

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA DANNA KULIK

**ESTUDO FITOQUÍMICO E DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Forsteronia*
velloziana (A.DC.) Woodson (APOCYNACEAE)**

CURITIBA

2014

JULIANA DANNA KULIK

**ESTUDO FITOQUÍMICO E DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Forsteronia
velloziana* (A.DC.) Woodson (APOCYNACEAE)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas. Orientação: Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel. Coorientação: Profa. Dra. Marilis Dallarmi Miguel.

CURITIBA

2014

"Lembra teu Criador enquanto és jovem. Levanta-te despreocupado antes do alvorecer, e segue em busca de aventuras, não existem campos mais vastos a percorrer nem jogos mais importantes a jogar. Cresce agreste conforme a tua natureza, como aqueles juncos e samambaias que nunca se tornarão feno. Que ribombe o trovão; e aí que ele ameace ruína ás tua lavouras? Não é a ti que ele envia seu recado, portanto abriga-te sobre a nuvem enquanto eles fogem para suas carroças e seus telheiros. É por falta de iniciativa e fé que estão os homens onde estão, comprando e vendendo, gastando a vida como escravos."

H.D. THOREAU

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela sua graça e pela vida,

Aos meus pais, grandes professores, por todo o incentivo, apoio e amor,

Ao meu irmão Rafael, grande amigo,

À minha família,

Aos meus orientadores, Obdúlio Gomes Miguel e Marilis Gomes Miguel pelos ensinamentos, dedicação e confiança,

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade,

Ao Prof. Dr. Anderson Barison do departamento de Química da UFPR pela contribuição na elucidação dos espectros de RMN,

Ao Prof. Dr. Railson Hennenberg e ao laboratório de Bioquímica do setor de Ciências Farmacêuticas da UFPR, pela sugestão da técnica de hemólise e disponibilização de espaço e equipamentos,

Ao Prof. Dr. Fábio S. Murakami e ao laboratório de Controle de Qualidade II do setor de Ciências Farmacêuticas da UFPR, pelo suporte na realização do estudo de atividade antimicrobiana e disponibilização e espaços e equipamentos,

Aos professores doutores Vitor Alberto Kerber, Josiane Dias e Sandra Warumby Zanin, pelos ensinamentos e colaborações na execução do trabalho,

Ao Museu Botânico de Curitiba e ao botânico e pesquisador Osmar dos Santos Ribas pela solicitude e pela identificação da planta,

*Ao Dr. Rui Pereira Leite Júnior, pesquisador do IAPAR, por ter gentilmente cedido a cepa de *Agrobacter tumefaciens*,*

Aos técnicos dos laboratórios, Paulo, Graça e Vitor pela disponibilidade e suporte,

À CAPES pelo suporte financeiro,

Aos meus colegas e amigos do laboratório que contribuíram significativamente para a execução deste trabalho, á Beatriz K. Hirota, pelos ensinios e suporte, á Mariana S. Krause pela parceria no estudo de atividade hemolítica, Vinícius de O. Berdnazuk e Francis J. Zortea pelo auxílio nas coletas, á Paula Piekarski pela parceria na avaliação fitoquímica, á Ana Flávia Duarte, Cristiane de Paula, Ranieri Campos, Marileda Zucheto, Daniela Folquitto, Samanta Golin e Giovanna Strapasson, que me acompanharam em todo o trabalho,

*À Dra. Cristiane Bezerra da Silva, por todo companheirismo, suporte, auxílio e orientação nos ensaios de alelopatia e toxicidade contra larvas de *Aedes aegypti*,*

À Msc. Fernanda Maria Marins Ocampos pela parceria, companheirismo e pela contribuição e auxílio nos RMNs e na elucidação estrutural,

À minha querida amiga Thaís Fernanda Moreira por ser uma grande incentivadora e colaboradora, pela paciência e auxílio em todas as etapas do trabalho,

À minha querida amiga Elaine Cristina de A. Abreu, pelas colaborações,

Aos meus amigos, minha segunda família e caros companheiros nessa caminhada,

À todos que de alguma forma cooperaram e possibilitaram a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Deise e Antônio, grandes mestres.

Às minhas avós Florinda e Rosalina,

mulheres fortes, grandes inspirações.

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo estudar a espécie *Forsteronia velloziana* (Apocynaceae). Este estudo foi realizado a partir das cascas do caule desta espécie, coletadas na cidade de Curitiba, com os quais foi preparado um extrato etanólico bruto que foi fracionado em porções de acordo com a polaridade dos constituintes. A partir das amostras obtidas, por meio de colunas cromatográficas, foram encontrados terpenos que foram identificados por RMN ^{13}C e RMN ^1H .

O estudo das biológicas com as frações da espécie revelaram grande capacidade antioxidante pelo método da redução do complexo do fosfomolibdênio e pelo ensaio de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), principalmente nas frações clorofórmio e acetato de etila da casca, foi também comprovada a capacidade de redução de radicais livres pelo método do DPPH, principalmente pela fração acetato de etila.

Com relação à toxicidade, esta foi avaliada sobre o microcústáceo *Artemia salina* e larvas de *Aedes aegypti*, no primeiro o extrato e frações não se demonstraram tóxicos, porém em relação à atividade larvicida a fração hexano e o extrato bruto das folhas que foi realizado paralelamente, apresentaram grande eficiência, portanto pode-se inferir que estes podem atuar como pesticidas no controle de vetores da dengue, sem apresentar toxicidade ambiental.

A atividade hemolítica em sangue de carneiro também foi avaliada e nenhuma das doses testadas demonstrou atividade tóxica. A baixa toxicidade do extrato também foi demonstrada em ensaios de atividade antimicrobiana, nas quais foram testadas pelo método do antibiograma de difusão em ágar, o extrato e frações contra as bactérias *Agrobacterium tumefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e contra o fungo *Candida albicans*, não havendo atividade sobre nenhuma das espécies testadas.

Foi avaliada também a atividade alelopática da espécie, os resultados indicaram a interação do extrato e frações com as sementes de *Lactuca sativa*, reduzindo a velocidade de germinação, porém sem interferir nas taxas e gerando uma significativa diminuição nas dimensões das radículas, o que torna a espécie de interesse para o desenvolvimento de métodos de controle para espécies daninhas.

Palavras-chave: *Forsteronia velloziana*, Apocynaceae, Toxicidade, Alelopatia, Antioxidante, β -sitosterol.

ABSTRACT

The present work aimed to study the *Forsteronia velloziana* species belonging to the family Apocynaceae. This study was carried out from the bark of this specie, collected in the city of Curitiba, with which they prepared a crude ethanol extract that was fractionated into portions according to the polarity of the constituents. From the samples obtained through chromatography columns, terpenes which have been identified by ¹H NMR and ¹³C NMR were found.

The study of some biological activities with the fractions of the species, showed great antioxidant capacity by reducing the phosphomolybdenum the complex method and the assay of thiobarbituric acid reactive species (TBARS), mainly in fractions chloroform and ethyl acetate bark, has also been proven to reduce the ability of free radicals by the method DPPH, mainly by ethyl acetate fraction.

With respect to toxicity testing, this was assessed on brine shrimp and larvae of *Aedes aegypti*, the first extract and fractions not shown toxic, but in relationship to the larvicidal activity hexane fraction and crude extract of leaves was carried out in parallel showed great efficiency, so it can be inferred that these can act as pesticides to control dengue vector, without presenting environmental toxicity.

The hemolytic activity on sheep blood was also evaluated to set a toxicological endpoint of the species, and none of the tested doses showed toxic activity. The low toxicity of the extract was also demonstrated in antimicrobial activity assays, in which were tested by the agar diffusion susceptibility testing method, the extract and fractions against *Agrobacterium tumefaciens* bacteria, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and against the fungus *Candida albicans*, with no antimicrobial activity against any of the tested species.

We also evaluated the allelopathic activity of the species, indicated the interaction of the extract and fractions with the seeds of *Lactuca sativa*, reducing the germination rate, but without interfering with the exchange and generating a significant decrease in the dimensions of rootlets, which makes the species of interest to develop methods for controlling weeds.

Keywords: *Forsteronia velloziana*, Apocynaceae, Toxicity, Allelopathy, Antioxidant, β -sitosterol.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CIPÓ, EXEMPLAR DA ESPÉCIE <i>Forsteronia velloziana</i>	6
FIGURA 2. RAMO DE <i>Forsteronia velloziana</i> , OBSERVANDO-SE A MORFOLOGIA E DISPOSIÇÃO DAS FOLHAS.	6
FIGURA 3. <i>Forsteronia velloziana</i> , APRESENTANDO FRUTOS ALONGADOS.....	7
FIGURA 4. FRUTO E SEMENTES DE <i>Forsteronia velloziana</i>	7
FIGURA 5. MORFOLOGIA DE <i>Forsteronia velloziana</i>	8
FIGURA 6. ESTRUTURA DO ESQUELETO DOS ALCALOIDES VERDADEIROS.	22
FIGURA 7. ORIGEM DOS ALCALOIDES INDÓLICOS Á PARTIR DO TRIPTOFANO	23
FIGURA 8. ESQUEMATIZAÇÃO DA ORIGEM METABÓLICA DOS ALCALOIDES.	24
FIGURA 9. ESQUEMATIZAÇÃO DA ROTA BIOSSINTÉTICA DOS TERPENOS.....	27
FIGURA 10. ESTRUTURA QUÍMICA DO β - SITOSTEROL.....	61
FIGURA 11. ESPECTRO DE RMN DE ^1H (400 MHZ EM CDCL ₃) DA AMOSTRA J1 OBTIDA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DO EXTRATO DE <i>Forsteronia velloziana</i>	62
FIGURA 12. ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (400 MHZ EM CDCL ₃) DA AMOSTRA J1 OBTIDA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DO EXTRATO DE <i>Forsteronia velloziana</i>	63
FIGURA 13. GRÁFICOS DA RELAÇÃO DOSE-ESTÍMULO DA TOXICIDADE DO DE <i>F. velloziana</i> EM <i>A. aegypti</i>	70
FIGURA 14. GRÁFICO DO EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE FOLHA E FRAÇÕES HEXANO, ACETATO DE ETILA DO CAULE DE <i>F. velloziana</i> NA ATIVIDADE DA TRIPSINA EM LARVAS DE <i>A. aegypti</i>	72
FIGURA 15. GRÁFICO DO Efeito DOS EXTRATOS BRUTO DE FOLHA E DAS FRAÇÕES HEXANO E ACETATO DE ETILA DE <i>F. velloziana</i> NA ATIVIDADE DA QUIMIOTRIPSINA EM LARVAS DE <i>A. aegypti</i>	73
FIGURA 16. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA FRAÇÃO HEXÂNICA DE <i>F. velloziana</i> SOBRE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM LARVAS DE <i>A. aegypti</i>	75
FIGURA 17. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE <i>F. velloziana</i> SOBRE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM LARVAS DE <i>A. aegypti</i>	76

FIGURA 18. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE <i>F. velloziana</i> SOBRE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM LARVAS DE <i>A. aegypti</i>	76
FIGURA 19. GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA DO EXTRATO E FRAÇÕES DE <i>F. velloziana</i> EM PORCENTAGEM EM RELAÇÃO AOS PADRÕES RUTINA E ÁCIDO ASCÓRBICO, PELO MÉTODO DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO.....	79
FIGURA 20. GRÁFICO REPRESENTANDO AS CONCENTRAÇÕES DE AMOSTRA DO EXTRATO E FRAÇÕES DO CAULE DE <i>F. velloziana</i> NECESSÁRIAS PARA A REDUÇÃO EM 50% DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE DPPH (IC 50).)	81
FIGURA 21. RETA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELO ÁCIDO ASCÓRBICO.....	82
FIGURA 22. RETA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELO PADRÃO RUTINA.....	82
FIGURA 23. RETA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELO EXTRATO BRUTO DO CAULE DE <i>F. velloziana</i>	83
FIGURA 24. RETA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELA FRAÇÃO HEXANO DO CAULE DE <i>F. velloziana</i>	83
FIGURA 25. RETA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DO CAULE DE <i>F. velloziana</i>	84
FIGURA 26. RETA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO CAULE DE <i>F. velloziana</i>	84
FIGURA 27. RETA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELA FRAÇÃO REMANESCENTE HIDRO ALCOÓLICA DO CAULE DE <i>F. velloziana</i>	85
FIGURA 28. GRÁFICO DA INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA PROMOVIDA PELO EXTRATO E FRAÇÕES DE <i>F. velloziana</i> AVALIADA PELO MÉTODO DO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) EXPRESSO EM PORCENTAGEM E COMPARADAS AO PADRÃO BHT.	86
FIGURA 29. PLACA DE TESTE PARA O CRESCIMENTO DE <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , CONTENDO NAS AMOSTRAS O EXTRATO BRUTO.	89
FIGURA 30. GRÁFICO DA TAXA DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i> EXPOSTAS AO EXTRATO BRUTO DE <i>F. velloziana</i>	92
FIGURA 31. GRÁFICO DA TAXA DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>L. sativa</i> EXPOSTAS Á FRAÇÃO HEXANO DO EXTRATO DE <i>F. velloziana</i>	92
FIGURA 32. GRÁFICO DA TAXA DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>L. sativa</i> EXPOSTAS Á FRAÇÃO CLOROFÓRMIO.....	93

FIGURA 33. GRÁFICO DA TAXA DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>L. sativa</i> EXPOSTAS Á FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE <i>F. velloziana</i>	93
FIGURA 34. GRÁFICO DA TAXA DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>L. sativa</i> EXPOSTAS Á FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE DO EXTRATO DE <i>F. velloziana</i>	94
FIGURA 35. GRÁFICO DA MÉDIA DO CRESCIMENTO RADICULAR DE SEMENTES DE <i>L. sativa</i> EXPOSTAS AO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DE <i>F. velloziana</i> EXPRESSO EM MILÍMETROS.....	97
FIGURA 36. GRÁFICO DA MÉDIA DO CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO EM SEMENTES DE <i>L. sativa</i> EXPOSTAS AO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DE <i>F. velloziana</i> EXPRESSO EM MILÍMETROS.....	98

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Taxonomia geral da espécie <i>Forsteronia velloziana</i>	4
TABELA 2: Espécies do gênero <i>Forsteronia</i> no Brasil, subdivididas em endêmicas e não endêmicas.	10
TABELA 3. Teor de umidade do caule de <i>F. velloziana</i>	55
TABELA 4. Teor de cinzas totais do caule de <i>F. velloziana</i>	56
TABELA 5. Resultado da análise sistemática fitoquímica do extrato etanólico de caule e folhas particionados de <i>Forsteronia velloziana</i>	57
TABELA 6. Resultado da análise sistemática fitoquímica para compostos solúveis em água do caule de <i>Forsteronia velloziana</i>	59
TABELA 7. Sinais apresentados nos espectros de RMN de ¹³ C (400 MHz em CDCl ₃) da amostra J1 e de β-sitosterol	64
TABELA 8. Resultado do estudo de toxicidade pelo extrato alcoólico bruto do caule (BR), e das frações hexano (HX), clorofórmio (CL), acetato de etila (AC) ao solvente metanol e ao controle sulfato de quinidina sobre <i>Artemia salina</i>	65
TABELA 9. Atividade hemolítica do extrato bruto e frações de <i>Forsteronia velloziana</i> , expresso pela média da porcentagem ± DPR.	67
TABELA 10. Índice de Velocidade de Germinação (IVG) das sementes de <i>L. sativa</i> expostas ao tratamento com extrato e frações de <i>F. velloziana</i> por 120 horas, as doses testadas foram de 0,25, 0,5 e 1 mg/mL de solução de MES.	91

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
SUMÁRIO	
1.INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GERAL	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 <i>Forsteronia velloziana</i>	4
3.1.1 Aspectos gerais.....	4
3.2 O GÊNERO <i>Forsteronia</i>	9
3.2.1 Aspectos gerais.....	9
3.2.3 Importância Etnofarmacológica e Estudos	11
3.3 A FAMÍLIA APOCYNACEAE	13
3.3.1 Taxonomia e distribuição	13
3.3.2 Morfologia	14
3.3.3 Aspectos econômicos	15
3.3.4 Importância farmacológica	16
3.4 ALCALOIDES.....	20
3.4.1 Aspectos gerais.....	20
3.4.2 Estrutura e Biossíntese	21
3.4.3 Farmacologia e Atividades Biológicas.....	25
3.5 TERPENOS E ESTEROIDES	26
3.5.1 Aspectos gerais e estrutura	26
3.5.2 Biossíntese.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 MATERIAL VEGETAL.....	29
4.1.1 Coleta, identificação e exsicata.....	29
4.1.2.2 Cinzas totais.....	30

4.1.3 Ensaio Sistemático de Análise Fitoquímica	31
4.1.3.1 Extração dos Metabólitos Solúveis em Etanol	31
4.1.3.2 Pesquisa de alcaloides	32
4.1.3.3 Pesquisa de leucoantocianidinas	32
4.1.3.4 Pesquisa de heterosídeos flavônicos	32
4.1.3.5 Pesquisa de flavonóis	33
4.1.3.6 Pesquisa de dihidroflavonois.....	33
4.1.3.7 Pesquisa de cumarinas.....	33
4.1.3.8 Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos	34
4.1.3.9 Pesquisa de esteroides e triterpenos	34
4.1.3.10 Extração de Metabólitos Solúveis em Água	35
4.1.3.11 Pesquisa de heterosídeos antociânicos	36
4.1.3.12 Pesquisa de heterosídeos saponínicos.....	36
4.1.3.13 Pesquisa de heterosídeos cianogênicos	36
4.1.3.14 Pesquisa de taninos.....	37
4.1.3.15 Pesquisa de ácidos voláteis.....	38
4.1.3.16 Pesquisa de ácidos fixos.....	38
4.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA	38
4.2.1 Obtenção dos extratos	38
4.2.1.1 Extração por Soxhlet.....	38
4.2.2 Determinação do teor de sólidos do extrato bruto.....	39
4.2.3 Obtenção das Frações	40
4.2.4 Purificação das frações	40
4.2.5 Isolamento das substâncias	40
4.2.6 Elucidação estrutural.....	41
4.3 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	41
4.3.1 Atividade Antioxidante.....	41
4.3.1.1 Formação do Complexo Fosfomolibdênio.....	42
4.3.1.2 Avaliação da Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)	43
4.3.1.3 Teste com Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	44
4.3.2 Avaliação da Toxicidade	45
4.3.2.1 Avaliação da Toxicidade Frente ao Microcrustáceo <i>Artemia salina</i>	45

4.3.2.2 Atividade Larvicida Contra <i>Aedes aegypti</i>	46
4.3.2.2.1 Avaliação da Toxicidade	46
4.3.2.2.2 Avaliação na Morfologia Interna das Larvas	48
4.3.2.2.3 Preparo do homogeneizado de larvas de <i>A. aegypti</i> tratadas com os extratos e frações.....	48
4.3.2.2.4 Determinação do Teor de Tripsina e Quimiotripsina	48
4.3.2.3 Avaliação da Atividade Hemolítica	49
4.3.3 Análise da Atividade Antimicrobiana	50
4.3.3.1 Preparo das Amostras	50
4.3.3.2 Meio de Cultura.....	51
4.3.3.3 Preparo do Inóculo e Teste	51
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA	52
4.4.1 Preparo do Teste	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 MATERIAL VEGETAL.....	54
5.1.1 Coleta, identificação e exsicata.....	54
5.1.2 Análises Físico- Químicas.....	54
5.1.2.1 Umidade.....	54
5.1.1.2 Teor de Cinzas.....	55
5.2 ENSAIO SISTEMÁTICO EM FITOQUÍMICA	56
5.2.1 Pesquisa de metabólitos solúveis em etanol.....	56
5.2.2 Pesquisa de metabólitos solúveis em água	58
6.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA	60
6.3.1 Determinação do teor de sólidos do extrato bruto e frações.....	60
6.3.2 Purificação das frações e elucidação estrutural	60
6.4 ANÁLISE DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	65
6.4.1 Avaliação da toxicidade	65
6.4.1.1 Avaliação da toxicidade frente ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i>	65
6.4.1.2 Avaliação da atividade hemolítica	67
6.4.1.3 Avaliação da atividade tóxica sobre larvas de <i>Aedes aegypti</i>	69
6.4.1.3.1 Toxicidade do extrato e frações	69
6.4.1.2.2. Conteúdo de tripsina e quimiotripsina	72
6.4.2 Avaliação da Atividade Antioxidante	78

6.4.2.1 Formação do Complexo Fosfomolibdênio.....	78
6.4.2.2 Avaliação da Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)	80
6.4.2.3 Teste com espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	85
6.4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	88
6.4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA	90
6.4.4.1 Teste de Germinação.....	90
6.4.4.2 Teste de Crescimento	95
7. CONCLUSÃO	99
REFERÊNCIAS.....	101

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país de dimensões geográficas extensas, ocupa praticamente metade do território sul americano e está sujeito a uma grande variabilidade climática, abrangendo desde áreas semiáridas a climas temperados e florestas tropicais úmidas, o que propiciou a existência da mais rica megabiodiversidade do planeta (MITTERMEIER et al, 2005).

Estima-se que o Brasil detenha entre 15 a 20% do número total de espécies do planeta (BRASIL, 1988) contando com mais de 50 mil espécies vegetais descritas, o que representa 22% da flora mundial. Possui dois *hot spots* de biodiversidade – A Mata Atlântica e o Cerrado, além de seis reservas da biosfera reconhecidas pela UNESCO (BRASIL, 2011a).

Ao lado de toda esta riqueza, os problemas se apresentam em magnitude proporcional. Um exemplo drástico pode ser observado no domínio da Mata Atlântica - uma das áreas florestais mais ricas em diversidade biológica do planeta, que há 500 anos se estendia por cerca de um milhão de km² ao longo 17 estados, ao final da década de 1980 estava reduzida a menos de 9% de sua área original (BRASIL,1988) e atualmente a 7,3% (BRASIL, 2011b).

A perda de diversidade biológica tem ocorrido de forma alarmante, principalmente pelo fato de que, ao contrário de outras catástrofes ambientais, a perda da biodiversidade é irreversível (MITTERMEIER et al, 1998). Neste contexto, a degradação ambiental leva a perdas irrecuperáveis de patrimônios biológicos, dos quais, frequentemente há escassez de informações e conhecimentos a respeito das espécies.

PRIMACK e RODRIGUES (2002) sugerem que, para que o patrimônio natural seja protegido, é necessário que a sociedade mude sua percepção, passando a considerá-lo como um conjunto de recursos de propriedade comum que possui valores diretos, ou seja, valor produtivo e de consumo. Esta valorização só será possível a partir do desenvolvimento de estudos sobre o potencial da flora nativa que permitirá o aproveitamento de toda uma gama de possibilidades proporcionadas pela biodiversidade.

Entre as perspectivas de estudos em biodiversidade, substâncias provenientes do metabolismo secundário dos vegetais despertam grande interesse, isto porque as plantas fornecem não somente modelos para uma posterior síntese química de seus princípios ativos como também direcionam a domesticação e cultivo de espécies com propriedades medicinais.

A obtenção dos princípios ativos vegetais teve seu início do século XIX, com o isolamento da morfina a partir de *Papaver somniferum* pelo farmacêutico Friedrich Wilhelm Adam Sertürner em 1803, subsequentemente foram isoladas a quinina e a atropina, entre outras substâncias, o que desencadeou a substituição dos extratos vegetais, utilizados pela humanidade desde os seus primórdios, por substâncias isoladas (SCHULZ et al, 2001).

O desenvolvimento da síntese química e a ausência de estudos científicos que comprovassem a eficácia das substâncias de origem vegetal impulsionaram a substituição destes por fármacos sintéticos a partir da década de 1960, o que foi reforçado pelas dificuldades de controle químico, físico-químico, farmacológico e toxicológico dos extratos vegetais até então utilizados (SCHENKEL et al, 2000).

Entretanto, a partir dos anos 1980, os avanços técnicos e o desenvolvimento de novos métodos de isolamento de substâncias ativas a partir de fontes naturais, permitiram maior rapidez na identificação de substâncias em amostras complexas como os extratos vegetais, ressurgindo o interesse pela pesquisa destas substâncias como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos (TUROLLA, 2006).

Consideradas a importância do conhecimento sobre a biodiversidade vegetal brasileira e a relevância do estudo fitoquímico para o desenvolvimento de novos fármacos e substâncias para as mais diversas aplicações, faz-se necessário o estudo de plantas nativas, entre elas a *Forsteronia velloziana*, uma liana endêmica do Brasil.

O posicionamento taxonômico desta espécie fornece a perspectiva de resultados promissores, considerando que esta planta pertence à família Apocynaceae, produtora de diversos grupos de substâncias de interesse farmacológico.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar análises da composição fitoquímica, das atividades biológicas e toxicológicas dos extratos e frações obtidos do caule de *Forsteronia velloziana* (A.DC.) Woodson.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste estudo são:

- Efetuar a análise da composição fitoquímica do caule de *Forsteronia velloziana* (A.DC.) através de métodos cromatográficos e espectroscópicos, buscando isolar componentes fitoquímicos.
- Avaliar as atividades biológicas do extrato e frações.
- Avaliar a toxicidade.
- Avaliar a atividade larvicida de caule e folha.
- Avaliar a atividade antimicrobiana.
- Avaliar o perfil de atividade antioxidante.
- Avaliar a ação alelopática.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Forsteronia velloziana*

3.1.1 Aspectos gerais

A espécie *Forsteronia velloziana* (A.DC.) Woodson, teve sua classificação e descrição botânica realizada no ano de 1934, porém apresentou ao longo do tempo alguns sinônimos aceitos, sendo eles, *Forsteronia microphylla* (Müll.Arg.) Hand.-Mazz., *Forsteronia multinervia* var. *microphylla* Müll.Arg., *Echites vellozianus* A.DC. e como sinônimos ilegítimos *Forsteronia bracteata* Müll.Arg., *Echites bracteatus* Vell e *Thyrsanthus bracteatus* (Müll.Arg.) Miers.(RAPINI, 2010).

Sua hierarquia taxonômica encontra-se na TABELA 1:

TABELA 1: Taxonomia geral da espécie *Forsteronia velloziana* (A.DC.) Woodson.
FONTE: RAPINI, 2010.

Taxonomia de <i>Forsteronia velloziana</i>	
Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Gentianales
Família	Apocynaceae
Tribo	Mesechiteae
Gênero	<i>Forsteronia</i> G. Mey
Espécie	<i>Forsteronia velloziana</i>

Forsteronia velloziana tem como hábito liana, sendo uma trepadeira ou cipó lenhoso, seus habitats são campos e capões, seu porte atinge o dossel destes capões e florestas, é nativa e endêmica do Brasil, distribuindo-se nas regiões Centro-Oeste (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás), Sudeste (Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro) e Sul (Paraná e Santa Catarina) pertencendo aos domínios fitogeográficos Mata Atlântica e Cerrado. Na floresta Atlântica encontra-se tanto em florestas ombrófilas densas como em florestas ombrófilas mistas.

Sua fenologia aponta para o início do ciclo reprodutivo, com floração em novembro, sendo a sua dispersão de sementes anemocórica.

3.1.2 Morfologia e Morfoanatomia

Esta espécie é caracterizada como uma trepadeira com ramos pubérculos (FIGURA 1), apresentando folhas curto-pecioladas a subsésseis, oblongo-elípticas a largamente ovais, oblongo-elípticas a ovaladas com ápice curtamente acuminado (FIGURA 2), base subcordada, membranáceas, curtamente pilosas na face superior, curta e esparsamente hirtelas na face inferior, com glândulas inconspícuas na base na nervura central, com 2,5-4,5 cm de comprimento e 1,5-1,8 cm de largura. Suas inflorescências são terminais congestas, subcorimbosas, curtamente hirsutas.

Os frutos de *Forsteronia velloziana* são foliculares alongados deiscentes (FIGURA 3), que variam de 6 a 10 cm de comprimento, com sementes truncadas, com tufo apical de pelos (FIGURA 4) (VASCONCELLOS e GOUVEA, 1993).

As flores são pequenas, verde amareladas, com brácteas linear-lanceoladas, cálice com lobos lanceolados e esquamelas alternas, a corola apresenta tubo puberulento internamente. Os estames são inseridos na fauce da corola são glabros e o ovário ovoide, curtamente hirsuto (FIGURA 5).



FIGURA 1. CIPÓ, EXEMPLAR DA ESPÉCIE *Forsteronia velloziana* COLETADO NO INTERIOR DO BOSQUE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ EM 29/05/2012. FONTE: A AUTORA.



FIGURA 2. RAMO DE *Forsteronia velloziana*, OBSERVANDO-SE A MORFOLOGIA E DISPOSIÇÃO DAS FOLHAS. FONTE: A AUTORA



FIGURA 3. *Forsteronia velloziana*, APRESENTANDO FRUTOS ALONGADOS, DEISCENTES, LIBERANDO AS SEMENTES. FONTE: A AUTORA.



FIGURA 4. FRUTO E SEMENTES DE *Forsteronia velloziana*. OS FRUTOS APRESENTAM 8 cm DE COMPRIMENTO, AS SEMENTES CERCA DE 0,5 CM COM TUFOS APICAIS DE PELOS COM 1,5 cm. FONTE: A AUTORA



FIGURA 5. MORFOLOGIA DE *Forsteronia velloziana*. (A) RAMO FLORÍFERO, (B) FACE INTERNA DE SÉPALA COM ESQUAMELAS, (C) ESTIGMA, (D) ANTERA, (E) OVÁRIO COM NECTÁRIO. FONTE: VASCONCELOS e GOLVEIA, 2003.

Estudos morfoanatômicos e morfoquímicos das flores desta espécie foram realizados por RIO e colaboradores (2006), caracterizaram a anatomia das domácias e os coléteres sésseis e ramificados, sendo estes descritos pela primeira vez para órgãos vegetativos de Apocynaceae. Estruturas secretoras florais e vegetativa estudadas em *F. velloziana* foram: idioblastos; hipoderme e epiderme, laticíferos; apêndices apicais e epiderme da cabeça do estilete; coléteres calicinais e nectários.

3.2 O GÊNERO *Forsteronia*

3.2.1 Aspectos gerais

Incluído na subfamília Apocynoideae Burnett (Endress e Bruyns 2000), *Forsteronia* G. Mey., tendo como sinônimos heterônimos *Aptotheca* Miers, *Parsonsia* P.Beauv., *Syringosma* Mart. ex Rchb., *Thenardia* Kunth., *Thyrsanthus* Benth., é um gênero constituído por 46 espécies de distribuição neotropical, encontradas praticamente em toda América do Sul, desde o México até o Uruguai.

Estudos realizados por SIMÕES e colaboradores (2004), avaliaram genótipos e realizaram a caracterização genética de diversos grupos dentro de Apocynaceae, incluindo o gênero *Forsteronia*, no qual se concluiu que o táxon é monofilético, ou seja, todo ele tem a mesma origem evolutiva. No Brasil, existem 25 espécies nativas, sendo destas 10 endêmicas (TABELA 2) distribuídas nos domínios fitogeográficos Cerrado, Caatinga, Amazônia e Mata Atlântica, sendo encontradas em todas as regiões do país (RAPINI et al, 2010).

TABELA 2: Espécies do gênero *Forsteronia* no Brasil, subdivididas em endêmicas e não endêmicas (RAPINI, 2010).

Espécies Nativas do Gênero <i>Forsteronia</i>	
Espécies Endêmicas do Brasil	<i>Forsteronia amazonica</i> Monach.
	<i>Forsteronia australis</i> Müll.Arg.
	<i>Forsteronia cordata</i> (Müll.Arg.) Woodson
	<i>Forsteronia leptocarpa</i> (Hook. & Arn.) A.DC.
	<i>Forsteronia linearis</i> (Vell.) Müll.Arg.
	<i>Forsteronia montana</i> Müll.Arg.
	<i>Forsteronia paludosa</i> Woodson
	<i>Forsteronia pilosa</i> (Vell.) Müll.Arg.
	<i>Forsteronia rufa</i> Müll.Arg.
	<i>Forsteronia velloziana</i> (A.DC.) Woodson
Espécies Não Endêmicas do Brasil	<i>Forsteronia acouci</i> (Aubl.) A.DC.
	<i>Forsteronia affinis</i> Müll.Arg.
	<i>Forsteronia brevifolia</i> Markgr.
	<i>Forsteronia duckei</i> Markgr.
	<i>Forsteronia glabrescens</i> Müll.Arg.
	<i>Forsteronia gracilis</i> (Benth.) Müll.Arg.
	<i>Forsteronia guyanensis</i> Müll.Arg.
	<i>Forsteronia laurifolia</i> (Benth.) A.DC.
	<i>Forsteronia lucida</i> Markgr.
	<i>Forsteronia mollis</i> Rusby
	<i>Forsteronia pubescens</i> A.DC.
	<i>Forsteronia refracta</i> Müll.Arg.
	<i>Forsteronia tarapotensis</i> K.Schum. ex Woodson
<i>Forsteronia thyrsoides</i> (Vell.) Müll.Arg.	
<i>Forsteronia umbellata</i> (Aubl.) Woodson	

3.2.2 Morfologia e morfoanatômica

Os representantes do gênero *Forsteronia* são predominantemente lianas e raramente arbustos. Morfologicamente, este gênero tem como características gerais as folhas opostas, as inflorescências terminais multiflora, racemosa a cimosas,

brácteada com flores pequenas apresentando corola dextrorsa, tubo curto com comprimento inferior a 3 mm, fauce sem reforço e lobos estendidos, estames com anteras parcialmente férteis, de ápice excluso, sagitadas e firmemente aderidas ao estigma.

O gineceu é apocárpico e o ovário é circundado por cinco nectários, os frutos são foliculares e alongados com sementes truncadas, caracterizadas por apicais de função anemocórica (VASCONCELLOS e GOUVEA, 1993).

