmacológicos do Gênero e Espécie.....	19
2.2.9 Aspectos Toxicológicos do Gênero e Espécie.....	23
2.2.10 Aspectos de Atividade Antimicrobiana do Gênero.....	25
2.2.11 Considerações Sobre Alelopatia.....	26
2.2.12 Análise Estatística.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	31
3.2 ENSAIOS FITOQUÍMICOS.....	31
3.2.1 Preparo do Extrato Aquoso a 20%.....	31
3.2.1.1 Características organolépticas e pH.....	31
3.2.1.2 Pesquisa de antocianinas.....	32
3.2.1.3 Pesquisa de heterosídeos saponínicos.....	32
3.2.1.4 Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos.....	32
3.2.1.5 Pesquisa de taninos.....	33
3.2.2 Preparo do Extrato Etanólico 20%.....	34
3.2.2.1 Fracionamento do extrato em solventes de polaridade crescente.....	34
3.2.2.2 Pesquisa de alcalóides.....	34
3.2.2.3 Pesquisa de leucoantocianidinas.....	35
3.2.2.4 Pesquisa de flavonóides.....	36

3.2.2.5	Teste oxálico - bórico.....	36
3.2.2.6	Ensaio de Pacheco.....	37
3.2.2.7	Pesquisa de cumarinas.....	37
3.2.2.8	Pesquisa de antraquinonas.....	38
3.2.2.9	Pesquisa de esteróides e triterpenos - reação de Liberman Bouchard...	38
3.2.2.10	Pesquisa de esteróides e triterpenos - reação de Keller Kelliani.....	39
3.3	OBTENÇÃO DO EXTRATO E FRACIONAMENTO.....	40
3.3.1	Obtenção do Extrato Bruto.....	40
3.3.2	Fracionamento do Extrato Bruto.....	40
3.3.2.1	Testes com o vegetal, extrato bruto e frações.....	41
3.4	PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES DO EXTRATO BRUTO.....	41
3.4.1	Fração Hexano (FHEX).....	41
3.4.2	Fração Diclorometano (FDMT).....	43
3.4.2.1	Coluna cromatográfica da fração diclorometano.....	44
3.4.2.2	Extração ácido-base da fração diclorometano.....	46
3.4.3	Fração Acetato de Etila (FATE).....	49
3.4.4	Fração Hidroalcoólica Remanescente (FHAR).....	49
3.5	IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS.....	52
3.5.1	Cromatografia Gasosa da Fração Hexano.....	52
3.5.2	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono e Hidrogênio dos Compostos Isolados.....	53
3.5.3	Espectrometria no Infravermelho dos Compostos Isolados.....	53
3.5.4	Espectroscopia no Ultravioleta do Composto 6.....	53
3.6	ESTUDO DE ATIVIDADE ALELOPÁTICA DO EXTRATO BRUTO.....	54
3.6.1	Germinação.....	55
3.6.2	Crescimento.....	55
3.6.3	Análise Estatística.....	56
3.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	56
3.7.1	Difusão em Disco.....	57
3.7.2	Concentração Inibitória Mínima.....	58
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1	TESTES COM O VEGETAL, EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES.....	59
4.2	ENSAIOS FITOQUÍMICOS.....	59
4.3	RESULTADOS COM A FRAÇÃO HEXANO.....	61
4.3.1	Cromatografia em Camada Delgada da Fração Hexano.....	61
4.3.2	Cromatografia Gasosa da Fração Hexano.....	61
4.3.3	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono e Hidrogênio Composto 1....	64
4.3.3.1	Discussão do espectro de RMN de ¹³ C do composto 1.....	64
4.3.3.2	Discussão do espectro de RMN de ¹ H do composto 1.....	66
4.3.4	Espectroscopia no Infravermelho do Composto 1.....	68
4.4	RESULTADOS COM A FRAÇÃO DICLOROMETANO.....	70
4.4.1	Características dos Compostos Isolados.....	70
4.4.2	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono e Hidrogênio do Composto 2.....	70
4.4.2.1	Discussão do espectro de RMN de ¹³ C do composto 2	70

707073

4.4.2.2	Discussão do espectro RMN de ^1H do composto 2.....	72
4.4.3	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono do Composto 4	74
4.4.4	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono e Hidrogênio do Composto 5.....	77
4.4.4.1	Discussão do espectro de RMN de ^{13}C e DEPT do composto 5.....	77
4.4.4.2	Discussão do espectro de RMN de ^1H do composto 5.....	80
4.5	RESULTADOS COM A FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE...	82
4.5.1	Características do Composto 6.....	82
4.5.2	Espectroscopia no Ultravioleta do Composto 6.....	82
4.5.3	Espectroscopia no Infravermelho do Composto 6.....	83
4.5.4	Espectroscopia por Ressonância Magnética de Carbono do Composto 6..	85
4.6	ATIVIDADE ALELOPÁTICA.....	87
4.6.1	Extrato Bruto.....	87
4.6.1.1	Germinação.....	87
4.6.1.2	Crescimento.....	88
4.6.2	Fração Hexano.....	90
4.6.2.1	Germinação.....	90
4.6.2.2	Crescimento.....	91
4.6.3	Fração Diclorometano.....	93
4.6.3.1	Germinação.....	93
4.6.3.2	Crescimento.....	94
4.6.4	Fração Acetato de Etila.....	96
4.6.4.1	Germinação.....	96
4.6.4.2	Crescimento.....	96
4.6.5	Fração Hidroalcoólica Remanescente.....	98
4.6.5.1	Germinação.....	98
4.6.5.2	Crescimento.....	99
4.7	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	103
5	CONCLUSÃO	107
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
	REFERÊNCIAS	111

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- <i>Erythrina velutina</i> Willd., FABACEAE.....	9
FIGURA 2	- MAPA DA DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DE <i>Erythrina velutina</i>	11
FIGURA 3	- ESQUELETO CLÁSSICO DOS ALCALÓIDES DE <i>Erythrina sp.</i>	14
FIGURA 4	- ESTRUTURA DE COMPOSTOS JÁ ISOLADOS DA <i>Erythrina velutina</i> ..	16
FIGURA 5	- OUTROS COMPOSTOS JÁ ISOLADOS DO GÊNERO <i>Erythrina</i>	17
FIGURA 6	- BIOSÍNTESE DOS ALCALÓIDES DE <i>Erythrina sp.</i>	20
FIGURA 7	- ESQUEMA DE PURIFICAÇÃO E SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS DA FRAÇÃO HEXANO.....	42
FIGURA 8	- PROCESSO DE SEPARAÇÃO DA FRAÇÃO DICLOROMETANO.....	44
FIGURA 9	- FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO ÁCIDO-BASE E PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO DICLOROMETANO.....	47
FIGURA 10	- ESQUEMA DE PURIFICAÇÃO E SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE.....	50
FIGURA 11	- FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES VISANDO A REALIZAÇÃO DOS OBJETIVOS PROPOSTOS.....	52
FIGURA 12	- CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COMPARATIVA DA FRAÇÃO HEXANO COM PADRÕES ESTERÓIDES E TRITERPENO...	61
FIGURA 13	- CROMATOGRAMA PADRÃO DE REFERÊNCIAS ANALISADAS EM CROMATOGRAFIA GASOSA POR PADRONIZAÇÃO INTERNA.....	62
FIGURA 14	- CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO HEXANO.....	63
FIGURA 15	- RMN ¹³ C (50 MHz, em CDCl ₃) PARA O COMPOSTO	65
FIGURA 16	- 1.....	65
FIGURA 17	- ESTRUTURA DO COMPOSTO MAJORITÁRIO SUGERIDA PARA O COMPOSTO 1.....	66
FIGURA 18	- COMPARAÇÃO DE C1 COM PADRÕES DE ESTERÓIDES E TRITERPENO.....	66
FIGURA 19	- ESPECTRO DE RMN ¹ H (200 MHz, em CDCl ₃) PARA O COMPOSTO 1.....	67
FIGURA 20	- ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 1.....	69
FIGURA 21	- RMN ¹³ C (50 MHz, em CDCl ₃) PARA O COMPOSTO 2 E ESTRUTURA SUGERIDA.....	71
FIGURA 22	- ERITRALINA E VALORES DE DESLOCAMENTO QUÍMICO DE HIDROGÊNIO, CONSTANTE DE ACOPLAMENTO E MULTIPLICIDADE DOS SINAIS.....	72
FIGURA 23	- RMN ¹ H (200 MHz, em CDCl ₃) PARA O COMPOSTO	73
FIGURA 24	- 2.....	73

	RMN ¹³ C (50 MHz, em CDCl ₃) PARA O COMPOSTO	
FIGURA 23	- 4.....	74
FIGURA 24	- ESTRUTURAS DE ALCALÓIDES SUGERIDOS PARA O COMPOSTO 4.....	75
	RMN ¹³ C (50 MHz, em CDCl ₃) PARA O COMPOSTO	
FIGURA 25	- 5.....	77
FIGURA 26	- DEPT DO COMPOSTO 5.....	78
FIGURA 27	- PRIMEIRA PROPOSTA DE ESTRUTURA PARA COMPOSTO 5 A PARTIR DOS DESLOCAMENTOS OBTIDOS NO ESPECTRO	79
FIGURA 28	- SEGUNDA PROPOSTA DE ESTRUTURA PARA COMPOSTO 5 A PARTIR DOS DESLOCAMENTOS OBTIDOS NO ESPECTRO	79
FIGURA 29	- ERITRININA E VALORES DE DESLOCAMENTO QUÍMICO DE HIDROGÊNIO, CONSTANTE DE ACOPLAMENTO E MULTIPLICIDADE DOS SINAIS.....	80
FIGURA 30	- ESPECTRO DE RMN ¹ H (200 MHz, em CDCl ₃) PARA O COMPOSTO 5.....	81
FIGURA 31	- ESPECTRO DE ULTRAVIOLETA DO COMPOSTO 6.....	83
FIGURA 32	- ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 6.....	84
FIGURA 33	- RMN ¹³ C (50 MHz, em DMSO-d ₆) PARA C6.....	86
FIGURA 34	- PLÂNTULAS DE <i>Lactuca sativa</i> ANTES DA LEITURA DO CRESCIMENTO.....	87
FIGURA 35	- DIFERENÇA DA MÉDIA DE CRESCIMENTO EM cm PARA A RADÍCULA E O HIPOCÓTILO DAS SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i> SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS CASCAS DE <i>Erythrina velutina</i>	102
FIGURA 36	- RESULTADO DO TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO COM O EXTRATO BRUTO PARA O <i>S. aureus</i> E <i>S. pyogenes</i>	104
FIGURA 37	- RESULTADO DO TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO COM A FRAÇÃO HEXANO PARA O <i>S. aureus</i> E <i>S. pyogenes</i>	104
FIGURA 38	- RESULTADOS DO MIC PARA O EXTRATO BRUTO.....	105
FIGURA 39	- PLACA CONTROLE DO TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO PARA ALGUNS MICRORGANISMOS.....	106

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1	- ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA <i>Erythrina velutina</i>	12
QUADRO 2	- ESTRUTURAS QUÍMICAS DE ALGUNS ALCALÓIDES DO GÊNERO <i>Erythrina</i>	15
QUADRO 3	- DESIGNAÇÃO DOS TRATAMENTOS PARA ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
TABELA 1	- CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÃO HEXANO NOS RESÍDUOS SECOS E DISCOS.....	57
TABELA 2	- RENDIMENTO DO PROCESSO DE FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO.....	59
TABELA 3	- RESULTADO DOS TESTES DE UMIDADE, CINZAS, RESÍDUO SECO.....	59
TABELA 4	- RESULTADOS COM O EXTRATO AQUOSO.....	59
TABELA 5	- RESULTADOS DAS FRAÇÕES DO EXTRATO ALCOÓLICO.....	60
TABELA 6	- DADOS DOS PADRÕES DE METABÓLICOS ANALISADOS EM CROMATOGRAFIA GASOSA POR PADRONIZAÇÃO INTERNA.....	62
TABELA 7	- TABELA COMPARATIVA DA FRAÇÃO HEXANO COM OS PADRÕES DE METABÓLICOS.....	63
TABELA 8	- DESLOCAMENTOS EM ppm DO ESPECTRO DE RMN ¹³ C PARA ESTIGMASTEROL.....	64
TABELA 9	- DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM ppm DO ESPECTRO DE RMN ¹³ C PARA O COMPOSTO 2 E CARBONO CORRESPONDENTE.....	70
TABELA 10	- GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>L. sativa</i> DURANTE 6 DIAS - EXTRATO BRUTO.....	88
TABELA 11	- ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO TESTE DE ALELOPATIA COM O EXTRATO BRUTO PARA A VARIÁVEL RADÍCULA A 5% DE SIGNIFICÂNCIA.....	88
TABELA 12	- TESTE DE SCOTT & KNOTT PARA O CRESCIMENTO DA RADÍCULA DA SEMENTE DE <i>L. sativa</i> - EXTRATO BRUTO.....	89
TABELA 13	- ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO TESTE DE ALELOPATIA COM O EXTRATO BRUTO PARA A VARIÁVEL HIPOCÓTILO A 5% DE SIGNIFICÂNCIA.....	89

TABELA 14	- TESTE DE SCOTT & KNOTT PARA O CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DA SEMENTE DE <i>L. sativa</i> – EXTRATO BRUTO.....	90
TABELA 15	- GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>L. sativa</i> DURANTE 6 DIAS - FRAÇÃO HEXANO.....	91
TABELA 16	- ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO TESTE DE ALELOPATIA COM A FRAÇÃO HEXANO PARA A VARIÁVEL RADÍCULA A 5% DE SIGNIFICÂNCIA.....	91
TABELA 17	- TESTE DE SCOTT & KNOTT PARA O CRESCIMENTO DA RADÍCULA DA SEMENTE DE <i>L. sativa</i> – FRAÇÃO HEXANO.....	92
TABELA 18	- ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO TESTE DE ALELOPATIA COM A FRAÇÃO HEXANO PARA A VARIÁVEL HIPOCÓTILO A 5% DE SIGNIFICÂNCIA.....	92
TABELA 19	- TESTE DE SCOTT & KNOTT PARA O CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DA SEMENTE DE <i>L. sativa</i> - FRAÇÃO HEXANO.....	93
TABELA 20	- GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>L. sativa</i> DURANTE 6 DIAS PARA A FRAÇÃO DICLOROMETANO.....	94
TABELA 21	- ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO TESTE DE ALELOPATIA COM A FRAÇÃO DICLOROMETANO PARA A VARIÁVEL RADÍCULA A 5% DE SIGNIFICÂNCIA.....	94
TABELA 22	- TESTE DE SCOTT KNOTT PARA CRESCIMENTO DA RADÍCULA DA SEMENTE DE <i>L. sativa</i> – FRAÇÃO DICLOROMETANO.....	95
TABELA 23	- ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO TESTE DE ALELOPATIA COM A FRAÇÃO DICLOROMETANO PARA A VARIÁVEL HIPOCÓTILO A 5% DE SIGNIFICÂNCIA.....	95
TABELA 24	- GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>L. sativa</i> DURANTE 6 DIAS PARA A FRAÇÃO ACETATO DE ETILA.....	96
TABELA 25	- ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO TESTE DE ALELOPATIA COM A FRAÇÃO ACETATO DE ETILA PARA VARIÁVEL RADÍCULA A 5% DE SIGNIFICÂNCIA.....	96
TABELA 26	- TESTE DE SCOTT KNOTT PARA CRESCIMENTO DA RADÍCULA DA SEMENTE DE <i>L. sativa</i> – FRAÇÃO ACETATO DE ETILA.....	97
TABELA 27	- ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO TESTE DE ALELOPATIA COM A FRAÇÃO ACETATO DE ETILA PARA VARIÁVEL HIPOCÓTILO A 5% DE SIGNIFICÂNCIA.....	97
TABELA 28	- TESTE DE SCOTT & KNOTT PARA O CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DA SEMENTE DE <i>L. sativa</i> – FRAÇÃO ACETATO DE ETILA.....	98
TABELA 29	- GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>L. sativa</i> DURANTE 6 DIAS PARA A FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE.....	99
TABELA 30	- ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO TESTE DE ALELOPATIA COM A FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE PARA A VARIÁVEL RADÍCULA A 5% DE SIGNIFICÂNCIA.....	99
TABELA 31	- TESTE DE SCOTT KNOTT PARA CRESCIMENTO DA RADÍCULA DA SEMENTE DE <i>L. sativa</i> – FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE.....	100
TABELA 32	- ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO TESTE DE ALELOPATIA COM A FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE PARA A VARIÁVEL HIPOCÓTILO A 5% DE SIGNIFICÂNCIA.....	100

To remove this message please register.

TABELA 33	- TESTE DE SCOTT & KNOTT PARA O CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DA SEMENTE DE <i>Lactuca sativa</i> – FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE.....	101
TABELA 34	- RESULTADOS DOS TESTES DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA...	103

LISTA DE ABREVIATURAS E DE SIGLAS

ASTM	- American Society for Testing and Materials
ATCC	- American Type Culture Collection
CCD	- Cromatografia em Camada Delgada
CCP	- Cromatografia em Camada Preparativa
CG	- Cromatografia Gasosa
CG-MS	- Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
DBC	- Delineamento em Blocos ao Acaso
DEPT	- Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DIC	- Delineamento Inteiramente ao Acaso
d.m.s.	- Diferença Mínima Significante
EB	- Extrato Bruto
EMBRAPA	- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EtOAc	- Acetato de Etila
F	- Teste F Estatístico
F.AE.	- Fração Acetato de Etila
FATE	- Fração Acetato de Etila
F _c	- F Crítico Estatístico
FC	- Fator de Correção
F.C.	- Fração Clorofórmio
FDMT	- Fração Diclorometano
F.H	- Fração Hexano
F.H.A.	- Fração Hidroalcoólica
FHAR	- Fração Hidroalcoólica Remanescente
FHEX	- Fração Hexano
GL	- Graus de Liberdade
H ₀	- Hipótese Nula
H ₁	- Hipótese Alternativa
IAS	- International Allelopathy Society
IP	- Intraperitoneal
IV	- Espectroscopia no Infravermelho
MIC	- Minimal Inhibitory Concentration

This document has been created with a DEMO version of PDF Create Convert
(http://www.equinox-software.com/products/pdf_create_convert.html)

To remove this message please register.

OMS	- Organização Mundial de Saúde
P-valor	- Valor do Teste P Estatístico
ppm	- Partes Por Milhão
RMN ¹³ C	- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹ H	- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RR	- Retenção Relativa
TMS	- Tetra Metil Silano
TR	- Tempo de Retenção
UV	- Espectroscopia no Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

γ	- Gama
¹⁴ C	- Carbono 14
mg/kg	- miligrama(s) por kilograma(s)
μ g/mL	- micrograma(s) por mililitro(s)
nm	- nanômetros
μ L	- Microlitro(s)
Hz	- Hertz
CDCl ₃	- Clorofórmio deuterado
DMSO d ₆	- Dimetilsulfóxido deuterado
MHz	- Mega Hertz
<i>dd</i>	- Duplo Dupleto
<i>m</i>	- Multiplete
<i>H</i>	- Hidrogênio

RESUMO

A *Erythrina velutina* Willd. é conhecida popularmente como “mulungu”, suas cascas são utilizadas principalmente pela população do nordeste brasileiro devido a suas propriedades calmante, sudorífica, emoliente e anestésica local. A pesquisa teve como propósitos o isolamento de substâncias químicas, a partir de técnicas cromatográficas, presentes no extrato bruto e frações deste (hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente). A identificação dos compostos isolados foi realizada por meio da análise dos dados das espectroscopias de ultravioleta, infravermelho e ressonância magnética nuclear de carbono e hidrogênio; a verificação da atividade antibacteriana do extrato bruto foi realizada através dos testes de difusão em disco e concentração inibitória mínima e, da fração hexano por teste de difusão em disco, além disso também foi procedida a verificação da atividade alelopática na germinação e alteração do crescimento da radícula e hipocótilo das sementes de *Lactuca sativa* para diferentes concentrações do extrato bruto e frações, os dados foram analisados estatisticamente pela análise de variância e teste de comparação múltipla de médias de Scott & Knott. Na fração hexano foram identificados o ácido fênico, ácido cinâmico, α -amirina, estigmasterol, β -amirina, β -sitosterol e lupeol por cromatografia gasosa e isolados o estigmasterol em mistura com o β -sitosterol. Da fração diclorometano foram isolados dois alcalóides e as estruturas propostas são eritralina, que foi identificada por comparação de seus dados espectrais com os dados publicados e já foi isolada desta espécie, 8-oxo-11 β -metoxieritralina e eritrinina (não relatadas para a espécie); da fração hidroalcoólica remanescente isolou-se um composto que exhibe algumas características de açúcar monocíclico, ainda não completamente identificado. O extrato bruto e a fração hexano demonstraram atividade antibacteriana moderada, em relação aos antibióticos controle, contra o *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. A germinação das sementes de *Lactuca sativa* não foi inibida e o crescimento da radícula e hipocótilo destas plântulas para o extrato bruto e frações foi estatisticamente significativo e diferente dos controles com água e etanol, a fração hidroalcoólica remanescente teve a maior atividade e alterou a morfologia das plântulas causando enovelamento, ausência de pêlos radiculares e

ausência de folíolos. Cabe salientar que a atividade antibacteriana, a atividade alelopática e a presença de estigmasterol e o composto isolado da fração hidroalcoólica remanescente ainda não haviam sido citadas na literatura conforme levantamento bibliográfico para *Erythrina velutina*.

Palavras-chave: alelopatia, análise estatística, atividade antibacteriana, microbiologia, alcalóides, estigmasterol.

ABSTRACT

Erythrina velutina Willd. is popularly known as mulungu, and its bark is used especially by the population of the Brazilian northeast owing to its sedative, sudorific, emollient and topic anaesthetic properties. This research is aimed at isolating the chemical substances in the crude extract and its partitions (hexane, dichloromethane, ethyl acetate and hydro alcoholic remaining fractions), through chromatographic techniques. The analysis of the spectrum copies of ultraviolet, infrared and nuclear magnetic resonance of carbon and hydrogen were used in the identification of the isolated compounds. The antibacterial activity of the crude extract was verified by using disk diffusion method and minimal inhibition concentration (MIC), and hexane fraction activity was verified through the disk diffusion method, and besides that the allelopathic activity in the germination and growth of the radicle and plantule of the *Lactuca sativa* seeds was checked at different concentrations of crude extract and fractions. Data were statistically examined by analysis of variance (ANOVA) and Scott Knott multiple comparison test. The hexane fraction GC showed fenic acid, cinnamic acid, α -amirin, stigmasterol, β -amirin, β -sitosterol and lupeol by gas chromatography; stigmasterol was isolated and identified as the major compound in the mixture with β -sitosterol. Two alkaloids were isolated from the dichloromethane fraction and the structures found were: erythraline that has been identified by comparing its spectral characteristics to its published ones and has been isolated from this gender, and 8-oxo-11(-methoxyerythraline and erythrinin which had not been related to this gender before; from the remaining hidroalcoholic fraction it was possible to segregate a compound that seems to have monocyclic sugar characteristics, but has not been thoroughly identified so far. The crude extract and the hexane fraction gave evidence of moderate antibacterial activity in relation to the antibiotics control, against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. The germination of *Lactuca sativa* seeds was not inhibited and the growth of the radicle and hypocotyls to the amount of crude extract and fractions were statistically significant and different from the water and ethanol control. The remaining hidroalcoholic fraction was the most active and that caused the plantules morphology to show alterations such as curling, radicle hair absence and follicle absence. It seems important to emphasize that antibacterial activity, allelopathic activity,

**This document has been created with a DEMO version of PDF Create Convert
(http://www.equinox-software.com/products/pdf_create_convert.html)
To remove this message please register.**

stigmasterol presence and the isolated compound from the remaining hidroalcoholic fraction had never been mentioned before in literature according to a bibliographic survey of *Erythrina velutina*.

Key-words: allelopathy, statistical analysis, antibacterial activity, microbiology, alkaloids, stigmasterol.

1 INTRODUÇÃO

O uso de drogas vegetais é tão antigo quanto a própria existência da vida humana na Terra e inúmeros relatos do seu uso tornam quase mística a relação de benefícios obtidos, dentre estes destaca-se o Papiro de Ebers. A Arqueologia tem demonstrado que algumas drogas utilizadas pela indústria de fitoterápicos representam um legado que permeia a evolução de inúmeras civilizações até os tempos atuais.

O homem percebeu a importância em se estudar e preservar as espécies vegetais, tal perspectiva se assenta na ocorrência de uma série de descobertas apontadas por historiadores. Cita-se o cultivo e preservação de jardins botânicos criados pelos egípcios ainda em 1.500 a.C e em Atenas, 350 a.C, Theophrastus recebe sementes de plantas úteis, dentre elas, muitas espécies medicinais enviadas por "Alexandre, o Grande" oriundas de expedições à Índia (MAURICE, 1976).

Toda a história evidencia a presença de herbários, como exemplo pode-se citar John Gerard que no século XVII criou em Londres um herbário, o mesmo está em funcionamento até os dias atuais. Mais adiante pode-se ver as grandes conquistas do povo europeu em busca de especiarias, além das plantas úteis às referidas enfermidades que acometiam o homem, como a malária e a cólera.

Essas informações puderam perpassar as gerações por meio da grande contribuição científica de um grande naturalista chamado Carl von Linné (1707-1778). Este estabeleceu um sistema binário de nomenclatura, aceito e adotado internacionalmente até os dias atuais (THONSON, 1981, p.16).

A Etnobotânica tem demonstrado que dentre tantas espécies algumas têm propriedades peculiares e por isto são escolhidas como objeto de estudo. A utilização de plantas medicinais como recurso terapêutico ou para o desenvolvimento de novos medicamentos, a partir das substâncias delas isoladas, ou via plantas transgênicas tem se mostrado uma forma não convencional de produção de matérias primas vegetais, que começa a ser melhor explorada (SIMÕES et al., 2000, p.25).

MIGUEL e MIGUEL (2004, p.13) relatam que "as pesquisas científicas iniciaram na tentativa de comprovar a identidade botânica, composição química e ação farmacológica das drogas vegetais, agrupando aquelas de efeitos semelhantes. Essas pesquisas buscaram determinar as estruturas quimicamente ativas e a promoção de modificações estruturais. Esses estudos possibilitaram a proposição de maior atividade terapêutica, junto aos requisitos de qualidade e ausência de toxicidade".

Esse grande avanço científico pode garantir a botânica, a química de produtos naturais e a farmacologia, grandes descobertas com aplicações diretas na medicina tradicional denominada Fitoterapia. Nesta perspectiva programas de financiamento à pesquisa têm incorporado junto às Universidades e Instituições de Pesquisa incentivo a busca de fármacos com aplicação na prevenção a saúde e cura de diversas patologias.

A saúde, "estado de completo bem-estar físico, mental e social - e não apenas a ausência de desconforto ou enfermidade", é uma das necessidades básicas do homem e tem sido sua constante preocupação (KOROLKOVAS, 1988, p. 39). Assim sendo, os pesquisadores têm como dever desenvolver métodos que

tragam à realidade o farto arsenal terapêutico proveniente de fontes largamente disponíveis.

Destaca-se há tempos na terapêutica popular a *Erythrina velutina*, espécie nativa brasileira e de larga distribuição, a casca e frutos têm sido utilizados na medicina popular em algumas regiões do Nordeste brasileiro, embora a eficácia e segurança de seu uso ainda não tenham sido confirmadas cientificamente e havendo indicativos de substâncias de interesse, torna-se necessário investir na pesquisa fitoquímica a fim de se comprovar o potencial terapêutico.

São atribuídas as preparações da casca propriedades sudorífica, calmante, emoliente e peitoral e do seu fruto seco, ação anestésica local, usado na forma de cigarro como odontálgico (LORENZI; MATOS, 2002, p.306).

Desse modo espera-se ser possível atender a demanda de informações científicas desta espécie, beneficiando também a saúde da população que faz uso das substâncias provindas da *Erythrina velutina*.

1.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a composição fitoquímica das cascas da *Erythrina velutina* Willd., FABACEAE e avaliar a atividade antibacteriana e microbiológica.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) detectar e isolar constituintes químicos presentes no extrato da espécie estudada por meio de fracionamento cromatográfico;
- b) identificar os constituintes químicos isolados a partir da análise dos dados das espectroscopias de UV, IV, CG, RMN ^1H e ^{13}C .
- c) avaliar a atividade antibacteriana do extrato bruto e fração hexano das cascas de *Erythrina velutina*;
- d) avaliar por meio de análise estatística a atividade alelopática do extrato bruto e frações hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente das cascas de *Erythrina velutina*;

2 REVISÃO DE LITERATURA

As plantas do gênero *Erythrina* são conhecidas por produzirem alcalóides, flavonóides, isoflavonóides e outras substâncias. Segundo AMER et al. (1991, p. 329) representam a principal fonte de alcalóides tetracíclicos, que possuem atividade semelhante ao curare causando paralisia muscular (DECKER et al., 1995, p. 79).

Seus alcalóides também possuem efeitos cardiovasculares e os isoflavonóides e flavonóides apresentam atividades bactericidas e antifúngicas e também inibem agregação plaquetária (NKENGFACK et al., 2000, p.855).

2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA FABACEAE

CRONQUIST (1981, p. 601) afirma que a família Fabaceae consiste de 440 gêneros e 12 mil espécies. O maior gênero, *Austragalus*, possui em torno de 2 mil espécies, sendo que vários gêneros, inclusive *Erythrina*, têm importante representatividade.

Segundo JOLY (1998, p.371) a família das leguminosas compreende mais de seiscentos gêneros que reúnem mais de 13 mil espécies (uma das maiores dentre as dicotiledôneas) e estão espalhadas em todo o mundo especialmente nas regiões tropicais e subtropicais.

Os pólenes identificáveis da família Fabaceae foram detectados somente na metade do Mioceno Superior e então a família parece ser a mais jovem das três que compõe a ordem Fabales.

As sementes freqüentemente contêm quantidades consideráveis de canavanina, um aminoácido não protéico aparentemente restrito a esta família. BELL, LACKEY e POLHILL¹, citados por CRONQUIST (1981, p.601) sugerem que a canavanina é um antimetabólito da arginina e tem um importante papel de defesa e estocagem de nitrogênio.

Seu valor econômico é significativo e junto com as gramíneas representam as mais importantes famílias produtoras de alimentos vegetais. A parte disto, a família Fabaceae produz valiosas drogas medicinais, espécies ornamentais, forrageiras, produtoras de azeites e inseticidas, fixadoras de nitrogênio e muitas outras funções (SALINAS, 1992, p.26).

