

KÁSSIA MANTOVAN FARDIN

**Avaliação do potencial antifúngico e
antioxidante em *Avicennia schaueriana* Stapf &
Leech. e comparação do perfil químico em
diferentes locais de ocorrência**

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

SÃO PAULO

2014

KÁSSIA MANTOVAN FARDIN

**Avaliação do potencial antifúngico e
antioxidante em *Avicennia schaueriana* Stapf &
Leech. e comparação do perfil químico em
diferentes locais de ocorrência**

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

Orientadora: Dr^a. MARIA CLÁUDIA MARX YOUNG

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Fardin, Kássia Mantovan

F221a Avaliação do potencial antifúngico e antioxidante em *Avicennia schaueriana* Stapf & Leech. e comparação do perfil químico em diferentes locais de ocorrência / Kássia Mantovan Fardin -- São Paulo, 2014.

79 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2014

Bibliografia.

1. Acanthaceae. 2. Metabolismo secundário. 3. Naftoquinonas. I. Título

CDU: 582.955.2

*Aos meus amados pais, Paulo e Inêz, que tudo me ensinaram,
e sem os quais eu não teria chegado até onde cheguei,
dedico este trabalho.*

Agradecimentos

A realização de mais essa etapa em minha vida, não teria sido possível se não fosse a colaboração de inúmeras pessoas, seja na execução do trabalho em si, na contribuição com ideias, ou no apoio emocional, fundamental para a manutenção de meu bem estar e sanidade mental (risos)... Coisas que me fizeram, mais uma vez, aprender que nessa vida nada se conquista sozinho! Por isso, agradeço:

Primeiramente à Deus, por inserir em mim a força de vontade e a coragem de que precisei em inúmeros momentos... e à Natureza, por desde sempre, me encantar com sua exuberância excepcional a ponto de fazer com que me apaixonasse por ela e resolvesse me dedicar a trabalhar em seu serviço!

Agradeço também aos meus pais, Paulo e Inêz, responsáveis por plantarem em mim a sementinha da perseverança, e por terem me ensinado valores que me fazem seguir com ética e dedicação no meu trabalho, e mais do que isso, por terem me incentivado a ser tudo aquilo que sempre tive vontade de ser, acreditando no meu potencial, e me dando muito amor e carinho. Assim como quando me tornei bióloga, volto a dizer que vocês se formam “mestres” comigo!

À minha irmã Núbia, por sem querer, ter me inserido no mundo acadêmico, me mostrando que essa realidade não está tão distante de nós, sendo pra mim, um exemplo de determinação, e além disso, pelo carinho, apoio e inúmeras ajudas, até mesmo com a parte estatística! (risos) E ao meu querido irmão Vitor, simplesmente pelos beijinhos na testa, tão doces e espontâneos, em momentos que o que eu mais precisava era apenas de um carinho!

Não poderia deixar de agradecer especialmente ao Fernando, pelo amor, carinho, compreensão e companheirismo! Nando, você é peça chave em minha vida, e eu tenho certeza que sem a sua presença, tudo teria sido mais difícil! Obrigada por me ouvir, me acalmar, me incentivar e acreditar sempre em mim, obrigada por existir em minha vida e acrescentar mais “vida” em meus dias!

Se existem anjos na Terra, com certeza a maioria deles, senão todos, encontram-se encarnados em formas animais, e por isso também agradeço ao meu anjinho, Nico (Niquinho), o gatinho mais especial desse mundo, que com sua sensibilidade, trouxe conforto ao meu coração nos momentos mais difíceis!

E não poderia esquecer da minha querida orientadora, Dra. Maria Cláudia Marx Young, a “Dra. Claudíssima”... Agradeço não apenas pela orientação, mas também pelo carinho e confiança depositada em mim. Quero que saiba que te admiro muito, e tenho um carinho especial pela senhora... e por isso, te considero como um membro de minha família! Obrigada pelos ensinamentos!

Agradeço à Dra. Luce, por ter me socorrido, em inúmeros momentos em que percebi meu “desespero”! Obrigada por ser sempre tão prestativa! E obrigada também pela amizade, pelas caronas, pela companhia em “cafés científicos”, pelas risadas que me proporcionou, por ser uma companheira de quarto tão divertida naqueles dias do congresso, pela ajuda no HPLC, e esclarecimentos a respeito de técnicas como LCMSMS e LC-DAD!

Agradeço também ao querido amigo e “irmão” Pedro Ivo (meu toddynho – companheiro de aventuras, risos), por estar nessa jornada comigo desde a faculdade! Obrigada pela amizade, carinho, torcida, risadas... enfim, obrigada por fazer parte da minha vida e dividir comigo momentos importantes... “É nós”, Pedrinho, sempre! hahaha...

Às melhores amigas que alguém poderia ter: Manú, Juzinha, Daí, Fer, Glau, Van Fu e Marina. Suas lindinhas, obrigada por tudo! Desde a companhia no laboratório, até as risadas, desabafos, abraços coletivos, palavras de incentivo e carinho, tanto dentro como fora dele! A amizade de vocês foi um dos maiores presentes que ganhei em todo esse tempo de botânico.

Não posso deixar de mencionar os queridos Athos e Evandro, que se tornaram como irmãozinhos para mim, saibam que vocês também fazem parte do grupo de “melhores amigos que alguém poderia ter”, e também são “presentes” que ganhei por trabalhar no botânico.

Ao Rodrigo Cabral, mais do que um companheiro de bancada e “irmãozinho de orientação”, um amigo. Obrigada por tudo que me ensinou desde a Iniciação Científica, pelas nossas conversas, risadas e companheirismo! Obrigada, por mesmo de longe, me ajudar em momentos de confusão intelectual (risos)... espero que a nossa parceria vá além do meu mestrado e seu doutorado!

E agradeço também aos demais “irmãozinhos de orientação”, Lud e Anderson, pessoas especiais que me deixaram saudades!

Aos queridos Cláudia e Ph, simplesmente pelos aproximados 16 anos de amizade... pela torcida de sempre!

À Meire, ao Paco, Érica e Raoni (sogra, sogro e cunhados), pelo carinho e torcida de sempre!

Ao Renato, cunhado tão fofo e carinhoso! Olha só: finalmente saí do meu habitat natural! (risos)...

Agradeço também à minha querida prima Aline, simplesmente por se demonstrar tão feliz quanto eu mesma com todas as minhas conquistas!

Aos demais colegas de laboratório, muito queridos: Joãozinho, Flávio, Leila, Cynthiazinha, Roseli, Van Oliveira, por tornarem o ambiente tão divertido e agradável de se trabalhar. E como sempre dizia o Flávio, com seu capacete na mão, na hora de ir embora: “Tchau amiguinhos... foi bom estar com vocês, brincar com vocês...” (risos)

À Dra. Maria Ângela, simplesmente pelo seu carinho, atenção e companhia tão agradável, que me fizeram nutrir grande admiração! E também à Dra. Rita, por sempre me entusiasmar com palavras de incentivo!

Aos demais pesquisadores do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, pelo exemplo e aprendizado em nossas reuniões semanais.

Ao Dr. João Lago, Dra. Cláudia Furlan e Dra. Maria Tereza Grombone-Guaratini, pelas valiosas dicas na arguição em minha qualificação.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo e principalmente ao Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente pela oportunidade de realizar esse trabalho.

Aos funcionários de apoio, Ana Alice e Cida, e aos técnicos de laboratório Pedro e Mary Monteiro, a querida “Maryzinha”, enfim, Mary, obrigada por ser nossa “mãe” no laboratório!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa concedida, sem a qual se tornaria completamente inviável a realização deste trabalho.

E, por fim, à todos aqueles, que direta ou indiretamente, contribuíram para o sucesso da realização deste trabalho, e mais do que isso, por estarem presentes em minha vida, os quais peço perdão se porventura tenha esquecido de mencionar o nome...

O meu mais sincero e carinhoso OBRIGADA!!!

*Ao ser indagada sobre os perigos a que estava exposta, a Rosa responde:
“ É preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser conhecer borboletas.
Dizem que são tão belas!”
[...]*

*Mais tarde, a Raposa diz ao príncipezinho:
“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante.”*

O Pequeno Príncipe – Antoine de Saint’Exupéry

RESUMO

Avicennia schaueriana, conhecida popularmente como mangue preto ou siriúba, foi selecionada para este estudo devido ao forte potencial antifúngico e antioxidante detectado nos extratos brutos de caules e folhas. O gênero *Avicennia* (Acanthaceae) é caracterizado quimicamente pela presença de iridoides glicosilados, flavonoides, diterpenos e naftoquinonas, porém não há registro de estudos fitoquímicos com *A. schaueriana*. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo comparar o perfil químico de *A. schaueriana* coletada em dois diferentes locais, direcionando o estudo para a identificação dos compostos e/ou das classes de compostos responsáveis pelas atividades antifúngica e antioxidante. Para tanto, folhas e caules de *A. schaueriana* coletados na Ilha do Cardoso (IC) e em Itanhaém (It) foram moídos e extraídos com etanol sob pressão e temperatura. Os extratos etanólicos de folhas e caules foram particionados com éter de petróleo, clorofórmio e acetato de etila. Posteriormente, os extratos e frações foram submetidos a análises em CLAE para verificação do perfil químico. Para avaliação da atividade antioxidante, os extratos e frações foram submetidos a ensaio qualitativo em cromatografia de camada delgada (CCD) com uma solução do radical DPPH e ensaio quantitativo em microplaca com DPPH, e para a identificação das classes de compostos responsáveis pela atividade, foram realizadas revelações químicas com Cloreto de Alumínio (5%) e NP-PEG, além da quantificação de fenóis totais. Para avaliação da atividade antifúngica, os extratos e frações foram submetidos a ensaio qualitativo por bioautografia em CCD com os fungos filamentosos *Cladosporium sphaerospermum*, *Cladosporium cladosporioides* e *Colletotrichum lagenarium*, ensaio quantitativo pelo método de diluição em Ágar com o fungo filamentoso *Colletotrichum gloeosporioides*, e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) com os fungos *C. gloeosporioides* e *C. sphaerospermum*. As frações ativas foram purificadas por cromatografia em camada delgada preparativa e identificadas a partir de análises por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (CL-EM) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). A comparação do perfil químico entre *A. schaueriana* (IC) e (It) mostrou que existem diferenças quantitativas de acordo com o perfil cromatográfico, e qualitativas de acordo com a identificação de alguns compostos. *A. schaueriana* (IC) se mostrou mais ativa em relação à *A. schaueriana* (It) para as duas atividades biológicas testadas. Na atividade antioxidante, o maior teor de compostos fenólicos detectado em *A. schaueriana* (IC) relaciona-se diretamente ao potencial de sequestro de radicais livres, estando a atividade provavelmente relacionada à presença de flavonoides detectados por revelações químicas. Já a atividade antifúngica provavelmente está relacionada à presença de naftoquinonas, dentre elas o lapachol, à ampla gama de ésteres metílicos de ácidos graxos, à presença do lupeol, e também de derivados do ácido cinâmico, sendo que a diferença de potencial antifúngico entre IC e It, provavelmente se deve à presença mais marcante das naftoquinonas em IC do que em It, na qual praticamente não foram detectadas.

Palavras chave: *Avicennia schaueriana*, metabolismo secundário, perfil químico, potencial antioxidante, potencial antifúngico, naftoquinonas.

ABSTRACT

Avicennia schaueriana, popularly known as black mangrove or siriuba was selected for this study due to the strong antifungal and antioxidant potential detected in crude extracts of stems and leaves. The genus *Avicennia* (Acanthaceae) is chemically characterized by the presence of iridoid glycosides, flavonoids, diterpenes and naphthoquinones, but there is no record of phytochemical studies with *A. schaueriana*. Therefore, this study aims to compare the chemical profile of *A. schaueriana* collected in two different locations, regarding the identification of compounds and/or classes of compounds responsible for the antifungal and antioxidant activities. For this purpose, leaves and stems of *A. schaueriana* collected at Ilha do Cardoso (IC) and Itanhaém (It) were ground and extracted with ethanol under pressure and temperature. The ethanolic extracts of leaves and stems were partitioned with petroleum ether, chloroform and ethyl acetate. Subsequently, the extracts and fractions were subjected to HPLC analysis for verification of chemical profile. To evaluate the antioxidant activity, the extracts and fractions were subjected to qualitative assay on thin layer chromatography (TLC) with a solution of DPPH and quantitative microplate assay with DPPH. Aluminum chloride (5%) and NP-PEG were used for the detection of flavonoids, and the phenolic content was measured using the Folin-Ciocalteu reagent. To evaluate the antifungal activity, the extracts and fractions were subjected to qualitative assay by bioautography TLC with filamentous fungi *Cladosporium sphaerospermum*, *Cladosporium cladosporioides* and *C. lagenarium*, quantitative assay by agar dilution method with the filamentous fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined for *C. gloeosporioides* and *C. sphaerospermum*. The active fractions were purified by preparative thin layer chromatography and identified from the analysis on LC-MS and GC-MS. A comparison of the chemical profile between *A. schaueriana* (IC) and (It) has shown that there are quantitative and qualitative differences according to the chromatographic profile and the identification of some compounds, respectively. *A. schaueriana* (IC) was more active in relation to *A. schaueriana* (It) for the two tested biological activities. The higher content of phenolic compounds in *A. schaueriana* (IC) seems to be directly related to the potential for scavenging free radicals, and to the presence of flavonoids. The antifungal activity could probably be related to the presence of naphthoquinones, lapachol among them, the wide range of methyl esters of fatty acids, the presence of lupeol, and also derivatives of cinnamic acid. The higher antifungal potential of IC is probably due to the presence of naphthoquinones.

Keywords: *Avicennia schaueriana*, secondary metabolism, chemical profile, antioxidant activity, antifungal activity, naphthoquinones.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Principais rotas biossintéticas do metabolismo secundário e suas associações ao metabolismo primário (Taiz; Zeiger, 2009). 4
- Figura 2:** Compostos identificados no gênero *Avicennia*. **1 – 5:** Iridoides glicosilados; **6 – 13:** Diterpenos; **14 – 17:** Flavonóides; **18 – 26:** Naftoquinonas. 7
- Figura 3:** *Avicennia schaueriana*. À direita e acima – destaque para as folhas. À direita e abaixo – destaque para os pneumatóforos. Foto: Kássia Fardin (2012). 8
- Figura 4:** Perfil cromatográfico obtido por HPLC analítico dos extratos de folhas em (λ) 254nm. Em vermelho – perfil cromatográfico do extrato etanólico de folhas da Ilha do Cardoso. Em azul - perfil cromatográfico do extrato etanólico de folhas de Itanhaém. 22
- Figura 5:** Perfil cromatográfico obtido por HPLC analítico dos extratos de caule em (λ) 254nm. Em vermelho – perfil cromatográfico do extrato etanólico de caule da Ilha do Cardoso. Em azul - perfil cromatográfico do extrato etanólico de caule de Itanhaém. 22
- Figura 6:** Placas de CCD analítica (de sílica gel F₂₅₄ eluídas em CHCl₃/MeOH 95:5) das frações de *A. schaueriana* (IC e It). Ilha do Cardoso (IC): 1- EE-F, 2- EE-C, 3- EP-F, 4- EP-C, 5- EP-C emulsão, 6- CHCl₃-F, 7- CHCl₃-C, 8- AcOEt-F, 9- AcOEt-C, 10- AcOEt-C emulsão, 11- MeOH/H₂O-F, 12- MeOH/H₂O-C. Itanhaém (It): 1- EE-F, 2- EE-C, 3- EP-F, 4- EP-C, 5- EP-F emulsão, 6- EP-C emulsão, 7- CHCl₃-F, 8- CHCl₃-C, 9- AcOEt-F, 10- AcOEt-C, 11- MeOH/H₂O-F, 12- MeOH/H₂O-C. 24
- Figura 7:** Autografia (CCD, em sílica gel F₂₅₄ eluída em BAW, e revelada com DPPH) de *A. schaueriana* (IC). 1- EE-F, 2- EE-C, 3- EP-F, 4- EP-C, 5- EP-C emulsão, 6- CHCl₃-F, 7- CHCl₃-C, 8- AcOEt-F, 9- AcOEt-C, 10- AcOEt-C emulsão, 11- MeOH/H₂O-F, 12- MeOH/H₂O-C, 13- Quercetina. 25
- Figura 8:** Autografia (CCD, em sílica gel F₂₅₄ eluída em BAW, e revelada com DPPH) de *A. schaueriana* (It). 1- EE-F, 2- EE-C, 3- EP-F, 4- EP-C, 5- EP-F emulsão, 6- EP-C emulsão, 7- CHCl₃-F, 8- CHCl₃-C, 9- AcOEt-F, 10- AcOEt-C, 11- MeOH/H₂O-F, 12- MeOH/H₂O-C, 13- Quercetina. 25
- Figura 9:** Gráfico de porcentagem do sequestro do radical livre DPPH pelos extratos e frações de *A. schaueriana* (IC e It). Barras vermelhas – Extratos e frações de *A. schaueriana* (IC); Barras azuis – Extratos e frações de *A. schaueriana* (It). Extratos brutos na concentração de 200 μ g/mL, e frações na concentração de 100 μ g/mL. 26
- Figura 10:** Gráfico do percentual de fenóis totais nos extratos e frações de *A. schaueriana* (IC e It). Barras vermelhas – Extratos e frações de *A. schaueriana* (IC); Barras azuis – Extratos e frações de *A. schaueriana* (It). 26
- Figura 11:** Comparação das revelações químicas (NP-PEG e AlCl₃ – 5%) com o perfil de atividade antioxidante em CCD analítica dos extratos e frações de *A. schaueriana* (IC e It). Placas de sílica gel F₂₅₄ eluídas com BAW, e reveladas com: Duas placas superiores – NP-PEG; Duas placas do meio – AlCl₃ – 5%; Duas placas inferiores – DPPH. IC e It - 1- EE-F, 2- EE-C, 3- CHCl₃-F, 4- CHCl₃-C, 5- AcOEt-F, 6- AcOEt-C, 7- MeOH/H₂O-F, 8- MeOH/H₂O-C, 9- Quercetina. 28
- Figura 12:** Bioautografias (CCD, em sílica gel F₂₅₄ eluídas em CHCl₃/MeOH 95:5) dos extratos e frações de *A. schaueriana* (IC e It), reveladas com: A – *C. sphaerospermum*; B – *C. cladosporioides*; C – *C. lagenarium*. Ilha do Cardoso – 1- EE-F, 2- EE-C, 3- EP-F, 4- EP-C, 5- EP-C emulsão, 6- CHCl₃-F, 7- CHCl₃-C, 8- AcOEt-F, 9- AcOEt-C, 10- AcOEt-C emulsão, 11- MeOH/H₂O-F, 12- MeOH/H₂O-C, 13- Nistatina. Itanhaém – 1- EE-F, 2- EE-C, 3- EP-F,

4- EP-C, 5- EP-F emulsão, 6- EP-C emulsão, 7- CHCl ₃ -F, 8- CHCl ₃ -C, 9- AcOEt-F, 10- AcOEt-C, 11- MeOH/H ₂ O-F, 12- MeOH/H ₂ O-C, 13- Nistatina.	30
Figura 13: Ensaio de diluição em Ágar, realizado com extratos e frações de <i>A. schaueriana</i> (IC), após cinco dias de cultivo com o fungo <i>C. gloeosporioides</i> . Extratos etanólicos na concentração de 2mg/mL; frações na concentração de 0,5mg/mL; controle metanol feito com 40μL do solvente.	32
Figura 14: Ensaio de diluição em Ágar, realizado com extratos e frações de <i>A. schaueriana</i> (It), após cinco dias de cultivo com o fungo <i>C. gloeosporioides</i> . Extratos etanólicos na concentração de 2mg/mL; frações na concentração de 0,5mg/mL; controle metanol feito com 40μL do solvente.	32
Figura 15: Gráfico do IVCm de <i>C. gloeosporioides</i> quando inoculado com extratos e frações de <i>A. schaueriana</i> (IC e It). [#] p<0,05 na comparação com o controle negativo e controle metanol para amostras da IC – barras vermelhas (ANOVA e pós-teste –Tukey). ⁺ p<0,05 na comparação com o controle negativo e controle metanol para amostras de It – barras azuis (ANOVA e pós-teste –Tukey). * p<0,05 na comparação entre amostras iguais de diferentes locais (Teste t).	33
Figura 16: Representação da localização das faixas raspadas em cada fração para a obtenção das sub-frações. Figuras da esquerda mostram a localização das manchas de atividade antifúngica contra <i>C. sphaerospermum</i> , e as figuras da direita mostram a visualização da cromatoplaça sob luz UV (λ 254nm).	35
Figura 17: Superior - Bioautografia (CCD, em sílica gel F ₂₅₄ eluída em CHCl ₃ /MeOH 95:5) das sub-frações obtidas por CCD Preparativa, revelada com <i>C. sphaerospermum</i> . A – EP-F (IC), B – EP-C (IC), C – EP-C emulsão (IC), D– CHCl ₃ -F (IC), E – CHCl ₃ -C (IC), F – AcOEt-C (IC), G – EP-F (It), H – EP-C (It), I – EP-F emulsão (It), J– EP-C emulsão (It), K – CHCl ₃ -F (It), L – CHCl ₃ -C (It). Inferior – Visualização sob UV (λ 256nm).	35
Figura 18: Perfil cromatográfico por HPLC analítico da sub-fração 2 de EP-C (IC). Detecção sob luz ultravioleta a (λ) 254nm.	37
Figura 19: Perfil cromatográfico por HPLC analítico da sub-fração 3 de EP-C (IC). Detecção sob luz ultravioleta a (λ) 254nm.	38
Figura 20: Perfil cromatográfico por HPLC analítico da sub-fração 4 de EP-C (IC). Detecção sob luz ultravioleta a (λ) 254nm.	39
Figura 21: Perfil cromatográfico por HPLC analítico da sub-fração 2 de CHCl ₃ -F (IC). Detecção sob luz ultravioleta a (λ) 254nm.	40
Figura 22: Perfil cromatográfico por HPLC analítico da sub-fração 2 de CHCl ₃ -C (IC). Detecção sob luz ultravioleta a (λ) 254nm.	41
Figura 23: Perfil cromatográfico por HPLC analítico da sub-fração 3 de CHCl ₃ -C (IC). Detecção sob luz ultravioleta a (λ) 254nm.	42
Figura 24: Perfil cromatográfico por HPLC analítico da sub-fração 2 de CHCl ₃ -F (It). Detecção sob luz ultravioleta a (λ) 254nm.	43
Figura 25: Perfil cromatográfico por HPLC analítico da sub-fração 1 de CHCl ₃ -C (It). Detecção sob luz ultravioleta a (λ) 254nm.	44
Figura 26: Perfil cromatográfico por HPLC analítico da sub-fração 2 de CHCl ₃ -C (It). Detecção sob luz ultravioleta a (λ) 254nm.	45
Figura 27: Perfil cromatográfico por HPLC analítico da sub-fração 3 de CHCl ₃ -C (It). Detecção sob luz ultravioleta a (λ) 254nm.	46

Figura 28: Análise em LC-MS ESI(+) da sub-fração 2 de EP-C (IC). Acima - Cromatograma de contagem de íons totais (TIC – Total Íons Count), com a sinalização por meio de setas dos picos correspondentes à visualização em UV (λ) 254nm. Abaixo, 1 e 2 - Espectros em MS/ESI(+) dos picos indicados pelas setas.....	48
Figura 29: Análise em LC-MS ESI(+) da sub-fração 3 de EP-C (IC). Acima - Cromatograma de contagem de íons totais (TIC – Total Íons Count), com a sinalização por meio de setas dos picos correspondentes à visualização em UV (λ) 254nm. Abaixo, 1, 2 e 3 - Espectros em MS/ESI(+) dos picos indicados pelas setas.....	49
Figura 30: Análise em LC-MS ESI(+) da sub-fração 4 de EP-C (IC). Acima - Cromatograma de contagem de íons totais (TIC – Total Íons Count), com a sinalização por meio de seta do pico correspondente à visualização em UV (λ) 254nm. Abaixo, 1 - Espectro em MS/ESI(+) do pico indicado pela seta.	50
Figura 31: Análise em LC-MS ESI(+) da sub-fração 2 de CHCl ₃ -F (IC). Acima - Cromatograma de contagem de íons totais (TIC – Total Íons Count), com a sinalização por meio de setas dos picos correspondentes à visualização em UV (λ) 254nm. Abaixo, 1 e 2 - Espectros em MS/ESI(+) dos picos indicados pelas setas.	51
Figura 32: Análise em LC-MS ESI(+) da sub-fração 2 de CHCl ₃ -C (IC). Acima - Cromatograma de contagem de íons totais (TIC – Total Íons Count), com a sinalização por meio de seta do pico correspondente à visualização em UV (λ) 254nm. Abaixo, 1 - Espectro em MS/ESI(+) do pico indicado pela seta.....	52
Figura 33: Análise em LC-MS ESI(+) da sub-fração 3 de CHCl ₃ -C (IC). Acima - Cromatograma de contagem de íons totais (TIC – Total Íons Count), com a sinalização por meio de setas dos picos correspondentes à visualização em UV (λ) 254nm. Abaixo, 1 e 2 - Espectros em MS/ESI(+) dos picos indicados pelas setas.	53
Figura 34: Análise em LC-MS ESI(+) da sub-fração 2 de CHCl ₃ -F (It). Acima - Cromatograma de contagem de íons totais (TIC – Total Íons Count), com a sinalização por meio de setas dos picos correspondentes à visualização em UV (λ) 254nm. Abaixo, 1, 2 e 3 - Espectros em MS/ESI(+) dos picos indicados pelas setas.	54
Figura 35: Análise em LC-MS ESI(+) da sub-fração 1 de CHCl ₃ -C (It). Acima - Cromatograma de contagem de íons totais (TIC – Total Íons Count), com a sinalização por meio de setas dos picos correspondentes à visualização em UV (λ) 254nm. Abaixo, 1, 2 e 3 - Espectros em MS/ESI(+) dos picos indicados pelas setas.	55
Figura 36: Análise em LC-MS ESI(+) da sub-fração 2 de CHCl ₃ -C (It). Acima - Cromatograma de contagem de íons totais (TIC – Total Íons Count), com a sinalização por meio de setas dos picos correspondentes à visualização em UV (λ) 254nm. Abaixo, 2 e 3 - Espectros em MS/ESI(+) dos picos indicados pelas setas. Obs: Não foi detectado o espectro do pico 1.	56
Figura 37: Análise em LC-MS ESI(+) da sub-fração 3 de CHCl ₃ -C (IC). Acima - Cromatograma de contagem de íons totais (TIC – Total Íons Count), com a sinalização por meio de seta do pico correspondente à visualização em UV (λ) 254nm. Abaixo, 1 - Espectro em MS/ESI(+) do pico indicado pela seta.....	57
Figura 38: Espectro MS-MS/ESI(+) (acima) do íon m/z 289 $[M+H]^+$ e espectro GC-MS (abaixo) do composto de massa (M^+) 288, identificado como Avicenol-C à partir da literatura.	58
Figura 39: Espectro MS-MS/ESI(+) (acima) do íon m/z 257 $[M+H]^+$ e espectro GC-MS (abaixo) do composto de massa (M^+) 256.....	59
Figura 40: Avicequinona-C.....	59

Figura 41: Espectro MS-MS/ESI(+) (acima) do íon m/z 271 $[M+H]^+$ e espectro GC-MS (abaixo) do composto de massa (M^+) 270, identificado como éster metílico do Ácido Palmítico à partir da biblioteca NIST.....	60
Figura 42: Espectro MS-MS/ESI(+) (acima) do íon m/z 191 $[M+H]^+$ e espectro GC-MS (abaixo) do composto de massa (M^+) 190, identificado como Megaestigmatrienona à partir da biblioteca NIST.	61
Figura 43: Espectro MS-MS/ESI(+) (acima) do íon m/z 239 $[M+H]^+$ e espectro GC-MS (abaixo) do composto de massa (M^+) 238.....	62
Figura 44: 2-isopropenilnafto[2,3-b]furan-4,9-quinona.	62
Figura 45: Espectro MS-MS/ESI(+) do íon m/z 229 $[M+H]^+$ sem espectro correspondente em GC-MS e não identificado.....	63
Figura 46: Avicenol-B.	63
Figura 47: Naftoquinonas detectadas por GC-MS. 1– Avicequinona-B. 2– Lapachol. 3– α -Lapachona. 4– Nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-isopropil.....	65
Figura 48: Ácidos graxos metilados detectados por GC-MS. 1– Ácido Palmítico, éster metílico. 2– Ácido Oleico, éster metílico. 3– Ácido Linoleico, éster metílico. 4– Ácido 11-Octadecenoico, éster metílico.	68
Figura 49: Lupeol.....	69
Figura 50: Estruturas do éster metílico do Ácido cinâmico (1) e do éster metílico do ácido 3,4- dimetoxibenzoico (2).	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rendimento dos extratos etanólicos.....	21
Tabela 2: Frações obtidas após partição líquido/líquido, com suas respectivas massas e rendimentos.	23
Tabela 3: Percentual de fenóis totais nos extratos e frações de <i>A. schaueriana</i> (IC e It).	27
Tabela 4: IVCm e porcentagem de inibição de <i>C. gloeosporioides</i> calculados à partir do ensaio de diluição em Ágar, realizado com extratos e frações de <i>A. schaueriana</i> (IC e It).	Erro! Indicador não definido.
Tabela 5: Concentração Mínima Inibitória dos extratos e frações de IC e It contra <i>C. gloeosporioides</i>	34
Tabela 6: Concentração Mínima Inibitória dos extratos e frações de IC e It contra <i>C. sphaerospermum</i>	34
Tabela 7: Sub-frações obtidas após CCD Preparativa com suas respectivas massas.	36
Tabela 8: Compostos detectados por CG-EM em frações de Éter de Petróleo (IC e It) e sub-frações ativas.	66
Tabela 9: Compostos detectados por GC-MS nas frações Clorofórmicas, frações de Acetado de Etila e resíduos Hidrometanólicos após metilação.	67

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	xi
1. Introdução.....	1
1.1 Os metabólitos secundários ou especiais.....	2
1.2 Gênero <i>Avicennia</i>	6
1.3 <i>Avicennia schaueriana</i> Stapf & Leech.	7
1.4 Antioxidantes.....	9
1.5 Antifúngicos	9
2. Objetivos	11
2.1 Objetivo geral	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
3. Metodologia	12
3.1 Material vegetal	12
3.2 Extração	12
3.3 Partição dos extratos.....	12
3.4 Análises cromatográficas.....	13
3.4.1 Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA).....	13
3.4.2 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP).....	13
3.4.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	13
3.5 Identificação dos compostos presentes nas frações purificadas	14
3.5.1 Análise por LC-MS-MS/ESI(+).....	14
3.5.2 Análise por CG-EM (GC-MS).....	15
3.6 Quantificação de Fenóis Totais	16
3.7 Revelações químicas.....	16
3.8 Atividades Biológicas.....	17
3.8.1 Atividade Antioxidante (anti-radicalar)	17
3.8.1.1 Ensaio qualitativo por autografia em cromatografia de camada delgada.....	17
3.8.1.2 Ensaio quantitativo em microplaca	17
3.8.2 Atividade Antifúngica	18
3.8.2.1 Ensaio qualitativo por bioautografia em cromatografia de camada delgada .	18
3.8.2.2 Ensaio quantitativo pelo método de diluição em Agar	19
3.8.2.3 Concentração Mínima Inibitória (CMI) por meio de microdiluição.....	20
4. Resultados e Discussão	21
4.1 Obtenção, rendimento e perfil cromatográfico do Extrato Etanólico (EE)	21

4.2	Obtenção, rendimento e perfil cromatográfico das Frações	22
4.3	Atividades biológicas	24
4.3.1	Avaliação do potencial antioxidante e quantificação de fenóis totais.....	24
4.3.2	Avaliação do potencial antifúngico e purificação das frações ativas.....	29
4.4	Identificação dos compostos.....	47
5.	Conclusões	71
6.	Referências bibliográficas	72

1. Introdução

Do ponto de vista utilitarista a biodiversidade é fonte de muitos recursos úteis, ou potencialmente úteis para as populações humanas, tais como alimentos, fármacos e matérias primas (Hanazaki, 2003). Deste modo, a prática da utilização de recursos naturais no tratamento e cura de doenças esteve presente na espécie humana desde os primórdios da civilização. O homem, preocupado com sua integridade física e o alívio da dor, observava constantemente as características da natureza e a partir da relação dos animais com as diversas espécies vegetais, avaliava quais apresentavam potencialidade de uso para alívio de seus problemas, utilizando-as como medicamento, alimento e até mesmo produzindo ferramentas (Di Stasi, 1996).

Atualmente, a Organização Mundial da Saúde calcula que 80% da população do planeta utilizam de alguma maneira, plantas como medicamentos. Porém, o desconhecimento sobre a biodiversidade das florestas tropicais torna o uso dos produtos naturais reduzido a um pequeno número de plantas conhecidas. Estima-se que no mundo, sejam utilizadas cerca de 25.000 espécies nas preparações da medicina tradicional (Garcia, 1995), sendo que só no Brasil são catalogadas mais de 55.000 espécies vegetais de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (Guerra; Nodari, 2001).

A observação da natureza pode ser válida na descoberta de novas substâncias químicas com potenciais terapêuticos, sendo assim, os vegetais constituem uma rica fonte de novas substâncias com atividade biológica potencial (Di Stasi, 1996). No entanto, a diminuição das coberturas vegetais implica na perda da diversidade, além de inviabilizar o conhecimento aprofundado da mesma (Souza, 2007).

Como tentativa de direcionar esforços na preservação da biodiversidade, Myers (1988) criou o conceito “*hotspot* de biodiversidade”. Os *hotspots* são áreas onde há elevada quantidade de espécies endêmicas, porém com risco de perda de seu habitat (Myers et al., 2000). Atualmente estima-se que a soma da área total dos 34 *hotspots* existentes, seja equivalente a apenas 2,3% da superfície terrestre (Conservation International, 2011), sendo que grande parte da população mundial vive dentro destes *hotspots*, apresentando elevado crescimento demográfico (Hanazaki, 2003).

O Brasil possui biomas de grande diversidade genética (Souza, 2007), dentre eles a Mata Atlântica, um dos 34 *hotspots* mundiais (Pinto et al., 2006; Lagos; Muller, 2007;

Conservation International, 2011). A Mata Atlântica é considerada o bioma mais rico em biodiversidade do planeta (S.O.S. Mata Atlântica, 2010), além de possuir várias formações associadas como manguezais, restingas, formações campestres de altitude e brejos (Tabarelli et al., 2005). Sua extensão original perfazia 1.300.000 Km², o que correspondia a 15% do território nacional, englobando 17 estados brasileiros, embora atualmente 93% dessa floresta já tenham sido devastados ou alterados de alguma maneira (S.O.S. Mata Atlântica, 2010). Essa redução de área se deve ao fato de que cerca de 60% da população brasileira vivem nestas regiões, exercendo pressões por intermédio dos impactos de suas atividades, tais como desmatamentos, exploração de recursos minerais, implantação de projetos agropecuários, queimadas criminosas, entre outros (Silva; Andrade, 2005; S.O.S. Mata Atlântica, 2010). Tais fatores intensificam a perda da diversidade, levando à fragmentação do conhecimento sobre o funcionamento do ecossistema (Pinto et al., 2006).

Somada à perda de diversidade, estima-se que menos de 1% da flora brasileira é conhecida quimicamente (Souza, 2007). Portanto, a intensificação de investimentos nesta área de estudo possibilitará o uso e o manejo sustentável, além da preservação das espécies reconhecidamente importantes no aspecto farmacológico/medicinal.

1.1 Os metabólitos secundários ou especiais

Apesar da facilidade para sintetizar substâncias em laboratório, as plantas continuam sendo importantes fontes de fármacos, pois os produzem naturalmente, sem fornecimento adicional de energia. Além disso, a estrutura de algumas moléculas é tão complexa, que os métodos para a síntese em laboratório são muito onerosos (Raven; Evert; Eichhorn, 2007).