Estudos realizados por RIO e colaboradores (2005) apontam para a possibilidade da identificação e diferenciação de espécies nativas de *Forsteronia* encontradas no Cerrado (*F. australis* Müll.Arg., *F. glabrescens* Müll.Arg., *F. pubescens* A.DC. e *F. thyrsoides* (Vell.) Müll.Arg.) através da morfoanatomia de seus pecíolos e folhas, variando também quanto aos feixes vasculares e a distribuição de dioblastos secretores. Em todas as espécies a presença dos estômatos é restrita a face superior das folhas e é observada a presença de coléteres ativos embora haja variação entre estas (coletéres padrão, séssil e ramificado).

LARROSA e DUARTE (2005) caracterizaram morfoanatomicamente folhas e caule de *F. glabrescens* Müll.Arg. A folha desta espécie é anfiestomática, o que corrobora com o estudo de RIO et al (2005), a avaliação histoquímica desta planta mostrou idioblastos com substâncias fenólicas, prismas de oxalato de cálcio e laticíferos ramificados encontrados na folha e no caule, a epiderme desta planta é unisseriada e o mesofilo é dorsiventral a nervura central tem secção plano-convexa e é percorrida por um feixe vascular bicolateral em arco aberto.

3.2.3 Importância Etnofarmacológica e Estudos

Diversos estudos têm sido realizados com espécies do gênero *Forsteronia* principalmente na América Central. No Brasil boa parte dos estudos estão direcionados a questões de morfologia, morfoanatomia e levantamentos de biodiversidade.

Levantamentos etnofarmacológicos apontam para o uso de diversas espécies deste gênero, no Brasil, *Forsteronia floribunda* (Sw.) G. Mey. e *Forsteronia glabrescens* Müll. Arg. são utilizadas na medicina tradicional como febrífugo (PENA,

1941), embora estudos posteriores coloquem a espécie *F. floribunda*, no Index de espécies tóxicas de animais, plantas e bactérias (GILBOA et al, 1978).

No interior o estado de Goiás, *Forsteronia refracta*, planta chamada pela população tradicional de “cipó leiteiro”, tem o uso do látex para o combate a tumores (SILVA e PROENÇA, 2008) efeito que pode ser explicado experimentalmente pelo trabalho de XU e colaboradores (2006), que demonstrou a inibição da síntese da MAPK (mitogen-activated protein kinases) pelo extrato bruto e por seus glicosídeos acetilados isolados, estas enzimas desempenham um papel importante no processo da tradução genica em organismos eucarióticos, e é diretamente envolvida nos processos de crescimento e sobrevivência de tumores (SMITH et al, 2005).

Forsteronia gracilis (Benth.) Müll.Arg., é utilizada por comunidades tradicionais da Guiana contra doenças de pele e como inibidor de veneno de sapo (DE FILLIPS et al, 2004).

Nos países da América Central, o uso de plantas do gênero *Forsteronia* não é só medicinal, mas também está relacionado a usos e costumes de populações da região amazônica. Em Chazuta, na Amazônia peruana, faz parte da cultura popular o uso de dietas restritivas a produtos da floresta associado ao retiro e ao isolamento individual, com o objetivo da melhoria geral das condições de saúde.

Segundo os Quechuas de San Martin e Lama, populações que habitam a região, as dietas restritivas promovem atividade depurativa, anti-inflamatória, anti-infecciosa, psicoativa e de melhoria das condições mentais. As cascas de *Forsteronia graciloides* Woodson, conhecida como “Sapo waska”, são utilizadas nestas dietas através da sua decocção, para o tratamento de fraturas ósseas (SANZ-BISET et al, 2011).

Na mesma região, o látex desta planta é utilizado para hérnia inguinal, preparado misturando-se uma colher do material vegetal com água morna, para dores articulares, contusões e injúrias, o tratamento é realizado através de um emplastro feito do látex aquecido e como tônico pós-parto e para prolapso de ovários e útero, o látex é preparado diluído em rum (SANZ-BISET et al, 2009).

Diversas plantas nativas da Amazônia venezuelana foram testadas quanto as suas atividades biológicas, considerando-se a toxicidade, que foi avaliada frente ao microcrustáceo *Artemia salina* e os efeitos sobre a atividade cardiovascular. Uma das espécies testadas é a *Forsteronia laurifolia* (Benth.) A. DC.

Desta planta foram avaliados folhas e caules, que em ensaios prévios apresentaram triterpenos e flavonoides. Os estudos apontaram a diminuição da pressão arterial induzida pelos extratos, demonstraram letalidade à *Artemia salina* (JIMENEZ et al, 2001).

Além da importância etnofarmacológica e das pesquisas que apontam para o uso de substâncias extraídas destas Apocynaceae, outros usos e aplicações destas plantas também tem sido estudados, na Argentina, existem estudos para a obtenção do látex para uso industrial (EZCURRA,1981).

Considerados os estudos já existentes sobre o uso popular de espécies de *Forsteronia*, a ausência de avaliações de atividade antioxidante e de alelopatia, e os escassos estudos fitoquímicos do gênero, é necessário que exista o desenvolvimento de novos trabalhos sobre as demais espécies deste gênero.

3.3 A FAMÍLIA APOCYNACEAE

3.3.1 Taxonomia e distribuição

A família Apocynaceae pertence à ordem Gentianales que compreende, além desta, outras quatro famílias: Gelseminaceae, Gentianaceae, Loganiaceae e Rubiaceae (APG III 2009).

Em 1789, Jussieu descreveu Apocynaceae (“Apocineae”) com 24 gêneros subdivididos em três grupos, diferenciados apenas pelas características dos frutos e sementes, no ano de 1810 estudos taxonômicos de Brown contribuíram para que o número de gêneros aumentasse para 53, e atualmente engloba aproximadamente 300 gêneros (RAPINI, 2012).

Atualmente cinco subfamílias estão incluídas em Apocynaceae: Rauvolfioideae (cosmopolita; contando com 10 tribos e 83 gêneros), Apocynoideae (cosmopolita; contando com 8 tribos e 80 gêneros), Periplocoideae (Origem europeia; contando com 33 gêneros), Secamonoideae (Origem européia; 8 gêneros) e Asclepiadoideae (cosmopolita; contando com 4 tribos e 172 gêneros); as duas

primeiras são subfamílias parafiléticas , enquanto as outras três são monofiléticas. (ENDRESS e BRUYNS 2000; ENDRESS et al, 2007).

Nos últimos anos, Apocynaceae foi alvo de uma controvérsia quanto à sua circunscrição, culminando na proposição de uma nova classificação, baseada em caracteres morfológicos e apoiada por dados moleculares, que incluiu Asclepiadaceae (ENDRESS e BRUYNIS, 2000, RAPINI, 2012).

Apocynaceae possui distribuição pantropical, com representantes também em regiões temperadas. A família inclui aproximadamente 300 gêneros e 5000 espécies, no Brasil ocorrem 95 gêneros e 850 espécies (RAPINI, 2010; RAPINI, 2012; LORENZI, 2009).

3.3.2 Morfologia

As espécies taxonomicamente enquadradas na família Apocynaceae são herbáceas, arbustivas, subarbustivas, arbóreas, frequentemente lianas ou cipós, geralmente latescentes.

As folhas são geralmente opostas, menos frequentemente alternas como no gênero *Aspidosperma*, que tende a ser separado do agrupamento ou verticiladas, como em *Allamanda*. Não apresentam estípulas, estas ocorrem raramente em algumas espécies de *Odontadenia*, a margem de suas folhas é inteira.

Apocynaceae apresenta inflorescências, racemosa ou cimosas, às vezes reduzida a uma única flor, flores geralmente vistosas, bissexuadas, raramente dioicas ou ginodióicas, estas encontradas em algumas espécies de *Rauwolfia*.

Morfologicamente as flores são actinomorfas ou raramente ligeiramente zigomorfas, diclamídeas, o cálice é pentâmero podendo ser dialissépalo ou gamossépalo, a prefloração é imbricada valvar; a corola é pentâmera, gamopétala, com a prefloração semelhante ao cálice, apresenta estames em número igual ao das pétalas, epipétalos, com anteras rimosas, com pólen muitas vezes agrupado em polínias.

O gineceu é bicarpelar, dialicarpelar, mas com os estiletos unidos, ou menos frequentemente gamocarpelar sendo neste caso ovário 1-2-locular, o ovário é na maioria das vezes súpero, sendo ínfero apenas nos gêneros *Himathantus* e *Plumeria*,

a placentação pode ser axial ou parietal, o ovário é geralmente pluriovulado e, dispostas ao redor deste, frequentemente são encontradas glândulas nectíferas.

As Apocynaceae apresentam fruto do tipo folículo, seco ou raramente carnosos, ocasionalmente cápsula, drupa e baga, as sementes são geralmente comosas, às vezes aladas, como no gênero *Forsteronia*, ou envolvidas por arilo carnosos (LORENZI, 2009; MARTINS et al, 2000).

3.3.3 Aspectos econômicos

A família Apocynaceae, além da significativa biodiversidade, da importância ecológica e farmacológica, apresenta um importante potencial econômico. Entre os seus representantes há espécies que são fornecedoras de látex para a produção de borracha, como as de *Landolphia* Beauv., e as que fornecem látex para o preparo da goma de mascar, *Macoubea guianensis* Aubl. (piquiá), *Lacmellea pauciflora* (Kuhl.) Monac. (chamarrão) e *Couma rigida* Müll. Arg. (mucugê), cujo suco láteo adocicado também é usado como leite vegetal e *Hancornia speciosa* Müll. Arg. (mangabeira) que produz um fruto utilizado na alimentação, servindo também para o preparo de sucos e sorvete (QUINET e ANDREATA, 2005).

Diversas espécies têm recebido destaque no Brasil, especialmente por fazerem parte do projeto "Extrativismo não-madeireiro e desenvolvimento sustentável na Amazônia" (ITTO – PD 31/99 Ver. 3)", que visa a proteção das florestas tropicais através do uso racional dos recursos proporcionados pela biodiversidade, através do extrativismo vegetal.

Algumas das espécies protegidas por este projeto são a *Asclepias curassavica* L., que pode ser utilizada para a produção de fibras para tecidos, a *Cascabela thevetia*, para a alimentação animal, artesanato, a extração do óleo das sementes para fins cosméticos e de saboaria, a *Aspidosperma excelsum* Benth., que apresenta substâncias adstringentes podendo ser utilizadas para fins cosméticos, a *Himatanthus sucuuba*, a *Hancornia speciosa* e a *Parahancornia fasciculata* (Poir.) Benoist, utilizada para obtenção de fibras de celulose para produção de papel e para alimentação, por apresentar frutos carnosos e adocicados.

Aspidosperma é um gênero pertencente à Apocynaceae que compreende cerca de 43 espécies de distribuição neotropical, apresentando importância como fornecedoras de madeira nobre (GOMES e CAVALCANTI, 2001), entre elas destaca-se as Perobas como a Peroba rosa, *Aspidosperma polyneuron* uso para móveis pela sua resistência e durabilidade e a Peroba mica, *Aspidosperma populifolium* A. DC., também a Araracanga, *Aspidosperma desmanthum* de coloração amarelo- avermelhada e o Piquiá Marfim Roxo, *Aspidosperma desmanthum* Benth. ex Muell. Arg. (LOGSDON, 2008; IBAMA, 2012)

Também são madeiras importantes economicamente obtidas de Apocynaceas: a Aquaricara branca, *Geissospermum sericeum* Bth. & Hook, o Amapá Amargoso, ou Mogno dourado, *Parahancornia amapa* e a Gogó-de-guariba, *Rauwolfia paraensis* (SINDMASP, 2012; IBAMA, 2012).

O látex característico das plantas desta família é utilizado não somente para fins medicinais, como o do Amapá, *Parahancornia fasciculata* (Poir) Benoist, estes serão discutidos no próximo tópico, onde serão consideradas as drogas vegetais oriundas de Apocynaceae, quanto ao uso industrial, podemos considerar a Sorva ou Sovinha, *Couma utilis* (Mart.) Muell. Arg., uma espécie amazônica de valor econômico por ser produtora de um látex branco não elástico que possui valor comercial como matéria-prima para goma-de-mascar.

Esta planta apresenta também o fruto comestível, e por ser uma belíssima árvore, apresenta com potencial ornamental (FALCÃO et al, 2003), as espécies mais utilizadas para obtenção de látex para produção de borracha são *Aspidosperma australe* Müll. Arg; *Blepharodon bicuspidatum* Fourn e *Hancornia speciosa* (EMBRAPA, 2004).

3.3.4 Importância farmacológica

Apocynaceae apresenta grande importância medicinal devido à presença de diversas classes de metabólitos secundários isolados a partir de folhas e cascas de seus representantes, como glicosídeos cardiotônicos e alcaloides (RIZZINI e MORS 1976; MOURA e AGRA, 1989).

A produção de alguns desses compostos do metabolismo secundário está relacionada à presença de estruturas secretoras, dentre as quais vários tipos já foram mencionados para a família: tricomas, coléteres, idioblastos, cavidades, nectários, laticíferos e osmóforos (RIO, 2005; TORRES e GALLETTO, 1998; SENNBLAD et al, 1998).

As principais drogas vegetais clássicas, provenientes de espécies da família Apocynaceae são os alcaloides das raízes de Rauvófia (*Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. Ex Kurz) e das partes aéreas da Vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don.) (SCHRIPSEMA et al, 2000).

Catharanthus roseus (L.) G. Don. é um sub arbusto muito utilizado para fins ornamentais, originária da ilha de Madagascar. No caule desta planta existe uma mistura complexa de alcaloides indólicos de ampla utilização terapêutica (SCHRIPSEMA et al, 2000; LORENZI, 2009); entre eles a vincristina, a vimblastina e a vinorelbina, sendo o último um derivado semissintético, todos estes compostos têm atividades farmacológicas comprovadas, como agentes antineoplásicos, agindo através da inibição da divisão celular na metáfase, pela ligação com a tubulina, o que impede a polimerização dos microtubulos (PRATT et al, 1994).

Rauwolfia serpentina (L.) Benth. Ex Kurz, é uma planta popularmente utilizada na medicina hindu para o tratamento de hipertensão, psicoses, epilepsia, doenças mentais e nas mordidas de serpentes. A quantidade de alcaloides presentes neste vegetal pode alcançar 2,5% e cerca de 50 substâncias desta classe de metabólito secundário já foram isolados deste gênero. Estes alcaloides podem ser derivados da iombina, como a reserpina e a rescinamina, das iombinas heterocíclicas, como a serpentina ou derivados indólicos como a ajmalina (ABHIJIT, 2011; PANWAR et al, 2011; SCHRIPSEMA et al, 2000).

O uso de Apocynaceae para fins medicinais não se limita somente às drogas clássicas, diversos estudos etnofarmacológicos relatam a utilização de plantas desta família, que no Brasil, está distribuída em todos os domínios fitogeográficos, sendo utilizados por populações de todas as regiões.

Plantas indicadas por caboclos do Parque Nacional do Jaú (Amazonas) foram avaliadas fitoquimicamente e farmacologicamente por RODRIGUES e colaboradores (2010). Uma das espécies estudadas foi *Himathantus sucuuba* (Spruce ex Müll. Arg.) Woodson, conhecida localmente como sucuuba, uma árvore da qual foram utilizados caules e folhas, os resultados validaram a utilização popular da planta

como analgésica. A mesma planta é citada por SANZ-BISET et al (2009) como vermífuga, depurativa e antirreumática.

O Amapá (*Parahancornia fasciculata* (Poir) Benoist) é uma planta cujo látex é comumente utilizado nos estados do Pará e Amazonas, sendo o seu uso popularmente reconhecido para enfermidades estomacais e do sistema respiratório, é vendido em centros urbanos, em feiras livres, e até mesmo em farmácias, sendo economicamente significativo dentro do conjunto de produtos de origem extrativista (SILVA et al, 2011).

MOURA e AGRA (1989) realizaram um levantamento das Apocynaceas tóxicas e medicinais do nordeste brasileiro e encontraram 37 espécies com uso conhecido, a maioria destas sendo utilizado o látex para os preparados. Destas 26 já tem o princípio ativo isolado.

Na região nordeste é popular o uso da *Secondatia floribunda* DC., que no Ceará é chamada de catuaba, planta utilizada como afrodisíaco, da *Allamanda violacea* Gardn, espécie que apresenta propriedades antimicrobianas e de *Geissospermum laeve* (Vell.) Miers, com propriedades tônicas e antifebris, sendo os alcaloides de sua casca eficientes hipotensores, confirmados em experimentos laboratoriais (QUINET e ANDREATA, 2005).

Mandevilla velutina (Mart.) Woodson, é nativa e endêmica do bioma Cerrado, popularmente conhecida como “batata-infalível”, é utilizada como anti-inflamatória, antibiótica e também pelas suas propriedades antiofídicas (BIONDO et al, 2007).

Devido a sua larga escala de distribuição e o grande número de espécies incluídas neste táxon, plantas do gênero Apocynaceae têm o uso medicinal difundido por toda a região tropical e subtropical, e vários estudos tem sido realizados desde a década de 1970 sobre os usos etnofarmacológicos destas espécies, como também sobre a sua fitoquímica e atividades biológicas.

Em Guiné-Bissau plantas do gênero *Lindolphia* além de servirem com recurso alimentar, visto que este gênero apresenta frutos carnosos e adocicados, têm uso medicinal bastante difundido. Raspas do caule de *Lindolphia heldelotii* são misturadas em água e administradas para facilitar o processo do parto e também para prisão de ventre, já a infusão das folhas é utilizada como antidiarreico, as folhas cozidas de *Lindolphia owariensis* são utilizadas como cataplasmas sobre torções e ramos jovens, cascas e raízes de *Lindolphia dulcis* também são utilizadas medicinalmente (MARTINS et al, 2000).

OMINOA e KOKWARO (1993) realizaram um levantamento das espécies da família Apocynaceae utilizadas pelas populações no Quênia, foram catalogadas 25 espécies de 16 gêneros com uso medicinal, além disso, foram encontradas espécies para usos diversos como *Saba comorensis*, cujos frutos são comestíveis, *Curissa edulis*, cujas raízes são utilizadas na culinária, a *Acokanthera schimperi* utilizada como veneno para caça, *Strophanthus mirabilis* como alimento para animais forrageiros, *Funtumia africana* para obtenção de madeira e *Wrightia demartiniana* para perfumaria.

Na América Central, além das espécies do gênero *Forsteronia* já citadas, outras Apocynaceae são utilizadas para fins medicinais, entre elas *Aspidosperma myristicifolium* (Markgr.) Wood. cujo nome popular é Remo kaspi e *Aspidosperma rigidum* Rusby, conhecida como Tashkum remo kaspi, ambas com o uso para reumatismo, sendo preparados os caules em decocção (SANZ-BISET et al, 2009).

Outras plantas são utilizadas com atividade antirreumática, entre elas *Rauwolfia praecox* K. Schum. ex Mark., que apresenta também atividade emética sendo útil no tratamento de parasitoses, *Tabernaemontana pandacaqui* Lam e *Tabernaemontana vanheurckii* Müll. Arg. Espécies deste mesmo gênero, *Tabernaemontana sananho* Ruiz Pav. e *Tabernaemontana undulata* Vahl) são utilizados pelas suas propriedades antiofídicas. Para infecções dermatológicas é utilizado o látex de *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. (SANZ-BISET et al, 2009).

Um fator relevante quando abordadas as propriedades farmacológicas e fitoquímicas desta família botânica é a presença de substâncias com toxicidade, como exemplo, a *Asclepias curassavica* L., uma planta herbácea que têm ampla distribuição na América do Sul, e embora tenha usos medicinais descritos, seu látex pode cegar, causar paralisia, dentre outros efeitos se for ingerida em doses elevadas (DUKE e VASQUEZ, 1994), efeitos que são atribuídos a um glicosídeo tóxico chamado asclepiadina, que tem ação sobre a musculatura lisa e sistema nervoso central (SCHVARTSMAN, 1979).

Cascabela thevetia (L.) Lippold, é outra planta tropical, de porte arbóreo, que apresenta usos farmacológicos, porém com grande toxicidade, exceto a polpa do fruto, por conter glicosídeos tóxicos, principalmente tevetina e peruvosídeo (MORTON, 1971), o que a torna útil como inseticida, fungicida e bactericida.

Outras plantas citadas como tóxicas são a *Allamanda catartica* L., que ocasiona distúrbios gastrointestinais severos, *Thevetia peruviana* (Pers.) Schum.

popularmente chamada de “Chapéu de Napoleão”, que ocasiona efeitos neurológicos, arritmias cardíacas e náuseas, assim como a espécie *Nerium oleander* L., conhecida como Espirradeira (SCHENKEL, 2004).

Considerada a relevância da família Apocynaceae e do gênero *Forsteronia* para a farmacobotânica, a medicina tradicional como também para o isolamento e obtenção de drogas vegetais, faz-se necessário um aprofundamento no conhecimento sobre os principais grupos de metabólitos secundários aos quais pertencem os princípios ativos destas plantas: Os Alcaloides, esteroides e terpenos.

3.4 ALCALOIDES

3.4.1 Aspectos gerais

Além do metabolismo primário, que origina todos os compostos necessários para manter as funções vitais do vegetal, as plantas produzem também substâncias resultantes do metabolismo secundário, que se diferencia do primário por não apresentar reações e produtos comuns a todas as plantas, sendo específicos em determinados grupos. Os metabólitos secundários podem apresentar efeitos medicinais ou tóxicos, além de exercerem funções como proteção contra predadores e atração de agentes polinizadores (SANTOS et al, 2004).

Alcaloides são compostos nitrogenados oriundos do metabolismo secundário vegetal, principalmente nas angiospermas, mas podendo também ser derivados de animais e fungos (EVANS, 1996). Geralmente são farmacologicamente ativos, gerando respostas fisiológicas bastante importantes, apresentam grande diversidade estrutural e vias metabólicas complexas.

Esta classe de substâncias tem papel importante neste estudo, principalmente pelo seu papel quimiotaxônomico e nos estudos filogenéticos, considerando-se que alcaloides indólicos são marcadores químicos para Apocynaceae (BOLZANI et al, 1984; BOLZANI et al, 1987; PEREIRA et al, 2007).

O termo alcaloide pode ter duas origens, na palavra árabe al-quali, planta que foi utilizada para a primeira obtenção da soda ou na palavra alcalina (alkali-like),

ambas apontam para o fato de que grande parte destes compostos possuem caráter básico que depende da disponibilidade de elétrons do nitrogênio (HENRIQUES et al, 2004; CORDELL, 1981).

PELLETIER (1983) definiu os alcaloides com o seguinte conceito: “Um alcaloide seria uma substância orgânica cíclica contendo um nitrogênio em estado de oxidação negativo e cuja a distribuição é limitada entre os organismos vivos”, esta definição é importante pois exclui demais compostos orgânicos nitrogenados e substâncias sintéticas.

Os alcaloides encontram-se nas plantas sob a forma de sais ácidos orgânicos ou em estado livre, solubilizados nos vacúolos, por isso extrai-se em solução aquosa, mas preferencialmente em diluição em ácidos minerais fortes, o que torna os sais mais solúveis e a extração mais eficiente (COSTA, 2001). Para a pesquisa qualitativa rápida, são utilizados os reagentes gerais para alcaloides: Reagente de Dragendorff (tetraiodeto bismuto de potássio), Reagente de Mayer (tetraiodeto de potássio), Reativo de Bertrand (ácido silicotúngstico) e ácido fosfomolibdico (MOREIRA, 1979; COSTA, 2001).

Este metabólito secundário é de suma importância para os vegetais, principalmente por apresentar notáveis atividades na fisiologia dos seres humanos e dos outros animais, além de muitas vezes apresentarem toxicidade e sabor desagradável o que proporciona às plantas que o sintetizam um mecanismo efetivo de defesa contra predadores. Podem ser também utilizados pelas plantas para proteção contra radiação solar, detoxificação e como reserva de nitrogênio (LARSON et al, 1984; LEVIN et al, 1978).

Estes compostos são encontrados em todas as partes dos vegetais, porém com o acúmulo preferencialmente em tecidos de crescimento ativo, células epidérmicas e hipodérmicas, bainhas vasculares e vasos lactíferos (HENRIQUES et al, 2004).

3.4.2 Estrutura e Biossíntese

A classificação dos alcaloides decorre da estrutura cíclica presente em sua molécula, podendo ser divididos entre alcaloides verdadeiros, que apresentam

apenas um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico. As substâncias que não se enquadram neste padrão são chamadas de protoalcaloides. Os esqueletos estruturais dos alcaloides pode ser observada na FIGURA 6, basicamente estes alcaloides constituem três grupos principais: os alcaloides tropânicos, indólicos e esteroidais, podendo ser classificados também como não heterocíclicos (hordenina, mescalina, efedrina, colchicina, eritromicina, jurubina, paquisandrina e taxol) e heterocíclicos, que compreendem todos os demais.

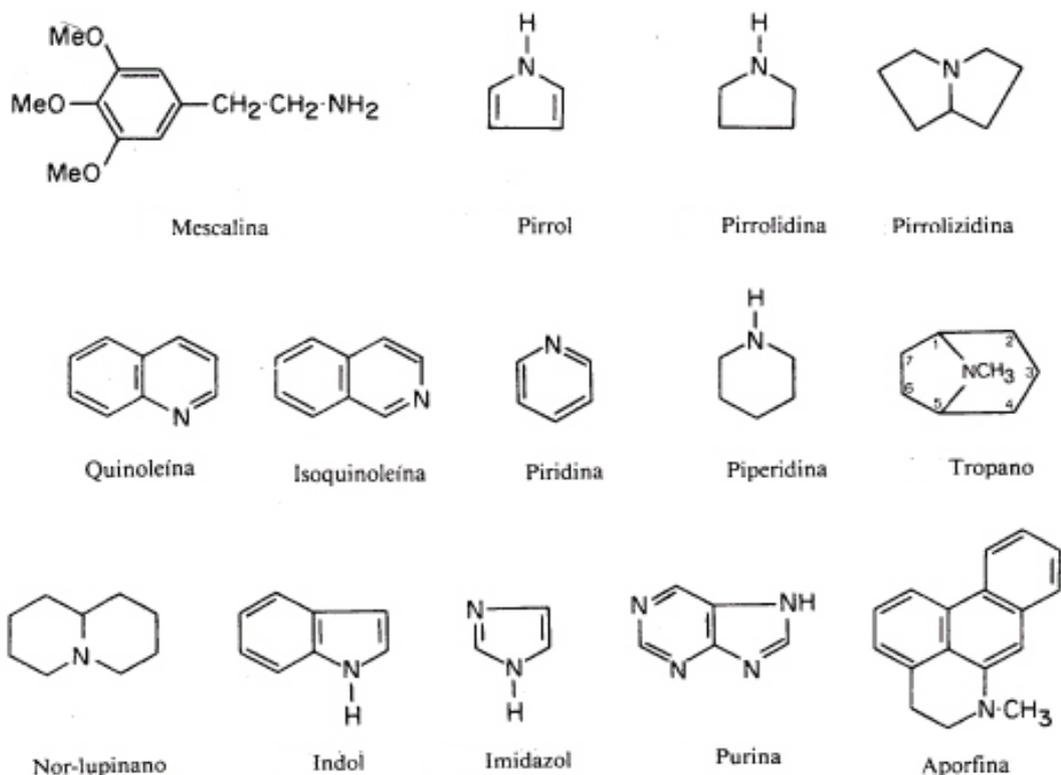


FIGURA 6. ESTRUTURA DO ESQUELETO DOS ALCALOIDES VERDADEIROS. FONTE: EVAN'S, 1996.

Outra forma de classificar este grupo de compostos é segundo o aminoácido que o origina. Porém como as vias metabólicas são complexas e não se sabe exatamente qual é a origem do alcaloide, a primeira classificação torna-se a mais usual (EVAN'S, 1996).

De acordo com a literatura pode-se classificá-los segundo sua origem metabólica em quatro grupos, devido às limitações já mencionadas, são eles os alcaloides derivados de aminoácidos, do ácido nicotínico e do ácido antranílico,

alcaloides derivados do metabolismo do acetato ou terpênicos e os alcaloides derivados peptídicos.

A via metabólica para a síntese dos alcaloides é bastante complexa, estes compostos tem em comum sua origem na síntese do ácido chiquímico através da degradação da glicose. O ácido chiquímico pode ser convertido em triptofano, que dará origem aos alcaloides indólicos (FIGURA 7) e quinolínicos, ou em fenilalanina ou em tirosina que serão substrato para síntese dos protoalcaloides, alcaloides isoquinolínicos e benzilquinolínicos.

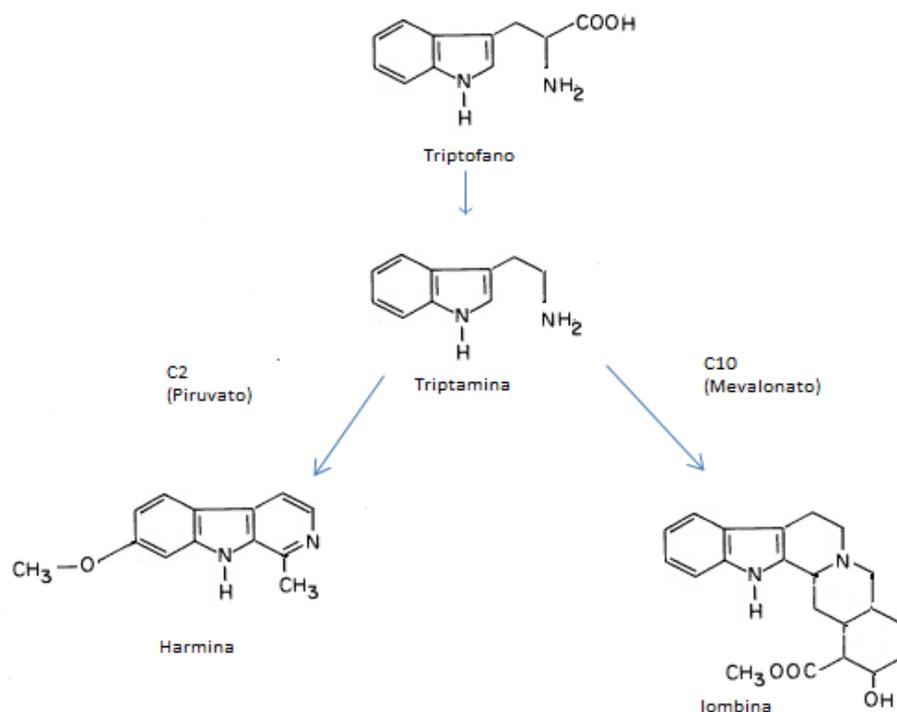


FIGURA 7. ORIGEM DOS ALCALOIDES INDÓLICOS Á PARTIR DO TRIPTOFANO FONTE: SANTOS, 2004.

A glicose por sua vez, pode ser degradada em acetil-CoA, que participará do ciclo do ácido cítrico, processo do qual derivarão dois aminoácidos: a ornitina e a lisina. Esses aminoácidos serão precursores dos alcaloides pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piperidínicos e quinolizidínicos (FIGURA 8) (SANTOS, 2004).

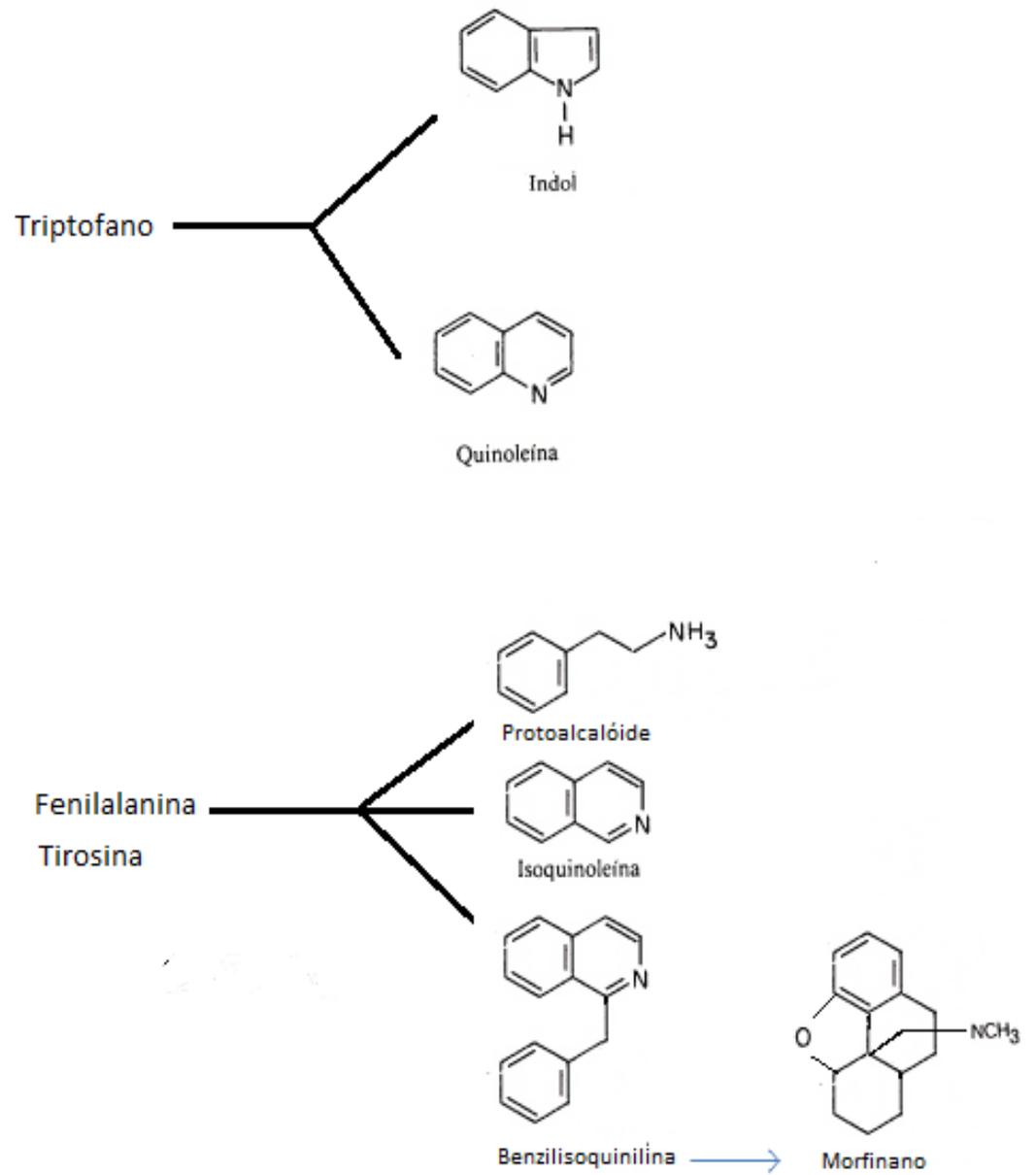


FIGURA 8. ESQUEMATIZAÇÃO DA ORIGEM METABÓLICA DOS ALCALOIDES. FONTE: SANTOS, 2004.