2.1.1 Descrição da Família Fabaceae

São plantas de hábito muito variado, desde grandes árvores das matas tropicais a arbustos, subarbustos, ervas anuais ou perenes e também muitas trepadeiras, vivem em diferentes altitudes e latitudes. As folhas são sempre de disposição alterna, compostas, pari ou imparipenadas, com estípulas ou estipelas às vezes transformadas em espinhos. As folhas podem se apresentar modificadas em gavinhas ou estar reduzida a dois ou um só folíolo. Folhas e folíolos de todas as ordens sempre com pulvinos (articulações) na base, nos pecíolos ou nos peciólulos, que permitem movimentos diurnos (às vezes muito rápidos) às folhas em resposta a variados agentes.

¹ BELL, E.A., LACKEY, J.A., POLHILL, R.M. Systematic significance of canavanine in the Papilionoideae (Faboideae). **Biochemical Systematic Ecology**, v. 6, p. 201-212, 1978.

Flores variadas sempre cíclicas, de simetria radial até fortemente zigomorfas, diclamídeas com cálice gamossépalo, pentâmero ou tetrâmero; corola dialipétala pentâmera ou tetrâmera na maioria das vezes com pétalas muito desiguais. Androceu formado por quatro a dez estames, livres ou soldados entre si. Ovário sempre súpero, unicarpelar e unilocular, as vezes divididos por falsos septos, com muitos óvulos, fruto variado em geral legume, seco, deiscente por duas valvas, do tipo lomento segmentando-se, seco e indeiscente ou ainda de pericarpo mais ou menos carnoso. Sementes às vezes envoltas em mucilagens ou polpa doce, ou com arilo ou testa duríssima. Todas vivem simbioticamente com certas bactérias capazes de fixar o nitrogênio do ar, encontradas nos conhecidos nódulos ou raízes (JOLY, 1998, p. 372).

Caules por vezes de estrutura anômala freqüentemente provido com vários tipos de pêlos. Apresentam comumente cristais solitários de oxalato de cálcio em algumas células da epiderme ou parênquima. Freqüente presença dispersa de células secretoras de tanino, gomas e outras substâncias como protoantocianinas, ácido cianogênico, mas não o ácido elágico e sem compostos iridóides, comumente produzem alcalóides especialmente dos grupos da piridina, quinolizidina e indol. As folhas contêm estômatos de diversos tipos (CRONQUIST, 1981, p. 599-601).

2.1.2 Distribuição Geográfica da Família Fabaceae

A família Fabaceae encontra-se dispersa nas regiões temperadas, frias e também tropicais (CRONQUIST, 1981, p. 601).

De acordo com JOLY (1998, p.372) a família das leguminosas encontra-se dispersa por todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais.

2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO E A ESPÉCIE

O gênero *Erythrina* (família FABACEAE) é largamente conhecido, ocorre nas regiões tropicais e sub-tropicais do mundo. Possui cerca de 110 espécies, das quais 70 são nativas da América (VASCONCELOS et al., 2003, p. 946). O nome *Erythrina* vem do grego "erythros", que significa vermelho, em alusão à cor de suas flores. São empregadas como ornamentais, sombreadoras de lavouras de café e cacau, além disso, as espécies são fornecedoras de alcalóides, tanino, madeira e outros. Para o Brasil são relacionadas cerca de doze espécies (EPAMIG, 1993, p. 20).

A madeira da *E. velutina* (figura 1) é leve, macia e pouco resistente aos agentes decompositores. É empregada na confecção de tamancos, jangadas, brinquedos e caixotaria. A árvore é extremamente ornamental, principalmente quando em flor, isto tem estimulado seu uso no paisagismo, principalmente na arborização de ruas, jardins e alamedas.

A árvore também é utilizada como cerca viva pela facilidade com que pega de estacas espetadas no próprio local. As flores são freqüentemente visitadas por pássaros que sugam seu néctar (LORENZI, 1992, p.207).

O "mulungu", nome comum de várias espécies de *Erythrina*, foi escolhido como árvore símbolo da EMBRAPA Agrobiologia e tem inúmeras funções ligadas a



FIGURA 1 - *Erythrina velutina* Willd., FABACEAE

FONTE: LORENZI (1992, p.207)

2.2.1 Sinonímia da Espécie

2.2.1.1 Sinonímia vulgar

Segundo LORENZI (1992, p.205): mulungu, suinã, canivete, corticeira. Segundo EPAMIG (1993, p.24): mulungu-da-catinga, mulungu, pau-de-coral, sanaduíf, sananduva, suinã, suinan (Brasil); arbe à coral (Guiana Francesa); bucare, pinon da costa e pinon espinosa (Cuba); bucare e peonita (Venezuela); cay-boung (Conchinchina); chocho e coral (Colômbia); coral bean tree (Inglaterra); imortelle (Martinica); poró blanco (Costa Rica).

2.2.1.2 Sinonímia científica

Segundo MISSOURI BOTANIC GARDEN (2004):

Coralodendron velutinum, Willd. (Kuntze, 1891); *Chirocalix velutinum* Walp (fide Krukoff, B. A., Barneby, R.C., 1974); *Erythrina aculeatíssima* Desf. (fide Krukoff, B. A., Barneby, R.C., 1974; fide Krukoff, B. A., 1971); *Erythrina splendida* (fide Krukoff, B. A., Barneby, R.C., 1974; fide Jorgesen, P.M, S & León-Yanez (eds.)

1999); *Erythrina velutina* fo. *aurantiaca* (Ridl.) Krukoff, 1939; *Erythrina velutina* Jacq. (1804).

Segundo INDEX KEWENSIS (HOOKER; JACKSON, 1960):

Erythrina = CHIROCALYX (1843); CORALLODENDRON (1745);
DUCHASSAINGIA (1850); HYPAPHORUS (1858); MACROCYMBIUM (1853);
MICROPTERYX (1850); MOURICOU (1763); STENOTROPIS (1855); XYPHANTUS

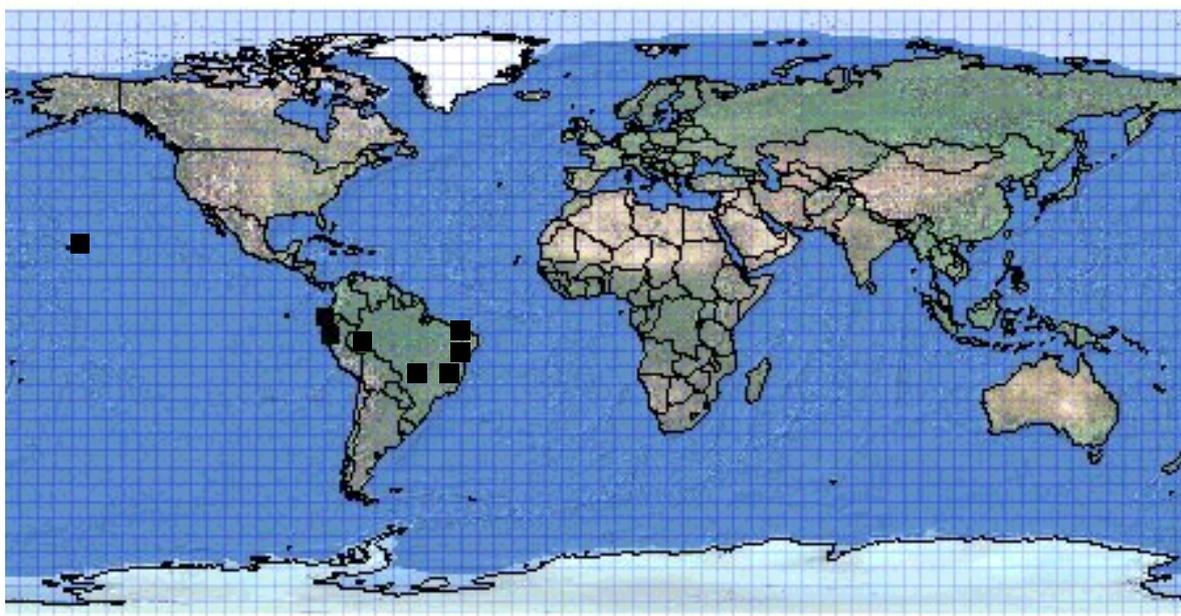


FIGURA 2 - MAPA DA DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DE *Erythrina velutina*
FONTE: http://mobot1.mobot.org/website/map_post.asp

2.2.3 Aspectos Ecológicos da Espécie

A *Erythrina velutina* é uma árvore comumente usada em jardins e parques no nordeste brasileiro (DA-CUNHA et al., 1996, p. 1371). Planta decídua, heliófita, característica de várzeas úmidas e beira de rios da caatinga da região semi-árida do nordeste brasileiro. É também encontrada na orla marítima de Pernambuco e na floresta latifoliada semidecídua de Minas Gerais e São Paulo.

Ocorre preferencialmente nas formações secundárias apresentando, entretanto, dispersão bastante irregular e descontínua. Produz anualmente grande quantidade de sementes viáveis.

Floresce a partir do final do mês de agosto com a planta totalmente despida de foliagem, prolongando-se até dezembro. Os frutos amadurecem em janeiro-fevereiro (LORENZI, 1992, p.207).

2.2.4 Enquadramento Taxonômico da Espécie

O enquadramento taxonômico da *Erythrina velutina* segundo ENGLER (1964) e CRONQUIST (1981) encontra-se inserido no quadro 1 abaixo.

QUADRO 1 - ENQUADRAMENTO TAXÔNOMICO DA *Erythrina velutina*

	Segundo ENGLER (1964)	Segundo CRONQUIST (1981)
Divisão	Angiospermae	Magnoliophyta
Classe	Dicotyledoneae	Magnoliopsida
Subclasse	Archichlamydeae	Rosidae
Ordem	Rosales	Fabales
Família	Leguminosae	Fabaceae
Sub-família	Papilionoideae	-
Gênero	<i>Erythrina</i>	<i>Erythrina</i>
Espécie	<i>E. velutina</i>	<i>E. velutina</i>

2.2.5 Morfologia da Espécie

Árvore pequena de caule tortuoso, caule e ramos armados; folhas trifolioladas, pecíolo de 13-15 milímetros; folíolos largos, decíduos durante a floração; raques compridas, armada de acúleos. Flores vermelhas ou vermelho-alaranjadas, curto-pediceladas, em racemos multifloros; cálice truncado-campanulado de 16-18 milímetros de comprimento, corola de 5-6 centímetros de comprimento; carena ligeiramente menor, arredondada de pétalas livres. Estame vexilar conato apenas na base, de filetes avermelhados. Legume estipulado, glabro,

polispermo, com várias sementes vermelhas, duras, vernicosas, com mácula preta (EPAMIG, 1993, p.24).

2.2.6 Aspectos Etnobotânicos da Espécie

A *Erythrina velutina* é conhecida na medicina popular como sudorípara e sedativa (RABELO, 2001, p. 543). O infuso das cascas é empregado como calmante e sedativo de tosses e bronquites, bem como para tratamento de verminoses e hemorróidas. O decocto é utilizado para acelerar a maturação de abscessos gengivais (LORENZI; MATOS, 2002, p. 306).

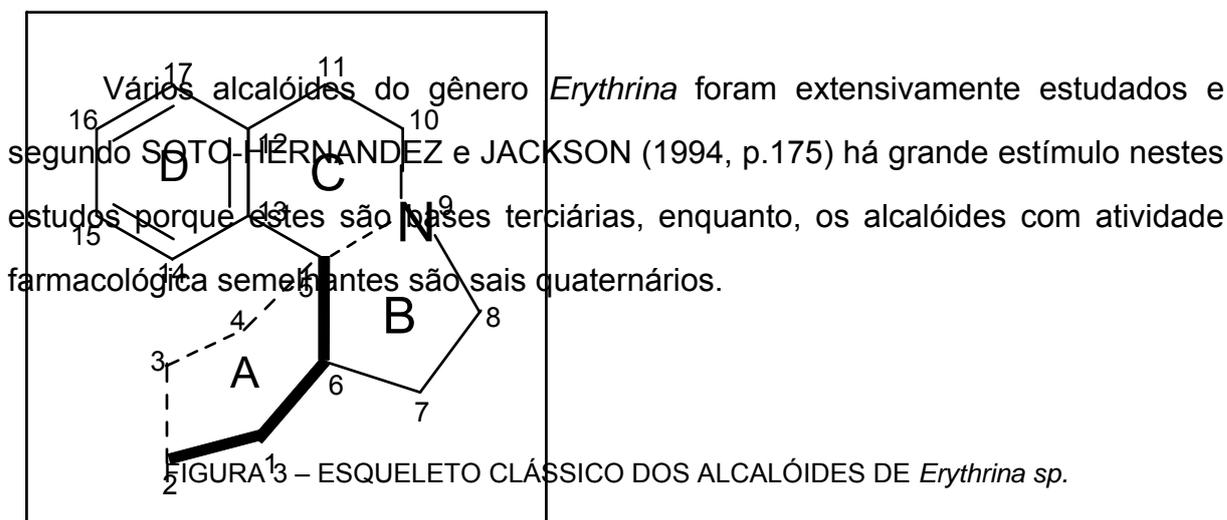
Outros representantes deste gênero demonstram atividades com interesse farmacêutico, como a *E. speciosa* que no Brasil é utilizada como analgésica, anti-inflamatória e bactericida (DIAS FILHO et al., 2002, p.1027). A *E. variegata* L. var. *orientalis* tem reputação folclórica na Índia, China e Indochina sendo suas cascas empregadas como adstringente, febrífugo, anti-séptico, para o tratamento do fígado, sedativo e colírio para oftalmia, as folhas são consideradas estomáquicas, diuréticas, para o alívio de dores nas articulações (TELIKEPALLI et al., 1990, p.2005) e no tratamento da epilepsia (GHOSAL; DUTTA; BHATTACHARYA, 1972, p. 1274). A *Erythrina sigmoidea* é utilizada no país de Camarões para o tratamento de disenterias, asma, dores no estômago, infertilidade feminina e infecções microbianas (NKENGFAK et al., 1994, p.1047).

2.2.7 Aspectos Químicos das Espécies do Gênero *Erythrina*

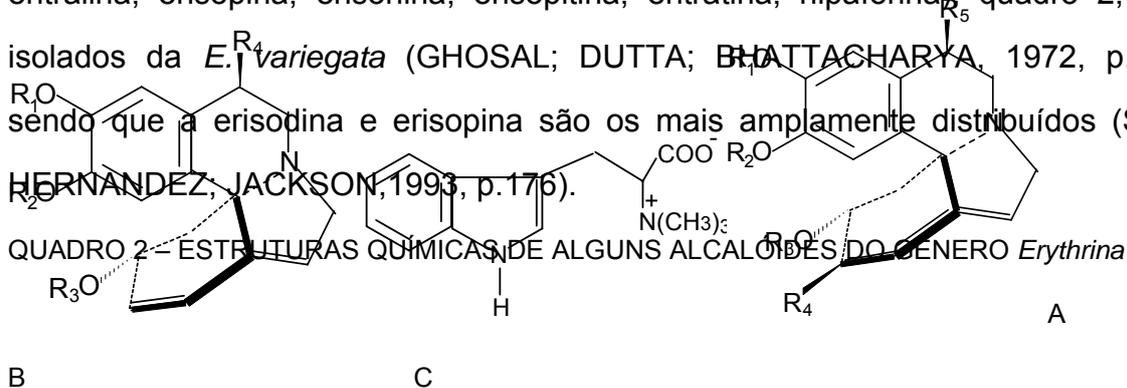
As plantas do gênero *Erythrina* são a principal fonte dos alcalóides tetracíclicos tipo eritrina (figura 3), que foram originalmente identificados em 1937 por Folkers e Major, as plantas do gênero *Cocculus*, da família Menispermaceae

também produzem alcalóides muito semelhantes aos das eritrinas, somente diferindo no padrão de oxigenação do anel A (AMER et al., 1991, p. 161).

O prefixo "eryso-" denota a presença de função fenólica, o prefixo "erythroi-" indica que o anel D do esqueleto é lactônico e o prefixo "erythra-" reporta que o anel D do esqueleto é o clássico. Os alcalóides dienóides possuem uma ligação dupla carbono-carbono no anel A e no anel B e, os alquenóides têm somente uma dupla ligação geralmente no anel A. Os alcalóides tipo eritrina são geralmente dextrorrotatórios (AMER; SHAMMA; FREYER, 1991, p.329) e sua configuração absoluta está demonstrada na figura abaixo.



Alguns exemplos de alcalóides deste gênero (erisotrina, erisodina, erisovina, eritralina, erisopina, erisonina, erisopitina, eritratina, hipaforina), quadro 2, foram isolados da *E. variegata* (GHOSAL; DUTTA; BHATTACHARYA, 1972, p.1275), sendo que a erisodina e erisopina são os mais amplamente distribuídos (SOTO-HERNANDEZ, JACKSON, 1993, p.176).

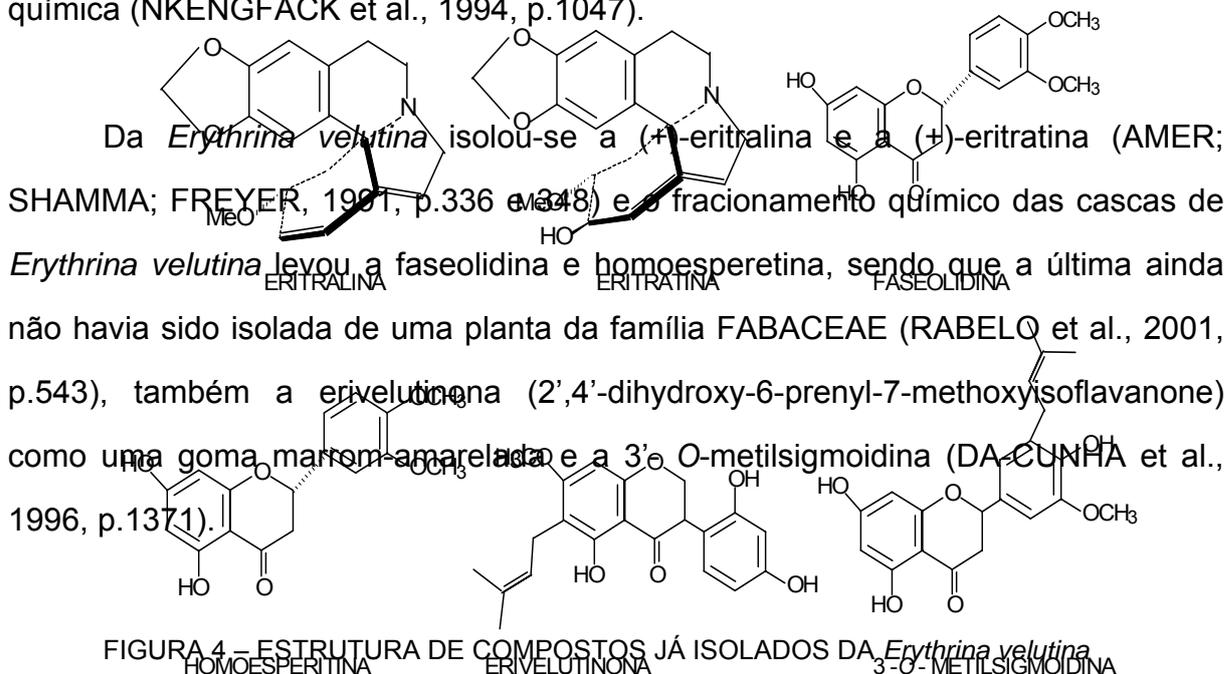


	Estrutura	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	N
Erisotrina	A	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	-	-
Erisodina	A	H	CH ₃	CH ₃	H	-	-
Erisovina	A	CH ₃	H	CH ₃	H	-	-
Eritralina	A	- CH ₂ -		CH ₃	H	-	-
Erisopina	A	H	H	CH ₃	H	-	-
Erisonina	A	H	CH ₃	H	H	-	-
Erisopitina	B	H	H	CH ₃	OH	H	-
Eritratina	B	- CH ₂ -		CH ₃	OH	H	-
Hipaforina	C	-	-	-	-	-	-
N óxido de erisotrina	A	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	-	N ⁺ ---O ⁻
N óxido de eritratina	A	- CH ₂ -		CH ₃	OH	H	N ⁺ ---O ⁻

A erisotrina, eritratina, hipaforina, N-óxido de erisotrina, N-óxido de eritratina (quadro 2) foram isolados da *E. mulungu*, sendo que os três primeiros compostos

são de ocorrência comum neste gênero, dos dois últimos compostos não foi excluída a possibilidade de serem artefatos, mas considerando o processo de extração e o material vegetal utilizado foi definido que são produtos naturais do metabolismo da espécie (SERRAGIOTTO; LEITÃO FILHO; MARSAIOLI, 1981, p. 2771 e 2775).

Nas duas últimas décadas, mais de cinquenta flavonóides foram isolados de várias partes de cerca de quinze espécies do gênero *Erythrina*, sendo que a larga ocorrência de flavanonas preniladas, isoflavonas, pterocarpanos e saponinas triterpenóides dentre os derivados não-alcaloídicos é uma importante característica química (NKENGFAK et al., 1994, p.1047).



Alcalóides glucodienóides estão sendo isolados das espécies, como por exemplo, (+)-16 β -D-glucocerisopina e (+)-15 β -D-glucocerisopina das sementes de *E. latíssima* (WANJALA; MAJINDA, 2000, p.871).

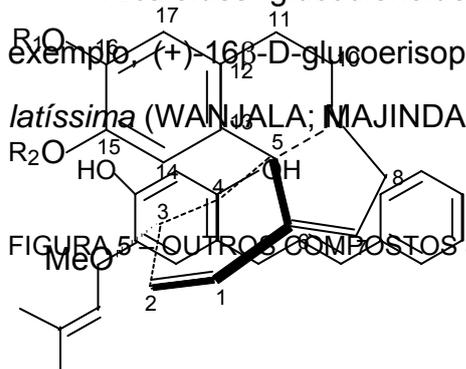
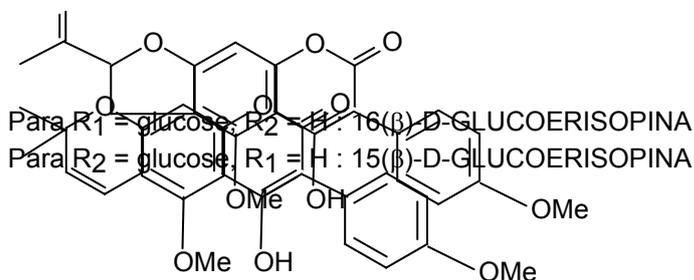


FIGURA 5 - OUTROS COMPOSTOS JÁ ISOLADOS DO GÊNERO *Erythrina*



Para R₁ = glucose, R₂ = H : 16(β)-D-GLUCOERISOPINA
 Para R₂ = glucose, R₁ = H : 15(β)-D-GLUCOERISOPINA

ERIVAESTIRENO

INDICANINE A

ÁCIDO ROBÚSTICO

Também se reporta o isolamento das seguintes isoflavonas: eritrinina A, B e C, osajina, alpinum isoflavona, oxiresveratrol estireno e diidroestilbeno diidroresveratrol, warangalona, 5,7,4"-triidroxy-6,8-diprenilisoflavona, quatro pterocarpanos já conhecidos (ericristagalina, eritrabissina II, faseolina e faseolidina),

uma flavanona (isobavachin) e um cinamilfenol (erivariestireno) separados das cascas de *E. variegata* (TELIKEPALLI et al., 1990, p.2005).

Cumarinas são isoladas a partir desta planta sendo que a primeira deste gênero foi da *Erythrina stricta* (SINGH et al., 1981, p.527), assim como as estruturas das seguintes fenilcumarinas: indicanina A, fenilcumarina ácido robústico e isoflavonas como daidzeina e 8-prenildaidzeina das cascas de *E. indica* (NKENGFAK et al., 2000, p. 855). Três isoflavonas preniladas foram isoladas da *E. vogelii*, a saber, vogelin A, vogelin B e vogelin C (ATINDEHOU et al., 2002, p.181).

As sementes das leguminosas são ricas em lectinas, proteínas de natureza não-imunoglobulina capazes de reconhecimento específico e ligação reversível a carboidratos. As lectinas têm atraído interesse devido aos efeitos em vários sistemas biológicos como aglutinação de células, indução de mitose em linfócitos, produção de γ -interferon por células periféricas mononucleares de sangue humano, atividade semelhante a insulina e citotoxicidade, sendo que algumas destas proteínas com atividade ligante de carboidratos têm sido utilizadas em bioquímica, biologia celular, imunologia e áreas afins com finalidade de análises.

Seu papel nas plantas ainda não está bem estabelecido, diferenças mínimas na estrutura das lectinas são responsáveis por atividades e especificidades diferentes.

A lectina extraída das sementes de *Erythrina velutina* forma *aurantiaca* demonstrou indução da migração de neutrófilos na cavidade peritoneal e bolsa de ar dorsal de ratos podendo ser útil no desenvolvimento de medicamentos antiinflamatórios baseados na estrutura de lectinas deste tipo (MORAES et al., 1996, p.978-984).

Muitos outros compostos químicos de classes estruturais variadas, com atividade demonstrada ou não, já foram isolados de diversas espécies de eritrinas, demonstrando que este gênero é uma fonte de substâncias biologicamente ativas.

2.2.7.1 Biossíntese dos alcalóides do gênero *Erythrina sp.*

Apesar da divergência entre alguns autores, presume-se que os alcalóides da *Eythrina* são biossintetizados a partir da tirosina, via condensação de duas moléculas de dopamina, diferentemente da proposição anterior, de que eram derivados diretos do ácido xíquimico.

Alguns passos da biossíntese foram demonstrados experimentalmente usando intermediários marcados com ^{14}C (MANTLE; COLEMAN, 1984, p.1617). DYKE e QUESSY (1981, p.53) citam um experimento de alimentação induzida com a (+)-(S)-norprotoisomenina marcada com ^{14}C , onde foi demonstrado que este é o intermediário precursor específico dos alcalóides. A figura 6 mostra um exemplo de biossíntese destes.

2.2.8 Aspectos Farmacológicos do Gênero e Espécie

Segundo BARROS (1970, p. 118) os extratos aquoso e etanólico das cascas de *Erythrina velutina* utilizados em testes farmacológicos na concentração de 1:1, demonstraram resultados significativos tais como depressor da respiração e pressão sanguínea de gatos com o extrato etanólico e estimulante da respiração com o extrato aquoso, depressor da atividade do músculo cardíaco de sapo para ambos os extratos, inibidor das contrações musculares induzidas em uma preparação de músculo abdominal de sapo para ambos os extratos, inibidor da motilidade e tônus

This document has been created with a DEMO version of PDF Create Convert
(http://www.equinox-software.com/products/pdf_create_convert.html)
To remove this message please register.

de uma preparação de duodeno de coelho para ambos os extratos e, forte atividade inibidora de contrações uterinas induzidas por ocitocina em uma preparação de útero de rata adulta virgem para ambos os extratos.



FIGURA 6 – BISSÍNTESE DOS ALCALÓIDES DE *Erythrina sp.*

FONTE: DYKE; QUESSY, 1981.

Estudos farmacológicos com a *Erythrina velutina* em animais de laboratório constataram uma significativa atividade espasmolítica de seu extrato bruto hidroalcoólico, atividade curarizante, antimuscarínica e depressora do Sistema Nervoso Central, compatíveis com as propriedades preconizadas pela medicina popular para esta planta (LORENZI; MATOS, 2002, p. 306).

Vários alcalóides extraídos de eritrinas demonstram atividades farmacológicas semelhantes ao curare, incluindo a diidro- β -eritroidina que é o composto mais potente isolado deste gênero e, em adição a estes efeitos, esta substância é um antagonista competitivo dos receptores neuronais nicotínicos para a acetilcolina de uso comum. Os receptores nicotínicos são estruturas pentaméricas compostas de oito subunidades α e três subunidades β . A elucidação de compostos com diferentes afinidades para receptores nicotínicos neuronais e musculares é de grande importância para o entendimento do funcionamento deste complexo sistema de receptores (DECKER et al., 1995, p. 79).

Estes alcalóides com atividade bloqueadora neuromuscular transitória são ativos mesmo quando administrados oralmente (TANAKA et al., 2001, p. 871).

Apesar dos efeitos de vários alcalóides de *Erythrina* nos receptores nicotínicos musculares para acetilcolina estarem caracterizados, somente os efeitos da diidro- β -eritroidina foram extensivamente estudados para os receptores neuronais nicotínicos para acetilcolina.

A erisodina, outro alcalóide deste gênero foi estudado e demonstrou seletividade maior do que a diidro- β -eritroidina para os receptores neuronais em relação aos receptores musculares (DECKER et al., 1995, p.79).

Os efeitos do tratamento oral com extrato hidroalcoólico das inflorescências da *Erythrina mulungu* em vários modelos para ansiedade foram comparados com padrão benzodiazepínico e demonstraram que o extrato exerce efeitos ansiolíticos em tipos específicos de comportamentos de defesa, particularmente naqueles sensíveis ao tratamento com baixas doses de benzodiazepínicos (ONUSIC et al., 2002, p.473).

VASCONCELOS et al. (2003, p.949) demonstraram que a *Erythrina velutina* e a *Erythrina mulungu* possuem efeitos antinociceptivos significantes em diferentes modelos experimentais e, que os efeitos analgésicos destas plantas são independentes do sistema opióide.

Foram avaliados os efeitos no comportamento de ratos em estudo com o extrato hidroalcoólico de *E. velutina* e *E. mulungu* no testes de cruz elevada, campo aberto e de coordenação motora (rota rod). Doses únicas de 200, 400 ou 800 mg/kg foram administradas via oral e doses de 200 e 400 mg/kg via intraperitoneal (IP) em ratas fêmeas. Observou-se redução da atividade locomotora com os dois extratos hidroalcoólicos após tratamento IP em ambas as doses. Houve diminuição no número de entradas nos braços aberto e fechado da cruz elevada após administração da dose máxima (800 mg/kg) via oral para ambos os extratos, este

efeito pode ser devido a diminuição na atividade locomotora. Os extratos não tiveram efeito na coordenação motora no teste “rota rod”. Demonstrou-se que estes extratos têm efeitos depressores no Sistema Nervoso Central, o que pelo menos parcialmente colabora com o uso popular destas plantas como tranqüilizante na medicina brasileira (VASCONCELOS et al., 2003).