A variedade de substâncias que as plantas produzem, deriva em grande parte do seu metabolismo secundário (Raven; Evert; Eichhorn, 2007), ou também denominado por vários autores como metabolismo especial (Monteiro et al., 2005; Furlan et al., 2010). No interior das células de todas as plantas ocorrem reações enzimáticas pertencentes ao metabolismo vegetal, que é dividido, didaticamente, em duas partes: a síntese de metabólitos primários, e a síntese de metabólitos secundários, formados a partir de vias metabólicas alternativas, e muitas vezes, dependentes do metabolismo primário (Fávero; Pavan, 1997; Santos, 2001).

Durante a fotossíntese as plantas utilizam a energia da luz solar para sintetizar os compostos carbonados necessários aos processos celulares essenciais à vida. Fazendo uso de seis moléculas de gás carbônico (CO₂) e seis moléculas de água (H₂O), produzem glicose, liberando oxigênio e energia na forma de ATP. Essa glicose produzida é translocada pela

planta, na maioria das vezes, na forma de sacarose, ou ainda armazenada, por exemplo, na forma de amido (Pimentel, 1998; Taiz; Zeiger, 2009).

Durante a respiração celular ocorre a oxidação dos açúcares produzidos na fotossíntese através da glicólise, do ciclo de krebs (ou ciclo do ácido cítrico) e da fosforilação oxidativa, produzindo ATP e liberando uma série de ácidos orgânicos. Os intermediários desses processos bioquímicos e os substratos gerados proporcionam o ponto de partida para inúmeras rotas biossintéticas na planta (Taiz; Zeiger, 2009).

Com a incorporação de nutrientes minerais absorvidos pelas raízes, associada aos substratos e a liberação de energia gerados na respiração, a planta produz os compostos necessários ao seu crescimento e desenvolvimento, como os carboidratos, lipídeos, aminoácidos (proteínas) e ácidos nucleicos. Tais compostos pertencem ao metabolismo primário do carbono, ou metabolismo principal, sendo denominados, portanto, de metabólitos primários, por serem indispensáveis à existência e manutenção da vida e ocorrerem em todos os vegetais (Taiz; Zeiger, 2009).

Já os demais compostos intermediários e produtos destes processos bioquímicos são precursores de rotas biossintéticas alternativas, que levam à formação dos metabólitos secundários, ou especiais (Dewick, 2009; Taiz; Zeiger, 2009).

Estas substâncias, apesar de não serem essenciais ao desenvolvimento da planta, contribuem na defesa contra predadores e desenvolvimento de estratégias para permanência em seu ecossistema, apresentando atividades biológicas interessantes, e sendo assim, utilizadas principalmente na indústria farmacêutica (Ferri, 1996; Santos, 2001).

Os metabólitos secundários, ou especiais, podem ser divididos em três grandes grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos nitrogenados e compostos fenólicos (Taiz; Zeiger, 2009), dentro dos quais são encontradas diversas classes químicas. O ciclo biossintético geral dos metabólitos secundários encontra-se ilustrado na Figura 1 a seguir.

Terpenos, terpenóides ou isoprenóides são compostos que derivam da união de unidades pentacarbonadas que apresentam um esqueleto ramificado de isopentano, elemento estrutural básico dos terpenos, também denominado como unidade isoprênica (difosfato de isopentenila – IPP) (Aharoni et al., 2006; Taiz; Zeiger, 2009). Os terpenos constituem o maior grupo de produtos secundários, sendo sintetizados pela via do ácido mevalônico ou via fosfato de metileritritol (Simoes; Spitzer, 2003). Apesar de serem sintetizados a partir de poucas vias bioquímicas, as várias formas de modificações enzimáticas tais como, hidroxilações, acetilações e metilações, adicionam uma grande diversidade estrutural aos compostos emitidos, aumentando a volatilidade dos mesmos no passo final de sua formação (Dudareva et

al, 2004; Gang, 2005). Nas plantas, tais compostos desempenham funções fisiológicas e ecológicas específicas para sua sobrevivência e adaptação ao meio ambiente, atuando na defesa contra herbivoria e ataque de patógenos, atração e orientação de polinizadores, atração de dispersores de sementes e na transmissão de informações sobre o status fisiológico da planta (Dudareva et al., 2011).

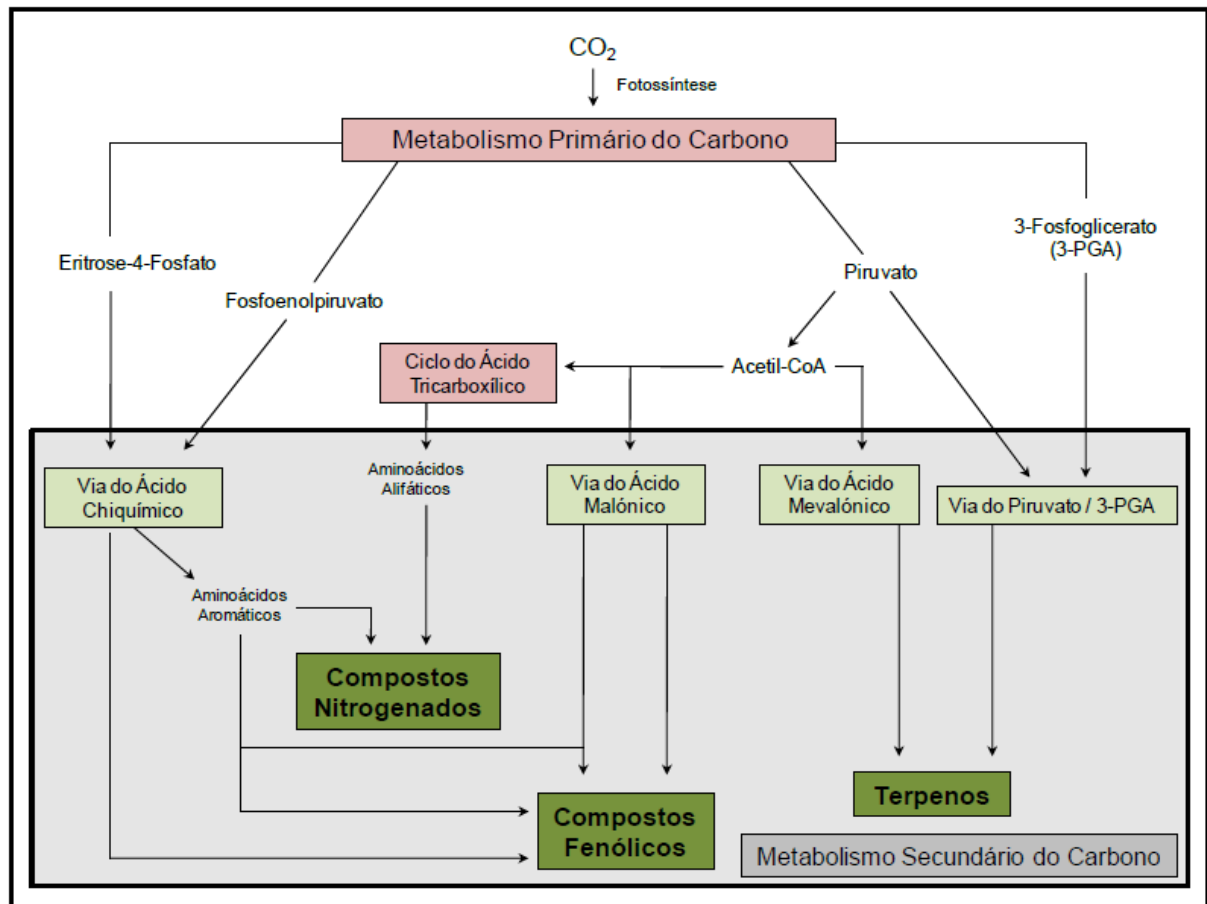


Figura 1: Principais rotas biossintéticas do metabolismo secundário e suas associações ao metabolismo primário (Taiz; Zeiger, 2009).

Já os compostos nitrogenados, englobam uma variedade de metabólitos secundários que contêm nitrogênio em sua estrutura. Essa categoria inclui compostos bem conhecidos como os glicosídeos cianogênicos, os glicosinolatos e os alcalóides, os quais são de grande interesse devido ao seu efeito tóxico e suas propriedades farmacológicas (Taiz; Zeiger, 2009). Desde tempos antigos que o homem vem utilizando os alcalóides na forma de extratos vegetais, como venenos, estimulantes, narcóticos e também na medicina. Para as plantas, muitos destes compostos atuam como substâncias de defesa contra animais e microorganismos, por exemplo (Heldt, 2005).

Este grupo é proveniente de aminoácidos alifáticos e aminoácidos aromáticos, podendo ter em sua estrutura cadeias carbônicas provenientes de outras vias do metabolismo

secundário. Todos os alcalóides têm em comum a presença de um ou vários átomos de nitrogênio normalmente em um anel heterocíclico, o que lhes confere caráter alcalino (Buchanan, 2000). Tais compostos são armazenados sob a forma protonada, principalmente no vacúolo (Heldt, 2005).

Outro grupo importante é o dos compostos fenólicos. Eles são caracterizados pela presença de um grupo fenol, ou seja, um grupo hidroxila funcional em um anel aromático (Taiz; Zeiger, 2009), e exibem uma grande diversidade de estruturas, com cerca de 10.000 substâncias conhecidas (Simões et al., 2003; Taiz; Zeiger, 2009).

Os fenólicos são normalmente encontrados como ésteres ou glicosídeos, e em menor escala, como compostos livres (Vermerris; Nicholson, 2006). Sua biossíntese ocorre pela via do ácido chiquímico que é a responsável pela formação da maioria dos fenólicos. Algumas estruturas são exclusivas desta via, como as encontradas nos ácidos fenólicos (C6-C1) e nos fenilpropanóides (C6-C3). Outras classes de fenólicos como os flavonóides (C6-C3-C6) são provenientes de biossíntese mista, na qual a via do ácido chiquímico fornece um anel C6-C3 enquanto que a via do acetato malonato oferece o outro anel C6.

Existem várias classes destes compostos, incluindo os fenóis simples, ácidos fenólicos, fenilpropanóides, flavonóides, taninos, ligninas e quinonas (Cseke et al., 2006).

A maior parte das substâncias formadas por essa classe de compostos é destinada à produção de constituintes de parede estrutural, as ligninas, sendo as mesmas essenciais para o desenvolvimento vascular, possibilitando a capacidade de sustentação dos vegetais, a qual foi de extrema importância para a conquista do ambiente terrestre. Além disto, através dessa via é formada uma vasta matriz de constituintes que assumem papéis não estruturais, mas que são de extrema importância para defesa, desenvolvimento, sinalização ao estresse, e atração de polinizadores e dispersores de frutos ou repulsão de insetos (Vermerris; Nicholson, 2006).

A variedade dos metabólitos secundários encontrados nas plantas pode ser explicada pelo fato de que os vegetais estão enraizados no solo e não podem se deslocar. Deste modo, eles não podem responder ao meio ambiente pelas mesmas vias que os animais e por isso criam artifícios moleculares para garantir sua sobrevivência (Gottlieb, 1990; Harborne 1993; Sandes; Di Biasi, 2000).

Como os produtos de origem natural são sintetizados por organismos vivos, ou seja, a partir de seu metabolismo, espera-se que tais substâncias tenham maior chance de apresentar alguma atividade biológica (Sandes; Di Biasi, 2000).

Segundo Rouhi (1997), a seleção de espécies com potencial farmacológico/medicinal realizada através de bioensaios dirigidos para a detecção de substâncias de interesse, viabiliza

a proteção e promove a exploração racional da diversidade vegetal, disponibilizando uma fonte de novos produtos para a humanidade. Neste contexto, durante a realização do projeto temático “Conservação e Utilização Sustentável da Biodiversidade Vegetal do Cerrado e Mata Atlântica: Diversidade Química e Prospecção de Novos Fármacos – Fase II”, dentro do programa BIOTA/FAPESP (Processo nº 03/02176-7), registrado no Instituto de Botânica de São Paulo sob número 03.03, nosso grupo se dedicou à bioprospecção de plantas nativas detentoras de atividades biológicas, realizando triagens no estado de São Paulo em regiões de Cerrado e Mata Atlântica. Estas triagens indicaram algumas espécies, dentre elas *Avicennia schaueriana*, selecionada para este estudo devido ao forte potencial antifúngico e antioxidante detectado em extratos brutos obtidos de seus caules e folhas em testes preliminares realizados pelo grupo.

1.2 Gênero *Avicennia*

O gênero *Avicennia* pertence à família Acanthaceae, sendo representado por duas espécies no Brasil: *Avicennia schaueriana* e *Avicennia germinans* (Proffice, et al., 2010), as quais constituem a vegetação dos mangues (Barroso, 1991). Estudos demonstraram que *Avicennia* sp. pode se desenvolver em uma variedade de condições, desde substratos arenosos a argilosos (Bernini, et al., 2006), e dentro de seu ecossistema característico, é considerada a mais tolerante ao estresse ambiental, podendo ser encontrada em substratos altamente salinos ou em áreas sujeitas a baixas temperaturas (Silva et al., 2005).

Os manguezais são ecossistemas tipicamente tropicais e estão presentes em quatro continentes e seis regiões geográficas do planeta, sendo as de maior ocorrência: América Central e Caribe, Índia, Península da Indochina, Brasil e Austrália (Fonseca; Rocha, 2004). São ecossistemas costeiros de transição entre o ambiente marinho e terrestre, estando sujeitos ao regime das marés. Ocorrem em regiões protegidas como estuários, baías e lagunas (Silva, et al., 2005), planícies e praias lodosas e desembocaduras de rios, sendo compostos por árvores e arbustos com grande tolerância a águas salobras (Fonseca; Rocha, 2004). A diversidade de espécies associadas aos manguezais depende das condições climáticas regionais e da proximidade com outras formações vegetais (Lacerda, 1999).

O gênero *Avicennia* é caracterizado quimicamente pela presença de iridóides glicosilados (Bousquet-Mélou; Fauvel, 1998; Feng et al., 2006), flavonóides (Feng et al., 2006), diterpenos (Subrahmanyam et al., 2006), naftoquinonas (Ito et al., 2000) – Figura 2, e já foram listadas algumas atividades biológicas, como ação anticolinesterásica em *A. officinalis* (Suganthi et al., 2009), efeito antiviral (Zandi et al., 2009) e antioxidante

(Ramadan et al., 2009) em *A. marina*, além da sua utilização no combate a fungos em raízes de quiabo e feijão (Tariq et al., 2006), e da comprovação de potencial alelopático (Chen et al., 2009). Mais recentemente, estudos demonstraram potencial antibactericida nas cascas e raízes de *A. schaueriana* (Santos, et al., 2010).

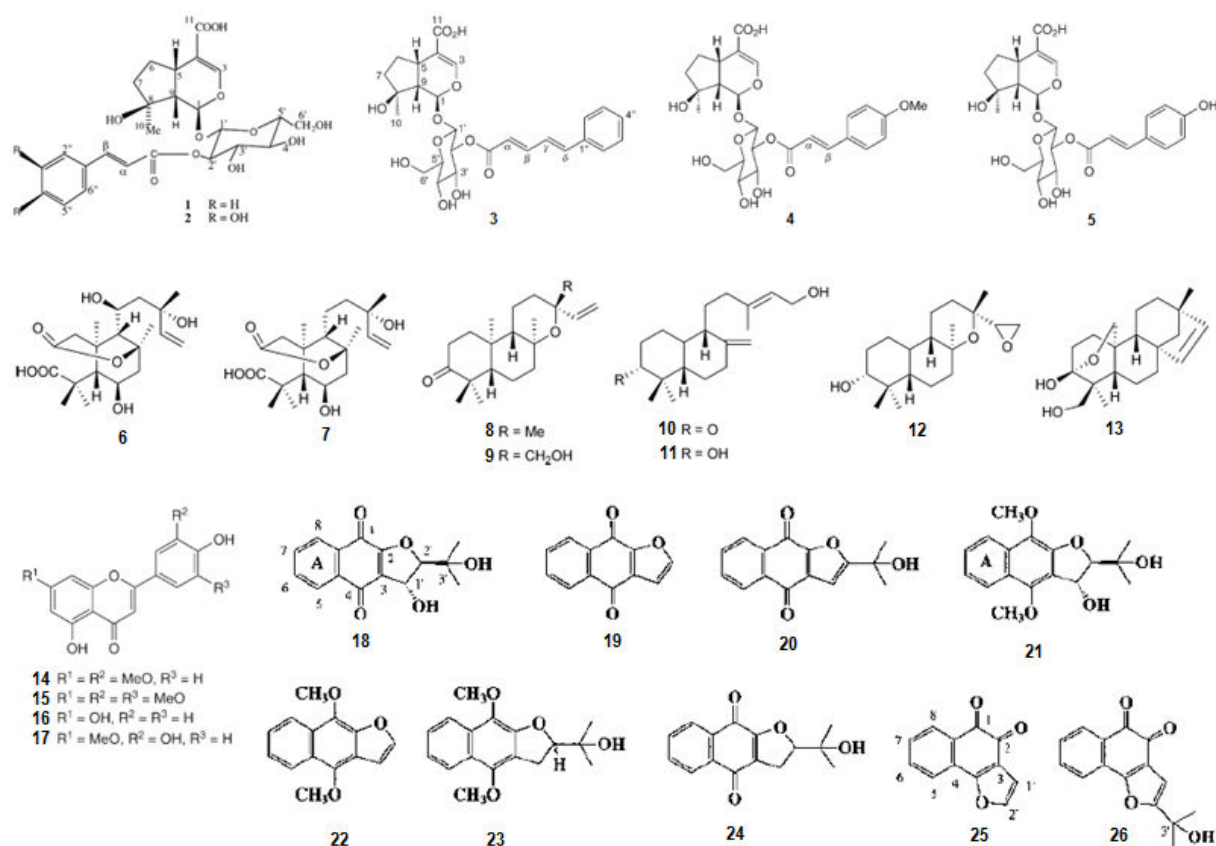


Figura 2: Compostos identificados no gênero *Avicennia*. 1 – 5: Iridoides glicosilados; 6 – 13: Diterpenos; 14 – 17: Flavonóides; 18 – 26: Naftoquinonas.

1.3 *Avicennia schaueriana* Stapf & Leech.

Avicennia schaueriana (Figura 3), conhecida popularmente como mangue preto ou siriúba (Ramos; Geraldo, 2007), possui raízes curtas e na posição vertical, próprias para solos salinos, denominadas pneumatóforos (Silva, et al., 2005; Sérgio, et al., 2006). Suas folhas apresentam-se brilhosas e com glândulas que expelem sal (Fonseca; Rocha, 2004). A espécie encontra-se distribuída geograficamente nos estados do Pará, Maranhão, Ceará, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Santa Catarina, mas não é endêmica do Brasil (Profice, et al., 2010).



Figura 3: *Avicennia schaueriana*. À direita e acima – destaque para as folhas. À direita e abaixo – destaque para os pneumatóforos. Foto: Kássia Fardin (2012).

Estudos recentes demonstraram que *A. schaueriana* teve respostas morfológicas distintas em ambientes com diferente salinidade, indicando que, nos locais de maior competitividade para a espécie (ambiente salobro), houve um aumento na assimetria foliar em relação a plantas de ambiente salino, o que poderia estar relacionado ao aumento do gasto energético implicado pela competição (Santos, 2011). Em contrapartida, do ponto de vista químico, não há referências quanto ao seu metabolismo secundário e os compostos provenientes dele.

Levando-se em consideração a falta de estudos fitoquímicos com *A. schaueriana*, torna-se importante a realização de um estudo mais aprofundado, já que a mesma se mostra promissora no isolamento de substâncias com potencial antioxidante e antifúngico.

Além disso, a ocorrência da planta em diferentes manguezais, e em condições distintas de salinidade dentro do referido ecossistema, pode sugerir que haja diferença no perfil do metabolismo secundário em função do local, já que foram comprovadas alterações morfológicas em plantas encontradas em locais de alta competitividade quando comparadas aos mais habituais.

Desta forma, um estudo que possibilite a comparação do perfil químico em diferentes locais de ocorrência, pode colaborar para o melhor entendimento da espécie, contribuindo ainda, neste caso, para a descoberta e o conhecimento de substâncias de interesse medicinal.

1.4 Antioxidantes

Recentemente, tem havido um interesse crescente na descoberta e conhecimento de antioxidantes derivados de plantas. Antioxidante é uma substância que, em pequenas quantidades, é capaz de prevenir ou retardar, de forma significativa, a oxidação de materiais facilmente oxidáveis, tais como as gorduras, podendo agir na neutralização ou sequestro de radicais livres e até mesmo na quelatação de metais de transição (Pietta, 2000; Liu, 2010; Miguel, 2010).

Os radicais livres têm um papel importante nas reações bioquímicas/fisiológicas do corpo humano, no entanto, se houver produção excessiva de radicais de oxigênio durante os processos patofisiológicos ou devido a fatores ambientais adversos e não existirem antioxidantes disponíveis *in vivo*, podem ocorrer doenças e danos profundos em tecidos (Molyneux, 2004; Huang, 2005). O processo de envelhecimento e patologias como o câncer, enfisema, aterosclerose, artrites e outras doenças graves estão relacionadas com a oxidação de componentes biológicos como membranas celulares, proteínas e o DNA (Liu 2010; Miguel 2010). Desta forma, a descoberta de substâncias com potencial antioxidante de origem vegetal, pode proporcionar o desenvolvimento de técnicas mais brandas para o tratamento de tais enfermidades.

1.5 Antifúngicos

É importante a descoberta de substâncias com potencial antifúngico devido à evolução contínua da resistência desses organismos tanto na medicina como na agricultura. A procura por agrotóxicos mais seguros, com menos toxicidade sobre o ambiente e os animais é uma grande preocupação (Oliva et al., 2003). Desta forma, estudos que visem o combate a fungos fitopatogênicos são de grande interesse agrícola, visto que os mesmos são responsáveis por grandes perdas e prejuízos de âmbito econômico, além dos danos ecológicos proporcionados pelo uso de pesticidas no seu combate.

Para estudar a atividade antifúngica, o presente trabalho realizou testes com fungos dos gêneros *Cladosporium* e *Colletotrichum*. Os fungos do gênero *Cladosporium* são, de maneira geral, saprofíticos do solo e de vegetais em decomposição, seus esporos são dispersos pelo ar, podendo causar alergias (Meng et al. 2012). Já os fungos do gênero *Colletotrichum*, são os responsáveis causadores de antracnose em diversas culturas, a qual é caracterizada pela desfolha precoce, podendo levar à morte do hospedeiro. O patógeno pode afetar qualquer

parte da planta, e quando a doença atinge o fruto, inutiliza-o para o consumo e, consequentemente para o comércio (Sussel, 2005).

O fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, é considerado uma espécie fitopatogênica em *Anacardium occidentale* L. (cajueiro), nos estados da Bahia, Ceara, Rio Grande do Norte e Piauí, em *Lycopersicon esculentum* Mill. (tomateiro), no Pernambuco, e também em *Zea mays* L. (milho), causando a podridão de Cladosporium (Mendes, Urban, 2014). Enquanto que o fungo *Cladosporium sphaerospermum* Penzig, é uma espécie comum e cosmopolita, ocorrendo como invasor secundário em diversas partes de plantas, como a rizosfera do feijão, e sementes de arroz e milho. É encontrado em ambientes como ar, solo, comidas e tinturas, e mostra-se sensível a diversas substâncias químicas (Hoog, Garro 1995). Em humanos, *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* podem causar feohifomicose subcutânea (Gugnani et al. 2000, Vieira et al. 2001, Qiu-Xia et al. 2007, Sang et al. 2011) e doenças do trato respiratório (Yano et al. 2003).

Já os fungos *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Penz. & Sacc. e *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., são causadores de antracnose em diversas culturas agrícolas, principalmente em *Averrhoa carambola* L. (carambola) e *Carica papaya* L. (mamoeiro), sendo os maiores responsáveis pelas perdas pós-colheita nas mesmas (Mendes, Urban, 2014).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Comparar o perfil químico de *A. schaueriana* coletada em dois diferentes locais, direcionando o estudo para a identificação dos compostos e/ou das classes de compostos responsáveis pelas atividades antifúngica e antioxidante.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o potencial antifúngico e antioxidante do extrato etanólico e das frações obtidas de caules e folhas de *A. schaueriana*, coletada nos dois locais.

2. Purificar as frações ativas e comparar o perfil químico e atividades biológicas entre as plantas dos dois locais.

3. Identificar as possíveis substâncias ativas.

3. Metodologia

3.1 Material vegetal

O material vegetal foi coletado em dois diferentes locais. Um deles foi o Parque Estadual da Ilha do Cardoso (RSCabral 16 - SP), sendo este material denominado *A. schaueriana* (IC) e o segundo local, o manguezal do município de Itanhaém (Cordeiro 3336), sendo este material portanto, denominado *A. schaueriana* (It). Após a triagem, em ambas as coletas, o material foi separado em folhas e caules, e colocado em estufa para secagem com circulação de ar à temperatura de 40° C. O material seco foi moído em moinho de facas para obtenção do pó (Moinho de facas TE 625 Tipo Cróton, Marca TECNAL, Mesh 20).

3.2 Extração

O material seco em pó, obtido de caules (1807g) e de folhas (965g) de *A. schaueriana* (IC), assim como o obtido de caules (695g) e folhas (445g) de *A. schaueriana* (It) foi submetido, separadamente, à extração com álcool etílico hidratado (92,8° INPM), por meio do aparelho ASE (Accelerated Solvent Extractor, ASE 300, marca DIONEX), colocando-se aproximadamente 30g de material em cada cela. A extração por meio deste aparelho ocorre à pressão, temperatura e tempo controlados, e as condições foram de 15 min. por cela, a 60°C. Após a obtenção da solução etanólica, a mesma foi concentrada em evaporador rotatório (BUCHI, Mod. R-114) e posteriormente liofilizada para obtenção do extrato etanólico seco.

3.3 Partição dos extratos

Os extratos etanólicos (EE) obtidos tanto de *A. schaueriana* (IC) como de *A. schaueriana* (It) foram submetidos a partições líquido/líquido com solventes orgânicos de polaridades crescentes: Éter de Petróleo, Clorofórmio e Acetato de Etila. No início da partição os EE foram solubilizados em uma solução de metanol (MeOH) e água (H₂O) na proporção de 8:2 (v/v) e levados a um funil de separação no qual foram adicionados, por partição, 50 mL de cada solvente, totalizando 5 filtrações. À medida que os solventes foram trocados, a proporção de água na mistura aumentou para 6:4 (v/v).

As frações e os resíduos obtidos no processo de partição foram concentrados em evaporador rotatório (BUCHI) e, posteriormente, permaneceram em banho-maria à temperatura de 50°C para a completa eliminação do solvente.

3.4 Análises cromatográficas

3.4.1 Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA)

Os extratos e frações foram analisados por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) utilizando placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (0,2 mm, Merck). As placas foram eluídas em sistema de solventes apropriados para cada ensaio biológico, da seguinte maneira:

- Clorofórmio e metanol (95:05, v/v) para os ensaios antifúngicos;
- A fase superior de BAW (n-butanol/ácido acético/água, 40:10:50) para os ensaios antioxidantes.

Após desenvolvimento da cromatografia, as placas foram observadas sob luz UV nos comprimentos de onda (λ) a 254 nm e 366 nm, em equipamento CAMAG ReproStar 3 e fotografadas em câmera Epson PhotoPC 3000Z, posteriormente sendo submetidas à ensaios de atividade biológica para a localização das frações ativas.

3.4.2 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP)

Considerando-se o forte potencial antifúngico detectado nos extratos de folhas e de caules de *A. schaueriana* proveniente dos dois locais de coleta, seguiu-se para a purificação das frações ativas através de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).

A CCDP foi realizada em placas de vidro de 20 X 20cm cobertas com sílica gel 60 PF₂₅₄ (Merck) na proporção de 6g de sílica em 15 mL de água destilada por placa, utilizando-se equipamento automático CAMAG para sua preparação com a espessura da camada de sílica ajustada para 0,5mm. O sistema de eluição utilizado foi CHCl₃:MeOH (95:5 v/v). Após a eluição e análise sob luz UV à (λ) 254 nm e 366 nm, as faixas de interesse foram marcadas, separadas e, posteriormente a sílica contendo material adsorvido foi submetida à filtração com metanol em sistema sob vácuo. As sub-frações resultantes foram levadas ao banho-maria (50 °C) para completa eliminação do solvente e re-submetidas à ensaios biológicos para a confirmação e seleção das mais ativas.

3.4.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para verificação do perfil cromatográfico dos extratos brutos, das frações e sub-frações, as mesmas foram diluídas em metanol na concentração de 1mg/mL, e injetadas uma a uma em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) Varian Pro Star 310 (analítico) com loop de 20 μ L. A coluna

utilizada foi uma Restek Ultra C-18 (150mm X 4,6mm: 5 μ m) com pré-coluna Polaris (Varian) A 2000-MG2. As análises foram realizadas nas seguintes condições:

- Fluxo de 1,6 mL/min;
- Injeção: 20 μ L;
- Fase móvel contendo metanol (MeOH), acetonitrila (ACN) e água deionizada (H₂O Mili-Q) em sistema de gradiente:
 - Tempo 0 min – [05:05:90],
 - Tempo 35 min – [05:55:40],
 - Tempo 40 min – [10:90:0];
- Detecção:
 - (λ) 254nm;
- Tempo total: 40 minutos.

3.5 Identificação dos compostos presentes nas frações purificadas

Com o objetivo de obter dados substanciais à identificação dos compostos, as frações e sub-frações de interesse foram analisadas por técnicas espectroscópicas diferentes e complementares, tais como: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrômetro de Massas (LC-MS – *Liquid Chromatography and Mass Spectrometry*) com analisador do tipo quadrupolar de armadilha de íons (ESI), e Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (GC-MS – *Gas Chromatography and Mass Spectrometry*) com analisador de massas quadrupolar.

3.5.1 Análise por LC-MS-MS/ESI(+)

As análises em LC-MS-MS/ESI(+) foram realizadas pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP). O sistema utilizado foi composto por um LC da marca Shimadzu, com bomba LC-10AD vp, detector UV-Vis SPD-M10A vp, injetor automático SIL-10AF, coluna Restek Ultra C-18 (150mm X 4,6mm: 5 μ m) com pré-coluna Polaris (Varian) A 2000-MG2, e um MS modelo Amazon Speed ETD da marca Bruker Daltonics, com ionização e analisador do tipo quadrupolar de armadilha de íons (ion trap). Todos os dados foram obtidos no modo positivo ESI(+).

As sub-frações foram preparadas na concentração de 1mg/mL de metanol, e as análises foram realizadas nas seguintes condições:

- Fluxo de 1 mL/min;

- Injeção: 20 µL;
- Fase móvel contendo acetonitrila (ACN – acidificada com 0,1% de ácido fórmico) e água deionizada (H₂O Mili-Q – acidificada com 0,1% de ácido fórmico) em sistema de gradiente:
 - Tempo 0 min – [10:90],
 - Tempo 35 min – [60:40],
 - Tempo 40 min – [100:0].
- Detecção:
 - Os perfis foram registrados a (λ) 254nm;
- Tempo total: 40 minutos.

3.5.2 Análise por CG-EM (GC-MS)

O sistema CG-EM é composto por um cromatógrafo gasoso Agilent (série 6890) Hewlett-Packard, acoplado a espectrômetro de massas, com sistema quadrupolo (Agilent 5973 Network Mass Selective Detector), e energia de ionização de 70eV. A coluna capilar utilizada foi HP 5-MS (3m x 0,2mm de diâmetro interno, com 0,25 cm de espessura). O Helio foi utilizado como gás de arraste a uma pressão de 80 KPa e velocidade linear de 1 mL/min.

Levando-se em consideração os diferentes aspectos, em relação à volatilidade das amostras a serem analisadas, foram utilizadas duas metodologias distintas:

Análise das frações apolares e sub-frações

As frações de éter de petróleo e as sub-frações ativas foram diluídas em metanol na concentração de 8mg/mL e analisadas nas seguintes condições: injetor a 260°C, com volume de injeção de 1,5µL. Temperatura inicial de 75°C mantida por 10 minutos e aquecimento da coluna em 10°C por minuto até 280°C por 20 minutos (tempo total de análise de 51 min.).

Análise das frações de polaridade média a alta

Por serem amostras de maior polaridade, e consequentemente possuírem compostos de mais difícil volatilização, as frações clorofórmicas, frações de acetato de etila e os resíduos hidrometanólicos foram submetidos ao processo de metilação para verificar a ocorrência de compostos ácidos, segundo metodologia proposta por Shafaghat (2011), que consiste em adicionar 2mL de hexano para cada 100mg de amostra (devidamente pesada e armazenada em tubo plástico) e agitar, adicionando posteriormente 200 µL de uma solução metanólica de hidróxido de potássio (KOH) 2Mol/L. Vedar o tubo com tampa PTFE, e agitar vigorosamente (em aparelho Vortex) durante 60 segundos. Deixar em repouso até o sobrenadante clarear

para coletá-lo em seguida, pois esta é a fase que contém os ésteres metílicos. A solução pode ser mantida em refrigerador até a análise por no máximo 12 horas.

Após a metilação das amostras, as mesmas foram analisadas nas seguintes condições: injetor a 250°C, com volume de injeção de 1,5µL. Temperatura inicial de 60°C mantida por 3 minutos e aquecimento da coluna em 5°C por minuto até 220°C por 5 minutos (totalizando 40 min. de análise).

A identificação dos compostos foi baseada na comparação dos espectros de massas encontrados com os da biblioteca NIST 08 instalada no equipamento e com dados da literatura de compostos já identificados para o gênero *Avicennia*, bem como de outros gêneros característicos de manguezal.

3.6 Quantificação de Fenóis Totais

A quantificação de fenóis totais foi realizada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Marinova et al. (2005), com adaptações para microplaca.

Para realizar a quantificação é necessária a comparação das absorbâncias das amostras com as de uma curva padrão, portanto, foi preparada uma curva de ácido gálico nas concentrações de 20µg/ml; 40µg/ml; 60µg/ml; 80µg/ml; 100µg/ml; 120µg/ml; e 140µg/ml. Os extratos e frações foram diluídos na concentração de 500µg/mL.

O ensaio, realizado em triplicata, consiste em adicionar em cada cavidade da microplaca, na seguinte ordem: 90µL de água destilada, 10µL de padrão ou amostra, 10µL do reagente Folin-Ciocalteu e esperar 5 minutos. Logo após, adicionar 100µL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 7% (em água destilada), 40µL de água destilada, misturar e incubar por 90 minutos. A leitura foi feita a 750nm em aparelho BIOTEK KC4 e os resultados foram expressos em porcentagem de fenóis em equivalentes de ácido gálico.

3.7 Revelações químicas

Para a detecção de flavonoides, foram realizadas duas revelações químicas, sendo uma com NP-PEG e outra com Cloreto de Alumínio (AlCl_3 - 5%).

Para tanto, alíquotas de 200 µg do extrato etanólico (EE) de caules e folhas, e alíquotas de 100 µg das frações de ambas as amostras (It e IC), foram aplicadas em placas de camada delgada (CCD) de sílica gel 60 F₂₅₄ (0,2 mm, Merck), e eluídas com a fase superior de BAW (n-butanol/ácido acético/água, 40:10:50), usando como controle positivo a

Quercetina (2,5 µg), dissolvida em metanol. Logo após a eliminação do solvente, os cromatogramas foram revelados com as soluções dos reagentes, seguindo os protocolos:

NP-PEG:

Borrifar primeiro solução A (2-Aminoetil difenilborato – 1% em MeOH) e depois a solução B (polietileno glicol 6000 – 5% em EtOH). Visualizar sob luz UV (366nm).

AlCl₃ – 5%:

Borrifar na placa uma solução de Cloreto de Alumínio (5% em EtOH) e visualizar sob luz UV (366 nm).

