

ESTUDOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DE *Microgramma vacciniifolia* (LANGSD. & FISCH.) COPEL (POLYPODIACEAE)

Marize T. L. P. Peres*, Euclésio Simionatto, Sônia C. Hess, Vanderléa F. L. Bonani, Ana C. S. Candido e Caroline Castelli

Departamento de Hidráulica e Transportes, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79070-900 Campo Grande – MS, Brasil

Nilva R. Poppi e Neli K. Honda

Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79070-900 Campo Grande – MS, Brasil

Cláudia A. L. Cardoso e Odival Faccenda

Departamentos de Química e de Computação, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 79804-970 Dourados – MS, Brasil

Recebido em 14/4/08; aceito em 13/11/08; publicado na web em 25/3/09

CHEMICAL AND BIOLOGICAL STUDIES OF *Microgramma vacciniifolia* (LANGSD. & FISCH.) COPEL (POLYPODIACEAE). Chemical studies with aerial parts of *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel. afforded β -sitosterol, hopan-22-ol, 6-metoxiapinenin-7-O- β -D-allopyranoside and a mixture containing ethyl esters of carboxylic acids. The structures of the compounds were elucidated by spectroscopy and GC-MS analysis. The total phenolics contents of the crude extract and fractions were determined by Folin-Ciocalteu method. The antioxidant activity was evaluated using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). The AcOEt fraction showed better activity in DPPH assay ($9.9 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$), and presented also higher contents of the total phenolic ($93.60 \pm 1.11 \mu\text{g/mg}$). Antimicrobial and allelopathic effects of the crude etanolic extract and fractions also were evaluated. In addition, the combination of biological activities was discussed.

Keywords: *Microgramma vacciniifolia*; Polypodiaceae; biological activity.

INTRODUÇÃO

Polypodiaceae é a maior família de samambaias, sendo composta por cerca de 170 gêneros e 7000 espécies.¹ São especialmente abundantes em florestas e áreas úmidas, mas ocorrem também em quase todas as áreas florísticas, de zonas do deserto a florestas chuvosas e dos trópicos ao ártico ou antártico. Polypodiaceae compreende principalmente espécies epífitas, ocasionalmente terrícolas ou rupícolas.²

Microgramma é um gênero americano, pertencente à família Polypodiaceae, incluindo cerca de 13 espécies. São espécies epífitas em florestas pantanosas, chuvosas e fechadas, encontradas frequentemente ao longo de rios e riachos, também ocorrem em florestas secundárias. Este gênero é amplamente distribuído nos trópicos americanos, sendo encontrado no México e no sul da Flórida, até o sul da Argentina. Como uma epífita, o gênero *Microgramma* dispõe de raízes superficiais que se espalham pelas cascas das árvores e arbustos, absorvendo a matéria orgânica disponível.¹

Alguns estudos fitoquímicos com espécies do gênero *Microgramma* descrevem a ocorrência de triterpenóides³ e compostos fenólicos.⁴

Microgramma vacciniifolia (Langsd. & Fisch.) Copel. é descrita como uma epífita reptante e/ou hemiepipífita reptante de distribuição neotropical. Pode ser encontrada como corticícola e/ou rupícola e é facilmente reconhecida por seu caule longo intensamente revestido por escamas e folhas dimorfas (as estéreis são ovadas e as férteis lanceoladas). *Microgramma vacciniifolia* é conhecida popularmente como erva-silvina, erva-silveira, erva-terezinha, erva-de-lagarto, cipó-cabeludo, cipó-peludo. Relatos apontam esta espécie como um poderoso adstringente, sendo também recomendada para hemorragias,

expectorações, diarreias, disenterias, cólicas intestinais e hidropsia.^{5,6}

No presente trabalho efetuou-se um estudo fitoquímico com a pteridófito *Microgramma vacciniifolia*, que possibilitou a identificação e o isolamento dos esteróides β -sitosterol e hopan-22-ol, da flavona glicosilada 6-metoxiapinenina-7-O- β -D-allopiranosídeo e de uma mistura de ésteres graxos. Avaliou-se o potencial biológico dos extratos e frações frente a três ensaios: antioxidante, antimicrobiano e alelopático.

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal

As frondes verdes de *M. vacciniifolia* foram coletadas em abril de 2003, na zona urbana do município de Dourados -MS. O material vegetal foi identificado pela bióloga L. P. Clemente em comparação com exsicata previamente identificada pelo biólogo A. Salino (UFMG). Uma exsicata da espécie encontra-se depositada no herbário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul de acordo com a identificação: Brasil.MS: Ponta Porã, Faz. Curupi, 19.VIII. 1999 I.A. Carneiro, L.P. Clemente & Sciamarelli 62 (CGMS/BHCB); idem, id. 10.IX. 2000, I.A. Carneiro 16 (CGMS/BHCB).

Instrumentação

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Bruker DPX-300. As amostras foram solubilizadas em CDCl_3 e MeOD, tomando-se como padrão interno de referência o TMS. As análises em CG-EM foram realizadas em um equipamento Varian- 3800 operando com impacto de elétrons de 70 eV, equipado com coluna capilar CP-SIL (30 m x 0,25 mm). A identificação dos componentes

*e-mail: mperes@propp.ufms.br

foi baseada em comparações dos tempos de retenção e espectros de massas da biblioteca NBS/NIST.