3.4.3 Farmacologia e Atividades Biológicas

Os alcaloides são substâncias que apresentam um grande potencial para o desenvolvimento de novas drogas, assim como para a descoberta de novas moléculas para fins terapêuticos, considerando-se que são estruturalmente muito diversificados, com cadeias lineares planares, sistemas policíclicos, moléculas globulares e diversos padrões de conformação, rigidez e flexibilidade, o que confere a estas substâncias uma enorme gama de possibilidades de ação.

Outras vantagens do estudo dos alcaloides consistem na rara possibilidade da existência de misturas racêmicas, o que facilita significativamente a elucidação estrutural, além do peso molecular moderado e da facilidade da extração promovida pela sua basicidade, que os tornam facilmente solúveis em água quando na forma de sal (CORDELL et al, 2001).

Para este trabalho é importante enfatizar as atividades biológicas dos alcaloides indólicos, grupo marcador para Apocynaceae.

Biologicamente os alcaloides indólicos, que são marcadores para a família em estudo, agem nos sistemas neurotransmissores opiáceos, GABAérgicos, colinérgicos, muscarínicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos, por isso são empregados largamente como hipotensor arterial, simpatolítico, diurético, vasoconstrictor periférico, estimulante respiratório, anestésico, agente bloqueador adrenérgico, espasmogênico intestinal, sedativo e relaxante do músculo esquelético (PEREIRA et al, 2007).

Alcaloides indólicos são também responsáveis pelos efeitos do tabaco, de bebidas como a ayahuasca e rapés utilizados por nativos da Amazônia, bem como pelas propriedades sedativas do maracujá (PEREIRA et al, 2007; PIRES et al, 2010).

Outros grupos de alcaloides podem também ligar-se ao DNA afetando a transcrição, o que explica o efeito antitumoral de algumas drogas vegetais obtidas de *Clotalaria spectabilis* (Fabaceae) da qual é extraída a monocrotalina, uma pirrolizidina, a *Cephaelis acuminata* (Rubiaceae) da qual é extraída a Emetina, uma isoquinolina, e o gênero *Bouvardia* (Rubiaceae) do qual são extraídos a bouvardina e a desoxibouvardina (CORDELL, 2001; EVANS, 1996).

3.5 TERPENOS E ESTEROIDES

3.5.1 Aspectos gerais e estrutura

Terpenos e esteroides compõem um grupo de substâncias originárias do metabolismo secundário. Amplamente distribuídas nos vegetais, apresentam as mais variadas funções, desde a atração de polinizadores, exercida prioritariamente pelos óleos essenciais, à composição de hormônios responsáveis pelo desenvolvimento das plantas, proteção contra fitopatógenos e na competição pela ocupação do ambiente pelo através da ação alelopática inibitória em outras plantas (VALLILLO et al, 2006; TOSCAN, 2010; ARAÚJO-MARCO et al, 2012).

A classe dos terpenos e terpenoides agrupa uma grande variedade de metabólitos secundários pela sua biossíntese, sendo estes derivados de unidades isoprênicas, unidades pentacarbonadas, originárias do metabolismo do ácido mevalônico.

Os esqueletos carbônicos dos terpenos e dos esteroides podem ser formados pela condensação de um número variável de unidades de isopreno (5C), e a quantidade de isoprenos determina a sua classificação: monoterpenos (10C) são formados pela condensação de dois isoprenos, sesquiterpenos por três (15C), diterpenos (20C) por quatro, sesterpenos (25C) por cinco, triterpenos por seis (30C), tetraterpenos (40C) por oito unidades isoprenicas, acima disso são chamados polisoprenoides (MANN, 1987; SIMÕES, 2007).

A via metabólica acetato-mevalonato, que dá origem aos terpenos é a mesma que origina subsequentemente os ácidos graxos, estes divergem pela presença de ramificações e de estruturas cíclicas (SIMÕES, 1994; SIMÕES, 2007), a biossíntese e o metabolismo dos terpenos será tratada no próximo tópico.

3.5.2 Biossíntese

A rota biossintética dos terpenos e dos esteroides a partir do metabolismo primário iniciado pela via do acetato-mevalonato e suas ramificações para as diferentes classes de compostos encontra-se esquematizada na FIGURA 9.

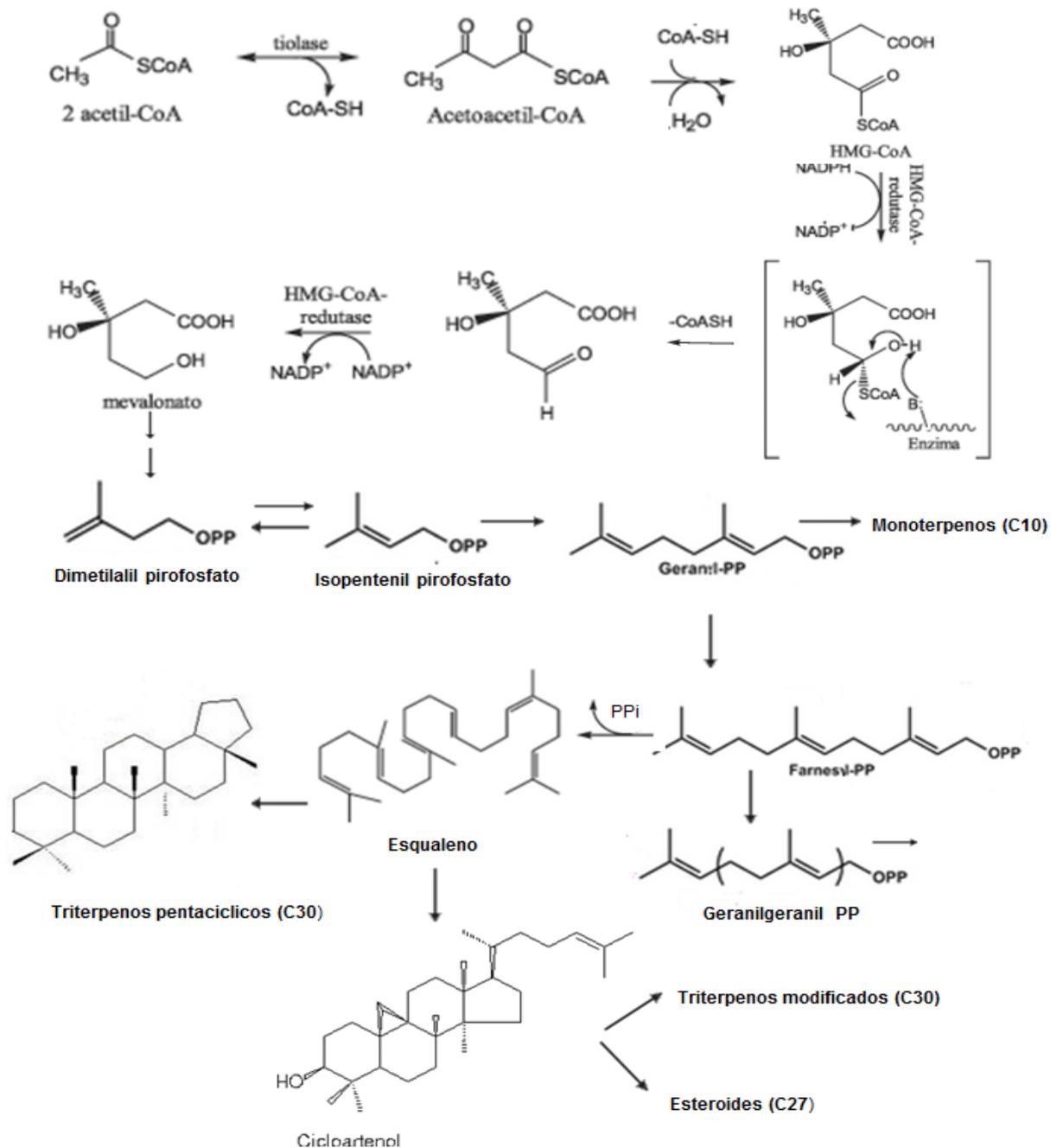


FIGURA 9. ESQUEMATIZAÇÃO DA ROTA BIOSSINTÉTICA DOS TERPENOS. (FONTES: SIMÕES, 2007; CAMPOS e CARVALHO, 2007).

O mevalonato é formado a partir de uma reação irreversível de hidrólise do 3-hidróxi-3- metilglutaril CoA, este é derivado da condensação de duas moléculas: o acetoacetil CoA e o acetil CoA. Ele também é precursor, não somente na via metabólica dos terpenos, mas também dos esteroides, saponinas e dos heterosídeos cardiotônicos. A condensação de acetil CoA por outras vias, dá origem aos ácidos graxos, acetogeninas e heterosídeos (SIMÕES et al, 2007).

Pela via do mevalonato, é formado o isopreno ativo (isopentenil pirofosfato), que se polimeriza dando origem a moléculas que aumentam de cinco em cinco carbonos.

O isopreno e seu isômero ligam-se formando moléculas de geranyl pirofosfato, que são ligadas a outra molécula de isopreno, dando origem aos diterpenos e aos sesquiterpenos, o mais simples deste último grupo, o farnesil-pirofosfato quando condensado origina o esqualeno, que é precursor da maioria dos triterpenos e esteroides (SIMÕES et al, 2007; CAMPOS e CARVALHO, 2007; ARAÚJO-MARCO et al, 2012).

3.5.3 Farmacologia e Atividades Biológicas

Agrupando uma grande diversidade de compostos, os terpenos apresentam variadas atividades biológicas e farmacológicas, sendo importante destacar o fato dos óleos essenciais pertencerem a esta classe de metabólitos secundários, sendo compostos prioritariamente de monoterpenos (cerca de 90% dos óleos voláteis) e sesquiterpenos.

Entre as atividades estudadas e aplicadas de terpenos estão a pesticida e inseticida (QUEIROZ-VOLTAN; 1994; VIEGAS JUNIOR, 2003); herbicida, efeito derivado do seu potencial alelopático (CANDIDO et al, 2010); antisséptica e antimicrobiana (SANTURIO et al, 2007; BUENO-SÁNCHEZ, 2009) além de uma significativa gama de ações farmacológicas descritas sobre o sistema nervoso central e periférico como analgesia e anestesia, ação antiespasmódica e carminativa, além de anti-inflamatória e secretolítica (SIMÕES et al, 2007).

Destaca-se também entre as atividades biológicas a capacidade antioxidante (MOON et al, 2006; CARVALHO et al, 2009; SOUZA e MACHADO, 2012) desempenhada especialmente pelos triterpenos que atuam ação inibindo a ação de radicais livres (TOSCAN, 2010; SOUZA e MACHADO, 2012).

Há uma forte correlação da presença de terpenos em alguns extratos vegetais e a sua ação antiofídica. Segundo PEREIRA e colaboradores (1994) terpenoides e fitoesteróis tem ação sobre a inibição do veneno de serpentes, ação também ligada á ação anti-inflamatória destes compostos, dada pela sua atividade antioxidante, gerando redução dos intermediários reativos do oxigênio gerados pelo processo inflamatório.

Efeitos alelopáticos tem sido estudados em diversas espécies vegetais, entre os óleos essenciais que apresentam esta atividade biológica pode-se citar o cineol, a cânfora, o campfeno, o limoleno, a α tujona e a isotujona, muitos outros compostos pertencentes aos grupos de monoterpenos e sesquiterpenos, havendo um papel relevante desempenhado pelos óleos voláteis (FERREIRA e AQUILA, 2000), entre os triterpenos o acetato de α -amirina e β -amirina e entre os esteroides o β -sitosterol (DALL´STELLA, 2008).

Sobre os triterpenos e esteroides, faz-se relevante sobre o presente trabalho a sua atividade larvicida sobre diversas espécies de Culicideos, entre eles espécies dos gêneros *Culex* e *Aedes*, vetores de doenças como a dengue e a febre amarela, óleos essenciais também apresentam esta atividade podendo ser citado os exemplos do mentol e da mentona, que desempenham toxicidade sobre larvas de diversas espécies de insetos (SIMÕES et al, 2007 *apud* KESLEY, 1984).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

4.1.1 Coleta, identificação e exsicata

O material vegetal foi coletado bosque pertencente à Universidade Federal do Paraná, campus Jardim Botânico, cuja coordenada geográfica é 25°26'52"S 49°14'21"W e a determinação da espécie botânica foi realizada no herbário do Museu Botânico Municipal da cidade de Curitiba, Estado do Paraná pelo botânico curador do acervo, Osmar dos Santos Ribas. A amostra foi comparada com exsicatas da espécie já tombadas pelo museu, estando fértil, parte do material coletado foi herborizado e tombado junto ao acervo, sob o número de registro 353907.

4.1.2 Análises físico-químicas

4.1.2.1 Umidade

Para a avaliação da umidade, foi utilizada a metodologia proposta pela V Farmacopeia Brasileira, para isso sete cadinhos de volume 15 mL, foram lavados e secos em estufa à temperatura de 100 °C por uma hora, posteriormente levados ao dessecador até alcançarem a temperatura ambiente, pesados e então utilizados para a pesagem de um grama da matéria prima vegetal previamente estabilizada à sombra, em temperatura ambiente e triturada em moinho de facas. Após a pesagem do material este foi mantido em estufa à 105 °C por até peso constante.

Cada um dos cadinhos foi pesado e a relação entre a massa inicial da matéria prima e a massa final desta, subtraindo-se o peso do cadinho foi considerada o teor de umidade, que é expresso em porcentagem.

4.1.2.2 Cinzas totais

O método utilizado para a avaliação do teor de cinzas também é proposto pela V Farmacopeia Brasileira. Os cadinhos utilizados para a avaliação do teor de

umidade foram transferidos para a mufla onde permaneceram por 4 horas a 600 °C, após retirados e dessecados, foram pesados e o valor obtido em relação ao peso inicial da amostra, subtraindo-se o peso do cadinho é considerado o teor de cinzas, sendo expresso em porcentagem.

4.1.3 Ensaio Sistemático de Análise Fitoquímica

O ensaio sistemático fitoquímico é de fundamental importância para o direcionamento da pesquisa e do isolamento de moléculas de origem vegetal. Esse ensaio será realizado segundo MOREIRA (1979), contando com algumas alterações.

4.1.3.1 Extração dos Metabólitos Solúveis em Etanol

O extrato etanólico bruto a 20 % foi preparado por maceração de 40 g do caule e folhas de *Forsteronia velloziana*, previamente secos e triturados, sendo estabilizado em 200 mL de álcool etílico a 70% v/v, por 1 hora em banho-maria a 70°C, sendo posteriormente filtrado em papel e o volume completado para 200 mL.

O extrato é concentrado até um terço do seu volume e particionado em funil de separação com solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano e acetato de etila, foram utilizados 20 mL de solvente em cada etapa de extração, completando o volume total de 200 mL. O resíduo do extrato constitui a fração hidroalcoólica, tendo seu volume completado para 200 mL com etanol 70%.

As frações obtidas foram utilizadas para a pesquisa de glicosídeos flavônicos, cumarínicos e antraquinônicos, alcaloides, esteroides e triterpenos.

A quantidade de folhas de *Forsteronia velloziana* não foi suficiente para a realização de todos os ensaios propostos no projeto, porém, considerado o especial interesse na extração e identificação de alcaloides desta espécie, 40 g do material coletado foi destinado á análise sistemática fitoquímica sendo utilizado somente na extração etanólica.

4.1.3.2 Pesquisa de alcaloides

A pesquisa qualitativa de alcaloides foi realizada através do uso dos principais reagentes conhecidos para alcaloides, o tetraiodeto bismuto de potássio (Reativo de Dragendorff), mercúrio tetraiodeto de potássio (Reativo de Mayer) e ácido sílico túngico (Reativo de Bertrand).

Das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e hidro alcóolica foram retiradas amostras de 50 mL, evaporadas em banho-maria a 50°C e ao resíduo seco adicionado 1 mL de etanol e acrescentado 20 mL de HCl 1%.

Para cada amostra foram testados 3 tubos de ensaio, cada um com 1 mL do respectivo extrato clorídrico, para cada tubo foram adicionadas 2 gotas de cada reativo. Para o teste foram utilizados tubos somente com o extrato, como controle negativo.

Serão consideradas positivas para a presença de alcaloides, as amostras que reagirem e apresentarem formação de precipitado branco ou leve turvação branca, com os reagentes de Mayer e Bertrand e precipitado de coloração tijolo com o reagente de Dragendorff.

4.1.3.3 Pesquisa de leucoantocianidinas

Foram levados a secura em banho-maria a 50°C, 10 mL das frações e depois dissolvidos com 5 mL de álcool etílico, a este extrato adicionados 5 gotas de HCl concentrado, levando ao aquecimento até ebulição. A reação é positiva quando há desenvolvimento de coloração vermelha.

4.1.3.4 Pesquisa de heterosídeos flavônicos

De cada fração 20 mL foram levados à secura e dissolvidos posteriormente com 10 mL de etanol. Dessas frações 5 mL foram transferidos para cada tubo de ensaio, a fração hidro alcóolica é transferida diretamente ao tubo de ensaio. Em

cada tubo adiciona-se 200 mg de limalha de ferro e HCl fumegante lentamente. O resultado positivo é observado através do desenvolvimento de coloração vermelho a vermelho sangue.

4.1.3.5 Pesquisa de flavonóis

Esta pesquisa é realizada pelo teste do Oxálico Bórico ou reação de Taubock no qual 10 mL de cada fração são levados à secura, posteriormente são adicionadas 5 gotas de acetona e 30 mg da mistura de ácido bórico e ácido oxálico (1:1), levando novamente a secura. Ao resíduo são adicionados 5 mL de éter etílico e a visualização realizada em ultravioleta, havendo fluorescência em caso de reação positiva.

4.1.3.6 Pesquisa de dihidroflavonois

A pesquisa de dihidroflavonois foi realizada com a secagem de 10 mL das frações em cápsulas de porcelana e o resíduo obtido aquecido em fogareiro com alguns cristais de acetato de sódio, 0,1 mL de anidrido acético e 0,1 mL de HCl concentrado. O resultado é considerado positivo se houver desenvolvimento de coloração roxa.

4.1.3.7 Pesquisa de cumarinas

Para a pesquisa de cumarinas, 30 mL das frações foram concentradas até 5 mL em banho-maria, a 50°C, e recuperadas com 5 mL de acetato de etila.

A fração hidro alcoólica foi levada até pH 1 por adição de HCl 2N e 5 mL de HCl concentrado. Esta mistura é resfriada e transferida para um funil de separação para extração com éter etílico (2 X 10 mL), sendo posteriormente concentradas em banho-maria até 5 mL.

Foram transferidos 3 mL das frações para tubos de ensaio, adicionados 2 mL de NaOH 2 N e levados para a câmara de luz ultravioleta em 366 nm por 15 minutos, onde a reação positiva é observada através da visualização de fluorescência azul ou verde amarelada.

Em um papel filtro serão marcados três pontos, e então efetuadas manchas de aproximadamente 1 cm de diâmetro com o restante das frações etéreas.

As manchas 1 e 2 são tratadas com NaOH 1 N e, sobre a mancha 1, coloca-se uma moeda, o papel filtro é levado à câmara de ultravioleta a 365 nm e novamente deixando em exposição por 15 minutos.

A reação para cumarinas é considerada positiva, ocorrendo o desenvolvimento de fluorescência, com coloração azul ou verde amarelada na mancha 2.

4.1.3.8 Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos

A avaliação da presença de heterosídeos antraquinônicos foi realizada através da reação de Borntraeger, para isso, foram transferidos para balões de fundo chato 30 mL das frações juntamente com 5 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico a 10% sendo mantida em refluxo por 1 hora, é feita então a filtragem e a adição de 30 mL de H₂O.

Em um funil de separação foram realizadas extrações com éter (2 X 10 mL), as frações obtidas foram reunidas e concentradas em banho-maria, até um volume de 5 mL e colocadas em um tubo de ensaio, adicionando-se 5 mL de NH₄OH. Observa-se a alteração da coloração para vermelho, a reação é considerada positiva.

4.1.3.9 Pesquisa de esteroides e triterpenos

Foram realizadas as reações de Liberman-Bouchard e Keller Kelliani, para a pesquisa de esteroides e triterpenos. Nestes ensaios, 10 mL das frações são

evaporadas até secura, os resíduos redissolvidos em 5 mL de clorofórmio e filtrados em algodão.

De cada uma das amostras 0,1; 0,5 e 1,0 mL são transferidos para três tubos de ensaio, e o volume completado para 2 mL com clorofórmio.

Para a reação de Liberman-Bouchard são adicionados aos tubos de ensaio 1 mL de anidrido acético e lentamente 2 mL de H₂SO₄ concentrado. A coloração poderá ser modificada para rósea, azul, verde ou amarela, as duas primeiras indicativas da presença de função carbonila na posição 3 e duplo enlace nas posições 5 e 6 ou 7 e 8, a coloração verde indica a função hidroxila em 3 e dupla ligação entre 5 e 6 ou 7 e 8, e a amarela um grupamento metila no carbono 14.

Para a reação de Keller Kelliani, foram levados à secura 2 mL dos extratos clorofórmicos preparados anteriormente. Os resíduos foram dissolvidos com 2 mL de ácido acético glacial e 0,2 mL de solução aquosa de cloreto férrico 1%. Transferem-se então as misturas para tubos de ensaio contendo 2 mL de H₂SO₄.

O desenvolvimento de coloração azul ou verde na zona de contato entre as duas fases indica a presença de desoxiaçúcares, sendo a coloração azul indicativa para esteroides e verde para triterpenos.

4.1.3.10 Extração de Metabólitos Solúveis em Água

O extrato aquoso foi preparado com 40 g do caule de *Forsteronia velloziana* previamente seco e triturado e 200 mL de água, permanecendo em banho-maria pelo período de 1 hora a 70°C, posteriormente o material foi filtrado e o volume completado com água até 200 mL.

Este extrato foi utilizado para a pesquisa de glicosídeos antocianos e cianogênicos, saponinas, taninos condensados e hidrolisáveis, amino grupos e flavonoides.

4.1.3.11 Pesquisa de heterosídeos antociânicos

Para análise qualitativa de heterosídeos antociânicos foram separados 5mL do extrato aquoso do caule em 3 tubos de ensaio. No primeiro é adicionado HCl 1% até pH 4, o surgimento de tons avermelhados é indicativo de reação positiva; o segundo tubo é alcalinizado com NaOH até pH 10, se positivo, observa-se tons azulados e o terceiro será neutralizado a pH 7 com o aparecimento de tons violáceos.

Posteriormente, 10 mL do extrato foram extraídos com álcool butílico em funil de separação por duas vezes. As frações foram reunidas e concentradas até 5mL. Então, foi acrescentado 5 gotas de HCl concentrado e a solução foi aquecida até ebulição, havendo antocianidinas, deve ocorrer o desenvolvimento de coloração vermelha.

4.1.3.12 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Neste teste são utilizados 3 tubos de ensaio com a mesma quantidade de extrato aquoso, ambos são submetidos á agitação intensa por cinco minutos, a espuma formada é medida imediatamente e após repouso de 30 minutos, sendo presença de saponinas confirmada pela formação de espuma persistente com altura superior a 1 cm.

4.1.3.13 Pesquisa de heterosídeos cianogenicos

Para a pesquisa de heterosídeos cianogenéticos, 5 mL do extrato aquoso foram transferidos para um tubo de ensaio de modo a não umedecer suas paredes, e adicionado 1 mL de H₂SO₄ 10% ou 1 N. Suspende-se no tubo uma tira de papel picro-sódico, preparado com tiras de papel filtro, embebido em solução de ácido pícrico 1% e seco ao abrigo da luz. As tiras pícricas secas são embebidas em

solução de carbonato de sódio 10%, sendo secas e, posteriormente, armazenadas em frasco âmbar.

Com o auxílio de uma rolha de cortiça, o papel foi mantido sobre o tubo que permaneceu em banho-maria (60°C) por 30 minutos. O resultado positivo é observado pelo desenvolvimento de coloração marrom á vermelho no papel picrossódico.

4.1.3.14 Pesquisa de taninos

A presença de taninos é avaliada através de diversos reagentes, para isso foram transferidos para 5 tubos de ensaio 1 mL de extrato aquoso. No tubo 1 adiciona-se 3 gotas de cloreto férrico, sendo o resultado positivo observado pela coloração azul ou verde, com ou sem formação de precipitado, o mesmo resultado deve ser observado no segundo tubo, ao qual são adicionadas 1 a 3 gotas de sulfato amoniacal.

Nos tubos 3, 4 e 5 o resultado positivo é caracterizado pela formação de precipitado, ao tubo 3 são adicionadas de 1 a 3 gotas de cloridrato de emetina, ao tubo 4,5 mL de ácido acético (gota a gota) e 5 mL de acetato de chumbo e ao tubo 5, 3 gotas de dicromato de potássio 1%.

Para a pesquisa de taninos condensados e hidrolisáveis foram transferidos para um balão de fundo chato 30 mL do extrato aquoso, ao qual foram adicionados, 6 mL de formaldeído 40% e 4 mL de ácido clorídrico 37%. Essa mistura foi aquecida em refluxo por uma hora, e após resfriamento, filtrada.

O resíduo do papel de filtro foi lavado com solução de álcool 50% e sobre ele, gotejada solução de KOH a 5%. A coloração verde é indica a presença de taninos condensados.

Ao filtrado foi adicionado excesso de acetato de sódio e gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1%, a mudança da coloração para azul, indica a presença de taninos hidrolisáveis.

4.1.3.15 Pesquisa de ácidos voláteis

Esse teste foi realizado da mesma maneira do que o teste para heterosídeos cianogénicos com uma fita de pH. A presença desses ácidos é indicada pela coloração da fita para valores abaixo de pH 7.

4.1.3.16 Pesquisa de ácidos fixos

Foram transferidos para um balão 20 mL do extrato aquoso, e então acrescentados 2 mL de NaOH 1N. Essa solução foi colocada em refluxo por 30 minutos. Após resfriamento, acidificado com H₂SO₄ 2 N e extraído com éter etílico em três repetições, utilizando 10 mL para cada repetição.

Os extratos etéreos foram reunidos e tratados com carvão ativo, sendo em seguida filtrados e mantidos em banho-maria (50°C) até a secura. O resíduo foi mantido em estufa por 10 minutos, resfriado e adicionados á ele 5 mL de NH₄OH 1N.

Em uma tira de papel de filtro concentraram-se duas manchas (3 gotas em cada mancha) com o resíduo amoniacal, deixando na estufa até secar. Sobre uma das manchas foi gotejado o reativo de Nessler.

A formação de coloração marrom nessa mancha indica a presença de ácidos fixos. Os ácidos fórmico, propiônico e amino acético não formam manchas, pois não fixam a amônia, apresentando reação negativa.

4.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA

4.2.1 Obtenção dos extratos

4.2.1.1 Extração por Soxhlet

As amostras de planta seca, estabilizada e moída foram pesadas e extraídas em aparelho de Soxhlet modificado segundo CARVALHO, 2001.

A um aparelho de Soxhlet foi conectado um condensador, que permite com que o solvente seja continuamente reutilizado no processo, o que o torna econômico em relação á outros métodos de extração. Todo o sistema foi levado ao aquecimento em manta aquecedora e deixado em refluxo por 12 horas, de modo a obter o extrato alcoólico por extração em meio solvatado (CARVALHO, 2001).

Para a utilização deste equipamento foram introduzidos no suporte de vidro do aparelho um volume adequado do material vegetal (este contém uma placa porosa e uma camada de algodão para conter o material vegetal), sobre este sistema é adicionado cerca de 6000 mL de álcool 96° GL para extração. Com o sistema sob aquecimento, o álcool presente no balão foi evaporado e posteriormente condensado no condensador de bolas. Deste modo, o líquido extrator percorre novamente o material vegetal, permitindo a extração.

No momento em que o menisco do extrato no canal lateral do Soxhlet atinge o ponto de refluxo, o extrato é descarregado no balão por sifonamento e o processo repetido 10 vezes. Este procedimento previne a degradação térmica de substâncias no balão, uma vez que a quantidade de líquido extrator é constante no sistema e é capaz de solvatar os compostos presentes.

4.2.2 Determinação do teor de sólidos do extrato bruto

A análise do teor de sólidos foi realizada segundo a V Farmacopeia brasileira. Foram pipetados volumetricamente em três placas de petri previamente dessecadas, 10 mL do extrato bruto. A placa foi mantida em estufa a 105°C até peso constante. A diferença entre o peso da placa com o resíduo do extrato e a placa vazia fornecerá o teor de sólidos em 10 mL do extrato.

4.2.3 Obtenção das Frações

As frações das espécies vegetais foram obtidas através do sistema líquido-líquido. Sendo utilizados solventes de diferentes polaridades, em ordem crescente de polaridade (n-hexano, clorofórmio, acetato de etila). Todos os solventes utilizados apresentam padrão analítico (PA).

Para o sistema de partição líquido-líquido foi utilizado o aparelho soxhlet modificado conectado ao condensador de bolas e a um balão de fundo chato com pérolas de vidro. Todo o sistema foi levado ao aquecimento em manta aquecedora e deixado sob refluxo por cerca de 6 horas.

4.2.4 Purificação das frações

A purificação das frações foi efetuada através de cromatografia em coluna. Cada uma das frações obtidas foi incorporada a sílica-gel 60, formando a pastilha de sílica. Com estas pastilhas foi realizada cromatografia em coluna das frações hexano e clorofórmio, para eluição da amostra por meio de um sistema de passagem de solventes com gradientes de polaridades crescentes, na qual a concentração do solvente mais polar é iniciada em 90:10 e decresce em 10 mL a cada 100 mL utilizados. As frações recolhidas foram coletadas em frascos de vidro de 15 mL, e secas em temperatura ambiente pela evaporação do solvente.

As características das frações recolhidas foram analisadas através de cromatografia em camada delgada, utilizando-se cromatoplasmas de Sílica-gel 60 F254 Merck® e visualizadas com lâmpada UV no comprimento de onda de 360 nm.

4.2.5 Isolamento das substâncias

Os cristais precipitados nos frascos obtidos da separação das frações através da cromatografia em coluna foram purificados através da lavagem das paredes do frasco com éter de petróleo gelado, posteriormente foi adicionado metanol, contando

que os compostos em forma de cristais eram de baixa polaridade, então o material foi centrifugado, e o sobrenadante descartado, sendo repetida a lavagem três vezes para que os cristais ficassem livres de misturas.

Foram obtidas 4 amostras, a amostra J1 obtida da fração clorofórmio na faixa de polaridade acetato- hexano (40:60), frascos 53 a 60, a amostras J2 e J3 também foram obtidas nesta fração, respectivamente nas faixas de polaridade acetato- hexano (65:35 e 70:30), frascos 110 a 117 e (80:20) frascos 120 á 127.

A amostra J4 foi obtida da fração hexano, na faixa de polaridade hexano- acetato (35:65), frasco 48.

4.2.6 Elucidação estrutural

As substâncias isoladas foram submetidas às análises espectrométricas para elucidação de sua estrutura, para isso, foram realizadas no setor de Química da UFPR.

Todos os experimentos de RMN foram realizados em um espectrômetro Bruker DPX 200 NMR, operando a 4,7 T, observando os núcleos de ^1H e ^{13}C a 200,13 e 50,32 MHz, respectivamente. O espectrômetro estava equipado com uma sonda quadrinuclear de 5 mm. Todos os deslocamentos químicos foram observados em relação ao sinal do TMS, em 0,00 ppm, como referencia interna.

O solvente utilizado para a solubilização das amostras foi clorofórmio deuterado.

4.3 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.3.1 Atividade Antioxidante

Para a avaliação das possíveis atividades antioxidantes apresentadas pelo extrato bruto de *Forsteronia velloziana* e por suas frações, foram utilizados três

diferentes métodos: a formação do complexo fosfomolibdênio, técnica descrita por PRIETO, PINEDA e AGUILAR (1999), que permite avaliar a capacidade antioxidante tanto de componentes lipofílicos quanto hidrofílicos, o teste com espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) que permite a avaliação da ação protetora do extrato e frações contra a peroxidação lipídica e a avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH, que quantifica a capacidade destes reduzirem radicais livres.

4.3.1.1 Formação do Complexo Fosfomolibdênio

Este ensaio tem como princípio a avaliação da oxidação corrida no reativo, utilizando como padrões comparativos a rutina e o ácido ascórbico.

O reativo foi preparado através da mistura de uma solução de fosfato de sódio 0,1 M (28 mL), com uma solução de molibdato de amônio 0,03 M (12 mL), ácido sulfúrico 3 M (20 mL) e água q.s.p. para 100 mL, sendo este preparado no momento do uso. As amostras testadas e as soluções padrões de ácido ascórbico e rutina, foram preparadas na concentração de 200 µg/mL em metanol (BIANCO, 2003).

Em triplicatas, foram adicionados 3 mL de reativo e 0,3 mL da amostra em tubo de ensaio, o mesmo procedimento foi realizado para os padrões e para o branco, que contém apenas metanol.