3.8 Atividades Biológicas

3.8.1 Atividade Antioxidante (anti-radicalar)

3.8.1.1 Ensaio qualitativo por autografia em cromatografia de camada delgada

Alíquotas de 200 µg do extrato etanólico (EE) de caules e folhas, e alíquotas de 100 µg das frações de ambas as amostras (It e IC), foram aplicadas em placas de camada delgada (CCD) de sílica gel 60 F₂₅₄ (0,2 mm, Merck), e eluídas com a fase superior de BAW (n-butanol/ácido acético/água, 40:10:50), usando como controle positivo a Quercetina (2,5 µg), diluída em metanol. Logo após a eliminação do solvente, os cromatogramas foram revelados com uma solução metanólica do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (0,2%, DPPH, Sigma). Após um período de 30 minutos, manchas brancas ou amarelas apareceram sob um fundo roxo, as quais são indicativas de atividade antioxidante (Cuendt *et al.* 1997). Os resultados foram observados e fotografados em sistema CAMAG.

3.8.1.2 Ensaio quantitativo em microplaca

Os extratos etanólicos e as frações obtidas através da partição líquido/líquido de ambas as amostras (It e IC), foram submetidos inicialmente, à quantificação do potencial antioxidante em microplaca para a determinação da porcentagem de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), de coloração púrpura que absorve a 518nm. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R•), o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância.

Para isso, nas 96 cavidades da microplaca foram adicionados 71,4 µL de solução metanólica de DPPH (0,3 mM) juntamente com 178,5 µL das amostras dos extratos

etanólicos (concentração de 200 µg/mL/cavidade da microplaca) e das frações (concentração de 100 µg/mL/cavidade da microplaca). O controle negativo foi realizado com 71,4 µL de solução metanólica de DPPH (0,3 mM) e 178,5 µL de metanol. Como controle positivo foi utilizado a Quercetina (4 µg/mL). A microplaca foi mantida em temperatura ambiente, na ausência de luz, e a absorbância foi medida aos 15 e 30 minutos de reação, a 518 nm, em aparelho BIOTEK KC4.

O cálculo da porcentagem de inibição é realizado comparando-se as velocidades de reação das amostras em relação ao branco.

3.8.2 Atividade Antifúngica

3.8.2.1 Ensaio qualitativo por bioautografia em cromatografia de camada delgada

Os fungos filamentosos *Cladosporium sphaerospermum* Penzing (CCIBt 491), *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries (CCIBt140) e *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Penz. & Sacc. (MMBF 994) foram utilizados como reveladores nos bioensaios de detecção de substâncias fungitóxicas.

Para a obtenção das culturas, os fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* foram mantidos em placas com meio BDA (batata – dextrose – ágar) e *Colletotrichum lagenarium*, em placas contendo meio aveia – ágar, incubadas a 27°C, no escuro, por 14 dias. As suspensões de conídios dos fungos foram obtidas em solução de sais e glicose 30% na proporção 6:1 e armazenadas em freezer.

Para a avaliação da atividade antifúngica, alíquotas de 400 µg do extrato etanólico (EE) de caules e folhas, 200 µg das frações, e 100 µg das sub-frações de ambas as amostras (It e IC), foram aplicadas em placas de camada delgada (CCD) de sílica gel 60 F₂₅₄ (0,2 mm, Merck), e eluídas no sistema de solventes CHCl₃:MeOH (95:05, v/v), usando como controle positivo a Nistatina (1 µg). Após a eliminação completa dos solventes, as cromatoplas foram borrifadas com a suspensão de conídios dos fungos (>2x10⁶ conídios/mL) e incubadas em câmara úmida a 27°C, por 48 horas, no escuro (Homans & Fuchs, 1970). Após este período, a presença de zonas claras de inibição indicou a ocorrência de compostos com atividade antifúngica. Os resultados foram observados, registrados em sistema CAMAG e os valores de R_f calculados.

3.8.2.2 Ensaio quantitativo pelo método de diluição em Agar

O ensaio quantitativo foi realizado com o fungo filamentoso *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (MMBF 03/99) em razão de sua alta fitopatogenicidade para diversas plantas de interesse agrônomo, porém com baixa produção de conídios para utilização em bioautografia direta em CCD.

Para a obtenção da cultura do fungo *C. gloeosporioides*, o mesmo foi mantido em placas com meio BDA, as quais foram incubadas a 27°C, no escuro, por 14 dias. A suspensão de conídios foi obtida por meio da raspagem do micélio, deposição em tubo contendo água destilada estéril e em seguida agitação em vortex para liberação dos conídios presentes no micélio. Posteriormente, a suspensão foi filtrada com gaze.

Os extratos e frações ativas detectadas pelo bioensaio de atividade antifúngica por CCD foram submetidos à quantificação do potencial antifúngico em placas de Petri. Para isso, amostras de extratos (2mg/mL) e de frações (0,5mg/mL) diluídas em metanol, foram adicionadas ao meio de cultura BDA. Como controles foram utilizados o meio BDA sem adição de amostra (controle negativo) e com adição de metanol (controle do solvente). Após a solidificação dos meios, foram depositados discos blanque estéreis no centro das placas. Alíquotas de 10µL da suspensão de conídios ($2,5 \times 10^5$ conídios/mL) foram inoculadas sobre os discos, e as placas de Petri foram vedadas com parafilme e incubadas a 27°C, no escuro. Os ensaios foram realizados em triplicatas para cada amostra, e o diâmetro do crescimento do micélio do fungo foi medido diariamente por um período de cinco dias, onde a porcentagem de inibição foi determinada pela comparação do controle negativo com os tratamentos.

Os valores do diâmetro de crescimento foram utilizados para determinar o IVCN (Índice de Velocidade de Crescimento Micelial), expresso em cm/dia (Abreu et al., 2008) de acordo com a equação:

$$IVCN = \frac{\sum (D - D.A)}{N}$$

Onde, D: Diâmetro médio atual; D.A: Diâmetro médio anterior; N: Número de dias após a inoculação.

Com os valores de IVCN foi realizada a comparação através do teste estatístico ANOVA One-Way seguido do pós-teste de Tukey e Teste t de *Students* quando necessário, sendo considerados como valores significantes $p < 0,05$.

3.8.2.3 Concentração Mínima Inibitória (CMI) por meio de microdiluição

Os extratos e frações ativas detectadas pelo bioensaio de atividade antifúngica por CCD foram submetidos à determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) com os fungos *C. gloeosporioides* e *C. sphaerospermum*. A CMI foi realizada seguindo a mesma metodologia do ensaio quantitativo de diluição em Ágar, porém reduzida para microplaca.

Para isso, amostras de extratos e frações foram diluídas em metanol em diferentes concentrações (iniciando com 10mg/mL até 500µg/mL) e adicionadas ao meio de cultura BDA ainda quente (100µL/cavidade). Como controles foram utilizados o meio BDA sem adição de amostra (controle negativo) e com adição de metanol (controle do solvente). Após a solidificação dos meios, alíquotas de 5µL da suspensão de conídios ($2,5 \times 10^5$ conídios/mL, tanto no teste com *C. gloeosporioides* como com *C. sphaerospermum*), foram inoculadas. As microplacas foram vedadas com filme plástico e incubadas a 27°C no escuro. Os ensaios foram realizados em triplicatas para cada amostra, e após um período de dois dias foi possível observar a presença ou ausência de crescimento dos fungos, sendo as concentrações presentes nas cavidades ausentes de crescimento fúngico, consideradas como concentrações mínimas inibitórias.

4. Resultados e Discussão

4.1 Obtenção, rendimento e perfil cromatográfico do Extrato Etanólico (EE)

Após o processo de extração do material em pó e posterior liofilização, foi possível comparar os rendimentos entre os órgãos vegetais estudados, bem como entre os indivíduos provenientes dos dois locais. No total, foram obtidos quatro extratos etanólicos (EE): EE-Folhas (IC), EE-Caules (IC), EE-Folhas (It) e EE-Caules (It). Os rendimentos obtidos nas extrações estão descritos na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1: Rendimento dos extratos etanólicos.

	Ilha do Cardoso		Itanhaém	
	Folhas	Caules	Folhas	Caules
Material seco (g)	964,7	1807	445	695
Extrato etanólico (g)	32,75	52,11	23,59	29,54
RENDIMENTO	3,39%	2,88%	5,30%	4,25%

Em ambos os materiais (IC e It), as folhas apresentaram maior rendimento em relação aos caules, o que já era esperado, pois é nas folhas que se encontra a maior parte da matéria orgânica vegetal distribuída em diversos compartimentos celulares, como por exemplo, o vacúolo, que apresenta acúmulo ativo de solutos, tais como, íons inorgânicos dissolvidos, ácidos orgânicos, açúcares, enzimas e grande parte dos metabólitos secundários (Taiz & Zeiger, 2010).

Analisando a Tabela 1 acima, observa-se ainda que de maneira geral, o rendimento do material de Itanhaém foi superior ao da Ilha do Cardoso. Quanto a isso, Falkenberg et al. (1999), apontam que o teor de metabólitos secundários pode ser influenciado por vários fatores que vão além da parte anatômica utilizada, como por exemplo, o local e época de coleta. Gobo-Neto e Lopes (2007), explicam que diversos fatores, como os fisiológicos (nutrição, fenologia, genética), os climáticos (precipitação, temperatura, radiação solar), geográficos (altitude, poluição atmosférica) e ecológicos (competição, herbivoria) atuando em conjunto podem alterar a taxa de produção e acúmulo dos metabólitos secundários. Desta forma, é possível inferir que ao menos o teor de compostos produzidos por *A. schaueriana* apresenta-se variável entre os dois indivíduos estudados no presente trabalho, pois ao analisar o perfil cromatográfico obtido através de HPLC analítico dos extratos etanólicos, apresentado

nas Figuras 4 e 5 a seguir, observa-se clara diferença de abundância entre os picos majoritários dos extratos quando comparados entre si.

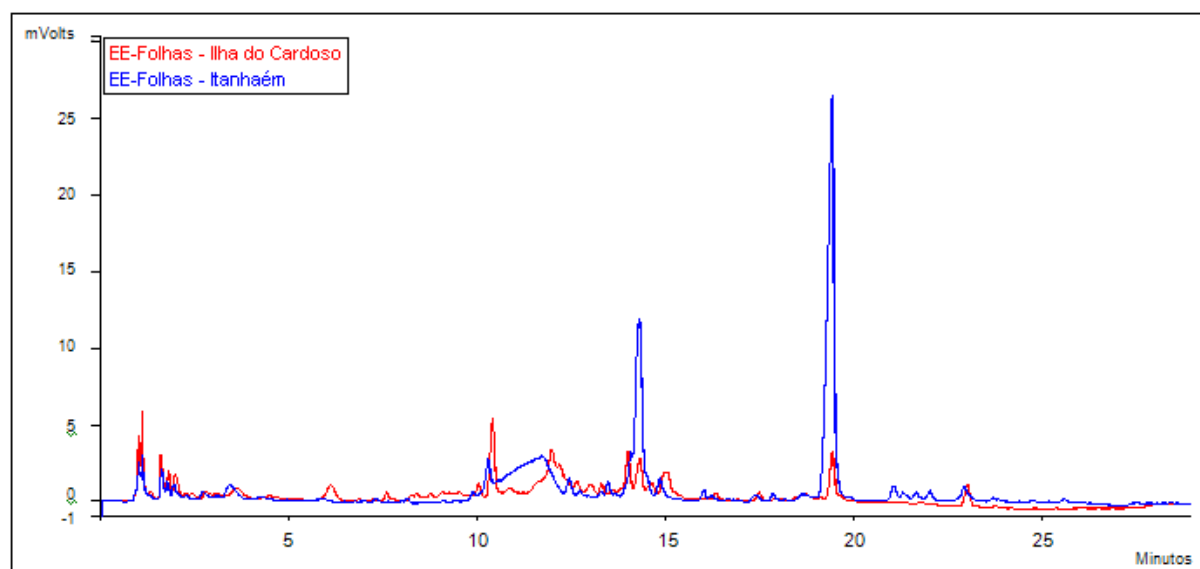


Figura 4: Perfil cromatográfico obtido por HPLC analítico dos extratos de folhas em (λ) 254nm. Em vermelho – perfil cromatográfico do extrato etanólico de folhas da Ilha do Cardoso. Em azul - perfil cromatográfico do extrato etanólico de folhas de Itanhaém.

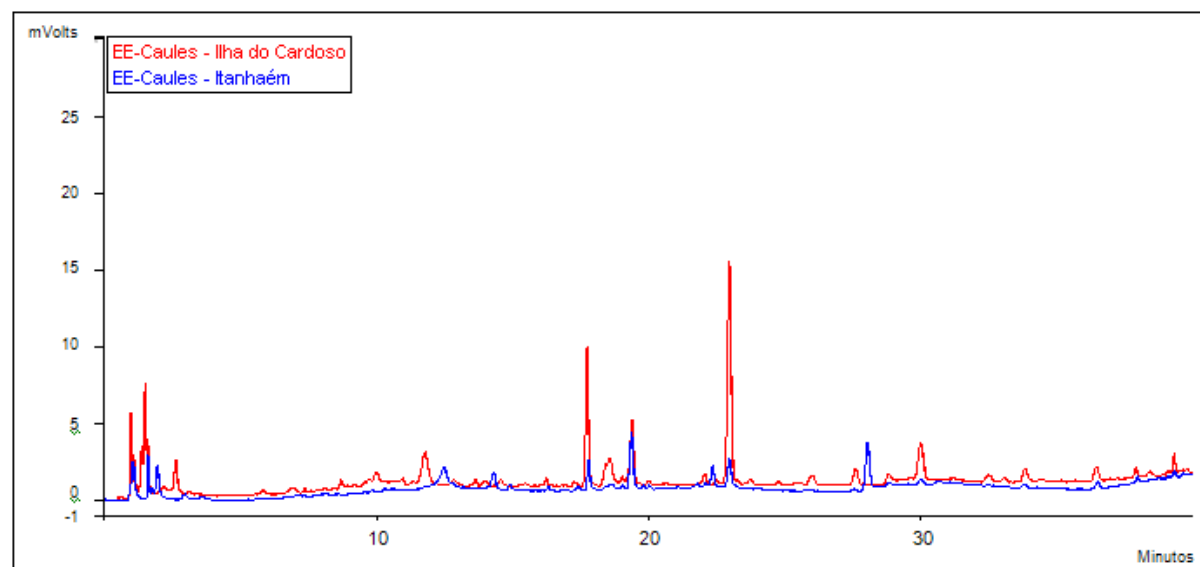


Figura 5: Perfil cromatográfico obtido por HPLC analítico dos extratos de caule em (λ) 254nm. Em vermelho – perfil cromatográfico do extrato etanólico de caule da Ilha do Cardoso. Em azul - perfil cromatográfico do extrato etanólico de caule de Itanhaém.

4.2 Obtenção, rendimento e perfil cromatográfico das Frações

Durante o processo de partição líquido/líquido com os solventes de polaridade crescente, formaram-se algumas emulsões que também foram separadas para os testes biológicos, por este motivo a quantidade de resíduos obtida foi diferente entre os extratos:

para *A. schaueriana* (IC), foram obtidos 4 resíduos de folhas e 6 resíduos de caules (sendo dois deles, emulsões), e para *A. schaueriana* (It), foram obtidos 5 resíduos de folhas e 5 resíduos de caules (com uma fase de emulsão em cada um). A Tabela 2 a seguir, apresenta as massas de cada fração acompanhadas de seu rendimento (em porcentagem) em relação ao extrato etanólico.

Tabela 2: Frações obtidas após partição líquido/líquido, com suas respectivas massas e rendimentos.

Frações	Ilha do Cardoso		Itanhaém	
	Folhas	Caules	Folhas	Caules
Éter de Petróleo	4,646g - 16,9%	5,657g - 11,6%	2,352g - 11,6%	2,852g - 10,8%
Éter de Petróleo - emulsão	-	7,329g - 15%	0,754g - 3,7%	2,582g - 9,8%
Clorofórmio	2,689g - 9,3%	9,258g - 18,9%	3,899g - 19,2%	6,399 - 24,4%
Acetato de Etila	2,297g - 7,9%	4,028g - 8,2%	2,445g - 12,1%	1,480g - 5,6%
Acetato de Etila - emulsão	-	0,085g - 0,17%	-	-
Resíduo hidrometanólico	10,313g - 35,5%	16,83g - 34,5%	7,048g - 34,7%	7,859g - 29,9%

Mais uma vez, é possível notar diferenças ao fazer a comparação entre os rendimentos das frações de IC e It, sendo que as frações de Éter de Petróleo (EP) da Ilha do Cardoso apresentaram maior rendimento em relação às mesmas frações de Itanhaém, enquanto que as frações Clorofórmicas (CHCl_3) tiveram rendimento menor. Já para as Frações de Acetato de Etila (AcOEt), as folhas apresentaram maior rendimento quando particionadas do extrato de Itanhaém, enquanto os caules foram mais rendosos quando provenientes do extrato da Ilha do Cardoso.

Ao analisar o perfil cromatográfico das frações, obtido por meio de CCD analítico e visualizado sob luz ultravioleta de (λ) 254nm e 366nm, apresentado na Figura 6 a seguir, as diferenças detectadas no rendimento se confirmam através da disparidade nas intensidades das manchas escuras sob visualização de (λ) 254nm, principalmente nas frações de EP, que são muito mais intensas em IC do que em It, e na presença de mais manchas avermelhadas sob visualização de (λ) 366nm nas frações de Itanhaém, além da detecção de manchas esverdeadas no EE-Caules e CHCl_3 -Caules que não se fizeram presentes nas frações correspondentes da Ilha do Cardoso.

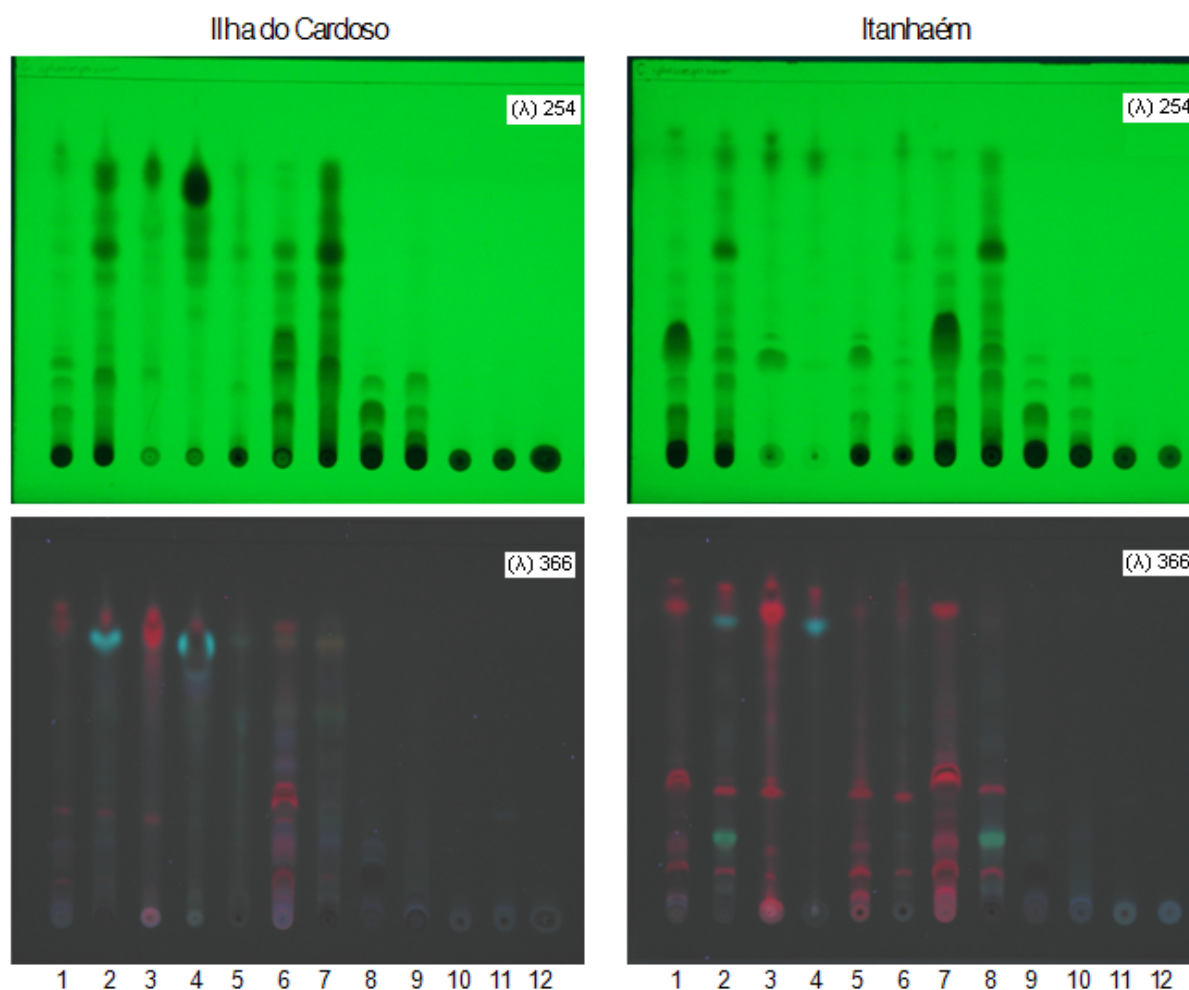


Figura 6: Placas de CCD analítica (de sílica gel F₂₅₄ eluídas em CHCl₃/MeOH 95:5) das frações de *A. schaueriana* (IC e It). Ilha do Cardoso (IC): 1- EE-F, 2- EE-C, 3- EP-F, 4- EP-C, 5- EP-C emulsão, 6- CHCl₃-F, 7- CHCl₃-C, 8- AcOEt-F, 9- AcOEt-C, 10- AcOEt-C emulsão, 11- MeOH/H₂O-F, 12- MeOH/H₂O-C. Itanhaém (It): 1- EE-F, 2- EE-C, 3- EP-F, 4- EP-C, 5- EP-F emulsão, 6- EP-C emulsão, 7- CHCl₃-F, 8- CHCl₃-C, 9- AcOEt-F, 10- AcOEt-C, 11- MeOH/H₂O-F, 12- MeOH/H₂O-C.

4.3 Atividades biológicas

4.3.1 Avaliação do potencial antioxidante e quantificação de fenóis totais

Após a realização da autografia em CCD foi possível verificar a localização dos compostos com atividade antioxidante. As Figuras 7 e 8 a seguir apresentam as autografias dos extratos e frações de *A. schaueriana* (IC) e *A. schaueriana* (It) respectivamente, reveladas com o radical livre DPPH.

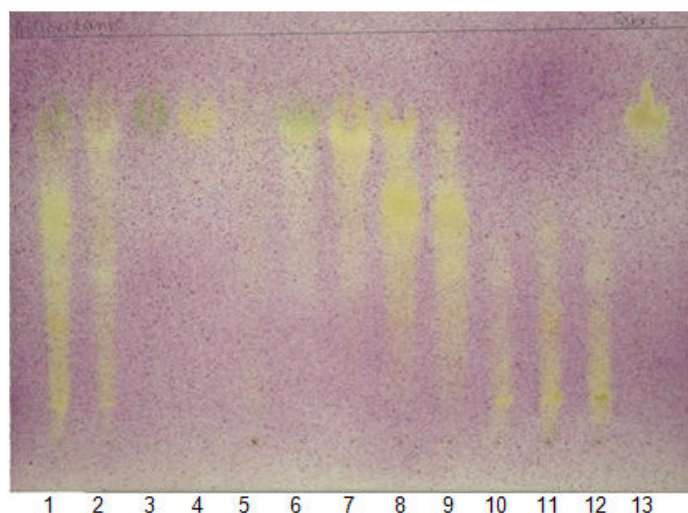


Figura 7: Autografia (CCD, em sílica gel F₂₅₄ eluída em BAW, e revelada com DPPH) de *A. schaueriana* (IC). 1- EE-F, 2- EE-C, 3- EP-F, 4- EP-C, 5- EP-C emulsão, 6- CHCl₃-F, 7- CHCl₃-C, 8- AcOEt-F, 9- AcOEt-C, 10- AcOEt-C emulsão, 11- MeOH/H₂O-F, 12- MeOH/H₂O-C, 13- Quercetina.

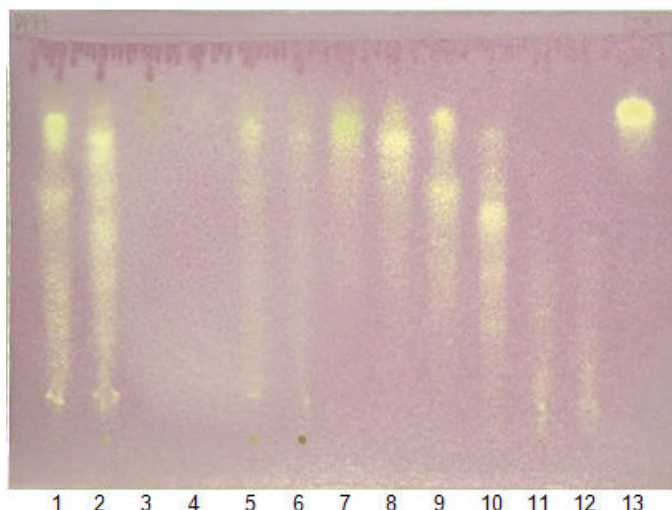


Figura 8: Autografia (CCD, em sílica gel F₂₅₄ eluída em BAW, e revelada com DPPH) de *A. schaueriana* (It). 1- EE-F, 2- EE-C, 3- EP-F, 4- EP-C, 5- EP-F emulsão, 6- EP-C emulsão, 7- CHCl₃-F, 8- CHCl₃-C, 9- AcOEt-F, 10- AcOEt-C, 11- MeOH/H₂O-F, 12- MeOH/H₂O-C, 13- Quercetina.

Devido à formação de rastros, não foi possível calcular os Rfs. A partir da análise das figuras é possível detectar que o perfil de atividade das frações é semelhante, porém a intensidade é distinta. As manchas de atividade das frações de *A. schaueriana* (It) são menores e apresentam coloração amarelada menos intensa quando comparadas às manchas das frações de *A. schaueriana* (IC), sugerindo maior potencial antioxidante nesta última, informação esta, que se comprova na quantificação do potencial antioxidante realizada através de microplaca, a qual se encontra exposta no gráfico da Figura 9 a seguir.

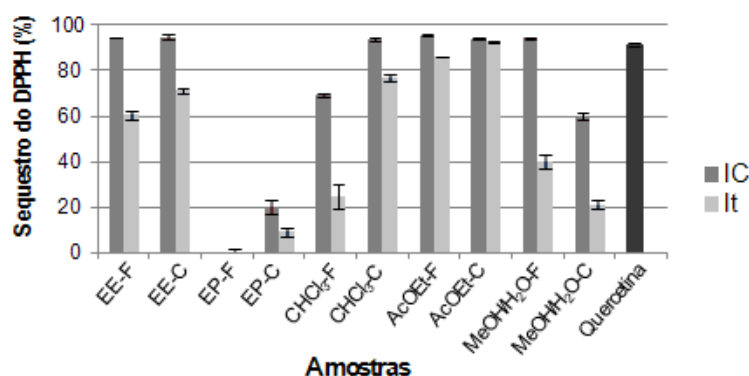


Figura 9: Gráfico de porcentagem do sequestro do radical livre DPPH pelos extratos e frações de *A. schaueriana* (IC e It). Barras vermelhas – Extratos e frações de *A. schaueriana* (IC); Barras azuis – Extratos e frações de *A. schaueriana* (It). Extratos brutos na concentração de 200 µg/mL, e frações na concentração de 100 µg/mL.

Comparando-se o percentual de sequestro dos extratos e frações de ambos os locais coletados, é possível afirmar que *A. schaueriana* (IC) apresenta maior potencial antioxidante em relação à *A. schaueriana* (It), sendo que o EE-F e C (IC) apresentaram 94% de sequestro, enquanto que o EE-F e C (It) apresentaram 60% e 71% de sequestro respectivamente. Dentre as frações da Ilha do Cardoso todas, exceto as de EP, apresentaram sequestro superior a 60%. Já para as frações de Itanhaém apenas CHCl₃-C, AcOEt-F e C apresentaram percentual superior a 60%, as demais exibiram sequestro inferior a 40%.

Dentre as diversas substâncias antioxidantes de ocorrência natural, podem ser citadas como principais as vitaminas C e E, os carotenoides, e em maior destaque os compostos fenólicos, os quais têm recebido muita atenção nos últimos anos devido a propriedades redutoras relacionadas à sua estrutura química, a qual possui características que desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (Haslam, 1996; Chum et al., 2005; Sousa et al., 2007; Podsdek, 2007; Silva et al., 2010). Por este motivo, foi feita a quantificação de fenóis totais presentes nos extratos e frações, e os resultados encontram-se expressos do gráfico da Figura 10 a seguir.

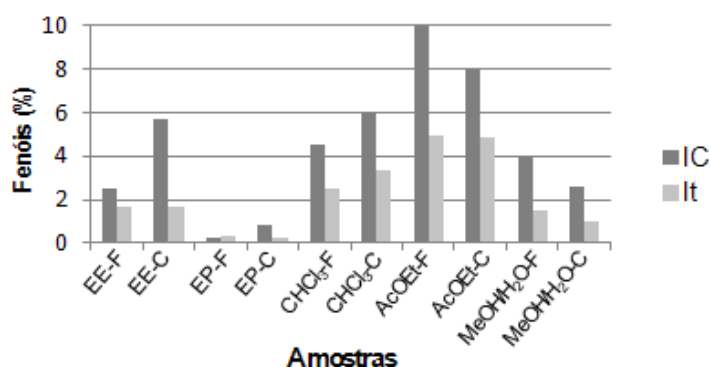


Figura 10: Gráfico do percentual de fenóis totais nos extratos e frações de *A. schaueriana* (IC e It). Barras vermelhas – Extratos e frações de *A. schaueriana* (IC); Barras azuis – Extratos e frações de *A. schaueriana* (It).

Como observado no gráfico, os extratos da Ilha do Cardoso apresentaram percentual maior de compostos fenólicos em relação aos de Itanhaém, com 2,5% em EE-F (IC), 5,7% em EE-C (IC) e 1,6% em EE-F e C (It). Para as frações, a quantificação de compostos fenólicos apresentou relação direta com o percentual de sequestro dos radicais livres, sendo as amostras com maiores quantidades de fenóis, as que também apresentaram maior percentual de sequestro do radical, sugerindo desta forma, que haja uma estreita relação entre os compostos fenólicos produzidos por *A. schaueriana* e sua capacidade antioxidante. Observa-se ainda que o percentual de fenóis totais é superior nos extratos e frações da Ilha do Cardoso em comparação aos de Itanhaém. Os valores exatos do percentual de fenóis totais quantificado nas amostras estão presentes na Tabela 3 a seguir.

Tabela 3: Percentual de fenóis totais nos extratos e frações de *A. schaueriana* (IC e It).

Amostras	Fenóis Totais (%)	
	IC	It
EE-F	2,51	1,69
EE-C	5,73	1,69
EP-F	0,24	0,32
EP-C	0,85	0,20
CHCl3-F	4,52	2,46
CHCl3-C	6,01	3,32
AcOEt-F	10,33	4,96
AcOEt-C	7,98	4,83
MeOH/H2O-F	3,93	1,49
MeOH/H2O-C	2,60	0,98

Os compostos fenólicos exibem uma grande diversidade de estruturas das quais pelo menos um hidrogênio do anel aromático é substituído por um grupo hidroxila. Nesta classe são encontradas estruturas tão variadas quanto à dos ácidos fenólicos, dos derivados da cumarina, os pigmentos hidrossolúveis (das flores, dos frutos e das folhas), polímeros como as ligninas e os taninos (Simões et al., 2003) e os flavonoides que representam um dos grupos fenólicos mais importantes, diversos e amplamente distribuídos em plantas. Estes compostos atuam como antioxidantes (Harborne, 1989; Harborne & Williams, 2000), devido à presença dos átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila adjacentes, das duplas ligações dos anéis benzênicos e da dupla ligação da função oxo ($-C=O$) de algumas moléculas de flavonoides, que garantem a esses compostos tal atividade (Silva et al., 2010).

Portanto, para verificar se a atividade antioxidante em *A. schaueriana* está relacionada à presença de flavonoides, foram realizadas duas revelações químicas com as frações de atividade mais intensa, sendo uma com NP-PEG e outra com Cloreto de Alumínio (AlCl_3 – 5%). A comparação das revelações químicas com o perfil de atividade antioxidante entre os extratos e frações da Ilha do Cardoso e Itanhaém encontra-se exibida na Figura 11 a seguir.

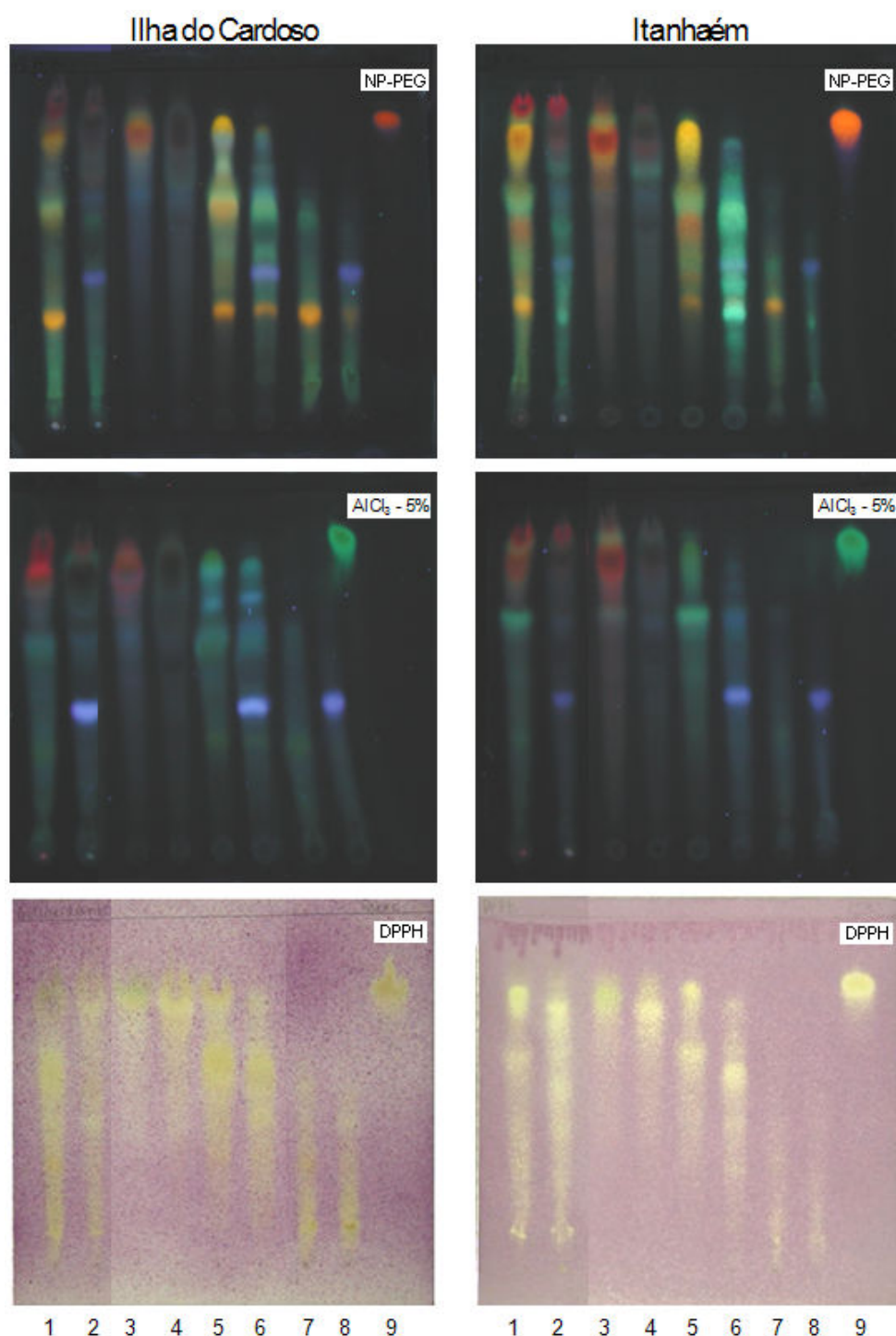


Figura 11: Comparação das revelações químicas (NP-PEG e AlCl_3 – 5%) com o perfil de atividade antioxidante em CCD analítica dos extratos e frações de *A. schaueriana* (IC e It). Placas de sílica gel F_{254} eluídas com BAW, e reveladas com: Duas placas superiores – NP-PEG; Duas placas do meio – AlCl_3 – 5%; Duas placas inferiores – DPPH. **IC e It** - 1- EE-F, 2- EE-C, 3- CHCl_3 -F, 4- CHCl_3 -C, 5- AcOEt -F, 6- AcOEt -C, 7- $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ -F, 8- $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ -C, 9- Quercetina.