Procedimento para obtenção dos extratos

O material coletado foi seco à temperatura ambiente e triturado. Foram transferidos 1,5 kg deste material para um recipiente de vidro de boca larga. Este material foi macerado em etanol (Chemco, 93%) e filtrado a cada 24 h por 10 dias, até que os metabólitos secundários presentes nos tecidos fossem completamente extraídos. A evaporação foi realizada em rotavapor, fornecendo 50,2 g do extrato etanólico bruto (EEB). Utilizou-se 20 g do extrato etanólico bruto de *M. vacciniifolia* para o fracionamento. Foram dissolvidos com uma mistura de etanol/água a 1/9 (v/v) e submetidos à partição exaustiva líquido/líquido, em funil de separação, com os solventes hexano e acetato de etila (AcOEt), obtendo-se, após evaporação dos solventes, as frações semipurificadas: fração hexânica (Fr. Hex.) (2,04 g), fração acetato de etila (Fr. AcOEt) (2,12 g) e fração hidroetanólica (Fr. EtOH/H₂O) (10,5 g).

Determinação do teor de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais presentes nas amostras foi feita por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin–Ciocalteu.^{7,8} Os extratos e frações (5 mg) foram dissolvidos em 5 mL de metanol. Uma alíquota de 100 µL desta solução foi transferida para balões de 5 mL. A esta solução adicionou-se 1 mL de água destilada e, posteriormente, 0,2 mL do reagente Folin–Ciocalteu. Finalizando, adicionou-se 0,6 mL de uma solução 20% de Na₂CO₃ e completou-se o volume com metanol. Após 90 min, a absorbância das amostras foi medida a 750 nm utilizando-se cubetas de quartzo. O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (50 a 500 µg/mL) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por mg de extrato. A equação da curva de calibração do ácido gálico foi $y = 0,0025x + 0,0802$, com coeficiente de correlação $R = 0,9968$. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Análise qualitativa da atividade antioxidante

Os materiais vegetais foram aplicados (2 µL de uma solução a 5 mg/mL, de cada material), em triplicata, sobre placas de alumínio impregnadas com sílica gel 60 F254 (Merck). Posteriormente, as placas cromatográficas foram eluídas com os seguintes sistemas de solventes: AcOEt/EtOH/H₂O 50/35/15 ou 30/30/40 e examinadas 30 min após a nebulização com DPPH em MeOH (0,4 mmol/mL). Os compostos ativos apareceram como sinais amarelo-claros sobre o fundo púrpura.⁹

Análise quantitativa da atividade antioxidante

A atividade sequestradora de radicais livres para o EEB e para as frações hexânica, AcOEt e EtOH/H₂O foi determinada utilizando o método que emprega DPPH,^{10,11} usando uma série de diluições. A 50 µL de várias concentrações dos extratos em metanol (10,0; 5; 2,5; 1,25; 0,62 e 0,31 mg/mL) foram adicionados 5 mL de solução de DPPH (0,004% em metanol). Após um período de 30 min de incubação em temperatura ambiente, as absorbâncias das amostras foram registradas contra um branco em 517 nm. A inibição do radical livre DPPH (em %) foi calculada pela expressão $I\% = (A_{\text{branco}} - A_{\text{amostra}} / A_{\text{branco}}) \times 100$. A concentração dos extratos que provocou 50% de inibição (EC50), foi calculada pela equação da reta. Os

testes foram realizados em triplicata. Utilizaram-se como padrões o antioxidante sintético butil hidroxianisol (BHA) e os flavonóides quercetina e rutina.

Potencial de atividade alelopática

O EEB e as frações semipurificadas foram ensaiados com alface (*Lactuca sativa* cv Grand Rapids), marca Isla Pak, e cebola (*Allium cepa* cv Baia Periforme), marca Feltrin, adquiridos comercialmente. Os bioensaios de germinação e crescimento foram realizados no Laboratório de Pesticidas Naturais/UFMS. Para os bioensaios de germinação, aplicou-se a metodologia descrita por Nishimura *et al.*¹² Nas placas de Petri, previamente lavadas e esterilizadas em autoclave foram colocados discos de papel-filtro Whatmann número 1 (5,5 cm de diâmetro), umedecidos com 1 mL de solução do extrato etanólico bruto e frações semipurificadas nas concentrações de 250, 500 e 1000 mg/L. Após a evaporação do solvente, foi adicionado 1,5 mL de Tween 80 (100 mg/mL) e o conjunto deixado em repouso por 12 h. Em seguida, cada disco de papel recebeu 50 diásporos das espécies alvo (alface/cebola), distribuídos aleatoriamente, com quatro repetições para cada extrato/fração, conforme recomendado na literatura.¹³ Como controle, procedimento similar foi utilizado, porém, aplicando-se somente o solvente, sem o extrato/frações. As placas de Petri contendo os diásporos foram levadas ao germinador, marca Eletrolab Modelo LA, com condições de luz (160 W), umidade ($\pm 80\%$) e temperatura (25 °C alface, 15 °C cebola, ± 2 °C) constantes, sendo os discos de papel filtro mantidos úmidos por meio de regas com H₂O destilada, quando necessário. A contagem de sementes germinadas foi realizada diariamente, tendo como critério a protrusão radicular com 2 mm de comprimento. O experimento foi considerado concluído quando a germinação foi nula por 3 dias consecutivos. Para os bioensaios de crescimento foi utilizada a metodologia descrita por Barnes *et al.*¹⁴ As medidas das radículas e do hipocótilo/coleótilo de 10 plântulas por placa foram feitas 3 dias após a germinação utilizando-se papel milimetrado. No presente trabalho foram desenvolvidos 4 ensaios com extratos/frações de *M. vacciniifolia*, com 4 tratamentos (0, 250, 500 e 1000 mg/L) e 4 repetições. Cada parcela constituiu-se de 50 diásporos para a germinação e 10 para o crescimento da radícula/coleótilo. O tempo médio de germinação foi calculado de acordo com a metodologia descrita por Laboriau.¹⁵