Em recente trabalho publicado por DANTAS et al., (2004, p. 132), o extrato aquoso das folhas de *Erythrina velutina* demonstrou aumento do sono induzido por pentobarbital de maneira dose-dependente (10 mg/kg, 100 mg/kg e 300 mg/kg) indicando efeito sedativo, hipnótico e diminuição da atividade motora em roedores nas doses de 50 mg/kg e 200 mg/kg, fato que pode estar relacionado a interação de alguns compostos com receptores neuronais periféricos resultantes da atividade bloqueadora neuromuscular já conhecida. Um dos dados mais interessantes refere-se à interferência com os processos mnemônicos em doses baixas de 10 mg/kg no ensaio denominado teste de locomoção e habituação, houve a perda de memória a habituação ao campo aberto, fato que pode estar relacionado a uma interação com os circuitos neuronais no hipocampo, concluiu-se que o extrato aquoso das folhas demonstrou efeitos centrais e periféricos dependentes da dose utilizada.

Muitas outras substâncias isoladas de espécies do gênero *Erythrina* demonstram atividades farmacológicas de grande interesse, porém há necessidade de estudos mais aprofundados acerca de suas ações.

2.2.9 Aspectos Toxicológicos do Gênero e Espécie

Em muitos dos países desenvolvidos a maior fonte de proteínas da dieta provém das plantas. Sementes de legumes e cereais têm suprido de proteínas e energia as rações para animais (NORTON, 1991, p. 68). Colheitas de forragens exceto as gramíneas incluem os membros da família Leguminosae (DUFFUS; DUFFUS, 1991, p. 2). Na família das leguminosas são encontrados alguns componentes tóxicos, como por exemplo:

- Aminoácidos: os aminoácidos potencialmente tóxicos não são componentes normais de proteínas, mas ocorrem livremente em muitas plantas e particularmente nas leguminosas, fato que tem limitado seu uso como alimento. Estes são encontrados concentrados em sementes, mas podem ocorrer na planta inteira. Destes compostos os latirógenos são os mais importantes e, podem causar duas síndromes que são o osteolatrismo (anormalidades no esqueleto e hemorragias) e neurolatrismo (fraqueza, paralisia das pernas e dificuldade respiratória, e em humanos além dos anteriores também causam tremores dos músculos (DUFFUS; DUFFUS, 1991, p. 12 - 13).

- Lectinas: Estão presentes particularmente nas sementes das leguminosas e têm demonstrado causar gastroenterites, náuseas e diarreia em humanos e gatos (DUFFUS; DUFFUS, 1991, p. 13).

- Inibidores de Protease: os inibidores de protease e inibidores de tripsina são considerados a principal causa de morte em animais de experimentos alimentados com ração crua. Estes fatores antinutricionais estão presentes em vários alimentos para humanos e animais. Um dos inibidores de protease mais estudado é o inibidor de tripsina da soja, sendo que seus homólogos foram isolados de sementes de eritrinas. Estes compostos podem causar depressão do crescimento em animais em teste, afetar a digestibilidade de proteínas da soja em roedores, reduzir a absorção de enxofre e nitrogênio (quando em rações cruas) a partir de soja em ratos e galinhas atuando com mecanismo diferente em cada animal, induzir hipertrofia e hiperplasia do pâncreas estimulando a excessiva secreção de enzimas, estimular a síntese de tripsina e quimotripsina no pâncreas aumentando a demanda de metionina e cisteína.

Estes compostos podem ser inativados por um processo combinado e bem controlado de secagem, temperatura, duração do aquecimento, tamanho da partícula e condições de mistura (NORTON, 1991, p. 68 - 98).

- Alcalóides: atuam por vários mecanismos e são comuns na família Leguminosae.

- Glicosídeos cianogênicos: são tóxicos devido a liberação de ácido hidrocianico após a digestão ou por lesão da célula vegetal antes da ingestão. Em algumas plantas incluindo as famílias Rosaceae, Leguminosae e Gramineae podem estar presentes em altas concentrações principalmente nas folhas (DUFFUS; DUFFUS, 1991, p. 15).

A *Erythrina cristagalli* é considerada tóxica devido aos alcalóides, estes são lentamente absorvidos pelo tubo gastrintestinal e rapidamente excretados pelo rim, tornando difícil a intoxicação por esta via, mas a administração parenteral de extratos pode determinar um quadro neurológico, astenia, paresias ou paralisias musculares. A ação paralisante é consequência dos alcalóides sobre a acetilcolina e obedece a seguinte seqüência: músculos enervados pelos nervos cranianos, músculos do tronco e das extremidades e musculatura respiratória. A morte sobrevém por asfixia consequente à paralisia dos músculos que atuam na respiração (SCHVARTSMAN, 1979, p. 101 e 102).

2.2.10 Aspectos de Atividade Antimicrobiana do Gênero:

O extrato da planta africana *Erythrina abyssinica* demonstrou atividade contra leveduras e fungos sendo que a eritroabissin-I e faseolina tiveram atividade antilevedura contra *Sacharomyces cerevisiae* e *Candida utilis* com CIM (Concentração Inibitória Mínima) entre 25-50 µg/mL e atividade antifúngica contra *Sclerotinia lebertiana*, *Mucor mucedo*, *Rhizopus chinensis* com CIM entre 6 -25 µg/mL (NAKANISHI, 1982, p. 23).

O gênero *Erythrina* tem provado ser uma fonte farta de espécies contendo agentes antimicrobianos que pertencem a várias classes estruturais de flavonóides (TELIKEPALLI et al., 1990, p.2005). Raízes de *Erythrina variegata* demonstraram atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium smegmatis* (TELIKEPALLI et

al., 1990, p.2005). Segundo MAJINDA; ABEGAZ; BEZABIH et al. (2001, p. 1199) os alcalóides isolados da *Erythrina latissima* não demonstraram atividade antibacteriana contra os microrganismos testados. Os alcalóides foram a (+)-eritralina, (+)-erisotrina, (+)-erisovina, (+)-erisodina, (+)- β -D-glucoerisodina, (+)-8-oxoeritralina, (+)-erisotramidina, (+)-16 β -D-gluco-erisopina, (+)-15 β -D-glucoerisopina e (+)-10,11-dioxoerisotrina e os microrganismos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *B. subtilis*, *C. mycoderma* e *Sacharomyces cerevisiae*.

Os extratos metanólico e diclorometano de *Erythrina vogelii* mostraram propriedades antifúngicas contra *Cladosporium cucumerinum* no ensaio direto de autobiografia (ATINDEHOU et al., 2002, p. 181).

A atividade antibacteriana da *Erythrina velutina* ainda não foi relatada, segundo levantamento bibliográfico.

2.2.11 Considerações Sobre Alelopatia

Os indivíduos vivem em comunidades dinâmicas constituídas por fatores físicos e químicos e interações que entre eles se estabelecem. A estas interações, ainda pouco conhecidas, dá-se o nome de interferências, diferenciadas em alelospolia, alelomeiação e alelopatia. A alelospolia é a competição entre organismos que retiram do ambiente elementos essenciais prejudicando o desenvolvimento normal de outros.

A alelomeiação ou interferências indiretas são as que alteram o ambiente físico ou biológico com reflexo nos seres vizinhos, como no caso da alimentação seletiva dos herbívoros e a alelopatia é a introdução de substâncias químicas produzidas pelo organismo que afetam a comunidade (ALMEIDA, 1988, p.5).

O termo deriva das palavras gregas *alleton* (mútuo) e *pathos* (prejuízo) e foi primeiramente usado por Molish em 1937, sendo durante algum tempo interpretado de várias maneiras. Alguns autores conferem uma atividade mais ampla ao termo e consideram a alelopatia como todas as interferências entre seres vivos provocadas por substâncias químicas por eles elaboradas quer ocorram ou não no reino vegetal, o que inclui insetos e herbívoros (ALMEIDA, 1988, p. 5 – 7). Em 1996 a definição de alelopatia foi ampliada, segundo a IAS (International Allelopathy Society) e diz respeito aos processos que envolvem a produção de metabólitos secundários por plantas, microrganismos, vírus e fungos que influenciam no crescimento e desenvolvimento de sistemas agrícolas e biológicos. Atualmente a alelopatia é considerada uma nova ciência prioritária nos países desenvolvidos (MALHEIROS; PERES, 2001, p. 504).

As substâncias alelopáticas também são denominadas aleloquímicos ou produtos secundários, dentre os diversos seres é nas plantas que estes se concentram com maior frequência, independente de células específicas ou órgãos, a produção não é cumulativa e sofre influência de fatores edáficos, climáticos e de sanidade. O objetivo da formação destes compostos nas plantas ainda não é bem determinado, mas sabe-se que obedecem as leis da genética e são produzidos com finalidades específicas como defesa, talvez devido a imobilidade, prevenção da decomposição das sementes, interferência na dormência de sementes e gemas. Os principais grupos de aleloquímicos são os gases tóxicos, ácidos orgânicos e aldeídos, ácidos aromáticos, lactonas simples insaturadas, terpenóides e esteróis, quinonas, flavonóides, taninos, alcalóides, cumarinas e outros. A liberação destas substâncias pode ser volatilização, exsudação pelas raízes ou lixiviação através da água da chuva ou orvalho, de partes vivas ou mortas (ALMEIDA, 1988, p. 7 - 10).

A maneira como agem as substâncias alelopáticas não é totalmente esclarecida, mas sabe-se que atuam em mais de uma função como assimilação de nutrientes, crescimento, fotossíntese, respiração, síntese de proteínas, permeabilidade da membrana celular, atividade enzimática dentre outras. A interferência entre as plantas na natureza se deve ao conjunto de substâncias e aos efeitos ambientais, um único composto não tem concentração suficiente para que atue isoladamente (ALMEIDA, 1988, p. 16 - 18) e estudos de alelopatia com compostos isolados e combinados teve resposta mais acentuada para o último (MALHEIROS; PERES, 2001, p. 506).

Os aleloquímicos podem ser interessantes do ponto de vista da pesquisa de substâncias com características de herbicidas naturais com alta especificidade para plantas daninhas em culturas de vegetais com potencial alimentício ou medicinal.

Os ensaios mais comuns para o teste de atividade alelopática são os de germinação de sementes e crescimento ou desenvolvimento de plantas medindo-se o comprimento da radícula e hipocótilo, que evoluirão para raiz e caule respectivamente.

2.2.12 Análise Estatística

A análise do crescimento é feita estatisticamente. A premissa de uma avaliação estatística é que os tratamentos sejam designados às unidades de análise de modo aleatório e com repetições dentro dos tratamentos, se houver mais de um interferente no processo analisado é necessária a formação de blocos que dividam as interferências, estas condições formam o tipo de estudo denominado Delineamento Inteiramente ao Acaso (DIC) ou Delineamento em Blocos ao Acaso (DBC). Neste caso, os resultados gerados são as médias de crescimento. Há

necessidade de que estes dados representem a população (inferência estatística). Para tal, submetem-se os valores das médias ao teste de hipóteses que verificará se as médias são iguais (H_0 ou hipótese de nulidade) ou diferentes entre si (H_1 ou hipótese alternativa). O teste exige também que se estabeleça um nível de probabilidade de ocorrer o erro da rejeição de uma das hipóteses sendo ela verdadeira, este parâmetro é denominado nível de significância ou probabilidade (α) do teste que pode ser estipulado entre 1 a 10%.

Faz-se então a análise de variância dos dados (médias), que por diversos cálculos verifica se houve variação destes devido aos tratamentos ou devido ao acaso (resíduo). Na tabela gerada pela análise de variância (ANOVA) verifica-se o valor do teste F e compara-se ao valor de F_c (F crítico) padronizado por tabelas estatísticas conforme o nível de significância estipulado para o teste (1 a 10%). Se o valor de F for maior do que F_c rejeita-se H_0 , ou seja, rejeita-se a hipótese de que as médias são iguais com α entre 1 a 10% de significância.

Outro valor gerado pela ANOVA é o P-valor que estima diretamente se F é maior que F_c . Se isto for verdadeiro o P-valor será menor que o nível de significância estabelecido, por exemplo, se o nível de significância for fixado em 5% ou 0,05, e o P-valor for 0,01 conclui-se que F é maior que F_c e rejeita-se a hipótese de que todos os tratamentos são iguais ou, aceita-se que pelo menos um tratamento é diferente dos demais.

Estes primeiros resultados são gerados se houver inferência estatística ou, dados amostrais que reflitam a veracidade dos resultados para a população. Se as médias forem consideradas diferentes parte-se para os testes de comparação múltipla de médias que utilizam a diferença mínima significativa (d.m.s.) entre estas.

Cada vez que o valor absoluto da diferença entre duas médias for igual ou maior do que a d.m.s, essas são consideradas diferentes ao nível de significância estabelecido.

Existem várias maneiras de calcular a d.m.s e cada uma é um teste que em geral leva o nome do seu autor, não existindo algum que seja melhor, mas cada um exibe propriedades adequadas ao tipo de experimento desenvolvido (VIEIRA; HOFFMANN, 1989, p. 62). Os mais utilizados para este tipo de análise são os testes de Tukey (compara duas médias entre diferentes tratamentos) e Scott & Knott (subgrupos do grupo original de médias que diferem estatisticamente).

Na prática estes testes demonstram ao pesquisador qual tratamento teve atividade maior ou menor, facilitando e orientando o processo de escolha e aplicação dos dados da pesquisa em relação ao custo, tempo, praticidade e outros.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Cascas secas e estabilizadas de *Erythrina velutina* Willd. adquiridas junto a EMBRAPA Semi-Árido (Petrolina, Pernambuco). Identificação sob número de registro 2298 realizada por meio do Herbário desta instituição. A moagem foi realizada em moinho de facas e martelo.

2 ENSAIOS FITOQUÍMICOS

A partir dos extratos aquoso e etanólico de 80 gramas de cascas moídas de *Erythrina velutina* foram determinadas as características organolépticas, pH e reações para grupamentos específicos dos princípios ativos das drogas vegetais, segundo metodologia adaptada de MOREIRA (1979) e MIGUEL (2003).

3.2.1 Preparo do Extrato Aquoso a 20%

Pesou-se 40 g do vegetal moído que foram adicionados de 200 mL de água destilada como líquido extrator. O processo de maceração à quente foi efetuado em banho-maria a 70°C por uma hora em frasco aberto. Decorrido o tempo, o material foi filtrado e o volume completado para 200 mL lavando-se com o líquido extrator.

3.2.1.1 Características organolépticas e pH

Foram observadas as seguintes características organolépticas do extrato: cor, sabor e odor. O pH foi verificado em tira para verificação de pH Merck®.

3.2.1.2 Pesquisa de antocianinas

O ensaio foi realizado transferindo-se 5 mL do extrato aquoso para três tubos de ensaio, o primeiro tubo foi acidificado com ácido clorídrico 1% (pH aproximadamente 4), adicionou-se hidróxido de amônio (pH aproximadamente 10) no segundo tubo alcalinizando-o e neutralizando o terceiro tubo (pH 7).

3.2.1.3 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Os tubos da pesquisa anterior foram agitados energicamente por cinco minutos. A altura do anel de espuma formado foi medida em seguida. Após repouso de 30 minutos a leitura do anel foi realizada novamente. O desenvolvimento de espuma com altura superior a um centímetro persistente após o repouso indica reação positiva.

3.2.1.4 Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos

Comumente encontrados, produzem ácido cianídrico nas plantas (ROBBERS, *et.al.*, 1997 p.64). Foram adicionados 5 mL de extrato aquoso em tubo de ensaio com o cuidado de não umedecer suas paredes, adicionou-se 1 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico 1 N. Uma tira de papel picro-sódico foi suspensa no tubo de ensaio e levou-se o conjunto ao aquecimento em banho-maria por trinta minutos a 60°C. Este ensaio baseia-se na reação de formação do isopurpurato de sódio na tira de papel picro-sódico, se houver formação de coloração castanha a avermelhada

a reação é positiva. Para o preparo do papel picro-sódico tiras de papel de filtro com 1 cm de largura são embebidas com solução de ácido pícrico 1%, secas ao abrigo da luz e após, embebidas com solução de carbonato de sódio 10%. As tiras secas são armazenadas em frasco âmbar.

3.2.1.5 Pesquisa de taninos

Os seguintes reagentes foram utilizados nesta pesquisa:

- Solução de Gelatina: em três tubos de ensaio foram adicionados 0,5 mL, 1,0 mL e 2,0 mL, respectivamente, de extrato aquoso e 2 mL de solução aquosa de gelatina 2,5%. O desenvolvimento de precipitado indica reação positiva.
- Cloreto Férrico: em 1 mL de extrato aquoso adicionou-se três a cinco gotas de solução aquosa a 1% de cloreto férrico. O desenvolvimento de coloração azul indica reação positiva para taninos, verde para flavonóides e marrom para polifenóis.
- Cloridrato de Emetina: o desenvolvimento de precipitado após adição de 4 mL de água destilada e duas gotas de solução aquosa de emetina 1% em 1 mL de extrato aquoso indica reação positiva.
- Formol Clorídrico ou ensaio de Staniasny: Em balão de fundo chato com 250 mL de capacidade colocou-se 30 mL de extrato aquoso, 6 mL de formaldeído 40% e 4 mL de ácido clorídrico 37%. O balão foi acoplado a um condensador de bolas e levou-se a refluxo durante uma hora. Após deixou-se esfriar, e o extrato formol-clorídrico foi filtrado e reservado para pesquisa de taninos hidrolisáveis. O resíduo da filtração foi lavado com solução de álcool 50% e gotejou-se sobre o resíduo da lavagem solução aquosa de hidróxido de potássio 5%. O desenvolvimento de coloração verde ao gotejar o hidróxido de potássio indica reação positiva para taninos condensados.

Ao filtrado reservado foi adicionado excesso de acetato de sódio, sem agitação, e gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1%. Coloração azul na adição de cloreto férrico indica reação positiva para taninos hidrolisáveis.

3.2.2 Preparo do Extrato Etanólico 20%

O extrato foi preparado por maceração à quente, em banho-maria a 70°C por uma hora, a partir de 40 g do material vegetal moído e 200 mL de álcool etílico 70% como líquido extrator. Decorrido o tempo, o frasco foi retirado do banho-maria, filtrou-se o extrato e lavando-se o material com o líquido extrator o volume foi completado até 200mL.

3.2.2.1 Fracionamento do extrato em solventes de polaridade crescente

O extrato etanólico 20% foi concentrado em evaporador rotatório sob vácuo a 40°C até um terço de seu volume visando eliminar o excesso de álcool etílico. O fracionamento foi realizado seqüencialmente com hexano, clorofórmio e acetato de etila, solventes de ordem de polaridade crescente.

Em funil de separação 10 mL do extrato concentrado e 50 mL do respectivo solvente foram agitados, repetindo-se o processo por quatro vezes. Foram obtidas a fração hexano, fração clorofórmio, fração acetato de etila e a fração hidroalcólica remanescente, acondicionadas em frasco âmbar. O volume foi completado a 200 mL com os respectivos solventes, quando necessário. Com as frações seguiu-se a pesquisa de alcalóides, leucoantocianidinas, heterosídeos flavônicos, cumarinas, antraquinonas, esteróides e triterpenos.

3.2.2.2 Pesquisa de alcalóides

Levou-se a secura 50 mL de cada fração obtida em banho-maria a 70°C. O resíduo foi dissolvido em 1 mL de álcool etílico e acrescido de 20 mL de ácido clorídrico (HCl) a 1%. Transferiu-se 1 mL do extrato clorídrico para cinco tubos de ensaio e adicionaram-se duas gotas de cada reativo. Os reativos utilizados foram: reativo de Mayer (mercúrio tetraiodeto de potássio), reativo de Dragendorff (tetraiodeto bismuto de potássio), reativo de Bouchardat e reativo de Bertrand (ácido sílico túngstico).

Observar a formação de precipitado branco ou leve turvação branca para os reativos de Mayer e de Bertrand, precipitado de cor tijolo para o reativo de Dragendorff e precipitado de cor laranja para o reativo de Bouchardat.

Se houver reação positiva, o restante do extrato clorídrico é transferido para um funil de separação, alcalinizado com hidróxido de amônio até pH 9 a 10 e procede-se a extração com 15 mL de uma solução de diclorometano e éter na proporção de 3:1 por três vezes. Os extratos orgânicos são reunidos, levados à secura em banho-maria e adiciona-se 0,5 mL de álcool etílico e 5 mL de HCl a 1%. A reunião é ligeiramente aquecida e após esfriar, divide-se em cinco tubos de ensaio e realiza-se novamente a pesquisa para alcalóides utilizando os mesmos reativos. A reação positiva é a formação de precipitado confirmada pela dissolução do complexo com 2 mL de solução alcoólica de ácido tartárico 5%.

3.2.2.3 Pesquisa de leucoantocianidinas

Levou-se 10 mL de cada fração a secura em banho-maria e adicionou-se 5 mL de álcool etílico e cinco gotas de HCl concentrado em cada fração, o material foi

aquecido a ebulição. A reação é positiva se houver a reação de redução da leucoantocianidina (de coloração amarela) em antocianidina em presença de ácido clorídrico confirmada pela formação de coloração vermelha. As leucoantocianidinas são consideradas flavonóides monoméricos, 4 – dióis ou raramente 4 -óis.

3.2.2.4 Pesquisa de flavonóides

Baseia-se na modificação da estrutura do flavonóide em presença de ácido. Foram levados a secura em banho-maria 10 mL das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila, após resfriamento adicionou-se 5 mL de álcool etílico e transferiu-se o conteúdo para tubos de ensaio. O total de 5 mL da fração hidroalcoólica foi transferido diretamente para tubo de ensaio, sem secura prévia. A cada tubo de ensaio adicionou-se pastilha de zinco, com os tubos acondicionados em copo de béquer contendo gelo e em capela foi adicionado HCl fumegante lentamente em quantidade suficiente. A reação é positiva se houver formação de coloração amarela a vermelho para flavonas, vermelho a vermelho-sangue para flavonóis e diidroflavonóis, vermelho a violeta para flavononas, vermelho a rosa para derivados antociânicos, chalconas, auronas, dihidrochalconas, isoflavonas e isoflavononas não apresentam coloração.

3.2.2.5 Teste oxálico-bórico

Também conhecida como reação de Taubock. Em cápsula de porcelana 10 mL de cada fração foram levados a secura em banho-maria. Ao resíduo foram adicionadas 5 gotas de acetona e 30 mg de uma mistura na proporção 1:1 de ácido bórico e ácido oxálico. Após agitação foi levado a secura e 5 mL de éter etílico foram adicionados, o conteúdo foi transferido para tubos de ensaio e visualizado sob lâmpada ultravioleta, se houver fluorescência indica reação positiva especialmente

para flavonóis. As flavanonas e isoflavanonas não têm esta propriedade e os derivados antociânicos coram-se, mas não produzem fluorescência. Esta reação é explicada pela formação de quelatos, produzindo deslocamento batocrômico da banda I dos derivados do ácido borínico (compostos obtidos do ácido bórico com substituições na molécula por dois radicais orgânicos).

3.2.2.6 Ensaio de Pacheco

Em cápsula de porcelana foram adicionados 10 mL de cada fração e levados a secar em banho-maria. O resíduo foi aquecido em fogareiro e adicionaram-se alguns cristais de acetato de sódio e 0,1 mL de anidrido acético, logo em seguida 0,1 mL de HCl concentrado. O desenvolvimento de uma coloração roxa indica reação positiva para dihidroflavonóis, flavonas, chalconas, auronas, flavonóis e flavanonas dão resposta negativa.

3.2.2.7 Pesquisa de cumarinas

Em copo de béquer foram adicionados 30 mL de cada fração e acidificados até pH 1,0 adicionando HCl 2N, o volume foi concentrado em banho-maria para 5 mL. Após resfriamento foi passado para um funil de separação e extraído duas vezes de 10 mL em éter etílico e novamente concentrado em banho-maria até 5 mL. Do extrato etéreo transferiu-se 3 mL para tubo de ensaio e adicionou-se 2 mL de hidróxido de sódio solução Normal. A solução foi deixada por 15 minutos em câmara de luz ultravioleta a 366 nm. A reação positiva é a fluorescência de coloração azul ou verde-amarelada.

O restante do extrato etéreo foi depositado em papel de filtro em três pontos previamente marcados a grafite de modo a obter três manchas de aproximadamente 1 cm de diâmetro. As manchas 1 e 2 foram tratadas com uma gota de solução de

hidróxido de sódio Normal. A mancha 1 foi coberta com papel alumínio e o papel de filtro foi levado à câmara de luz ultravioleta a 366 nm ficando em exposição por 15 minutos. Se houver reação positiva a mancha 2 (tratada e não coberta) apresenta fluorescência de coloração azul ou verde amarelada.

A pesquisa baseia-se no fato de que a dissolução das cumarinas em álcali com clivagem do anel pirrólico forma o ácido *o*-hidroxi cinâmico ou sais de seu ânion. O sal alcalino do ácido hidroxi cinâmico exibe fluorescência. Sem irradiação da luz ultravioleta, nenhuma fluorescência é exibida para soluções recém preparadas ou soluções estocadas no escuro por meses; no entanto, ao irradiar luz ultravioleta, a forma *cis* migra para forma *trans*, que exibe coloração azul ou verde amarelada em poucos minutos.

3.2.2.8 Pesquisa de antraquinonas

Em balão de fundo chato de 250 mL de capacidade 30 mL da fração hidroalcoólica e 5 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico a 10% foram misturadas. As frações hexano, diclorometano e acetato de etila (30 mL de cada) foram levadas à secura em banho-maria e recuperadas até 30 mL com álcool 70% e após, receberam o mesmo tratamento. O balão, acoplado a um condensador, foi levado a refluxo por 30 minutos, em seguida filtrado ainda a quente em papel de filtro. Ao filtrado foram adicionados 30 mL de água destilada, transferiu-se o conteúdo para um funil de separação e extraiu-se com éter etílico (duas vezes de 10 mL). Os extratos etéreos foram concentrados em banho-maria até 5 mL, transferidos para tubo de ensaio onde realizou-se a reação de Borntraeger adicionando-se 5 mL de solução de hidróxido de amônio e agitando-se lentamente.

3.2.2.9 Pesquisa de esteróides e triterpenos - reação de Liberman Bouchard

Levou-se a secura 30 mL de cada fração em banho-maria e com auxílio de bastão de vidro seco dissolveram-se 5 mL de clorofórmio, filtrando em seguida. O extrato clorofórmico foi pipetado para três tubos de ensaio nos volumes de 0,1 mL, 0,5 mL e 1,0 mL completou-se para 2 mL com clorofórmio.

Em capela efetuou-se a reação de Liberman Bouchard adicionando lentamente 1,0 mL de anidrido acético e 2,0 mL de ácido sulfúrico.

Observa-se a formação de coloração rósea escura ou azul que indica presença da função carbonila na posição 3 e dupla ligação entre os carbonos 5 e 6. A coloração verde indica presença da função hidroxila na posição 3 e ligação dupla nas posições 5 e 6. Se houver coloração amarela provavelmente existe uma metila no carbono 14.

3.2.2.10 Pesquisa de esteróides e triterpenos - reação de Keller Kelliani

Sobre 50 mL das frações foram adicionados 50 mL de água destilada e 5 mL de solução de acetato básico de chumbo a 10%, após agitação o conteúdo foi centrifugado, decantando o líquido sobrenadante para um funil de separação e foi procedida a extração com 10 mL de clorofórmio por três vezes. O extrato clorofórmico foi concentrado em banho-maria a 40° C sob ventilação até 15 mL.

A reação de Keller Kelliani foi realizada transferindo-se 2 mL do extrato clorofórmico para tubo de ensaio e levando-se a secura. O resíduo foi dissolvido com 2 mL de ácido acético glacial e 0,2 mL de solução aquosa de cloreto férrico a 1%.

A mistura foi cuidadosamente transferida para um tubo de ensaio que continha 2 mL de ácido sulfúrico concentrado.

O desenvolvimento de coloração na zona de contato e/ou coloração na fase acética indicam presença de desoxi açúcares, sendo azul para esteróides e verde para triterpenos.

3.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E POSTERIOR FRACIONAMENTO

3.3.1 Obtenção do Extrato Bruto

As cascas de *Erythrina velutina*, em total de 2,672 kilogramas, foram processadas em aparelho de soxhlet (CARVALHO, 2001, p. 24). O aparelho foi conectado a um condensador de bolas e a um balão de fundo chato de capacidade para 3 L com pérolas de vidro. A este sistema foi adicionado álcool etílico 96 °GL até que metade do balão fosse preenchida de líquido. Todo o sistema foi levado ao aquecimento em manta aquecedora e deixado em refluxo por 4 horas.

O material obtido foi concentrado em evaporador rotatório (LABOROTA 4000 Heidolph®) sob pressão reduzida (50°C) para aproximadamente um quinto do seu volume. Este volume foi conservado em freezer por 24 horas, em frasco âmbar, visando a precipitação de gomas e pigmentos. Após esse período o extrato foi filtrado a vácuo, obtendo-se o extrato bruto (EB). O resíduo obtido no processo de filtração foi separado e acondicionado para análises posteriores.

3.3.2 Fracionamento do Extrato Bruto

O processo foi realizado em aparelho de soxhlet adaptado com solventes de ordem de polaridade crescente, iniciando-se pelo fracionamento do extrato bruto em hexano, diclorometano, acetato de etila obtendo-se a fração hexano

(FHEX), fração diclorometano (FDMT), fração acetato de etila (FATE) e o resíduo foi denominado fração hidroalcolica remanescente (FHAR). O aparelho foi conectado a um condensador de bolas e a um balão de fundo chato de capacidade para 150 mL, com pérolas de vidro. Todo o sistema foi levado ao aquecimento em chapa aquecedora e deixado em refluxo por 4 horas.

3.3.2.1 Testes com o vegetal, extrato bruto e frações

Foram realizados os testes de teor de umidade e teor de cinzas do vegetal conforme normas oficiais da Farmacopéia Brasileira IV ed. O resíduo seco do EB e frações FHEX, FDMT, FATE e FHAR foi realizado pesando-se 1,0 mL (medida volumétrica) do material, em triplicata e submetendo as amostras a 105°C até peso constante após resfriamento em dessecador.

3.4 PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES DO EXTRATO BRUTO

Após o fracionamento do EB e baseando-se nos resultados obtidos na análise fitoquímica preliminar, cada fração foi submetida a uma análise prévia de seus componentes por cromatografia em camada delgada (CCD). Todos os procedimentos foram utilizados na busca de métodos racionais para o isolamento das substâncias. Os solventes utilizados em todos os procedimentos descritos a seguir foram de grau de pureza para análise (P.A.).

3.4.1 Fração Hexano (FHEX)

Após o fracionamento a fração hexano foi concentrada para aproximadamente um quinto de seu volume em evaporador rotatório sob vácuo a 40°C. A cromatografia em camada delgada prévia da FHEX foi realizada em comparação a padrões de esteróides e triterpenos: β -sitosterol, estigmasterol, lupeol

cromatográfica com mesmo diâmetro interno, pastilha com 2 cm de altura e 9 g de sílica gel 60, coluna com 5 cm de altura e 22 g. A eluição foi desenvolvida com hexano e acetato de etila com aumento de 2,5% na polaridade até 20% de acetato de etila recolhidos em frascos de aproximadamente 20 mL, o conteúdo foi seco em temperatura ambiente.