As manchas indicativas da presença de flavonoides nas revelações químicas (coloridas no NP-PEG, e azul e verde no AlCl_3 – 5%), coincidem com o perfil de atividade antioxidante revelado com DPPH. No entanto, existe uma diferença qualitativa na fração de número 6 (AcOEt-C) detectada na revelação com NP-PEG, onde ela se mostra com uma variedade de colorações em IC que não é aparente em It, sendo que esta última apresenta perfil de coloração esverdeada. Observa-se ainda que esta mesma coloração esverdeada também é mais intensa nos extratos etanólicos de It em relação aos de IC.

Levando-se em consideração que a quantidade de compostos fenólicos nas amostras está diretamente relacionada ao percentual de sequestro do radical livre, bem como a localização dos flavonoides detectados nas revelações químicas, coincide com os focos de atividade antioxidante observados em CCD, é possível sugerir que parte da atividade antioxidante em *A. schaueriana* está relacionada a esta classe de compostos do metabolismo secundário.

O potencial antioxidante detectado em *A. schaueriana*, pode estar ligado às estratégias de sobrevivência da planta em seu meio característico, pois por estarem sujeitos ao regime das marés, os manguezais são ecossistemas de alta salinidade e, portanto ambientes com elevado grau de estresse abiótico. Os íons de sódio em solos salinos são tóxicos, desfavorecendo a nutrição potássica, a atividade das enzimas citosólicas, a fotossíntese e o metabolismo de maneira geral. Desta forma, espécies típicas de manguezal possuem características que auxiliam a suportar a alta salinidade, como a presença de glândulas que expelem sal, aliadas a um eficiente sistema antioxidante (Parida; Jha, 2010). Sendo assim, é completamente plausível que ocorram diferenças no potencial desse sistema antioxidante, já que as condições do meio abiótico podem variar de local para local.

4.3.2 Avaliação do potencial antifúngico e purificação das frações ativas

Após a realização da bioautografia em CCD foi possível verificar a localização dos compostos com atividade antifúngica. A Figura 12 a seguir apresenta as bioautografias dos extratos e frações de *A. schaueriana* (IC e It) reveladas com os fungos *C. sphaerospermum*, *C. cladosporioides* e *C. lagenarium* respectivamente.

Analisando as bioautografias, nota-se que para os extratos e frações provenientes do mesmo local, o perfil de atividade é praticamente o mesmo para os três fungos testados. Além disso, a presença de valores iguais de R_f entre diferentes frações pode indicar que a variedade de compostos com atividade antifúngica não seja muito grande, e que tais compostos estejam apenas distribuídos em quantidades distintas entre as frações.

A determinação do Rf (fator de retenção) é importante na identificação das substâncias (Mariano, *et al.*, 2010), sendo portanto um dos fatores mais significantes em CCD, ele se dá pela razão entre a distância percorrida pela substância em questão e a distância percorrida pela fase móvel (Degani, *et al.*, 1998). Tendo os seus valores definidos, torna-se possível fazer a comparação com valores de Rf de substâncias conhecidas, ou padrão (Mariano, *et al.*, 2010).

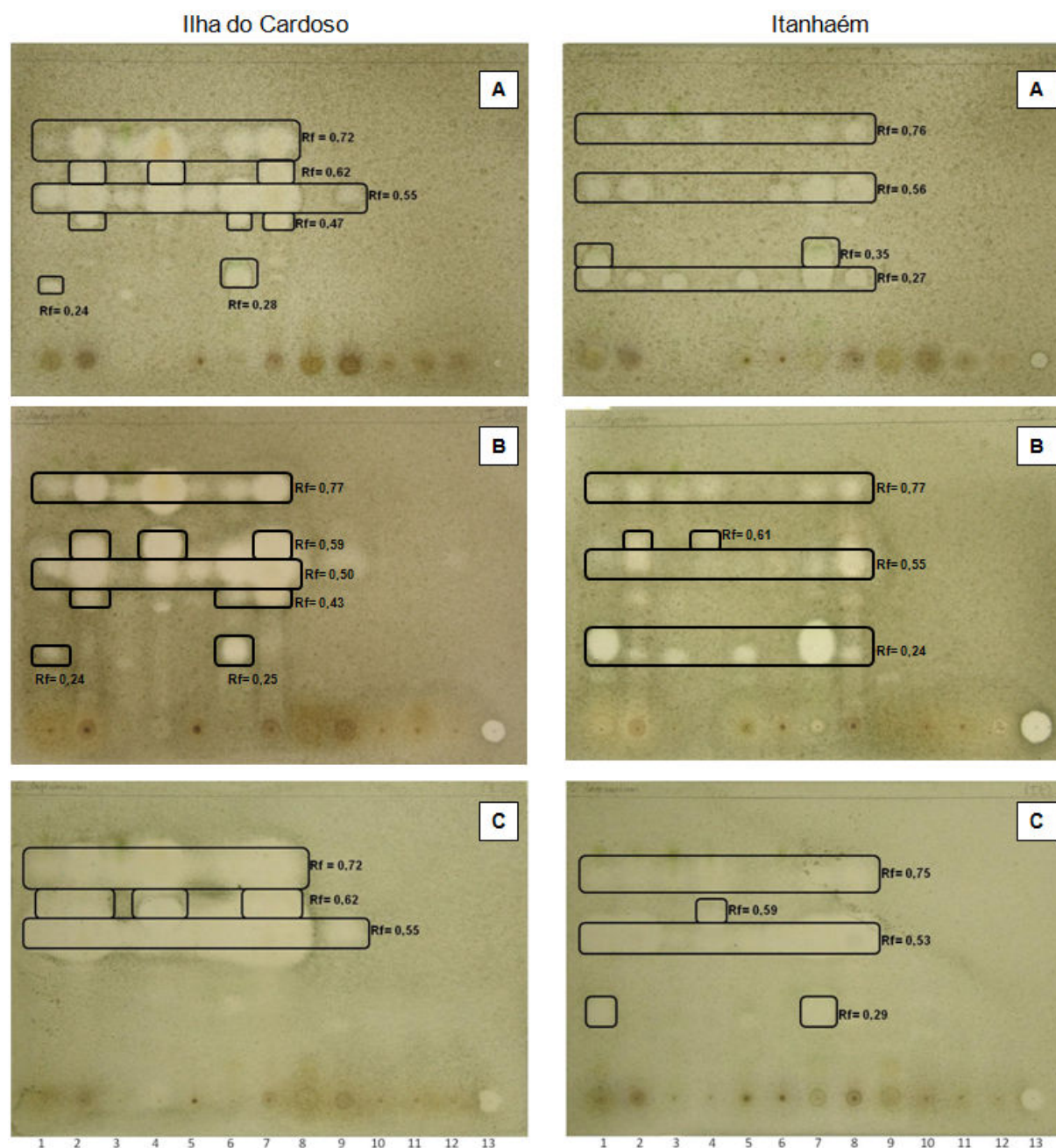


Figura 12: Bioautografias (CCD, em sílica gel F₂₅₄ eluídas em CHCl₃/MeOH 95:5) dos extratos e frações de *A. schaueriana* (IC e It), reveladas com: **A** – *C. sphaerospermum*; **B** – *C. cladosporioides*; **C** – *C. lagenarium*. **Ilha do Cardoso** – 1- EE-F, 2- EE-C, 3- EP-F, 4- EP-C, 5- EP-C emulsão, 6- CHCl₃-F, 7- CHCl₃-C, 8- AcOEt-F, 9- AcOEt-C, 10- AcOEt-C emulsão, 11- MeOH/H₂O-F, 12- MeOH/H₂O-C, 13- Nistatina. **Itanhaém** – 1- EE-F, 2- EE-C, 3- EP-F, 4- EP-C, 5- EP-F emulsão, 6- EP-C emulsão, 7- CHCl₃-F, 8- CHCl₃-C, 9- AcOEt-F, 10- AcOEt-C, 11- MeOH/H₂O-F, 12- MeOH/H₂O-C, 13- Nistatina.

Enquanto o perfil de atividade antifúngica é semelhante entre os três fungos testados para os extratos e frações de um mesmo local, comparando-se as bioautografias entre IC e It, é possível inferir que haja compostos ativos diferentes sendo produzidos, e também que os mesmos estejam presentes em concentrações distintas em cada planta.

Dentre os extratos e frações da Ilha do Cardoso e Itanhaém testados, os que apresentaram maior potencial antifúngico foram EE-F e C, EP-F e C e CHCl₃-F e C, sendo que AcOEt-C (IC) também apresentou atividade, porém um pouco mais fraca. Desta forma, estes foram os extratos e frações selecionados para o teste contra o fungo *C. gloeosporioides* pelo método de diluição em Ágar. As Figuras 13 e 14 retratam o experimento após cinco dias de cultivo com as amostras da Ilha do Cardoso e Itanhaém, respectivamente, e as porcentagens de inibição bem como os valores do IVCm (Índice de Velocidade de Crescimento Micelial) calculados para cada amostra encontram-se expressos na Tabela 4 a seguir, e ilustrados na Figura 15.

Tabela 4: IVCm e porcentagem de inibição de *C. gloeosporioides* calculados à partir do ensaio de diluição em Ágar, realizado com extratos e frações de *A. schaueriana* (IC e It).

Amostras	Ilha do Cardoso		Itanhaém	
	IVCM cm/dia	Porcentagem de inibição (%)	IVCM cm/dia	Porcentagem de inibição (%)
EE-F	0,83 ± 0,06 [#]	16,7	0,79 ± 0,08 ⁺	21,3
EE-C	0,15 ± 0,13 ^{#*}	85,3	0,69 ± 0,01 ⁺ *	30,7
EP-F	0,93 ± 0,03	7,3	0,88 ± 0,10	12,0
EP-C	0,38 ± 0,02 ^{#*}	62,0	0,88 ± 0,03 ⁺ *	12,0
CHCl ₃ -F	0,69 ± 0,03 ^{#*}	30,7	0,80 ± 0,04 ⁺ *	20,0
CHCl ₃ -C	0,37 ± 0,04 ^{#*}	62,7	0,67 ± 0,04 ⁺ *	33,3
AcOEt-C	0,86 ± 0,10	14,0	-	-
Controle negativo	1,00 ± 0,00	-	1,00 ± 0,00	-
Controle Metanol	1,00 ± 0,04	-	1,00 ± 0,04	-

Valores de média ± desvio padrão da média. [#] p<0,05 na comparação com o controle negativo e controle metanol para amostras da IC (ANOVA e pós-teste –Tukey). ⁺ p<0,05 na comparação com o controle negativo e controle metanol para amostras de It (ANOVA e pós-teste –Tukey). * p<0,05 na comparação entre amostras iguais de diferentes locais (Teste t).

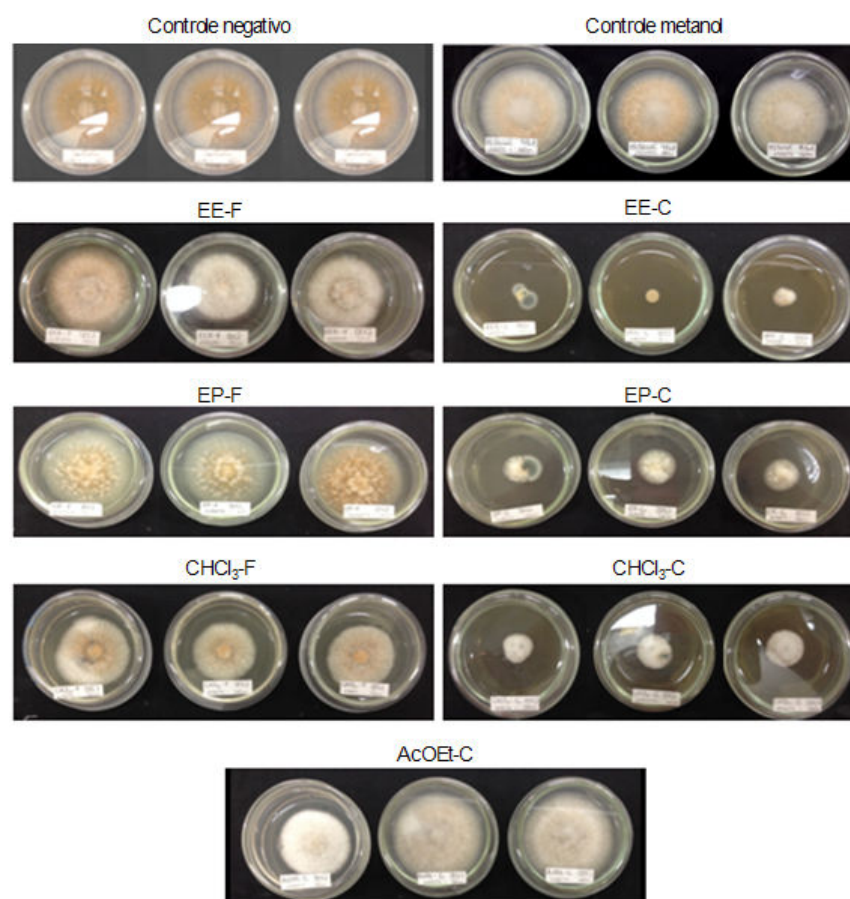


Figura 13: Ensaio de diluição em Ágar, realizado com extratos e frações de *A. schaueriana* (IC), após cinco dias de cultivo com o fungo *C. gloeosporioides*. Extratos etanólicos na concentração de 2mg/mL; frações na concentração de 0,5mg/mL; controle metanol feito com 40μL do solvente.

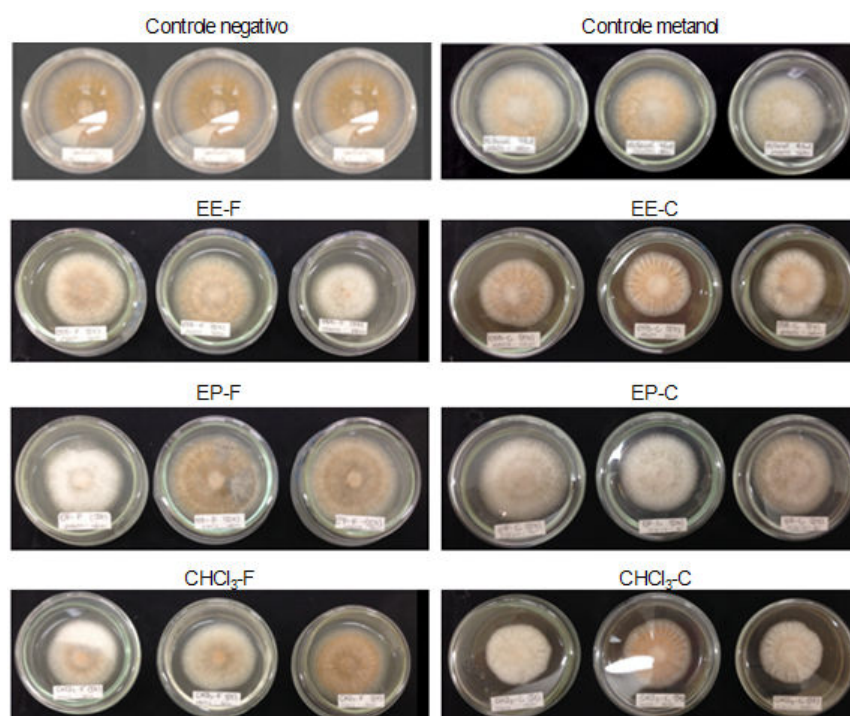


Figura 14: Ensaio de diluição em Ágar, realizado com extratos e frações de *A. schaueriana* (It), após cinco dias de cultivo com o fungo *C. gloeosporioides*. Extratos etanólicos na concentração de 2mg/mL; frações na concentração de 0,5mg/mL; controle metanol feito com 40μL do solvente.

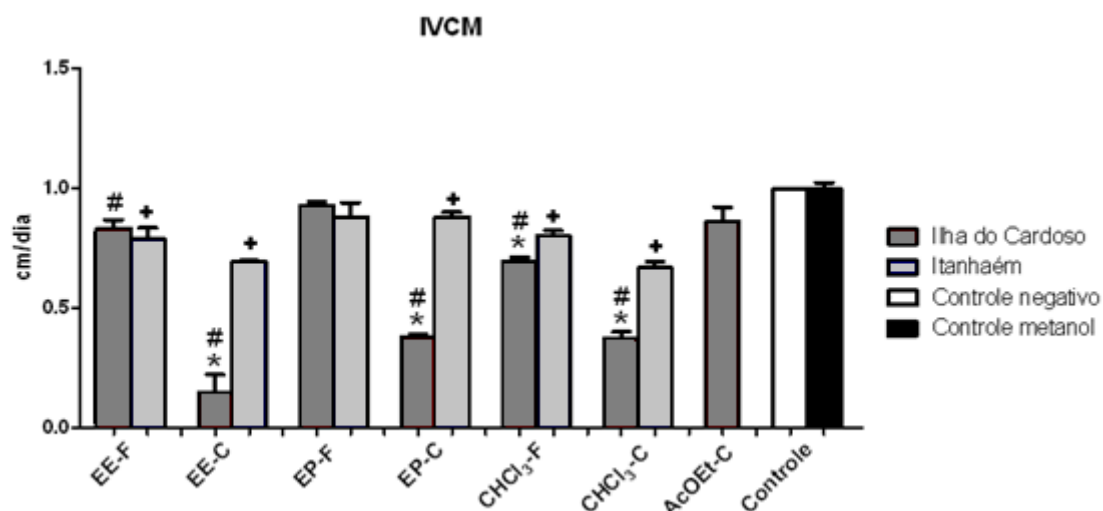


Figura 15: Gráfico do IVCm de *C. gloeosporioides* quando inoculado com extratos e frações de *A. schaueriana* (IC e It). [#] p<0,05 na comparação com o controle negativo e controle metanol para amostras da IC – barras vermelhas (ANOVA e pós-teste –Tukey). ⁺ p<0,05 na comparação com o controle negativo e controle metanol para amostras de It – barras azuis (ANOVA e pós-teste –Tukey). * p<0,05 na comparação entre amostras iguais de diferentes locais (Teste t).

Após o cálculo do IVCm é possível destacar que, dentre os extratos e frações da Ilha do Cardoso testadas, todas exceto EP-F e AcOEt-C, diferiram estatisticamente dos controles, apresentando consequentemente as maiores porcentagens de inibição de *C. gloeosporioides*, sendo EE-C, EP-C e CHCl₃-C as mais efetivas. Já para as amostras de Itanhaém, todas exceto EP-F diferiram dos controles, sendo o EE-C e CHCl₃-C as que apresentaram menor IVCm e portanto, maior porcentagem de inibição. Desta forma, constata-se que as frações provenientes dos caules, tanto em IC como em It, são mais efetivas no retardo da velocidade de crescimento do fungo, porém, quando comparados entre si, os Extratos Etanólicos de Caules (EE-C), as frações de Éter de Petróleo de Caules (EP-C), Clorofórmicas de Folhas (CHCl₃-F) e Clorofórmicas de Caules (CHCl₃-C) apresentaram diferenças estatísticas, sendo que em todos os casos, as frações da Ilha do Cardoso proporcionaram menor IVCm em relação às de Itanhaém.

Os mesmos extratos e frações foram posteriormente submetidos à quantificação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) com os fungos *C. gloeosporioides* e *C. sphaerospermum*, e os resultados encontram-se nas Tabelas 5 e 6 a seguir.

Tabela 5: Concentração Mínima Inibitória dos extratos e frações de IC e It contra *C. gloeosporioides*.

Amostra	CMI (mg/mL) - <i>C. gloeosporioides</i>	
	Ilha do Cardoso	Itanhaém
EE-F	7,5	6,0
EE-C	1,5	5,0
EP-F	8,0	9,0
EP-C	1,0	6,0
CHCl ₃ -F	1,5	1,5
CHCl ₃ -C	1,0	1,5
AcOEt-C	6,0	-

Tabela 6: Concentração Mínima Inibitória dos extratos e frações de IC e It contra *C. sphaerospermum*.

Amostra	CMI (mg/mL) - <i>C. sphaerospermum</i>	
	Ilha do Cardoso	Itanhaém
EE-F	5,0	6,0
EE-C	3,0	6,0
EP-F	8,0	9,0
EP-C	1,0	5,0
CHCl ₃ -F	2,0	1,0
CHCl ₃ -C	2,0	2,0
AcOEt-C	7,5	-

Os resultados coincidem com os obtidos no ensaio de diluição em Ágar, pois as amostras que apresentam menor CMI também foram as que apresentam menor IVCm, destacando-se, portanto EE-C, EP-C, CHCl₃-F e CHCl₃-C da Ilha do Cardoso, e CHCl₃-F e CHCl₃-C de Itanhaém.

Ainda que as menores CMIs tenham sido encontradas para as mesmas amostras nos ensaios com ambos os fungos, *C. gloeosporioides* se mostrou mais sensível do que *C. sphaerospermum*, já que concentrações menores foram capazes de inibi-lo por completo.

Após a verificação das frações de maior potencial antifúngico – EP-C (IC), CHCl₃-F (IC), CHCl₃-C (IC), CHCl₃-F (It) e CHCl₃-C (It), as mesmas, juntamente com suas emulsões (quando houve), foram submetidas à purificação por meio de refraçãoamento em CCD Preparativa, conforme ilustrado na Figura 16 a seguir, onde as sub-frações foram adquiridas pela raspagem das faixas (visualizadas a λ 254nm) correspondentes às manchas de atividade antifúngica no teste em CCD Analítica.

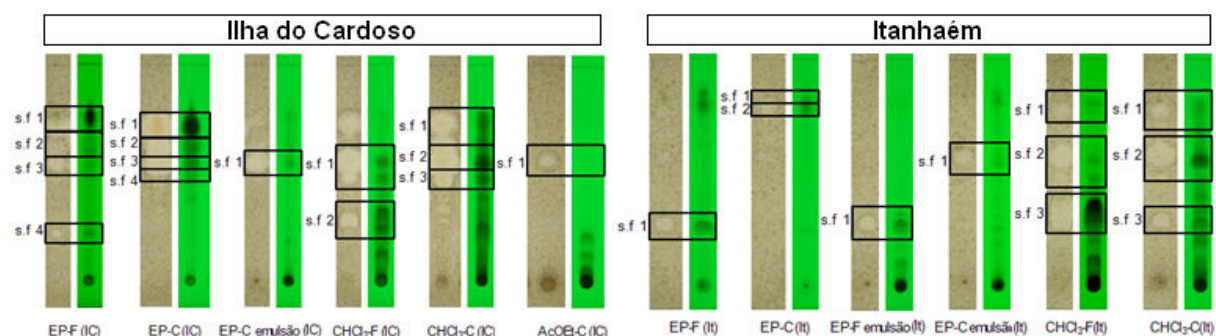


Figura 16: Representação da localização das faixas raspadas em cada fração para a obtenção das sub-frações. Figuras da esquerda mostram a localização das manchas de atividade antifúngica contra *C. sphaerospermum*, e as figuras da direita mostram a visualização da cromatoplate sob luz UV (λ 254nm).

Ao todo foram obtidas 26 sub-frações (s.f) de interesse, sendo 4 de EP-F (IC), 4 de EP-C (IC), 1 da emulsão de EP-C (IC), 2 da fração CHCl_3 -F (IC), 3 de CHCl_3 -C (IC), 1 de EP-F (It) e 1 de sua emulsão, 2 de EP-C (It) e 1 de sua emulsão, 3 de CHCl_3 -F (It) e 3 da fração CHCl_3 -C (It). As massas de cada sub-fração encontram-se na Tabela 7. Todas as sub-frações obtidas foram submetidas a nova bioautografia em CCD para a confirmação e seleção das mais ativas, e a Figura 17 a seguir ilustra os resultados.

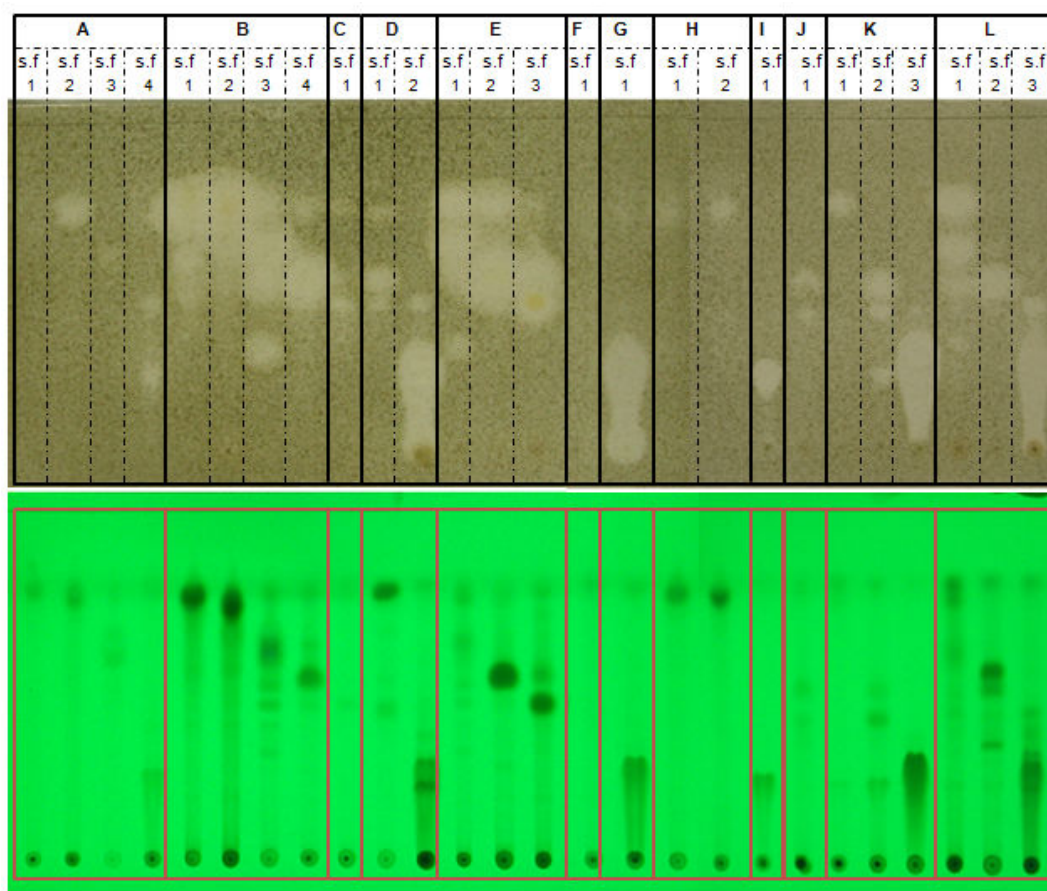


Figura 17: Superior - Bioautografia (CCD, em sílica gel F_{254} eluída em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5) das sub-frações obtidas por CCD Preparativa, revelada com *C. sphaerospermum*. A – EP-F (IC), B – EP-C (IC), C – EP-C emulsão (IC), D– CHCl_3 -F (IC), E – CHCl_3 -C (IC), F – AcOEt -C (IC), G – EP-F (It), H – EP-C (It), I – EP-F emulsão (It), J– EP-C emulsão (It), K – CHCl_3 -F (It), L – CHCl_3 -C (It). Inferior – Visualização sob UV (λ 256nm).

Tabela 7: Sub-frações obtidas após CCD Preparativa com suas respectivas massas.

Sub-frações	Ilha do Cardoso				Itanhaém		
	s.f. 1	s.f. 2	s.f. 3	s.f. 4	s.f. 1	s.f. 2	s.f. 3
EP-F	10,2mg	8,7mg	23,8mg	17mg	8,7mg	-	-
EP-C	9,2mg	7,8mg	7,7mg	5,4mg	9,2mg	7,8mg	-
EP-F (emulsão)	-	-	-	-	26,4mg	-	-
EP-C (emulsão)	24,6mg	-	-	-	8,2mg	-	-
CHCl ₃ -F	38,7mg	15,5mg	-	-	11,3mg	17,5mg	17,9mg
CHCl ₃ -C	15,1mg	7,9mg	7mg	-	12,2mg	20,6mg	12,3mg
AcOEt-C	29mg	-	-	-	-	-	-

As sub-frações mais ativas foram retiradas das frações: B = EP-C (IC); D = CHCl₃-F (IC); E = CHCl₃-C (IC); G = EP-F (It); K = CHCl₃-F (It) e L = CHCl₃-C (It), e todas elas tiveram seus perfis cromatográficos obtidos por HPLC analítico, os quais estão representados nas Figuras 18 à 27 a seguir, exceto a sub-fração 1 de CHCl₃-C (IC), sub-fração 1 de EP-F (It), e as sub-frações 1 e 2 de CHCl₃-F (It), que não apresentaram boa resolução. Nas figuras, encontram-se indicados por setas, os prováveis picos representativos dos compostos responsáveis pela atividade antifúngica.

Tais sub-frações foram posteriormente submetidas a análises espectroscópicas, como GC-MS e LC-MS-MS/ESI(+), para a identificação dos compostos.

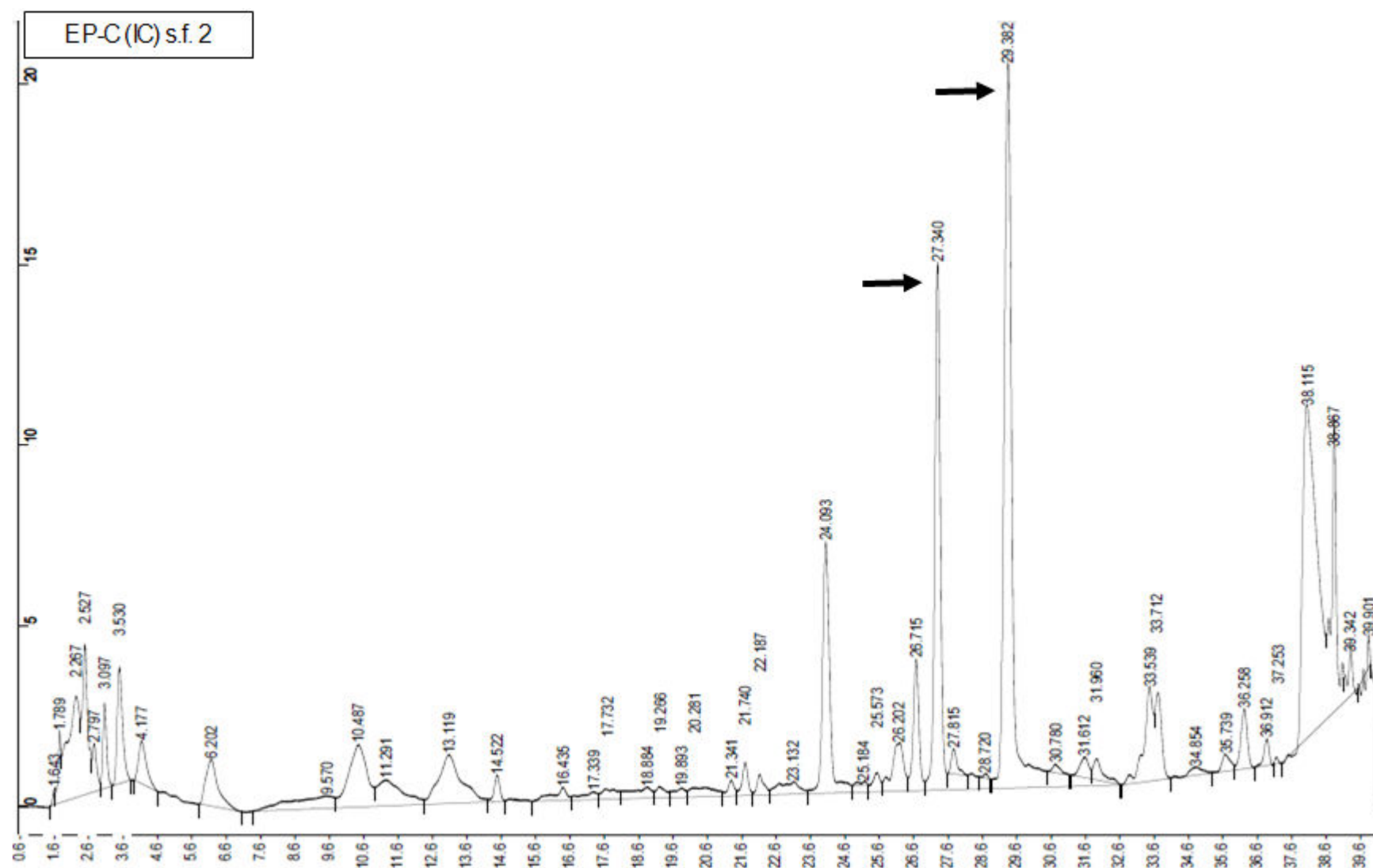


Figura 18: Perfil cromatográfico por HPLC analítico da sub-fração 2 de EP-C (IC). Detecção sob luz ultravioleta a (λ) 254nm.

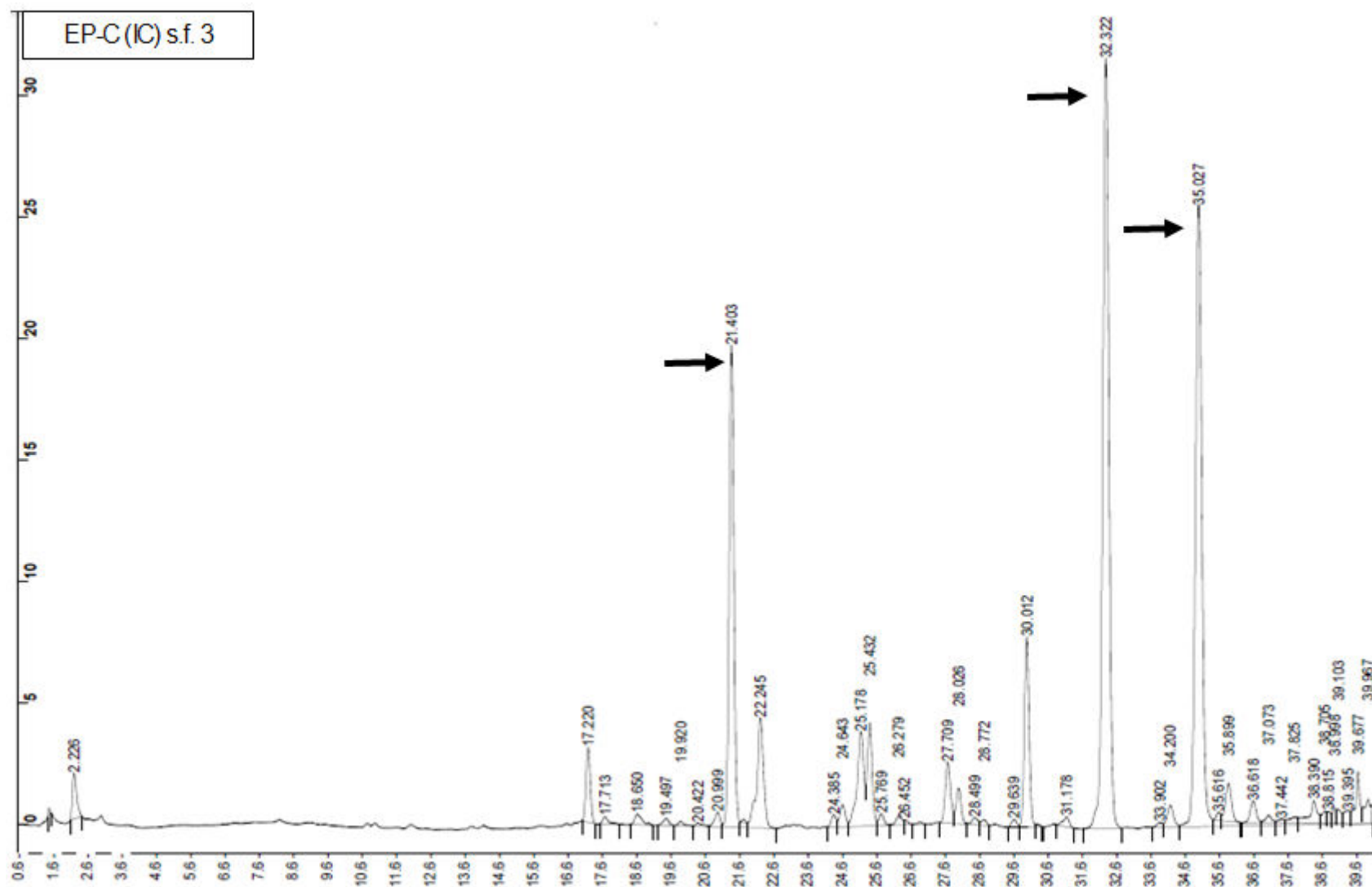


Figura 19: Perfil cromatográfico por HPLC analítico da sub-fração 3 de EP-C (IC). Detecção sob luz ultravioleta a (λ) 254nm.