Os dados foram submetidos à análise estatística ANOVA com nível de significância 0,05 quando os testes envolveram comparação de mais de duas médias e teste de Dunnet para a comparação múltipla de duas médias, ou seja, para verificar quais concentrações do EEB e frações aplicadas apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Os resultados de crescimento são apresentados em porcentagem em relação ao controle, sendo que zero representa o controle, valores positivos representam estímulo e valores negativos representam inibição.¹⁶

Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das amostras dos extratos foi determinada pelo método de concentração inibitória mínima (CIM). Uma coleção de 10 microorganismos foi usada, incluindo 7 bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella setubal* e 3 fungos: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomycetaceae cerevisiae*. Cepas padrões foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC) e os antibióticos cloranfenicol e nistatina foram usados como padrões. A CIM foi determinada em 96 placas de cultura usando o método

de microdiluição e uma suspensão de microorganismos com uma densidade de 10^5 UFC/mL com caldo de caseína-soja, incubado por 24 h a 37 °C para bactérias. Para fungos utilizou-se caldo Sabouraud, com um período de incubação de 72 h a 25 °C. As culturas que não apresentaram crescimento foram usadas para inocular placas de meio sólido (Agar Muller Hinton e Agar Sabouraud) com o objetivo de determinar a concentração mínima letal (CML). As amostras controle e testes foram ensaiadas simultaneamente, em triplicata, conforme técnica descrita previamente.¹⁷⁻¹⁹

Isolamento dos constituintes

Parte da fração hexânica de *M. vacciniifolia* (1,5 g) foi submetida a processo de purificação em coluna cromatográfica. O fracionamento foi realizado com sílica gel 60 Merck (0,063-0,200 mm), eluída com gradientes de solventes, hexano/AcOEt em ordem crescente de polaridade, sendo coletadas 500 frações de 50 mL. As frações 23-44, eluídas com o sistema hexano/AcOEt 98/2, renderam um óleo (140,6 mg). Este óleo foi analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. A comparação do espectro de massas, correspondente a cada sinal, com os da biblioteca do aparelho possibilitou a identificação de quatro substâncias: hexadecanoato de etila (**1**, 64,7%), oleato de etila (**2**, 13,8%), 15-metil-heptadecanoato de etila (**3**, 5,0%) e o éster etílico do ácido linoleico (**4**, 4,8%) com índice de similaridade de 89, 93, 95 e 90%, respectivamente.

Hexadecanoato de etila: t.r. 49,010 min; CG-EM *m/z*: 284 [M]⁺ (45%), 241 (51%), 199 (34%), 157(78%), 101(90%), 88(100%), 73 (59%).

Oleato de etila: t.r. 54,287 min; CG-EM *m/z*: 310 [M]⁺ (12%), 264 (50%), 222 (20%), 180 (14%), 155 (27%), 137 (22%), 124 (20%), 111 (31%), 101 (32%), 97 (53%), 83 (61%), 69 (66%), 55 (100%), 43 (25%).

15-metil-heptadecanoato de etila: t.r. 55,028 min; CG-EM *m/z*: 312 [M]⁺(63%), 269 (16%), (12%), 157 (27%), 101 (68%), 88 (100%), 57 (28%).

Ácido linoleico etil éster: t. r. 54,033 min; CG-EM *m/z*: 308 [M]⁺ (7%), 262 (30%), 220 (4%), 178 (16%), 150 (17%), 135 (24%), 121 (22%), 109 (33%), 95 (56%), 81 (81%), 67 (100%), 55 (39%), 41 (28%).

A fração 62-71 (30,9 mg), eluída com hexano/AcOEt 90/10, foi purificada possibilitando o isolamento do triterpenóide pentacíclico hopan-22-ol (**5**). Na fração 132-150 (110,7 mg), eluída com hexano/acetato de etila (85/15), após análises espectrais e comparação com padrões por CCD, identificou-se o esteróide β -sitosterol (**6**).

A fração acetato de etila foi fracionada em Sulpelclean™ LC-18 e purificada por CLAE usando RP-18. Este procedimento permitiu o isolamento da flavona 6-metoxiapinenina-7-O- β -D-allopiranosídeo (**7**, 8 mg). Dados de RMN da flavona 6-metoxiapinenina-7-O- β -D-allopiranosídeo: ¹H RMN (300 MHz, MeOD): δ 3,35 (s, OMe), 3,07 (m, 1H), 3,31 (m, 1H), 3,40 (m, 2H), 3,60 (m, 1H), 5,18 (d, 1H, *J*=8,4), 6,75 (s, 1H), 6,91 (s, 1H), 6,98 (d, 2H, *J*=8,4), 7,94 (d, 2H, *J*=8,4). ¹³C RMN (75 MHz, MeOD): δ 61,4, 62,5, 71,3, 74,7, 78,0, 78,5, 95,8, 102,0, 103,7, 107,5, 117,1, 123,1, 129,6, 134,2, 154,1, 154,3, 157,9, 162,9, 166,9, 184,4.

Análise em CLAE-DAD

A análise da fração acetato de etila em CLAE foi realizada com um sistema ternário de solventes, equipado com autoamostrador e detector arranjo de diodos. O software Star WS (workstation) foi usado na medida das áreas dos cromatogramas. Foi utilizada a coluna com fase reversa RP18 (25 cm x 4,6 mm x 5 μ m), com uma pequena pré-coluna de proteção (2,5 cm x 3 mm x 5 μ m), contendo

a mesma fase. O processo de eluição foi carregado com um programa de gradientes de solvente metanol/água/acetona nitrila (1/84/15) por 40 min até metanol/água/acetona nitrila (1/15/84), retornando às condições iniciais após 10 min.