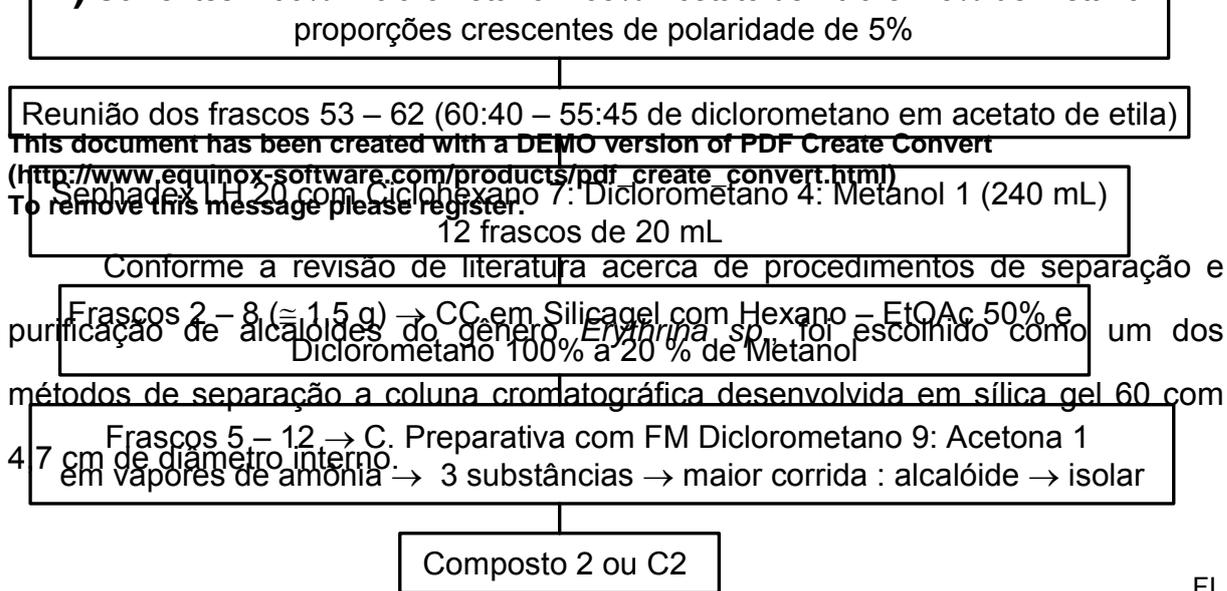
Nos frascos 4 a 14 (97,5 a 90% de hexano em acetato de etila) os cristais estavam quase límpidos, foram reunidos e filtrados em filtro sinterizado utilizando benzina gelada. O filtrado foi resfriado em geladeira e re-filtrado até esgotamento. A substância obtida foi denominada de composto 1 (C1).

Houveram na primeira coluna outros frascos com cristalização, este conteúdo reunido em metanol, seco ao ar e separado visando maior purificação e identificação por análises espectrométricas.

3.4.2 Fração Diclorometano (FDMT)

A fração diclorometano após fracionamento foi concentrada para aproximadamente um quinto de seu volume em evaporador rotatório sob vácuo a 40°C. Foi realizada cromatografia em camada delgada em cromatoplaça de sílica gel G de 5 cm de altura por 2,5 cm de largura, com fase móvel diclorometano em metanol na proporção de 90:10. Após seca ao ar a cromatoplaça foi revelada com solução de Dragendorff clorídrico (STAHL, 1969, p. 873). A partir daí 20 g de amostra foram divididas em duas alíquotas de 10 g cada, para dois procedimentos, o primeiro foi coluna cromatográfica e o segundo extração ácido-base.

3.4.2.1 Coluna cromatográfica da fração diclorometano



GURA 8 – PROCESSO DE SEPARAÇÃO DA FRAÇÃO DICLOROMETANO

Para a coluna foram utilizadas 80 g de sílica com altura de 6 cm e para a pastilha foram utilizadas 18 g de sílica e altura de 2,2 cm. A eluição ocorreu em diclorometano 100% a acetato de etila em metanol na proporção de 65:35 com aumento de polaridade de 5% entre as misturas, na quantidade de 100 mL por combinação. O conteúdo foi recolhido em frascos de aproximadamente 20 mL, seco ao ar em temperatura ambiente e os frascos foram analisados por CCD com fase móvel clorofórmio em metanol na proporção de 85:15, visualizadas em câmara de luz ultravioleta e reveladas com Dragendorff clorídrico, visando a reunião dos pontos de interesse para novas purificações. Em várias reuniões houveram pontos de alcalóides que serão objeto de futuras pesquisas.

O conteúdo dos frascos 53 a 62 (60:40 a 55:45 de diclorometano em acetato de etila) foi reunido por semelhança e apresentou após cerca de 20 dias uma formação de cristais pequenos e aderidos à parede dos frascos. O material foi submetido à nova purificação utilizando o polímero Sephadex® LH 20 com fase móvel ciclohexano, diclorometano e metanol na proporção de 7:4:1, baseado no comportamento em CCD, em quantidade de 240 mL.

Foram obtidos 12 frascos de 20 mL aproximadamente, o material dos frascos 2 a 8 com aproximadamente 1,5 g, foi reunido e submetido a nova coluna

cromatográfica de 4,1 cm de diâmetro interno, com coluna de 3,2 cm e 8 gramas de sílica gel 60 (70 – 20 mesh - 0,063 – 0,200 mm, ASTM, marca Merck®) e pastilha com 1,5 cm de altura e 1,6 g de sílica. A eluição iniciou com hexano e acetato de etila na proporção de 1:1 no total de 20 mL, após seguiu com diclorometano a 100% até 20% de metanol e aumento de polaridade de 5%. O conteúdo dos frascos foi deixado secando ao ar e após análise por cromatografia em camada delgada, utilizando como fase móvel diclorometano e acetona na proporção de 9:1 em cuba saturada com vapores de amônia e como revelador Dragendorff clorídrico, os frascos 5 a 12 (eluição 100:0 até 85:15) foram reunidos.

Com este material, quase totalmente purificado, foi realizada cromatografia em camada preparativa com 5 cm de altura e 20 cm de largura utilizando como fase móvel diclorometano e acetona na proporção de 9:1 em cuba saturada com vapores de amônia. Sob visualização em câmara de luz ultravioleta e comparando-se a uma CCD nas mesmas condições e revelada com Dragendorff clorídrico, a cromatoplaça foi assinalada com grafite demarcando a região de corrida maior, onde estava o alcalóide de maior concentração, esta região foi raspada com auxílio de espátula metálica, a sílica contendo o alcalóide foi suspensa em metanol e filtrada em filtro sinterizado até esgotamento do material aderido à sílica, confirmado através de CCD nas mesmas condições anteriores. O filtrado foi deixado evaporar ao ar e em dessecador. Foi realizada uma CCD de verificação e o alcalóide apareceu como um ponto isolado na metade superior da cromatoplaça (5 cm de altura por 2,5 cm de largura). Esta substância foi denominada composto 2 (C2). Sua identificação está descrita nos itens subseqüentes.

3.4.2.2 Extração ácido-base da fração diclorometano

O processo de extração ácido-base é comum na separação de alcalóides e se baseia na propriedade destes em solução ácida se tornarem sais, solúveis em solventes aquosos e em meio básico serem solúveis em solventes orgânicos, desta maneira são isolados como bases livres usando-se, por exemplo, diclorometano como solvente extrator. A figura 9 traz o processo simplificado utilizado nesta etapa.

A partir da segunda alíquota de 10 g da fração diclorometano foi realizada a extração ácido-base em aparelho de soxhlet modificado, ou seja, o equipamento perdeu a função de “sifonação” passando a função de percolação, utilizando

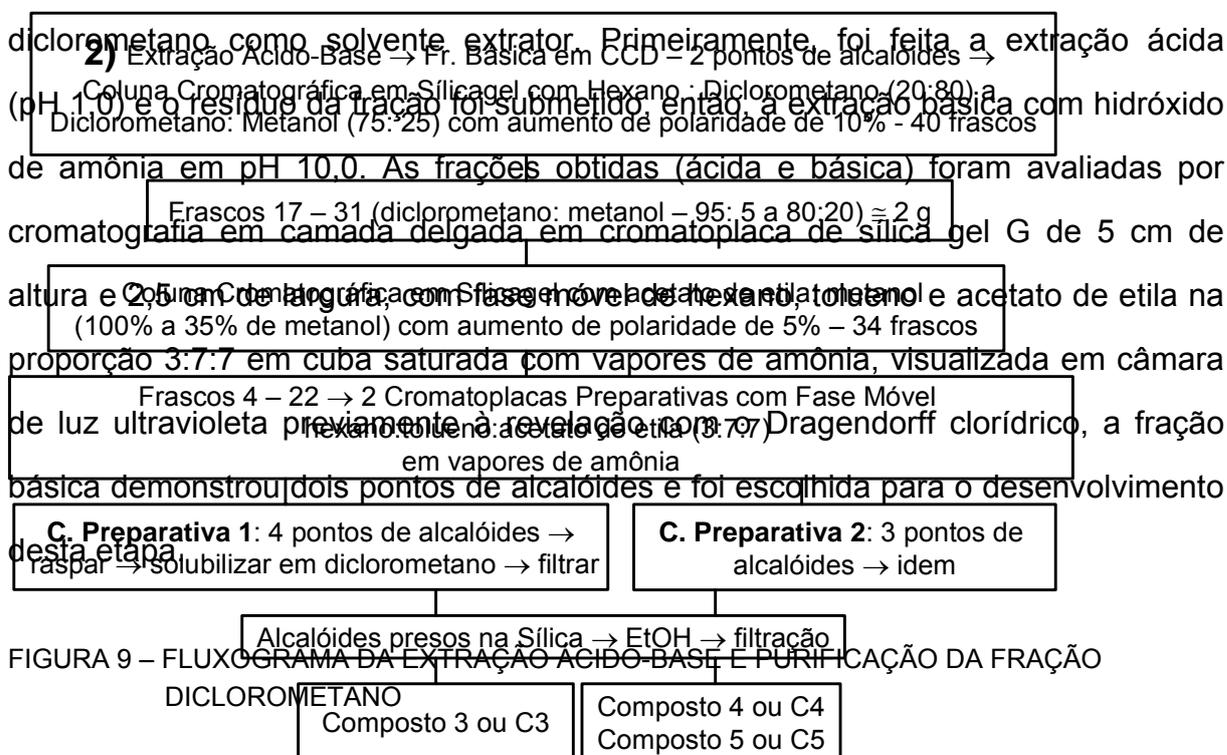


FIGURA 9 – FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO ÁCIDO-BASE E PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO

A amostra, em total aproximado de 6,8 g foi submetida à coluna cromatográfica de 4,1 cm de diâmetro interno. Para a coluna foram utilizadas 24,6 g de sílica gel 60 com altura de 5,2 cm e para a pastilha utilizou-se 13,6 g da mesma sílica (altura de 2,9 cm). A eluição iniciou com hexano em diclorometano na proporção de 20:80 até diclorometano em metanol a 80:20, com aumento de polaridade de 10% entre as combinações e alíquotas de 50 mL recolhidas em frascos de aproximadamente 20 mL. Após secos ao ar em temperatura ambiente, o conteúdo dos frascos 17 a 31 (eluição de diclorometano em metanol a partir de 95:5 até 80:20) foi reunido por similaridade em CCD, utilizando o mesmo tipo de cromatoplaça, a mesma fase móvel e revelador descritos anteriormente.

Este material, em total aproximado de 2,1 g foi purificado novamente em coluna cromatográfica de 4,7 cm de diâmetro interno utilizando-se para a pastilha 10,8 g da mesma sílica da coluna cromatográfica anterior com altura de 1,1 cm e para a coluna 31,9 g de sílica com altura de 2,9 cm. A eluição ocorreu em acetato de etila 100% a acetato de etila em metanol na proporção de 65:35 com aumento de 5% entre as combinações em alíquotas de 60 mL recolhidos em frascos de aproximadamente 20 mL. Por CCD nas mesmas condições descritas anteriormente, verificou-se que os alcalóides estavam concentrados entre os frascos 4 a 22. Este material foi reunido, seco ao ar em temperatura ambiente e em dessecador totalizando cerca de 0,7 g.

A amostra foi submetida à cromatografia em camada preparativa de sílica gel G com 5 cm de altura e 20 cm de largura, a fase móvel foi hexano, tolueno e acetato

de etila na proporção de 3:7:7 em cuba saturada com vapores de amônia. Devido a quantidade de amostra foram necessárias duas cromatoplas preparativas (CCP 1 e CCP 2). A CCP1 gerou quatro pontos de alcalóides e a CCP 2, gerou três pontos de alcalóides, visualizados sob câmara de luz ultravioleta e comparando-se a uma CCD nas mesmas condições (com 5 cm de altura e 2,5 cm de largura) revelada com Dragendorff clorídrico. Cada faixa de corrida foi demarcada com grafite e a sílica foi raspada com auxílio de espátula metálica para frascos individuais gerando sete frascos no total. Adicionou-se diclorometano em cada frasco e seus conteúdos foram filtrados isoladamente em filtro sinterizado. Para verificação do desprendimento dos alcalóides da sílica foi feita uma CCD nas mesmas condições anteriores e verificou-se que ainda havia material preso à sílica. Adicionou-se etanol em quantidade suficiente, seguiu-se filtração e os alcalóides desprenderam-se.

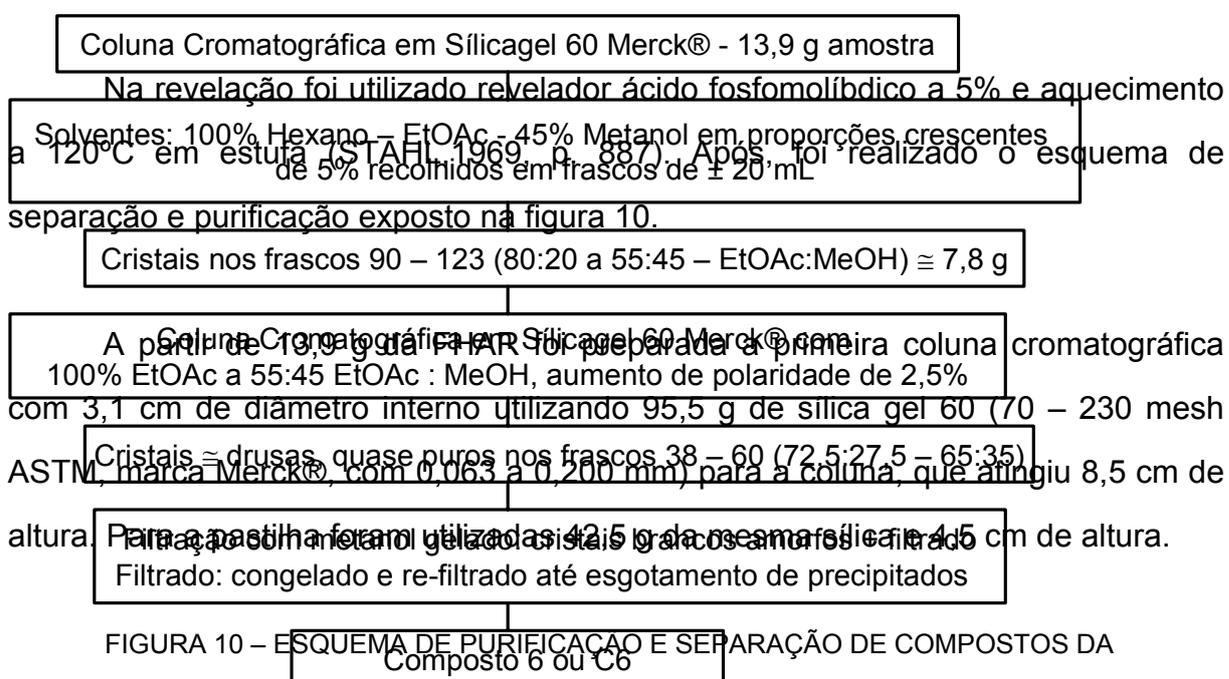
Por nova CCD foram escolhidos para análises espectroscópicas o conteúdo dos filtrados da sílica. Da CCP 1 foi eleito o de maior corrida, denominado composto 3 (C3) e da CCP 2 foram escolhidos o de maior e menor corrida denominados respectivamente de composto 4 (C4) e composto 5 (C5).

3.4.3 Fração Acetato de Etila (FATE)

Após o fracionamento a fração acetato de etila foi concentrada em evaporador rotatório sob vácuo a 40°C e submetida à CCD em cromatoplasca de sílica gel G de 5 cm de altura por 2,5 cm de largura, com fase móvel acetato de etila, diclorometano e metanol na proporção de 1:1:0,3 e após secagem ao ar foi visualizada em câmara de luz ultravioleta. A cromatoplasca foi revelada para flavonóides com o reativo de Neu (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1983, p. 172). A FATE foi separada, acondicionada em frasco e será submetida a procedimentos de separação e purificação futuramente.

3.4.4 Fração Hidroalcoólica Remanescente (FHAR)

Após o fracionamento com acetato de etila, o conteúdo remanescente (FHAR) foi concentrado para aproximadamente um quinto de seu volume em evaporador rotatório a 40°C. Foi feita a CCD prévia em cromatoplaça de sílica gel G, utilizando como fase móvel acetato de etila em metanol na proporção de 65:35 e após seca ao ar foi visualizada em câmara de luz ultravioleta.



FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE

A coluna foi eluída iniciando-se pela combinação hexano em acetato de etila na proporção de 30:70 seguindo até 45% de metanol em acetato de etila, com aumento de polaridade de 5% entre as misturas de solventes e 150 mL para cada combinação, recolhidos em frascos de aproximadamente 20 mL. Após a última eluição a coluna foi lavada com 200 mL de água destilada e o material foi acondicionado e separado. Em todos os frascos, inclusive no de lavagem com água

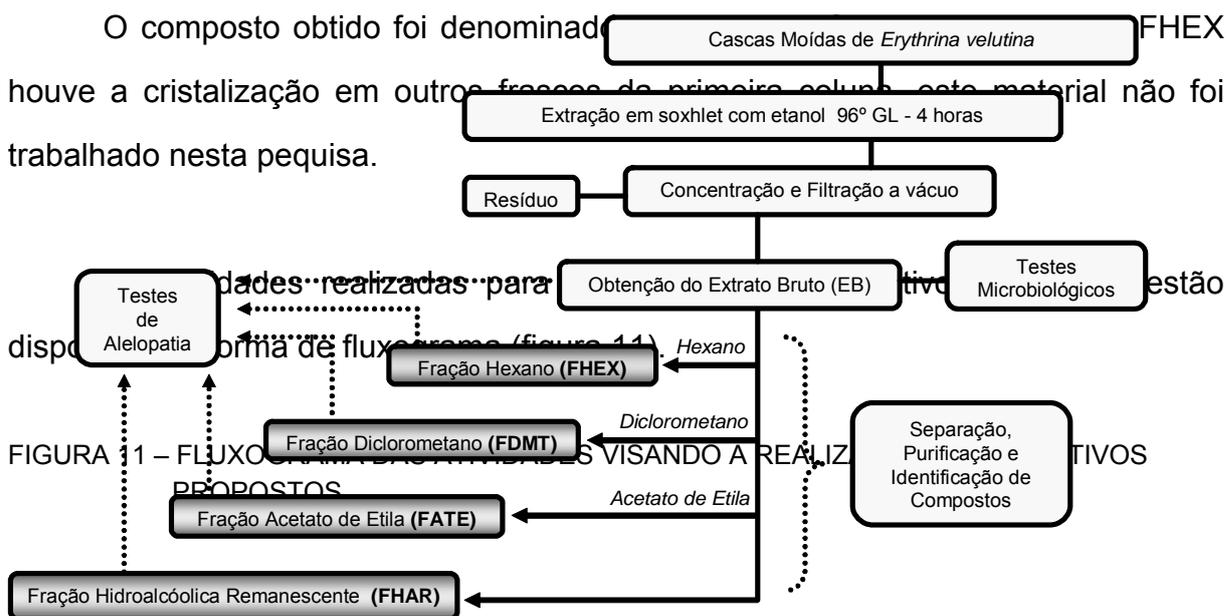
destilada, foi adicionado etanol, visando evitar a contaminação do material por fungos.

Nos frascos 90 a 123 (eluição com acetato de etila em metanol na proporção de 80:20 a 55:45) formaram-se precipitados com aparência de cristais, o material pesando cerca de 7,8 g foi reunido com auxílio de metanol e submetido à nova coluna cromatográfica com 3,1 cm de diâmetro interno e a mesma sílica utilizada anteriormente para a coluna e pastilha. A massa de sílica para a coluna foi de 25,6 g com altura de 6,3 cm e para a pastilha foi de 8,2 g com altura de 2 cm. A eluição iniciou com acetato de etila 100% até acetato de etila em metanol na proporção de 55:45 com aumento de polaridade de 2,5% entre as eluições e 100 mL para cada combinação, recolhidos em frascos de aproximadamente 20 mL. Ao conteúdo adicionou-se gotas de etanol visando a prevenção por contaminantes e o material foi seco ao ar em temperatura ambiente.

Nos frascos 38 a 60 (eluição na proporção de 72,5: 27,5 a 65:35) houve a formação de cristais do tipo drusas em pequena quantidade, mas de tamanho considerável. O material foi reunido e filtrado em filtro sinterizado com auxílio de metanol gelado, obtendo-se cristais amorfos e o filtrado, que foi mantido sob refrigeração e re-filtrado até esgotamento de precipitados.

Foi visualizado em cromatografia em camada delgada em cromatoplaças de sílica gel G em fase móvel metanol em água destilada na proporção 85:15, visualizado em câmara de luz ultravioleta e revelado com ninhidrina (STAHL, 1969, p. 889) a 110°C.

O composto obtido foi denominado FHEX. Houve a cristalização em outros frascos do primeiro colun, este material não foi trabalhado nesta pesquisa.



3.5 IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS

3.5.1 Cromatografia Gasosa da Fração Hexano

Uma amostra da fração hexano solubilizada em metanol foi encaminhada para análise em cromatografia gasosa conforme método de Padronização Interna de CARVALHO (2001, p. 49-51) com a finalidade de caracterizar e quantificar os analitos voláteis por retenção relativa (RR) em relação ao acetato de tocoferol (padrão interno). Utilizou-se cromatógrafo gasoso Shimadzu® modelo 14-B, equipado com colunas megabore DB-1 (100% dimetilpolisiloxano, polaridade 5) e DB-17 (50% fenil e 50% dimetilpolisiloxano, polaridade 24) de 0,53 mm de diâmetro interno por 30 m de comprimento. Utilizou-se como gás de arraste hidrogênio, split a 6 mL por minuto (razão 1:1), purga do septo 3 mL por minuto, make up nitrogênio 25 mL por minuto e oxigênio a 100 mL por minuto. O gradiente de temperatura utilizado foi: temperatura inicial 100°C com patamar de um minuto e rampa de aquecimento a 7°C por minuto até 260°C com patamar de 66 minutos. A temperatura do injetor foi de 260°C e do detector foi de 280°C. O volume de injeção foi de 2 µL.

3.5.2 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono e Hidrogênio dos Compostos

Isolados

A espectrometria de RMN – ^1H foi realizada em equipamento AC 200 Bruker®, do Departamento de Química da UFPR, a 200 Megahertz e a espectroscopias de RMN – ^{13}C e DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer ou Intensificação do Sinal sem Distorção por Transferência de Polarização) foram realizadas no mesmo equipamento em 50 Megahertz, todas em temperatura ambiente. O padrão de referência interna foi o tetra metil silano (TMS). O solvente utilizado foi clorofórmio deuterado (CDCl_3) para C1 a C5 e dimetilsulfóxido deuterado para C6. Quantidade aproximada de amostra enviada para análise: C1 (10 mg), C2 (8 mg), C3 (10 mg), C4 (11 mg), C5 (13 mg) e C6 (15 mg).

3.5.3 Espectroscopia no Infravermelho dos Compostos Isolados

Com 1% da amostra em relação a pastilha de KBr a análise foi efetuada em equipamento de infravermelho, 400 a 4000 cm^{-1} com transformada de Fourier (IVTF), BIORAD® FTS 3500 GX do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná. Esta análise foi efetuada para os compostos C1 e C6.

3.5.4 Espectroscopia no Ultravioleta do Composto 6 – C6

Utilizou-se o espectrofotômetro UV-Visible Spectrophotometer modelo UV1601 marca Shimadzu®, da Central Analítica desta Pós-graduação, cubetas de quartzo. A amostra foi diluída a $0,1\text{ mg/mL}$ e o solvente utilizado foi etanol P.A. Merck® e varredura entre 200 e 400 nm.

3.6 ESTUDO DE ATIVIDADE ALELOPÁTICA DO EXTRATO BRUTO

O bioensaio para verificação da atividade alelopática foi efetuado a partir do extrato bruto (EB) e frações FHEX, FDMT, FATE, FHAR das cascas da *Erythrina velutina* com a finalidade de observar o efeito sobre a germinação e crescimento de sementes de *Lactuca sativa* (conhecida como alface), cultivar babá com 99% de germinação detectados através de teste padrão de germinação.

Foram preparadas sete concentrações do extrato bruto e frações. As concentrações foram de 0,6 mg; 0,4 mg; 0,3 mg; 0,2 mg; 0,1 mg; 0,05 mg e 0,025 mg em etanol P.A., que foi o mesmo utilizado na extração do material vegetal. Também preparou-se um controle com água (CA) e um controle com etanol (CE).

Papéis de filtro qualitativo (Whatman número seis) recortados do tamanho das caixas Gerbox foram embebidos com 2 mL das soluções preparadas com as devidas concentrações e colocou-se em estufa a 60° C por 24 horas. Após decorrido o tempo, em fluxo laminar (Labcon Co Purifier® Class II), colocou-se os papéis de filtro secos nas caixas Gerbox, que foram umedecidos com 3 mL de água destilada e submeteram-se dez sementes de *Lactuca sativa* (unidades de análise) em cada caixa em quatro repetições. As caixas foram embaladas com papel alumínio e colocadas no germinador Mangelsdorf, marca Biomatic® à temperatura de 20 °C. Para cada concentração preparam-se duas caixas, uma para estudo da germinação e outra para estudo do crescimento. Os ensaios seguem a normatização oficial de análise de sementes para germinação e crescimento, garantindo a aleatorização da distribuição das sementes e a repetição dentro de cada tratamento. Como não existem outros fatores interferentes não houve necessidade de formação de blocos distintos de análise.

3.6.1 Germinação

Conforme ADEGAS, VOLL e PRETE (2003, p. 23) as sementes podem ser consideradas germinadas quando a protrusão da radícula através do tegumento se torna visível. Foi realizada leitura diária necessariamente no mesmo horário abrindo as caixas em fluxo laminar. As sementes que germinam são retiradas diariamente até seis ou sete dias (germinação total). A contagem é realizada por quadrantes, em sentido horário na caixa de germinação.

3.6.2 Crescimento

O crescimento é visualizado no sétimo dia de experimento. As caixas são abertas e as sementes são retiradas uma a uma para medir a radícula (que origina a raiz) e o hipocótilo (que origina o caule) em papel milimetrado. O resultado é calculado em centímetros.

Cada teste é realizado com dez sementes e quatro repetições para cada tratamento, considerando-se que as diferentes concentrações da amostra são os tratamentos, designados por dois algarismos, o primeiro indica a concentração do extrato e o segundo indica a repetição (quadro 3).

QUADRO 3 – DESIGNAÇÃO DOS TRATAMENTOS PARA A ANÁLISE ESTATÍSTICA

CONCENTRAÇÃO	ORDEM	REPETIÇÃO	TRATAMENTOS
0,6 mg	1	1, 2, 3, 4	11, 12, 13, 14
0,4 mg	2	1, 2, 3, 4	21, 22, 23, 24
0,3 mg	3	1, 2, 3, 4	31, 32, 33, 34
0,2 mg	4	1, 2, 3, 4	41, 42, 43, 44
0,1 mg	5	1, 2, 3, 4	51, 52, 53, 54
0,05 mg	6	1, 2, 3, 4	61, 62, 63, 64
0,025 mg	7	1, 2, 3, 4	71, 72, 73, 74
Controle com água (CA)	8	1, 2, 3, 4	81, 82, 83, 84
Controle com etanol (CE)	9	1, 2, 3, 4	91, 92, 93, 94

3.6.3 Análise Estatística

Os resultados do crescimento da radícula e hipocótilo em centímetros foram submetidos à análise estatística de variância e de comparação de médias utilizando-se o pacote computacional SISVAR (Sistema de Análise para dados Balanceados) segundo FERREIRA (2000). A verificação das diferenças de médias estatisticamente significantes foi realizada através do teste de Scott & Knott ao nível de 5% de significância, escolhido para as análises por ser claro, objetivo e isento de ambigüidades, presentes no teste de Tukey e na maioria dos testes de comparações múltiplas.

O tratamento será considerado efetivo quando todas as repetições estiverem no mesmo grupo de médias.

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A atividade antimicrobiana foi avaliada utilizando os métodos de difusão em disco e Concentração Inibitória Mínima (MIC) para o extrato bruto, para a fração hexano foi realizado o método de difusão em disco, as demais frações serão submetidas a testes futuramente.

Foram utilizadas as culturas puras (ATCC - American Type Culture Collection) das seguintes bactérias em ambos os testes: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615); *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228); *Proteus mirabilis* (ATCC 43071); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27283); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883); *Escherichia coli* (ATCC 11229); *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028). Os microrganismos foram adquiridos comercialmente (marca Newprov®).

3.7.1 Difusão em Disco

O teste de difusão em disco seguiu a metodologia adaptada por ROMEIRO (2001, p. 136 – 140) em que se avalia o resultado da atividade pela formação de halo de inibição de crescimento ao redor do disco impregnado com extrato. O microrganismo em solução padronizada é inoculado em placa com meio sólido onde são acondicionados os discos com diferentes concentrações de extrato. O resultado positivo é o diâmetro do halo de inibição em milímetros.

Discos estéreis de papel de 6 mm de diâmetro foram impregnados com 10 µL do extrato bruto e da fração hexano nas concentrações de 100%, 50%, 25% e 12,5% (tabela 1). As diluições foram realizadas utilizando o mesmo etanol 96° GL da extração e os testes realizados em triplicata.