Os tubos foram fechados e levados ao banho-maria à 95°C por 90 min. Após o resfriamento, foram obtidas as absorbâncias, através da leitura em espectrofotômetro UV-1601 Shimadzu, no comprimento de onda de 695 nm. A capacidade antioxidante das amostras será expressa em atividade antioxidante relativa (AAR%), em relação à rutina e ácido ascórbico, usadas como padrão, os resultados são calculados da seguinte maneira:

$$\text{AAR\% EM RELAÇÃO À VITAMINA C} = \frac{\text{Abs}_{(\text{amostra})} - \text{Abs}_{(\text{branco})}}{\text{Abs}_{(\text{vitamina C})} - \text{Abs}_{(\text{branco})}} \times 100$$

$$\text{AAR\% EM RELAÇÃO À RUTINA} = \frac{\text{Abs}_{(\text{amostra})} - \text{Abs}_{(\text{branco})}}{\text{Abs}_{(\text{rutina})} - \text{Abs}_{(\text{branco})}} \times 100$$

A variância dos resultados obtidos foi avaliada pelo teste ANOVA e a diferença entre as médias verificada pelo teste (t) de Tukey, sendo que valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4.3.1.2 Avaliação da Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) é um radical livre e estável com o qual compostos vegetais que apresentam potencial atividade antioxidante interagem, permutando os elétrons ou átomos de hidrogênio para o radical livre reduzindo-o. É um método fácil, rápido e muito utilizado para a avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais.

Para a avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH, são preparadas cinco soluções metanólicas das amostras em diferentes concentrações, adiciona-se 2,5 mL e 1 mL de uma solução metanólica de DPPH (0,03 mmol/mL). Para cada amostra são utilizadas cinco soluções com concentrações diferentes, são preparados 2,5 mL da solução e 1 mL de metanol, também é realizado um controle com 2,5 mL de metanol e 1 mL de solução de DPPH.

O potencial de redução do radical DPPH pelas amostras é avaliado através da análise espectrofotométrica (MENSOR et al, 2001). Após trinta minutos de reação foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 518 nm, correspondente a absorção máxima do radical em estudo. Como padrões foram utilizados rutina e vitamina C. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão dos resultados obtidos nos experimentos e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste ANOVA para avaliação da variância e verificando a diferença entre as médias, o teste (t) de Tukey, sendo que valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

A capacidade dos extratos em reduzir o radical é calculada da seguinte forma, onde na fórmula, (Abs) corresponde ao valor da absorbância:

$$\% \text{ Inibição da oxidação do DPPH} = \frac{100 - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}})}{(\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{branco}})} \times 100$$

4.3.1.3 Teste com Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A avaliação de atividade antioxidante com espécies reativas do ácido tiobarbitúrico foi realizada pelo método proposto por MORAIS et al (2006) com adaptações.

Foram adicionados 0,1 mL dos extratos e frações secas na concentração de 70 µg/mL, 0,4 mL de H₂O, 0,5 mL de solução de gema de ovo a 5% (p/v) em solução de SDS 0,55% (dodecil sulfato de sódio), 50 µL de ABAP 0,035M (cloreto de 2,2'-azo-bis-2-amidinopropano), 1,5 mL de ácido acético 20% (pH 3,5) e 1,5 mL de uma solução de TBA 0,4% (ácido tiobarbitúrico) preparada em solução de SDS 0,55%, e como branco é utilizado o 1-butanol, e então levado a banho-maria a 95°C por 1 hora.

Após o resfriamento da solução foram adicionados 1,5 mL de 1-butanol, para extração da fase orgânica. Os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos e em seguida, foi lida a absorbância do sobrenadante a 532 nm. Como controle negativo é utilizada a mesma solução, sendo nesta a amostra substituída por 0,1 mL de etanol. O teste deve ser realizado em quintuplicata.

O cálculo das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico foram realizadas utilizando a seguinte fórmula onde Abs corresponde a absorbância:

$$\text{IA}\% = (1 - \text{Abs Amostra} / \text{Abs Controle Negativo}) \times 100$$

Assim como nos demais estudos de atividade antioxidantes, os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste ANOVA para a variância e o teste (t) de Tukey, sendo que valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos, para verificar a diferença entre os resultados.

4.3.2 Avaliação da Toxicidade

Dentro das atividades biológicas, o estudo da toxicidade dos extratos é fundamental para o direcionamento do trabalho e das possíveis aplicações dos compostos investigados na pesquisa fitoquímica de uma determinada espécie. A toxicidade dos extratos de caule de *Forsteronia velloziana* foi avaliada frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, através de testes de atividade hemolítica em sangue de carneiro e contra larvas do mosquito *Aedes aegypti*, vetor da dengue e da febre amarela.

4.3.2.1 Avaliação da Toxicidade Frente ao Microcrustáceo *Artemia salina*

A avaliação da toxicidade utilizando o micro crustáceo *Artemia salina* é realizada através de um método rápido, simples, por não haver a necessidade de um ambiente asséptico e de baixo custo, além de não requerer equipamentos sofisticados e utilizar amostras em pouca quantidade, o que atribui viabilidade e eficácia (MEYER et al, 1982; DALL'STELLA, 2008).

Os ovos de *Artemia salina* na concentração 0,5 mg/ mL foram incubados para a obtenção das larvas deste micro crustáceo, cujo habitat é em água salgada, para isso, o cultivo do invertebrado é efetuado em água do mar artificial, preparada pela adição de 38 g de sal marinho (23 g NaCl; 11 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 4 g Na_2SO_4 ; 1,3 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ou $CaCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,7 g KCl) em 1000 mL de água purificada.

O pH foi ajustado para 9,0, utilizando-se Na_2CO_3 , com a finalidade de reduzir variações durante a incubação. O pH ideal para o crescimento de *Artemia salina* deve ser superior a 6,0 e inferior a 10,5 (LEWAN et al, 1992).

A eclosão dos ovos do micro crustáceo, é estimulada através da sua incubação em água salgada por 48 horas, sob aeração contínua e exposição à luz diurna. A temperatura foi mantida entre 27 e 30°C e o pH entre 8,0 – 9,0. Na primeira hora do processo a iluminação (20W) é mantida sobre o recipiente.

As amostras foram preparadas em uma solução com concentração de 10 mg/mL (solução 1), através da diluição 1:10 em solvente compatível, que foi diluída até as concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL, em um volume final de 5 mL em solução salina, com a qual as larvas foram tratadas.

Como controle, foram utilizados o mesmo solvente no qual as amostras são diluídas e água do mar artificial. Como controle positivo foi utilizada uma solução de dicromato de potássio. Após o preparo dos tubos, estes foram mantidos em estufa a 50° C por 24 horas para evaporação completa do solvente.

Para cada tubo de ensaio contendo as amostras e os controles, são transferidas 30 larvas de *Artemia salina* e o volume ajustado com água do mar artificial para 2,5 mL, após 24 horas de contato com as amostras, foi realizada a contagem das larvas mortas e vivas.

Os dados foram submetidos à análise pelo método estatístico Probitos para a determinação dos valores de DL50 e 95% de intervalos de confiança. As frações foram consideradas tóxicas quando os valores de DL50 forem menores que 1000 µg/mL (MEYER et al, 1982).

4.3.2.2 Atividade Larvicida Contra *Aedes aegypti*

4.3.2.2.1 Avaliação da Toxicidade

O *Aedes aegypti*, um mosquito da família Culicidae, é o vetor que transmite as arboviroses responsáveis pela febre amarela, dengue e dengue hemorrágica, doenças consideradas um importante problema de saúde pública mundial.

Uma das principais estratégias para a diminuição a incidência dessas doenças consiste em reduzir as populações do mosquito e para isso o controle das larvas é uma das alternativas mais relevantes. Desta forma torna-se importante a

busca de substâncias de origem natural que efetuem esse controle, considerando que substâncias sintéticas podem gerar sérios problemas ambientais (GARCEZ et al, 2013).

A atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* de extratos e frações do caule de *Forsteronia velloziana* e do extrato bruto das folhas foi realizada segundo metodologia do World Health Organization (1981a) com algumas modificações.

Os ovos de *Aedes aegypti* da linhagem Rockefeller foram fornecidos pela Fundação Oswaldo Cruz - RJ; sendo utilizada como padrão de susceptibilidade a inseticida para a espécie *Aedes aegypti* (HARTBERG e CRAIG, 1970). Para a eclosão dos ovos, estes foram colocados em bandeja de plástico e adicionados 500 mL de água sem cloro, e em seguida levada para estufa BOD (marca Novatecnica modelo NT 704) com temperatura a 27 ± 2 °C e umidade relativa de $80 \pm 5\%$.

A dieta das larvas consistiu de ração de peixe (aldon basic, MEP 200 complex) do período de eclosão até o 3º estágio larval. Foram preparadas soluções de concentração de 1000 µg/mL dos extratos e frações, solubilizando as amostras com 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas com água sem cloro em concentrações distintas de 1000, 500 e 250 µg/mL.

Para a realização dos ensaios 15 larvas do 3º estágio foram colocadas em triplicatas em copo de plástico contendo as amostras e o volume foi completado para 5 mL. A solução aquosa de DMSO 0,5% foi utilizada também em triplicata como controle negativo.

O inseticida utilizado como controle positivo (que causa a mortalidade das larvas) foi o temefós grau técnico 90% (lote 005/2011) fabricado pelo laboratório "Fersol Mairinque", São Paulo, e feita a calibração segundo o protocolo recomendado pela Organização Mundial da Saúde descrito (WHO, 1981 a,b ; LIMA et al, 2003; BRAGA et al, 2004) utilizando como concentração diagnóstico (CD) 0,060 mg/mL (duas vezes a concentração letal que causa mortalidade de 99% de uma cepa susceptível, como definido pela WHO (1981 a,b).

A atividade larvicida foi avaliada após 24 horas por meio da contagem do número de larvas mortas em cada amostra. Larvas incapazes de atingir a superfície da água quando tocadas, foram consideradas como mortas (WHO,1981b). Os valores da concentração letal (DL50) em µg/mL foram determinados utilizando a análise de Probit, pelo método de Finney (FINNEY, 1971).

4.3.2.2.2 Avaliação na Morfologia Interna das Larvas

Larvas no 4^o estágio foram selecionadas para os ensaios, por apresentarem tecidos mais desenvolvidos. As larvas coletadas foram imediatamente fixadas em 2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído, 3% sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2, e armazenadas em temperatura ambiente até o momento das análises (ARRUDA et al, 2003). As lâminas contendo as larvas foram preparadas e fotografadas usando uma câmera de vídeo digital (Leica) conectado a um microscópio invertido Zeis (500 µm).

4.3.2.2.3 Preparo do homogeneizado de larvas de *A. aegypti* tratadas com os extratos e frações

Homogeneizados das larvas de *A. aegypti* tratadas com o extrato bruto das folhas (BRF) e frações hexano e acetato de etila das cascas, durante 6 horas foram preparadas de acordo com MACEDO e colaboradores (1993) com modificações. As larvas foram homogeneizadas manualmente em gral de porcelana em 1,0 mL de tampão Tris/HCl em 0,05 M (pH 8,0) e centrifugadas a 17.000 rpm durante 20 minutos a 4^o C, e os sobrenadantes foram recolhidos, sendo adicionados mais 1,0 mL de tampão Tris/HCl. O extrato bruto das folhas e frações hexânica e acetato de etila das cascas foram selecionados para estes ensaios por apresentarem alta mortalidade das larvas.

4.3.2.2.4 Determinação do Teor de Tripsina e Quimiotripsina

A atividade total de tripsina foi determinada utilizando o reagente BAPNA (N-benzoil-D, L-arginina-p-nitroanilida) como substrato. Cerca de 500 µL do homogeneizado de larvas foi adicionado a 1 mL de BAPNA e deixados em repouso por 20 minutos a 37 °C, em seguida a reação foi parada pela adição de ácido acético

a 30% (v/v). A atividade da tripsina foi mensurada em leitor de microplacas a 410 nm (ϵ , 10.0 mM⁻¹ cm⁻¹) conforme SILVA e colaboradores (2009).

A atividade da quimiotripsina foi determinada usando SAAP (N-succinil-Ala-Ala-PRO-PHE-p Nitranilida) como substrato. Cerca de 50 μ l dos homogeneizados foram incubadas em 450 μ L de tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0) durante 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 1,0 mL de substrato SAAP 2 Mm, dissolvidos em DMSO puro (dimetilsulfóxido). A mistura de reação foi incubada a 37 °C durante 20 minutos, e em seguida a reação foi finalizada pela adição de ácido acético 30% (v/v). A absorbância foi lida a 405 nm (ϵ , 8,8 mM⁻¹ cm⁻¹) (SILVA et al, 2009).

4.3.2.3 Avaliação da Atividade Hemolítica

Para o ensaio de atividade hemolítica in vitro foi utilizada a técnica proposta BERENJEE, 2008 adaptada por HENNENBERG (2013). Para esta avaliação foi preparada uma solução de sangue de carneiro a 10% em PBS (tampão fosfato), para isso, 2 mL de sangue de carneiro (Newprov®) previamente homogeneizado, lavado com tampão fosfato gelado e centrifugado três vezes á 3000 rpm por 5 minutos para a remoção de resíduos de hemólise.

Á tubos contendo 200 μ l da solução de eritrócitos homogeneizados foram adicionados o mesmo volume de amostras preparadas através da suspensão do extrato bruto e das frações com a solução tampão fosfato, nas concentrações: 100, 200, 500 e 1000 μ g/mL. Para a realização dos controles as amostras foram substituídas por PBS para um controle negativo e por água destilada para o controle positivo respectivamente. Todos os tubos foram preparados em triplicatas.

Após o preparo dos tubos, estes foram cuidadosamente agitados e mantidos em repouso por 3 horas, em estufa com temperatura controlada á 37°C. Após o tempo de incubação, foram centrifugados por 5 minutos, a 3000 rpm.

Os sobrenadantes foram observados para verificação da ocorrência ou não da formação de hemólise total (solução límpida, vermelha e sem depósito de eritrócitos).

Para a quantificação da hemólise, os sobrenadantes foram transferidos para uma placa de ELISA, e a absorbância lida em 540 nm. A hemólise foi calculada com

base nos valores de absorvância do tubo de hemólise total, cujo valor é considerado 100%. Os valores obtidos foram submetidos aos testes estatísticos de variância avaliada pelo teste ANOVA e a diferença entre as médias pelo teste (t) de Tukey, sendo que valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. A taxa de hemólise foi calculada da seguinte forma:

$$\text{Hemólise (\%)} = \frac{\text{Abs}_{(\text{teste})} - \text{Abs}_{(\text{branco})} - \text{Abs}_{(\text{PBS})}}{\text{Abs}_{(\text{H}_2\text{O})} - \text{Abs}_{(\text{PBS})} - \text{Abs}_{(\text{branco})}} \times 100$$

4.3.3 Análise da Atividade Antimicrobiana

Para a avaliação da potencial atividade antimicrobiana do extrato bruto e frações de *F. velloziana* foi empregada a metodologia de difusão em ágar, adaptada de ROMEIRO (2001), para encontrar a ação inibitória do desenvolvimento de cepas de *Agrobacterium tumefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella thyphimuriu*, *Escherichia coli* (bactérias) e *Candida albicans* (fungos).

4.3.3.1 Preparo das Amostras

As amostras foram diluídas em metanol e sonicadas até a completa solubilização. Em placas de petri estérís, foram distribuídos os discos de papel identificados, dentro do fluxo laminar foram aplicados nos discos 10 μL da solução para se obter a concentração de 1000 μg por disco.

Prepararam-se também discos controles apenas com metanol, utilizados na dissolução dos extratos e discos comerciais contendo cloranfenicol (50 μg) para o controle das cepas bacterianas e cetoconazol para a cepa de *Candida albicans*. As placas foram deixadas abertas para secagem das amostras impregnadas.

4.3.3.2 Meio de Cultura

Os meios de cultura ágar Mueller-Hinton e Saboraud foram preparados de acordo com o procedimento do fabricante, esterilizados e colocado nas placas de petri esterilizadas. Estes foram escolhidos por serem meios não enriquecido, porém suficientemente nutritivo para permitir o desenvolvimento das colônias bacterianas, é o mais utilizado para testes de bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas.

4.3.3.3 Preparo do Inóculo e Teste

Foram utilizadas cepas de *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend, 1907) Conn1942, donor: R. E. Stall from: 1994, EUA (=1050 LBA), sendo de número 11095 da coleção do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) gentilmente cedida pelo pesquisador, Dr. Rui Pereira Leite Júnior, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella thyphimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), as quais foram repicadas em caldo tríptico de soja e incubadas à 35°C, 24 horas antes do teste.

As culturas jovens de cada bactéria foram diluídas em 5 mL de salina estéril comparando-se com a turbidez do tubo número 0,5 da escala de Mac Farland (0,5 mL de cloreto de bário a 1% em 9,5 mL de ácido sulfúrico a 1%) a fim de se obter a concentração de um milhão e quinhentos mil bactérias por mL. Realizou-se a inoculação com auxílio de swab estéril e dentro de câmara de fluxo laminar.

Em cada placa inoculada foram distribuídos cinco discos de papel impregnados, três discos de cada amostra (1000 µg), além de um disco impregnado apenas com o solvente e um disco de controle positivo com cloranfenicol (30 µg). Incubaram-se as placas inoculadas em estufa a 35°C, durante 24 horas. Após este período, retirou-se as placas da estufa e então avaliada a formação de halos de inibição.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

O estudo alelopático procura determinar o efeito de uma planta doadora sobre uma planta receptora, ou seja, o efeito de um indivíduo sobre outro prejudicando ou favorecendo seu desenvolvimento (MALHEIROS e PERES, 2001). Compostos de origem natural com atividade alelopática surgem como uma alternativa ao uso de herbicidas sintéticos que podem ser nocivos não somente ao consumidor de um produto como também para o meio ambiente. Considerados estes problemas, faz-se necessária a avaliação da alelopatia exercida pelo extrato e frações de *F. velloziana*.

4.4.1 Preparo do Teste

A potencial atividade alelopática dos extratos e frações de *Forsteronia velloziana* foi avaliada pela metodologia estabelecida pelo Ministério da Agricultura (BRASIL,1992), sendo o efeito considerado sobre a espécie *Lactuca sativa* L., espécie amplamente utilizada para este tipo de avaliação (DIAS, 2005).

Para os bioensaios, uma solução-estoque na concentração de 1000 mg L⁻¹ em água foi preparada com o extrato e frações dissolvidos em DMSO (Dimetilsulfóxido) a 0,1%, e tamponadas com solução de MES (ácido 2 morfolinoetanosulfônico) 10 mM, e o pH foi ajustado para 6,0 com solução de KOH 0,1 N.

Um procedimento similar foi utilizado como controle, porém com ausência dos extratos e frações. Para a realização do teste de germinação, placas de petri (9,0 cm de diâmetro) contendo papel filtro Whatman n° 1,0, foram autoclavadas e receberam 5,0 mL da solução dos tratamentos preparadas nas concentrações de 250, 500 e 1,000 mg L⁻¹. Em seguida, semearam-se sobre cada disco de papel filtro, 50 sementes de *Lactuca sativa* L. distribuídos aleatoriamente, com quatro repetições para cada solução (BRASIL, 1992).

O material preparado e os controles foram colocados em germinador Mangelsdorf (Biomatic), com limites de temperatura entre 17 e 20°C. Para cada concentração prepararam-se duas caixas, uma para o estudo da germinação e outra para o estudo do crescimento.

4.4.2 Teste de Germinação

Durante a germinação fez-se leituras diárias por cinco dias, no mesmo horário. As sementes que germinaram foram retiradas da caixa diariamente. As sementes foram consideradas germinadas quando se tornou visível a protrusão da radícula através do tegumento.

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado para cada repetição de cada tratamento. Este índice é calculado utilizando-se a quantidade de sementes germinadas, dividindo-se pelo dia da germinação e somando-se até o último dia de germinação. As médias dos índices de velocidade de germinação tiveram a variância avaliada pelo teste ANOVA e verificando a diferença entre as médias pelo teste (t) de Tukey, sendo que valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4.4.3 Teste de Crescimento

A leitura do crescimento foi realizada com o material que foi mantido no germinador por 5 dias, os quais foram abertos somente no dia da leitura, último dia do teste. Para cada semente mediu-se, com auxílio de papel milimetrado, o tamanho da radícula, que posteriormente origina a raiz, e do hipocótilo, que origina o caule. Os resultados foram submetidos às mesmas análises estatísticas utilizadas para o teste de germinação. Todos os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão, a avaliação da variância foi realizada utilizando o teste ANOVA e a verificação da diferença entre as médias pelo teste (t) de Tukey, sendo que valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MATERIAL VEGETAL

5.1.1 Coleta, identificação e exsicata

Foram realizadas duas coletas, nos meses de março e maio do ano de 2012, na segunda coleta a planta apresentava frutos bem desenvolvidos, já deiscentes, o que possibilitou o depósito de uma exsicata no Museu Botânico Municipal de Curitiba, sob o número de registro 353907.

Na primeira coleta foram obtidos 4,58 kg de caule e 123 g de folhas, sendo o caule integralmente utilizado para a produção do extrato bruto etanólico e as folhas reservadas. A segunda coleta permitiu a obtenção de 172 g de folhas que somados às folhas da primeira coleta totalizaram 395 g de material vegetal. A massa de caule obtida foi de 2,34 kg, que foram reservados em função da necessidade de novas extrações.

As folhas de *Forsteronia velloziana* foram coletadas em quantidade insuficiente para a realização de todos os estudos propostos, mas considerado o especial interesse nos alcaloides presentes nesta estrutura vegetal, foi realizada uma extração etanólica em aparelho de Soxhlet para o uso em algumas das atividades biológicas e caracterização química.

5.1.2 Análises Físico- Químicas

5.1.2.1 Umidade

O teor de umidade encontrado nas amostras de caule de *Forsteronia velloziana* está expresso na média \pm DPR em porcentagem da massa de vegetal

perdida ao longo da dessecação. Os valores obtidos estão expressos na TABELA 3, em apresentam o valor de p pelo teste (t) de Tukey, inferior a 0,05.

TABELA 3. Teor de umidade do caule de *F. velloziana*. A tabela mostra os valores obtidos nas pesagens das amostras, o valor calculado de perda e a perda em porcentagem, sua média e o desvio padrão da amostra, que apresentam estatisticamente $p > 0,05$.

Amostra (g)	Perda (g)	Perda (%)
1,0437	0,0874	8,37%
1,0197	0,0817	8,01%
1,0142	0,0822	8,11%
1,0135	0,0789	7,78%
1,0259	0,0824	8,03%
1,0090	0,0819	8,11%
1,0020	0,0813	8,11%
Média \pm DPR = 8,07% \pm 2,169%		

O valor médio encontrado de 8,07% \pm 2,169% encontra-se de acordo com valores apontados para caules de plantas medicinais segundo a quinta edição da Farmacopeia Brasileira e torna-se a princípio, um padrão para o desenvolvimento de um controle da qualidade da matéria prima vegetal.

5.1.1.2 Teor de Cinzas

O teor de cinzas quantifica os compostos inorgânicos em um vegetal e é um importante parâmetro de controle de qualidade, tendo como finalidade detectar possíveis adulterações de matéria prima. Esta avaliação apontou para um teor de cinzas médio de 4,35% \pm 1,121% nas amostras coletadas de *Forsteronia velloziana*, este valor poderá ser utilizado como referência para futuros testes, este valor encontra-se em conformidade com os valores apontados pela Farmacopeia Brasileira para caules com uso medicinal.

Os valores obtidos apresentam, e encontram-se na TABELA 4.

TABELA 4. Teor de cinzas totais do caule de *F. velloziana*. A tabela mostra os valores obtidos nas pesagens das amostras, o valor da massa vegetal seca, das cinzas totais em gramas e em porcentagem, sua média e o desvio padrão da amostra.

Amostra (g)	Seco (g)	Cinzas (g)	Cinzas (%)
1,0437	0,9563	0,0393	4,11%
1,0197	0,9380	0,0382	4,07%
1,0142	0,9321	0,0403	4,32%
1,0135	0,9342	0,0447	4,78%
1,0259	0,9430	0,0406	4,30%
1,009	0,9271	0,0435	4,69%
1,002	0,9207	0,0386	4,19%
Média ± DPR = 4,35% ± 1,121%			

5.2 ENSAIO SISTEMÁTICO EM FITOQUÍMICA

5.2.1 Pesquisa de metabólitos solúveis em etanol

Os resultados dos ensaios realizados com os extratos etanólicos de caule e folhas de *Forsteronia velloziana* encontram-se na TABELA 5.

A prospecção fitoquímica corroborou com os estudos que apontam para a presença de alcaloides como marcadores químicos para a família Apocynaceae (RIZZINI e MORS 1976; MOURA e AGRA, 1989; SENBLAD et al, 1998). O resultado, não só para alcaloides como também para os demais compostos indicados pelos ensaios, são fundamentais para um direcionamento na execução nas demais etapas do trabalho, tanto na perspectiva fitoquímica quanto para pautar os ensaios biológicos e toxicológicos subsequentes.

Leucoantocianidinas, heterosídeos flavônicos e antociânicos são compostos polifenólicos biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e do acetato, os mesmos precursores de substâncias como aminoácidos alifáticos, que são precursores de alcaloides, ácidos graxos, e terpenoides, também encontrados no screening fitoquímico (DORNAS, et al 2008 apud MANN, 1987)

TABELA 5. Resultado da análise sistemática fitoquímica do extrato etanólico de caule e folhas particionados de *Forsteronia velloziana*.

Metabólito/ Teste	Frações							
	HeF	HeC	DF	DC	AF	AC	HAF	HAC
Alcaloide (Dragendorff)	(++)	(+)	(++)	(++)	(-)	(-)	(+)	(-)
Alcaloide (Bouchardt)	(+)	(-)	(++)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
Alcaloide (Mayer)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
Leucoantocianidina	(-)	(-)	(-)	(-)	(+/-)	(+/-)	(+)	(+)
Cumarina	(-)	(-)	(-)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)
Heterosídeo Flavônico	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)*	(-)	(+)**	(-)
Heterosídeo Flavônico (Pacheco)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
Heterosídeo Flavônico(Zn em HCl)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Iridóides (Floroglucinol)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Iridóides (Ácido Sulfúrico)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Iridóides (Vanilina)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Heterosídeo Antraquinônico	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Esteroides/Triterpenos	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

As legendas para as frações do extrato são HeF (fração hexano de folha), HeC (fração hexano de caule), DF(fração diclorometano de folha), DC(fração diclorometano de caule), AF (fração acetato de folha), AC (fração acetato de caule), HAF (fração hidro alcóolica de folha) e HAC (fração hidroalcoólica de caule). Os resultados são expressos em (-) negativo, (+/-) levemente positivo, (+) positivo e (++) muito positivo. No teste para heterosídeos flavônicos, o resultado (-) aponta para a presença de chalconas, auronas, isoflavonas, flavononas e isoflavononas; (+)* derivados antocianicos e (+)** flavonas.

Os compostos fenólicos encontrados no estudo preliminar, bem como alguns grupos de terpenos apresentam importante atividade na captura de radicais livres o que torna o extrato e frações desta planta potencialmente antioxidantes (DORNAS et al, 2008; YOSHIDA e NIKI, 2003).

O resultado negativo para a presença de antraquinonas já era aguardado, considerando a presença de alcaloides na planta, isso porque as quinonas sintetizadas em plantas superiores apresentam os mesmos precursores que são destinados a rotas metabólicas completamente distintas. O ácido chiquímico que dá origem aos alcaloides pelas vias do triptofano e da fenilalanina/tirosina e o acetil-CoA, que dá origem aos alcaloides originários da ornitina e da lisina através do clico do ácido cítrico são os mesmos precursores das antraquinonas, o direcionamento metabólico para a síntese de um determinado grupo de compostos faz com que ambos os grupos não coexistam em um mesmo vegetal (SANTOS, 2007).

Além de alcaloides, foram detectadas também a presença de cumarinas e iridóides, classes de metabólitos secundários também interessantes do ponto de vista farmacológico.

5.2.2 Pesquisa de metabólitos solúveis em água

Os grupos de metabólitos secundários solúveis em água detectados no ensaio encontram-se na TABELA 6.

É importante considerar o resultado positivo para heterosídeos saponínicos ou saponinas, o que é um forte indicativo de atividade hemolítica, o que será avaliado juntamente às demais atividades biológicas.

A ausência de resultados positivos nos testes para taninos, compostos geralmente presentes nas cascas, pode ser analisado considerando a equivalência entre casca e córtex no caule do vegetal (SANTOS e MELLO, 2007) Sendo baixa a concentração destes taninos, o teste, que se baseando em precipitação, não teria sensibilidade suficiente para indicar o composto; o que também justificaria o resultado negativo para a presença destes, é o complexo insolúvel formado entre eles e os alcaloides o que inibiria a sua ligação com a gelatina e outras proteínas, bem como com o cloreto férrico e o sulfato de amônia (SANTOS e MELLO, 2007).

TABELA 6. Resultado da análise sistemática fitoquímica para compostos solúveis em água do caule de *Forsteronia velloziana*. Resultados positivos são indicados por (+) e negativos por (-).

Extrato Aquoso (Caule)	
Metabólito	Resultado
Heterosídeos Antocianicos	(-)
Heterosídeos Saponínicos	(+)
Heterosídeos Cianogenéticos	(-)
Taninos (Cloreto Férrico)	(-)
Taninos (Gelatina)	(-)
Taninos (Sulfato Amoniacal)	(-)
Aminogrupos	(+)
Ácidos Fixos	(+)
Ácidos Voláteis	(+)

A ausência de heterosídeos antociânicos já era esperada, pelo fato de que estes compostos oriundos da mesma rota metabólica dos flavonoides (ZUANAZZI e MONTANHA, 2007; LOPES et al, 2007) são encontrados prioritariamente nas flores, frutos e em algumas folhas, sendo os principais responsáveis por inúmeras tonalidades de cores (LOPES et al 2007 apud BOBBIO e BOBBIO, 1995; MAZZA e MINIATI, 1993) como também por aspectos importantes da biologia vegetal como a, proteção contra à ação da luz e á oxidação, mecanismo de defesa e vários mecanismos reprodutores das plantas, tais como a polinização e a dispersão de sementes (LOPES et al, 2007), portanto praticamente não são encontrados em caules.

Ácidos fixos, ácidos voláteis e aminogrupos são grupamentos metabólicos pertencentes diversos vegetais, destacando-se o fato de que aminogrupos são precursores na rota metabólica dos alcaloides (HENRIQUES et al, 2004).

6.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA

6.3.1 Determinação do teor de sólidos do extrato bruto e frações

A partir do caule coletado foram obtidos 4,5 L de extrato etanólico bruto, com rendimento total médio de 34,8 g/kg \pm 0,8 de material vegetal, o que corresponde a 3,48% da massa seca inicial.

As frações obtidas pelo particionamento líquido-líquido, com solventes de polaridade crescente tiveram o rendimento de 0,37% para a fração hexano, 0,29% para a fração clorofórmio, 0,11% para a fração acetato de etila e 2,7% para a fração hidro alcóolica, em relação á planta seca.

6.3.2 Purificação das frações e elucidação estrutural

Foram isolados quatro compostos, os quais foram nomeados J1, J2, J3 e J4, todos foram submetidos á análise por RMN de ^1H (400 MHz em CDCl_3), sendo as amostras J1 e J2 puras, estas foram submetidas á análise por RMN de ^{13}C (400 MHz em CDCl_3).

A identificação desta amostra foi realizada baseada nos dados espectrais e comparação com a literatura, sendo identificada a substância β -sitosterol (FIGURA 9). O espectro RMN de ^1H (200 MHz em CDCl_3) da amostra J1 está demonstrado na FIGURA 10, sinais intensos entre 0,5 e 1,4 ppm, sugerindo um esqueleto esteroidal.

Os singletes, em 0,68 ppm e 0,93 ppm referem-se aos hidrogênios dos grupos metila dos carbonos 18 e 19, respectivamente. Por outro lado, os grupamentos metila dos carbonos 26, 27, 21 e 29 estão representados pelos sinais 0,85, 0,91, 1,01 e 0,83 ppm, respectivamente. O singlete centrado em 3,52 ppm, refere-se ao hidrogênio do carbono 3. O espectro de RMN ^{13}C da amostra J1 está ilustrado na FIGURA 11, e sugere uma estrutura com um esqueleto carbônico bastante extenso.

Os deslocamentos encontrados para ^{13}C estão demonstrados na TABELA 7. Os valores obtidos são similares aos encontrados por DE-EKNAMKUL E

POTDUANG (2003) e DALL' STELLA (2008) respectivamente nas espécies *Croton sublyratus* e *Dorstenia multiformis* (FIGURA 11).

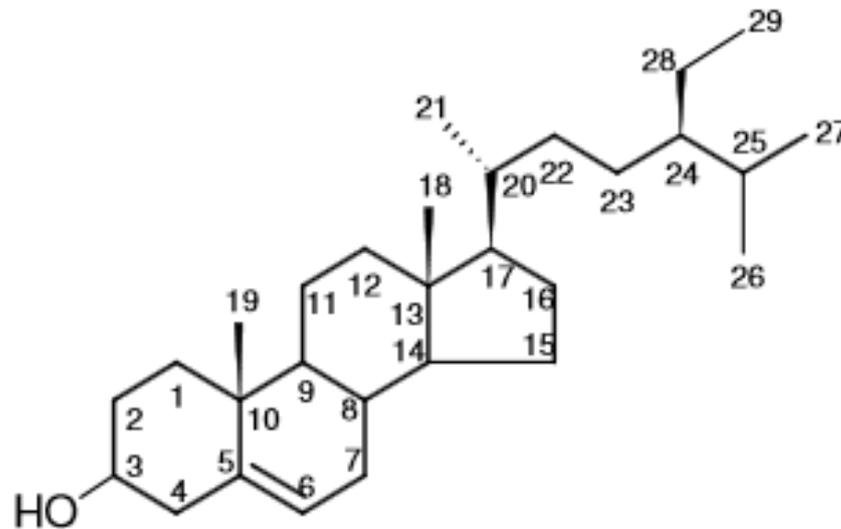


FIGURA 10. ESTRUTURA QUÍMICA DO β -SITOSTEROL (DALL' STELLA, 2008).