Preparação dos extratos

As amostras foram preparadas com 20 mg de extrato em 5 mL de hexano (ultrasom por 2 h). Uma limpeza foi realizada em Sulpelclean™ LC-18 (1 g, 55-105 μ m, 6 mL) obtido da Supelco Park/USA. Após, a amostra foi adicionada na coluna e eluída com metanol/água 80/20 v/v (Fração 1) (2 x 1 mL), metanol (Fração 2) (3 x 1 mL) e hexano (Fração 3) (5 x 1 mL). A fração 3 foi filtrada através de Millex filtro, (0,45 μ m diâmetro do poro) reconstituída em 3 mL com metanol e purificada por CLAE-UV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade sequestradora de radicais livres foi determinada pelo teste DPPH. Em um primeiro momento, o extrato bruto e as frações hidroetanólica, acetato de etila e hexânica de *M. vacciniifolia* foram testadas qualitativamente quanto a suas atividades antioxidantes mediante o ensaio com DPPH em CCD, onde foi analisada visualmente a intensidade de formação de halos pelas amostras e comparados com os padrões. Observou-se neste teste que as amostras oriundas do extrato bruto e da fração acetato de etila apresentavam uma forte atividade, enquanto as amostras das frações hexânica e hidroetanólica foram inativas e moderadamente ativas, respectivamente.

A análise quantitativa da atividade antioxidante do extrato bruto e frações de *M. vacciniifolia* foi determinada pelo método que também emprega o radical livre DPPH. Neste procedimento fizeram-se leituras em um espectrofotômetro e determinou-se a EC50. Como mostrado na Tabela 1, observa-se que a maior capacidade de sequestrar radicais livres é atribuída à fração acetato de etila, que apresentou uma EC50 de $9,9 \pm 0,03$ μ g/mL. A fração hexânica foi a menos ativa, apresentando o maior valor de EC50 ($235,4 \pm 3,20$ μ g/mL). A atividade antioxidante apresentou a seguinte ordem decrescente: Quercetina > BHA > Rutina > Fr. AcOEt > EEB > Fr. EtOH/H₂O > Fr. Hex..

Tabela 1. Atividade antioxidante e teor de fenóis totais do extrato bruto e frações de *Microgramma vacciniifolia*

Material testado	CE ₅₀ (μ g/mL)*	Teor de Fenóis Totais (μ g/mg)*
Extrato bruto	25,8 \pm 0,13	75,42 \pm 2,11
Fração hidroalcóolica	38,7 \pm 0,15	45,08 \pm 2,17
Fração hexânica	235,4 \pm 3,20	6,20 \pm 0,29
Fração acetato de etila	9,9 \pm 0,03	93,60 \pm 1,11
BHA	1,7 \pm 0,02	-
Rutina	3,3 \pm 0,08	-
Quercetina	1,6 \pm 0,02	-

*Os resultados são expressos como a média \pm SEM (n=3).

Após a determinação do potencial antioxidante de *M. vacciniifolia*, efetuou-se a determinação dos teores de fenóis totais. Os teores de fenóis totais contidos no extrato bruto e frações foram determinados pelo método colorimétrico que utiliza o reagente Folin-Ciocalteu. Os resultados são expressos como equivalentes ao ácido gálico (μ g/mg de extrato). De acordo com os dados apresentados na Tabela 1, a amostra que apresentou maior teor de fenólicos totais foi a Fr. AcOEt, com os valores de $93,60 \pm 1,11$ μ g mg⁻¹.

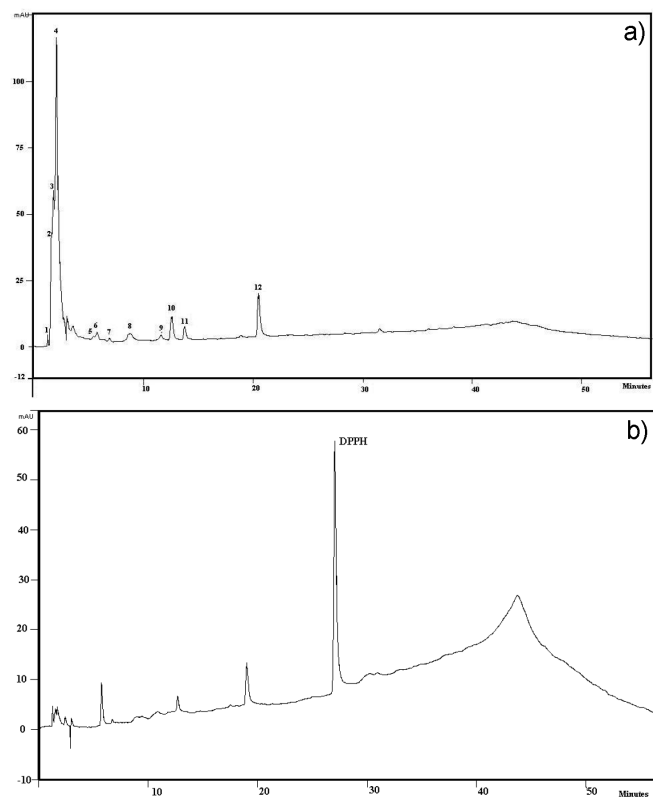


Figura 1. a) Cromatograma da fração acetato de etila de *M. vacciniifolia* antes da adição do DPPH, b) cromatograma da fração acetato de etila de *M. vacciniifolia* após 30 min da adição de DPPH