TABELA 1 – CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÃO HEXANO NOS RESÍDUOS SECOS E DISCOS

CONCENTRAÇÃO	EXTRATO BRUTO		FRAÇÃO HEXANO	
	Resíduo Seco em mg/mL	Total de sólidos em mg/10 µL	Resíduo Seco em mg/mL	Total de sólidos em mg/10 µL
100,0 %	312,75	$312,75 \times 10^{-2}$	200	200×10^{-2}
50,0 %	156,37	$156,37 \times 10^{-2}$	100	100×10^{-2}
25,0 %	78,19	$78,19 \times 10^{-2}$	50	50×10^{-2}
12,5 %	39,10	$39,10 \times 10^{-2}$	25	25×10^{-2}

Após a secagem dos discos a 40 °C, estes foram espalhados em placa de Petri contendo meio Ágar Mueller-Hinton adquiridas comercialmente, previamente inoculadas com os microrganismos. Como padrões de inibição de crescimento utilizou-se discos de antibióticos comerciais marca Newprov®, cloranfenicol 30 µg (código CLO30 – Lote A6389, validade Janeiro/05) e cefalotina 30 µg (código CFL30 -Lote 996 validade, Outubro/05). Em cada placa de teste colocou-se um disco de cada diluição, um com etanol 96 °GL (controle) e um com o padrão de cloranfenicol, totalizando seis discos por placa. Foram feitas placas-controle com os

dois padrões de antibióticos e o controle com etanol para cada microrganismo. As placas foram incubadas em estufa a 35 °C e os resultados lidos após 24 horas.

3.7.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima do extrato bruto foi realizada por um método adaptado do descrito em KONEMANN (1993, p. 454). As suspensões bacterianas padronizadas pela turbidez conforme o tubo 0,5 da escala de MacFarland (0,5 mL de BaCl₂ · 2H₂O 0,048M - 1,75% peso/volume em 99,5 mL de H₂SO₄ 0,36 N – 1% volume/volume), foram diluídas em solução estéril de Tween 80 a 0,2% em proporção de 2:100 e após inoculadas em caldo triptico caseína de soja – CASOY.

Foram inoculados 1,0 mL da suspensão de bactérias sobre 1,0 mL de extrato, puro ou diluído em caldo CASOY nas proporções 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64. As concentrações decrescentes de extrato utilizadas para o teste, partindo-se de 312,75 mg/mL foram 1:1 (156,37 mg/mL), 1:2 (78,19 mg/mL), 1:4 (39,10 mg/mL), 1:8 (19,55 mg/mL), 1:16 (9,77 mg/mL), 1:32 (4,89 mg/mL) e 1:64 (2,44mg/mL). O teste foi realizado em triplicata com incubação de 35° C durante 24 horas .

O controle positivo, que certifica o crescimento dos microrganismos nas condições do teste sem o extrato, é representado por 1,0 mL de suspensão de bactérias inoculado em 1,0 mL de caldo nutritivo. O controle negativo é representado por extrato diluído em caldo nutritivo na concentração 1:2 sem inóculo de bactérias, para eliminar a turbidez da amostra como fator de confundimento. Segundo

KONEMANN (1993, p. 455) o último tubo em que a amostra inibe o crescimento de microrganismos, visualmente comparado ao controle negativo, é considerado a CIM.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 TESTES COM O VEGETAL, EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES

Os resultados dos testes de umidade, resíduo seco, cinzas e rendimento do material vegetal, do extrato bruto e das frações estão demonstrados nas tabelas 2 e 3. Foram obtidos 200 mL, aproximadamente 71,2 gramas, de Extrato Bruto (EB).

TABELA 2 – RENDIMENTO DO PROCESSO DE FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO

	FHEX	FDMT	FATE	FHAR	TOTAL
%	14,38	34,88	9,95	40,79	100
G	10,24	24,84	7,09	29,05	71,231

TABELA 3 – RESULTADO DOS TESTES DE UMIDADE, CINZAS E RESÍDUO SECO

TEOR DE UMIDADE DO VEGETAL	TEOR DE CINZAS DO VEGETAL	RESÍDUO SECO DO EXTRATO BRUTO	TEOR DE CINZAS DO RESÍDUO SECO DO EXTRATO BRUTO
10,40%	17,71%	3,67%	8,57%

4.2 ENSAIOS FITOQUÍMICOS

De acordo com as características organolépticas o extrato bruto possui cor marrom, odor semelhante ao de mato e sabor adocicado, o pH foi de 6,0. Os resultados dos ensaios fitoquímicos realizados estão dispostos nas tabelas 4 e 5.

TABELA 4 – RESULTADOS COM O EXTRATO AQUOSO

ENSAIOS COM EXTRATO AQUOSO 20%

Antocianinas	-
Heterosídeos Saponínicos	-
Heterosídeos Cianogenéticos	+
Taninos	-

LEGENDA: (-) negativo, (+) positivo.

TABELA 5 – RESULTADOS DAS FRAÇÕES DO EXTRATO ALCOÓLICO

ENSAIOS COM	F.H.	F.C.	F.AE.	F.HA.
Alcalóides				
Mayer	-	-	-	-
Dragendorff	-	+++	-	+++
Bouchardat	-	+	-	-
Bertrand	-	-	-	-
Leucoantocianidinas	-	-	-	-
Flavonóides	-	-	-	-
Oxálico-Bórico	-	+	+	+
Ensaio de Pacheco	-	-	-	-
Cumarinas	-	-	-	-
Antraquinonas	-	-	-	-
Esteróides/ Triterpenos	+++	+++	-	-
Liberman – Bouchard	-	-	-	-
Keller – Kelliani	-	-	-	-

LEGENDA: F. H. = Fração Hexano; F. C. = Fração Clorofórmio; F. AE. = Fração Acetato de Etila; F.HA. = Fração Hidroalcoólica; Resultados = (-) negativo, (+) positivo, (+++) fortemente positivo.

Foi demonstrada a presença de esteróides, alcalóides, flavonóis e heterosídeos cianogenéticos, o que coincide com os dados da literatura para o gênero *Erythrina sp.*

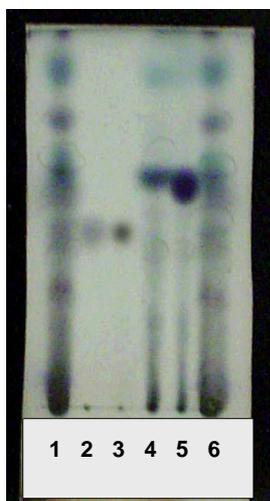
Os alcalóides, presentes na fração clorofórmio e hidroalcoólica, são compostos de caráter básico com solubilidade modificável em função do pH do meio.

Em pH básico os alcalóides na forma de base livre são insolúveis em solventes aquosos e solúveis em solventes orgânicos e em pH ácido, os alcalóides em forma de sal, são solúveis em solventes aquosos e insolúveis em solventes orgânicos.

Na forma de sal combinam-se ao iodo e metais pesados como bismuto, mercúrio e tungstênio formando precipitados, propriedade utilizada nesta pesquisa.

4.3 RESULTADOS COM A FRAÇÃO HEXANO

4.3.1 Cromatografia em Camada Delgada da Fração Hexano



Fração Hexano em comparação com os padrões (figura 12)

Presença de todas as substâncias em comparação, concordando com o cromatograma gasoso exposta no item 4.3.2.

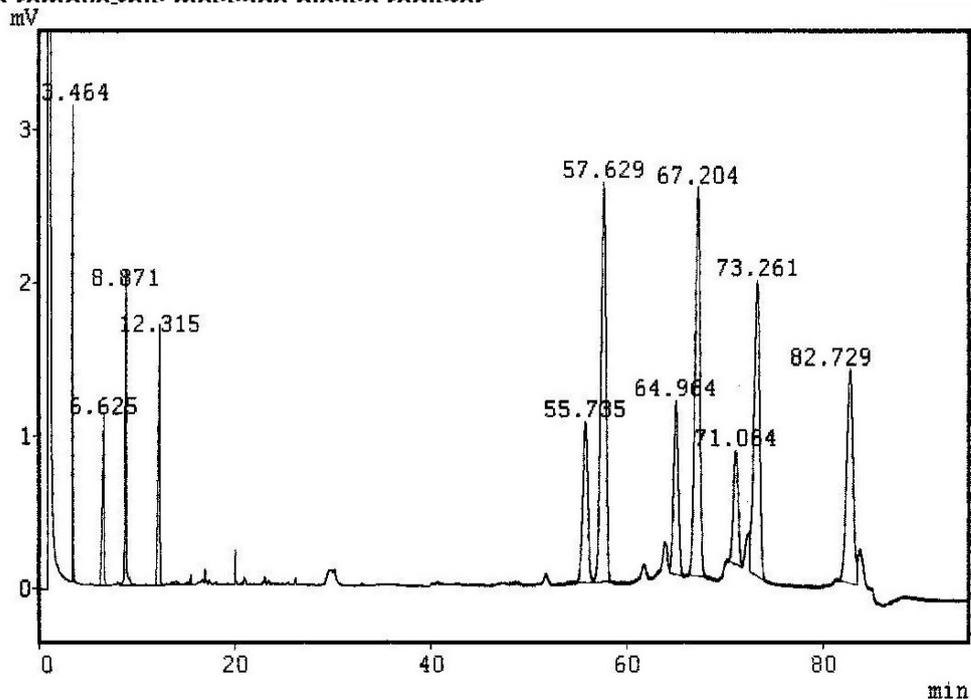
ROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COMPARATIVA DA FRAÇÃO
HEXANO COM PADRÕES DE ESTERÓIDES E TRITERPENO

FOTO: INFANTE VIEIRA, E. D, 2004

LEGENDA: 1 = FHEX; 2 = β -sitosterol; 3 = estigmasterol; 4 = lupeol; 5 = α,β -amirina; 6 = 1 = FHEX

4.3.2 Cromatografia Gasosa da Fração Hexano

To remove this message please register



romatograma
zação interna
análise dos
im o padrão
o, α -amirina,
bstâncias no

AS EM
JA

a
g
g
e

e
c
i
c
i

j
d
f
d
j
f
b
h

h

Fonte: CARVALHO (2004, p. 50)

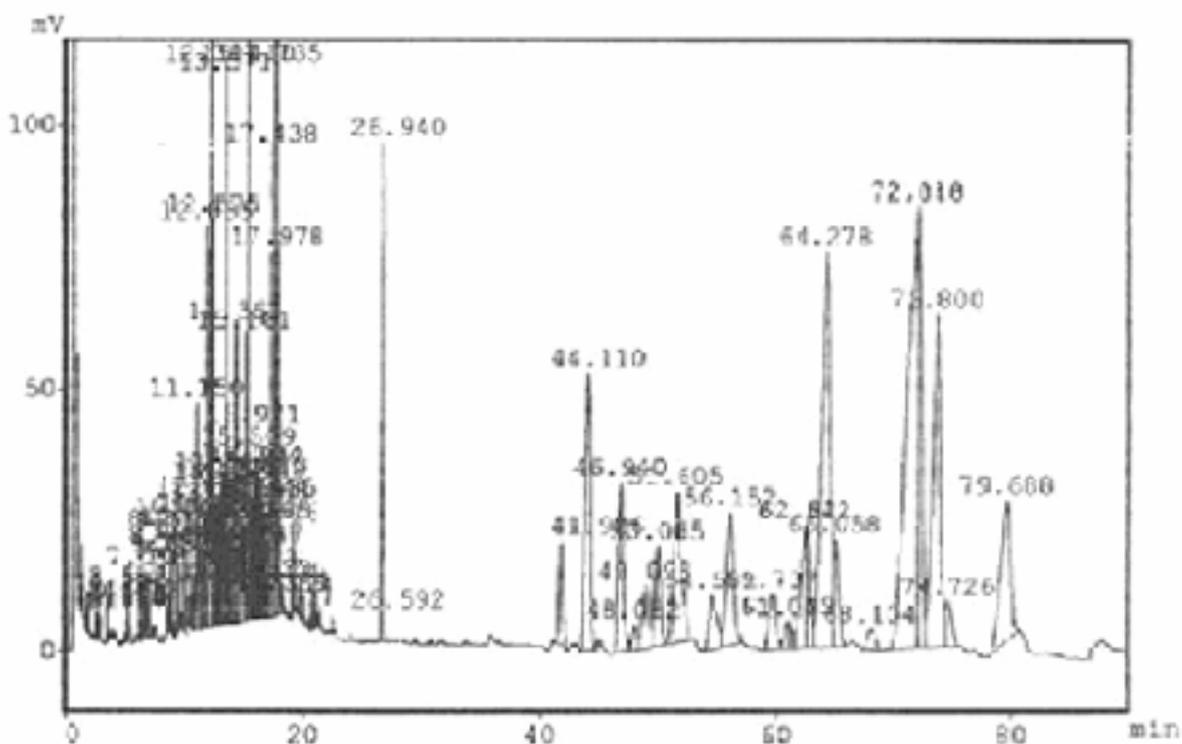


FIGURA 14 – CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO HEXANO

c
h
e
f
b
a
g
d

LEGENDA: a – ácido fênico; b – ácido cinâmico; c – acetato de tocoferol; d - α -amirina; e – estigmasterol; f - β -amirina; g - β -sitosterol; h – lupeol.

TABELA 7 – TABELA COMPARATIVA DA FRAÇÃO HEXANO COM OS PADRÕES DE METABÓLICOS

REFERÊNCIA	TR	RR	FRAÇÃO HEXANO	RR	TR
Ácido Fênico	3.464	0.060	Ponto 2	0,061	2.690
Ácido Cinâmico	12.315	0.214	Ponto 14	0,213	9.415
Acetato de tocoferol	57.629	1.000	-	-	-

To remove this message please register.

Alfa-amirina	64.964	1.130	Ponto 73	1,135	50.085
Estigmasterol	67.204	1.170	Ponto 74	1,170	51.605
Beta-amirina	71.064	1.230	Ponto 75	1,237	54.581
Beta-sitosterol	73.261	1.270	Ponto 72	1,273	56.152
Lupeol	82.729	1.440	Ponto 82	1,457	64.278

LEGENDA: TR = tempo de retenção; RR = retenção relativa

Através da área de cada pico e da área total pode-se calcular a proporção em porcentagem de cada substância na mistura, neste caso a fração hexano. A área total foi de 65766902 (100%). A seguir estão listados alguns dos compostos identificados na FHEX com suas respectivas áreas de pico e porcentagem: ácido cinâmico 356156 (0,54%); alfa-amirina 262186 (0,40%); estigmasterol 656288 (1,00%); beta-amirina 249933 (0,38%); beta-sitosterol 518441 (0,80%); lupeol (2,95%).

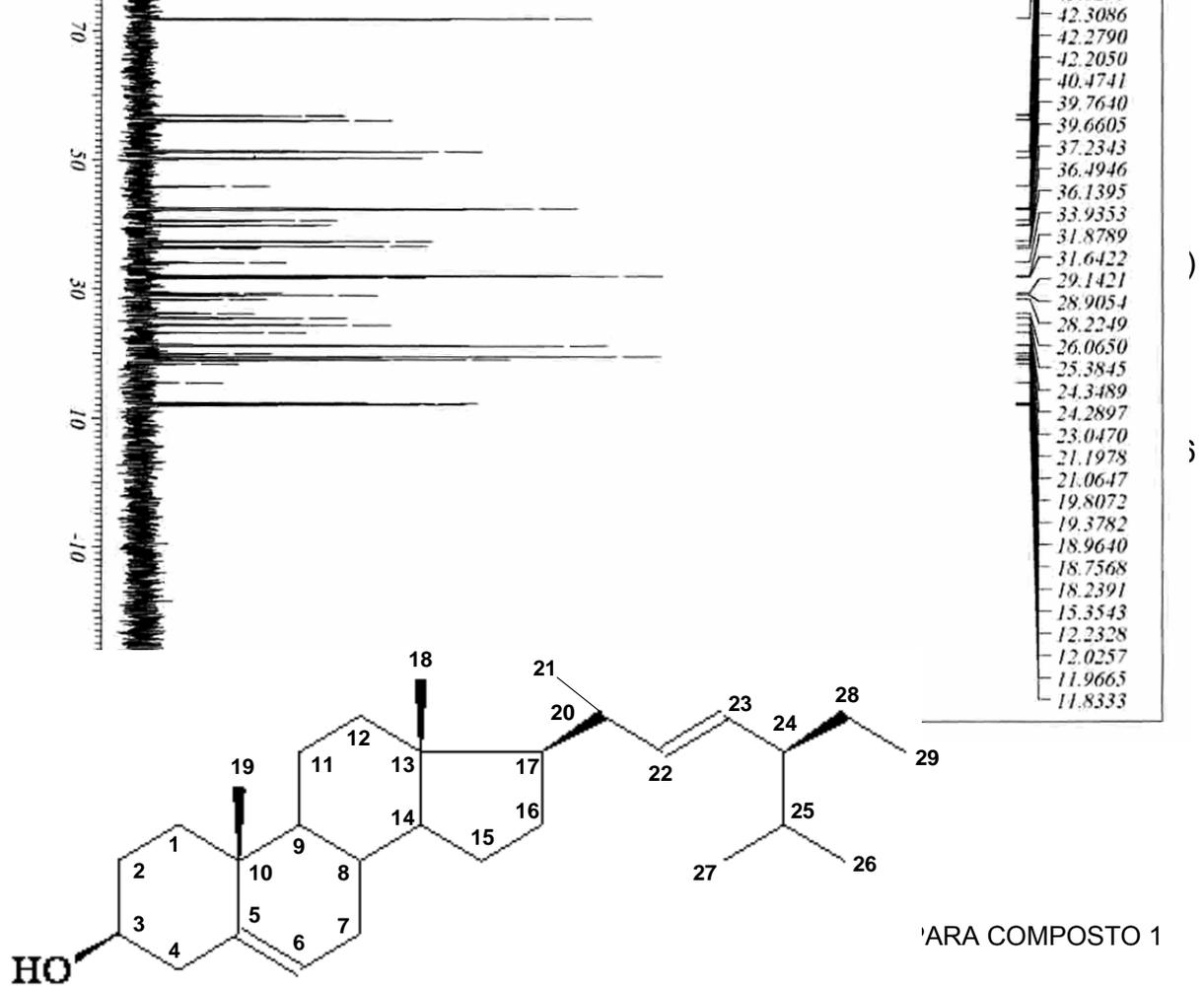
4.3.3 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono e Hidrogênio do Composto 1

1 Discussão do espectro de RMN de ^{13}C do composto 1

TABELA 8 – DESLOCAMENTOS EM ppm DO ESPECTRO DE RMN – ^{13}C PARA ESTIGMASTEROL

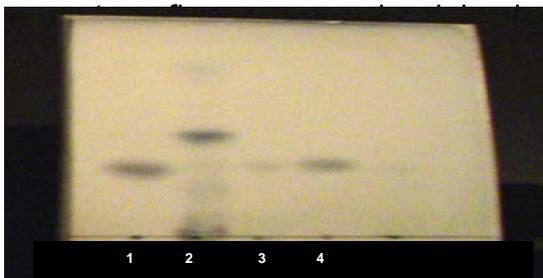
CARBONO	ppm	CARBONO	ppm	CARBONO	ppm
1	37,2	11 e 21	21,0	22	138,3
2	31,6	12	39,6	23	129,3
3	71,8	14	56,8	24	51,2
4 e 13	42,2	15	24,3	26	21,2
5	140,7	16	28,9	27	18,9
6	121,7	17	55,9	28	25,3
7, 8 e 25	31,8	18	12,0	29	12,2
9	50,1	19	19,3	-	-
10	36,5	20	40,4	-	-

Comparando-se os dados do espectro aos valores relatados por FORGO e KÖVÉR (2004, p. 48) para o estigmasterol (tabela 8) sugere-se que a estrutura majoritária seja o estigmasterol (figura 16) e os sinais excedentes no espectro são coincidentes para o β -sitosterol (DE-EKNAMKUL; POTDUANG, 2003, p. 394). O

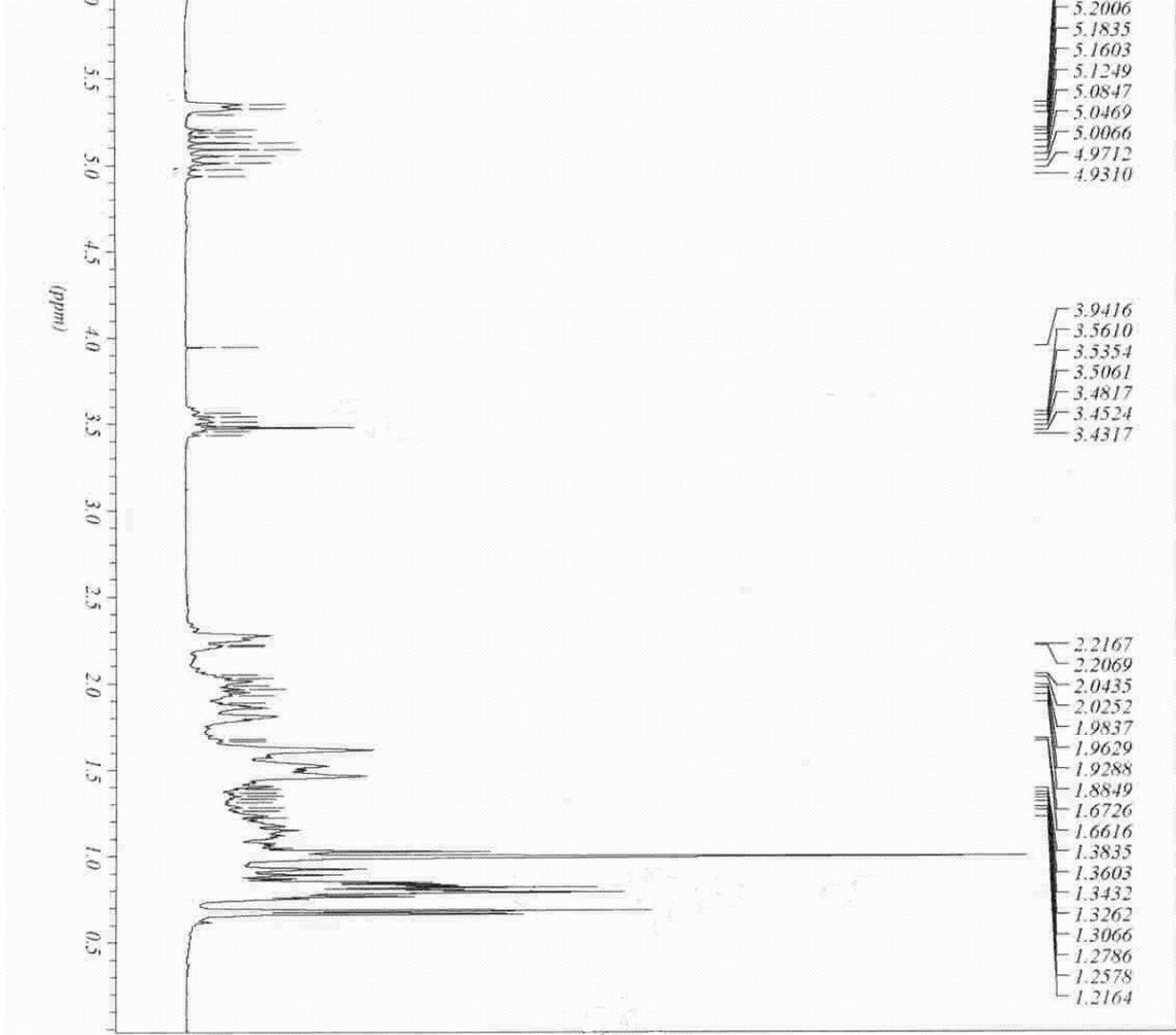


ESTIGMASTEROL

A presença das duas substâncias pode também ser visualizada por em comparação com padrões em que há compostos (figura 17).



COM PADRÕES DE ESTERÓIDES E TRITERPENO



CDCl₃
 H₆
 H₂₂ e H₂₃
 H₃

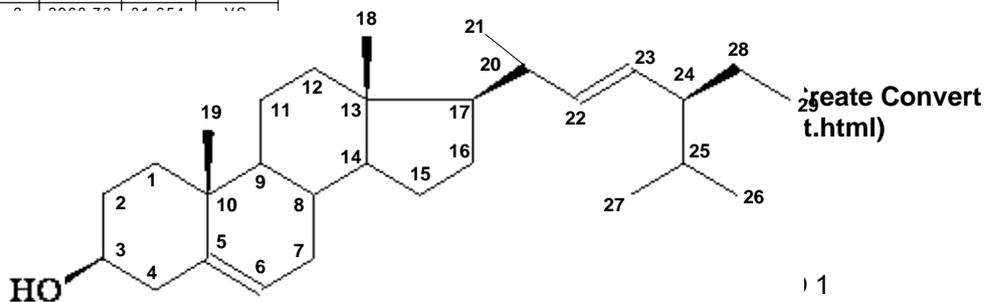
Para os sinais indicados no espectro têm-se para o hidrogênio do carbono 3 (H₃): 3,51 α [m 1H]; J_{3 α , 4 α} = 4,80 Hz; J_{3 α ,4 β} = 11,2 Hz. Para H₆: 5,34 [m 1H]; J_{6,7 β} = 5,3 Hz; J_{6,7 α} = 1,9 Hz. Para H₂₂: 5,17 [dd 1H]; J_{22,23} = 15,2 Hz. E para H₂₃: 5,04 Hz [dd 1H]; J_{23,24} = 8,6 Hz.

4.3.4 Espectroscopia no Infravermelho do Composto 1

Com base nos espectros obtidos por RMN para C1 e nos dados de infravermelho expostos por SILVERSTEIN, BASSLER e MORRIL (1994, p. 85 – 152) sugere-se para o espectro de C1 (figura 19) que a banda em $3415,93\text{ cm}^{-1}$ possa ser atribuída a deformação axial da ligação O – H da hidroxila livre ($\nu\text{ OH}$), isto é, sem ligações de hidrogênio que em álcoois e fenóis absorve fortemente entre $3650 - 3584\text{ cm}^{-1}$, se ocorrer a ligação de hidrogênio intermolecular aparecem outras bandas em frequência mais baixa, entre $3550 - 3200\text{ cm}^{-1}$ de intensidade forte e larga. A banda em $3286,69\text{ cm}^{-1}$ pode ser atribuída à deformação axial de C – H de alquenos ($\nu\text{ CH}$). Entre $3000 - 2840$ ocorrem as deformações axiais da ligação C– H de ciclo-alcanos em anel de baixa tensão e alcanos (parafinas) e as bandas em $2960,73\text{ cm}^{-1}$ ($\nu\text{ CH}$) e $2937,58$ podem ser atribuídas a estas vibrações. As vibrações de deformação axial de da ligação dupla de carbonos (C = C) em alquenos não conjugados e ciclo-alquenos em anéis de baixa tensão ocorrem entre $1667 - 1640\text{ cm}^{-1}$ e são fracas a moderadas, o que coincide com a banda presente em $1647,20\text{ cm}^{-1}$ ($\nu\text{ C=C}$). A banda em $1465,90\text{ cm}^{-1}$ pode ser atribuída a vibração de deformação angular simétrica no plano de C – H ($\delta_s\text{ CH}_2$) que ocorre em 1465 cm^{-1} .

A banda em $1382,96\text{ cm}^{-1}$ atribui-se a vibrações de deformação angular de C – H do grupamento metila ligado a carbono ($\delta_s\text{ CH}_3$). As vibrações de deformação axial da ligação C – O em álcoois e fenóis produzem banda na região de $1200 - 1000\text{ cm}^{-1}$ e acoplam-se com a vibração de deformação axial da ligação C – C adjacente, os álcoois secundários ligados a anéis alicíclicos de cinco ou seis átomos absorvem especificamente entre $1085 - 1050\text{ cm}^{-1}$, pode-se atribuir a banda em $1051,20\text{ cm}^{-1}$ este tipo de deformação. O restante das bandas de absorção pode ser atribuído à vibração axial de C – C que são fracas.

No	cm-1	%T	Intensity
1	2937,58	29,705	VS
2	2922,72	24,274	VS



11

4.4 RESULTADOS COM A FRAÇÃO DICLOROMETANO

4.4.1 Características dos Compostos Isolados

Todas as substâncias isoladas são gomas de coloração castanha, solúveis em clorofórmio, diclorometano, acetato de etila, etanol e metanol. Os rendimentos aproximados foram de oito mg para o Composto 2, de 10,4 mg para o Composto 3 (em análise), de 12 mg para o Composto 4 e 14 mg para o Composto 5. Seguem as análises obtidas até o presente momento.

4.4.2 Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono e Hidrogênio do Composto 2

4.4.2.1 Discussão do espectro de RMN de ^{13}C do composto 2

Conforme dados de revisão publicados por AMER; SHAMMA; FREYER (1991, p. 336 – 337) há coincidência de alguns sinais do composto 2 (tabela 9 e figura 20) com a eritralina (figura 21), composto já isolado da *Erythrina velutina* por técnicas diferentes da utilizada neste estudo, sugere-se por meio desta análise que o composto 2 seja a eritralina.