As amostras J3 e J4 apresentaram o mesmos sinais dos espectros de RMN de ^1H , com um grande número de sinais entre 0,5 e 1,4 ppm, indicativo de esqueleto terpênico, porém a amostra estava misturada não sendo possível a confirmação da estrutura devido aos sinais sobrepostos, porém é possível sugerir que a amostra contenha em conjunto com o β -sitosterol e estigmasterol, que segundo a literatura são substâncias que geralmente são encontradas como mistura e são diferenciadas apenas pelos carbonos 22 e 23. No estigmasterol, há uma dupla ligação, evidenciada pelos sinais em 138, 31 ppm (C22) e 129, 25 (C23) (DE-EKNAMKUL e POTDUANG, 2003). Nas amostras J1 e J2 não foram visualizados estes sinais, indicando a presença apenas do β -sitosterol.

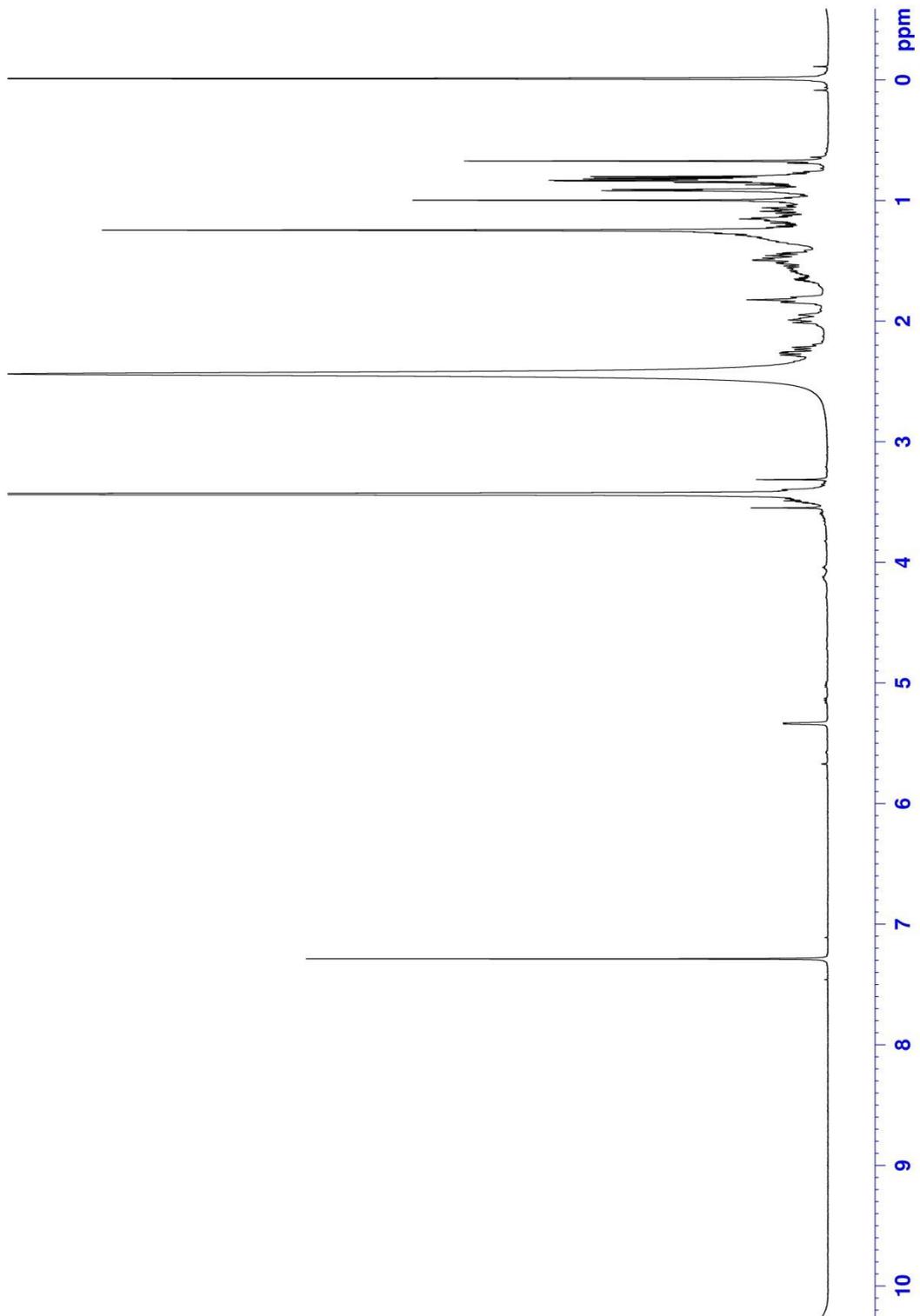


FIGURA 11. ESPECTRO DE RMN DE ¹H (400 MHz EM CDCL₃) DA AMOSTRA J1 OBTIDA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DO EXTRATO DE *Forsteronia vellosiana*.

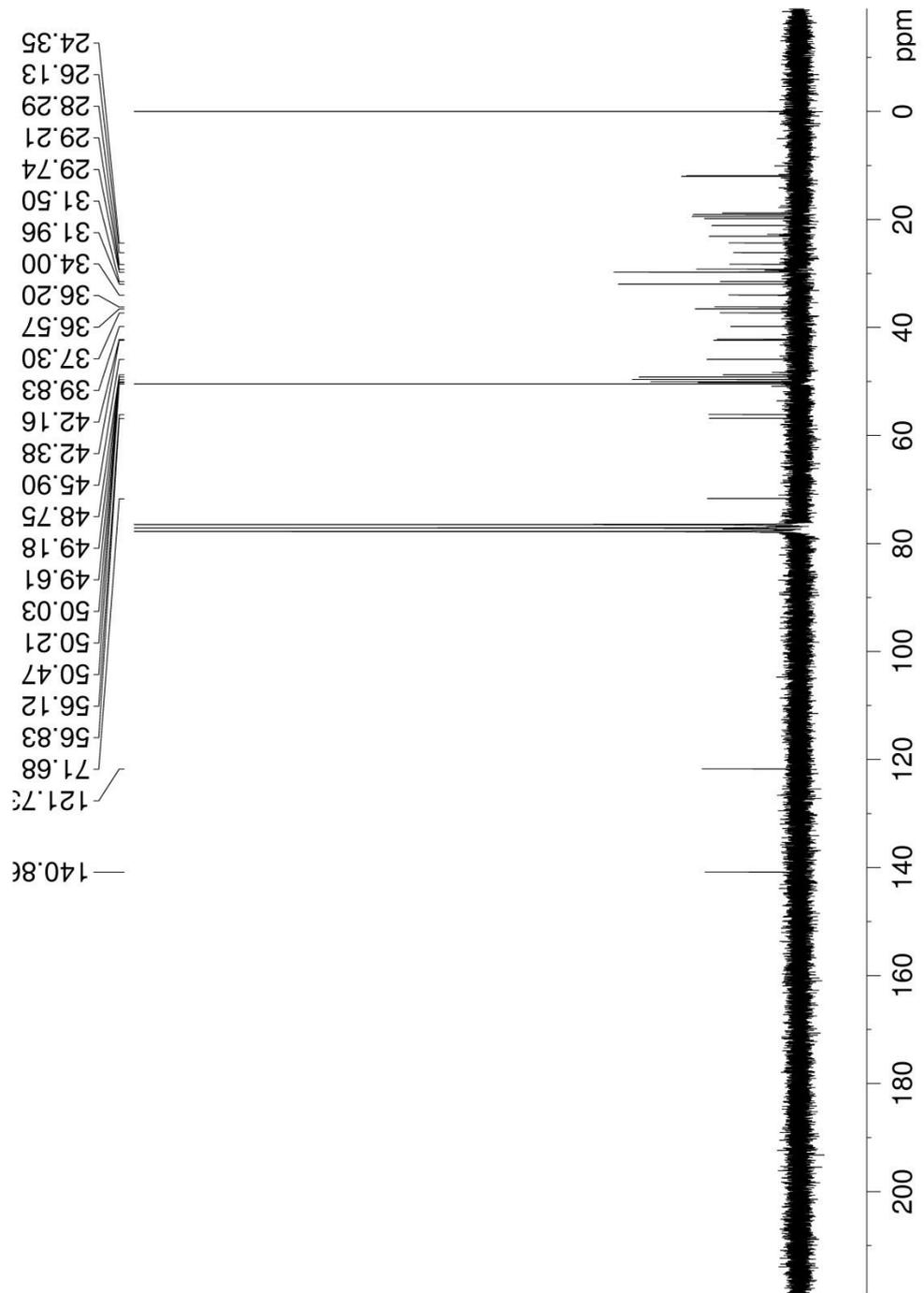


FIGURA 12. ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (400 MHz EM CDCl_3) DA AMOSTRA J1 OBTIDA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DO EXTRATO DE *Forsteronia velloziana*.

TABELA 7. Sinais apresentados nos espectros de RMN de ^{13}C (400 MHz em CDCl_3) da amostra J1, e de β -sitosterol obtidos por DE-EKNAMKUL E POTDUANG (2003) e DALL' STELLA (2008), obtidos de *Croton sublyratus* e *Dorstenia multiformis* respectivamente.

C	TIPO	AMOSTRA J1	DE-EKNAMKUL E	DALL' STELLA
			POTDUANG (2003)	(2008)
1	CH ₂	37.30	37.22	37.26
2	CH ₂	31.59	31.63	31.68
3	CH	71.88	71.80	71.81
4	CH ₂	42.15	42.19	42.21
5	C	140.76	140.72	140.75
6	CH	121.77	121.71	121.71
7	CH ₂	31.93	31.87	31.92
8	CH	31.5	31.87	31.92
9	CH	50.11	50.10	50.14
10	C	36.56	36.48	36.51
11	CH ₂	21.10	21.07	21.09
12	CH ₂	39,81	39.74	39.78
13	C	42.37	42.26	42.32
14	CH	56.80	56.73	56.78
15	CH ₂	24.34	24.29	24.31
16	CH ₂	28.29	28.22	28.26
17	CH	56.11	56.02	56.06
18	CH ₃	11.89	11.84	11.87
19	CH ₃	19.41	19.39	19.40
20	CH	36.19	36.12	36.15
21	CH ₃	11.81	18.76	18.79
22	CH ₂	34.00	33.91	33.95
23	CH ₂	26.12	26.02	26.08
24	CH	45.90	45.81	45.84
25	CH	29.19	29.11	29.15
26	CH ₃	19.84	19.80	19.83
27	CH ₃	19.05	19.01	19.04
28	CH ₂	23.11	23.04	23.07
29	CH ₃	12	11.97	11.99

6.4 ANÁLISE DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

6.4.1 Avaliação da toxicidade

6.4.1.1 Avaliação da toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*

O resultado do ensaio de toxicidade do extrato bruto e frações de *F. velloziana* frente ao microcrustáceo *Artemia salina* está apresentado na TABELA 8.

TABELA 8. Resultado do estudo de toxicidade pelo extrato alcoólico bruto do caule (BR), e das frações hexano (HX), clorofórmio (CL), acetato de etila (AC) ao solvente metanol e ao controle sulfato de quinidina sobre *Artemia salina*.

Amostra	Mortalidade/ Concentração			DL ₅₀ (µg/mL)	Intervalo de Confiança de 95%
	10 (µg/mL)	100 (µg/mL)	1000 (µg/mL)		
BR	0	0	0	> 1000	—
HX	0	0	0	> 1000	—
CL	0	0	0	> 1000	—
AC	0	0	0	> 1000	—
HA	0	0	0	> 1000	—
ETANOL	1	0	0	> 1000	—
SULFATO QUINIDINA	3	10	18	50,12	35,80-70,16

Considerando a possibilidade de que os extratos desta planta apresentar outras atividades biológicas e farmacológicas interessantes torna-se importante o caráter não tóxico deste vegetal como um indicativo favorável á sua utilização.

O resultado corrobora com os dados de toxicidade frente à *Artemia salina* realizado com a espécie *Forsteronia laurifolia* (Benth.) A. DC, por JIMENEZ e colaboradores (2001), onde o extrato do caule e suas frações não demonstraram toxicidade ao micro crustáceo em nenhuma das doses testadas, porém as folhas se mostraram significativamente tóxicas, até mesmo nas mais baixas doses testadas (50 µg/mL).

Outros estudos toxicológicos deverão ser realizados ainda, pelo fato deste teste ser aplicado especificamente a toxicidade ambiental (PIMENTEL et al, 2010) embora alguns autores correlacionem a atividade biológica de extratos contra a *Artemia salina* como indicativo de atividade antitumoral (ANDERSON et al, 1991; ARCANJO et al, 2012).

O resultado apresentado neste teste torna a não toxicidade da planta bastante interessante se foram consideradas as atividades alelopática e tóxica ao *Aedes aegypti*, que colocariam o extrato e substâncias obtidas a partir desta planta diretamente em contato com o meio ambiente, o que gera uma preocupação tanto em relação ao ser humano, quanto em relação os demais organismos presentes no ambiente onde esta será aplicado, tanto para o controle de pragas no meio agrícola, quanto no controle do vetor da dengue e da febre amarela.

Para PIMENTEL e colaboradores (2010) as atividades humanas, bem como o desenvolvimento de novas tecnologias que facilitam a execução destas precisam ser monitoradas de forma efetiva para que sejam evitados impactos negativos ao ambiente.

Nas linhas de pesquisa em produtos naturais, tem ficado cada vez mais evidente que análises químicas isoladas não são suficientes para se alcançar boas avaliações de risco em amostras ambientais, pois estas não informam a fração de contaminantes disponível para organismos vivos nem o potencial efeito deles quando misturados (AIT-AISSA et al, 2003) e para que seja obtido um retrato confiável do impacto gerado, são necessárias caracterizações ecotoxicológicas avaliadas em conjunto com as análises químicas (SVENSSON et al, 2005), o que faz dos entre as metodologias de monitoramento ambiental utilizando microcrustáceos facilmente aplicáveis, e esta linha de os estudos torna-se importante.

O teste realizado com a *Artemia salina* é muito utilizado, justamente por fornecer dados relevantes em relação ao impacto de extratos ou substâncias sobre a

biota, sendo uma metodologia simples, que demanda um baixo custo e é flexível á estruturas físicas de laboratórios de estudo fitoquímico (LUHLLIER et al, 2006)

A indicação da presença de grupos de metabólitos secundários que abrangem um grande número de substâncias potencialmente tóxicas como algumas cumarinas, saponinas e alcaloides, pela análise sistemática fitoquímica, faz necessária a avaliação do extrato e frações por parâmetros que indiquem sua ação sobre sistemas fisiológicos animais, sendo a metodologia escolhida para este trabalho o teste de atividade hemolítica *in vitro*, outro método simples, mas fornecedor de um panorama bastante claro para o desenvolvimento de estudos posteriores.

6.4.1.2 Avaliação da atividade hemolítica

As porcentagens de hemólise em tubo foram obtidas através da relação entre a média das absorbâncias dos tubos contendo extrato, dos brancos contendo PBS e da sua relação com o tubo total, o resultado do teste foi negativo para todas as frações em todas as concentrações, nestes tubos formou-se durante a centrifugação, um pellet bem definido, e o sobrenadante permaneceu com um aspecto límpido e incolor, tal qual o PBS utilizado no teste. No tubo de teste utilizado como comparativo, formou-se uma solução vermelha opaca e homogênea.

Os resultados obtidos através da absorbância são expressos na TABELA 9.

TABELA 9. Atividade hemolítica do extrato bruto e frações de *Forsteronia velloziana*, expresso pela média da porcentagem \pm DPR.

Amostra ($\mu\text{g/mL}$)	Hexano		Clorofórmio		Acetato		Hidro alcólico		Bruto	
	Média (%)	DPR(%)	Média (%)	DPR(%)	Média (%)	DPR(%)	Média (%)	DPR(%)	Média (%)	DPR(%)
1000	2,4	2,57	8,32	1,86	1,66	0,0259	-1,99	0,0091	1,46	0,0186
500	1,96	7,17	3,74	2,38	-0,81	0,0233	-1,75	0,0155	0,6	0,0159
200	-1	9,72	0,51	10,35	-0,84	0,0180	2,32	0,0062	2,51	0,0115
100	2,09	7,45	3,92	2,42	2,11	0,0161	2,4	0,0176	2,9	0,0025

O resultado obtido neste ensaio pode parecer controverso, considerada a prospecção fitoquímica realizada, que apontou a presença de alcaloides e saponinas, metabólitos conhecidos respectivamente pela sua toxicidade e capacidade hemolítica.

Pode-se justificar a ausência de atividade hemolítica apesar da presença destes grupos de compostos como um indicativo de que os alcaloides presentes no caule apresentam baixa toxicidade.

Quanto às saponinas, entre as diversas atividades biológicas relatadas para este grupo de substâncias, merecem destaque aquelas relacionadas ao aumento da resposta imune e a ruptura das membranas dos eritrócitos (KAISER et al, 2010), estas interagem fortemente com os lipídeos constituintes das membranas celulares (ALBERTS et al, 2006), por serem característica estruturalmente glicosídeos de esteroides ou de terpenos policíclicos, moléculas de caráter anfipático, apresentando uma porção da molécula lipofílica e outra hidrofílica, o que confere a estas substâncias a propriedade tensoativa (SCHENKEL et al, 2007).

Sendo essas detectadas na prospecção fitoquímica através da observação da formação de espuma persistente em tubos, era presumível uma capacidade hemolítica, principalmente nas frações menos polares testadas, considerando que as saponinas apresentam geralmente alta massa molecular, a não ocorrência de atividade hemolítica poderia explicar a ausência desta atividade pela existência de classes destas substâncias que não ocasionam tal dano aos eritrócitos, chamadas saponinas não hemolíticas (SUN e PAN, 2006; FLECK et al, 2006).

Porém se correlacionado o resultado do estudo de hemólise ao resultado obtido no estudo de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* é possível concluir que a presença de saponinas é negativa, embora o resultado apresentado na análise sistemática fitoquímica tenha demonstrado o contrário.

Deve-se considerar que crustáceos são invertebrados predominantemente aquáticos, estes respiram através de brânquias, estruturas responsáveis por retirar o oxigênio difuso na água (RUPPERT, FOX e BARNES, 2006) e as saponinas interferem diretamente sobre a redução da tensão superficial da água, não permitindo assim sua oxigenação (SCHENKEL et al, 2007), o que levaria a uma alta mortalidade dos animais, logo o que podemos supor é que tal resultado seja

decorrente da presença de outros compostos de caráter tensoativo, como açúcares, terpenos e até mesmo as cumarinas, que gerariam o efeito de espuma persistente.

Dados os resultados, ainda se faz necessária a realização de ensaios de toxicidade mais específicos e acurados, considerando que estudos de toxicidade in vivo foram realizados e apontaram para a toxicidade dos caules de *F. floribunda* em camundongos e porcos (WORTHLEY e SCHOTT, 1967).

6.4.1.3 Avaliação da atividade tóxica sobre larvas de *Aedes aegypti*

6.4.1.3.1 Toxicidade do extrato e frações

A análise dos resultados de toxicidade sobre as larvas de *Aedes aegypti* demonstrou uma significativa toxicidade da fração hexano do caule, com a DL50 de 107,039 µg/mL e do extrato bruto das folhas com a DL50 de 428,73 µg/mL. As demais frações não apresentaram toxicidade expressiva sendo a DL50 destes, 2,8 mg/mL para a fração acetato de etila, 5,6mg/mL para a fração clorofórmio, 10,5 mg/mL para a fração hidroalcoólica e o extrato bruto do caule se demonstrou igual ao controle, em conjunto com os respectivos desvios padrões e limites superiores e inferiores.

Para a dose de 1 mg/ mL, a efetividade máxima é de 70% para o extrato bruto das folhas, sendo menos eficiente apenas que a fração hexano do caule com a efetividade de 90% na mesma dose. As demais amostras foram pouco tóxicas, com a taxa de mortalidade máxima de 10% na fração clorofórmio, 40% na fração acetato de etila e 20% no remanescente hidroalcoólico, na dose de 1 mg/mL.

A relação dose-estímulo dos extratos e frações sobre *A. aegypti* estão apresentados na FIGURA 13 sendo (a) relativo ao extrato bruto das folhas, (b) fração hexano, (c) para a fração clorofórmio, (d) fração acetato de etila e (f) a fração hidroalcoólica.

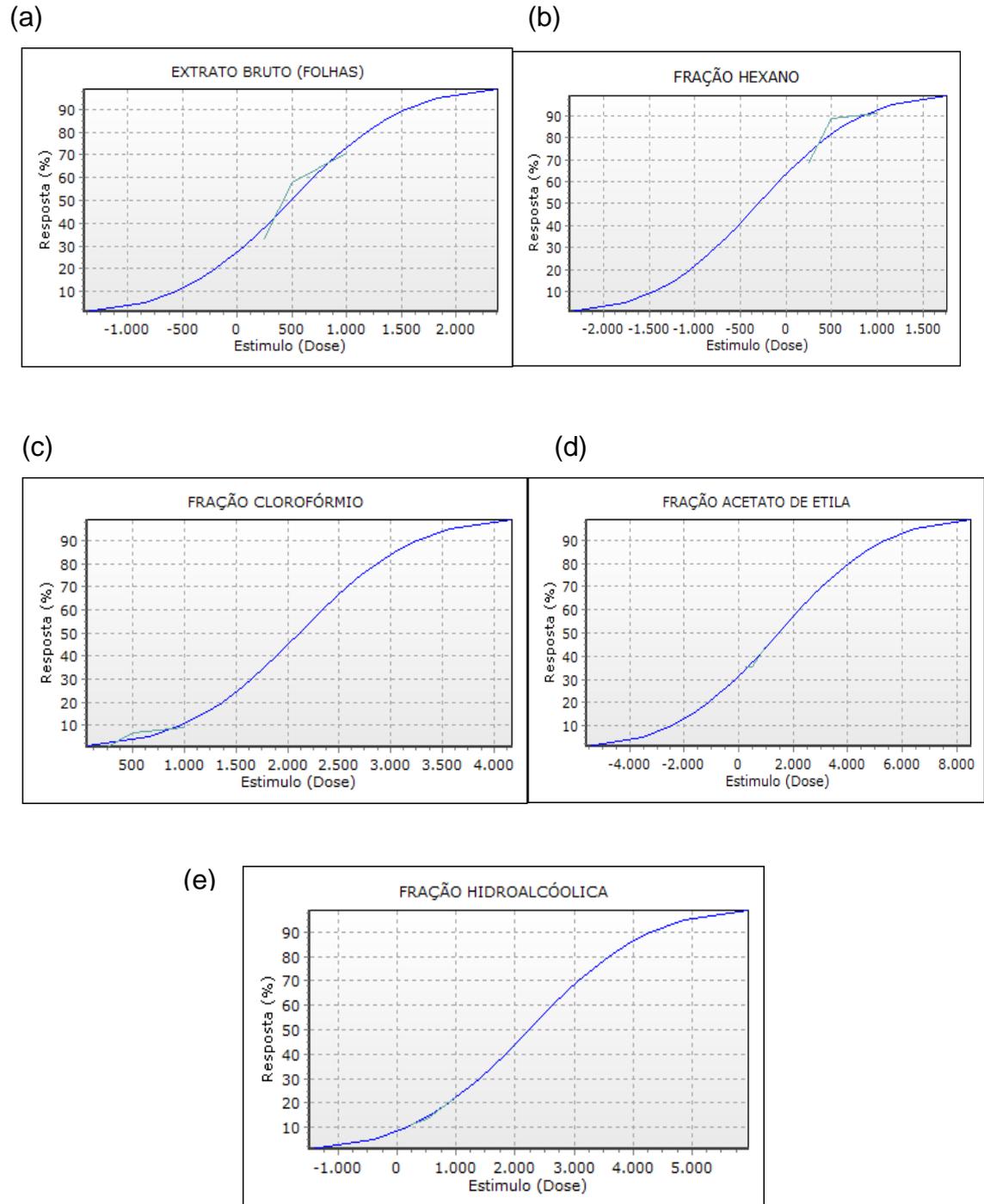


FIGURA 13. GRÁFICOS DA RELAÇÃO DOSE- ESTÍMULO DA TOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS (a), FRAÇÃO HEXANO (b), PARA A FRAÇÃO CLOROFÓRMIO (c), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (d) E A FRAÇÃO HIDROALCÓOLICA (f), DE *F. vellosiana* EM *A. aegypti*, APRESENTADA PELA ANÁLISE DE PROBIT. A RETA DE REGRESSÃO DE DOSE PREVISTA ESTÁ MARCADA EM AZUL E A RELAÇÃO DE DOSES TESTADAS E A SUA RESPECTIVA RESPOSTA TÓXICA EM (%).

O presente resultado demonstra que ainda que o extrato bruto e frações de caule, mesmo não exercendo toxicidade sobre o micro crustáceo *Artemia salina*, possuem caráter tóxico, e o extrato bruto das folhas que foram utilizadas somente para esta avaliação apresentam um potencial tóxico muito superior ao do caule, isso pode ser explicado pelo fato da presença de alcaloides ser maior nas folhas em relação aos caules, dada a função protetora deste grupo de compostos neste órgão vegetal.

LEITE e colaboradores (2009) apresentam em seu trabalho a correlação entre a presença de β -sitosterol e a toxicidade á larvas de *Aedes aegypti*. Nesta pesquisa desenvolvida com *Persea americana*, o abacate, foram isolados fitoesteróis, entre eles o β -sitosterol a partir do extrato metanólico da semente, que foi particionado utilizando-se solventes de polaridade crescente de forma similar ao presente trabalho desenvolvido com *F. velloziana*. O extrato e frações foram testados contra as larvas de *Aedes aegypti*, apontando para atividade larvicida de extrato bruto e da fração hexano, da qual foi isolado o terpeno..

RAHUMAN et al (2008) demonstrou que o extrato de *Abutilon indicum* feito com éter de petróleo, exerce significativa ação larvicida contra *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus* e justificou tal atividade devido a presença do β -sitosterol neste extrato.

A fração acetato de etila não foi significativamente tóxica, porém as larvas mortas apresentaram alterações na morfologia da sua membrana peritrófica, este resultado demonstrado por esta fração pode ser explicado pela presença de cumarinas nesta amostra, segundo GARCEZ (2009), que á partir dos extratos de *Ocotea velloziana* (Meisn.) Mez. e *Aiouea trinervis* (Meisn.) isolou-se cumarinas e obteve as frações onde foram encontrados estes compostos apresentaram excelente atividade larvicida, o mesmo perfil é demonstrado em diversas substâncias da mesma classe de metabólitos secundários por GARCEZ (2013), entre elas a pimpinelina, a swietenocumarina B, a marmesina, e a oxipeucedanina.

O resultado apresentado pelo ensaio realizado com esta fração, conjuntamente com as larvas provenientes dos testes com a fração hexano do caule e o extrato bruto do caule, foram avaliadas quanto ás condições do seu sistema digestório para uma melhor compreensão da ação das amostras.

6.4.1.2.2. Conteúdo de tripsina e quimiotripsina

A partir dos resultados apresentados sobre a mortalidade de larvas de *A. aegypti*, o extrato bruto das folhas, fração hexano e acetato de etila do caule foram investigados sobre a inibição na atividade da tripsina e quimiotripsina. Os ensaios que medem a atividade da tripsina e quimiotripsina foram realizadas pelo fato de que a tripsina e quimiotripsina são as enzimas digestivas mais importantes em *A. aegypti* e ocorrem em todas as fases do seu ciclo biológico, sendo muito expressas nas fases de larva e pupa (YANG; DAVIES, 1971; VENANCIO et al, 2009).

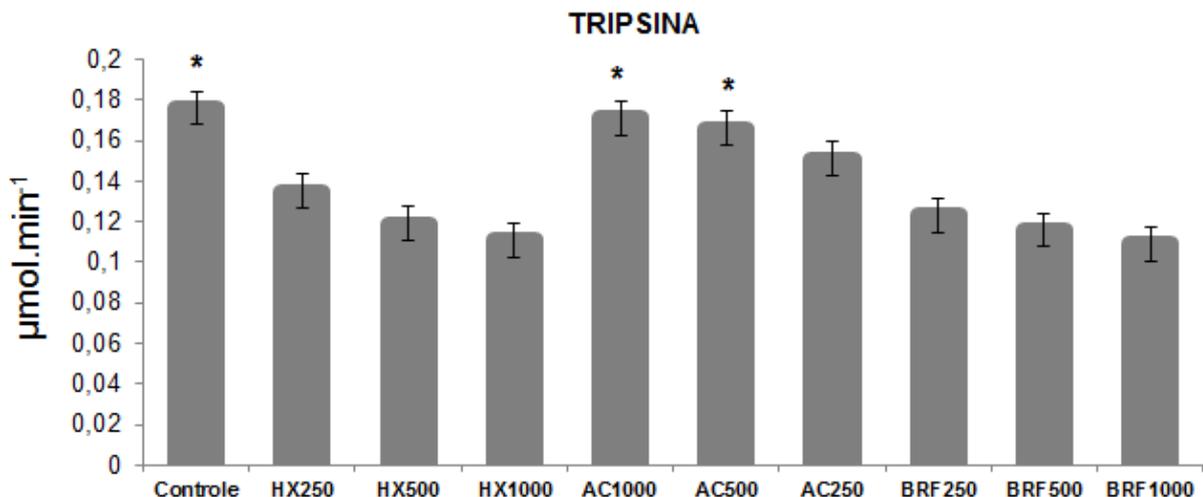


FIGURA 14. GRÁFICO DO EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE FOLHA E FRAÇÕES HEXANO, ACETATO DE ETILA DO CAULE de *F. vellosiana* NA ATIVIDADE DA TRIPSINA EM LARVAS DE *A. aegypti*. (HX) CORRESPONDE A FRAÇÃO HEXANO, (AC) A FRAÇÃO ACETATO DE ETILA E (BRF) AO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS, TODOS SEGUIDOS DAS DOSES TESTADAS: 250, 500 E 1000 mg/mL. MÉDIAS SEGUIDAS DO ASTERISCO NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ($P < 0,05$).

Tal como observado para a mortalidade, o extrato bruto de folha, provocaram diminuição acentuada na atividade de tripsina. As larvas foram mais sensíveis à fração hexânica e extrato bruto das folhas. Apenas a concentração de 1000 μg/mL da fração acetato diminuíram os níveis de tripsina em *A. aegypti* (FIGURA 14). Assim como observado para a atividade da tripsina, o conteúdo de quimiotripsina também se mostraram diminuídos para o extrato e frações testados. A menor

concentração da fração acetato de etila (250 µg.mL) não provocaram alterações no conteúdo de quimiotripsina (FIGURA 15).

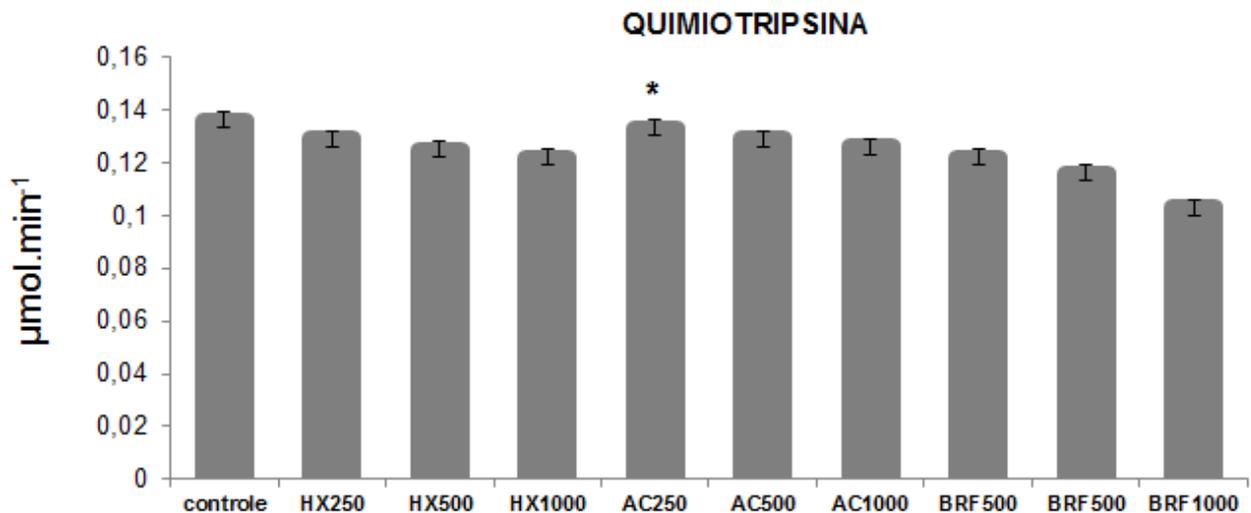


FIGURA 15. GRÁFICO DO Efeito DOS EXTRATOS BRUTO DE FOLHA E DAS FRAÇÕES HEXANO E ACETATO DE ETILA DE *F. velloziana* NA ATIVIDADE DA QUIMIOTRIPSINA EM LARVAS DE *A. aegypti*. (HX) CORRESPONDE A FRAÇÃO HEXANO, (AC) A FRAÇÃO ACETATO DE ETILA E (BRF) AO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS, TODOS SEGUIDOS DAS DOSES TESTADAS: 250, 500 E 1000 mg/mL. A MÉDIA ASSINALADA COM O ASTERISCO NÃO DIFERE ESTATISTICAMENTE EM RELAÇÃO AO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET ($P < 0,05$).

O intestino médio das fêmeas do mosquito *A. aegypti* sintetizam duas formas de tripsina após a alimentação com sangue, a tripsina precoce e tardia. A tripsina precoce é produzida em pequenas quantidades e aparece no intestino médio cerca de 1 h após a alimentação e desaparece cerca de 6 a 8 h após a alimentação. A tripsina tardia é produzida em grandes quantidades e começa a aparecer de 8 a 10 h após a alimentação (NORIEGA; WELLS, 1990).

Assim é plausível o uso de extratos de plantas contendo diferentes princípios ativos (metabólitos secundários, tais como, inibidores de tripsina, quimiotripsina e acetilcolina) que possam impedir o desenvolvimento da resistência larval por uma variedade de diferentes substâncias que possam atuar em vários mecanismos de ação inseticida (REGNAULT-ROGER et al, 2004).

A inibição da atividade destes extratos pode indicar que este não tem como alvo uma única substância, o que poderia dificultar a adaptação das larvas. Em larvas de *A. aegypti*, as proteases são mecanismos altamente ativos e regulam

diferentes atividades, tal como o controle da transdução do rnam para tripsina, quimiotripsina e inibidores de proteases endógenas (YANG; DAVIES, 1971;. HO ET AL, 1992).