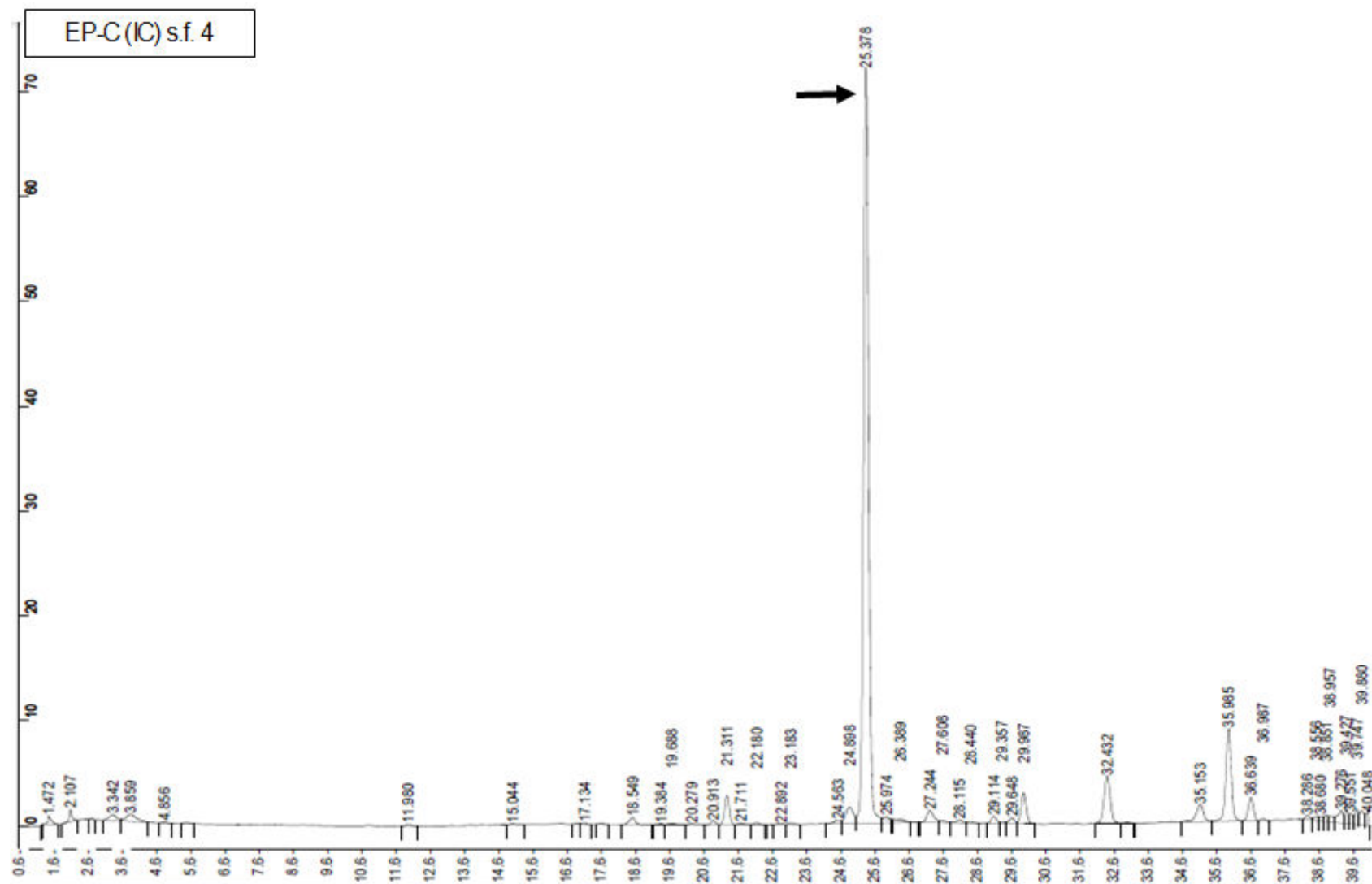


Figura 20: Perfil cromatográfico por HPLC analítico da sub-fração 4 de EP-C (IC). Detecção sob luz ultravioleta a (λ) 254nm.

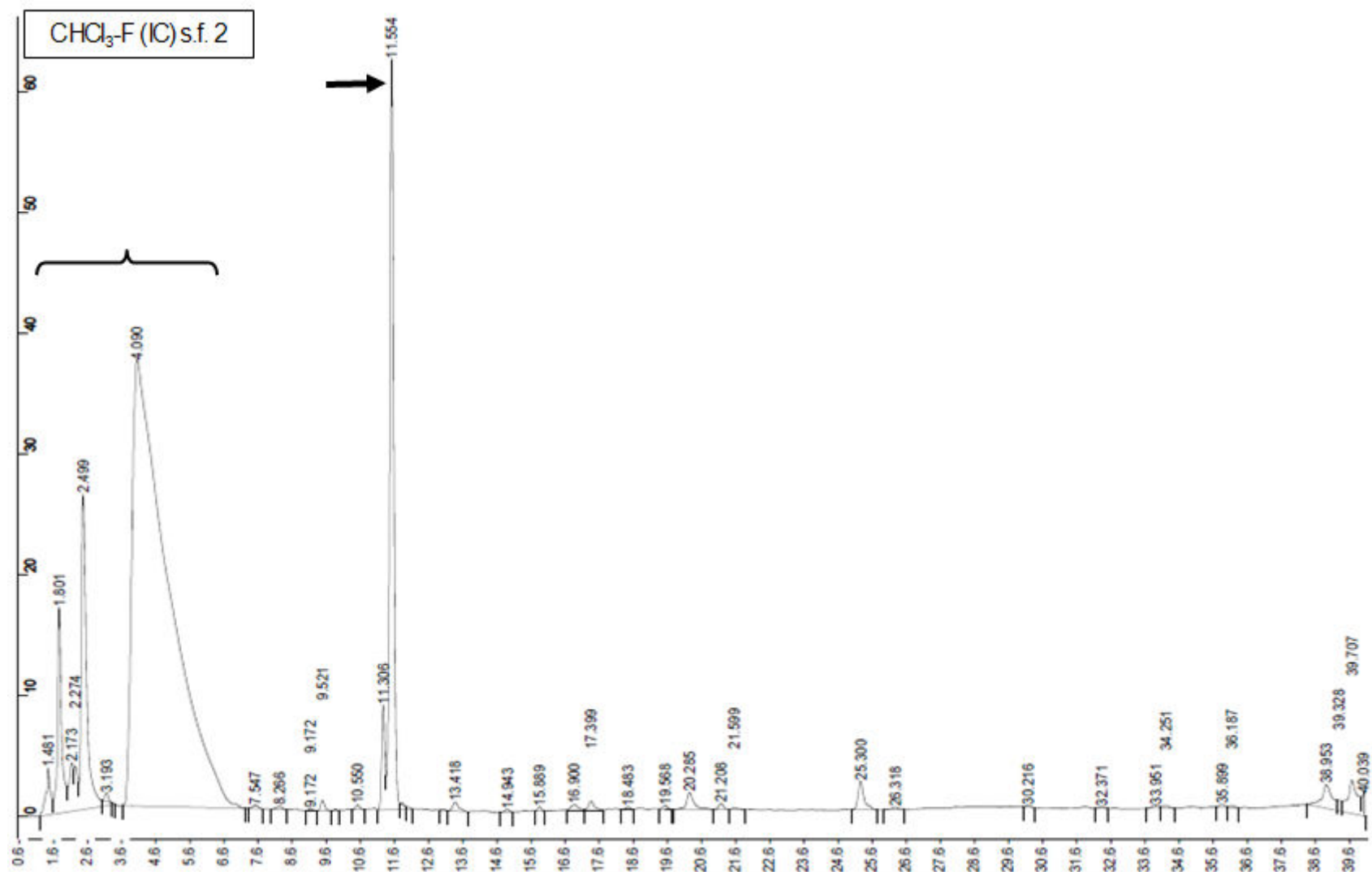


Figura 21: Perfil cromatográfico por HPLC analítico da sub-fração 2 de CHCl₃-F (IC). Detecção sob luz ultravioleta a (λ) 254nm.

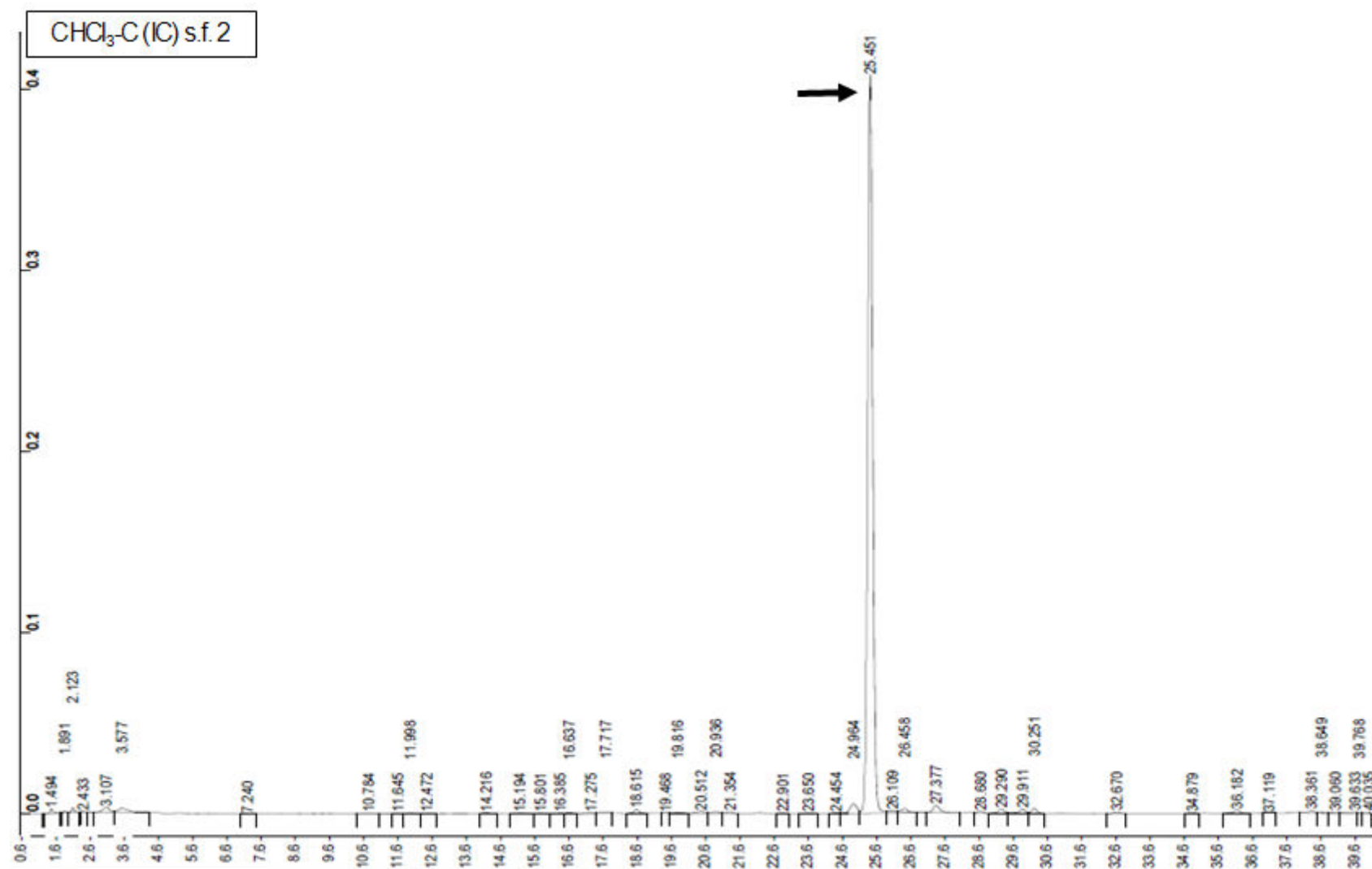


Figura 22: Perfil cromatográfico por HPLC analítico da sub-fração 2 de CHCl₃-C (IC). Detecção sob luz ultravioleta a (λ) 254nm.

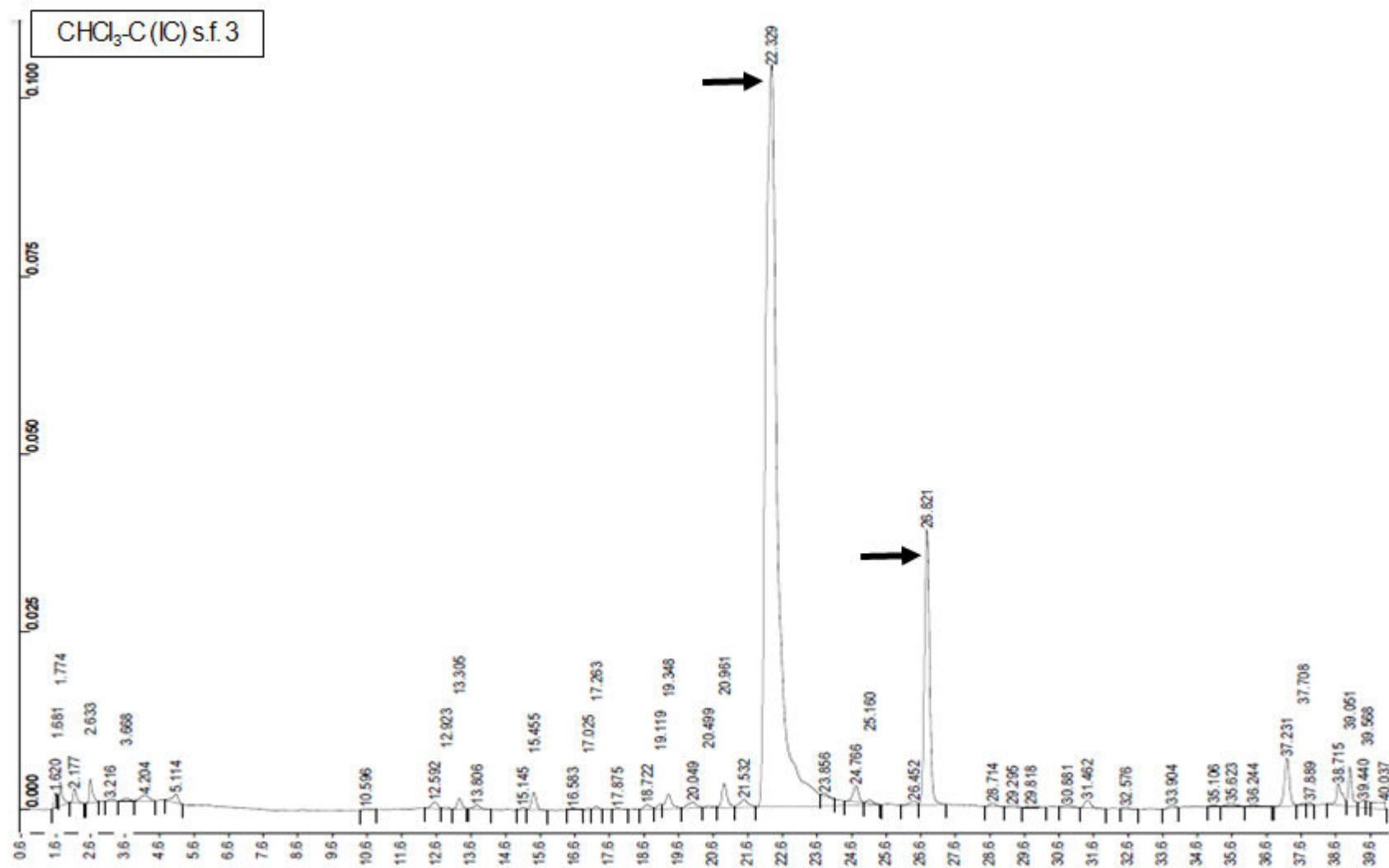


Figura 23: Perfil cromatográfico por HPLC analítico da sub-fração 3 de CHCl₃-C (IC). Detecção sob luz ultravioleta a (λ) 254nm.

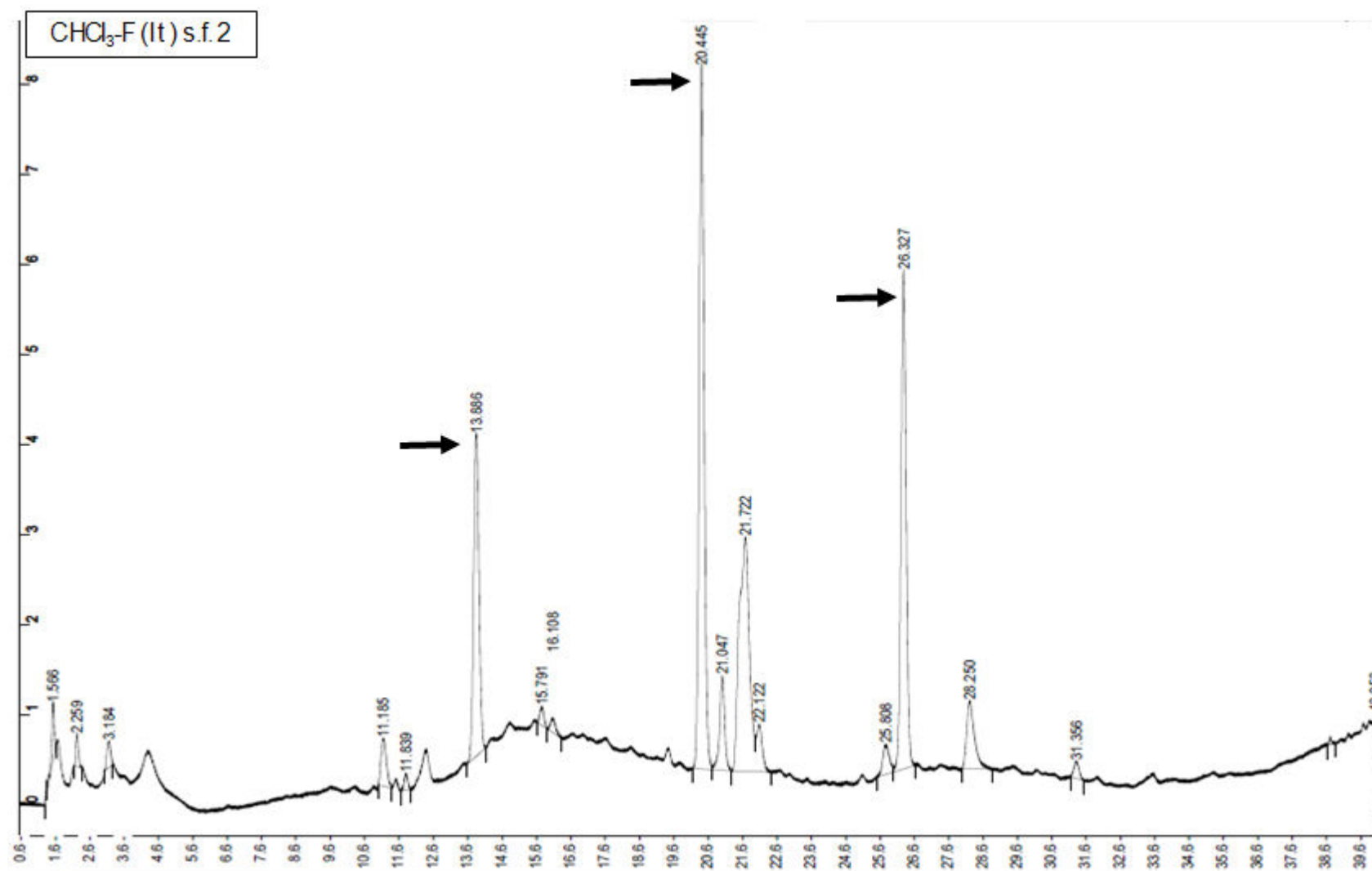


Figura 24: Perfil cromatográfico por HPLC analítico da sub-fração 2 de CHCl₃-F (It). Detecção sob luz ultravioleta a (λ) 254nm.

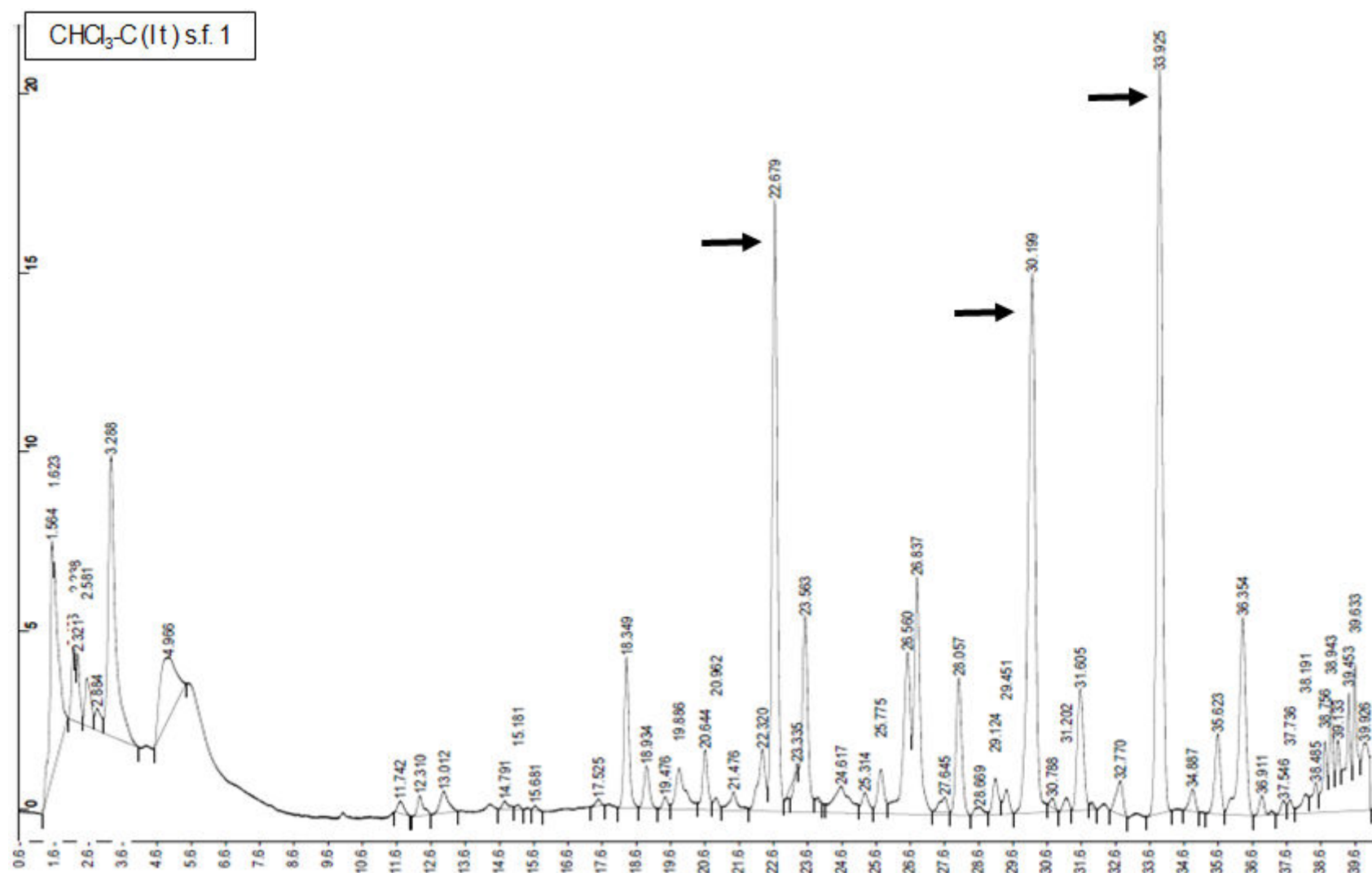


Figura 25: Perfil cromatográfico por HPLC analítico da sub-fração 1 de CHCl₃-C (It). Detecção sob luz ultravioleta a (λ) 254nm.

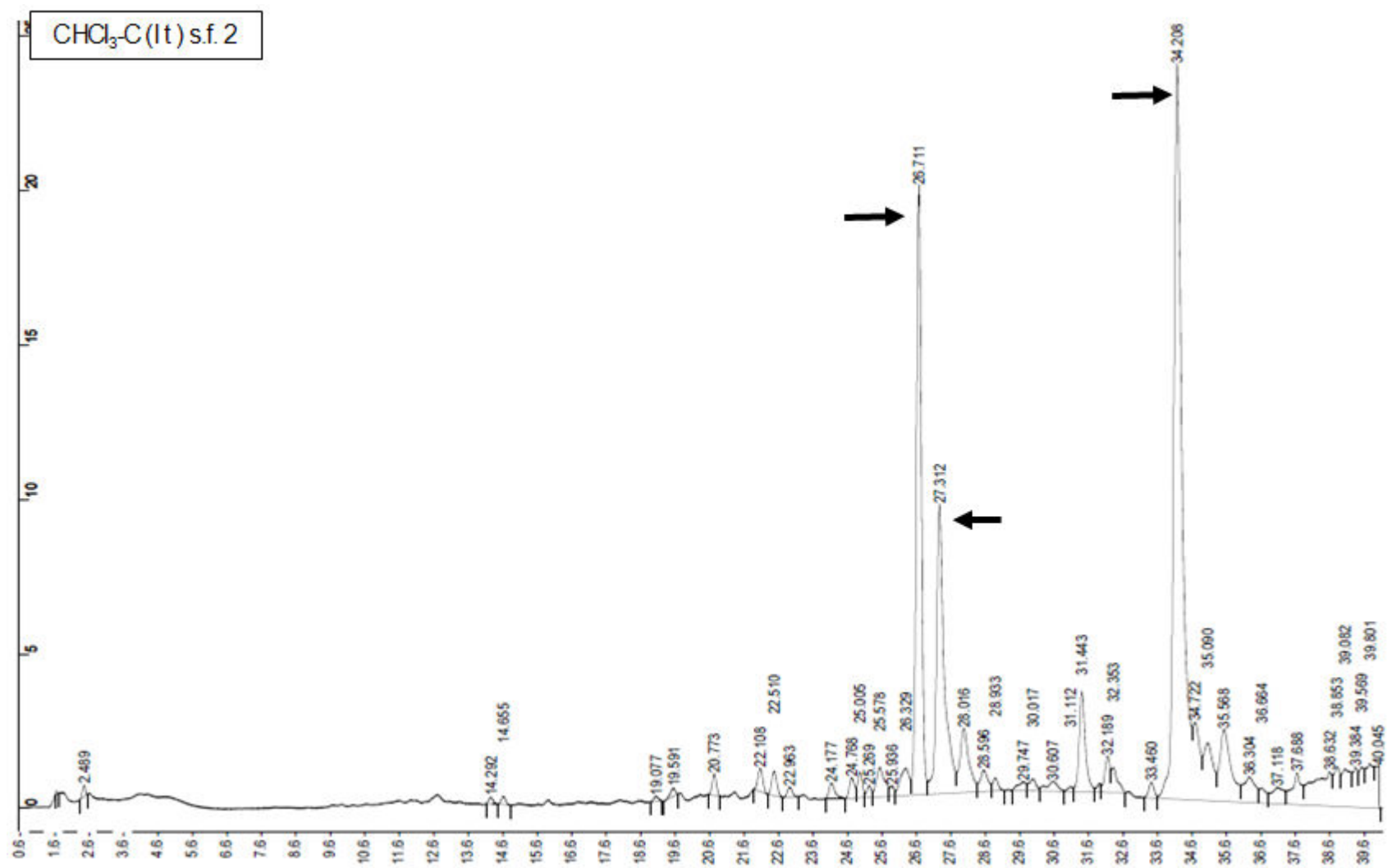


Figura 26: Perfil cromatográfico por HPLC analítico da sub-fração 2 de CHCl₃-C (It). Detecção sob luz ultravioleta a (λ) 254nm.

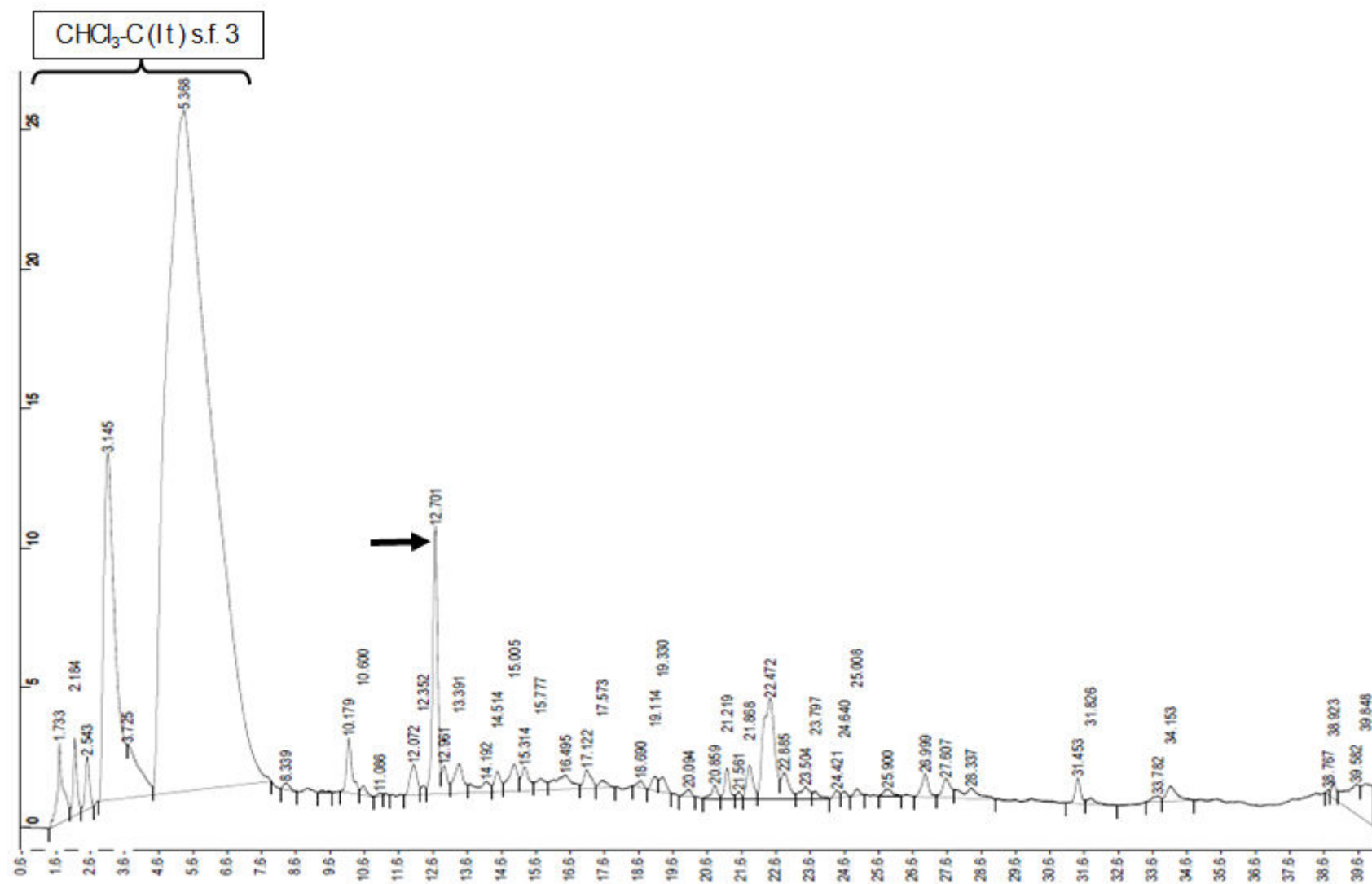


Figura 27: Perfil cromatográfico por HPLC analítico da sub-fração 3 de CHCl₃-C (It). Detecção sob luz ultravioleta a (λ) 254nm.

4.4 Identificação dos compostos

As sub-frações ativas (EP-C (IC) s.f. 2, 3 e 4; CHCl₃-F (IC) s.f. 2; CHCl₃-C (IC) s.f. 2 e 3; CHCl₃-F (It) s.f. 2; CHCl₃-C (It) s.f. 1, 2 e 3), foram submetidas à análise em LC-MS ESI(+) para verificar as massas moleculares (m/z) dos compostos correspondentes aos picos indicados nas figuras 17 à 27 exibidas anteriormente.

Para que fosse possível a identificação desses compostos, os dados de LC-MS foram confrontados, posteriormente, com os obtidos por GC-MS, comparando-se, para cada amostra, a existência de compostos de mesma massa em ambas as análises.

As Figuras 28 a 37 a seguir, apresentam os cromatogramas de contagem de íons totais (TIC – Total Íons Count) obtidos por LC-MS, com a sinalização por meio de setas dos picos correspondentes à visualização em UV (λ) 254nm, seguidos de seus espectros por MS/ESI(+). O espectro de massas gerado pela análise em LC-MS utiliza um sistema de ionização por eletrospray que é mais brando, podendo formar na maioria das vezes, aductos com hidrogênio ($[M+H]^+$), os quais encontram-se indicados nas figuras para aqueles espectros dentre os quais foi possível encontrar correspondentes na análise por GC-MS, ou através de consulta na literatura.

Observando as figuras, é possível perceber que alguns compostos ocorrem exclusivamente em uma única sub-fração, enquanto outros estão presentes em mais de uma sub-fração proveniente de um mesmo órgão vegetal (folhas ou caules), como é o caso do composto de massa 239 $[M+H]^+$, que foi detectado na sub-fração 4 de EP-C (IC) e nas sub-frações 2 e 3 de CHCl₃-C (IC). Há outros compostos, detectados apenas nos caules, que estão presentes em ambos os indivíduos estudados (IC e It), como é o caso do composto de massa 289 $[M+H]^+$, que foi detectado nas sub-frações 2 e 3 de EP-C (IC) e na sub-fração 1 de CHCl₃-C (It), e o composto de massa 271 $[M+H]^+$, detectado na sub-fração 3 de EP-C (IC) e na sub-fração 1 de CHCl₃-C (It). Já o composto de massa 257 $[M+H]^+$, foi detectado nas sub-frações 2, 3 e 4 de EP-C (IC), sub-frações 2 e 3 de CHCl₃-C (IC) e também na sub-fração 2 de CHCl₃-F (It).