TABELA 9 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM ppm DO ESPECTRO DE RMN ^{13}C PARA O COMPOSTO 2 E CARBONO CORRESPONDENTE

CARBONO	ppm	CARBONO	ppm	CARBONO	ppm
1	124,9	10	44,5	OMe	55,9
2 e 13	131,9	11	25,1	CH ₂ O ₂	100,7



FIG

URA 20 - RMN ^{13}C (50 MHz, em CDCl_3) PARA O COMPOSTO 2 E ESTRUTURA SUGERIDA

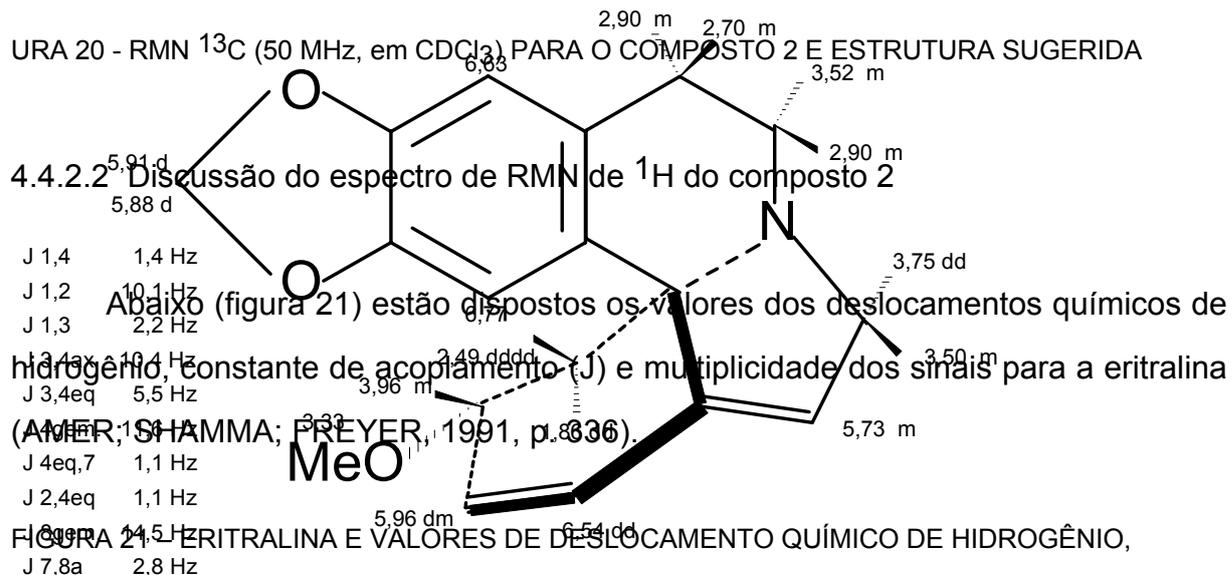
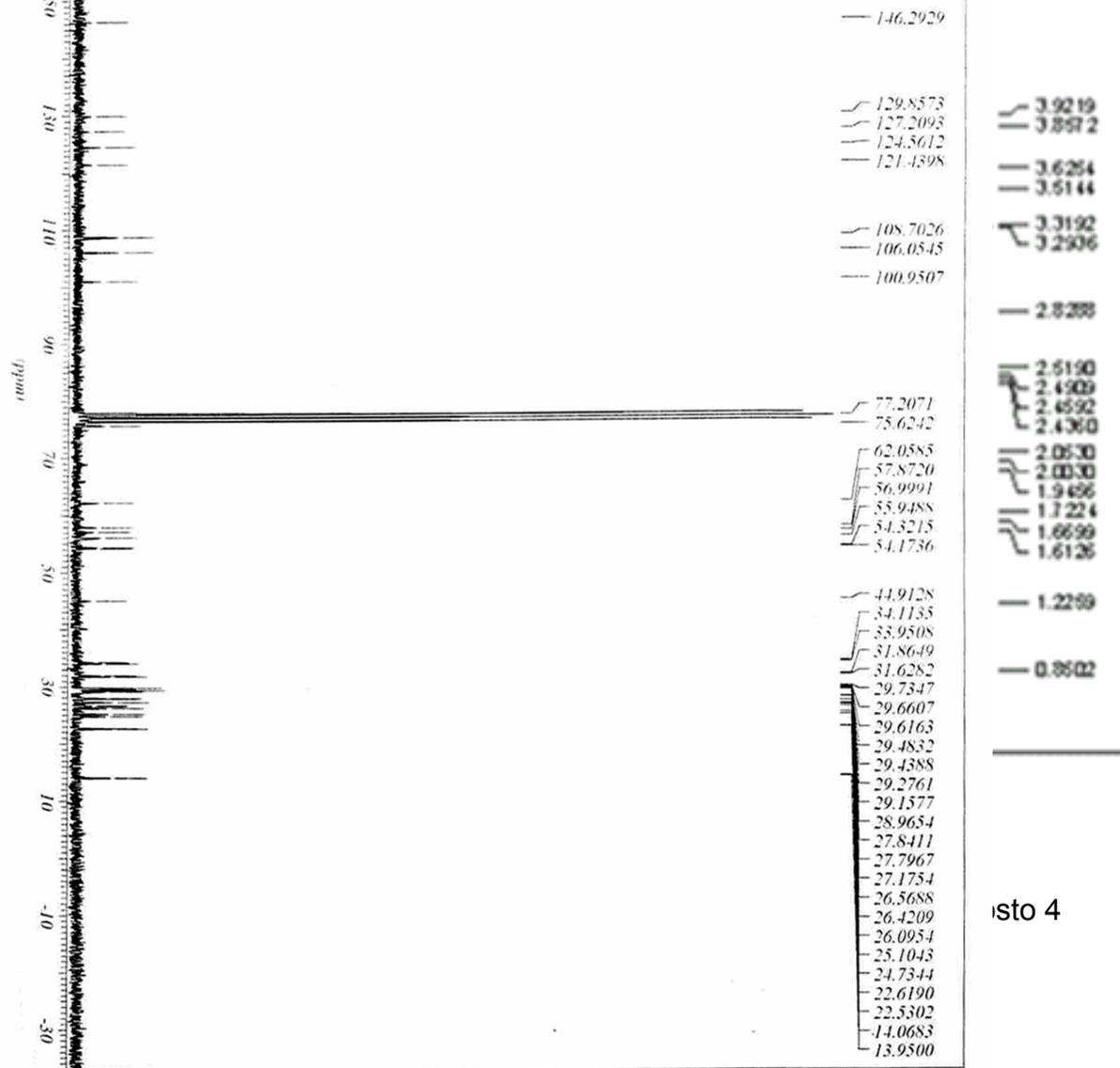


FIGURA 21. ERITRALINA E VALORES DE DESLOCAMENTO QUÍMICO DE HIDROGÊNIO, CONSTANTE DE ACOPLAMENTO E MULTIPLICIDADE DOS SINAIS

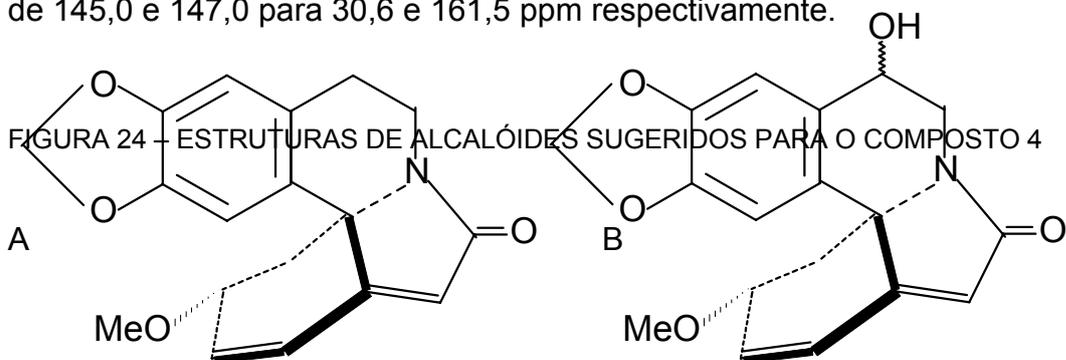


isto 4

FIGURA 23

- RMN ^{13}C (50 MHz, em CDCl_3)

Conforme a análise do espectro, o composto 4 provavelmente seja uma mescla de alcalóides, os sinais em 173,2 e 172,8 ppm são geralmente atribuídos à ligação carbonila em C8 (figura 24 A), o sinal em 166,6045 ppm poderia ser atribuído ao carbono 15 do anel D ligado a cetona de alcalóides do tipo lactônicos dienóides, o que mudaria o valor aproximado dos sinais dos carbonos 12 e 13 do anel D comum de 145,0 e 147,0 para 30,6 e 161,5 ppm respectivamente.



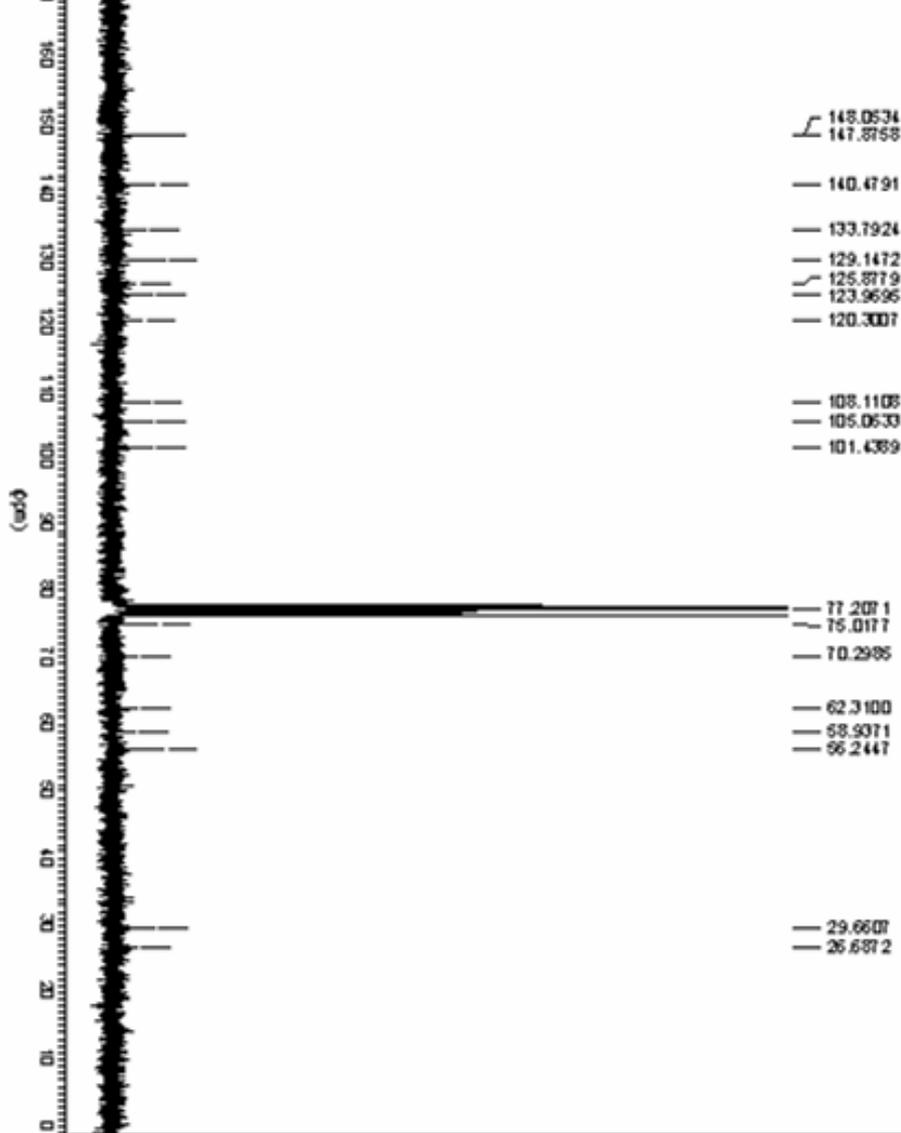


Os sinais em 129,8 ppm e 127,2 ppm poderiam ser atribuídos aos carbonos 12 e 13 do anel B com hidroxila ligada ao carbono 11 (figura 24 B).

Os valores de 108,7 ppm e 106,0 ppm são comuns aos carbonos 17 e 14 do anel D ligado ao grupo metilenodioxí (CH_2O_2), este gera sinais entre 100,6 e 101,8, o sinal em 75,6 ppm provavelmente se deve ao carbono 3 ligado a metoxila, entre 57,8 e 54,1 ppm poderiam ser incluídos os carbonos da metoxila e/ou carbono 8 de anel B tradicional, os sinais restantes podem ser atribuídos aos carbonos não citados em diferentes combinações de ligações química. Ainda pode ser sugerida outra estrutura (figura 24 C).

O composto 4 será submetido novamente a técnicas de separação visando a identificação das estruturas e posterior comparação ao composto 3 (em análise), considerando que C3 e C4 partiram da mesma amostra, foram submetidos à extração ácido-base, seguida de colunas cromatográficas, cromatoplaca preparativa nas mesmas condições e tiveram a maior eluição na corrida.

A partir destas considerações pode-se inferir que C3 contenha um dos alcalóides presentes em C4, porém mais purificado ou até isolado, devido a melhor separação em cromatoplaca.



ogênio do

to 5

A figura 27 mostra a estrutura do alcalóide denominado 8 - oxo - 11 β - metoxieritralina, isolado da *Erythrina lysistemon* (AMER; SHAMMA e FREYER, 1991, p. 343), conforme levantamento bibliográfico os dados de RMN – ^{13}C e ^1H para este composto não foram ainda publicados, a proposta destes valores é uma aproximação em função dos dados obtidos no espectro.

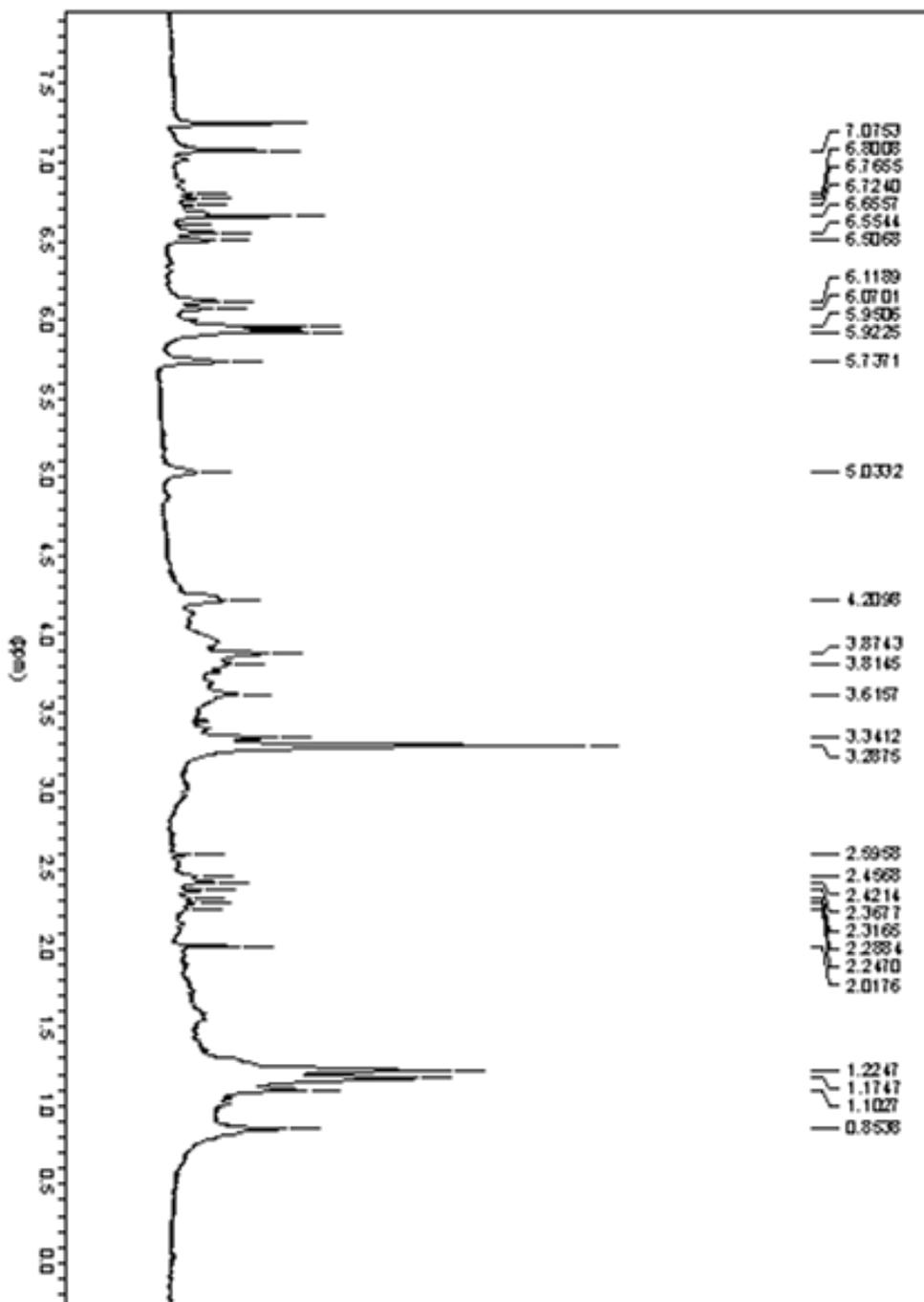
FIGURA 28 – SEGUNDA PROPOSTA DE ESTRUTURA PARA O COMPOSTO 5 A PARTIR DOS DESLOCAMENTOS OBTIDOS NO ESPECTRO

NOTA: Os valores dos sinais no espectro de RMN foram arredondados

O alcalóide acima apresentado (figura 28) é a eritrinina e já foi isolado de várias espécies de *Erythrina sp.*, exceto a *Erythrina velutina*. Para esta interpretação foi descartado o sinal 170,9 ppm.

4.4.4.2 Discussão do espectro de RMN de ^1H do composto 5

Os deslocamentos químicos dos hidrogênios para a proposta 1, assim como os dados dos espectros de RMN – ^{13}C e DEPT desta proposta estão sob análise. Os dados da eritrinina (figura 29) como deslocamentos de hidrogênio em ppm, constante de acoplamento (J) em Hertz e a multiplicidade dos sinais segundo AMER; SHAMMA, FREYER (1991, p. 337) são apresentados como proposta de estrutura 2.



IO,

em CDCl₃)

4.5 RESULTADOS COM A FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE

4.5.1 Características do composto 6

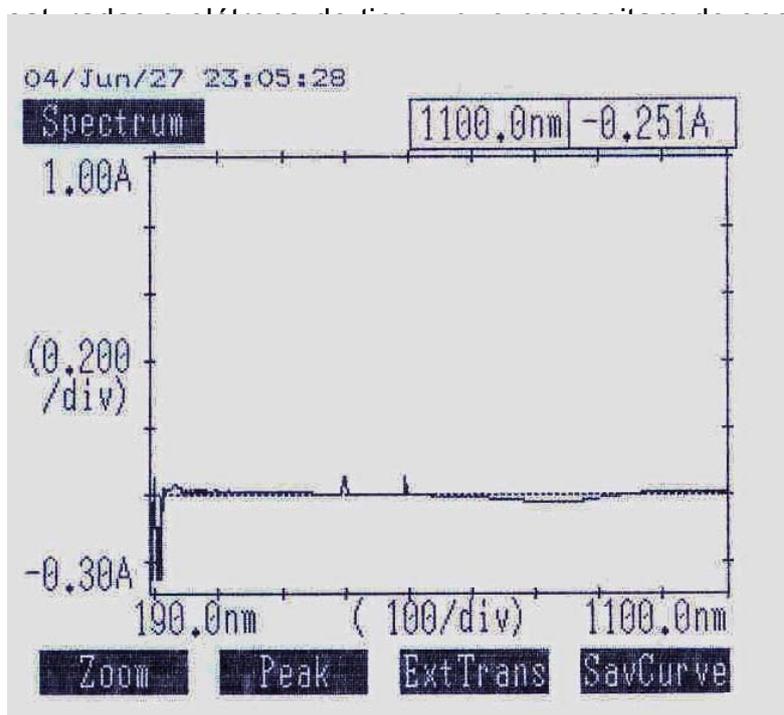
Após a filtração a substância perdeu a forma de cristalização original, semelhante a drusas, estabilizando-se como um pó branco cristalino amorfo, solúvel

em água destilada e muito pouco solúvel em etanol, é insolúvel nos demais solventes.

O rendimento foi de 62 mg. Não há visualização do composto sob luz ultravioleta e a melhor revelação é conseguida com ninhidrina dentre ácido 5-fosfomolibdico a 5% e solução saturada de sulfato cérico.

4.5.2 Espectroscopia no Ultravioleta do Composto 6

Conforme pode ser observado no espectro (figura 31), o composto não demonstrou absorbância significativa, ou seja, não possui cromóforos na região do ultravioleta próximo ou de quartzo, podendo ser um composto somente com ligações



energia muito alta para transição,

eteroátomo do tipo nitrogênio, por energia de transição, mas (ERSTEIN, 1994, p.268).

DO COMPOSTO 6

25 Aug 2004

File Name	C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\USUARIO\MENS DOCUMENTOS\IR\S\GRADUAÇÃO\SUZANED1AFHAR01.SPC
Date Stamp	07/08/2004 12:21:00
Date	25 Aug 2004 19:19:48
Technique	Infrared
Instrument	Bio-Rad
Spectral Region	NIR-IR
X Axis	Wavenumber (cm-1)
Y Axis	% Transmittance
Spectrum Range	399.2639 - 7501.1477
Points Count	3683
Data Spacing	1.9288

Partindo-se da premissa de que C6 não possui cromóforos, a interpretação do espectro de infravermelho (figura 32) conforme dados de SILVERSTEIN; BASSLER e MORRIL (1994, p. 94 – 119) sugere que a banda em $3278,98\text{ cm}^{-1}$ seja referente

a deformação axial de O – H em ligação de hidrogênio intermolecular (bandas em $3550 - 3200\text{ cm}^{-1}$), entre $3000 - 2840\text{ cm}^{-1}$ encontram-se as bandas de deformação axial de C – H nos alcanos e ciclo-alcanos em anéis de baixa tensão sendo que a deformação axial assimétrica de grupamentos metileno ($\nu_{as}\text{ CH}_2$) aparece como duas bandas, em 2926 e 2863 cm^{-1} ou variando em até 10 cm^{-1} em alcanos cíclicos sem tensão, estes dados podem corresponder as bandas em $2935,65\text{ cm}^{-1}$ e 2872 cm^{-1} do espectro.

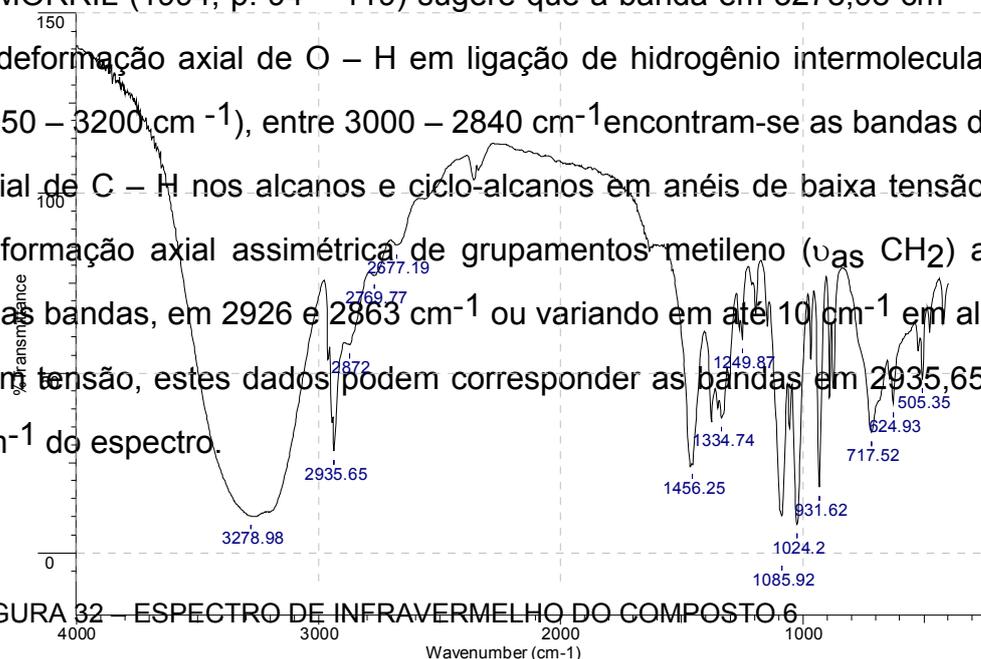


FIGURA 32 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 6

As bandas em 1085 cm^{-1} e 1024 cm^{-1} sugerem serem oriundas da deformação axial de C – O em álcoois e fenóis, que produzem bandas fortes entre 1260 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} , deve-se considerar também que as vibrações de

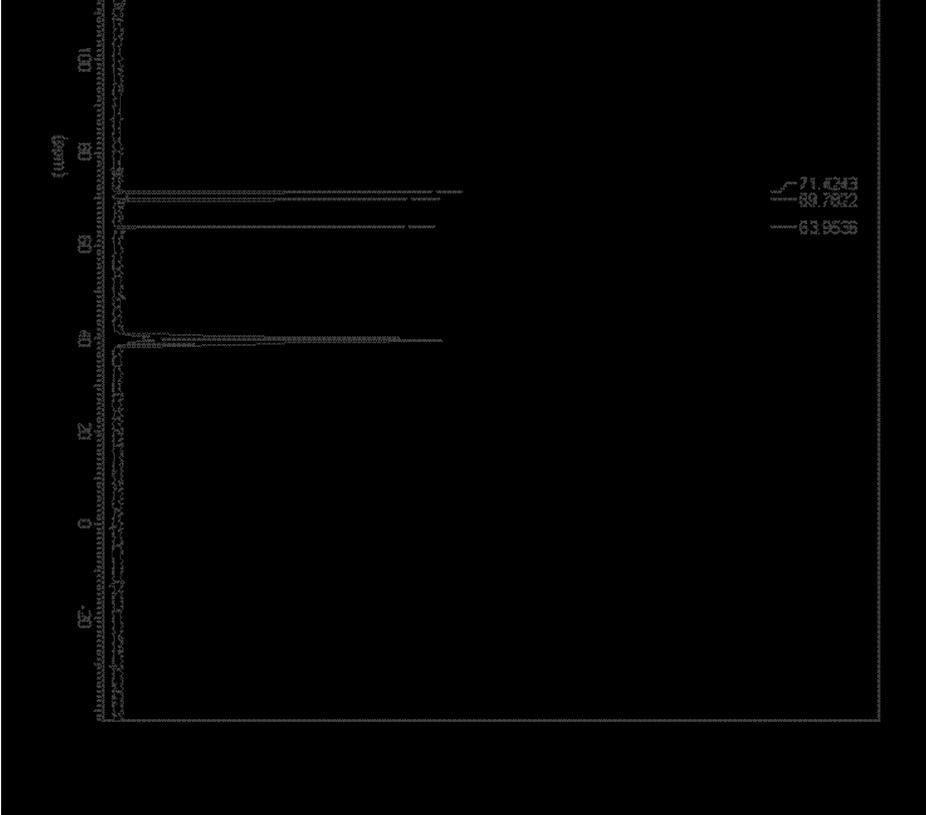
deformação axial do conjunto C – O – C em éteres alifáticos produz banda intensa na região de 1150 a 1085 cm⁻¹.

As demais bandas presentes no espectro são de interpretação duvidosa na ausência de dados provenientes de outras análises espectrométricas.

4 Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear de Carbono do Composto 6

O espectro demonstra a presença de sinais da amostra nos deslocamentos em 71,4 ppm, 69,7 e 63,9 ppm. Estes valores e as intensidades equivalentes sugerem uma estrutura simétrica. Deslocamentos de 71,3 ppm, 70,9 e 65,9 ppm são descritos para a molécula de frutose (PRETSCH; BÜHLMANN e AFFOLTER, 2000, 4.13.2) e deslocamentos semelhantes são descritos para moléculas de açúcar monocíclico como o galactitol – ducitol.

A partir destas considerações, análises confirmatórias serão efetuadas visando a identificação desta substância. É válido ressaltar que C6 pode ser eleito como um dos compostos de referência em análises de controle de qualidade da *Erythrina velutina*, pois teve rendimento satisfatório, sua separação foi simples considerando a insolubilidade em solventes orgânicos principalmente em metanol e obteve-se um composto relativamente isento de impurezas.



invert

C6

DMSO-d6

XCV

4.6 ATIVIDADE ALELOPÁTICA



FOTO: INFANTE VIEIRA, E.D., 2004.

4.6.1 Extrato Bruto

4.6.1.1 Germinação

Conforme os dados expressos (tabela 11), observa-se que o EB não inibiu a germinação das sementes de *Lactuca sativa*. A germinação para todas as amostras foi próxima a 100% (cem por cento).

TABELA 10 – GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *L. sativa* DURANTE 6 DIAS - EXTRATO BRUTO

AMOSTRA	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA	6º DIA	TOTAL
0,6 mg	1/0/0/0	8/9/8/8	0/0/1/1	1/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	37
0,4 mg	0/0/0/0	10/10/9/9	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	38
0,3 mg	5/6/1/3	3/4/8/6	1/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	37
0,2 mg	5/1/1/1	5/9/8/8	0/0/0/0	0/0/1/0	0/0/0/0	0/0/0/0	39
0,1 mg	1/1/0/0	9/9/9/9	0/0/0/0	0/0/1/0	0/0/0/0	0/0/0/1	40
0,05 mg	3/4/6/4	5/6/3/6	1/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	1/0/0/0	40
0,025 mg	1/4/4/7	8/6/4/1	0/0/0/0	0/0/1/0	0/0/0/0	1/0/1/0	38
CA	7/7/8/6	3/3/2/3	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	39
CE	1/0/0/0	8/8/8/8	0/1/1/0	1/0/0/0	0/0/1/1	0/1/0/0	39
Temperatura	21° C	20° C	21° C	21° C	20° C	20° C	

NOTA: A contagem de sementes germinadas está disposta por quadrantes para cada dia.

4.6.1.2 Crescimento

O P-valor menor que 0,05 ($\alpha=5\%$ de significância) indica que existe pelo menos um tratamento diferente (tabela 11). Conforme o teste de Scott & Knott ($\alpha = 5\%$ de significância) para o crescimento da radícula (tabela 12) podemos observar que os tratamentos 11, 12, 13 e 14 (0,6 mg), 41, 42, 43 e 44 (0,2 mg) e também 21, 54 e 64 tiveram crescimento de radícula menor e foram estatisticamente diferentes dos demais, inclusive dos tratamentos representados pelos controles com água e etanol. Isto indica que o extrato bruto de *Erythrina velutina* diminui o crescimento normal da radícula das sementes de *L. sativa* e pode ter potencial alelopático, podendo ser utilizado na menor concentração ativa. Como relatado anteriormente, somente será considerado efetivo o tratamento quando todas as repetições estiverem no grupo de menor média de crescimento.

TABELA 11 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO TESTE DE ALELOPATIA COM O EXTRATO BRUTO PARA A VARIÁVEL RADÍCULA A 5% DE SIGNIFICÂNCIA

FV	GL	F	P-valor
Tratamento		35	3,134
Erro		323	0,0000
Total corrigido		358	
CV (%) =		35,45	
Média Geral:		2,9986072	

TABELA 12 – TESTE DE SCOTT & KNOTT PARA O CRESCIMENTO DA RADÍCULA DA SEMENTE DE *L. sativa* – EXTRATO BRUTO

Tratamento	Média	Resultado	Tratamento	Média	Resultado	Tratamento	Média	Resultado
12	1,530000	a	23	2,870000	b	63	3,350000	b
11	1,940000	a	31	2,900000	b	51	3,360000	b
41	2,160000	a	61	2,930000	b	94	3,366667	b
42	2,210000	a	72	3,070000	b	73	3,380000	b
54	2,280000	a	52	3,080000	b	22	3,400000	b
14	2,280000	a	32	3,120000	b	24	3,540000	b
44	2,340000	a	33	3,170000	b	91	3,570000	b
64	2,350000	a	83	3,170000	b	92	3,670000	b
43	2,350000	a	52	3,190000	b	71	3,840000	b
21	2,620000	a	62	3,190000	b	93	3,860000	b
13	2,700000	a	84	3,230000	b	83	3,900000	b
74	2,860000	b	34	3,260000	b	81	3,950000	b

NOTA: As letras na coluna Resultados indicam quais Tratamentos foram iguais entre si.