De acordo com YANG e DAVIES (1971), a baixa atividade da tripsina é observada entre a fase de ecdise, larva e pupa de *A. aegypti*, e que provavelmente ocorre devido à falta de alimentação durante este período. No entanto, a ausência de variações significativas na atividade da tripsina nas larvas mantidas em água livre de cloro (controle) assegura que a diminuição da atividade da tripsina após incubação não foi devida à passagem do estágio larval.

Os organofosforados atuam inibindo a Acetilcolinesterase, importante enzima do sistema nervoso central. Essa enzima é fosforilada pelo inseticida, ficando irreversivelmente inativada. A inibição de acetilcolina resulta no acúmulo de acetilcolina nas junções nervosas (ou sinapses), o que impede a interrupção da propagação do impulso elétrico. Conseqüentemente, o sistema nervoso central continuará sendo estimulado, desencadeando o processo de paralisia que pode culminar com a morte do inseto.

A utilização do controle químico continua sendo uma das principais táticas utilizadas para o combate dos vetores, entretanto, devido à resistência adquirida pelos culicídeos e às escassas opções de novos inseticidas, a situação torna-se crítica (CHAMBERS et al, 1995).

O mosquito *Aedes aegypti*, cuja população se adapta rapidamente às condições de mudanças ambientais, apresenta rápida recuperação após as intervenções de controle (PAUL et al, 2006). Dessa forma, o uso de plantas com atividade sobre a acetilcolinesterase pode ser utilizado como alternativa para a resistência do mosquito aos pesticidas encontrados no comércio.

Estes resultados justificam as alterações observadas no intestino das larvas visualizadas em microscópio. Larvas tratadas com o controle apresentaram membrana peritrófica e espaço subperitrófico menos espessos, além de tecido epitelial espessado. Larvas tratadas com o concentração de 250 µg/mL apresentaram membrana peritrófica e o epitélio subperitrófico mais espessos quando comparados ao controle. A concentração de 500 µg/mL provocaram um maior número de dobras no tecido epitelial, além do espessamento do lúmen intestinal.

A concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ provocou espessamento da membrana peritrófica e o espessamento do lúmen intestinal também foi observado. O tecido epitelial também se apresentou mais escuro quando comparado ao controle (FIGURA 16). Larvas tratadas com a fração acetato de etila não apresentaram alterações na membrana e epitélio peritróficos. Somente o alargamento do tubo digestivo foi observado (FIGURA 17).

De forma semelhante, à fração hexânica, o extrato bruto das folhas provocou o espessamento e escurecimento da membrana peritrófica em todas as concentrações ensaiadas, e os efeitos foram mais intensos para a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Nas regiões onde o tecido epitelial se torna menos espesso, foi observado que estes sulcos quase se fundem com a membrana peritrófica nas concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. Isto pode se decorrente de um menor espessamento na região do lúmen externo. A menor concentração provocou fissuras no tecido epitelial (FIGURA 18).

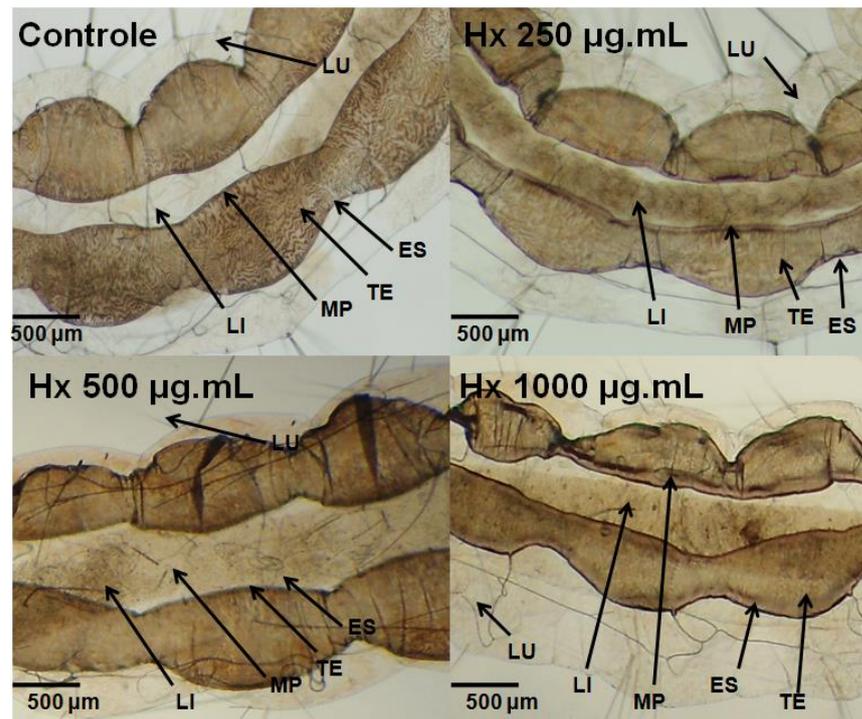


FIGURA 16. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA FRAÇÃO HEXÂNICA DE *F. velloziana* SOBRE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM LARVAS DE *A. aegypti*. NOTA: LU= LÚMEN, TE= TECIDO EPITELIAL, ES= ESPAÇO SUBPERITRÓFICO, MP= MEMBRANA PERITRÓFICA, LI= LÚMEN INTESTINAL

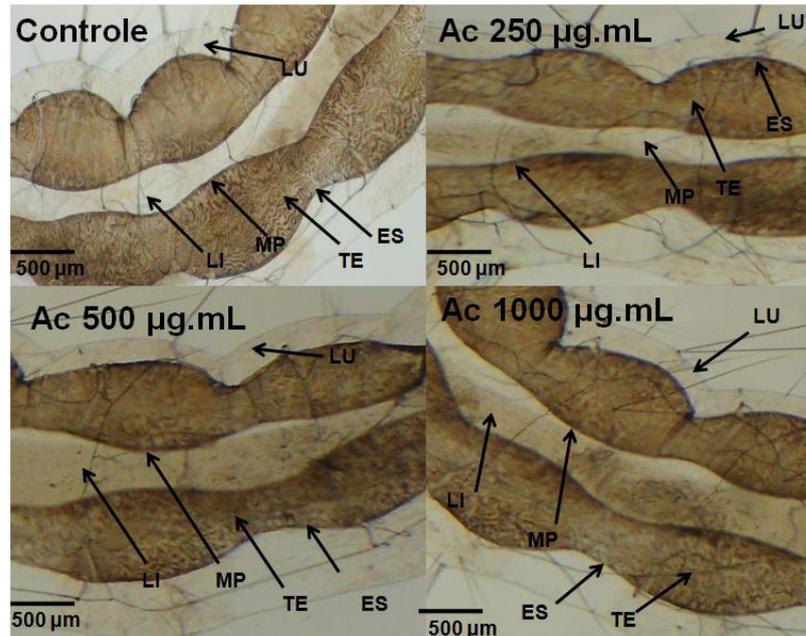


FIGURA 17. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE *F. velloziana* SOBRE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM LARVAS DE *A. aegypti*. NOTA: LU= LÚMEN, TE= TECIDO EPITELIAL, ES= ESPAÇO SUBPERITRÓFICO, MP= MEMBRANA PERITRÓFICA, LI= LÚMEM INTESTINAL.

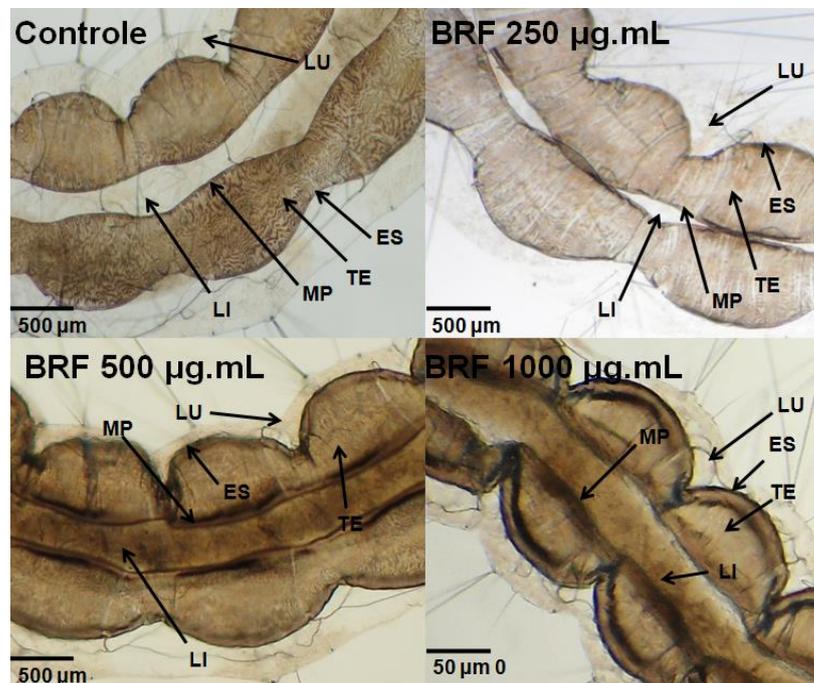


FIGURA 18. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *F. velloziana* SOBRE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM LARVAS DE *A. aegypti*. NOTA: LU= LÚMEN, TE= TECIDO EPITELIAL, ES= ESPAÇO SUBPERITRÓFICO, MP= MEMBRANA PERITRÓFICA, LI= LÚMEM INTESTINAL.

Uma vez que os processos de digestão e de absorção ocorrem no intestino médio, a organização espacial da digestão depende da relação de cada um dos compartimentos (célula, espaço subperitrófico e endoperitrófico e tecido epitelial) além das diferentes fases da digestão e enzimas correspondentes (TERRA, 1996).

A diminuição no espessamento do epitélio pode ser considerado um mecanismo de defesa da larva, visto que, uma das principais funções desta membrana é a proteção das células epiteliais, contra a ação mecânica do alimento, podendo ainda, agir como uma barreira para invasão de microorganismos ingeridos e patógenos (RICHARDS e RICHARDS, 1977).

Em vertebrados, o muco é secretado próximo à camada primária, com a finalidade de proteger o epitélio intestinal, enquanto auxilia no processo de digestão (CICCIA; COUSSIO; MONGELLI, 2000). No entanto, os insetos não possuem uma típica camada de muco no trato digestivo e, em vez disso, este é revestido por uma estrutura de proteção única, a membrana peritrófica (PETERS, 1992).

A membrana peritrófica se apresenta como uma estrutura mucinosa, diferente do muco presente nos vertebrados, pela sua incorporação de quitina, resultando na estrutura protéica reforçada por fibras de quitina (WANG e GRANADO, 1996). Substâncias tóxicas interagem especificamente com receptores da membrana apical do intestino médio, causando sérios danos ao epitélio, que culminam com a morte da larva (CHARLES, 1981; GILL et al, 1992).

Dessa forma, o uso dos extratos de *F. velloziana* no controle de larvas é um método de controle alternativo para minimizar os efeitos nocivos de pesticidas utilizados no controle do mosquito. Além disso, amostras de locais onde já houve uso intensivo de pesticidas pelos programas de controle demonstram que a larva e mosquito se tornaram resistentes, sendo um destes mecanismos o aumento na síntese de acetilcolinesterase (PINHEIRO e TADEI, 2002). Neste sentido, o extrato e frações testados se mostram uma alternativa para o controle de larvas, uma vez que atuam como inibidores de enzimas digestivas como a tripsina e quimi tripsina, demonstrando seu potencial como pesticida fisiológico.

Novas investigações sobre a atuação dessas substâncias de forma isolada poderão melhorar a compreensão sobre a indicação popular dessa espécie como pesticida, e levar a um possível desenvolvimento de formulações que poderão ser utilizadas no controle de larvas e mosquitos.

6.4.2 Avaliação da Atividade Antioxidante

6.4.2.1 Formação do Complexo Fosfomolibdênio

Os resultados da atividade antioxidante do extrato bruto e frações do caule de *F. velloziana* em relação ao ácido ascórbico e a rutina, avaliados pelo método da formação do complexo entre molibdênio V, produto da redução do molibdênio IV por substâncias antioxidantes, podem ser observados na FIGURA 19.

Considerando que o ácido ascórbico e a rutina são padrões que já possuem diversos estudos sobre sua atividade antioxidante, as frações acetato de etila (222,7%) e clorofórmio (272,9%) são as que apresentaram maior atividade antioxidante frente ao padrão rutina, seguidas pela fração hidroalcoólica (168,8%), o extrato bruto (93,8%) e a fração hexano (88,6%).

Em relação ao ácido ascórbico, considerada 100% de atividade antioxidante, as frações acetato de etila e clorofórmio apresentaram novamente os melhores resultados, sendo considerado para a fração acetato de etila uma atividade antioxidante de aproximadamente 60,3% em relação ao ácido ascórbico, seguido da fração clorofórmio com aproximadamente 49,2%, fração hidroalcoólica (37,3%), extrato bruto etanólico (20,7%) e fração hexano (19,6%).

A avaliação em relação a diferentes padrões faz-se necessária, visto que embora ambos desempenhem o papel de redutores, estes diferenciam-se na sua velocidade de redução e mecanismo de ação sendo que o ácido ascórbico tende a ser mais rápido, portanto podemos concluir que em termos de redução os compostos presentes no extrato e frações do vegetal tem seu mecanismo similar ao da rutina.

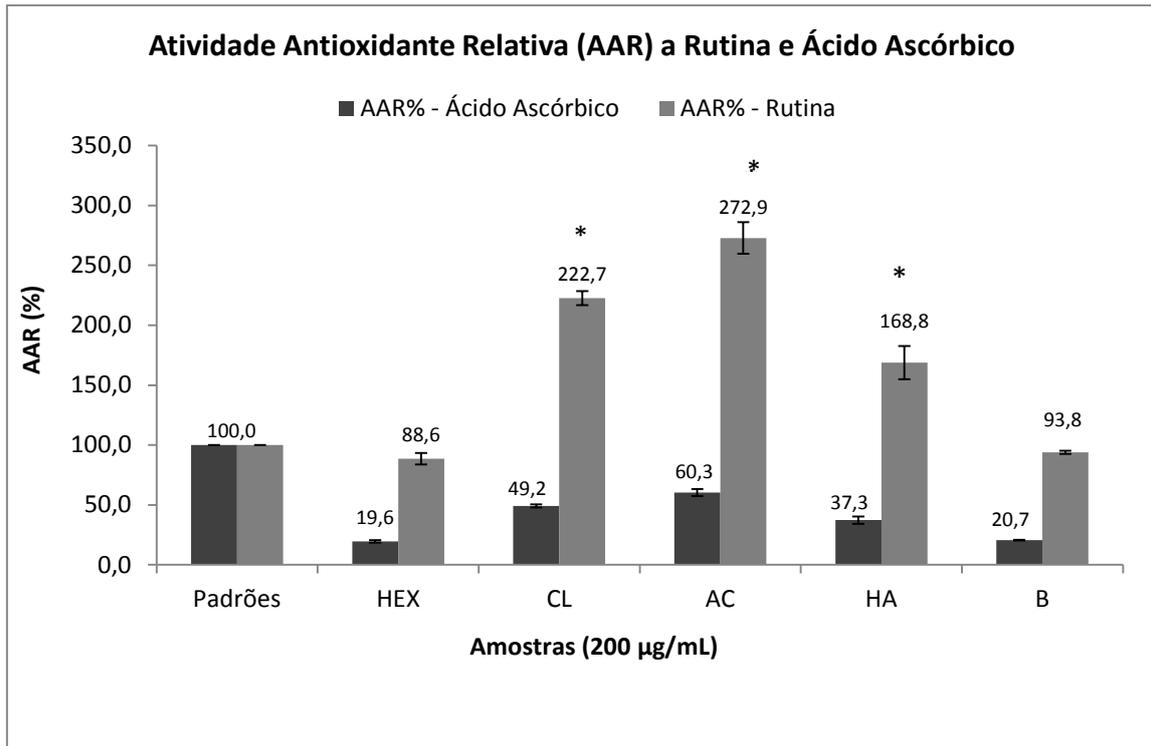


FIGURA 19. GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA DO EXTRATO E FRAÇÕES DE *F. velloziana* EM PORCENTAGEM EM RELAÇÃO AOS PADRÕES RUTINA E ÁCIDO ASCÓRBICO, PELO MÉTODO DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO. A SIGNIFICÂNCIA DOS DADOS FOI ANALISADA PELO TESTE ANOVA E A VARIÂNCIA PELO TESTE T DE TUKEY APRESENTANDO $P \geq 0,05$, SENDO OS VALORES DIFERENTES DO CONTROLE ASSINALADOS COM UM ASTERISCO. AS FRAÇÕES ESTÃO APRESENTADAS NO GRÁFICO COMO HEX (FRAÇÃO HEXANO), CL (FRAÇÃO CLOROFÓRMIO), AC (FRAÇÃO ACETATO DE ETILA), HA (FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE) E B (EXTRATO BRUTO).

A similaridade da atividade entre as frações que apresentaram capacidade antioxidante e a rutina dá-se pelo fato desta substância pertencer à classe dos flavonoides, compostos polifenólicos biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e do acetato, precursores de vários grupos de substâncias como aminoácidos alifáticos, terpenóides, ácidos graxos dentre outros (MANN, 1987). estas substâncias são de grande interesse pela sua capacidade de reduzir radicais livres (DORNAS et al, 2008), e foram detectados no extrato bruto e nas frações clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica, o que explicaria sua atividade similar ao padrão utilizado.

A ação sinérgica entre os compostos fenólicos encontrados na pesquisa fitoquímica inicial (heterosídeos flavônicos, leucoantocianidinas e cumarinas) e os compostos apolares (esteroides e terpenos), entre eles o triterpeno β -sitosterol identificado junto à fração clorofórmio, explicariam a alta atividade antioxidante nas frações, considerados que esteroides e especialmente terpenos também são

compostos com capacidade antioxidante (MOON et al, 2006) podendo ser citados os ácidos ursólico, oleanólico (CARVALHO et al, 2009) e betulínico (SOUZA e MACHADO, 2012), carotenoides como luteína, a zeaxantina e o licopeno (PERES, 2004; KIM et al, 2001), os triterpenos originários do lupiol (SOUZA e MACHADO, 2012), citral, geraniol, 1,8 cineol, terpineol, citronelal, itronelol e o β -cariofileno (TOSCAN, 2010).

Substâncias antioxidantes são compostos que funcionam como inibidores dos processos óxido redutivos desencadeados pelos radicais livres (TOSCAN, 2010) e assim tem função de captura-los não permitindo assim a peroxidação lipídica, a modificação de proteínas e os danos no DNA (SAITO et al, 2004).

Diferentes metodologias de avaliação surgem para que os diversos processos que envolvem a capacidade antioxidante de uma fração ou extrato vegetal possam ser compreendidos, isso se faz necessário devido ao fato de que produtos de origem natural geralmente são compostos de um conjunto complexo de substâncias que agem de formas diversas (CHOI et al, 2002).

Como foi significativo o efeito exercido pelas frações mais polares do extrato do caule de *F. velloziana*, na verificação da sua capacidade antioxidante na formação do complexo fosfomolibdênio, é importante considerar a sua atividade na inibição da peroxidação lipídica e na captura direta de radicais livres, para a obtenção de um panorama mais abrangente sobre o seu perfil.

6.4.2.2 Avaliação da Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

A avaliação da atividade antioxidante pela capacidade de reduzir radicais livres é de grande importância para que seja traçado um perfil do extrato vegetal e assim orientar seu estudo, objetivando sua aplicação em um produto final.

A FIGURA 20 representa as concentrações mínimas de amostra necessárias para a Redução em 50% da Concentração Inicial de DPPH (IC50), dos padrões comparativos utilizados, do extrato bruto e das frações testadas, nenhuma das amostras testadas demonstrou atividade antioxidante significativa por esta metodologia.

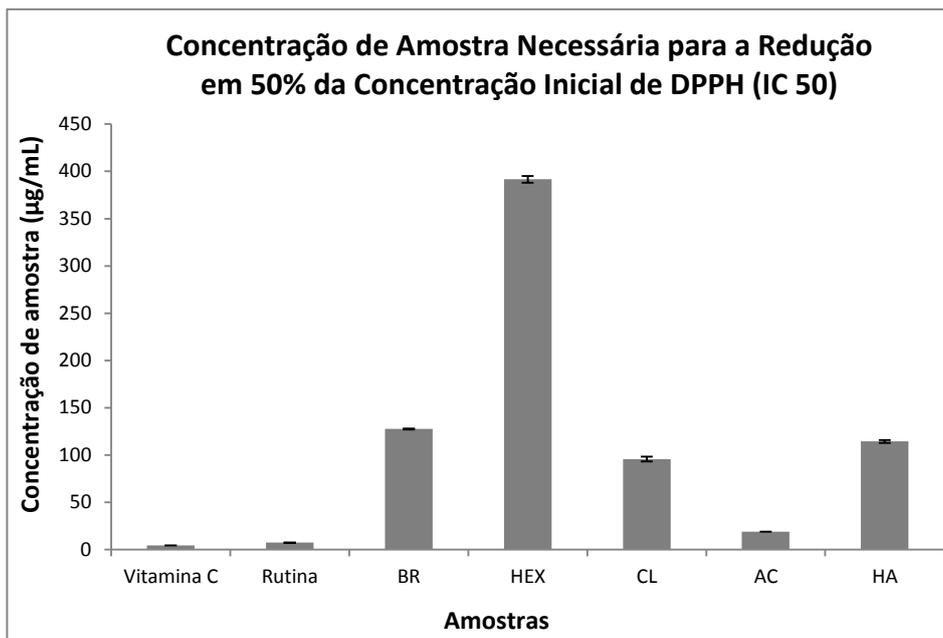


FIGURA 20. GRÁFICO REPRESENTANDO AS CONCENTRAÇÕES DE AMOSTRA DO EXTRATO E FRAÇÕES DO CAULE DE *F. velloziana* NECESSÁRIAS PARA A REDUÇÃO EM 50% DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE DPPH (IC 50). A SIGNIFICÂNCIA DOS DADOS FOI ANALISADA PELO TESTE ANOVA, A VARIÂNCIA DOS DADOS FOI ANALISADA PELO TESTE T DE TUKEY APRESENTANDO $P > 0,05$. AS FRAÇÕES ESTÃO APRESENTADAS NO GRÁFICO EM A SIGLAS HEX (FRAÇÃO HEXANO), CL (FRAÇÃO CLOROFÓRMIO), AC (FRAÇÃO ACETATO DE ETILA), HA (FRAÇÃO HIDRO ALCOÓLICA REMANESCENTE) E BR (EXTRATO BRUTO).

Os resultados obtidos neste experimento não foram tão significativos em termos de capacidade antioxidante se comparados aos obtidos no ensaio da formação do complexo fosfomolibdênio. As doses do IC50 para a redução do radical DPPH se mostraram superiores às doses dos padrões comparativos ácido ascórbico e rutina, ou seja, neste teste demonstraram-se menos eficientes na redução do radical DPPH.

Através deste ensaio, verificou-se que a fração acetato de etila apresentou um IC50 de 18,965 µg/ml, representando o melhor resultado quando comparado aos padrões ácido ascórbico (4,503 µg/mL) e rutina (7,330 µg/mL). A fração clorofórmio apresentou IC50 de 30,982 µg/mL, a fração hidroalcoólica (111,742 µg/mL), seguido do extrato bruto (127,612 µg/mL) e da fração hexano (391,636 µg/mL), indicando que essas amostras são menos ativas do que os padrões analisados e do que as demais amostras, pois é preciso uma quantidade maior destas amostras para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH.

Os gráficos das retas geradas estão apresentadas no FIGURA 21 (Ácido ascórbico), FIGURA 22 (Rutina), FIGURA 23 (Extrato bruto), FIGURA 24 (Fração

hexano), FIGURA 25 (Fração clorofórmio), FIGURA 26 (Fração acetato de etila) e FIGURA 27 (Fração remanescente hidroalcoólica).

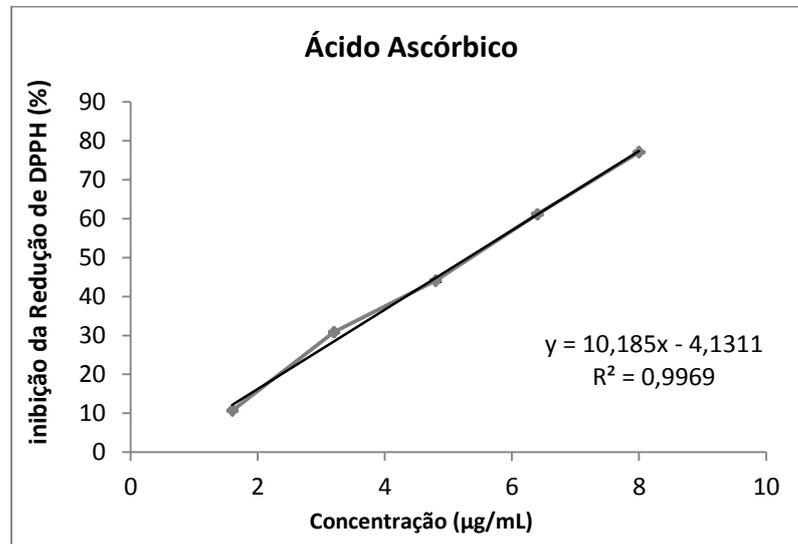


FIGURA 21. RETA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELO ÁCIDO ASCÓRBICO.

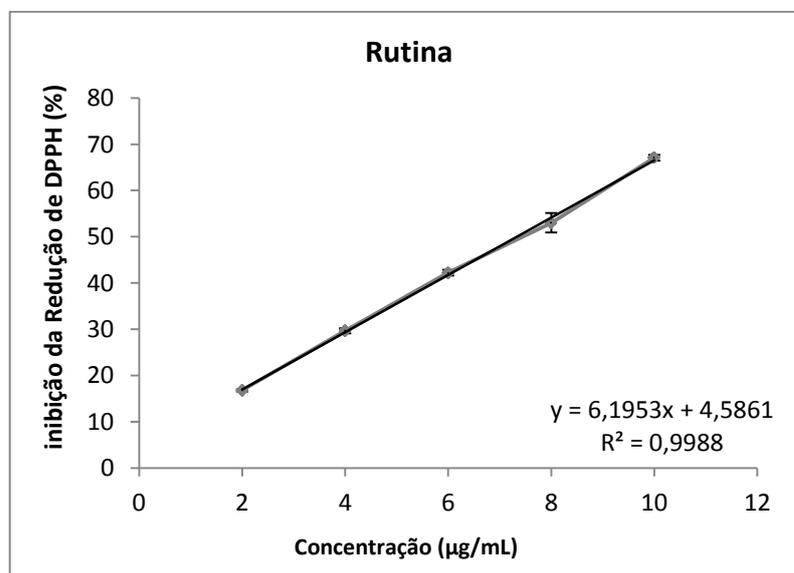


FIGURA 22. RETA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELO PADRÃO RUTINA.

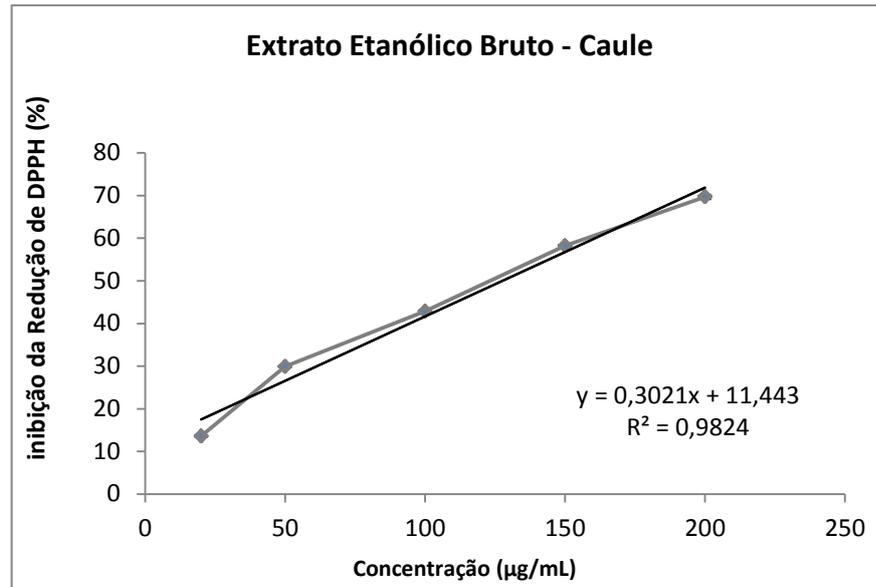


FIGURA 23. RETA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELO EXTRATO BRUTO DO CAULE DE *F. velloziana*.

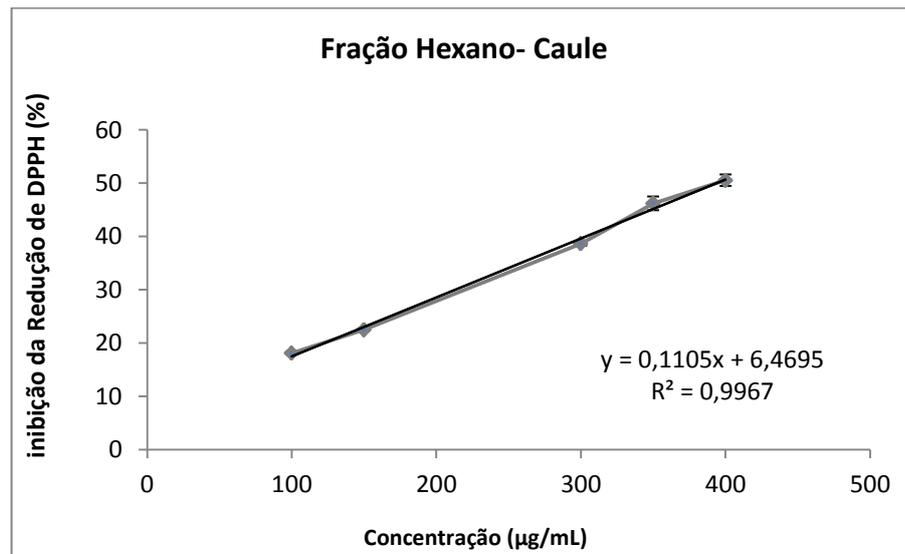


FIGURA 24. RETA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELA FRAÇÃO HEXANO DO CAULE DE *F. velloziana*.

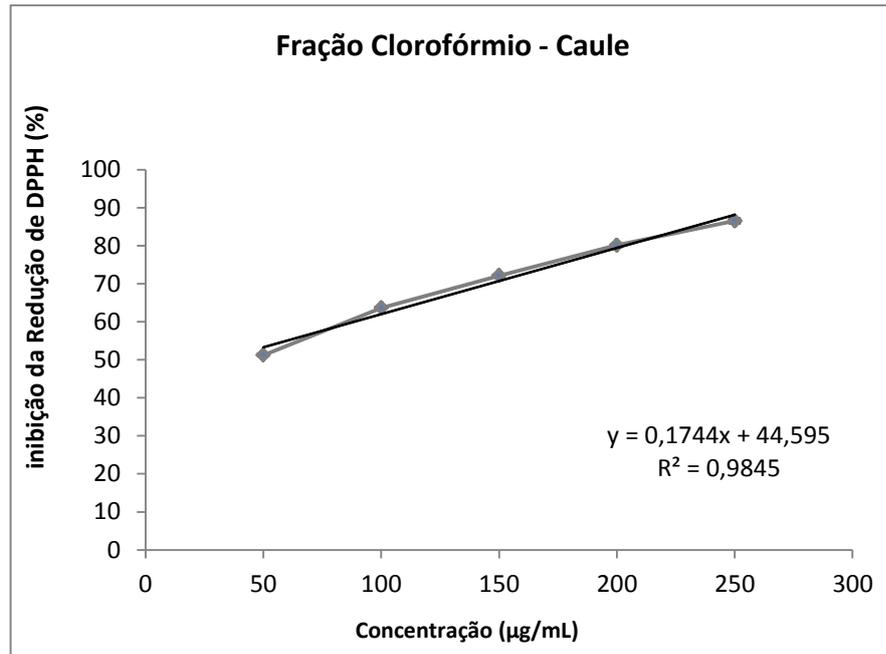


FIGURA 25. RETA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DO CAULE DE *F. vellosiana*.

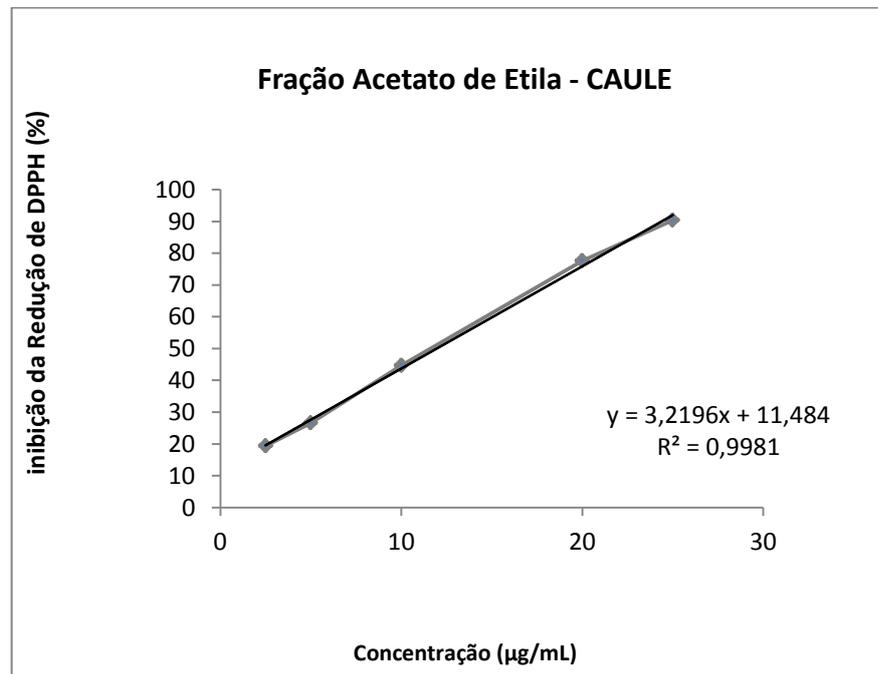


FIGURA 26. RETA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO CAULE DE *F. vellosiana*.