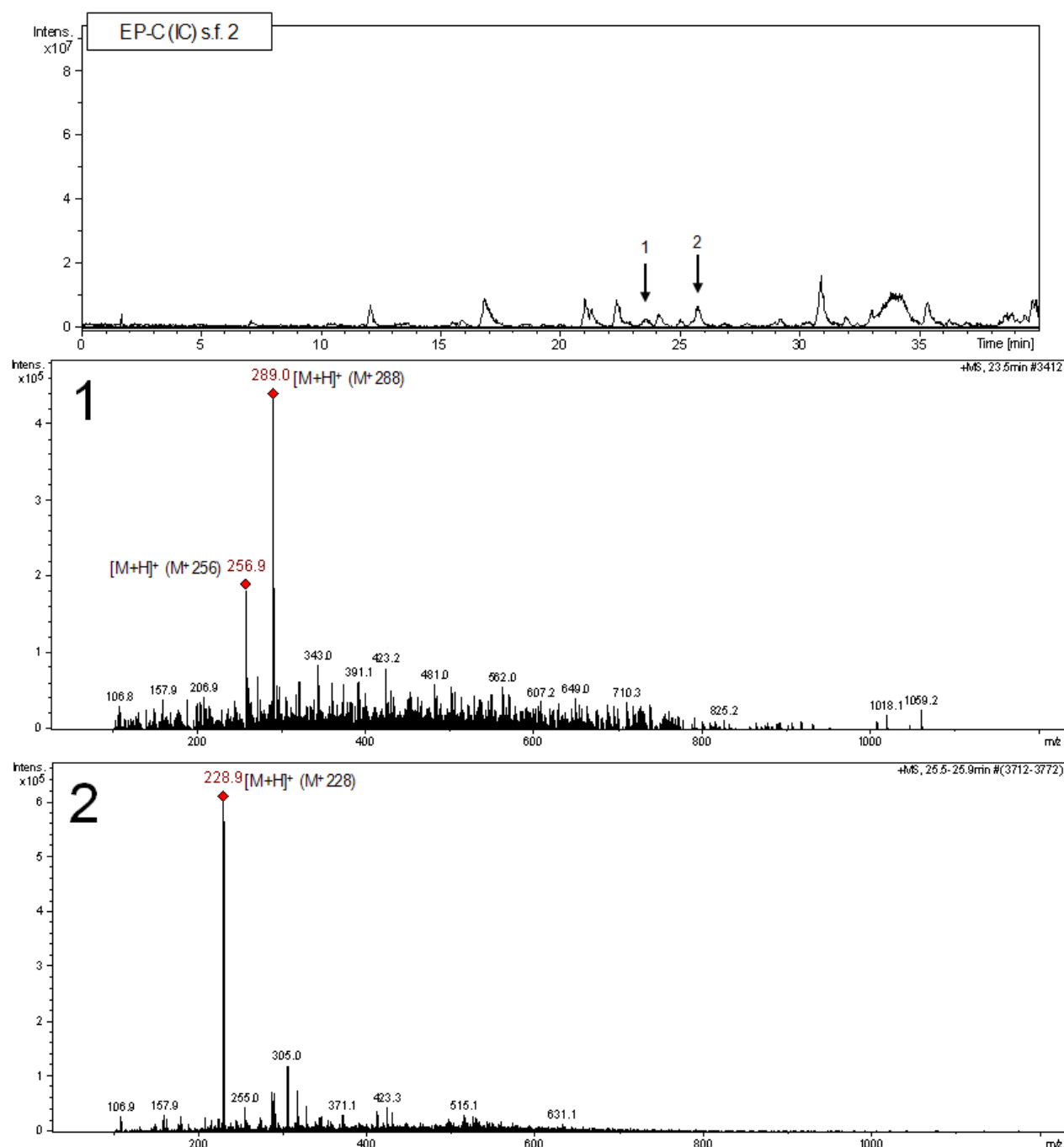


Figura 28: Análise em LC-MS ESI(+) da sub-fração 2 de EP-C (IC). **Acima** - Cromatograma de contagem de íons totais (TIC – Total Íons Count), com a sinalização por meio de setas dos picos correspondentes à visualização em UV (λ) 254nm. **Abaixo, 1 e 2** - Espectros em MS/ESI(+) dos picos indicados pelas setas.

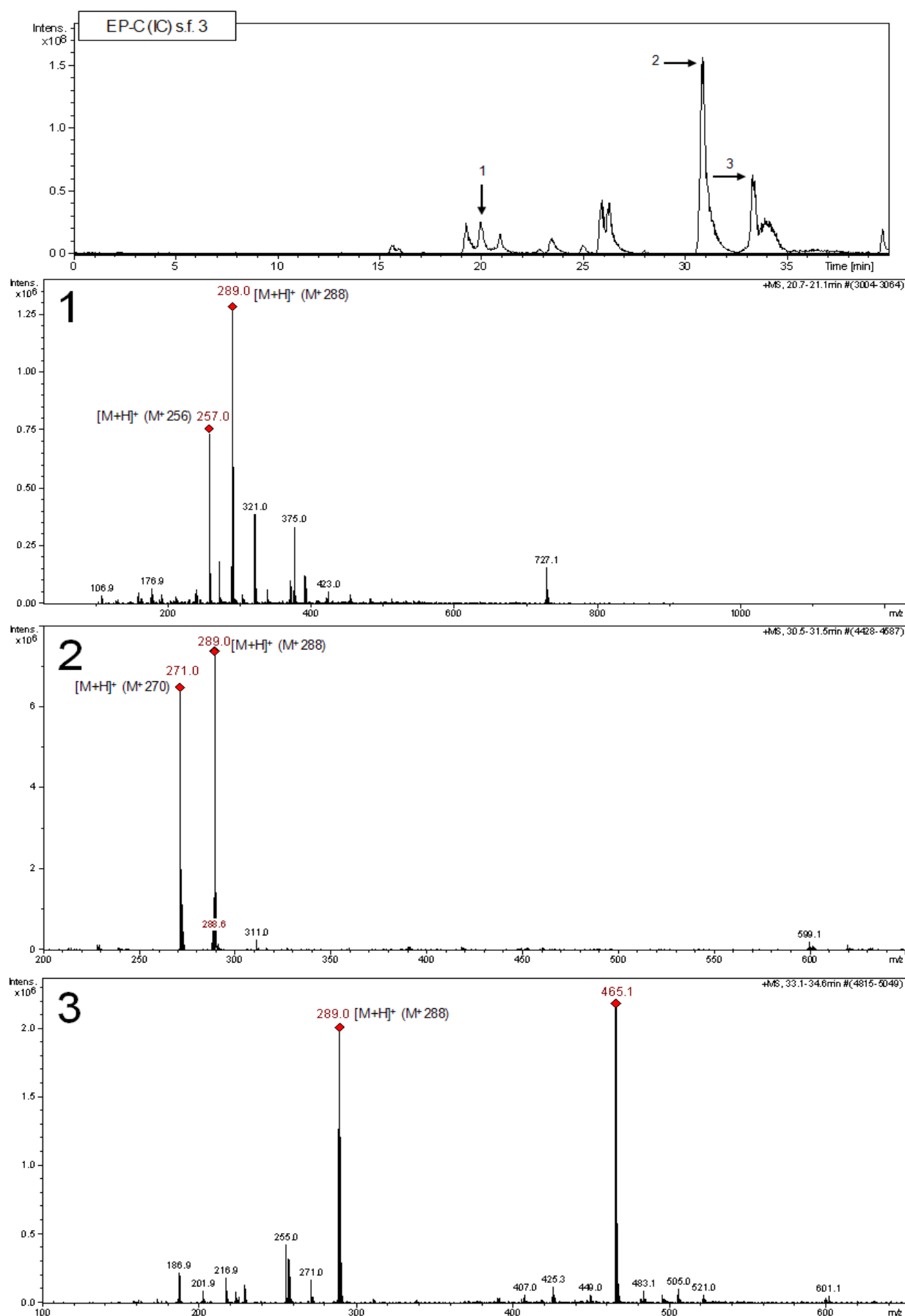


Figura 29: Análise em LC-MS ESI(+) da sub-fração 3 de EP-C (IC). **Acima** - Cromatograma de contagem de íons totais (TIC – Total Íons Count), com a sinalização por meio de setas dos picos correspondentes à visualização em UV (λ) 254nm. **Abaixo, 1, 2 e 3** - Espectros em MS/ESI(+) dos picos indicados pelas setas.

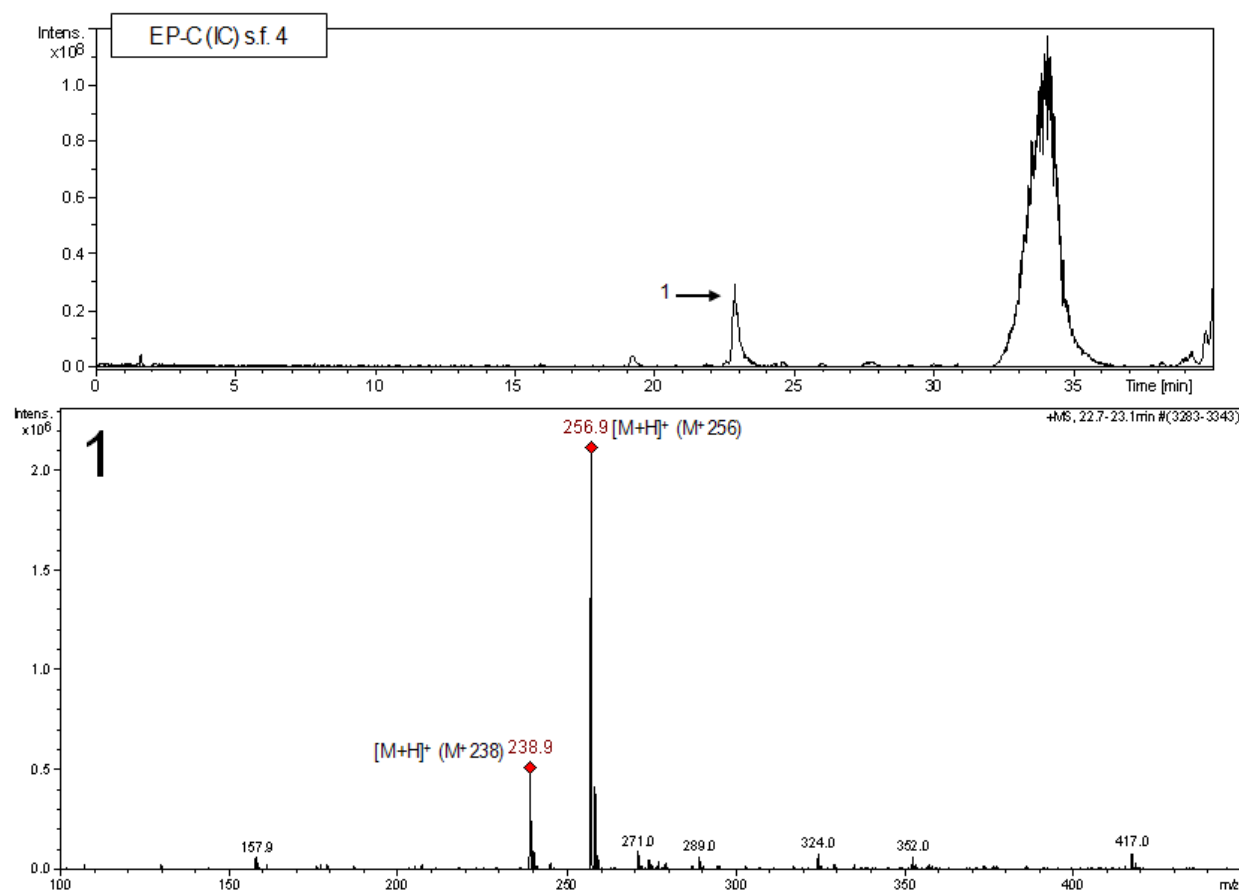


Figura 30: Análise em LC-MS ESI(+) da sub-fração 4 de EP-C (IC). **Acima** - Cromatograma de contagem de íons totais (TIC – Total Íons Count), com a sinalização por meio de seta do pico correspondente à visualização em UV (λ) 254nm. **Abaixo, 1** - Espectro em MS/ESI(+) do pico indicado pela seta.

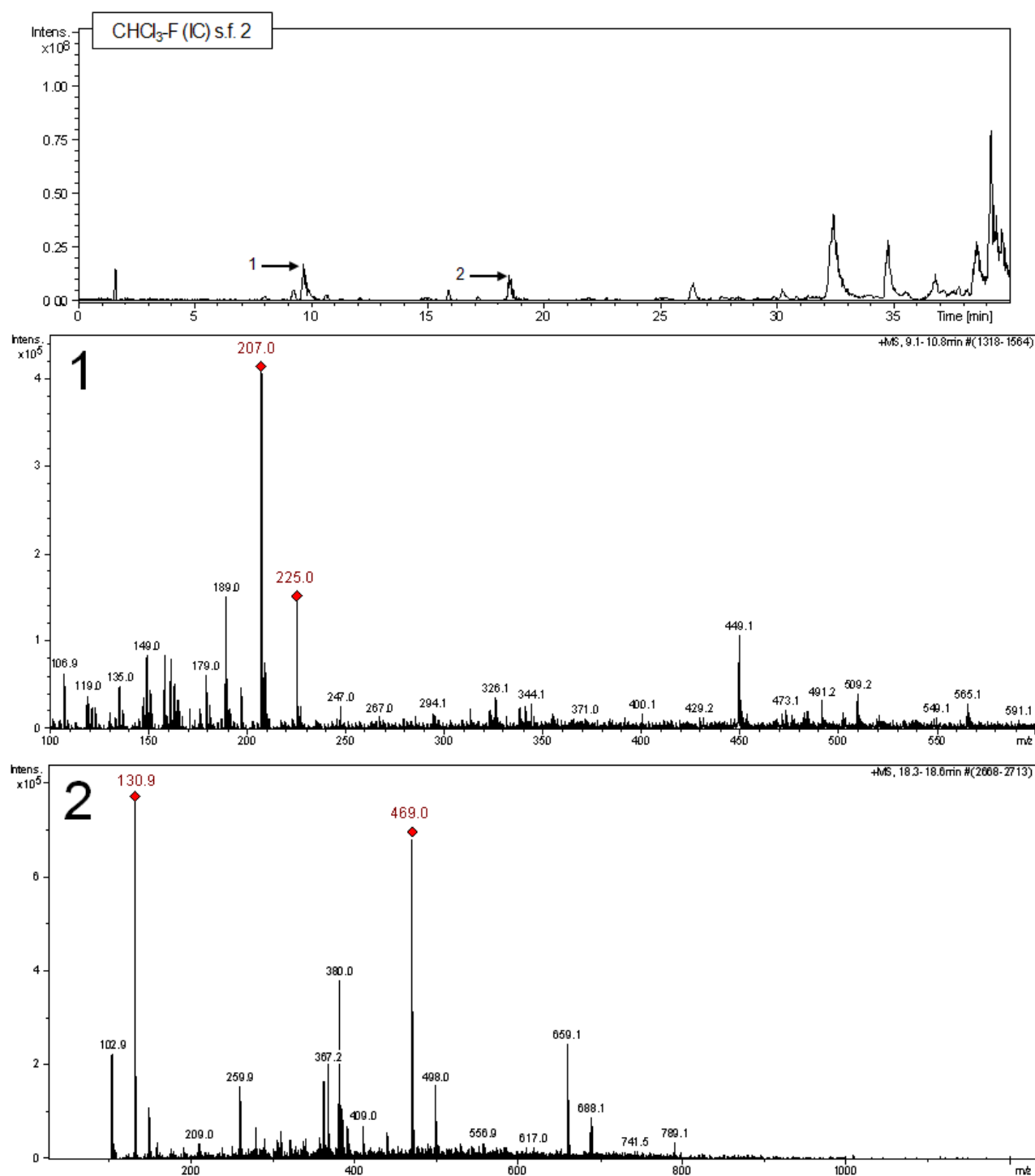


Figura 31: Análise em LC-MS ESI(+) da sub-fração 2 de CHCl₃-F (IC). **Acima** - Cromatograma de contagem de íons totais (TIC – Total Íons Count), com a sinalização por meio de setas dos picos correspondentes à visualização em UV (λ) 254nm. **Abaixo, 1 e 2** - Espectros em MS/ESI(+) dos picos indicados pelas setas.

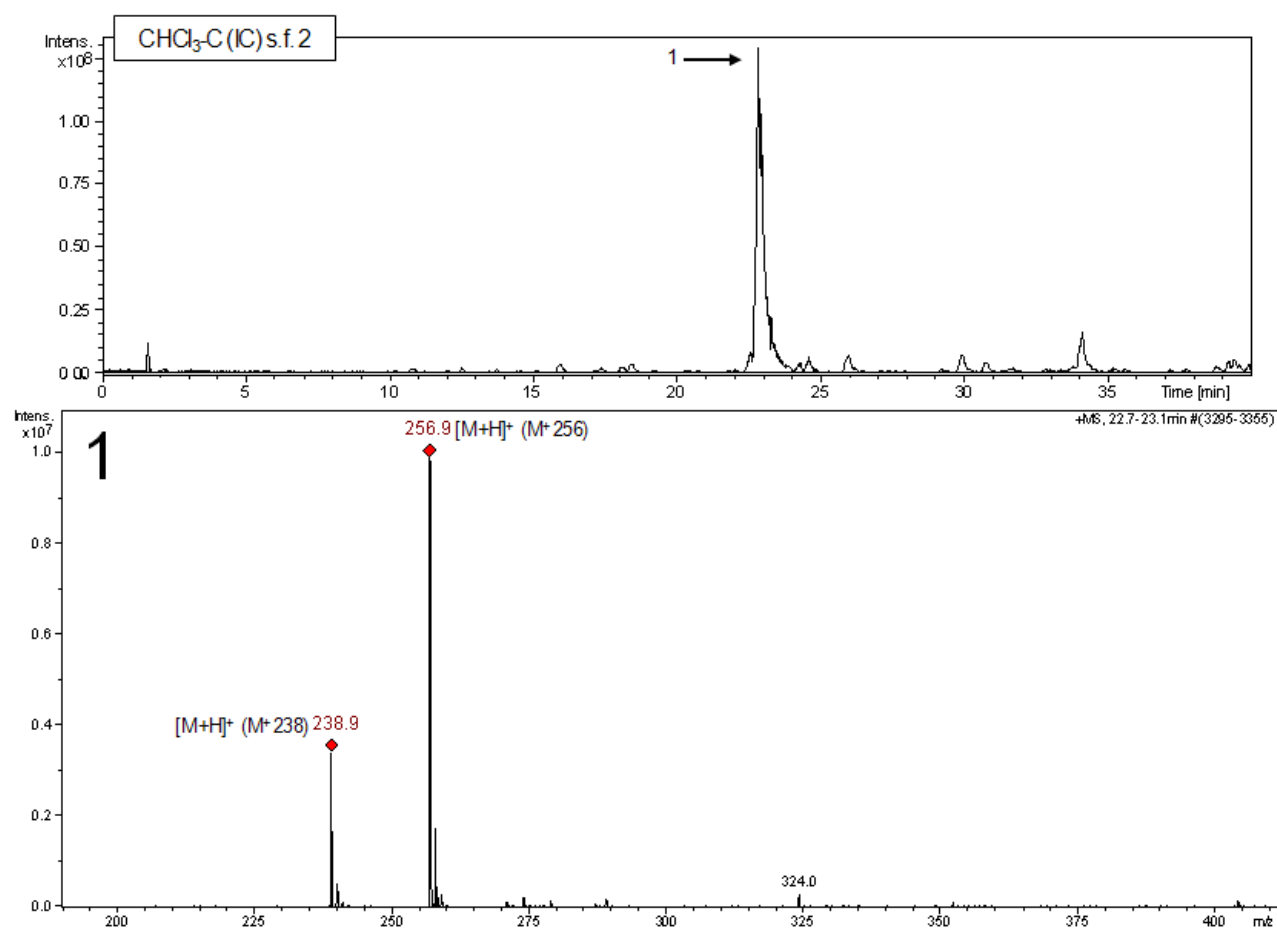


Figura 32: Análise em LC-MS ESI(+) da sub-fração 2 de CHCl₃-C (IC). **Acima** - Cromatograma de contagem de íons totais (TIC – Total Íons Count), com a sinalização por meio de seta do pico correspondente à visualização em UV (λ) 254nm. **Abaixo, 1** - Espectro em MS/ESI(+) do pico indicado pela seta.

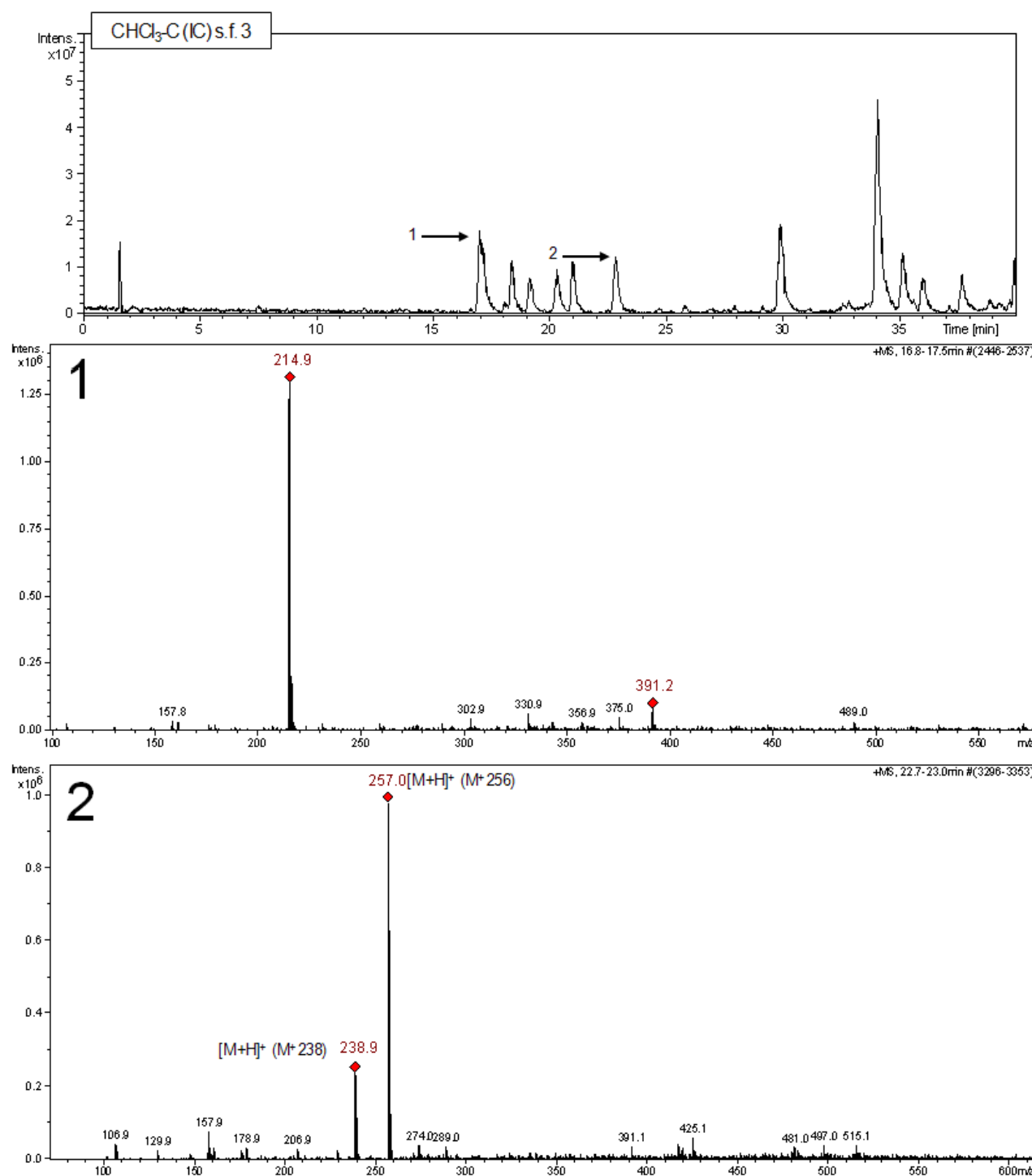


Figura 33: Análise em LC-MS ESI(+) da sub-fração 3 de CHCl₃-C (IC). **Acima** - Cromatograma de contagem de íons totais (TIC – Total Íons Count), com a sinalização por meio de setas dos picos correspondentes à visualização em UV (λ) 254nm. **Abaixo, 1 e 2** - Espectros em MS/ESI(+) dos picos indicados pelas setas.

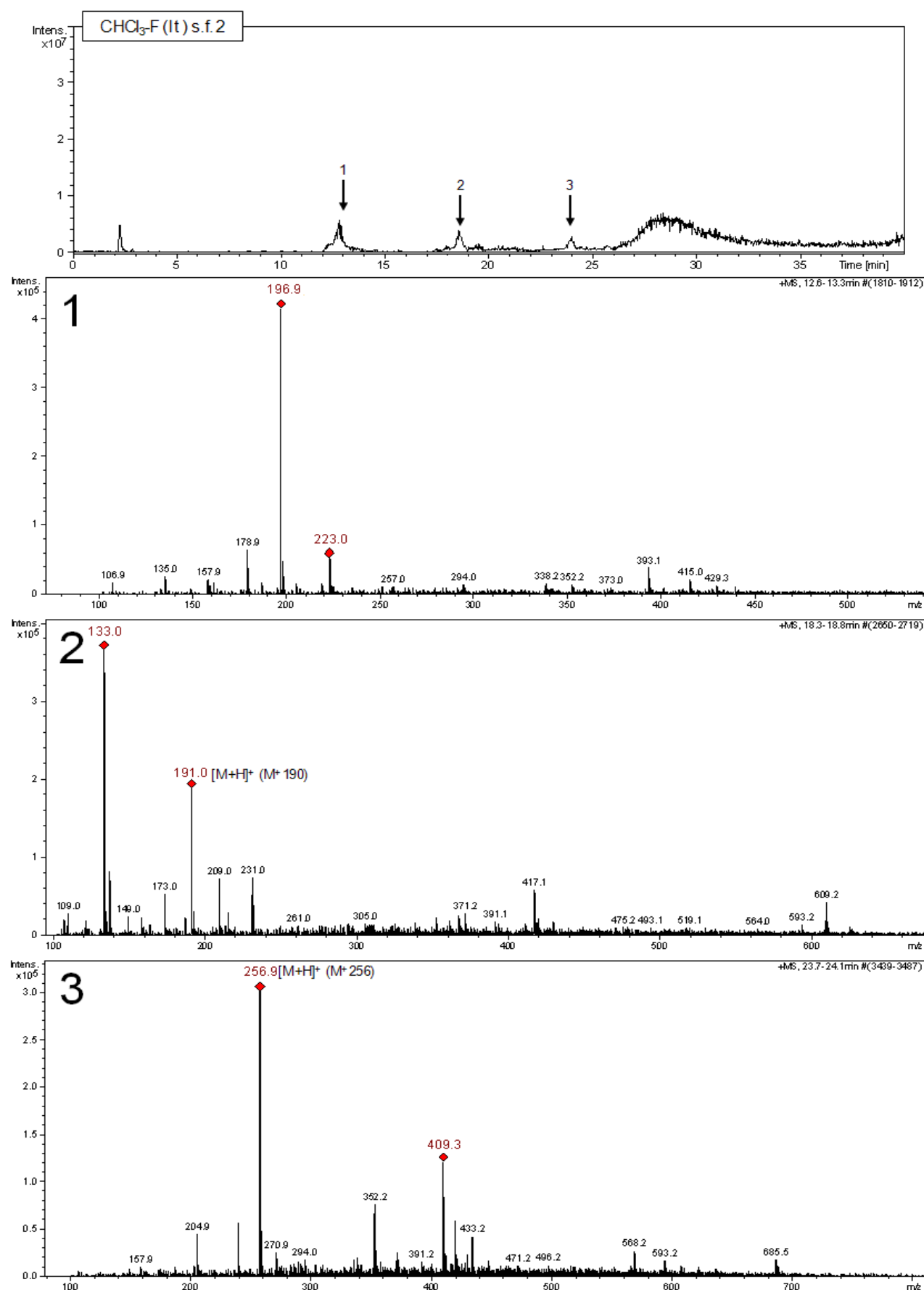


Figura 34: Análise em LC-MS ESI(+) da sub-fração 2 de CHCl₃-F (It). **Acima** - Cromatograma de contagem de íons totais (TIC – Total Íons Count), com a sinalização por meio de setas dos picos correspondentes à visualização em UV (λ) 254nm. **Abaixo, 1, 2 e 3** - Espectros em MS/ESI(+) dos picos indicados pelas setas.

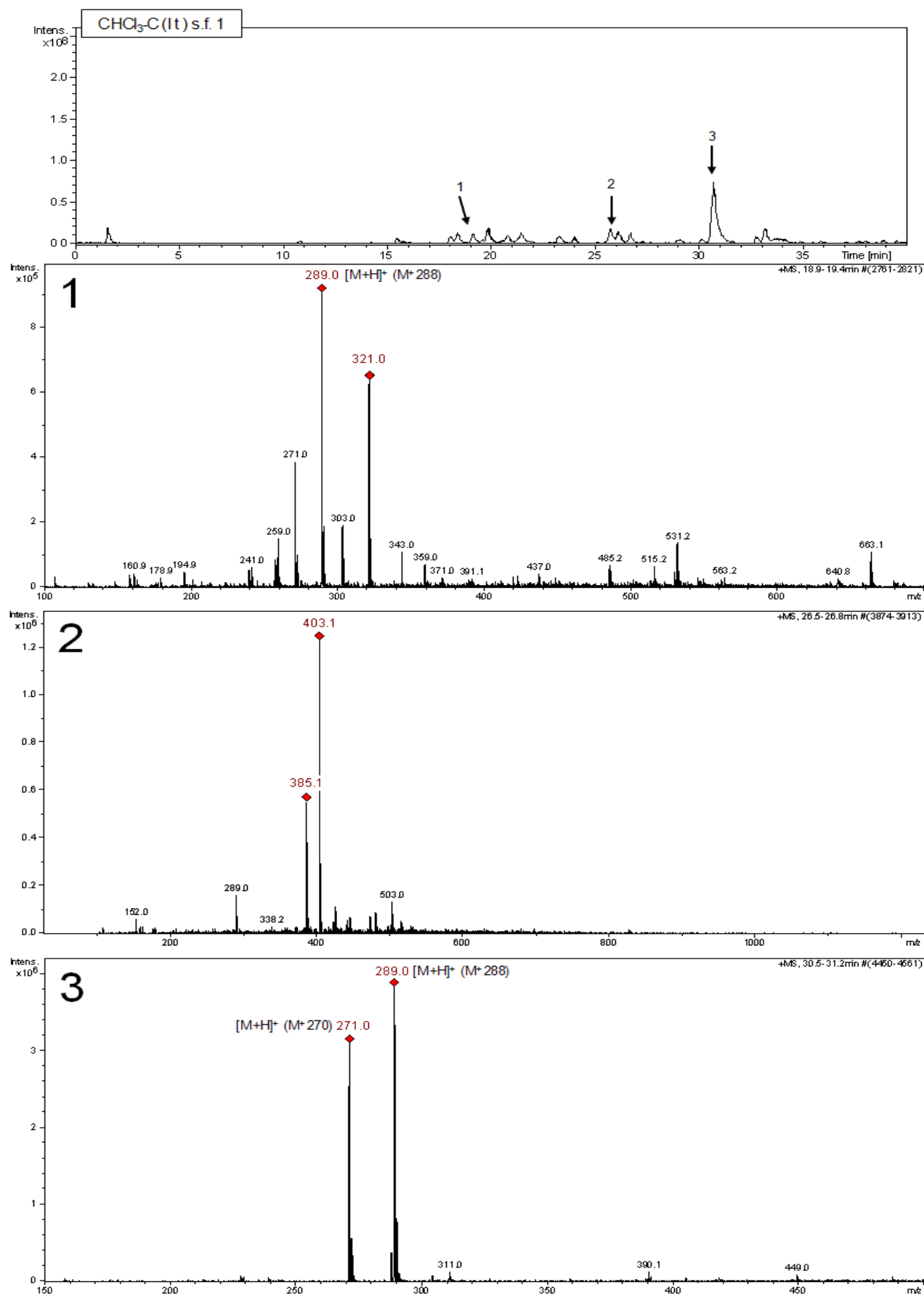


Figura 35: Análise em LC-MS ESI(+) da sub-fração 1 de CHCl₃-C (It). **Acima** - Cromatograma de contagem de íons totais (TIC – Total Íons Count), com a sinalização por meio de setas dos picos correspondentes à visualização em UV (λ) 254nm. **Abaixo, 1, 2 e 3** - Espectros em MS/ESI(+) dos picos indicados pelas setas.

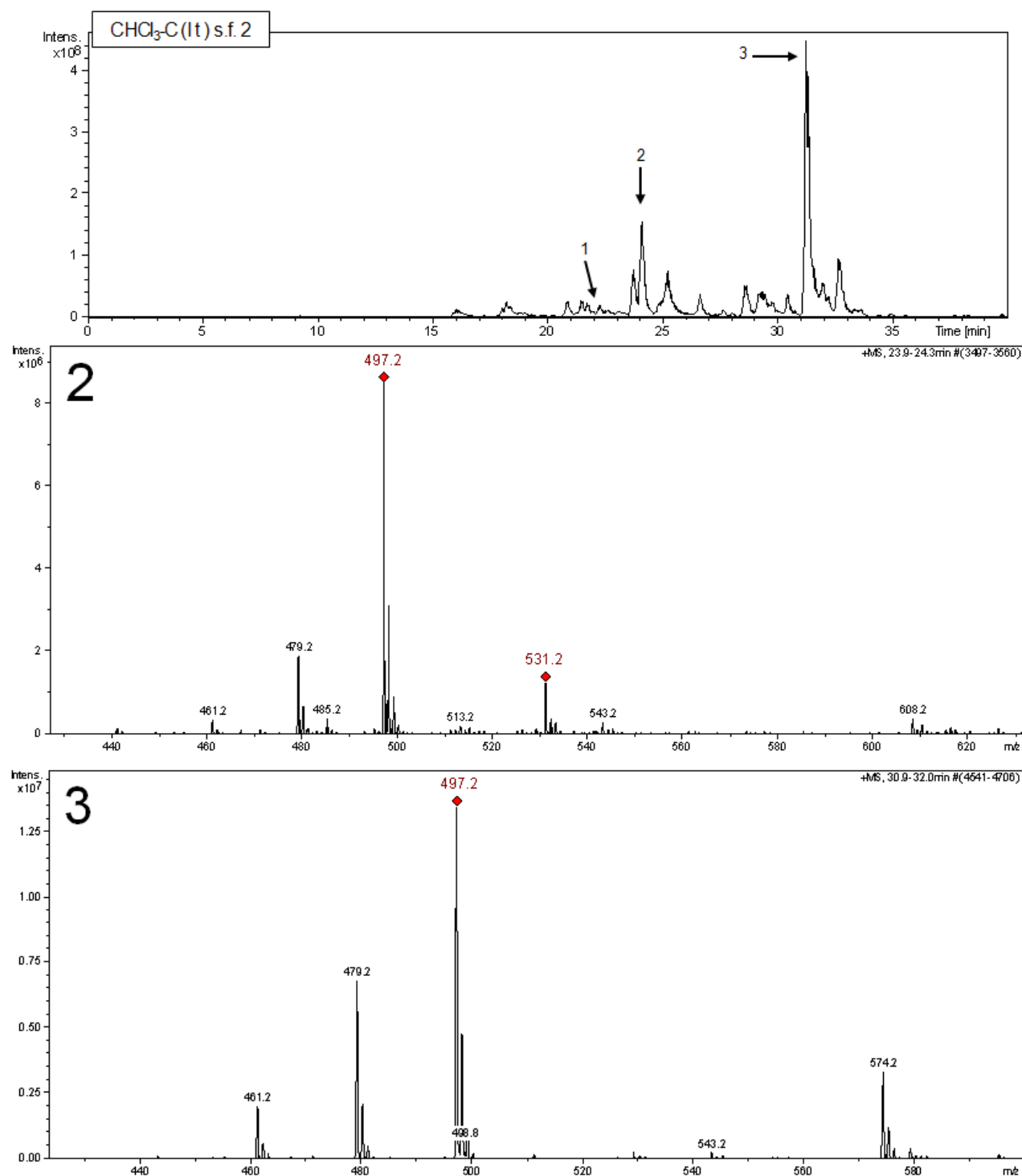


Figura 36: Análise em LC-MS ESI(+) da sub-fração 2 de $\text{CHCl}_3\text{-C (It)}$. **Acima** - Cromatograma de contagem de íons totais (TIC – Total Íons Count), com a sinalização por meio de setas dos picos correspondentes à visualização em UV (λ) 254nm. **Abaixo, 2 e 3** - Espectros em MS/ESI(+) dos picos indicados pelas setas. Obs: Não foi detectado o espectro do pico 1.