As análises para o hipocótilo submetido ao extrato bruto estão descritas a seguir (tabelas 13 e 14).

TABELA 13 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DOTESTE DE ALELOPATIA COM O EXTRATO BRUTO PARA A VARIÁVEL HIPOCÓTILO A 5% DE SIGNIFICÂNCIA

FV	GL	F	P-valor
Tratamento		35	3,5555
Erro		323	0,0000
Total corrigido		358	
CV (%) =		34,03	
Média Geral:		2,1699164	

Considerando que o p-valor foi menor que 0,05 ($\alpha=5\%$ de significância) existe pelo menos um tratamento diferente.

Conforme teste de Scott & Knott ($\alpha = 5\%$ de significância) para o crescimento do hipocótilo (tabela 14), podemos observar que os tratamentos 11, 12, 13 e 14 (0,6 mg), 61, 62, 63 e 64 (0,05 mg) e também 21, 51, 53 e 54 foram os mais eficientes na diminuição do crescimento do hipocótilo e estatisticamente diferentes dos demais,

inclusive dos tratamentos representados pelos controles com água e etanol. É interessante ressaltar que o hipocótilo foi sensível a uma concentração menor de EB em relação a radícula (0,05 mg) e possui, estatisticamente, a mesma atividade inibidora de crescimento do hipocótilo do que o grupo de maior concentração (0,6 mg). Supõe-se que para a escolha do tratamento após realizado o teste, vários fatores devam ser considerados podendo ser o custo um dos mais relevantes assim, cada vez que em um teste desse modelo houverem várias concentrações efetivas estatisticamente, sugere-se submeter as menores concentrações aos respectivos testes de campo.

TABELA 14 – TESTE DE SCOTT & KNOTT PARA O CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DA SEMENTE DE *L. sativa* – EXTRATO BRUTO

Tratamento	Média	Resultado	Tratamento	Média	Resultado	Tratamento	Média	Resultado
54	1,180000	a	62	2,040000	a	73	2,340000	b
14	1,500000	a	74	2,110000	b	82	2,360000	b
12	1,580000	a	52	2,110000	b	83	2,470000	b
64	1,620000	a	43	2,110000	b	41	2,540000	b
53	1,630000	a	24	2,150000	b	94	2,555556	b
11	1,650000	a	42	2,190000	b	71	2,560000	b
13	1,680000	a	22	2,190000	b	32	2,620000	b
51	1,720000	a	34	2,250000	b	82	2,750000	b
21	1,730000	a	44	2,260000	b	93	2,850000	b
23	1,790000	a	84	2,290000	b	91	2,860000	b
61	1,980000	a	31	2,290000	b	81	2,880000	b
63	2,010000	a	33	2,400000	b	92	2,970000	b

NOTA: As letras na coluna Resultados indicam quais Tratamentos foram iguais entre si.

4.6.2 Fração Hexano

4.6.2.1 Germinação

A germinação diária após o ensaio com a Fração Hexano está na tabela 15.

TABELA 15 – GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *L. sativa* DURANTE 6 DIAS – FRAÇÃO HEXANO

AMOSTRA	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA	6º DIA	TOTAL
0,6 mg	0/0/0/0	7/8/7/6	2/1/1/2	1/1/1/1	0/0/0/1	0/0/0/0	39
0,4 mg	0/0/0/0	8/8/6/6	0/1/1/2	1/0/2/2	1/1/1/0	0/0/0/0	40
0,3 mg	0/0/0/0	8/6/8/8	2/2/1/0	0/2/0/1	0/0/1/0	0/0/0/0	39
0,2 mg	0/0/0/0	7/10/8/8	3/0/0/1	0/0/1/0	0/0/0/0	0/0/0/0	38
0,1 mg	0/0/0/0	5/4/6/5	3/3/3/1	2/1/0/2	0/1/1/1	0/1/0/1	40
0,05 mg	0/0/0/0	8/9/9/8	2/1/1/1	0/0/0/0	0/0/0/1	0/0/0/0	40
0,025 mg	0/0/0/0	8/9/9/9	2/1/1/1	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	40
CA	0/0/0/0	8/8/6/8	2/2/3/2	0/0/1/0	0/0/0/0	0/0/0/0	40
CE	0/0/0/0	6/7/8/8	3/2/1/1	1/1/0/1	0/0/1/0	0/0/0/0	40
Temperatura	18° C	19° C	20° C	19° C	20° C	20° C	

NOTA: A contagem de sementes germinadas está disposta por quadrantes para cada dia.

A germinação total da fração hexano foi próxima a 100% o que demonstra que as substâncias nela contidas não interferem neste processo. A avaliação sobre o crescimento das plântulas é apresentado a seguir.

4.6.2.2 Crescimento

As mesmas análises estatísticas foram empregadas para este ensaio, ANOVA e o teste de comparação de médias de Scott & Knott, realizado devido ao fato do P-valor da ANOVA ser menor que 0,05 ($\alpha = 5\%$), tabela 16. Os dados obtidos para o crescimento da radícula e hipocótilo de sementes de *L. sativa* submetidas a fração hexano estão dispostos abaixo (tabelas 16, 17, 18 e 19).

TABELA 16 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO TESTE DE ALELOPATIA COM A FRAÇÃO HEXANO PARA A VARIÁVEL RADÍCULA A 5% DE SIGNIFICÂNCIA

V	GL	F	P-valor
Tratamento	35	2,567	0,0000
Erro	324		
Total corrigido	359		
CV (%) =	37,25		
Média Geral:	0,9961111		

TABELA 17 – TESTE DE SCOTT & KNOTT PARA O CRESCIMENTO DA RADÍCULA DA SEMENTE DE *L. sativa* – FRAÇÃO HEXANO

Tratamento	Média	Resultado	Tratamento	Média	Resultado	Tratamento	Média	Resultado
73	0,550000	a	43	0,930000	a	14	1,070000	b
11	0,590000	a	51	0,930000	a	31	1,090000	b
94	0,760000	a	64	0,970000	b	44	1,090000	b
32	0,780000	a	23	1,000000	b	61	1,100000	b
21	0,790000	a	81	1,000000	b	41	1,100000	b
74	0,800000	a	52	1,000000	b	83	1,120000	b
54	0,830000	a	42	1,000000	b	34	1,190000	b
92	0,860000	a	13	1,010000	b	72	1,190000	b
12	0,870000	a	63	1,040000	b	24	1,270000	b
53	0,880000	a	82	1,040000	b	84	1,330000	b
71	0,910000	a	62	1,060000	b	91	1,340000	b
22	0,930000	a	33	1,070000	b	93	1,370000	b

NOTA: As letras na coluna Resultados indicam quais Tratamentos foram iguais entre si.

Os tratamentos com menor crescimento foram 11, 12, 21, 22, 32, 43, 51, 53, 54, 71, 73, 74, 92, 94. Nenhum tratamento teve todas as repetições dentro do grupo de menor média, portanto a fração hexano não foi efetiva na diminuição do crescimento da radícula de *L. sativa*, fato diferente do ocorrido para o hipocótilo.

A análise de variância para o hipocótilo submetido a FHEX (tabela 18) e o P-valor de 0,0206, menor que 0,05 estabelecido para o nível de significância permitiu realizar o teste de comparação de médias de Scott & Knott (tabela 19).

TABELA 18 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DOTESTE DE ALELOPATIA COM A FRAÇÃO HEXANO PARA A VARIÁVEL HIPOCÓTILO A 5% DE SIGNIFICÂNCIA

FV	GL	F	P-valor
Tratamento	35	1,596	0.0206
Erro	324		
Total corrigido	359		
CV (%) =	76,44		
Média Geral:	1,3058333		

TABELA 19 – TESTE DE SCOTT & KNOTT PARA O CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DA
SEMENTE DE *L. sativa* – FRAÇÃO HEXANO

Tratamento	Média	Resultado	Tratamento	Média	Resultado	Tratamento	Média	Resultado
73	0,760000	a	74	1,100000	a	92	1,400000	a
11	0,790000	a	32	1,160000	a	71	1,530000	b
21	0,920000	a	31	1,160000	a	84	1,550000	b
54	0,920000	a	81	1,170000	a	91	1,560000	b
51	0,940000	a	23	1,170000	a	72	1,570000	b
12	0,950000	a	34	1,180000	a	63	1,660000	b
43	0,950000	a	14	1,200000	a	62	1,710000	b
52	0,960000	a	24	1,220000	a	93	1,760000	b
41	0,970000	a	44	1,230000	a	64	1,800000	b
82	1,020000	a	13	1,260000	a	94	1,990000	b
22	1,020000	a	83	1,290000	a	53	2,150000	b
42	1,070000	a	33	1,380000	a	61	2,540000	b

NOTA: As letras na coluna Resultados indicam quais Tratamentos foram iguais entre si.

Os tratamentos 11, 12, 13 e 14 (0,6 mg), 21, 22, 23 e 24 (0,4 mg), 31, 32, 33 e 34 (0,3mg), 41, 42, 43 e 44 (0,2 mg) e 51, 52, 54, 73, 74, 81, 82, 83 e 92 foram os mais eficientes na diminuição do crescimento do hipocótilo (tabela 19). A FHEX demonstrou maior atividade considerável neste caso em relação a radícula. Mesmo na concentração de 0,2 mg a FHEX pode gerar uma planta (da espécie testada) com baixas possibilidades de pleno desenvolvimento de suas funções.

4.6.3 Fração Diclorometano

4.6.3.1 Germinação

Em função dos dados (tabela 20) nota-se que a fração diclorometano não inibiu a germinação, sendo que esta foi próxima do total esperado. A FDMT é rica em alcalóides, estas substâncias como visto no item 2.2.1 são reconhecidamente agentes alelopáticos, mas é possível notar que, ao menos preliminarmente, os

alcalóides da *Erythrina velutina* não exibiram nenhuma alteração em relação aos controles CA e CE para a germinação.

TABELA 20 – GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *Lactuca sativa* DURANTE 6 DIAS PARA A FRAÇÃO DICLOROMETANO

AMOSTRA	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA	6º DIA	TOTAL
0,6 mg	5/6/6/3	4/3/4/6	0/0/0/0	1/0/0/0	0/1/0/0	0/0/0/1	40
0,4 mg	8/5/4/6	2/5/5/3	0/0/1/0	0/0/0/0	0/0/0/1	0/0/0/0	40
0,3 mg	5/4/5/4	5/4/4/6	0/1/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	38
0,2 mg	3/4/1/3	6/5/7/7	0/1/0/0	0/0/1/0	1/0/0/0	0/0/1/0	40
0,1 mg	4/7/6/5	6/2/3/5	0/0/1/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	39
0,05 mg	5/4/2/2	5/5/5/6	0/1/2/0	0/0/0/1	0/0/1/1	0/0/0/0	40
0,025 mg	5/6/4/4	4/4/6/5	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	1/0/0/0	39
CA	9/8/8/7	0/2/0/2	0/0/2/0	1/0/0/1	0/0/0/0	0/0/0/0	40
CE	6/5/4/6	3/4/5/3	1/0/0/0	0/1/0/1	0/0/1/0	0/0/0/0	40
Temperatura	20° C	21° C	20° C	22° C	21° C	20° C	

NOTA: A contagem de sementes germinadas está disposta por quadrantes para cada dia.

4.6.3.2 Crescimento

TABELA 21 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO TESTE DE ALELOPATIA COM A FRAÇÃO DICLOROMETANO PARA A VARIÁVEL RADÍCULA A 5% DE SIGNIFICÂNCIA

FV	GL	F	P-valor
Tratamento		35	2,242
Erro		324	
Total corrigido		359	
CV (%) =		46,09	
Média Geral:		1,0725000	

O dado de P-valor (tabela 21) que permite avançar para o teste de comparação de médias de Scott & Knott (tabela 22), onde verifica-se que os tratamentos que demonstraram o menor crescimento foram 11, 12, 13 e 14 (0,6 mg), 21, 22, 31, 33, 34, 41, 42, 43 e 44 (0,2 mg), 54, 61, 62, 63, 71, 72, 73 e 74 (0,025 mg), 81, 82 e 94. A menor concentração (0,025 mg) já apresentou a propriedade alelopática de diminuição do crescimento da radícula, que pode gerar uma planta provavelmente inviável. Estes resultados podem estar relacionados à presença de pêlos radiculares na maioria das plântulas deste ensaio. A radícula apresenta pêlos radiculares desprovidos de cutícula e com citoplasma abundante responsáveis pelo

aumento de superfície e de absorção de água e nutrientes do meio na planta em formação (POTSCH, 1962, p. 53). Com o envelhecimento da raiz os pêlos caem e são substituídos pelas raízes secundárias e terciárias (FERRI, 1986, p.19).

TABELA 22 – TESTE DE SCOTT & KNOTT PARA O CRESCIMENTO DA RADÍCULA DA SEMENTE DE *L. sativa* – FRAÇÃO DICLOROMETANO

Tratamento	Média	Resultado	Tratamento	Média	Resultado	Tratamento	Média	Resultado
42	0,620000	a	63	0,950000	a	92	1,150000	b
74	0,740000	a	73	0,960000	a	51	1,190000	b
71	0,810000	a	12	0,970000	a	52	1,210000	b
62	0,820000	a	11	1,000000	a	91	1,220000	b
43	0,850000	a	13	1,010000	a	23	1,280000	b
31	0,540000	a	21	1,020000	a	24	1,300000	b
54	0,540000	a	44	1,020000	a	54	1,360000	b
61	0,880000	a	22	1,040000	a	84	1,390000	b
41	0,910000	a	33	1,060000	a	32	1,420000	b
14	0,920000	a	94	1,070000	a	83	1,530000	b
82	0,920000	a	81	1,100000	a	93	1,540000	b
72	0,930000	a	34	1,120000	a	53	1,570000	b

NOTA: As letras na coluna Resultados indicam quais Tratamentos foram iguais entre si.

TABELA 23 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO TESTE DE ALELOPATIA COM A FRAÇÃO DICLOROMETANO PARA A VARIÁVEL HIPOCÓTILO A 5% DE SIGNIFICÂNCIA

FV	GL	Fc	P-valor
Tratamento	35	1,302	0,1245
Erro	324		
Total corrigido	359		
CV (%) =	53,76		
Média Geral:	1,3675000		

O P-valor para este teste foi de 0,1245 (12,45%) e ultrapassa o valor de $\alpha = 5\%$ de significância (0,05). Então se a hipótese de que existe pelo menos um tratamento diferente (H1) for aceita, haverá um erro porque o P-valor é maior que o α e, paralelamente, o *F* deste teste é menor que o *F_c*. Quando os valores de *F* são próximos a um, neste caso foi de 1,302 (tabela 23), presume-se que os tratamentos não serão diferentes estatisticamente. O teste de Scott & Knott foi realizado, mas não exposto, porque como esperado todas as médias foram iguais estatisticamente. Na prática isto demonstra que a fração diclorometano não interferiu no crescimento do hipocótilo, pois apresentou resultado estatisticamente igual ao controle com água

e controle com etanol. O resultado discrepante entre radícula e hipocótilo pode ser oriundo da presença dos pêlos radiculares na maioria das plântulas neste ensaio.

4.6.4 Fração Acetato de Etila

4.6.4.1 Germinação

TABELA 24 – GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *L. sativa* DURANTE 6 DIAS PARA A FRAÇÃO ACETATO DE ETILA

AMOSTRA	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA	6º DIA	TOTAL
0,6 mg	2/0/3/2	6/9/5/8	0/1/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	36
0,4 mg	2/1/1/0	8/9/8/9	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/1/0	39
0,3 mg	3/3/2/3	6/7/8/7	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	39
0,2 mg	2/2/1/4	8/7/9/6	0/0/0/0	0/0/0/0	0/1/0/0	0/0/0/0	40
0,1 mg	3/2/2/2	7/7/8/8	0/0/0/0	0/0/0/0	0/1/0/0	0/0/0/0	40
0,05 mg	2/1/1/1	8/7/9/9	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/2/0/0	40
0,025 mg	3/1/0/1	6/8/9/8	0/0/1/0	0/0/0/0	1/1/0/0	0/0/0/0	39
CA	6/2/2/3	4/7/8/7	0/0/0/0	0/0/0/0	0/1/0/0	0/0/0/0	40
CE	3/3/2/2	6/7/8/8	0/0/0/0	0/0/0/0	1/0/0/0	0/0/0/0	40
Temperatura	20° C	20° C	20° C	21° C	22° C	22° C	

NOTA: A contagem de sementes germinadas está disposta por quadrantes para cada dia.

A fração acetato de etila a 0,6 mg apresentou uma discreta inibição da germinação das sementes de *Lactuca sativa*, (tabela 24), mas este resultado não chega a ser considerado relevante.

4.6.4.2 Crescimento

TABELA 25 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO TESTE DE ALELOPATIA COM A FRAÇÃO ACETATO DE ETILA PARA A VARIÁVEL RADÍCULA A 5% DE SIGNIFICÂNCIA

FV	GL	F	P-valor
Tratamento		35	2,301
Erro		324	0,0001
Total corrigido		359	
CV (%) =		47,97	
Média Geral:		0,943333	

A partir do dado de P-valor (tabela 25) partiu-se para o teste de comparação de médias (tabela 26).

TABELA 26 – TESTE DE SCOTT & KNOTT PARA O CRESCIMENTO DA RADÍCULA DA SEMENTE DE *Lactuca sativa* – FRAÇÃO ACETATO DE ETILA

Tratamento	Média	Resultado	Tratamento	Média	Resultado	Tratamento	Média	Resultado
62	0,620000	a	51	0,810000	a	81	1,030000	b
61	0,650000	a	63	0,820000	a	44	1,070000	b
82	0,670000	a	92	0,860000	a	33	1,120000	b
84	0,680000	a	24	0,880000	a	72	1,150000	b
64	0,690000	a	14	0,900000	a	73	1,150000	b
52	0,700000	a	83	0,900000	a	32	1,180000	b
21	0,730000	a	11	0,970000	b	74	1,200000	b
13	0,740000	a	12	0,970000	b	31	1,210000	b
43	0,740000	a	53	0,970000	b	22	1,260000	b
42	0,750000	a	23	0,980000	b	71	1,310000	b
41	0,760000	a	54	0,990000	b	91	1,340000	b
94	0,780000	a	34	1,010000	b	93	1,370000	b

NOTA: As letras na coluna Resultados indicam quais Tratamentos foram iguais entre si.

Os tratamentos 13, 14, 21, 24, 41, 42, 43, 51, 52, 61, 62, 63 e 64 (0,05 mg), 82, 83, 84, 92 e 94 foram os mais eficientes na diminuição do crescimento da radícula, sendo que o tratamento correspondente a 0,05 mg foi o único completamente efetivo. Para maior entendimento da ação da FATE sobre o crescimento das sementes de *Lactuca sativa* é necessário avaliar os resultados sobre o hipocótilo (tabelas 27 e 28).

TABELA 27 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO TESTE DE ALELOPATIA COM A FRAÇÃO ACETATO DE ETILA PARA A VARIÁVEL HIPOCÓTILO A 5% DE SIGNIFICÂNCIA

FV	GL	F	P-valor
Tratamento	35	1,822	0,0041
Erro	324		
Total corrigido	359		
CV (%) =	56,48		
Média Geral:	1,4386111		

O P-valor para a variável hipocótilo está próxima a 0,05, mas menor, sendo assim partiu-se para o teste de Scott & Knott (tabela 28).

TABELA 28 – TESTE DE SCOTT & KNOTT PARA O CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DA SEMENTE DE *Lactuca sativa* – FRAÇÃO ACETATO DE ETILA

Tratamento	Média	Resultado	Tratamento	Média	Resultado	Tratamento	Média	Resultado
84	0,680000	a	11	1,270000	a	23	1,660000	b
83	0,790000	a	92	1,400000	b	51	1,680000	b
82	0,900000	a	12	1,410000	b	41	1,720000	b
94	1,000000	a	42	1,410000	b	33	1,740000	b
61	1,050000	a	44	1,430000	b	93	1,760000	b
21	1,090000	a	81	1,440000	b	74	1,760000	b
14	1,090000	a	13	1,460000	b	31	1,830000	b
62	1,130000	a	72	1,510000	b	71	1,880000	b
63	1,130000	a	24	1,530000	b	53	1,900000	b
52	1,170000	a	34	1,530000	b	73	1,920000	b
64	1,170000	a	91	1,560000	b	54	1,960000	b
43	1,210000	a	22	1,640000	b	32	1,980000	b

NOTA: As letras na coluna Resultados indicam quais Tratamentos foram iguais entre si.

Os tratamentos 11,14, 21, 43, 52, 61, 62, 63 e 64 (0,05 mg), 82, 83, 84 e 94 foram os mais efetivos. A concentração de 0,05 mg também para o hipocótilo foi o único tratamento efetivo. A fração acetato de etila das cascas da *Erythrina velutina* contém flavonóides, segundo as análises apresentadas em tópicos anteriores. Estas substâncias assim como os alcalóides são responsáveis por atividades alelopáticas interessantes em várias espécies, fato que parece ser aplicável à FATE das cascas de *Erythrina velutina*, que mesmo em concentração relativamente baixa pode inviabilizar o crescimento normal da planta testada.

4.6.5 Fração Hidroalcoólica Remanescente

4.6.5.1 Germinação

A fração hidroalcoólica remanescente não inibiu a germinação (tabela 29).

TABELA 29 – GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *L. sativa* DURANTE 6 DIAS PARA A FRAÇÃO
 HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE

AMOSTRA	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA	6º DIA	TOTAL
0,6 mg	0/0/0/0	6/6/10/7	1/2/0/2	1/0/1/0	0/0/0/0	0/1/0/0	37
0,4 mg	0/0/0/0	5/5/8/8	2/4/1/0	1/0/0/2	1/0/0/0	1/0/1/0	39
0,3 mg	0/0/0/0	6/7/7/8	0/2/1/0	1/1/2/1	0/0/0/0	1/0/0/1	38
0,2 mg	0/0/0/0	6/7/8/7	3/2/0/3	1/0/1/0	0/0/0/0	0/0/0/0	38
0,1 mg	0/0/0/0	9/7/5/5	1/0/5/5	0/1/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	38
0,05 mg	0/0/0/0	9/8/9/9	0/2/1/1	0/0/0/0	1/0/0/0	0/0/0/0	40
0,025 mg	0/0/0/0	9/8/7/9	1/1/2/1	0/1/0/0	0/0/0/0	0/0/1/0	40
CA	0/0/0/0	8/8/6/8	2/2/3/2	0/0/1/0	0/0/0/0	0/0/0/0	40
CE	0/0/0/0	6/7/8/8	3/2/1/1	1/1/0/1	0/0/1/0	0/0/0/0	40
Temperatura	19° C	20° C	19° C	18° C	20° C	20° C	

NOTA: A contagem de sementes germinadas está disposta por quadrantes para cada dia.

4.6.5.2 Crescimento

O crescimento da radícula foi avaliado pelo teste de Scott & Knott (tabela 30) após a verificação de que existe pelo menos um tratamento diferente dos demais pela análise de variância (ANOVA), especificamente pelos valores de P-valor e *F* (tabela 31).

TABELA 30 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO TESTE DE ALELOPATIA COM A FRAÇÃO
 HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE PARA A VARIÁVEL RADÍCULA A 5% DE
 SIGNIFICÂNCIA

FV	GL	F	P-valor
Tratamento		35	2,793
Erro		324	
Total corrigido		359	
CV (%) =		35,21	
Média Geral:		0,9416667	

TABELA 31 - TESTE DE SCOTT & KNOTT PARA O CRESCIMENTO DA RADÍCULA DA
 SEMENTE DE *Lactuca sativa* - FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE

Tratamento	Média	Resultado	Tratamento	Média	Resultado	Tratamento	Média	Resultado
31	0,520000	a	51	0,860000	a	61	1,060000	b
12	0,540000	a	92	0,860000	a	53	1,090000	b
33	0,590000	a	22	0,870000	a	63	1,090000	b
24	0,620000	a	41	0,890000	a	62	1,090000	b
34	0,700000	a	14	0,920000	a	71	1,090000	b
23	0,720000	a	42	0,930000	a	83	1,120000	b
44	0,740000	a	13	0,930000	a	72	1,150000	b
11	0,770000	a	64	0,930000	a	74	1,280000	b
32	0,770000	a	21	0,940000	a	73	1,310000	b
94	0,780000	a	54	0,960000	a	84	1,330000	b
52	0,850000	a	81	1,000000	b	91	1,340000	b
43	0,850000	a	82	1,040000	b	93	1,370000	b

NOTA: As letras na coluna Resultados indicam quais Tratamentos foram iguais entre si.

Os tratamentos 11, 12, 13 e 14 (0,6 mg), 21, 22, 23 e 24 (0,4 mg), 31, 32, 33 e 34 (0,3 mg), 41, 42, 43 e 44 (0,2 mg), 51, 52, 54, 64, 92 e 94 foram os mais eficientes na diminuição do crescimento da radícula. A FHAR parece não apresentar problemas de solubilidade e a atividade das suas substâncias para este teste teve como limite inferior 0,2 mg.

TABELA 32 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO TESTE DE ALELOPATIA COM A FRAÇÃO
 HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE PARA A VARIÁVEL HIPOCÓTILO A 5% DE
 SIGNIFICÂNCIA

FV	GL	F	P-valor
Tratamento	35	4,162	0,0000
Erro	324		
Total corrigido	359		
CV (%) =	49,80		
Média Geral:	1,214444		

O P-valor é menor que o nível de significância estabelecido (0,05), tabela 32, e a partir deste dado pode se partir para o teste de comparação de médias estatisticamente diferentes, estes dados estão na tabela 34.

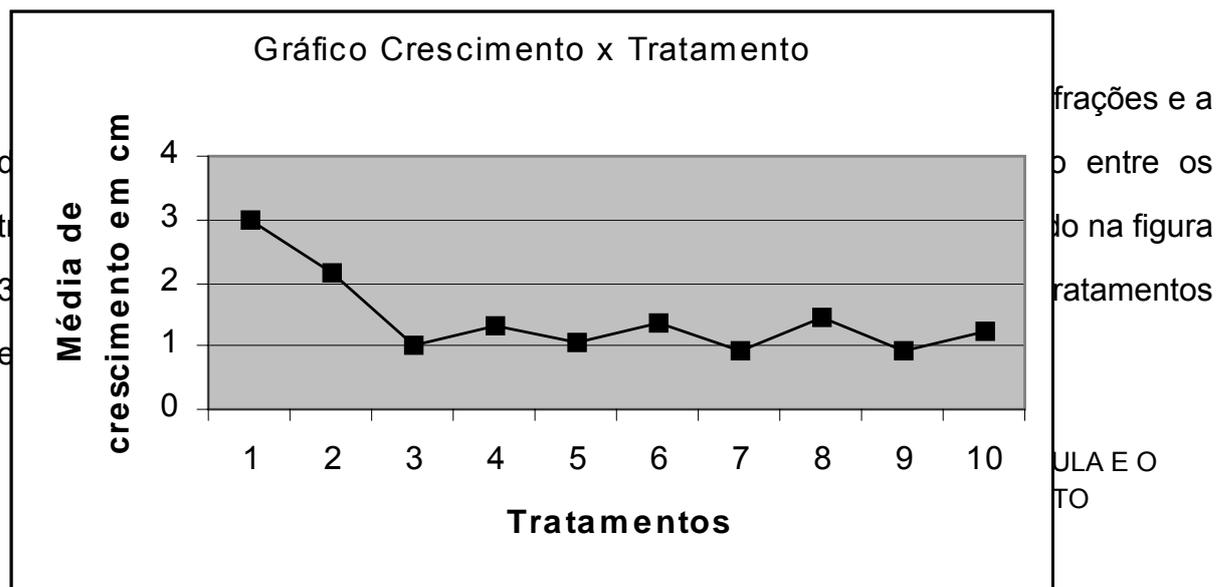
TABELA 33 – TESTE DE SCOTT & KNOTT PARA O CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DA SEMENTE DE *Lactuca sativa* - FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE

Tratamento	Média	Resultado	Tratamento	Média	Resultado	Tratamento	Média	Resultado
31	0,500000	a	94	1,000000	a	92	1,400000	b
12	0,680000	a	41	1,000000	a	84	1,550000	b
24	0,760000	a	82	1,020000	a	91	1,560000	b
33	0,800000	a	54	1,020000	a	72	1,590000	b
44	0,840000	a	42	1,030000	a	64	1,630000	b
51	0,890000	a	43	1,080000	a	71	1,680000	b
52	0,900000	a	14	1,080000	a	61	1,730000	b
23	0,910000	a	32	1,120000	a	74	1,730000	b
11	0,930000	a	21	1,130000	a	63	1,760000	b
53	0,950000	a	81	1,170000	a	93	1,760000	b
13	0,950000	a	83	1,290000	a	73	1,940000	b
34	0,970000	a	22	1,310000	a	62	2,060000	b

NOTA: As letras na coluna Resultados indicam quais Tratamentos foram iguais entre si.

Os tratamentos 11, 12, 13 e 14 (0,6 mg), 21, 22, 23, e 24 (0,4 mg), 31, 32, 33 e 34 (0,3 mg), 41, 42, 43 e 44 (0,2 mg), 51, 52, 53 e 54 (0,1 mg), 23, 81, 82, 83, 94 foram efetivos na diminuição do crescimento do hipocótilo. A FHAR foi eficiente na redução do crescimento normal das plântulas de *Lactuca sativa*, demonstrando potencial para inviabilizar plantas normais desta espécie.

Em todos os testes houveram algumas sementes com a morfologia alterada como tortuosidades do tipo enovelamento, ausência dos pêlos radiculares e ausência do primórdio foliar que originaria os folíolos. A fração hidroalcoólica remanescente apresentou a falta de primórdio foliar e pêlos radiculares em cerca de 60% das sementes para todas as diluições, um número expressivo comparando-se com as alterações esporádicas das outras frações e do extrato bruto e considerando-se os efeitos gerais, esta fração parece ter sido a mais eficiente.



LEGENDA: 1 = Média de crescimento da *radícula* com o Extrato Bruto; 2 = Média de crescimento do *hipocótilo* com o Extrato Bruto; 3 = Média de crescimento da *radícula* com a Fração Hexano; 4 = Média de crescimento do *hipocótilo* com a Fração Hexano; 5 = Média de crescimento da *radícula* com a Fração Diclorometano; 6 = Média de crescimento do *hipocótilo* com a Fração Diclorometano; 7 = Média de crescimento da *radícula* com a Fração Acetato de Etila; 8 = Média de crescimento do *hipocótilo* com a Fração Acetato de Etila; 9 = Média de crescimento da *radícula* com a Fração Hidroalcoólica Remanescente; 10 = Média de crescimento do *hipocótilo* com a Fração Hidroalcoólica Remanescente.