Sendo a Fr. AcOEt do extrato etanólico bruto de *M. vacciniifolia* a que apresentou os maiores teores de fenóis totais e, também, aquela mais ativa frente ao radical DPPH, esta foi submetida a um estudo utilizando-se CLAE, em que foram investigados os perfis cromatográficos em duas situações: antes da adição do radical livre DPPH e após a adição de DPPH. A Figura 1 ilustra os cromatogramas obtidos a partir da injeção de alíquotas das duas amostras investigadas. Comparando-se o cromatograma apresentado na Figura 1a, obtido antes do tratamento com DPPH, com aquele apresentado na Figura 1b, obtido após a adição do DPPH, é possível observar que, na região de zero a 2 min, ocorreu uma redução acentuada na intensidade dos sinais, os quais podem contribuir para a atividade antirradicalar. Supõe-se que a Fr. AcOEt apresenta várias substâncias que reagem com o DPPH, o que está de acordo com os resultados dos testes de avaliação da atividade antioxidante, descritos na Tabela 1. A flavona 6-metoxiapinenina-7-O- β -D-allopiranosídeo, isolada da Fr. AcOEt, foi analisada quanto a sua atividade antirradicalar frente ao DPPH, através de CCD e espectrofotometria, sendo inativa nas maiores concentrações testadas. Em trabalhos anteriores foi analisada a atividade antioxidante da apigenina na forma não glicosilada, a qual também foi descrita como inativa frente ao DPPH.^{20,21} Observa-se, portanto, que a apigenina é inativa frente ao radical DPPH, independente de estar na forma glicosilada ou tri-hidroxilada. A Figura 2 mostra a estrutura da flavona, juntamente com os demais compostos identificados neste estudo.

O EEB de *M. vacciniifolia* e frações derivadas foram submetidas a testes de avaliação da atividade antimicrobiana, sendo que a Fr. Hex. foi a mais ativa frente aos fungos *Sacharomices cerevisiae* e *Candida albicans*, com MIC de 0,25 mg/mL. Já nos testes contra bactérias observou-se maior resistência contra a Fr. Hex., com valores de MIC superiores a 0,5 mg/mL. As outras amostras (EEB, Fr. AcOEt e Fr.

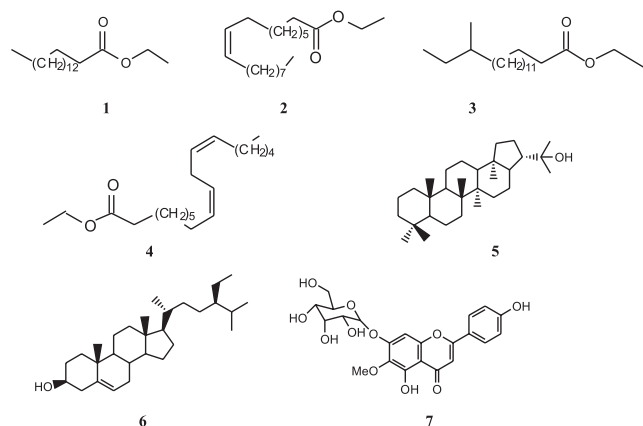


Figura 2. Estrutura dos compostos identificados em *M. vacciniifolia*

EtOH/H₂O) apresentaram valores de MIC superiores a 0,5 mg/mL, sendo consideradas pouco ativas.

Quanto aos resultados obtidos nos ensaios alelopáticos, observou-se que o EEB de *M. vacciniifolia* reduziu significativamente o índice de velocidade de germinação (IVG) de alface (dicotiledônea), nas maiores concentrações ensaiadas (1000 mg/L). Com cebola (monocotiledônea) nenhum efeito significativo na germinação foi observado, para EEB. Com relação às frações, constatou-se que todas reduziram o IVG de alface, verificando-se atrasos na germinação de 76% pela Fr. Hex., 50% pela Fr. AcOEt, e 56% pela Fr. EtOH/H₂O, em relação ao controle, na maior concentração ensaiada (1000 mg/L). Com relação à germinabilidade, apenas a Fr. AcOEt reduziu significativamente a porcentagem de germinação de alface em 43%, em relação ao controle, na concentração de 1000 mg/L. Nos testes com cebola, a Fr. Hex. e a Fr. AcOEt afetaram a germinação das sementes, reduzindo o IVG (63 e 33%) e a porcentagem de germinação (62 e 29%), respectivamente, na maior concentração ensaiada (1000 mg/L). Nos ensaios de crescimento, apresentados em porcentagem em relação ao controle, a raiz primária de alface foi estimulada pelo EEB e pela Fr. EtOH/H₂O nas menores concentrações ensaiadas (250 mg/L), enquanto que a Fr. AcOEt inibiu o crescimento inicial da raiz primária de alface em 60% em relação ao controle, na concentração de 1000 mg/L. O crescimento do hipocótilo de alface foi estimulado pelas menores concentrações ensaiadas do EEB e de todas as frações. O comprimento médio da raiz primária de cebola foi reduzido em 16% pela Fr. Hex. na concentração de 1000 mg/L. A Fr. AcOEt, em todas as concentrações ensaiadas, reduziu o crescimento da raiz primária de cebola, sendo em 81%, na maior concentração ensaiada (1000 mg/L). O comprimento médio do coleótilo de cebola foi inibido pela maior concentração da Fr. Hex. (-24%) e Fr. AcOEt (-30%). O EEB e a Fr. EtOH/H₂O não interferiram no crescimento de cebola.

O atraso na germinação, a redução da porcentagem de sementes germinadas, a inibição do crescimento da raiz primária e as alterações morfológicas observadas para as espécies ensaiadas com o extrato etanólico bruto e frações semipurificadas de *M. vacciniifolia* sugerem potencial de atividade alelopática desta espécie.