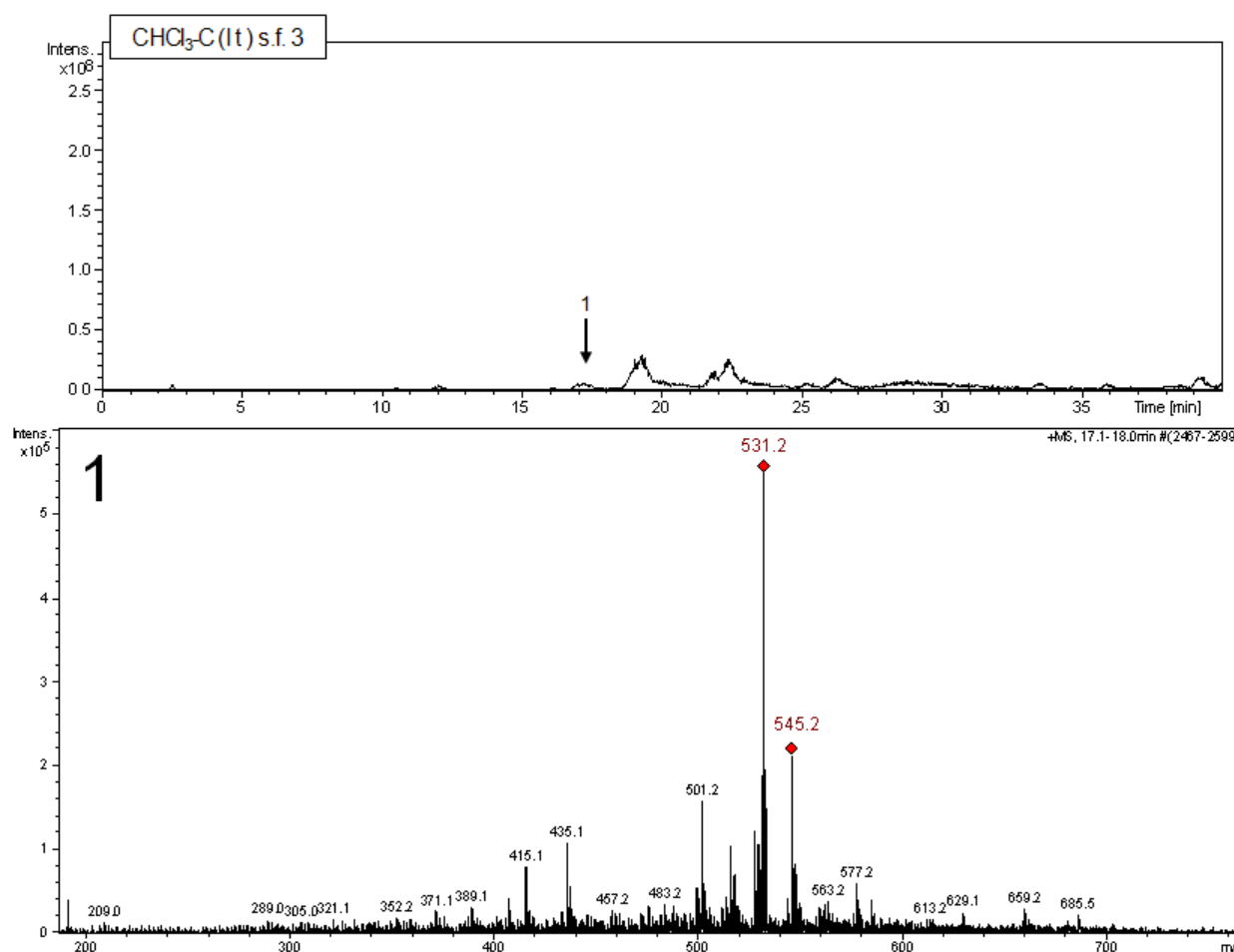


Figura 37: Análise em LC-MS ESI(+) da sub-fração 3 de $\text{CHCl}_3\text{-C}$ (IC). **Acima** - Cromatograma de contagem de íons totais (TIC – Total Íons Count), com a sinalização por meio de seta do pico correspondente à visualização em UV (λ) 254nm. **Abaixo, 1** - Espectro em MS/ESI(+) do pico indicado pela seta.

Após a análise em LC-MS ESI(+), os íons mais intensos dentre os quais foram encontrados correspondentes na análise por GC-MS e/ou busca na literatura, principalmente aqueles que foram recorrentes em mais de uma sub-fração, também foram analisados por ESI(+)-MS/MS para observar seus padrões de fragmentação. Sendo assim, as Figuras 38 a 45 a seguir, apresentam os espectros em ESI(+)-MS/MS obtidos por cromatografia líquida, seguidos dos espectros de massas correspondentes obtidos por GC-MS, com posterior identificação.

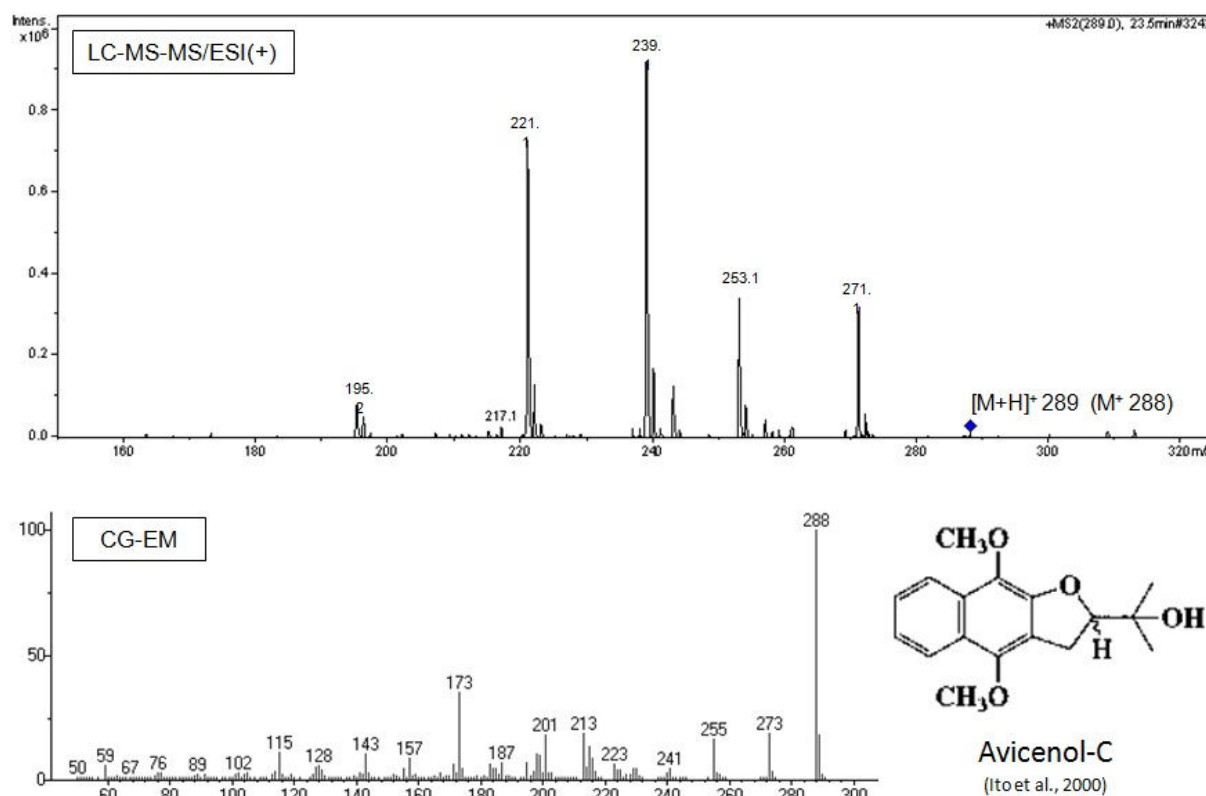


Figura 38: Espectro MS-MS/ESI(+) (**acima**) do íon m/z 289 $[M+H]^+$ e espectro GC-MS (**abaixo**) do composto de massa (M^+) 288, identificado como Avicenol-C à partir da literatura.

O composto de massa (M^+) 288 (Figura 38), que foi detectado nas sub-frações 2 e 3 de EP-C (IC) e na sub-fração 1 de $CHCl_3$ -C (It) na análise em LC-MS, e também na sub-fração 4 de EP-C (IC), sub-fração 2 de $CHCl_3$ -C (IC) e sub-fração 2 de $CHCl_3$ -C (It) no GC-MS (Tabela 8), não foi identificado à partir da biblioteca NIST. No entanto, consultando a literatura a respeito do gênero, o composto foi identificado como Avicenol-C, o qual foi isolado pela primeira vez de *Avicennia alba* e caracterizado por Ito et al. (2000).

O Avicenol-C é uma naftoquinona, que possui um cromóforo 1,4-naftoquinol, e apresenta a fórmula molecular $C_{17}H_{20}O_4$. O espectro descrito por Ito et al. (2000), – EI-MS m/z (%): 288 (M^+ , 100), 273 (19), 255 (16), 229 (7), 215 (18), 213 (32), 201 (27), 199 (17), 195 (11), 187 (13), 183 (10), 173 (63), 171 (12), 157 (16), 143 (23) – é muito semelhante ao encontrado nas amostras analisadas, desta forma é possível sugerir que este composto também ocorre em *A. schaueriana*.

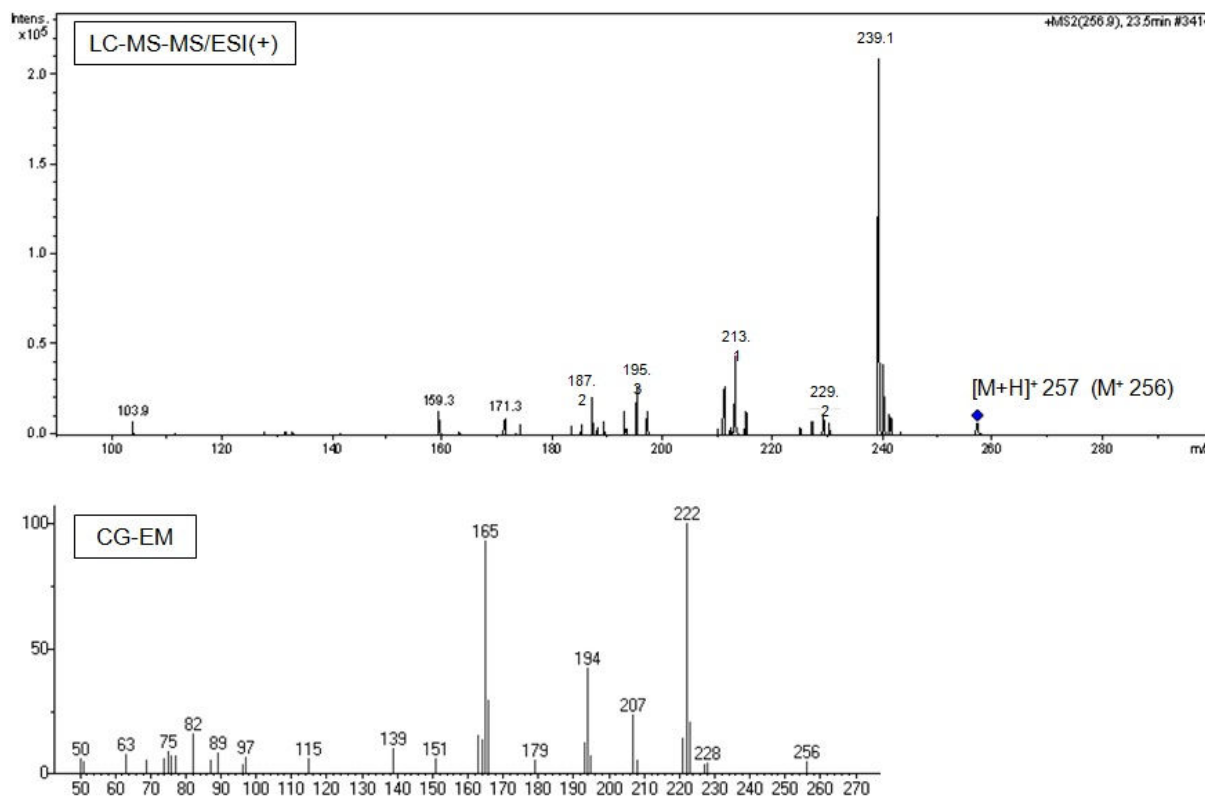


Figura 39: Espectro MS-MS/ESI(+) (**acima**) do íon m/z 257 $[M+H]^+$ e espectro GC-MS (**abaixo**) do composto de massa (M^+) 256.

O composto de massa (M^+) 256 (Figura 39), que foi detectado nas sub-frações 2, 3 e 4 de EP-C (IC), na sub-fração 2 e 3 de $CHCl_3$ -C (IC) e na sub-fração 2 de $CHCl_3$ -F (It) na análise em LC-MS, e somente na sub-fração 3 de $CHCl_3$ -C (IC) no GC-MS (Tabela 8), não pôde ser identificado à partir da biblioteca NIST. No entanto, Ito et al. (2000), descreveram outro composto, também isolado pela primeira vez de *Avicennia alba*, de massa (M^+) 256, denominado Avicequinona-C, ilustrado na Figura 40 a seguir.

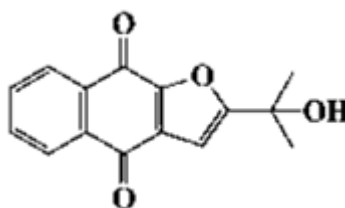


Figura 40: Avicequinona-C.

A Avicequinona-C é uma naftoquinona que apresenta fórmula molecular $C_{15}H_{12}O_4$. O espectro descrito por Ito et al. (2000), – EI-MS m/z (%): 256 (M^+ ,12), 241 (100), 214 (18), 199 (10), 129 (10), 115 (17), 105 (22) – difere do encontrado na análise das amostras por GC-MS, mas levando-se em consideração que a Avicequinona-C é uma naftoquinona análoga ao Avicenol-C, que ambas ocorrem em *A. alba*, e que esta última foi encontrada nas amostras de

A. schaueriana analisadas, é possível que o composto de massa (M^+) 256 tenha uma estrutura relacionada a Avicequinona-C.

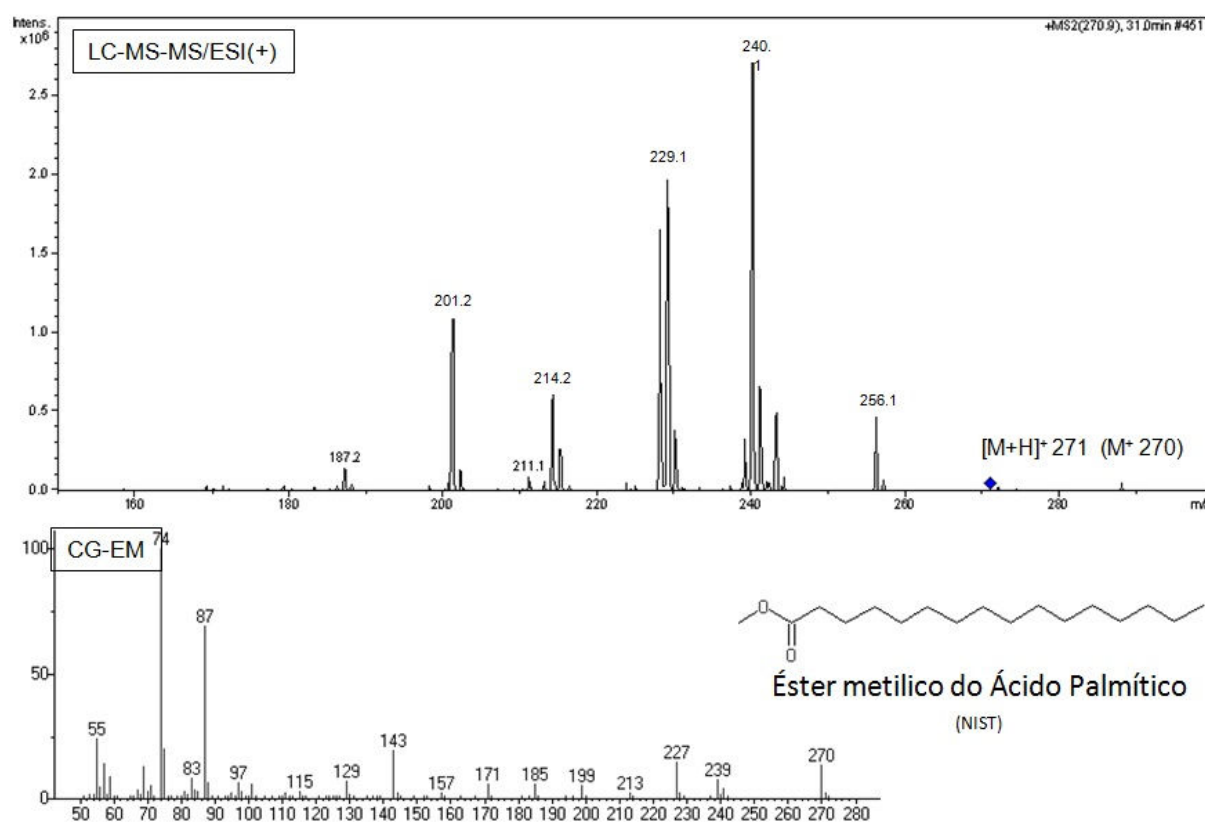


Figura 41: Espectro MS-MS/ESI(+) (**acima**) do íon m/z 271 $[M+H]^+$ e espectro GC-MS (**abaixo**) do composto de massa (M^+) 270, identificado como éster metílico do Ácido Palmítico à partir da biblioteca NIST.

O composto de massa (M^+) 270 (Figura 41), que foi detectado na sub-fração 3 de EP-C (IC) e na sub-fração 1 de $CHCl_3$ -C (It) na análise em LC-MS, e em todas as sub-frações pelo GC-MS (Tabela 8), foi identificado à partir da biblioteca NIST como o ester metílico do Ácido hexadecanóico, também denominado éster metílico do Ácido Palmítico. O espectro de massas da biblioteca – 74 (M^+ , 100), 87 (72), 43 (32), 55 (31), 41 (23), 143 (21), 75 (19), 57 (18), 69 (13), 227 (11) – é muito semelhante ao encontrado nas amostras, portanto é possível sugerir que este composto esteja presente em *A. schaueriana*.

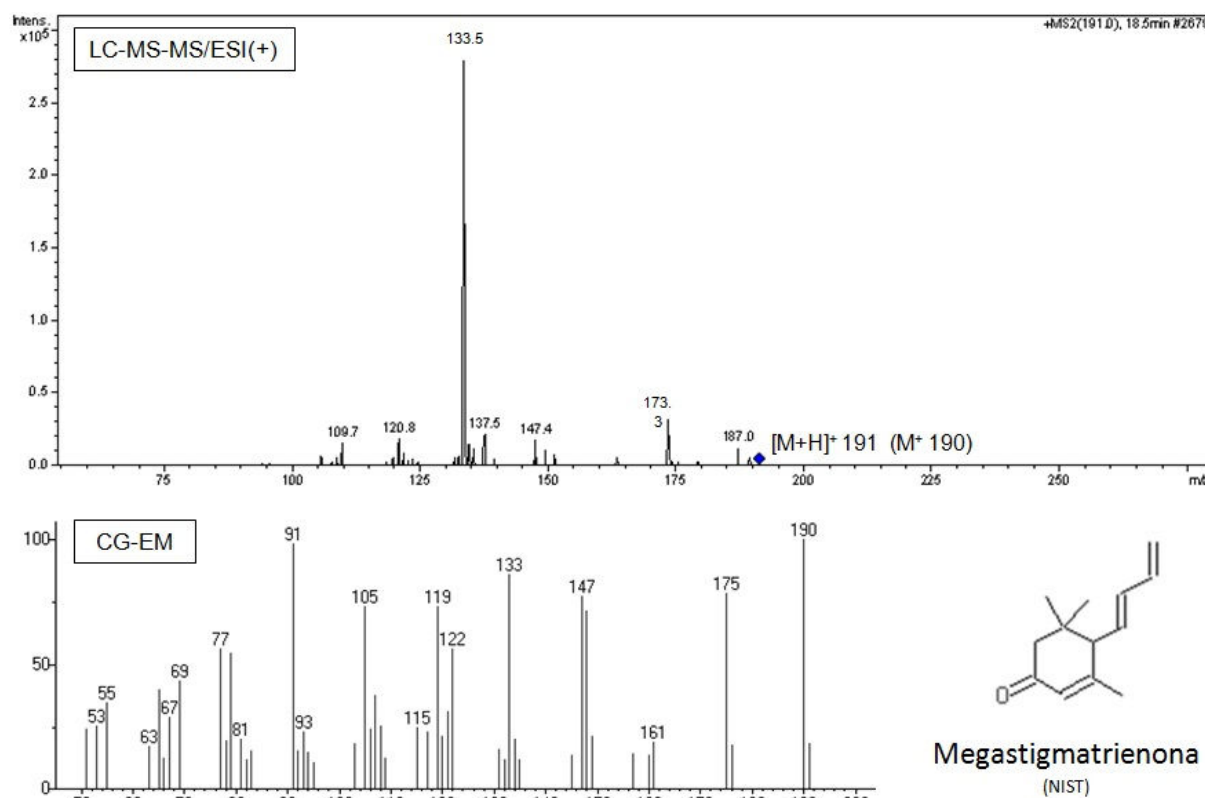


Figura 42: Espectro MS-MS/ESI(+) (acima) do íon m/z 191 $[M+H]^+$ e espectro GC-MS (abaixo) do composto de massa (M^+) 190, identificado como Megastigmatrienona à partir da biblioteca NIST.

O composto de massa (M^+) 190 (Figura 42), que foi detectado na sub-fração 2 de $CHCl_3$ -F (It) nas análises em LC-MS e GC-MS (Tabela 8), foi identificado à partir da biblioteca NIST como Megastigmatrienona. O espectro de massas da biblioteca – 190 (M^+ , 100), 148 (93), 175 (87), 133 (84), 147 (75), 91 (63), 119 (55), 41 (52), 105 (44), 39 (41) – é muito semelhante ao encontrado nas amostras, portanto, também é possível sugerir que este composto esteja presente em *A. schaueriana*.

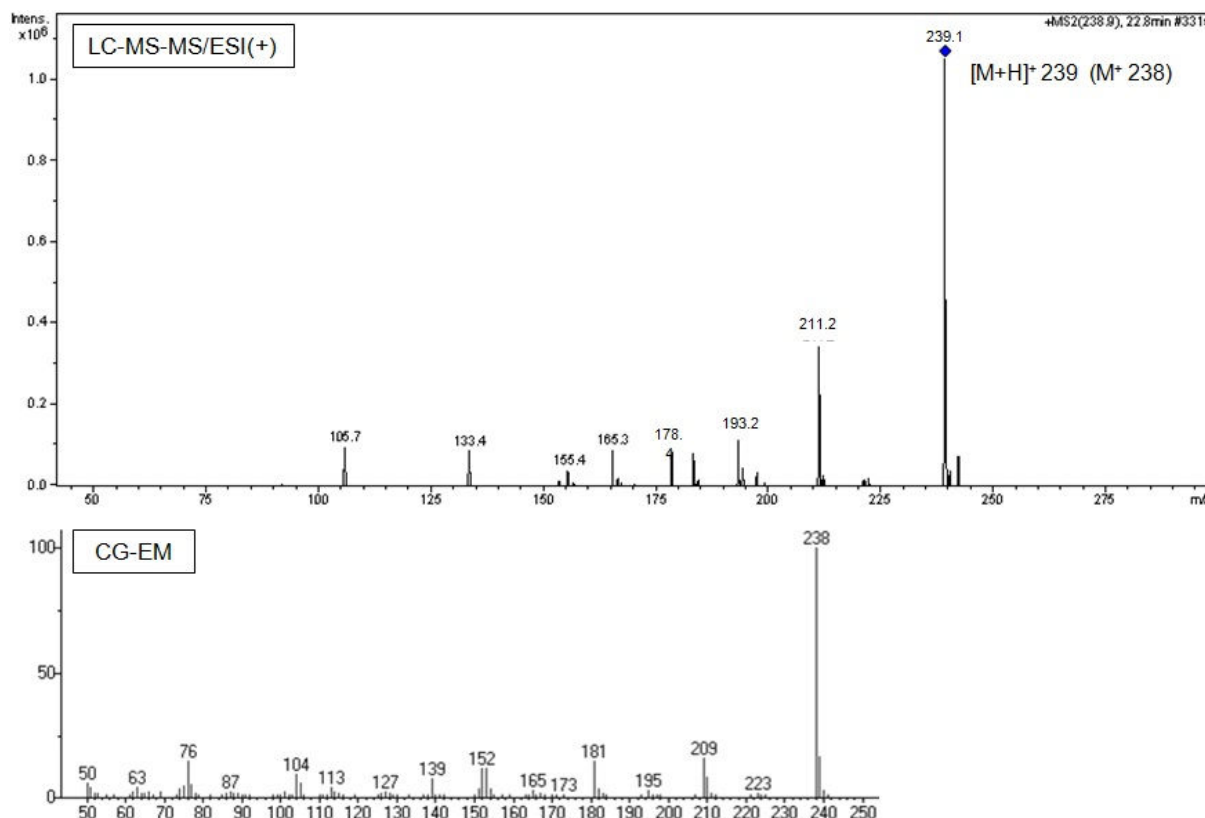


Figura 43: Espectro MS-MS/ESI(+) (**acima**) do íon m/z 239 [M+H]⁺ e espectro GC-MS (**abaixo**) do composto de massa (M⁺) 238.

O composto de massa (M⁺) 238 (Figura 43), foi detectado na sub-fração 4 de EP-C (IC), e nas sub-frações 2 e 3 de CHCl₃-C (IC) nas análises em LC-MS e GC-MS (Tabela 8).

Apesar de não ter sido identificado pela biblioteca, e também de não ter sido encontrado um padrão de fragmentação igual ao obtido na literatura, Singh et al. (2008), identificaram um composto de massa (M⁺) 238, denominado como 2-isopropenilnafto[2,3-b]furan-4,9-quinona, o qual encontra-se ilustrado na Figura 44.

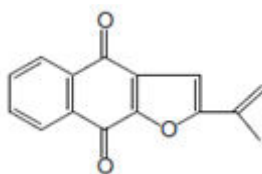


Figura 44: 2-isopropenilnafto[2,3-b]furan-4,9-quinona.

O artigo não traz a fragmentação do mesmo, mas levando em consideração que foram identificadas outras naftoquinonas semelhantes, e que o íon 239 presente no espectro em ESI(+)-MS-MS, é o íon 100% do composto de massa [M+H]⁺ 257 (sugerido como algo semelhante à Avicequinona-C), é plausível, que ao perder uma molécula de água, a Avicequinona-C venha a se transformar neste composto, portanto existe a possibilidade de que o mesmo esteja presente na amostra analisada.

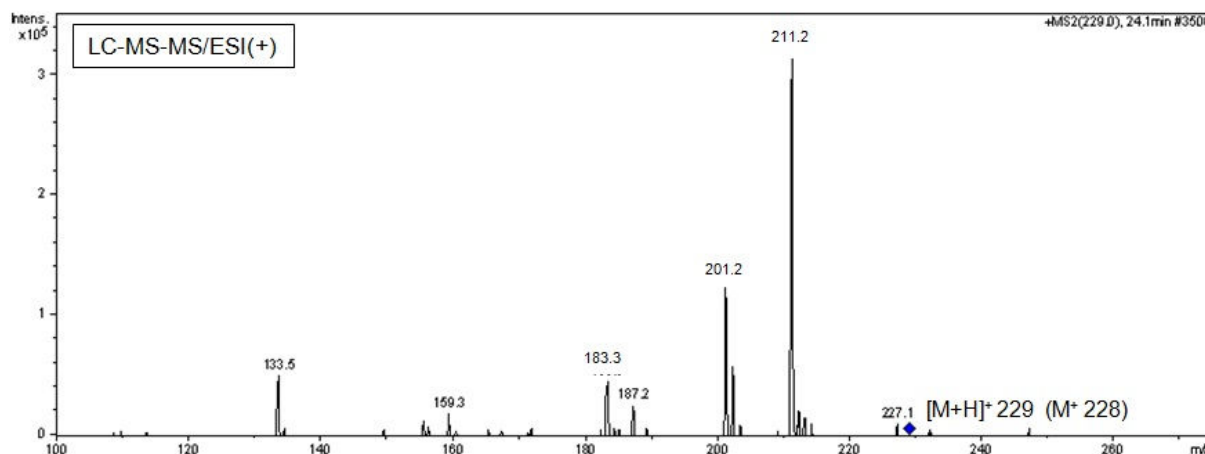


Figura 45: Espectro MS-MS/ESI(+) do íon m/z 229 $[M+H]^+$ sem espectro correspondente em GC-MS e não identificado.

O composto de massa (M^+) 228 (Figura 45), foi detectado somente na sub-fração 2 de EP-C (IC), e apenas na análise por LC-MS.

Apesar de não ter espectro de massas correspondente no banco de dados do GC-MS, Ito et al. (2000), identificaram um composto, também isolado pela primeira vez de *Avicennia alba*, de massa (M^+) 228, denominado como Avicenol-B, o qual encontra-se ilustrado na Figura 46 a seguir.

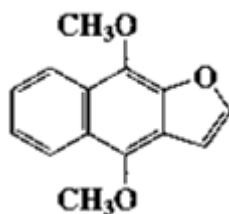


Figura 46: Avicenol-B.

O Avicenol-B é outra naftoquinona que possui um cromóforo 1,4-naftoquinol, apresenta a fórmula molecular $C_{14}H_{12}O_3$ e espectro de massas em EI-MS m/z (%): 228 (M^+ , 13), 213 (28), 167 (63), 149 (100), 135 (6). Esta naftoquinona é análoga à Avicequinona-B – (M^+) 198 –, a qual foi encontrada na sub-fração 2 de EP-C (IC) quando analisada por GC-MS (dados apresentados na Tabela 8).

Portando, levando-se em consideração que nas amostras estudadas foram identificadas outras naftoquinonas semelhantes, e que através do GC-MS foi encontrado, na mesma fração, um composto análogo ao Avicenol-B, é aceitável a sugestão de que seja esse, ou algum composto semelhante ao Avicenol-B de massa (M^+) 228, que esteja presente na amostra analisada.

Como observado, naftoquinonas se fazem presentes nas amostras analisadas, principalmente nas frações e sub-frações provenientes da Ilha do Cardoso. As naftoquinonas pertencem ao grupo das quinonas, uma classe estruturalmente diversa de compostos fenólicos com ampla gama de propriedades farmacológicas (Martínez, Benito, 2005).

Quinonas são encontradas em bactérias, fungos, líquens, gimnospermas e angiospermas nas mais diversas formas, sendo que em plantas ocorrem como benzoquinonas, antraquinonas e naftoquinonas (Martínez, Benito, 2005).

Numa revisão realizada por Wu et al. (2008), sobre os produtos naturais de plantas de mangue, constatou-se que dentre todas as espécies desse ecossistema, a presença de naftoquinonas se restringe apenas às do gênero *Avicennia*, já tendo sido relatadas 15 diferentes naftoquinonas a partir de estudos com *A. marina*, *A. alba* e *A. officinalis*, mostrando que esta classe de compostos é bem marcante e característica no gênero.

Os mesmos autores mencionam que estudos de atividade biológica realizados com naftoquinonas isoladas de espécies de *Avicennia*, tais como Avicequinona-A e C, Estenocarpoquinona-B e a mistura das Avicenonas-E e F, exibiram atividade antimicrobiana significativa contra *Candida albicans*, além de forte atividade antiproliferativa contra linhagens celulares relacionadas à leucemia mieloide crônica humana.

Quinonas estão fortemente associadas à atividade antifúngica, sendo que neste aspecto as naftoquinonas recebem grande destaque, apresentando eficiência comprovada no combate a *C. albicans*, *Fusarium* spp. e até mesmo contra o basidiomiceto *Pleurotiis sajor*, causador da podridão branca no cajueiro (Martínez, Benito, 2005).

Além de atividade antifúngica, as naftoquinonas também estão relacionadas a diversas outras atividades biológicas, como atividade antineoplásica, ou anti-câncer, atividade anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, antibacteriana, antiprotozoária e moluscicida (Martínez, Benito, 2005). Segundo Lucas et al. (2013), o mecanismo de ação dessas quinonas está relacionado à sua capacidade redox, a qual pode conduzir à formação de espécies reativas de oxigênio responsáveis por danificar macromoléculas celulares.

Levando-se em consideração a amplitude de atividades biológicas das naftoquinonas, principalmente com relação à inibição do crescimento de fungos patogênicos, e relacionando esse fato à presença marcante das mesmas em plantas do gênero *Avicennia*, é possível afirmar que as naftoquinonas recorrentes em *A. schaueriana* possuem estreita relação com o forte potencial antifúngico detectado nos testes com seus extratos, sendo provavelmente as principais responsáveis pela atividade, já que as frações e sub-frações mais ativas, ou seja,

aquelas provenientes da Ilha do Cardoso foram as que apresentaram maior teor e variedade de naftoquinonas.

Além das substâncias mencionadas até o momento, que foram identificadas através da união de técnicas espectroscópicas, várias outras foram identificadas a partir da análise por GC-MS. As Tabelas 8 e 9 a seguir, apresentam as substâncias identificadas nas sub-frações e nas frações metiladas, respectivamente. Quando não foi possível identificar os compostos através da biblioteca do equipamento, os espectros de massas foram comparados com dados da literatura citados para o gênero.

Observando os compostos descritos na Tabela 8, além das naftoquinonas já mencionadas (as quais também foram detectadas através de LC-MS) a análise por GC-MS proporcionou a detecção da Avicequinona-B, identificada a partir da literatura, o Lapachol e α -Lapachona, presentes no EP-C (IC), e a Nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-isopropil, sendo que esta última representa o pico mais abundante da sub-fração 4 do EP-C (IC) e das sub-frações de CHCl_3 -C (IC), reforçando a discussão anterior a respeito da forte presença de naftoquinonas em *A. schaueriana*. A Figura 47 a seguir ilustra essas naftoquinonas.

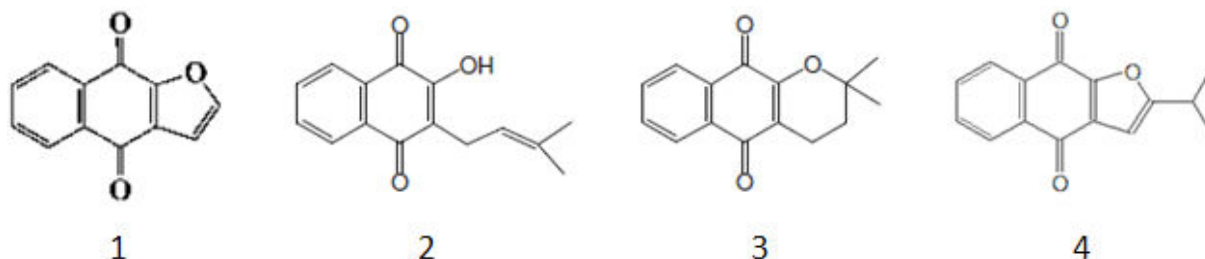


Figura 47: Naftoquinonas detectadas por GC-MS. 1– Avicequinona-B. 2– Lapachol. 3– α -Lapachona. 4– Nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-isopropil.