O extrato bruto teve o maior crescimento em média em relação às frações, o crescimento do hipocótilo pelo gráfico é notadamente menor em relação à radícula. Para as outras frações este resultado foi diferente, ou seja, o crescimento da

radícula foi menor que do hipocótilo em todos os casos. Considerando-se as frações somente para o crescimento da radícula ou somente para o crescimento do hipocótilo, não houve destaque.

4.7 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

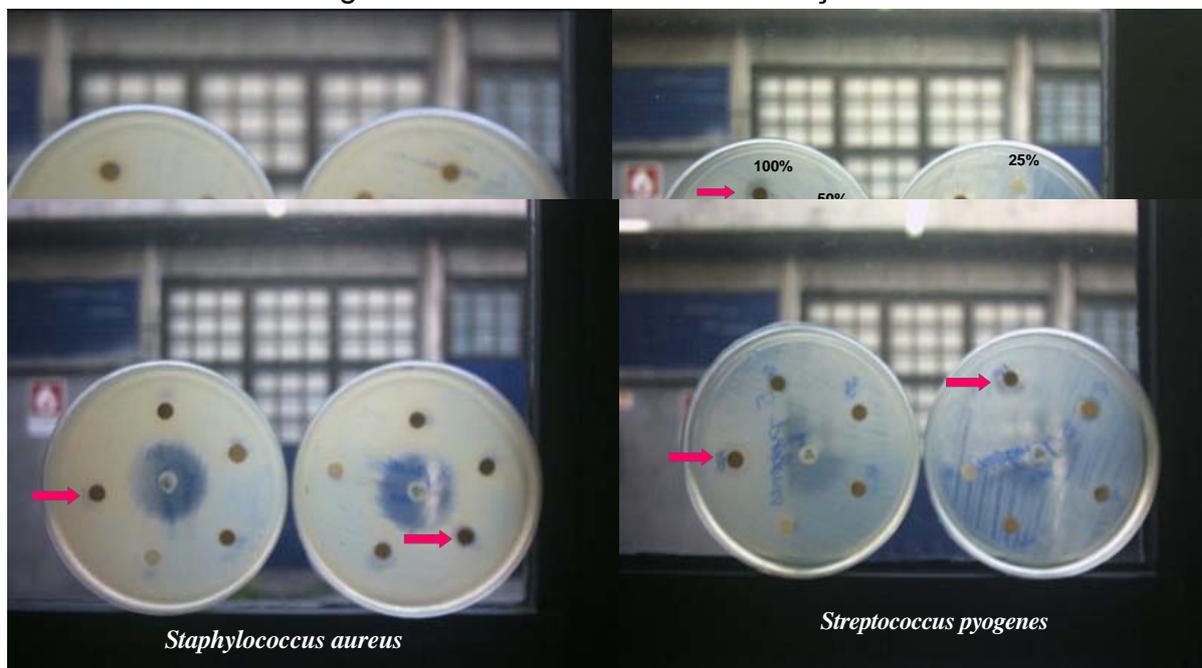
Os microrganismos para estes testes foram selecionados devido a capacidade de causarem diversas patologias que podem atingir gravidade considerável, alguns também representam riscos de infecções nosocomiais de difícil controle, e as culturas purificadas são de aquisição acessível. A partir dos resultados para os microrganismos escolhidos (tabela 34) pode-se traçar um direcionamento para análises futuras.

TABELA 34 – RESULTADOS DOS TESTES DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

<i>E. velutina</i>		DIFUSÃO EM ÁGAR – MÉDIA DO DIÂMETRO DOS HALOS DE INIBIÇÃO EM mm							
CONCENTRAÇÕES		MICRORGANISMOS							
		<i>Sa</i>	<i>Sp</i>	<i>Se</i>	<i>Pm</i>	<i>Pa</i>	<i>Kp</i>	<i>Ec</i>	<i>St</i>
EB	312,75 mg/mL (100,0%)	7	12	0	0	0	0	0	0
	156,37 mg/mL (50,0%)	0	9	0	0	0	0	0	0
	78,19 mg/mL (25,0%)	0	7	0	0	0	0	0	0
	39,10 mg/mL (12,5%)	0	0	0	0	0	0	0	0
FHEX	200 mg/mL (100,0%)	7	13	0	0	0	0	0	0
	100 mg/mL (50,0%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	50 mg/mL (25,0%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	25 mg/mL (12,5%)	0	0	0	0	0	0	0	0
Controle Cloranfenicol (30 µg/mL)		34	35	38	28	30	30	33	36
Controle Cefalotina (30 µg/mL)		50	45	40	11	0	26	0	29
Controle dos Microrganismos		+	+	+	+	+	+	+	+
Controle do etanol		0	0	0	0	0	0	0	0
		CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (mg/mL)							
EB		9,77 (1:16)	9,77 (1:16)	19,55 (1:8)	39,10 (1:4)	19,55 (1:8)	19,55 (1:8)	19,55 (1:8)	19,55 (1:8)

Legenda: EB = extrato bruto; FHEX = fração hexano; *S.a* = *Staphylococcus aureus*; *S.p* = *Streptococcus pyogenes*; *S.e* = *Staphylococcus epidermidis*; *P.m* = *Proteus mirabilis*; *P.a* = *Pseudomonas aeruginosa*; *K.p* = *Klebsiella pneumoniae*; *E.c* = *Escherichia coli*; *S.t* = *Salmonella typhimurium*; + = crescimento dos microrganismos no meio de cultura isento de droga.

Os resultados desta avaliação mostram atividade antibacteriana do EB e FHEX sobre *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*, nenhuma atividade sobre as outras bactérias testadas por difusão em ágar e atividade moderada a fraca contra todos os microrganismos no teste de concentração inibitória mínima – MIC



PARA O *S. aureus* E *S. pyogenes*
FOTO: DIAS, J.F.G., 2004.

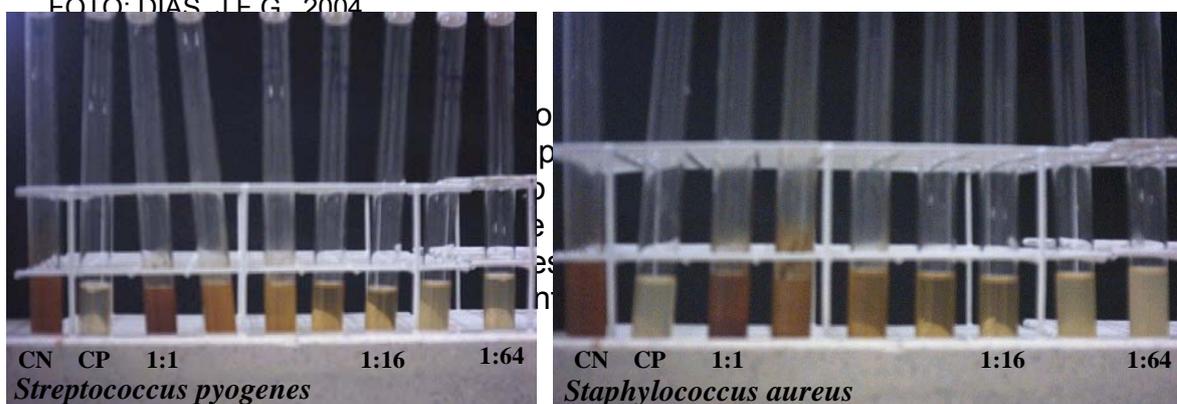


FIGURA 38 – RESULTADOS DO MIC PARA O EXTRATO BRUTO
FOTO: DIAS, J.F.G., 2004.

Segundo LENETTE et al. (1987, p. 1214 e 1215) os microrganismos foram suscetíveis aos antibióticos controle conforme os halos de inibição que apresentaram, mas houve resistência de dois microrganismos frente a cefalotina. A figura 39 mostra alguns exemplos. Considerando os resultados, o etanol presente

nas amostras demonstrou não influenciar os resultados da atividade antibacteriana

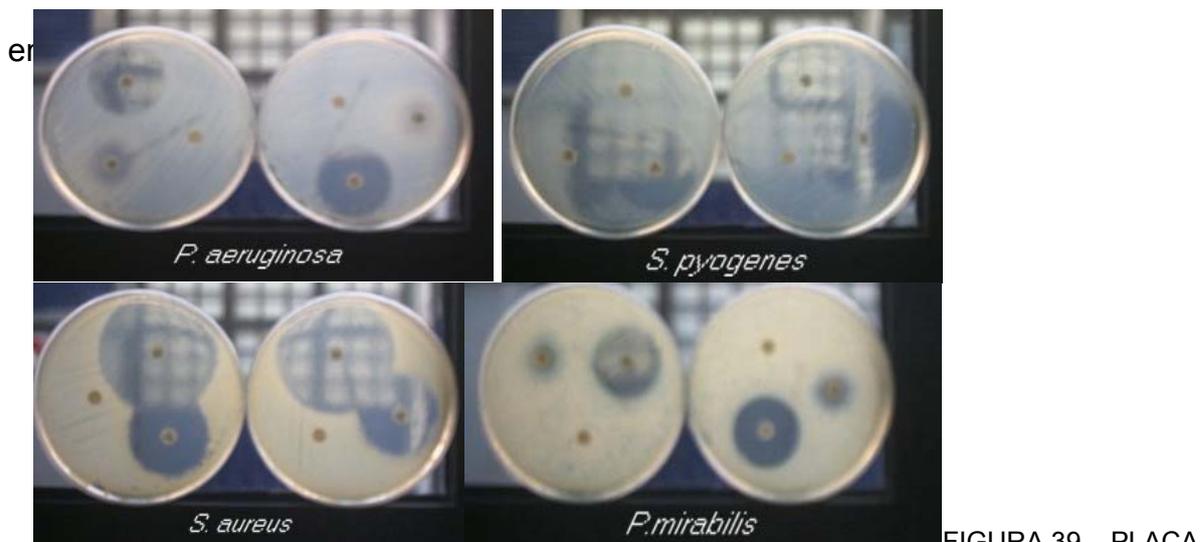


FIGURA 39 – PLACA
CONTROLE DO TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO PARA ALGUNS
MICROORGANISMOS

FOTO: DIAS, J.F.G., 2004.

Os esteróides e triterpenos comumente presentes nas plantas estão concentrados geralmente na fração mais apolar, neste caso a FHEX, e são conhecidos por diversas atividades de interesse biológico, dentre as quais a atividade antimicrobiana. Substâncias como o β -sitosterol, a α -amirina e lupeol demonstraram atividade contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (SINGH; SINGH, 2003, p. 814 - 816) e segundo JAIN, JAIN e SINGH (2003,

p. 231 - 233) a α -amirina (0,29%) demonstrou a maior atividade entre os triterpenos presentes na *Arnebia hispidissima* (Lehm.) DC. contra a *E. coli*.

O *Staphylococcus aureus* é conhecido por causar infecções como foliculite, celulite, carbúnculo, impetigo, osteomielite, bacteremia, endocardite, pneumonia e ocasionalmente a meningite, e o *Streptococcus pyogenes* é causador de faringoamidalites que podem originar a febre reumática e glomerulonefrite como complicações, piodermites, erisipela, pneumonias, febre puerperal, pericardites, peritonites e outras (TRABULSI et al., 1999).

5 CONCLUSÃO

Da fração hexano das cascas de *Erythrina velutina* Willd. foi isolado o composto 1 (C1) como uma mistura de estigmasterol e β -sitosterol, sendo que o estigmasterol está em maior proporção. O estigmasterol e o β -sitosterol ainda não haviam sido relatados para a *Erythrina velutina* conforme levantamento bibliográfico. Ambos são fitoesteróis relativamente comuns em plantas, principalmente nas sementes da família das leguminosas (EVANS, 1996, p. 299). Alguns estudos sugerem ao estigmasterol atividade anti-hepatotóxica, anti-inflamatória, antinociceptiva, preventivo de vários tipos de câncer, sedativo e hipocolesterolêmico (AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE, 2005), os fitoesteróis também têm sido comercializados livremente no intuito de aumentar a massa muscular de humanos.

A análise por cromatografia gasosa da fração hexano sugeriu a presença de ácido fênico, ácido cinâmico, α -amirina, estigmasterol, β -amirina, β -sitosterol e lupeol, compostos ainda não relatados para a *Erythrina velutina*.

Da fração diclorometano foram isolados quatro compostos. O composto 2 (C2) de acordo com comparação de dados obtidos na literatura sugere ser o alcalóide eritralina, já isolado em outras espécie de eritrinas. O composto 3 (C3) está sob análise até o momento visando a elucidação de sua estrutura. O composto 4 (C4) como uma mescla de alcalóides não totalmente identificados. O composto 5 (C5) com duas propostas para alcalóides de *Erythrina*, a (+) – 8 - oxo - 11 β - metoxieritralina ou a eritrinina.

Da fração hidroalcoólica remanescente foi isolado o composto 6 (C6) conforme o tipo de cristalização apresentado. Através das análises realizadas foi sugerida uma estrutura com esqueleto semelhante a frutose que pode ser considerado um composto interessante para análises de controle de qualidade.

A atividade alelopática com influência inibitória do crescimento da radícula e hipocótilo foi estatisticamente diferente dos controles com água e etanol para o hipocótilo tratado com a fração hexano, radícula tratada com a fração diclorometano e de ambos para o extrato bruto, fração acetato de etila e hidroalcoólica remanescente. Os resultados para a fração hexano e diclorometano, assim como das demais frações são suficientes para inviabilizar o pleno desenvolvimento de uma planta de *Lactuca sativa*. A fração hidroalcoólica remanescente alterou a morfologia de modo deletério de uma quantidade razoável de plântulas de *L. sativa* submetidas ao teste de crescimento, as alterações foram enovelamento, ausência do primórdio foliar e ausência de pêlos radiculares na maioria das plântulas, resultados não evidenciados para o extrato bruto e outras frações.

O bioensaio de inibição de germinação de sementes não apresentou resultados satisfatórios em relação aos extratos e frações analisadas.

O extrato bruto e a fração hexano demonstraram atividade antibacteriana moderada contra o *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* nos testes de difusão em disco e concentração inibitória mínima para o extrato bruto e difusão em disco para a fração hexano. Esses resultados colaboram na elucidação preliminar dos compostos envolvidos na atividade biológica testada e microorganismos suscetíveis, podendo futuramente direcionar os estudos realizados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ciência é uma rede intrincada de conhecimentos gerados, distribuídos e assimilados cada vez mais rapidamente nos dias de hoje, situação que corre paralela, mas talvez não tão velozmente aos problemas a serem resolvidos. Este fato nos leva a perceber que a pesquisa científica e ética tem sua importância intrínseca no contexto da busca de soluções ou ao menos seus indicadores. Os conhecimentos utilizados, gerados e combinados deste trabalho fazem parte desta rede e almeja-se que possam contribuir com seu crescimento.

O Brasil se destaca como fonte farta e promissora de espécies vegetais com potencial biológico inestimável, mas considerando que mesmo as espécies reconhecidas, e de longa data utilizadas pela população, carecem de informações fidedignas é conseqüente o raciocínio de quanto ainda falta ser elucidado. Neste sentido esta pesquisa fundamenta-se na busca de maiores conhecimentos acerca da *Erythrina velutina*, planta de larga distribuição na América do Sul principalmente no Brasil. O uso de substâncias provenientes do gênero *Erythrina* ou de seus extratos é de reconhecida aplicabilidade em várias áreas voltadas à saúde e bem-

estar geral. Apesar do uso freqüente das cascas de *E. velutina*, principalmente pela população do nordeste brasileiro para várias finalidades, ainda não existem informações de cunho científico suficientes para que esta ou seus derivados sejam aplicados em benefício da vida, fato lamentável considerando as potencialidades citadas ou percebidas no desenvolvimento deste trabalho, que favoreceriam consideravelmente a população.

As informações aqui obtidas poderão ainda contribuir com o direcionamento da busca racional de novas alternativas terapêuticas a partir de fontes naturais, pela indústria farmacêutica e de produtos químicos. A indústria farmacêutica nacional, principalmente de fitoterápicos, deveria ser prioritária na utilização e aplicação de informações científicas a partir de fontes vegetais brasileiras considerando a falta de apoio financeiro e a rigorosa legislação aplicada a este setor em relação ao registro de seus fitoterápicos. O rigor das exigências é necessário considerando-se a importância da aplicação e a possibilidade de ocorrência de fraudes, problemas de saúde contornáveis ou danos mais sérios aos usuários e deve servir como estímulo, e não entrave, à busca de informações.

Após o exame das informações relatadas percebe-se que alguns conhecimentos foram gerados, mas cada um atrelado a novos questionamentos que remetem à pesquisa mais aprofundada de alguns pontos como a ação farmacológica e toxicológica do extrato, frações, compostos isolados e a partir destes resultados a elaboração de uma forma farmacêutica eficiente e segura apta aos testes pré-clínicos e clínicos; a avaliação da atividade antibacteriana das frações não pesquisadas, dos compostos isolados e seus derivados com os mesmos e com outros microrganismos, levando-se em conta os resultados indicadores de potencial antibacteriano; de acordo com recomendações dispostas no manual "Good Agricultural Practices for Medicinal Plants" da Organização Mundial de Saúde (OMS)

sobre o cultivo de plantas com atividade medicinal deve-se evitar a ocorrência de poluição e o uso de agentes químicos devido ao risco toxicológico, este fato estimula e justifica os estudos de atividade alelopática; também o aprofundamento nas técnicas de separação e identificação dos compostos isolados, o isolamento e identificação das substâncias até o momento em estudo, visando elencar um marcador químico da espécie proporcionando à indústria farmacêutica a garantia e segurança na aquisição da matéria-prima, outros estudos relevantes ainda poderiam ser incluídos nestas considerações.

REFERÊNCIAS

ADEGAS, F.S.; VOLL, E.; PRETE, C.E.C. Embebição e germinação de sementes de picão preto (*Bidens pilosa*). **Planta Daninha**. V.21, n.1, p. 21 – 25, 2003.

AGRICULTURAL RESEARCH SERVICES. **Phytochemical and Ethnobotanical databases**. Disponível em: <<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/chemical.pl?STIGMASTEROL>> Acesso em 21 jan. 2005.

ALMEIDA, F.S. **A Alelopatia e as Plantas**. Londrina: Fundação Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR, 1988.

AMER, M. A.; EL-MASRY, S., SHAMMA, M.; FREYER, A. J. Three novel glycodienoid alkaloids from *Erythrina lysistemon*. **Journal of Natural Products**, v.54, n.1, p. 161 - 166, 1991.

AMER, M. A.; SHAMMA, M.; FREYER, A. J. The tetracyclic *Erythrina* alkaloids. **Journal of Natural Products**, v.54, n.2, p. 329-363, 1991.

ATINDEHOU, K.K.; QUEIROZ, E.F.; TERREAUX, C.; TRAORE, D.; HOSTETTMANN, K. Three new prenylated isoflavonoids from the root bark of *Erythrina vogelii*. **Planta Medica**, v.68, 181-183, 2002.

BARROS, G. G. et al. Pharmacological screening of some Brazilian plants. **Journal Pharmaceutical Pharmacology**, v.22, n.2, p. 116-122, 1970.

CARVALHO, J.L.S. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico do *Nasturtium officinale* R. BR., BRASSICACEAE**. Curitiba, 2001. 105 f. Dissertação

This document has been created with a DEMO version of PDF Create Convert
(http://www.equinox-software.com/products/pdf_create_convert.html)

To remove this message please register.

(Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

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

DA-CUNHA, E.V.L.; DIAS, C.; BARBOSA-FILHO, J.M.; GRAY, A.I. Eryvellutinone, an isoflavanone from the stem bark of *Erythrina vellutina*. **Phytochemistry**, v.43, n.6, p. 1371 – 1373, 1996.

DANTAS, M. C.; DE OLIVEIRA, F. S.; BANDEIRA, S. M.; BATISTA, J. S.; SILVA Jr., C. D.; ALVES, P. B.; ANTONIOLLI, A. R.; MARCHIORO, M. Central nervous system effects of the crude extract of *Erythrina velutina* on rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 129 – 133, 2004.

DE-EKNAMKUL, W.; POTDUANG, B. Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. **Phytochemistry**, v. 62, p. 389 – 398, 2003.

DECKER, M.W.; ANDERSON, D.J.; BRIONI, D.L.; DONELLY-ROBERTS, D.L.; CHAE, K.H.; O'NEILL, A.B.; PIATTONI-KAPLAN, M.; SWANSON, S.; SULLIVAN, J.P. Erysodine, a competitive antagonist at neuronal nicotinic acetylcholine receptors. **European Journal of Pharmacology**, v.280, p.79-89, 1995.

DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V.; CORTEZ, D.A.C.; SANCHES, N.R.; PESSINI, G.L.; HOLETZ, F.B. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.7, p.1027-1031, 2002.

DUFFUS, C. M.; DUFFUS, J. H. Introduction and overview. In: D'MELLO, J. P. F.; DUFFUS, C. M.; DUFFUS, J.H. (Ed.). **Toxic substances in crop plants**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1991. p. 1 - 20.

DYKE, S.F., QUESSY, S.N. *Erythrina* and related alkaloids. In: MANSKE, R.H.F., RODRIGO, R.G.A. (Ed.). **The Alkaloids – Chemistry and Physiology**. New York: Academic Press, 1981. p. 1 - 98.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Eritrinas**. Disponível em: <<http://www.cnpab.embrapa.br/servicos/leguminosas/eritrina.html>> Acesso em 21 jan. 2005.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS - EPAMIG. O Gênero *Erythrina* L. no PAMG - Herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. **Daphne**, Belo Horizonte, v.3, n.1, p. 20-25, 1993.

ENGLER, A. **Syllabus der Pflanzenfamilien**. 12 auf. Berlin Borntraeger, v.2, 1964.

This document has been created with a DEMO version of PDF Create Convert (http://www.equinox-software.com/products/pdf_create_convert.html)

To remove this message please register.

EVANS, W. C. **Trease and Evans' Pharmacognosy**. 14 ed., Great Britain: The Bath Press, 1996.

Farmacopéia Brasileira. 4 ed. Parte II, São Paulo, p. v.4.2.3, v. 4.2.4, 1988.

FERREIRA, D.F. **Sistema de análise de variância de dados balanceados**. Pacote computacional. DEX/UFLA: Lavras, 2000.

FERRI, M. G., **Botânica: morfologia externa das plantas (organografia)**. 15 ed., São Paulo: Nobel, 1986.

FORGO, P., KÖVÉR, K. L. Gradient enhanced selective experiments in the ^1H NMR chemical shift assignments of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol, a phytosterol derivative. **Steroids**, v. 69, p. 43 – 50, 2004.

GHOSAL, S.; DUTTA, S.K.; BHATTACHARYA, S.K. *Erythrina* - Chemical and pharmacological evaluation II: alkaloids of *Erythrina variegata* L. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.61, n.8, p. 1274-1277, 1972.

HOOKER, J. D.; JACKSON, B.D. **Index Kewensis: an enumeration of the genera and species of flowering plants**, Tomus I. London: Oxford University Press, 1960.

JAIN, S.C.; JAIN, R.; SINGH, B. Antimicrobial principles from *Arnebia hispidissima*. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 41, n.4, p. 231 – 233, 2003.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; DOWWEL JR, V. R.; SOMMERS, H. M. **Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido**. 2 ed. Medicina Panamericana Editora do Brasil Ltda : São Paulo, 1993.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

LENETTE, E. H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W. J.; SHADOMY, H. J. **Manual de microbiologia clínica**. 4. ed. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana, 1987.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Editora Plantarum, 1992.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2002.

MAJINDA, R. R. T., ABEGAZ, B. M., BEZABIH, M., NGADJUI, B. T., WANJALA, C. C. W., MDEE, L. K., BOJASE, G., SILAYO, A., MASEJANE, I., YEBOAH, S. O. Recent results from natural product research at the university of Botswana. **Pure Applied Chemistry**, v. 73, n. 7, p. 1197–1208, 2001.

MALHEIROS, A.; PERES, M.T.L.P. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (Ed.). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos Editora Universitária, 2001. p. 503 - 523.

MANTLE, P.G.; COLEMAN, M.J. Biosynthesis of radiolabelled alkaloids from ¹⁴C-tyrosine in *Erythrina crista-galli*. **Phytochemistry**, v.23, n.8, p.1617 – 1618, 1984.

MAURICE, M. **Hombres y plantas**. Plaza Y Janes, Barcelona: [s.n.], 1976.

MIGUEL, O.G. **Ensaio sistemático de análise fitoquímica**. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2003.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. 2ª ed. São Paulo: Robe Editorial, 2004.

MISSOURI BOTANIC GARDEN. **Plant science W³ tropicos**. Disponível em: <<http://www.mobot.mobot.org/>> Acesso em: 21 jan. 2005.

MORAES, S.M.D.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; SANTOS-DE-OLIVEIRA, R.; PINTO, V.P.T.; OLIVEIRA, J.T.A. Purification, physicochemical characterization and biological properties of a lectin from *Erythrina velutina* forma *aurantiaca* seeds. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.29, p. 977-985, 1996.

MOREIRA, E.A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna Farmacêutica**. Curitiba, v.47,n.1, p. 03-19,1979.

NAKANISHI, K. Recent studies on bioactive compounds from plants. **Journal of Natural Products**, v.45, n.1, p. 15-26, 1982.

NKENGFAK, A.E.; VOUFFO, T.W.; FOMUM, Z.T.; MEYER, M.; BERGENDORFF, O.; STERNER, O. Prenylated isoflavanone from the roots of *Erythrina sigmoidea*. **Phytochemistry**, v.36, n.4, p. 1047 – 1051, 1994.

NKENGFAK, A.E.; WAFFO, A.K.; AZEBAZE, G.A.; FOMUM, Z.T.; MEYER, M.; BODO, B.; HEERDEN, F.R. Indicanine A, a new 3-phenylcoumarin from root bark of *Erythrina indica*. **Journal of Natural Products**, v.63, n.6, p.855-856, 2000.

NORTON, G. Proteinase Inhibitors. In: D'MELLO, J. P. F.; DUFFUS, C. M.; DUFFUS, J.H. (Ed.). **Toxic substances in crop plants**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1991. p. 68 - 106.

ONUSIC, G. M.; NOGUEIRA, R. L.; PEREIRA, A. M. S.; VIANA M. B. Effect of acute treatment with a water-alcohol extract of *Erythrina mulungu* on anxiety-related responses in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 473 - 477, 2002.

POTSCH, W. **Botânica**. 8 ed., Rio de Janeiro: Fundação Alfredo Herculano Xavier Potech, 1962.

PRETSCH, E.; BÜHLMANN, P., AFFOLTER, C. **Structure determination of organic compounds: tables of spectral data**. Berlin: Springer – Verlag Berlin Heidelberg, 2000.

RABELO, L.A.; AGRA, M.F.; DA-CUNHA, E.V.L.; SILVA, M.S.; BARBOSA-FILHO, J.M. Homohesperetin and phaseollidin from *Erythrina velutina*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.29, n.5, p.543-544, 2001.

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

ROMEIRO, R. de S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: Ed. UFV, 2001.

SALINAS, M.H.R. **Famílias de dicotiledôneas venezuelanas II. Subclases Rosidae y Asteridae: evolution, filogenia, gêneros**. Mérida: [s.n.], 1992.

SCHVARTSMAN, S. **Plantas venenosas**. São Paulo: Sarvier, 1979.

SERRAGIOTTO, M. H.; LEITÃO FILHO, H.; MARSALOLI, A. Erystrine-*N*-oxide and erythartine-*N*-oxide, two novel alkaloids from *Erythrina mulungu*. **Canadian Journal of Chemistry**, v.59, n.18, p. 2771-2775, 1981.

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

SINGH, H.; CHAWLA, A. S.; KAPOOR, V.K.; KUMAR, N. Investigation of *Erythrina* spp. IX. Chemical constituents in *Erythrina stricta* bark. **Journal of Natural Products**, v.44, n.5, p.526-529, 1981.

SINGH,B.; SINGH,S. Antimicrobial activity of terpenoids from *Trichodesma amplexicaule* Roth. **Phytotherapy Research**. v. 17, n.7, p. 814 – 816, 2003.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre e Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS e Editora da UFSC, 2000.

SOTO-HERNANDEZ, M.; JACKSON, A.H. *Erythrina* alkaloids: isolation and characterisation of alkaloids from Seven *Erythrina* Species. **Planta Medica**, v.60, p. 175-177, 1994.

STAHL, E. **Thin layer chromatography: a laboratory handbook**. 2. ed., Berlin: Springer Verlag, 1969.

This document has been created with a DEMO version of PDF Create Convert
(http://www.equinox-software.com/products/pdf_create_convert.html)

To remove this message please register.

TANAKA, H.; ETOH, H.; SHIMIZU, H.; OH-UCHI, T.; TERADA, Y.; TATEISHI, Y. Erythrinan alkaloids and isoflavonoids from *Erythrina poeppigiana*. **Planta Medica**, v. 67, p. 871-873, 2001.

TELIKEPALLI, H.; GOLLAPUDI, S.R.; KESHAVARZ-SHOKRI, A.; VELAZQUEZ, L.; SANDAMANN, R.A.; VELIZ, E.A.; JAGANNADHA RAO, K.V.; MADHAVI, A.S.; MITSCHER, L.A. Isoflavonoids and a cinnamyl phenol from root extracts of *Erythrina variegata*. **Phytochemistry**, v.29, n.6, p. 2005-2007, 1990.

THONSON, W.A.R. **Las Plantas Medicinales**. Barcelona: Milanesada, 1981.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

VASCONCELOS, S.M.M.; REBOUÇAS OLIVEIRA, G.; MOHANA DE CARVALHO, M.; RODRIGUES, A.C.P.; ROCHA SILVEIRA, E.; MARIA FRANÇA FONTELES, M.; FLORENÇO SOUSA, F.C.; BARROS VIANA, G.S. Antinociceptive activities of the hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v.26, n.7, p. 946 -949, 2003.

VASCONCELOS, S.M.M.; MACEDO, D.S.; PAIVA MONTEIRO, A.; RODRIGUES, A.C.P.; SILVEIRA, E.R.; CUNHA, G.M.A; SOUSA, F.C.F.; VIANA, G.S.B. Central activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.56, n.3, p.389–393,2004.

VIEIRA,S.;HOFFMANN,R. **Estatística experimental**. São Paulo:Editora Atlas, 1989.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Drogenanalyse**. Berlin: Springer-Verlag Heidelberg, 1983.

WANJALA, C.C.W.; MAJINDA, R.R.T. Two novel glucodienoid alkaloids from *Erythrina latissima* seeds. **Journal of Natural Products**, v.63, n.6, p. 871-873, 2000.