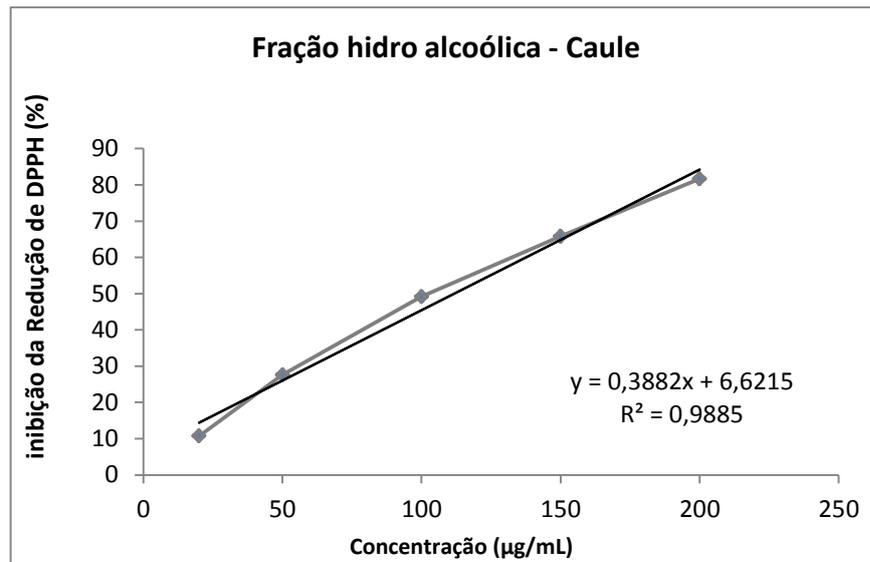


FIGURA 27. RETA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELA FRAÇÃO REMANESCENTE HIDRO ALCOÓLICA DO CAULÉ DE *F. velloziana*.

Embora este resultado seja aparentemente baixo, torna-se complementar às demais atividades antioxidantes avaliadas, visto que através de diferentes métodos é possível considerar diferentes vias de redução e considerar diferentes mecanismos de ação não somente na prevenção da oxidação como também da inibição de agentes oxidativos.

6.4.2.3 Teste com espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A avaliação da peroxidação lipídica pelo método das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico é um dos métodos mais difundidos para a avaliação *in vitro* da capacidade protetora exercida por substâncias e extratos vegetais contra a ação oxidativa, e surge como um complemento importante para os demais métodos utilizados.

A avaliação da inibição da peroxidação lipídica pelos extratos de *F. velloziana* é apresentada no FIGURA 28.

Os resultados apontam para a inibição lipídica de 20,28% efetuado pelo controle BHT, a fração acetato de etila se demonstrou igual ao controle inibindo 20,82%, a fração hidroalcoólica inibiu 30,5% e o extrato bruto apresentou o melhor

resultado inibindo 46,06%, a fração clorofórmio se mostrou menos eficiente com a inibição de 15,64% e a fração hexano foi praticamente inativo, com inibição de apenas 0,91%.

As frações testadas demonstraram dois diferentes perfis de atividade, as frações de maior polaridade (acetato de etila, remanescente hidroalcoólico) e o extrato bruto apresentaram atividade antioxidante sendo a fração acetato de etila estatisticamente igual ao padrão BHT, o remanescente hidroalcoólico e o extrato bruto apresentaram uma atividade protetora superior ao padrão, isso se deve especialmente á presença de compostos fenólicos nestas, e na fração clorofórmio á presença de terpenos como o β -sitosterol e outros encontrados misturados a este, conforme previamente indicados na análise sistemática fitoquímica.

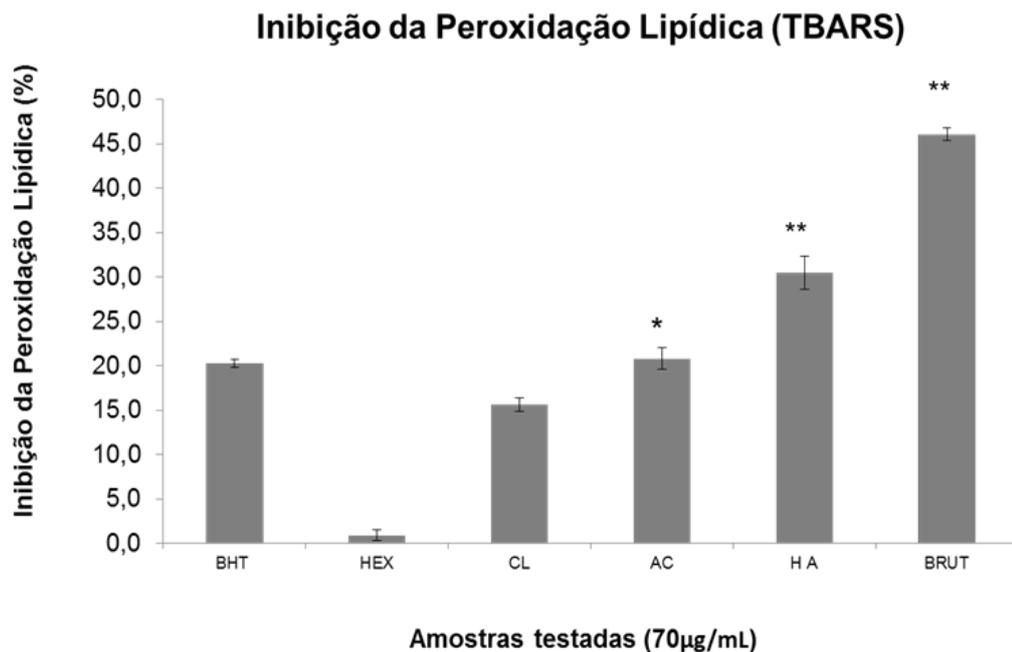


FIGURA 28. GRÁFICO DA INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA PROMOVIDA PELO EXTRATO E FRAÇÕES DE *F. velloziana* AVALIADA PELO MÉTODO DO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) EXPRESSO EM PORCENTAGEM E COMPARADAS AO PADRÃO BHT. A SIGNIFICÂNCIA DOS DADOS FOI ANALISADA PELO TESTE ANOVA, SENDO OS VALORES SIGNIFICATIVOS EM RELAÇÃO AO CONTROLE ASSINALADOS COM UM ASTERISCO, O VALOR IGUAL AO CONTROLE ASSINALADO COM UM ASTERISCO E VALORES INFERIORES NÃO MARCADOS. AS FRAÇÕES ESTÃO APRESENTADAS NO GRÁFICO: HEX (FRAÇÃO HEXANO), CL (FRAÇÃO CLOROFÓRMIO), AC (FRAÇÃO ACETATO DE ETILA), HA (FRAÇÃO HIDRO ALCOÓLICA REMANESCENTE) E BR (EXTRATO BRUTO).

Pose-se considerar também que no quesito proteção contra a peroxidação lipídica avaliada pelo método do TBARS, as frações ricas em compostos fenólicos como os flavonóides, neste caso as frações acetato de etila e hidroalcoólica, são mais eficientes que a fração rica em terpenos, e de forma sinérgica propiciam o excelente resultado apresentado pelo extrato bruto.

Os radicais de oxigênio, ânion superóxido, e outros radicais livres têm um papel importante nas reações bioquímicas e fisiológicas (DUARTE- TAYLOR et al, 2005; ALMEIDA et al, 2006; MOSSER e EDWARDS, 2008) porém quando se encontram produzidos em excesso durante os processos patofisiológicos ou devido a fatores ambientais adversos, ocasionam cumulativamente danos teciduais, levando a ocorrência de doenças e distúrbios (MOLYNEUX et al, 2004; HUANG et al, 2005).

A ação dos radicais livres ou das espécies reativas do oxigênio está diretamente correlacionada com o envelhecimento precoce, carcinogênese, mutagênese, aterosclerose, trauma, infarto miocárdial, artrite e isquemia (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990; GÜLCIN et al, 2003; CHANWITHEESUK et al, 2005) e estudos apontam para a sua ação em doenças neurodegenerativas como o mal de Parkinson e a doença de Alzheimer (HEO e LEE, 2004).

Um dos meios pelos quais os radicais atacam as biomoléculas é a peroxidação lipídica, que atinge constituintes de membrana ocasionando dano celular (NEGRI et al, 2009; CHOI et al, 2002, ANDRADE et al, 2007), atacam também outras biomoléculas, gerando dano em ácidos nucléicos, carboidratos e nas proteínas, através da oxidação de grupos sulfídrilas (SIES, 1991).

Considerada a importância das substâncias antioxidantes para a prevenção de doenças e a melhoria das condições de saúde humana, é relevante destacar também seu uso industrial e aplicações no desenvolvimento de produtos nutracêuticos, farmacêuticos e alimentícios.

Há uma tendência tanto da indústria fármaco-cosmética quanto da indústria alimentícia em buscar novas alternativas quanto o uso de substâncias conservantes (ILHA et al, 2008; ANDREO e JORGE, 2006), que mantenham a qualidade e a estabilidade dos produtos, porém apresentando reduzido caráter tóxico, beneficiando não somente o consumidor, mas também facilitando o desenvolvimento de produtos (CHORILLI et al, 2007; BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006), para isso substâncias de origem natural surgem como um importante

recurso, principalmente nos processos oxidativos em lipídeos (JASWIR, CHE-MAN e KITTS, 2000).

O resultado positivo para a atividade antioxidante protetora contra a peroxidação lipídica tanto do extrato bruto quanto das frações acetato de etila e remanescente do caule de *Forsteronia velloziana* dá a esta espécie e aos seus subprodutos um potencial uso, especialmente se avaliado conjuntamente com os resultados promissores obtidos no ensaio de formação do complexo fosfomolibdênio e na ação discreta, porém considerável da capacidade redutora de radicais livres da fração acetato de etila, avaliada pelo método do DPPH. Esses resultados fazem com que estudos da atividade antioxidante in vivo sejam cogitados, conjuntamente com demais testes de toxicidade que apontem para a segurança do uso do extrato e compostos derivados para o consumo humano.

6.4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O extrato bruto e frações de *F. vellozinana* foram testados em placas contra as bactérias *Agrobacterium tumefaciens* [(Smith & Townsend, 1907) Conn 19421 1095 donor: R.E.Stal from: 1994, EUA (=1050 LBA)], *Staphylococcus aureus* (ATCC6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC11229), *Salmonella typhimurium* (ATCC14028) e o fungo *Candida albicans* (ATCC10231), através do método de difusão em placa de ágar.

Não havendo halo de inibição de crescimento dos microrganismos pelos extratos impregnados nos discos, não sendo formado também nos controles realizados com o solvente e sendo observado nitidamente nos discos contendo os antibióticos cloranfenicol e cetoconazol, fica indicado que não há atividade antimicrobiana exercida pelo extrato e frações desta planta contra as cepas testadas (FIGURA 29).

São escassos os estudos de atividade antimicrobiana de plantas do gênero *Forsteronia*, sendo que apenas a avaliação do extrato bruto de *Forsteronia amblybasis* Blake (stem) testado contra *Mycobacterium tuberculosis* na concentração de 50µg/ mL apresentou inibição de 50% do crescimento bacteriano (GRAHAM et al, 2003). Entretanto deve-se considerar dois pontos fundamentais, a

composição química diferenciada entre espécies do mesmo gênero e as diferenças entre os microrganismos testados, o que pode gerar resultados diferentes.

O resultado negativo para a atividade antimicrobiana aponta conjuntamente com os dados obtidos nos ensaios com *Artemia salina*, e a atividade hemolítica para um caráter atóxico de produtos obtidos do caule da planta, ainda que a fração hexano do extrato do vegetal tenha demonstrado toxicidade contra o *Aedes aegypti*.

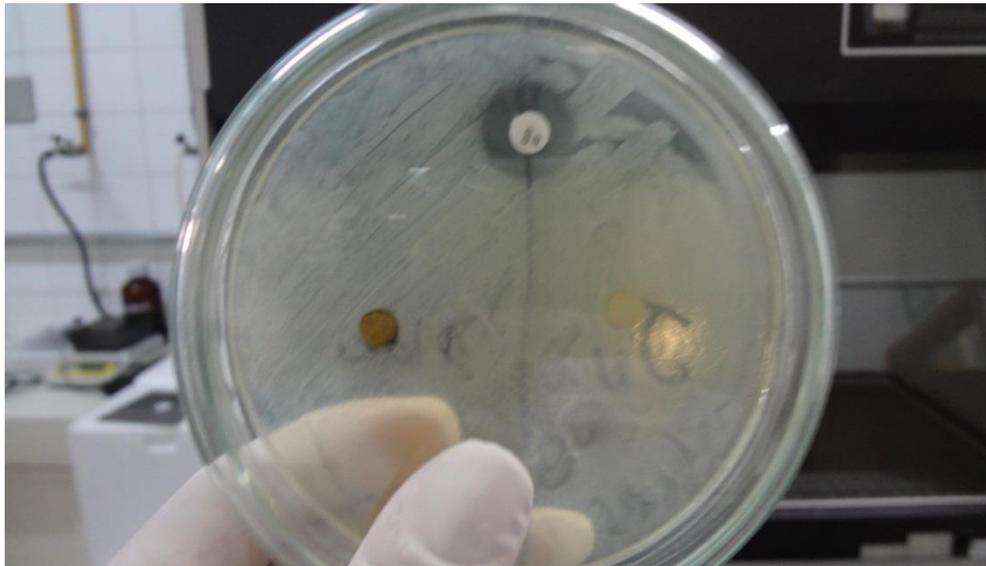


FIGURA 29. PLACA DE TESTE PARA O CRESCIMENTO DE *Agrobacterium tumefaciens*, CONTENDO NAS AMOSTRAS O EXTRATO BRUTO, NA CONCENTRAÇÃO 1000 mg/mL E OS CONTROLES REALIZADOS COM CLORANFENICOL E METANOL. NA PLACA OBSERVA-SE HALO DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO APENAS NO CONTROLE COM CLOANFENICOL. O MESMO OCORREU COM AS DEMAIS FRAÇÕES TESTADAS EM LINHAGENS BACTERIANAS E FÚNGICA.

Dado o fato de que as bactérias e fungo testados não apresentam alta resistência, sendo facilmente combatidos com antibióticos comuns, e serem os mais comumente causadores de infecções leves, considera-se aqui o extrato da planta testada como não potencial para estudos mais aprofundados para estudos microbiológicos, sendo descartada a necessidade de estudo de concentração inibitória mínima.

Neste caso, a resposta ao tratamento com os derivados do caule pode direcionar futuros estudos da planta, para atividades biológicas bastante interessantes do ponto de vista farmacológico.

O presente trabalho apresenta avaliações de atividade antioxidante *in vitro* bastante importantes para que o perfil químico da planta seja traçado, porém ainda é

necessário que se realizem testes *in vivo*, que considerem a ação dos compostos presentes no extrato diretamente sobre sistemas biológicos.

A resistência dos microrganismos ao extrato e a atividade antioxidante apontada nos ensaios químicos, possibilita o uso do extrato e frações para testes antioxidantes *in vivo*, utilizando cepas de *Saccharomices cerevisae*, proposto por SOARES et al, 2005.

Outra possibilidade para a continuidade dos estudos dada pelo resultado negativo de toxicidade do caule de *F. velloziana* frente aos microrganismos testados, é a viabilidade de estudos preliminares de atividade antitumoral, utilizando a bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, patogênica aos caules de batata (*Solanum tuberosum*).

Causadora de mutações gênicas que geram tumores no órgão do vegetal, *Agrobacterium tumefaciens* é utilizada em ensaios onde resultados positivos na diminuição da indução tumoral estão fortemente correlacionados aos resultados positivos em estudos de atividade antitumoral em células animais, o que torna estes ensaios preliminares utilizando a espécie bacteriana uma interessante fonte de informações para o direcionamento de estudo de extratos e compostos derivados de vegetais quanto a sua atividade antitumoral (FERRIGNI et al, 1982; COKER et al, 2003).

Estudos preliminares de atividade antitumoral são uma direção importante para o desenvolvimento de uma sequencia para os estudos de aplicação biológica desta espécie, considerando que tanto a sua família quanto o seu gênero apresentam um significativo uso medicinal para o tratamento deste tipo de enfermidades, assim como é discutido no próximo tópico, no qual são apresentados os resultados da atividade alelopática.

6.4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

6.4.4.1 Teste de Germinação

A avaliação da taxa de germinação das sementes de *Lactuca sativa* expostas a diferentes concentrações do extrato bruto *Forsteronia velloziana* e suas frações, durante o período de 120 horas, e está apresentada no FIGURA 30 (Extrato bruto),

FIGURA 31 (Fração hexano), FIGURA 32 (Fração clorofórmio), FIGURA 33 (Fração acetato de etila) e FIGURA 34 (Fração remanescente hidroalcoólico), expressas em porcentagem.

O IVG (Índice de velocidade de Germinação) dos tratamentos testados é encontrado na TABELA 10, sendo possível observar a redução da velocidade de germinação dos tratamentos em relação ao controle.

Nas sementes submetidas ao tratamento com as frações acetato de etila e remanescente hidro alcóolica, observou-se um efeito similar, porém menos pronunciado nas primeiras 72 horas, mas gradativo ao longo do período observado, isso independentemente da dose testada.

Ao final das 120 horas, tempo inferior ao previsto para o término do experimento as taxas de germinação alcançaram sua totalidade tanto nas placas de teste quanto nos controles, o que indica que o efeito alelopático do extrato sobre a planta, não inibindo a germinação, mas aumentando o período de tempo nos estágios iniciais.

TABELA 10. Índice de Velocidade de Germinação (IVG) das sementes de *L. sativa* expostas ao tratamento com extrato e frações de *F. velloziana* por 120 horas, as doses testadas foram de 0,25, 0,5 e 1 mg/mL de solução de MES.

ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG)						
Concentração (mg/mL)	BR	HEX	COLORO	ACE	HA	CTRL
0,25	109,2	100,38	111,63	133,50	116,63	
0,5	113,7	108,50	113,21	110,75	108,21	
1	107,4	107,16	113,83	117,63	125,25*	123,6

O índice é calculado pela divisão do número de sementes germinadas em cada tratamento divididas pelo número de dias de teste somadas ao final. Na tabela (BR) indica o resultado do extrato bruto, (HEX) da fração hexano, (CLORO) da fração clorofórmio, (ACE) da fração acetato de etila, (HA) do hidroalcoólico e (CTRL), o controle negativo realizado apenas com a solução do tampão MES em água destilada. O resultado que se demonstrou igual ao controle está assinalado com um asterisco, os demais IVGs foram diferentes.

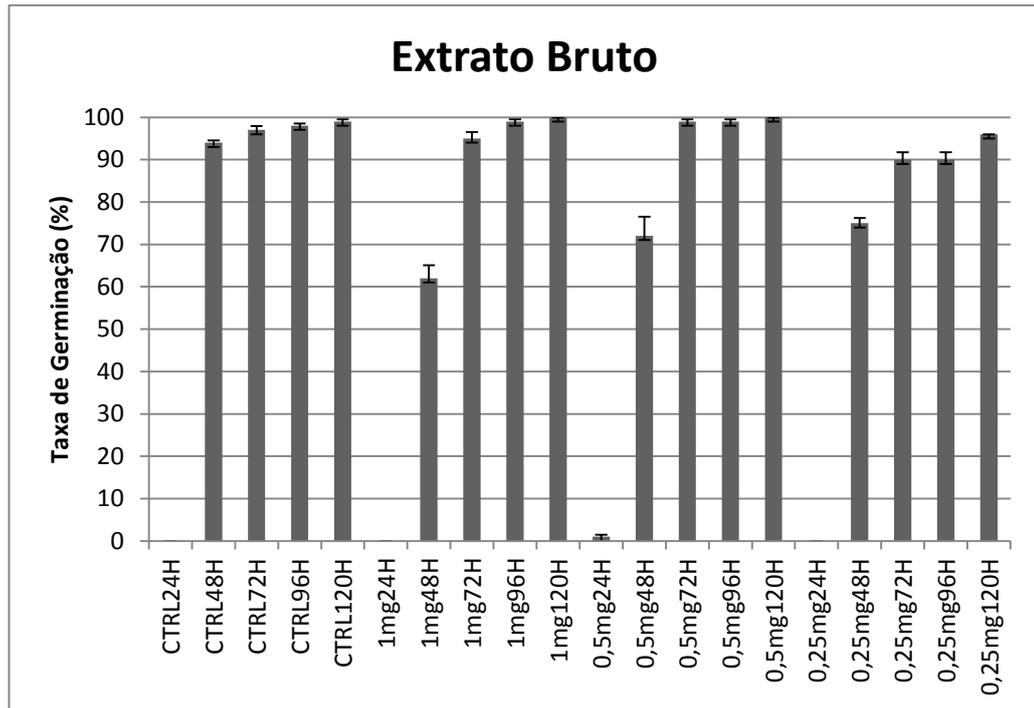


FIGURA 30. GRÁFICO DA TAXA DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *Lactuca sativa* EXPOSTAS AO EXTRATO BRUTO DE *F. velloziana* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DURANTE O PERÍODO DE 120 HORAS, EXPRESSO EM PORCENTAGEM. OS RESULTADOS FORAM SUBMETIDOS AOS TESTES DE ANOVA E TUKEY COM ($P \leq 0,05$) PARA A DETERMINAÇÃO DA SIGNIFICÂNCIA. OS RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES DO CONTROLE ESTÃO ASSINALADOS COM UM ASTERISCO.

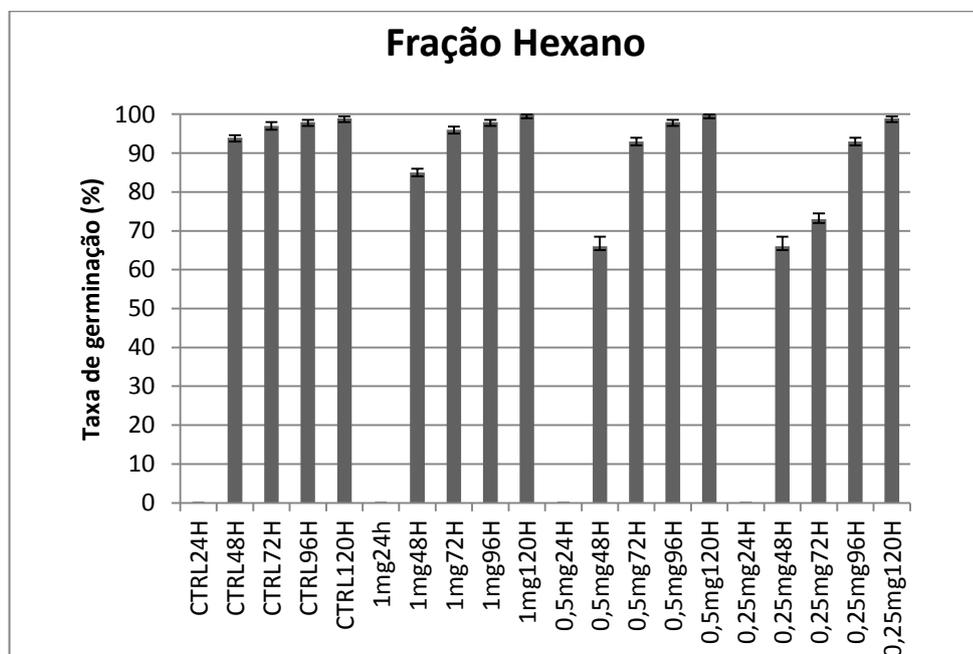


FIGURA 31. GRÁFICO DA TAXA DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *L. sativa* EXPOSTAS À FRAÇÃO HEXANO DO EXTRATO DE *F. velloziana* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, DURANTE O PERÍODO DE 120 HORAS, EXPRESSO EM PORCENTAGEM. OS RESULTADOS FORAM SUBMETIDOS AOS TESTES DE ANOVA E TUKEY COM ($P \leq 0,05$) PARA A DETERMINAÇÃO DA SIGNIFICÂNCIA. OS RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES DO CONTROLE ESTÃO ASSINALADOS COM UM ASTERISCO.

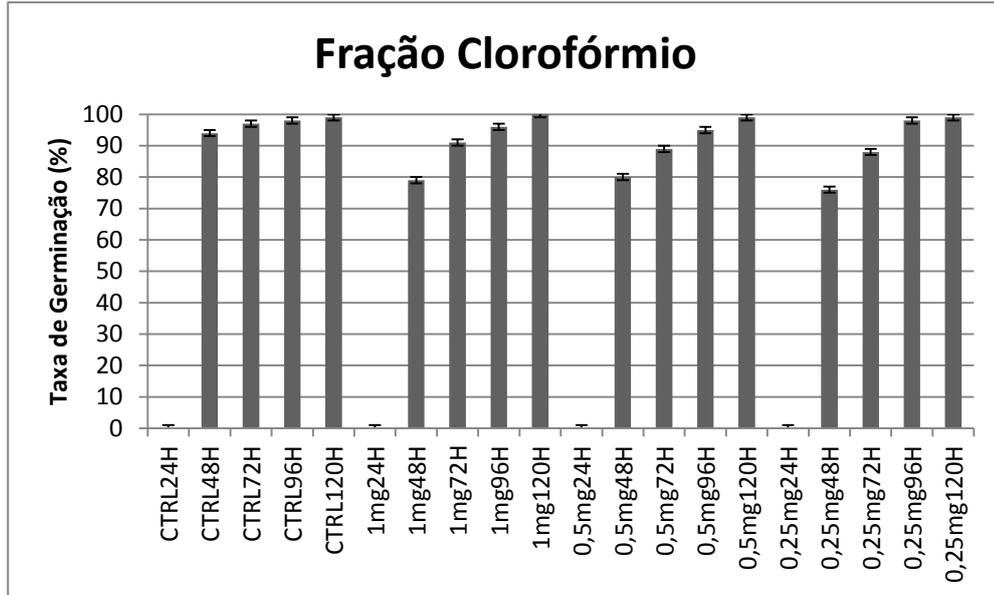


FIGURA 32. GRÁFICO DA TAXA DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *L. sativa* EXPOSTAS À FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DE *F. velloziana* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DURANTE O PERÍODO DE 120 HORAS, EXPRESSO EM PORCENTAGEM. OS RESULTADOS FORAM SUBMETIDOS AOS TESTES DE ANOVA E TUKEY COM ($P \leq 0,05$) PARA A DETERMINAÇÃO DA SIGNIFICÂNCIA. OS RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES DO CONTROLE ESTÃO ASSINALADOS COM UM ASTERISCO.

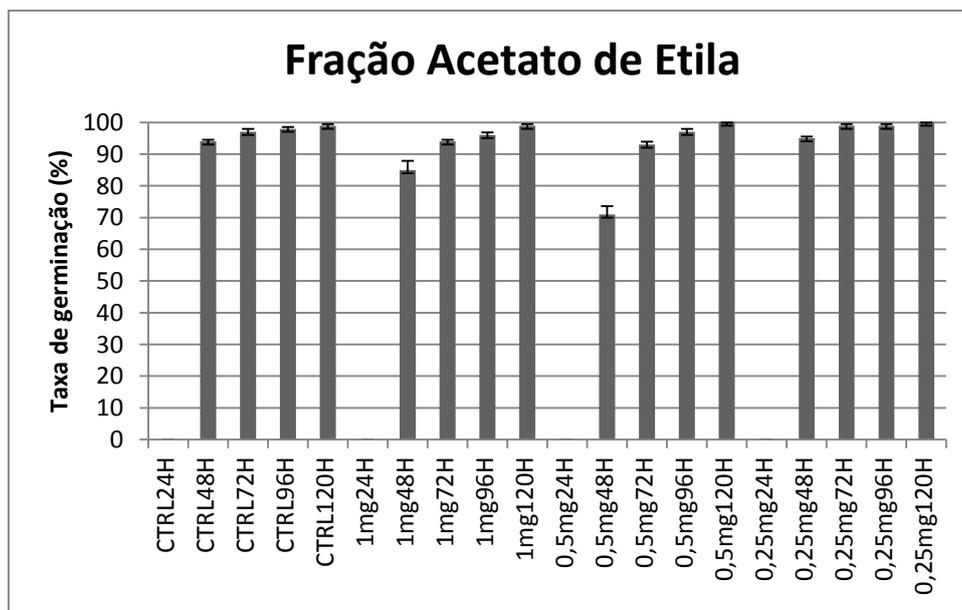


FIGURA 33. GRÁFICO DA TAXA DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *L. sativa* EXPOSTAS À FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE *F. velloziana* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DURANTE O PERÍODO DE 120 HORAS, EXPRESSO EM PORCENTAGEM. OS RESULTADOS FORAM SUBMETIDOS AOS TESTES DE ANOVA E TUKEY COM ($P \leq 0,05$) PARA A DETERMINAÇÃO DA SIGNIFICÂNCIA. OS RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES DO CONTROLE ESTÃO ASSINALADOS COM UM ASTERISCO.

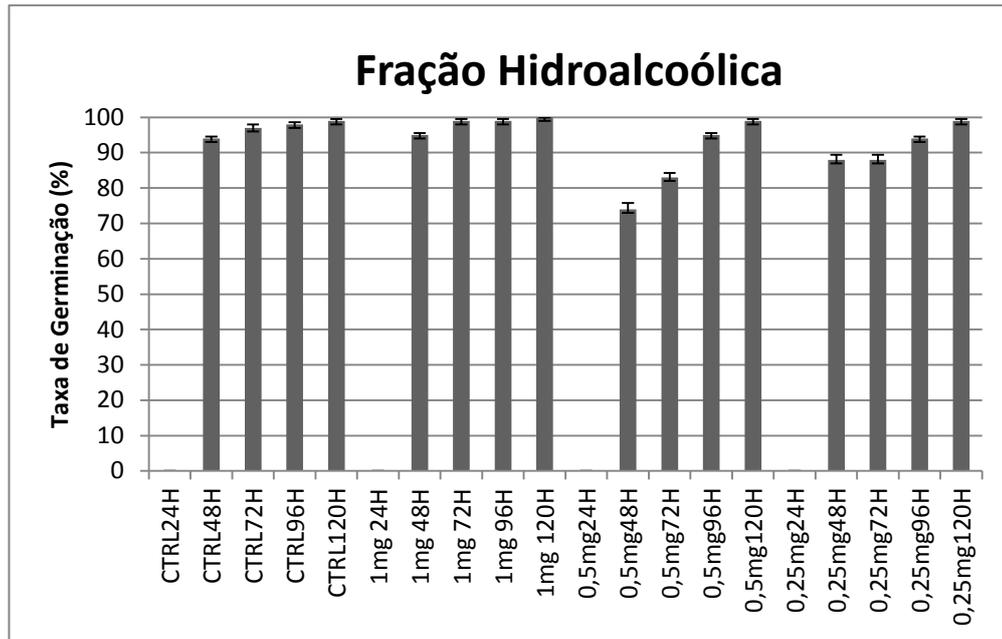


FIGURA 34. GRÁFICO DA TAXA DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *L. sativa* EXPOSTAS À FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE DO EXTRATO DE *F. velloziana* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DURANTE O PERÍODO DE 120 HORAS, EXPRESSO EM PORCENTAGEM. OS RESULTADOS FORAM SUBMETIDOS AOS TESTES DE ANOVA E TUKEY COM ($P \leq 0,05$) PARA A DETERMINAÇÃO DA SIGNIFICÂNCIA. OS RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES DO CONTROLE ESTÃO ASSINALADOS COM UM ASTERISCO.

O processo de germinação depende de três requisitos fundamentais: água, oxigênio e temperatura, além disso, em alguns casos como o das sementes de *Lactuca sativa* utilizadas no teste, sementes de ervas daninhas entre outras sementes pequenas, exigem a exposição à luz (RAVEN, 2007).

A inibição da taxa de germinação nos estágios iniciais nas frações mais apolares pode estar diretamente correlacionada com a redução da capacidade de embebição das sementes (TURK e TAWAHA, 2003). Este é o processo que permite com que a semente retenha líquido, o que ativa a enzima α -amilase, responsável por disponibilizar o amido que para o vegetal fornecendo recurso energético fundamental para a germinação (TEERARAK et al, 2012).

Considerado o papel da embebição neste processo, é possível supor que com este ocorrendo de forma lenta e progressiva nas sementes, a α -amilase passaria a se tornar ativa dependendo de um maior período de tempo, o amido passaria a se tornar livre permitindo a continuação da germinação até a protusão radicular e do hipocótilo, porém de forma mais lenta em relação ao controle, onde tais inibidores não estariam presentes.

O efeito alelopático pode ser mediado por diversas substâncias presentes nos vegetais, pertencentes a diferentes categorias de metabólitos secundários, entre eles ácidos graxos de cadeia curta, óleos essenciais, compostos fenólicos, alcaloides, esteroides e derivados de cumarinas (ALVES et al, 2004; WANDSCHEER e PASTORINI, 2008), estes grupos de compostos foram encontrados na prospecção fitoquímica preliminar, o que fundamenta não só a redução do IGV das sementes de alface expostas ao extrato e frações, mas também as alterações diagnosticadas na avaliação de crescimento, que serão apresentadas no próximo tópico.

6.4.4.2 Teste de Crescimento

A avaliação do crescimento das radículas e hipocótilos das sementes germinadas de *Lactuca sativa* submetidas ao tratamento com o extrato bruto e frações do caule de *Forsteronia velloziana* estão apresentados respectivamente nas FIGURAS 35 e 36, sendo expressas em milímetros.

Quanto ao crescimento radicular, é possível observar uma diminuição do seu crescimento em relação ao controle, exceto na fração acetato de etila em todos os tratamentos, na qual na dose de 1 mg/mL apresentou um crescimento superior ao do controle.

Também é possível considerar uma dependência diretamente proporcional a concentração nos tratamentos testados, considerando que as doses de 0,25mg/mL inibiu o crescimento radicular de forma menos intensa que a dose de 0,5mg/mL tratamento efetuado com o extrato bruto e com as frações hexano, clorofórmio e remanescente hidroalcoólico.