Considerando a atividade antioxidante e o teor de fenóis totais, diversos são os relatos que justificam que a alta atividade esteja relacionada à presença de compostos fenólicos.²²⁻²⁴ No caso da espécie *M. vacciniifolia* esta abordagem pode ser aplicada, pois a fração mais ativa em relação à atividade antioxidante (Fr. AcOEt) foi também a que apresentou maior teor de compostos fenólicos. Classes de compostos fenólicos com propriedades antioxidantes também podem apresentar propriedades antimicrobianas, tais como flavonóides e taninos,²⁵⁻²⁸ o que demonstra que algumas substâncias antioxidantes que atuam sequestrando radicais livres também agem no combate a microorganismos, o que tem tornado importante o estudo em conjunto das propriedades antioxidantes e antimicrobianas de frações e extratos de

plantas.^{29,30} Compostos fenólicos também podem exibir propriedades alelopáticas. Entre as substâncias fenólicas descritas por suas ações alelopáticas podem-se citar os derivados dos ácidos cinâmico e benzóico, sendo os mais freqüentes clorogênico, *p*-cumárico, ferúlico, cafeíco, *p*-hidroxibenzóico, sirínico e vanílico. Representantes pertencentes a classes como cumarinas, quinonas, flavonóides e taninos também são conhecidos como inibidores da germinação de sementes e do crescimento de plantas. Ácidos graxos de cadeia longa, identificados na fração hexânica de *M. vacciniifolia*, também são citados como compostos que apresentam propriedades alelopáticas.^{31,32}

MATERIAL SUPLEMENTAR

As tabelas relativas aos testes alelopáticos e antimicrobianos encontram-se disponíveis gratuitamente em <http://quimicanova.sbq.org.br>, na forma de arquivo pdf, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento de Ensino, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso do Sul (FUNDECT/MS). Ao CNPq pelas bolsas DCR e iniciação científica.

REFERÊNCIAS

1. Tryon, R. M.; Tryon, A. F.; *Ferns and Allied Plants with Special Reference to Tropical America*, Spring-Verlag: New York, 1982.
2. Moran, R. C. Em *Polypodiaceae. Flora Mesoamericana I. Psilotaceae a Salviniaceae*; Moran, R. C.; Riba, R., eds.; Universidad Nacional Autónoma de México: Cidade do México, 1995.
3. Arai, Y.; Yamaide, M.; Yamazaki, S.; Ageta, H.; *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3369.
4. Gombau, L.; Garcia, F.; Lahoz, A.; Fabre, M.; Roda-Navarro, P.; Majano, P.; Alonso-Lebrero, J. L.; Castell, J. V.; Gómez-Lechon, M. J.; González, S.; *Toxicol. in Vitro* **2006**, *20*, 464.
5. Santos, M. G.; Sylvestre, L. S.; *Acta Bot. Bras.* **2006**, *20*, 115.
6. Suffredini, I. B.; Bacchi, E. M.; Sertié, J. A. A. A.; *J. Ethnopharmacol.* **1999**, *65*, 217.
7. Bonoli, M.; Verardo, V.; Marconi, E.; Caboni, M. F.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5195.
8. Souza, C. M. M.; Silva, H. R.; Vieira-Jr., G. M.; Ayres, M. C. C.; da 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.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 351.
9. Mimica-Dukic, N.; Bozin, B.; Sokovic, M.; Mihajlovic, B.; Matavulj, B.; *Planta Med.* **2003**, *69*, 413.
10. Burits, M.; Bucar, F.; *Phytother. Res.* **2000**, *14*, 323.
11. Cuendet, M.; Hostettmann, K.; Potterat, O.; *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 1144.
12. Nishimura, H.; Nakamura, T. M. J.; Mizutani, J.; *Phytochemistry* **1984**, *23*, 2777.
13. Brasil. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária; *Regras para análise de sementes*, SNDA/DNDU/CLU: Brasília, 1992.
14. Barnes, J. P.; Putnam, A. R.; Burke, B. A.; Assen, A. J.; *Phytochemistry* **1987**, *26*, 1385.
15. Laboriau, L. G.; *A germinação das sementes*, Série de Biologia. Monografia 24, OEA - Programa Regional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico: Brasília, 1983.
16. Macias, F. A.; Gallindo, J. C. G.; Molinildo, J. M. G.; *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 795.
17. Food and Drugs Administration: *Code of Federal Regulations* **1991**, *21*, 300.
18. Hammer, K. A.; Carson, C. F.; Riley, T. V.; T. V. *J. Appl. Microbiol.* **1999**, *86*, 985.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Method for Dilution; *Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically* (Standard M7-A2), NCCLS 1985, Villanova.
20. Furusawa, M.; Tanaka, T.; Ito, T.; Nishikawa, A.; Yamazaki, N.; Nakaya, K.; Marsuura, N.; Tsuchiya, H.; Nagayama, M.; Inuma, M.; *J. Health Sci.* **2005**, *51*, 376.
21. Antas e Silva, D.; da Silva, T. M. S.; da Silva Lins, A. C.; da Costa, D. A.; Cavalcante, J. M. S.; Matias, W. N.; de Souza, M. F. W.; Braz Filho, R.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 1250.
22. Harborne, J. B.; Williams, C. A.; *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 310.
23. Mensor, L. L.; Menezes, F. S.; Leitão, G. G.; Reis, A. S.; Santos, T. C.; Coube, C. S.; *Phytother. Res.* **2001**, *15*, 27.
24. Basile, A.; Ferrara, L.; Del Pozzo, M.; Mele, G.; Sorbo, S.; Bassi, P.; Montesano, D.; *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *102*, 32.
25. Scalbert, A.; *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3875.
26. Harborne, J. B.; Williams, C. A.; *Phytochemistry* **2000**, *55*, 481.
27. Bylka, W.; Matlawska, I.; Pilewski, N. A.; *JANA* **2004**, *7*, 24.
28. Veluri, R.; Weir, T. L.; Bais, H. P.; Stermitz, F. R.; Vivanco, J. M.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1077.
29. Luo, H. X.; Lin, S. H.; Ren, F. Z.; Wu, L. P.; Chen, L. S.; Sun, Y.; *J. Food Prot.* **2007**, *70*, 1440.
30. Adedapo, A. A.; Jimoh, F. O.; Kóduro, S.; Masika, P. J.; Afolayan, A. J.; *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 4158.
31. Malheiros, A.; Peres M. T. L. P.; Em *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*; Yunes, R. A.; Calixto, J. B., eds.; Argos: Chapecó, 2001.
32. Harbone, J. B.; *Nat. Prod. Rep.* **1997**, *14*, 83.

ESTUDOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DE *Microgramma vacciniifolia* (LANGSD. & FISCH.) COPEL (POLYPODIACEAE)

Marize T. L. P. Peres*, Euclésio Simionatto, Sônia C. Hess, Vanderléa F. L. Bonani, Ana C. S. Candido e **Caroline Castelli**

Departamento de Hidráulica e Transportes, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79070-900 Campo Grande – MS, Brasil

Nilva R. Poppi e Neli K. Honda

Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79070-900 Campo Grande – MS, Brasil

Cláudia A. L. Cardoso e Odival Faccenda

Departamentos de Química e de Computação, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 79804-970 Dourados – MS, Brasil

Tabela 1S. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração letal mínima (CLM) do extrato bruto (EB) de *M. vacciniifolia*

Microrganismos ^a	EEB <i>M. vacciniifolia</i>		Padrão ^c
	CIM ^b	CLM ^b	CIM ^b
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	>500	-	1,56
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	>500	-	1,56
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	>500	-	1,56
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11103)	>500	-	3,12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC27853)	>500	-	3,12
<i>Salmonella setubal</i> (ATCC 19796)	>500	-	1,56
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 10031)	>500	-	3,12
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> (ATCC 2601)	>500	-	5,15
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	>500	-	10,3
<i>Cryptococcus neoformans</i> (ATCC 28952)	>500	-	10,3

^a ATCC (American Type Culture Collection); ^b em µg/mL; ^c Cloranfenicol para bactérias e nistatina para fungos.

Tabela 2S. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração letal mínima (CLM) da fração AcOEt de *M. vacciniifolia*

Microrganismos ^a	Fr. AcOEt <i>M. vacciniifolia</i>		Padrão ^c
	CIM ^b	CLM ^b	CIM ^b
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	>500	-	1,56
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	>500	-	1,56
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	>500	-	1,56
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11103)	>500	-	3,12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC27853)	>500	-	3,12
<i>Salmonella setubal</i> (ATCC 19796)	>500	-	1,56
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 10031)	>500	-	3,12
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> (ATCC 2601)	>500	-	5,15
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	>500	-	10,3
<i>Cryptococcus neoformans</i> (ATCC 28952)	>500	-	10,3

^a ATCC (American Type Culture Collection); ^b em µg/mL; ^c Cloranfenicol para bactérias e nistatina para fungos.

Tabela 3S. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração letal mínima (CLM) da fração hexânica de *M. vacciniifolia*

Microrganismos ^a	Fr. Hex. <i>M. vacciniifolia</i>		Padrão ^c
	CIM ^b	CLM ^b	CIM ^b
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	>500	-	1,56
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	>500	-	1,56
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	>500	-	1,56
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11103)	>500	-	3,12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC27853)	>500	-	3,12
<i>Salmonella setubal</i> (ATCC 19796)	>500	-	1,56
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 10031)	>500	-	3,12
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> (ATCC 2601)	250	>500	5,15
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	250	>500	10,3
<i>Cryptococcus neoformans</i> (ATCC 28952)	>500	-	10,3

^a ATCC (American Type Culture Collection); ^b em µg/mL; ^c Cloranfenicol para bactérias e nistatina para fungos.

Tabela 4S. Efeito do extrato etanólico bruto e frações semipurificadas de *Microgramma vacciniifolia* no índice de velocidade de germinação (IVG) de alface e cebola

	Índice de Velocidade de Germinação (IVG)*			
	Controle	250 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	1.000 mg L ⁻¹
<i>Lactuca sativa</i> (alface)				
(EEB) ¹	40,18±1,55 ^a	39,86±2,16a	32,33±1,43b	32,00±1,61b
(Fr.Hex.) ¹	40,18±1,55a	31,08±2,15b	27,40±2,06b	9,49±0,44b
(Fr. AcOEt) ¹	40,18±1,55a	32,23±1,43b	29,66±1,70b	20,12±1,86b
(Fr. EtOH/H ₂ O) ¹	40,18±1,55a	38,93±1,59a	33,07±1,66b	17,46±1,62b
<i>Allium cepa</i> (cebola)				
(EEB) ¹	7,39±0,41 ^a	6,89±0,58a	7,43±0,21a	6,99±0,52a
(Fr.Hex) ¹	7,39±0,41a	4,49±0,18b	4,52±0,35b	2,72±0,43b
(Fr. AcOEt) ¹	7,39±0,41 ^a	6,69±0,22a	6,57±0,32a	4,94±0,20b
(Fr. EtOH/H ₂ O) ¹	7,39±0,41 ^a	7,71±0,19a	7,42±0,49a	7,50±0,14a

¹Médias seguidas de mesma letra do controle não diferem entre si pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade. * Média ± Desvio padrão.