A Avicequinona-B foi isolada pela primeira vez de *Avicennia alba* e caracterizada por Ito et al. (2000). Como já mencionado, é um composto análogo ao Avicenol-B, também detectado no presente trabalho, e apresenta fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{O}_3$.

Já o Lapachol foi isolado pela primeira vez no ano de 1882 a partir de *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae), sendo encontrado mais tarde em várias outras espécies e famílias. Dentre as muitas naftoquinonas biologicamente ativas, o lapachol pode ser considerado como a mais versátil delas, pois apresenta diversas atividades biológicas tais como atividade antiviral, anti-inflamatória, antiparasitária e moluscicida, mas ficou amplamente conhecido a partir de 1968 quando testes demonstraram atividade altamente significativa contra tumores cancerígenos, porém seu uso para este tratamento não ganhou

Resultados e Discussão

Tabela 8: Compostos detectados por CG-EM em frações de Éter de Petróleo (IC e It) e sub-frações ativas.

T.R. (min)	Composto	Área relativa (%)													
		Ilha do Cardoso								Itanhaém					
		EP-F	EP-C	EP-C			CHCl ₃ -F	CHCl ₃ -C		EP-F	EP-C	CHCl ₃ -F	CHCl ₃ -C		
s.f. 2	s.f. 3			s.f. 4	s.f. 2	s.f. 2	s.f. 3	s.f. 2	s.f. 1			s.f. 2	s.f. 3		
20,79	Megastigmatrienona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,89	-	-	-
22,68	Ácido tetradecanóico, éster metílico	-	-	4,66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23,89	Avicequinona-B *	-	-	7,13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24,81	Ácido Palmítico, éster metílico	9,45	1,45	2,01	0,52	5,42	4,54	1,94	4,5	8,56	8,79	4,35	3,10	3,92	9,18
25,30	Naftaleno	-	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25,51	Ácido oleico, éster metílico	-	0,47	0,80	0,23	7,55	2,15	-	7,4	-	-	-	-	-	-
25,91	Lapachol	-	2,22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26,06	1,1'-Bifenil]-2-ol, 5-(1,1-dimetiletil)	-	7,34	-	0,53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26,46	Ácido linoleico, éster metílico	-	1,66	1,98	0,27	3,12	-	-	2,71	0,11	9,60	-	-	-	-
26,53	Ácido 11-Octadecenoico, éster metílico	-	-	-	-	-	-	-	-	12,40	9,77	-	-	-	-
26,60	Fitol	6,56	-	-	-	-	-	-	-	4,74	1,16	-	-	-	-
26,65	Nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-isopropil	-	-	-	-	28,57	-	81,21	50,96	-	-	-	-	27,01	-
26,75	Ácido esteárico, éster metílico	-	-	-	-	7,81	2,16	-	2,95	-	2,75	-	-	-	8,21
26,78	α-Lapachona	-	2,37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26,82	N.I. (Semelhante à Avicequinona-C) *	-	-	-	-	-	-	-	4,20	-	-	-	-	-	-
27,23	2-isopropenilnafto[2,3-b]furan-4,9-quinona *	-	-	-	-	7,32	-	8,03	-	-	-	-	-	-	-
28,54	Ácido eicosanóico, éster metílico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,12	-	-	-	-
28,58	Avicenol-C *	-	8,16	1,48	20,61	15,42	-	7,56	-	-	-	-	56,47	6,3	-
32,75	Trans-Esqualeno	9,54	-	-	-	-	-	-	-	-	2,33	-	-	-	-
40,13	Estigmasterol	2,79	-	-	-	-	-	-	-	-	4,95	-	-	-	-
42,26	γ-Sitosterol	4,37	-	-	11,84	-	-	-	-	7,99	17,65	-	-	-	-
43,03	β-Amirina	16,61	2,85	7,13	3,73	-	-	-	-	9,09	1,85	-	-	-	-
43,56	Lupenona	-	14,70	7,15	2,07	-	-	-	-	-	0,69	-	-	-	-
44,96	Lupeol	42,98	23,37	61,06	26,22	18,94	-	-	-	37,78	23,97	-	-	-	-
46,38	Estigmastenona	-	3,43	5,80	6,46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

T.R (min): Tempo de Retenção em minutos; Área (%): porcentagem de área relativa dos compostos identificados. N.I.: Compostos não identificados. Compostos marcados com * foram identificados a partir de consultas na literatura referente ao gênero.

Resultados e Discussão

Tabela 9: Compostos detectados por GC-MS nas frações Clorofórmicas, frações de Acetado de Etila e resíduos Hidrometanólicos após metilação.

T.R. (min)	Composto	Área (%)											
		Ilha do Cardoso						Itanhaém					
		CHCl ₃ - F	CHCl ₃ - C	AcOEt- F	AcOEt- C	MeOH/ H ₂ O-F	MeOH/ H ₂ O-C	CHCl ₃ - F	CHCl ₃ - C	AcOEt- F	AcOEt- C	MeOH/ H ₂ O-F	MeOH/ H ₂ O-C
19,775	Ácido cinâmico, éster metílico	10,85	1,18	56,34	5,82	1,47	-	50,16	36,73	78,39	74,79	57,76	9,07
24,699	Ácido 3,4-dimetoxi benzoico, éster metílico	-	1,28	-	1,01	-	-	-	1,53	-	-	-	1,19
25,533	1,2,3,4-Tetrahidronaftaleno-1-ácido carboxílico, 2-amino-, éster metílico	-	-	-	-	-	-	4,84	3,59	2,51	1,50	-	-
27,845	Ácido tetradecanóico, éster metílico	0,88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32,159	Ácido Palmítico, éster metílico	6,37	3,03	3,33	-	-	-	9,79	14,03	1,56	2,92	-	2,93
35,197	Ácido linoleico, éster metílico	1,79	2,64	-	-	-	-	2,26	9,33	-	-	-	-
35,313	Ácido 10-octadecenoico, éster metílico	-	3,85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35,340	Ácido linolenico, éster metílico	10,99	-	-	-	-	-	10,33	-	-	-	-	-
35,367	Ácido 9-Octadecenóico, éster metílico	-	-	-	-	-	-	-	12,17	-	-	-	-
35,943	Ácido esteárico, éster metílico	0,74	-	-	-	-	-	2,01	2,34	-	-	-	-

T.R (min): Tempo de Retenção em minutos; Área (%): porcentagem de área relativa dos picos identificados. N.I.: Composto não identificado.

força já que os efeitos tóxicos e colaterais são igualmente expressivos. O lapachol também apresenta atividade antimicrobiana e antifúngica, e apesar de não se saber ao certo o mecanismo exato de ação, acredita-se que ele esteja relacionado à sua capacidade, assim como de outras naftoquinonas, em interferir no sistema de transporte de elétrons e inibir o mecanismo respiratório celular (Hussain, et al., 2007).

Recentemente, o lapachol vem sendo estudado sob a ótica do combate a fitopatógenos e pragas, desta forma, Sousa, et al. (2008), realizaram testes contra o fungo *Fusarium oxysporum*, obtendo 92,8% de inibição no crescimento do mesmo quando inoculado com lapachol comercial isolado à partir de madeira de ipê.

A análise em GC-MS também proporcionou a detecção de vários ésteres metílicos de ácidos graxos, sendo que alguns deles encontram-se presentes com discreta representatividade nas amostras, como é o caso dos ésteres metílicos do Ácido Palmítico, do Ácido Oleico, do Ácido Linoleico e Ácido 11-Octadecenoico, encontrados em várias frações, e representados na Figura 48 a seguir.

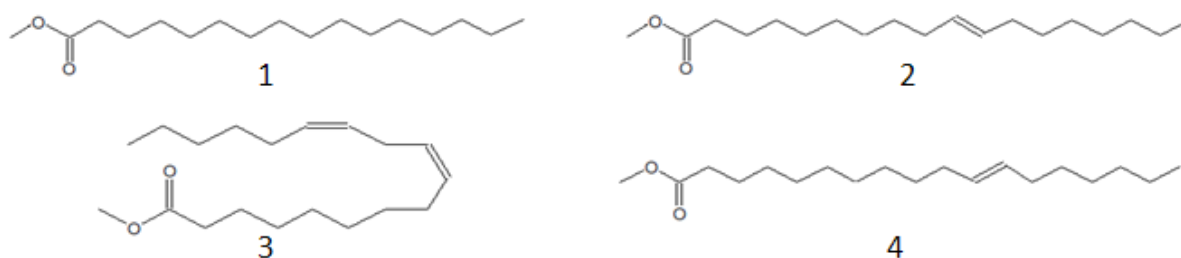


Figura 48: Ácidos graxos metilados detectados por GC-MS. 1– Ácido Palmítico, éster metílico. 2– Ácido Oleico, éster metílico. 3– Ácido Linoleico, éster metílico. 4– Ácido 11-Octadecenoico, éster metílico.

Os ácidos graxos são constituintes de todas as células vegetais, funcionando como compostos de membrana, produtos de armazenamento e fonte de energia, podendo também mediar defesas químicas contra microorganismos (Chandrasekaran et al., 2011). Alguns autores destacam que ácidos graxos apresentam potencial antifúngico, como foi o caso de Abdelillah et al. (2013), que ao avaliar a atividade antifúngica da fração de ésteres metílicos de ácidos graxos isolados das sementes de *Linum usitatissimum* contra os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus ochraceus*, detectaram inibição no crescimento micelial de 54,19 e 40,48% respectivamente. Já Shafaghat (2012), detectou inibição de 72% no crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* no teste com o extrato hexânico das folhas de *Hypericum scabrum*, o qual é rico em ácidos graxos, tendo como principais constituintes o ácido linoleico (ômega-6) e o ácido linolênico (ômega-3).

Em plantas de manguezal, os ácidos graxos são encontrados em abundância. Chandrasekaran et al. (2010) caracterizaram ácidos graxos presentes em 8 espécies de

manguezal, incluindo uma do gênero *Avicennia* (*A. officinalis*), onde o ácido palmítico foi o composto mais abundante em todas elas, e o ácido oleico foi o segundo mais abundante em *A. officinalis*. Chandrasekaran et al. (2011) ainda afirmaram que não só as plantas de manguezal, mas as halófitas de maneira geral apresentam forte atividade antifúngica relacionada aos ácidos graxos, comprovando sua afirmação através de ensaios realizados com a fração de ésteres metílicos de ácidos graxos isolados das folhas de *Sesuvium portulacastrum* contra os fungos patogênicos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*, chegando ao valor de CMI (concentração mínima inibitória) de 4 e 8mg/mL respectivamente.

Além das naftoquinonas e dos ácidos graxos, o Lupeol, um triterpeno ilustrado na Figura 49, foi outro composto com grande representatividade nas frações de folhas e caules de Éter de Petróleo (IC) e sub-frações deste último. Em estudos realizados por Gallo e Sarachine (2009), Lupeol apresentou zonas moderadas de inibição contra o crescimento dos fungos *Aspergillus Níger*, *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia phaseoli* e *Penicillium chrysogenum*, sendo este um indício de que, além dos demais compostos, o Lupeol também possa estar relacionado a atividade antifúngica em *A. shaueriana*, agindo como um intensificador, já que o mesmo foi detectado apenas em frações provenientes da Ilha do Cardoso, as quais são mais ativas em relação as frações de Itanhaém.

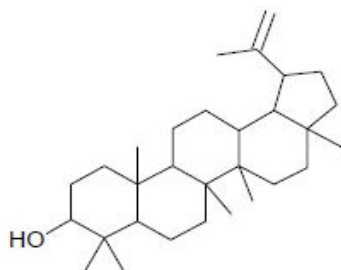


Figura 49: Lupeol.

Na Tabela 9, onde estão descritos os compostos identificados nas frações após o processo de metilação, infelizmente nenhum composto da fração MeOH/H₂O-C (IC) foi identificado, no entanto para as demais, além da forte presença de ácidos graxos, foram detectados: o éster metílico do ácido cinâmico e o éster metílico do ácido 3,4-dimetoxi benzoico, ilustrados na Figura 50 a seguir, sendo que o primeiro representa o pico mais abundante em quase todas as amostras em que foi localizado.

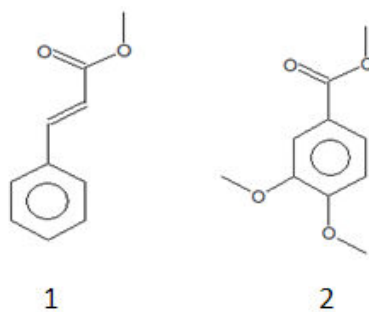


Figura 50: Estruturas do éster metílico do Ácido cinâmico (1) e do éster metílico do ácido 3,4-dimetoxibenzoico (2).

Muitas atividades biológicas tem sido atribuídas ao ácido cinâmico e seus derivados, tais como a inibição do *Plasmodium falciparum*, causador da malária (Kanaani, Ginsburg, 1992) e potencial anti-inflamatório (Fernandez et al., 1998) e antimicrobiano contra bactérias, e fungos do gênero *Pytium* sp. (Tawata et al., 1996). Em um experimento realizado por Said et al. (2004), com o fungo filamentosso *Neurospora crassa*, após 24 horas de inoculação numa concentração de 200µg/mL, o ácido cinâmico foi capaz de inibir 94% de seu crescimento em relação ao controle, além de causar mudanças no padrão de ramificação das hifas. Desta forma, o ácido cinâmico é outro composto que pode auxiliar na intensificação da atividade antifúngica em *A. schaueriana*.

Após a detecção destes compostos e classes de compostos relacionados à atividade antifúngica, é possível afirmar que *A. schaueriana* não possui apenas um único artifício para se proteger contra fungos, mas sim um arsenal, pois a ausência de naftoquinonas em frações e sub-frações provenientes de Itanhaém, e em algumas provenientes da Ilha do Cardoso, não impediu que as mesmas apresentassem atividade, ainda que menos intensa. Desta forma, acredita-se que os ácidos graxos e o ácido cinâmico, comuns a todas as amostras analisadas, cumprem um papel basal na defesa antifúngica, a qual é intensificada pela presença das naftoquinonas, classe reconhecida na literatura como biologicamente muito ativa.

O forte potencial antifúngico detectado em *A. schaueriana*, assim como o potencial antioxidante, deve estar provavelmente relacionado, às estratégias de sobrevivência da planta em seu meio característico, já que os manguezais são ambientes demasiadamente úmidos, condição esta, altamente favorável ao desenvolvimento de fungos, levando a acreditar que não apenas *A. schaueriana*, como também as demais espécies de manguezal venham a ser promissoras no isolamento de compostos antifúngicos para uso na medicina e agricultura.

Desta forma, sugere-se que estudos futuros se comprometam com o isolamento dos compostos antifúngicos e antioxidantes presentes em *A. schaueriana*, almejando a identificação não apenas de compostos conhecidos, como também de outros inéditos.

5. Conclusões

A comparação do perfil químico entre *A. schaueriana* coletada na Ilha do Cardoso e Itanhém por meio da purificação das frações ativas mostrou que existem diferenças quantitativas de acordo com o perfil cromatográfico, e qualitativas de acordo com a identificação dos compostos que provavelmente estão relacionados à atividade antifúngica.

A. schaueriana proveniente da Ilha do Cardoso se mostrou mais ativa em relação àquela coletada em Itanhaém para as duas atividades biológicas testadas. No que se refere à atividade antioxidante, o maior teor de compostos fenólicos detectado nos extratos e frações de *A. schaueriana* (IC) relaciona-se diretamente ao potencial de sequestro de radicais livres para as mesmas amostras, estando a atividade provavelmente relacionada à presença de flavonoides detectados a partir de revelações químicas.

Já a atividade antifúngica provavelmente está relacionada à presença de naftoquinonas variadas dentre as quais se encontra o lapachol, à ampla gama de ésteres metílicos de ácidos graxos, à presença do lupeol, e também de ácidos como o cinâmico. A diferença de potencial antifúngico entre os indivíduos coletados nos dois locais, provavelmente se deve à presença mais marcante das naftoquinonas em *A. schaueriana* proveniente da Ilha do Cardoso do que na proveniente de Itanhaém, na qual quase não foram detectadas.

6. Referências bibliográficas

- Abdelillah, A.; Houcine, B.; Halima, D.; Meriel, C. S.; Imane, Z.; Eddine, S. D.; Abdallah, M.; Daoudi, C. S.** 2013. Evaluation of antifungal activity of free fatty acids methyl esters fraction isolated from Algerian *Linum usitatissimum* L. seeds against toxigenic *Aspergillus* Asian Pac J Trop Biomed. 3(6): 443-448
- Abreu, G.F., Talamini, V.; Stadnik, M. J.** 2008. Bioprospecção de macroalgas marinhas e plantas aquáticas para o controle da antracnose do feijoeiro. Summa Phytopathologica. 34: 22-26.
- Aharoni, A.; Jongsma, M.A.; Kim, T.-Y.; Ri, M.-B.; Giri, A.P.; Verstappen, F.W.A.; Schwab, W.; Bouwmeester, H.J.** 2006. Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. Phytochemistry Reviews 5: 49-58.
- Barroso, G. M.;** 1991. Sistemática das Angiospermas do Brasil. 2.ed. Viçosa, MG: UFV Imprensa Universitária.
- Bernini, E.; Silva, M. A. B.; Carmo, T. M. S.; Cuzzuol, G. R. F.** 2006. Composição química do sedimento e de folhas das espécies do manguezal do estuário do Rio São Mateus, Espírito Santo, Brasil. Revista Brasil. Bot., 29(4): 689-699.
- Bousquet-Mélou, A.; Fauvel, M.** 1998. Inter-specific variation in the concentration of two iridoid glucosides in *Avicennia* L. (Avicenniaceae Endl.). Biochem. Syst. Ecol. 26(8): 935-940.
- Buchanan, B. B.; Gruissen, W.; Jones, R. L.** 2000. Biochemistry and molecular biology of plants. Rockville: American Society of Plant Physiologists.
- Chandrasekaran, M.; Kumar, A.S.; Kannathasan, K.; Venkatesalu, V.** 2010. Fatty-acid composition of some mangroves. Chemistry of Natural Compounds. 46(1): 92-94.
- Chandrasekaran, M.; Senthilkumar, A.; Venkatesalu, V.** 2011. Antibacterial and antifungal efficacy of fatty acid methyl esters from the leaves of *Sesuvium portulacastrum* L. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 2011; 15: 775-780.
- Chen, L.Y.; Peng, S.L.; Chen, B.M.; LI, J.; Pang, J.** 2009. Effects of Aqueous extracts of 5 mangrove spp. on cabbage germination and hypocotyl growth of *Kandelia candel.* Allelopathy J. 23 (2): 469-476.
- Chun, S.-S.; Vatem, D. A.; Lin, Y.-T.; Shetty, K.** 2005. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. Process Biochem. 40 (2): 809-816.

- Conservation International.** The biodiversity hotspots. Disponível em: <http://www.conservation.org/where/priority_areas/hotspots/Pages/hotspots_main.aspx>. Acesso em: 09. Ago. 2011.
- Cseke, L.J.; Kirakosyan, A.; Kaufman, P.B.; Warber, S.L.; Duke, A.J.; Brielmann, H.L.** 2006. Natural Products from Plants, 2^a ed.; CRC Press-Taylor and Francis Group, Boca Ranton.
- Cuendt, M., Hostettmann, K., PotteraT, O., Dyatmiko, K.** 1997. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagaria blumei*. *Helvetica Chimica Acta* 80: 1144-1152.
- Degani, A. L. G.; Cass, Q. B.; Vieira, P. C.** 1998. Cromatografia: um breve ensaio. Química Nova na Escola. 7: 21-25.
- Dewick, P. M.** 2009. Medicinal Natural Products – A biosynthetic approach. 3 ed. John Wiley and Sons. West Sussex. UK.
- Di Stasi, L. C.** 1996. Arte, ciência e magia. *In: Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar.* Di Stasi, L. C. São Paulo: Editora Fundação UNESP.
- Dudareva, N.; Pichersky, E.; Gershenzon, J.** 2004. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology*. 135: 1893–1902.
- Falkenberg, M. B., Santos, R. I., Simões, C. M. O.** 1999. Introdução à análise fitoquímica. *In: C.M.O. Simões, E.P. Sckenkel, G. Grosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz, P.R. Petrovick (eds.). Farmacognosia: da planta ao medicamento.* Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, pp. 163-179
- Fávero, O. A.; Pavan, S.** 1997. Botânica econômica. São Paulo: Catálise Editora.
- Feng, Y.; Li, X. M.; Duan, X. J.; Wang, B. G.** 2006. Iridoid glucosides and flavones from the aerial parts of *Avicennia marina*. *Chem. Biodivers.* 3 (7): 799-806.
- Fernandez, M. A.; Saens, M. T.; Garcia, M. D.** 1998. Anti-inflammatory activity in rats and mice of phenolic acids isolated from *Scrophularia frutescens*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 50, 1183–1186.
- Ferri, P. H.** 1996. Química de produtos naturais: métodos gerais. *In: Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar.* Di Stasi, L. C. São Paulo: Editora Fundação UNESP.
- Fonseca, S. M.; Rocha, M. T.** O MDL e as florestas de manguezal. *In: Seminários em Administração - SEMEAD.* 7., 2004, São Paulo: FEA-USP.
- Furlan, C. M.; Motta, L. B.; Santos, D. Y. A. C.** 2010. Tannins: what do they Represent in plant life?. *In: Georgios K. Petridis (ed). Tannins: Types, Foods Containing, and Nutrition.* Nova Science Publishers, Inc. p. 1-13.

- Gallo, M. B. C.; Sarachine, M. J.** 2009. Biological activities of lupeol. International journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences. 3 (1): 46-66.
- Gang, D.R.** 2005. Evolution of flavors and scents. Annu. Rev. Plant Biol. 56: 301–325.
- Garcia, E. S.** 1995. Biodiversidade, Biotecnologia e Saúde. Cad. Saúde Públ. 11(3): 495-500.
- Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P.** 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Química Nova 30: 374-381.
- Gottlieb, O. R.** 1990. Phytochemicals: differentiation and function. Phytochemistry 29: 1715-1724.
- Guerra, M. P.; Nodari, R. O.** 2001. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. *In*: Farmacognosia: da planta ao medicamento. Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/Ed. Da UFSC.
- Gugnani, H. C.; Sood, N.; Singh, B.; Makkar R.** 2000. Subcutaneous phaeohyphomycosis due to *Cladosporium cladosporioides* Mycoses 43: 85–87.
- Hanazaki, N.** 2003. Comunidades, conservação e manejo: o papel do conhecimento ecológico local. Biotemas. 16(1),23-47.
- Harborne, J.** 1989. General procedures and measurement of total phenolics. *In*: Methods in plant biochemistry: Plant Phenolics, Academic Press, London.
- Harborne, J. B.** 1993. Introduction to ecological biochemistry. 4ed. Academic Press. London
- Harborne, J.; Williams, C.** 2000. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry. 55: 481–504.
- Haslam E.** 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. J. Nat. Prod. 59 (2): 205-15.
- Heldt, H.** 2005. Plant Biochemistry. 3.ed. San Diego, California (USA): Elsevier.
- Homans, A. L.; Fuchs, A.** 1970. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. Journal of Chromatography 51: 327-329.
- Hoog, G. S.; Garro, J.** 1995. Atlas of Clinical Fungi. CBS, Spain.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.** 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. J. Agric. Food Chem 53(6), 1841-1856.
- Hussain, H.; Krohn, K.; Ahmad, V. U.; Miana, G. A.; Green, I. R.** 2007. Lapachol: an overview. ARKIVOC (ii): 145.

- Ito, C.; Katsuno, S.; Kondo, Y., Tan, H. T.; Furukawa, H.** 2000. Chemical constituents os *Avicennia alba*. Isolation and structural elucidation of a new naphthoquinones and their analogues. Chem. Pharm. Bull. 48(3): 339-343.
- Kanaani, J., Ginsburg, H.** 1992. Effects of cinnamic acid derivatives on in vitro growth of *Plasmodium falciparum* and on the permeability of the membrane of malaria-infected erythrocytes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 36: 1102–1108.
- Lacerda, L. D.** 1999. Os manguezais do Brasil. In: Os manguezais e nós. Vannucci, M. São Paulo: Edusp – Editora da Universidade de São Paulo.
- Lagos, A. R.; Muller, B. L. A.** 2007. Hotspot brasileiro Mata Atlântica. Saúde e Ambiente em Revista. 2(2),35-45.
- Liu, Z. Q.** 2010. Chemical Methods To Evaluate Antioxidant Ability. Chemical Reviews. 110 (10): 5675-5691.
- Lucasa, N. C.; Ruisa, C. P.; Teixeira, R. I.; Marc, L. L., Gardena, S. J.; Correa, R. J.; Ferreira, S.; Netto-Ferreira, J. C. Ferreira, V. F.** 2013. Photosensitizing properties of triplet furano and pyrano-1,2-naphthoquinones. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 276: 16– 30
- Mariano, A. F. S.; Freitas, P. A. A.; Ramalho, V. L. A.; Couto, J. A.** 2010. Cromatografia de aminoácidos em papel em aulas práticas de bioquímica. JEPEX 2010 – UFRPE: X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão. 18 a 22 de outubro.
- Marinova, D.; Ribarova, F.; Atanassova, M.** 2005. Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy. 40 (3): 255-260.
- Martinez, M. J. A.; Benito, P. B.** 2005. Biological activity of quinones. Atta-ur-Rahman (Ed.) Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 30 Elsevier. 303-366
- Mendes, M. A. S.; Urban, A. F.** 2014. Fungos relatados em plantas no Brasil, Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível em: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aqweb/michtml/fgbanco01.asp>. Acesso em: 10/2/2014.
- Meng, J.; Barnes, C.S.; Rosenwasser L.J.** 2012. Identity of the fungal species present in the homes of asthmatic children. Clinical & Experimental Allergy 42: 1448–1458.
- Miguel, M. G.** 2010. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. Flavour and Fragrance Journal. 25: 291–312
- Molyneux, P.** 2004. The use of the stable free radical di-phenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J. Sci. Technol. 26(2): 211-219.
- Monteiro, J. M.; Albuquerque, U. P.; Araujo, E. L.; Amorim, E. L. C.** 2005. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. Química Nova. 28: 892-896.

- Myers, N.** 1988. Threatened biotas: “hotspots” in tropical forests. *Environmentalist*. 8(3), 187-208.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., da Fonseca, G. A. B., Kent., J.** 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 403(24), 853-858.
- Oliva, A., Meepagala, K.M., Wedge, D.E., Harries, D., Hale, A.L., Aliotta, G., Duke, S.O.** 2003. Natural Fungicides from *Ruta graveolens* L. Leaves, Including a New Quinolone Alkaloid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 890–896.
- Parida, A. K.; Jha, B.** 2010. Salt tolerance mechanisms in mangroves: a review. *Trees*. 24: 199–217.
- Pietta, P.G.** 2000. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63(7) 1035-1042.
- Pimentel, C.** 1998. Metabolismo de carbono na agricultura tropical. Seropédica: EDUR - Editora Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. p.150
- Pinto, L. P.; et al.** 2006. Mata Atlântica Brasileira: os desafios para conservação da biodiversidade de um hotspot mundial. *In: Biologia da Conservação: essências*. ROCHA, C. F. D.; BERGALLO, H. G.; SLUYS, M. V.; ALVES, M. A. S. (eds.). São Carlos: RiMa.
- Podsdek, A.** 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Sci. Technol.* 40: 1-11.
- Profice, S. R.; Kameyama, C.; Côrtes, A. L. A.; Braz, D. M.; Indriunas, A.; Vilar, T.; Pessoa, C.; Ezcurra, C.; Wasshausen, D.** 2010. Acanthaceae. *In: Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Qiu-Xia, C.; Xing, C.L.; Ming, H.W.; Qiang, S.J.; Wen, L.; Fang, L.S.** 2007. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Cladosporium sphaerospermum* *Mycoses* 51: 79–80.
- Ramadan, M. F.; Amer, M. M. A.; Mansour, H. T.; Wahdan, K. M.; El-Sayed, R. M.; El-Sanhoty, S.; El-Gleel, W. A.** 2009. Bioactive lipids and antioxidant properties of wild Egyptian *Pulicaria incise*, *Diploaxis harra*, and *Avicennia marina*. *J. Verbrauch. Lebensm.* 4 (3-4): 239-245.
- Ramos, M. G. M.; Geraldo, L. P.** 2007. Avaliação das espécies de plantas *Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa* e *Rhizophora mangle* como bioindicadoras de poluição por metais pesados em Ambientes de mangues. *Eng. sanit. ambient.* 12(4): 440-445.
- Raven, P. H.; Evert, R. F.; Eichhorn, S. E.** 2007. *Biologia vegetal*. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. 830p.
- Rouhi, A. M.** 1997. Seeking drugs in natural products. *Chem. Eng. News*, 75: 14.

S.O.S. Mata Atlântica. Disponível em:

<<http://www.sosmatatlantica.org.br/index.php?section=info&action=mata>>. Acesso em: 27. Ago. 2010.

Said, S.; Neves, F. M.; Griffiths, A. J. F. 2004. Cinnamic acid inhibits the growth of the fungus *Neurospora crassa*, but is eliminated as acetophenone. *International Biodeterioration & Biodegradation* 54: 1 – 6

Sandes, A. R. R.; Di Biasi, G. 2000. Biodiversidade e diversidade química e genética. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 28-32.

Sang, H.; Zheng, X. E.; Zhou, W. Q.; He, W.; Lv, G. X.; Shen, Y. N.; Kongl, Q. T.; Liu W. D. 2011. A case of subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Cladosporium* Mycoses. 55: 195-197.

Santos, B. G. 2011. Árvores de estuário apresentam assimetria foliar em resposta a estresse por salinidade? *In: Prática em pesquisa em ecologia da Mata Atlântica. Curso de pós graduação em Ecologia – Universidade de São Paulo.*

Santos, R. I. 2001. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. *In: Farmacognosia: da planta ao medicamento.* Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/Ed. Da UFSC.

Santos, S. C.; Ferreira, F. S.; Damião, Alcinéia. O; Damião, Aldinéia. O.; Barros, T. F.; Rossi-Alva, J. C.; Fernandez, L. G. 2010. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechm. ex Moldenke, Verbenaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 20 (1): 124-129.

Sérgio, C.; Leite, E.; Pitteri, H.; Martuscelli, J.; Machado, P. Caracterização morfofisiológica do manguezal de Cananéia – SP. *In: ENVIRONMENTAL AND HEALTH WORLD CONGRESS*. 2006, Santos, SP – Brasil.

Shafaghat, A. 2012. Omega-3 content, antimicrobial and antioxidant activities of hexanic extract from seed and leaf of *Hypericum scabrum* from northwestern Iran. *African Journal of Microbiology Research*. 6 (5): 904-908.

Silva, A. J. R.; Andrade, L. H. C. 2005. Etnobotânica nordestina: estudo comparativo da relação entre comunidades e vegetação na Zona do Litoral - Mata do Estado de Pernambuco, Brasil. *Acta bot. bras.* 19(1), 45-60.

Silva, M. A. B.; Bernini, E.; Carmo, T. M. S. 2005. Características estruturais de bosques de mangue do estuário do rio São Mateus, ES, Brasil. *Acta bot. bras.* 19(3): 465-471.

Silva, M. L. C.; Costa, R. S.; Santana, A. S.; Koblitz, M. G. B. 2010 Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*. 31 (3): 669-682.

- Simoes, C. M. O. Spitzer, V.** 2003. Oleos Volateis. *In*: Simoes, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C. P., Mentz, L.A. & Petrovick, (orgs). Farmacognosia da planta ao medicamento. Florianopolis: Ed. UFSC. p.467.
- Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.** 2003. Farmacognosia da planta ao medicamento. Florianopolis: Ed. UFSC. p.467
- Singh, P. Khandelwal, P.; Hara, N.; Asai, T.; Fujimoto, Y.** 2008. Radermachol and naphthoquinone derivates from *Tecomella undulata*: Complete ¹H and ¹³C NMR assignments of radermachol with the aid of computational ¹³C prediction. Indian Journal of Chemistry. 47B: 1865-1870.
- Sousa, C. M. M., Silva, H. R., Vieira-Jr., G. M., Ayres, M. C. C., Costa, C. L. S., Araújo, D. S., Cavalcante, L. C. D., Barros, E. D. S., Araújo, P. B. M., Brandão, M. S., Chaves, M. H.** 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Quim. Nova. 30 (2): 351-355.
- Souza, L. F.** 2007. Recursos vegetais usados na medicina tradicional do Cerrado (comunidade de Baús, Acorizal, MT, Brasil). Rev. Bras. Pl. Med. Botucatu, 9(4), 44-54.
- Souza, M. A. A.; Silva, A. R.; Ferreira, M. A.; Lemos, M. J.; Ramos, R. G.; Ferreira, A. B. B.; Souza, S. R.** 2008. Atividade biológica do lapachol e de alguns derivados sobre o desenvolvimento fúngico e em germinação de sementes. Química Nova. 31 (7): 1670-1671
- Subrahmanyam, C.; Kumar, S.R.; Reddy, G.D.** 2006. Bioactive diterpenes from the mangrove *Avicennia officinalis* Linn. Indian J. Chem. Sect B-Org. Chem. Incl. Med. Chem. 45 (11): 2556-2557.
- Suganthi, N.; Pandian, S. K.; Devi, K. P.** 2009. Cholinesterase inhibitory effects of *Rhizophora lamarckii*, *Avicennia officinalis*, *Sesuvium portulacastrum* and *Suaeda monica*: Mangroves inhabiting an Indian coastal area (Vellar Estuary). Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 24(3): 702–707.
- Sussel, A. A. B.** 2005. Caracterização de Isolados de *Colletotrichum lagenarium*, agente causal da antracnose das cucurbitáceas. Piracicaba, 2005, 68p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Setor de Fitopatologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
- Tabarelli, M.; Pinto, L. P., Silva, J. M. C., Hirota, M. M. Bedê, L. C.** 2005. Desafios e oportunidades para conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. Megadiversidade. 1(1), 132-138.
- Taiz, L.; Zeiger, E.** 2010. Fisiologia Vegetal. 5.ed. Sinauer Associates.
- Tariq, M.; Dawar, S.; Mehdi, F.S.; Zaki, M.J.** 2006. Use of *Avicennia marina* in the control of root infecting fungi on okra and mash bean. Pak. J. Bot. 38 (3): 811-815.

- Tawata, S.; Taira, S.; Kobamoto, N.; Zhu, J.; Ishihara, M.; Toyama, S.** 1996. Synthesis and antifungal activity of cinnamic acid esters. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 60: 909–910.
- Vermeris, W.; Nicholson, R.** 2006. *Phenolic Compound Biochemistry*. Ed. Springer p.285.
- Vieira, M. R.; Milheiro, A.; Pacheco, F.;A.** 2001. Phaeohyphomycosis due to *Cladosporium cladosporioides*. *Medical Mycology* 39: 135–137.
- Wu, J.; Xiao, Q.; Xu, J. Li, M.; Pana, J.; Yang, M.** 2008. Natural products from true mangrove flora: source, chemistry and Bioactivities. *Nat. Prod. Rep.* 25: 955–981
- Yano, S.; Koyabashi, K; Kato, K.** 2003. Intrabronchial lesion due to *Cladosporium phaeospermum* in a healthy, non-asthmatic woman. *Mycoses* 46: 330–332.
- Zandi, K.; Taherzadeh, M.; Yaghoubi, R.; Tajbakhsh, S.; Rastian, Z.; Fouladvand, M.; Sartavi, K.** 2009. Antiviral activity of *Avicennia marina* against herpes simplex virus type 1 and vaccine strain of poliovirus (An in vitro study). *J. Med. Plants. Res.* 3(10): 771-775.