Tabela 5S. Efeito do extrato etanólico bruto e frações semipurificadas de *Microgramma vacciniifolia* na porcentagem de germinação de alface e cebola

	Porcentagem de germinação (G%)*			
	Controle	250 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	1.000 mg L ⁻¹
<i>Lactuca sativa</i> (alface)				
(EEB) ²	100,00±0,00a	100,00±0,00a	99,50±1,00a	98,50±1,00a
(Fr. Hex.) ²	100,00±0,00a	99,50±1,00a	99,00±2,00a	96,00±5,42a
(Fr. AcOEt) ²	100,00±0,00a	98,50±1,91a	98,50±1,91a	57,00±1,15b
(Fr.EtOH/H ₂ O) ²	100,00±0,00a	98,00±1,63a	99,50±1,00a	99,00±1,15a
<i>Allium cepa</i> (cebola)				
(EEB) ¹	92,50±1,91a	91,50±1,91a	91,00±2,58a	89,00±2,58a
(Fr. Hex) ¹	92,50±1,91a	89,50±2,52a	57,50±1,00b	35,50±2,52b
(Fr. AcOEt) ¹	92,50±1,91a	89,50±2,52a	86,00±1,63b	66,00±1,63b
(Fr.EtOH/H ₂ O) ¹	92,50±1,91a	94,00±2,83a	92,50±3,00a	92,50±1,91a

¹Médias seguidas de mesma letra do controle não diferem entre si pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade. ²Kruskal-Wallis (Mann Whitney U). * Média ± Desvio padrão.

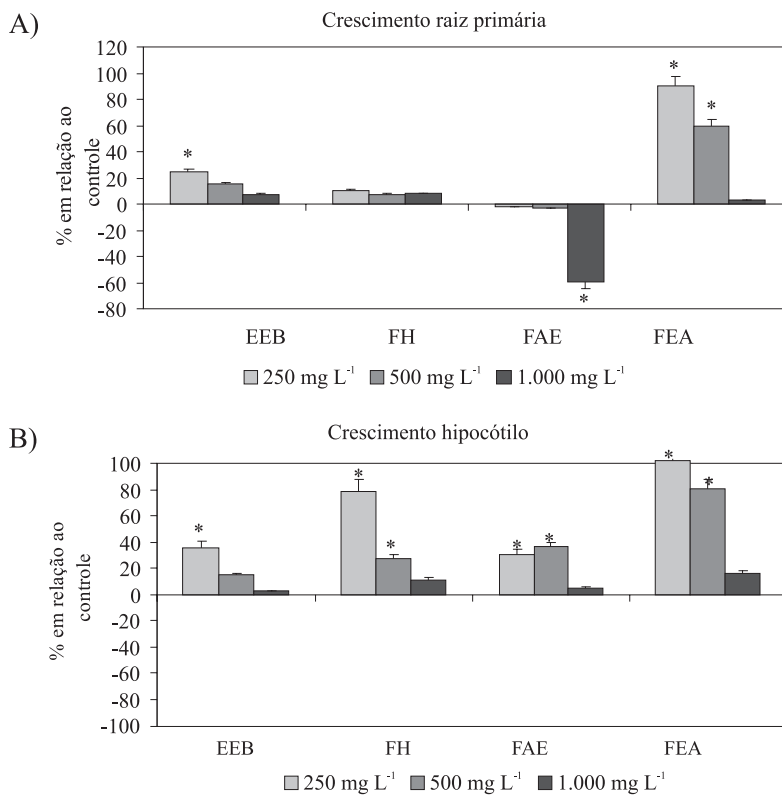


Figura 1S. Efeito do extrato etanólico bruto (EEB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE) e fração etanol-água (FEA) de *M. vacciniifolia* no crescimento da raiz primária (A) e hipocótilo (B) de *Lactuca sativa* (alface). Dados expressos em percentual em relação ao controle. *A média do tratamento difere significativamente em comparação com a média do controle, pelo teste de Dunnett

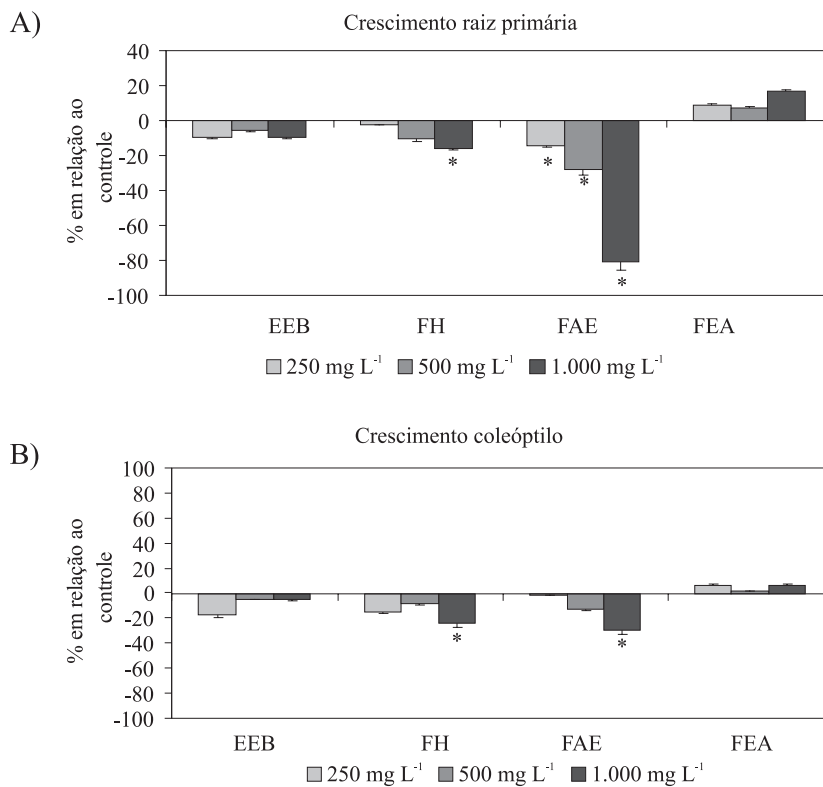


Figura 2S. Efeito do extrato etanólico bruto (EEB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE) e fração etanol-água (FEA) de *M. vacciniifolia* no crescimento da raiz primária (A) e coleótilo (B) de *Allium cepa* (cebola). Dados expressos em percentual em relação ao controle. *A média do tratamento difere significativamente em comparação com a média do controle, pelo teste de Dunnett