O crescimento do hipocótilo não recebeu influência do extrato e frações aos quais foram expostos, estatisticamente não houve diferença entre o tratamento e os controles. Embora este resultado seja negativo é importante considerar que a fração hexânica mais uma vez gerou uma diminuição no desenvolvimento, o que pode também ser explicado pela polaridade dos compostos retidos nesta fração, mas também pela ação alcaloídica e de outros compostos potencialmente citotóxicos nesta fração.

O efeito sobre o crescimento de radícula é correlacionado não mais á embebição das sementes, mas ás etapas posteriores no processo de germinação, diretamente dependentes da intensa atividade mitótica no embrião da planta (RAVEN et al, 2007).

Teerarak e colaboradores (2012) descreve a importância da inibição mitótica nos estágios iniciais de germinação, e a correlaciona ás ações de herbicidas comumente utilizados no controle de diversas plantas daninhas á sistemas agrícolas como o 2,4-d pentaclorofenol, o butaclor e a hidrazida maleica (ATEEK et al, 2002; MARCANO et al, 2004), todos estes agem inibindo a síntese de DNA e de proteínas nucleares durante o ciclo celular.

A inibição do ciclo celular pode estar diretamente correlacionada com a presença de alcaloides nesta planta, bem como em ocorre em outras plantas do mesmo gênero e família, sendo este grupo de substâncias considerado potencialmente citotóxico e citostático. O estudo realizado por MELO (2012) aponta para a ação alelopática do extrato de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC., que assim como *F. velloziana* pertencente á família Apocynaceae, gerando um efeito similar ao extrato e frações desta planta, não reduzindo a taxa de germinação, mas agindo diretamente sobre o desenvolvimento das radículas, e neste caso também dos hipocótilos de *Lactuca sativa*.

Este resultado é correlacionado com a presença dos fitoesteróis, também encontrados nesta planta, mas principalmente a inibição da celular gerada pelos alcaloides presentes no vegetal: isovoacangina, voacangina, catarantina, 3-hidroxi-coronaridina e coronaridina.

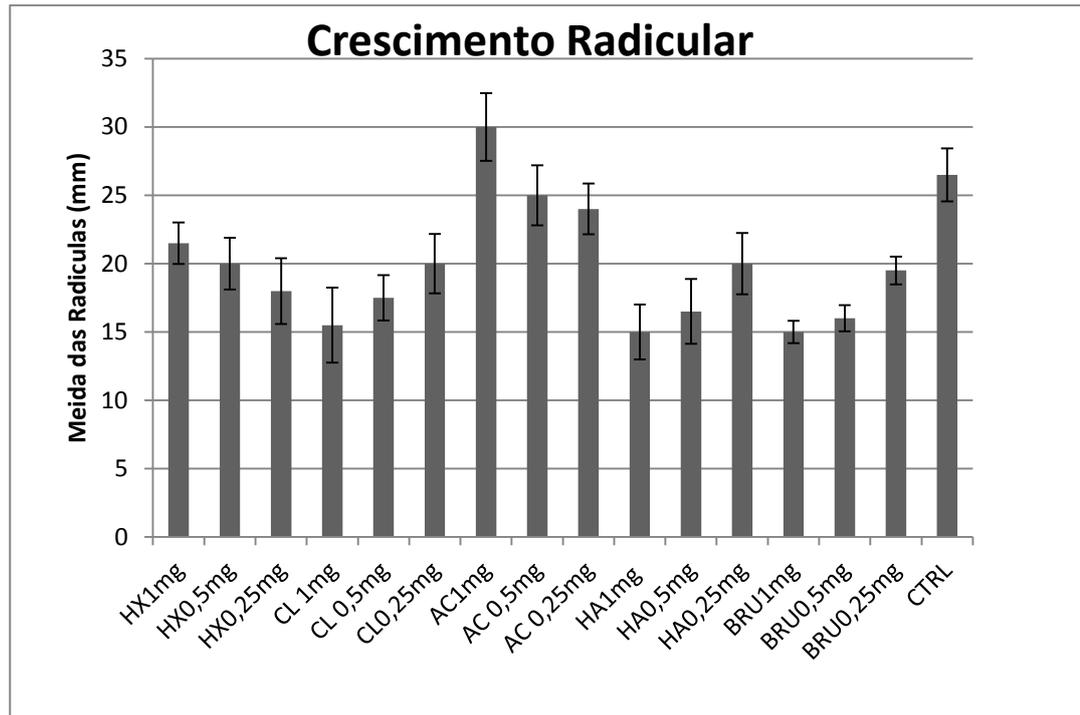


FIGURA 35. GRÁFICO DA MÉDIA DO CRESCIMENTO RADICULAR DE SEMENTES DE *L. sativa* EXPOSTAS AO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DE *F. velloziana* EXPRESSO EM MILÍMETROS. (HX) REFERE-SE À FRAÇÃO HEXANO, (CL) A FRAÇÃO CLOROFÓRMIO, (AC) À FRAÇÃO ACETATO DE ETILA, (HA) À FRAÇÃO HIDRO ALCOÓLICA REMANESCENTE, (BRU) AO EXTRATO BRUTO E (CTRL) AO CONTROLE REALIZADO SOMENTE COM ÁGUA DESTILADA E ÁCIDO MORFOETILSULFÔNICO. A DOSE ASSINALADA COM DOIS ASTERISCOS DEMONSTRU-SE SUPERIOR AO CONTROLE REALIZADO, AS DOSES MARCADAS COM DOIS ASTERISCOS, IGUAIS AO CONTROLE, AS DEMAIS DOSES SE MOSTRARAM INFERIORES. OS RESULTADOS FORAM SUBMETIDOS AOS TESTES DE ANOVA E TUKEY COM ($P \leq 0,05$) PARA A DETERMINAÇÃO DA SIGNIFICÂNCIA.

Outra planta deste mesmo gênero também apresenta ação direta sobre a divisão celular, porém neste caso sobre células animais de linhagens tumorais, o que possibilita uma análise breve sobre correlação entre a ação alelopática de determinados compostos e a atividade antitumoral.

O extrato aquoso e frações de *Tabernaemontana catharinensis* apresenta a sua atividade antitumoral comprovada experimentalmente por ALMEIDA e colaboradores (2004), a mesma atividade foi observada em outras Apocynaceas como *Rhazya stricta*, que possui alcaloides indólicos (MUKHOPADHYAY et al, 1981), *Achrosia acuminata*, cujas substâncias ativa são os alcaloides elipticina e 9-metoxielipticina (GRIMBLE, 1990), *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., cujo alcaloides apresentam atividade citostática na metáfase, entre muitas outras plantas que contém compostos com ação similar (CRAGG e NEWMANN, 2005; LIU et al, 2013).

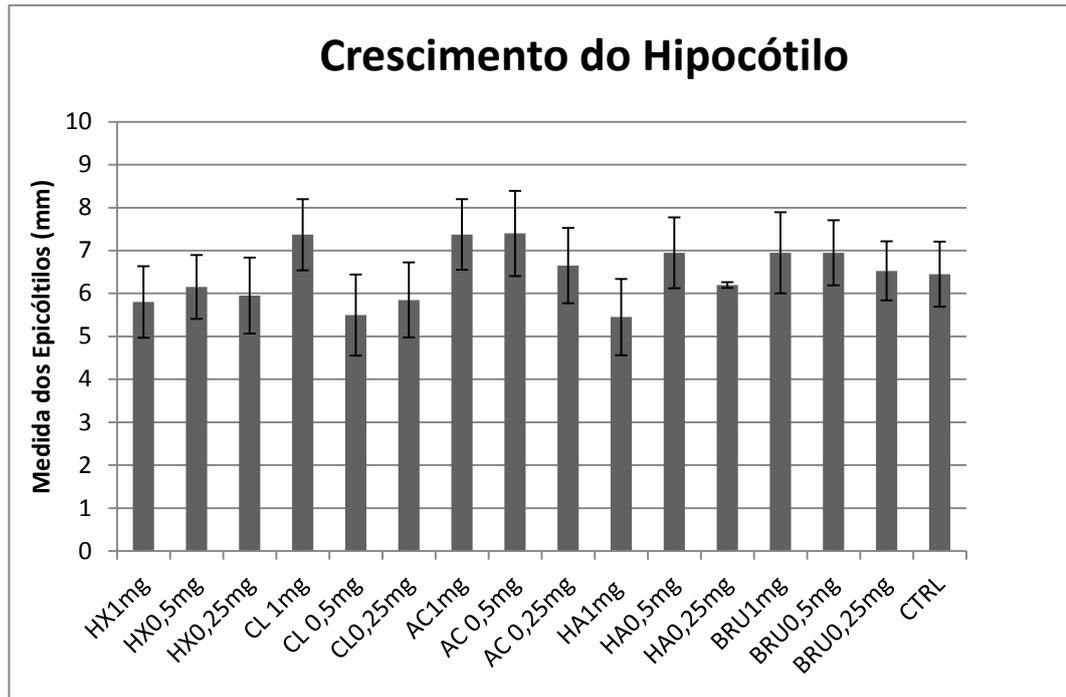


FIGURA 36. GRÁFICO DA MÉDIA DO CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO EM SEMENTES DE *L. sativa* EXPOSTAS AO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DE *F. vellosiana* EXPRESSO EM MILÍMETROS. (HX) REFERE-SE A FRAÇÃO HEXANO, (CL) A FRAÇÃO CLOROFÓRMIO, (AC) À FRAÇÃO ACETATO DE ETILA, (HA) À FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE, (BRU) AO EXTRATO BRUTO E (CTRL) AO CONTROLE REALIZADO SOMENTE COM ÁGUA DESTILADA E ÁCIDO MORFOETILSULFÔNICO. OS RESULTADOS FORAM SUBMETIDOS AOS TESTES DE ANOVA E TUKEY COM ($P \leq 0,05$) PARA A DETERMINAÇÃO DA SIGNIFICÂNCIA.

Até o presente momento, a única espécie do gênero *Forsteronia* estudada quanto a sua capacidade de inibição da mitose, é a já citada *F. refracta*, que tem uso popular para o tratamento de tumores (SMITH et al, 2005), e teve sua ação direta sobre a síntese de proteínas formadoras do fuso mitótico foi comprovada por XU-YA-MING e colaboradores (2006).

Considerada a ação dos alcaloides sobre a inibição da divisão celular. Em células vegetais, e a presença destes em plantas da família Apocynaceae e do gênero *Forsteronia* é considerável a sua ação sobre a formação do sistema radicular da *Lactuca sativa*, tal ação pode ser comprovada pelo uso da metodologia da genotoxicidade em *Allium cepa*, proposta por TEERARAK (2012).

De uma maneira geral, os testes de crescimento e germinação apontaram para a atividade biológica do extrato caule desta planta para com a espécie *Lactuca sativa*, agindo tanto no processo de germinação, como também influenciando o desenvolvimento inicial das partes aéreas do vegetal, o que possivelmente inibiria as

fases posteriores de desenvolvimento apontando assim um aspecto competitivo da espécie no ambiente que ocupa.

Substâncias químicas oriundas do metabolismo secundário funcionam como um mecanismo natural das plantas em relações ecológicas de competição ambiental, e o efeito ocasionado por esses compostos podem muitas vezes ser considerados “herbicidas naturais”. Os aleloquímicos isolados de plantas ou microrganismos são fonte potencial para modelos de novos tipos estruturais de herbicidas, mais específicos e menos prejudiciais ao meio ambiente (BHOWMIK e INDERJIT, 2003).

Não apresentando toxicidade ambiental, como indicaram os resultados obtidos no ensaio contra o microcrustáceo *Artemia salina*, o extrato bruto e frações de *Forsteronia velloziana* surgem como uma nova possibilidade para estudos preliminares para um novo herbicida, considerando sua ação nas sementes de *Lactuca sativa*, que é uma espécie bastante sensível por apresentar rápida germinação e adequada á estudos preliminares.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho torna-se relevante principalmente pela inicial falta de dados sobre a espécie nativa *Forsteronia velloziana*, a sua caracterização fitoquímica e seus dados farmacognósticos. A caracterização fitoquímica realizada apontou a presença de alcaloides, leucoantocianidinas, cumarinas, iridóides, esteroides, tri terpenos, ácidos fixos e voláteis.

Os resultados obtidos apontam para algumas possibilidades do uso desta espécie vegetal, pela capacidade antioxidante do seu extrato bruto, fração clorofórmio, acetato de etila e remanescente dada pela presença de compostos fenólicos e terpenos, pelo seu potencial alelopático observado especialmente nas frações hexano e clorofórmio e pela sua toxicidade ao mosquito vetor da dengue e da febre amarela, o *Aedes aegypti*, pela fração hexano do caule e extrato bruto das folhas.

Dados de toxicologia também são importantes, considerada a segurança para o consumo de produtos originários da planta. Embora os dados obtidos nos ensaios

de toxicidade contra *Artemia salina* e a avaliação da atividade hemolítica, complementados pelo resultado negativo em relação a todas as linhagens de microrganismos testados na avaliação da atividade antimicrobiana, ainda são necessários outros testes que garantam o caráter atóxico do extrato e frações desta espécie vegetal.

A não toxicidade demonstrada nos ensaios preliminares abre um leque de possibilidades de aplicação destes produtos de *F. velloziana*, principalmente para o uso ambiental no controle de espécies vegetais daninhas, uso indicado pelo ensaio de alelopatia ou como larvicida, sem apresentar toxicidade ambiental, o que é sugerido pelo ensaio com a *Artemia salina*.

O trabalho desenvolvido foi uma pequena contribuição para a caracterização de *Forsteronia velloziana* e do gênero *Forsteronia*. Outros passos ainda precisam dados em direção a informações mais específicas em relação ao seu uso, principalmente sobre a sua toxicologia, em testes mais acurados e sobre a sua atividade antitumoral, dado que seria relevante se considerados outros estudos sobre espécies da mesma família.

REFERÊNCIAS

ABHIJIT, D.; DE, J. N. Ethnobotanical aspects of *Rauvolfia serpentina* (L). Benth. ex Kurz. in India, Nepal and Bangladesh. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.5, n.2, p.144-150, 2011.

AIT-AISSA, S., PANDARD, P., MAGAUD, H., ARRIGO, A. P., THYBAUD, E. & PORCHER, J. M., Evaluation of an in vitro hsp70 induction test for toxicity assessment of complex mixtures: comparison with chemical analyses and ecotoxicity tests. **Ecotoxicology Environment Safe**. n.54, p. 92-104. 2003.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A. LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da Biologia Celular**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

ALMEIDA, L.; CINTRA, A. C.O; VERONESE, E. L.G.; NOMIZO, A.; FRANCO, J.J.; ARANTES, E.C.; GIGLIO, J.R.; SAMPAIO, S.V. Anticrotalic and antitumoral activities of gel filtration fractions of aqueous extract from *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae). **Comparative Biochemistry and Physiology: Toxicology & Pharmacology**. v.137, n.1, p. 19–27, 2004.

ANDERSON, JE.; GOETZ, CM.; McLAUGHLIN, JL.; SUFFNESS, M. A blind comparison of simple bench-top bioassay and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. **Phytochemistry Analysis**, vol. 2, p. 107-111, 1991.

ANDRADE, C.A.; COSTA, K.C.; BORA, K.; MIGUEL,M.D.; MIGUEL, O.G.; KERBER, V.A.Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. n.17, v.2, p.231-235, 2007.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes Naturais: Técnicas da Extração. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**. n.2, v.24, p.319-336, 2006.

ANVISA, Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada - Sexta Edição. M7-A6, Vol.23 N°2, 2003.

ARCANJO, D.D.R.; ALBUQUERQUE, A.C.M.; MELO-NETO, B.; SANTANA, L.C.L.R.; MEDEIROS, M.G.F; CITÓ, A.M.G.L. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 72, no. 3, p. 505-509, 2012.

ARRUDA, W.; CAVASIN; G.M.; SILVA, I.G. Estudo ultra-estrutural do efeito da toxicidade do extrato da *Magonia pubescens* (ST. HIL.) no mesêntero de larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Revista de Patologia Tropical**. n.37: p.255-267, 2008.

ATEEQ, B.; FARAH, M.A.; ALI, M. N.; AHMAD, W. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. **Mutation Research**. n. 514, p.105–113, 2002.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BALESTRIN, L. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopática, Benth. ex Kurz. in India, Nepal and Bangladesh. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.5, n.2, p.144-150, 2011.

BANERJEE, A. et al. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chemical and Biological Interact**. v. 174, n.2, p. 134-9. 2008.

BHOWMIK, P. C.; INDERJIT. Challenges and opportunities in implementing allelopathy for natural weed management. **Crop Protection**, v. 22, n. 8, p. 661-671, 2003.

BIANCO, E.M. Química e potencial antioxidante de folhas e caules de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr., Caesalpiaceae. Curitiba, 2003. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

BIONDO, R.; SOUZA, A. V.; BERTONI, B. W. ; SOARES, A. M.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Micropropagation, seed propagation and germplasm bank of *Mandevilla velutina* (Mart.) Woodson . **Scientia Agricola**, v.64, p.263-268, 2007.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Química do processamento de alimentos: pigmentos**. p 105-120. 2ª ed., Campinas: Varela, 1995.

BOLZANI, V.S.; SERUR, L. M.; MATOS, F. J. A.; GOITLIEBS, O. R. Indole Alkaloid Evolution in *Aspidosperma*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.15, n.2, p.187-200, 1987.

BOLZANI, V.S.; SILVA, M.F,G.F; ROCHA, A.I.; GOITLIEBS, O. R. Indole Alkaloids as Systematic Markers of the Apocynaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.12, n. 2, p. 159-166, 1984.

BRAGA, I.A.; LIMA, J.B.P.; SOARES, S.S.; VALLE, D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 99, p. 199-203, 2004.

BRASIL, EMBRAPA. 2004. Conservação, manejo e uso de sementes de *Hacornia speciosa* Gomez (Apocynaceae) <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/186141/1/doc126.pdf> Acesso em 15/07/2012.

BRASIL, IBAMA. 2011b. www.ibama.gov.br/ecossistemas/mata_atlantica.htm. Acesso em 24/04/2012.

BRASIL, IBAMA. 2012. <http://www.ibama.gov.br/lpf/madeira/pesquisa.php?idioma=portugues> Acesso em: 15/07/2012.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Primeiro Relatório para a Convenção sobre a Diversidade Biológica. 1988. <http://homolog-w.mma.gov.br/index.php?ido=conteudo.Monta&idEstrutura=14&idConteudo=1876> Acesso em 24/04/2012.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Quarto Relatório para a Convenção sobre a Diversidade Biológica. 2011a. http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/_publicacao/14_publicacao16062011035415.pdf Acesso em 24/04/2012

BROWN, R. On the Asclepiadeae, a natural order of plants separated from the Apocynae of Jussieu. **Memoirs of the Wernerian Natural History Society**, v.1, p.12-78, 1810.

BRASIL, Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle da Dengue, 2012. [www.portal.saude.gov.br/saude/area.cfm?idarea=920](http://portal.saude.gov.br/saude/area.cfm?idarea=920).

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para a análise de sementes. Brasília: SNAD/DNDV/CLAV, 1992.

BUENO-SÁNCHEZ, J.G.; MARTÍNEZ-MORALES, J.R.; STASHENKO, E. Actividad antimicobacteriana de terpenos Antimycobacterial activity of terpenes. **Revista de la Universidad Industrial de Santander**, v. 41, n.3, p.231- 240, 2009.

CAMPO, V.L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Química Nova**. vol.30 n.2, 2007.

CARVALHO, J. L. de C. Contribuição ao estudo fitoquímica e analítico do *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae. Curitiba, 2001. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Paraná.

CARVALHO, C. A.; LOURENÇO, M.V.; BERTONI, B.W.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, P.S.; FACHIN, A.L.; PEREIRA, A.M.S. Atividade antioxidante de *Jacaranda decurrens* Cham., Bignoniaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia** . vol.19, n.2, p. 592-598. 2009.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p.131-134, 2005.

CICCIA, G.; COUSSIO, J.; MONGELLI, E. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 72, p.185–189, 2000.

CHAMBERS, J. E.; CARR, R. L. Effects of paraoxon, p-nitrophenol, phenyl saligenin cyclic phosphate, and phenol on the rat. **Toxicology**. v.105, p. 291-304. 1995.

CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; RAKARIYATHAM, N. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. **Food Chemistry**. n.92, p. 491-497, 2005.

CHARLES, J.F. Histopatologie de l' actino de la delta endotoxine de *Bacillus thuringiensis* var. israelensis sur larves d'*Aedes aegypti* (Dipetra: Culicidae). **Entomophaga**. n. 26, p. 203–212., 1981.

CHORILLI, M.; LEONARDI, G.R.; SALGADO, H.R.N. Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. **Revista Brasileira de Farmácia**. n. 88, p.113-118, 2007.

CHOI, C.W.; KIM, S.C.; HWANG, S.S.; CHOI, B.K.; AHN, H.J.; LEE, M.Y.; PARK, S.H.; KIM, S.K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**. n. 163, p. 1161-1168, 2002.

COKER, P.S.; RADECKE, J., GUY, C.; CAMPER, N.D. Potato disc tumor induction assay: A multiple mode of drug action assay. **Phytomedicine**, v.10, n. 2,p. 133-138. 2003.

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R., The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, v.15, n.3, p.183-205, 2001.

CORDELL, G. A. Alkaloids derived from tryptophan. In Introduction to alkaloids: abiogenetic approach, Wiley: New York, 1981.

CRAGG; G. M.; NEWMAN, D.J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**. v.100, n. 1–2, p.72–79, 2005.

DALL´STELLA, D.S.G. Estudo fitoquímico aplicado da fração solúvel do extrato etanólico bruto da *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae). Curitiba, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

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

DeFILIPPS, R.A.; MAINA, S.L. & CREPIN, J. Medicinal Plants of the Guianas. 2004. <http://www.mnh.si.edu/biodiversity/bdg/medicinal/index.html>, acesso em: 23/06/2012.

DEMARCO D. ; KINOSHITA, L. S.; CASTRO, M. M. Laticíferos articulados anastomosados – novos registros para Apocynaceae. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 29, n.1, p.133-144, 2006.

DIAS. J. F. G. Estudo alelopático aplicado de *Aster lanceolatus*, Willd. Curitiba, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAGEN, T.J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciência Farmacêutica Básica Aplicada**.v.28, n.3, p. 241- 249, 2007.

DUKE, J.A.; VASQUEZ, R. **Amazonian ethnobotanical dictionary**. 215p. London: BocaRaton/Ann Arbor/CRC, 1994.

ENDRESS, M.E.; BRUYNS, P.V. A revised classification of Apocynaceae s.l. **The Botanical Review**, v. 66, p.1-56, 2000.

EVANS´, W.C. Trease and Evans´ **Pharmacognosy**. 14th edition. WB Saunders Company Ltd. London, 1996.

FALCÃO, M. A.; CLEMENT, C. R.; GOMES, J. B. M. Fenologia e produtividade da sorva (*Couma utilis* (mart.) muell. arg.) na Amazônia central. **Acta Botanica Brasilica**. n.1, v. 4, p.541-547, 2003.

FERRIGNI, N.R.; PUTMAN, J. E.; ANDERSON, B. Modification and evaluation of the potato disc assay and antitumor screening of Euphorbiaceae seeds. **Journal of Natural Products**, n. 45, p. 679–686. 1982.

FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E. Alelopatia: Uma área emergente da Ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. n. 12(Edição Especial), p.175-204, 2000.

FINNEY, D.J. **Probit Analysis**. 3º Edition, Cambridge University Press, 1971.

FLECK, J. D.; KAUFFMANN, C.; SPILKI, F.; LENCINA, C.L.; ROEHE, P.M.; GOSMANN, G. Adjuvant activity of *Quillaja brasiliensis* saponins on the immune responses to bovine herpesvirus type 1 in mice. **Vaccine**. n. 24, p. 7129-7134, 2006.

FCR,2012.http://www.thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/apocynaceae.html Acesso em 25/07/2012.

GARCEZ, W.S.; GARCEZ, F.R.; SILVA, L.M.G.E.; HAMERSKI, L. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of some plants native to the West- Central region of Brazil. **Bioresource Technology**, v.100, p.6647-6650, 2009.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; SILVA, L. M. G. E.; SARMENTO, U. C. Substâncias de origem vegetal com atividade larvídica contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**, n.5, v.3, p. 363-393, 2013.

GILBOA, I. ; HALSAO, B. W.; KAISER E.; KLEMMER ,K.; MINTON,S.; RUSSELL, F. E. Species index toxicon. **Toxicon**, v.16, p.309-332, 1978.

GILL, S.S.; COWLES, E.A.; PIETRANTONIO, P.V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annual Review of Entomology**, n. 37, p.616–636,1992.

GOMES, S. M.; CAVALCANTI, T. B. Morfologia floral de *Aspidosperma* Mart. & Zucc. (Apocynaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.15, n.1, p. 73-88, 2001.

GRAHAM, J. G.; PENDLAND, S. L.; PRAUSE, J. L.; DANZINGER L. H.; J. SCHUNKE VIGO; CABIESES, F.; FARNSWORTH, N. R. Antimycobacterial evaluation of Peruvian plants. **Phytomedicine** , v.10, p. 528–535, 2003.

GRIMBLE, G.W. Synthesis and antitumor activity of ellipticine alkaloids and related compounds. In: **The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology**. BROSSI, A. v.39, San Diego, California: Academic Press,1990.

GÜLCIN, I.; OKTAY, M.; KIRECCI, E.; KÜFREVIÖGLU, O.I. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L) seed extracts. **Food Chemistry**. n.83, p.371-382, 2003.

HALLIWELL, B.;GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3 ed. Clarendon, Oxford. 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymology**. n.186 p.1-85, 1990.

HARTBERG W.K., CRAIG-JR, G.B. Reproductive isolation in *Stegomyia* mosquitoes. II Hybrid breakdown between *Aedes aegypti* and *A. mascarensis*. **Evolution**, n.24, p.692-703,1970.

HANSEN, B.F. **A monographic revision of *Forsteronia* (Apocynaceae)**. PhD Thesis.University of South Florida, Tampa. 1985.

HENNEBERG, R. Estudo do efeito antioxidante de polifenóis em eritrócitos de

portadores de hemoglobina S . Curitiba, 2013. Tese (Doutorado) em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A.; LIMBERGER, R.P.; MORENO, P.R.H. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHERENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Florianópolis: UFSC, 2004.

HEO, H.J.; LEE, C.Y. Protective effects of quercetin and vitamin C against oxidative stress-induced neurodegeneration. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, n.52, v.25, p. 7514-7517, 2004.

HO, B.C.; KHOO, H.G.N.; CHEW, L.; WONG, K.P.; EWERT, A. Food ingestion and digestive enzymes in larval *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**. v. 29, n. 6, p. 960-964, 1992.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**., v. 53, n. 6, p. 1.841-1.856, 2005.

ILHA, S. M.; MIGLIATO, K.F.; VELLOSA, J. C. R.; SACRAMENTO, L.V.S. PIETRO, R.C.L.R.; ISAAC, V.L.B.; 1 BRUNETTI, I.L.; CORRÊA, M.A.; SALGADO H.R.N. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. n.18, v. 3, p. 387-393, 2008.

JASWIR, I; CHE MAN, Y. B.; KITTS, D. D. Use of natural antioxidants in refined palm olein during repeated deep-fat frying. **Food Research International**, v.33, n. 6, p. 501-508, 2000.

JIMENEZ, G.; HASEGAWA, M.; RODRÍGUEZ, M.; ESTRADA, O. ; MENDEZ, J.; CASTILLO, A.; GONZALEZ-MUJICA, F.; MOTTA, N.; VÁSQUEZ, J.; ROMERO-VECCHIONE, E. Biological screening of plants of the Venezuelan Amazons. **Journal of Ethnopharmacology**, v.77, p.77–83, 2001.

KAISER, S.; PAVEI, C. ; ORTEGA, G. G. Estudo da relação estrutura-atividade de saponinas hemolíticas e/ou imunoadjuvantes mediante uso de análise multivariada. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20, n.3, p. 300-309, 2010.

KIM M. K., AHN, S.H., LEE-KIM, Y.C. Relationship of serum α -tocopherol, carotenoids and retinol with the risk of breast cancer. **Nutrition Research**. n. 21, p.797-809, 2001.

LARROSA, C. R. R.; DUARTE, M. R. Anatomia foliar e caulinar de *Forsteronia glabrescens*, Apocynaceae. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, vol. 25, n.1 p. 28-34, 2006.

LARSON, R. A.; MARLEY, K. A., Quenching of singlet oxygen by alkaloids and related nitrogen heterocycles. **Phytochemistry**, n.23, v.10, p.2351-2354, 1984.

LEITE, J.J.G.; BRITO, E.H.S; CORDEIRO, R.A.; BRILHANTE, R.S.N.; SIDRIM, J.J.C.; BERTINI, L.M.; MORAIS, S.M. ; ROCHA, M.F.G. Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.2, p.110-113, 2009.

LEVIN, D. A.; YORK, B. M. J., The toxicity of plant alkaloids: an ecogeographic perspective. **Biochemical Systematics and Ecology**, n.6, v.1, p. 61-76, 1978.

LEWAN, L.; ANDERSON, M.; MORALES-GOMEZ, P. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 20, p. 297-301, 1992.

LHULLIER, C.; HORTA, P.A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, n.16, v.2, p.158-163, 2006.

LIMA, J.B.; PEREIRA DA CUNHA, M.; CARNEIRO DA SILVA, R.; GALARDO, A.K.R.; SOARES, S.S.; BRAGA, I.A.; RAMOS, R.P.; VALLE, D. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.68, p. 329-33, 2003.

LIU, L.; CAO, J.X.; YAO, Y.C.; XU, S.P. Progress of pharmacological studies on alkaloids from Apocynaceae. **Journal of Asian Natural Products Research**. n.15, v.2, p.166-184, 2013.

LOGSDON, N.B.; FINGER, Z.; ARTIOLI, C.G. Caracterização físico-mecânica da madeira de peroba-mica, *Aspidosperma populifolium* A. DC. (APOCYNACEAE). **Floresta**, v.38, n.1, 2008.

LOPES, T. J. ; XAVIER, M. F.; QUADRI, M. G. N.; QUADRI, M. B. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.13, n.3, p. 291-297, 2007.

LORENZI, H.; SOUZA, V. C. **Botânica sistemática: Guia Ilustrado para Identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG III**. Instituto Plantarum, São Paulo, 2009.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biology and Chemistry**. n.93, p. 265–275, 1951.

MACEDO, M.L.R.; FERNANDES, K.V.S.; SALES, M.P.; XAVIER-FILHO, J. Vicillins variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) Seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). **Comp. Biochem. Phys.** n. 105, p. 89-94, 1993.

MALHEIROS, A.; PERES, M. T. L. Alelopatia: interações químicas entre as espécies. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó/SC: Argos Universitária, 2001.

MANN, J. **Secondary metabolism**. p.374, Oxford, Claredon press. 1987.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X.; Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environment Research**. n. 94, p. 221–226, 2004.

MARTINS, E.S.; DINIZ, M.A.; GONÇALVES, A.E. O género *Lindolphia* P. Beauv. (Apocynaceae) na Guiné- Bissau. **Portugaliae Acta Botanica**, v.19, p.409-415, 2000.

MAZZA, G.; MINIATI, E. **Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains**. p. 362 . CRC Press, London, 1993.

MENSOR, L. L., et al. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoterapy Research**, v.15, p.127-130, 2001.

MELO, A. M. M. F. Estudo químico e atividade biológica de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. (APOCYNACEAE). 2012. xxiii, 154 f., il. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)—Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

MEYER, B. N., et al. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v.45, p.31-34, 1982.

MITTERMEIER, R.A.; FONSECA, G.A.B.; RYLANDS, A.B.; BRANDON, K. Uma Breve História da Conservação no Brasil. **Megadiversidade**, v.1, n.1, 2005.

MITTERMEIER, R.A.; MYERS, N.; THOMPSEN, J.G.; FONSECA, G.A.B.; OLIVIERI, S. Biodiversity hotspots and major wilderness areas: approaches to setting conservation priorities. **Conservation Biology**. v.12, p.516-520, 1998.

MOON, H.I.; KIM, E.J.; LEE, H.K.; CHUNG, J.H. The effect of sativan from *Viola vercunda* A. Gray on the expressions of matrix metalloproteinase-1 cause by ultraviolet irradiated cultured of primary human skin fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**. n. 104, p.12-17, 2006.

MORAIS, S.M.; CATUNDA-JUNIOR, F.E.A.; SILVA, A.R.A.; MARTINS-NETO, J.S.; RONDINA, D.; CARDOSO, J.H.L. Antioxidant activity of essential oils from Northeastern Brazilian Croton species. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

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

MORTON, J.F. **Plant poisonous to people**. 12p. Miami: Hurricane House, 1971.

MOURA, M. D. B. M.; AGRA, M. F. Apocynaceae tóxicas e medicinais ocorrentes nos estados de Pernambuco e Paraíba, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.3, n.2, p.273-279, 1989.

MUKHOPADHYAY , S.; HANDY , G.A.; FUNAYAMA , S.; CORDELL, G.A. Anticancer Indole Alkaloids of *Rhazya stricta*. **Journal of Natural Products**, n.44 v.6, p. 696–700, 1981.

NORIEGA, F. WELLS, M. A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**. 45. p. 613-620, 1999.

OMINOA, E.A.; KOKWARO, J.O. Ethnobotany of Apocynaceae species in Kenya. **Journal of Ethnopharmacology** , v.40, p.167- 180, 1993.

PANWAR, G.S.; ATTITALLA, I. H.; GURU, S.K. An Efficient in vitro Clonal Propagation and Estimation of Reserpine Content in Different Plant Parts of

Rauwolfia serpentina L. **American-Eurasian Journal of Scientific Research**, v.6, n.4, p.217-222, 2011.

PAUL, A.; HARRINGTON, L.C.; SCOTT, J.G. Evaluation of novel insecticides for control of dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**. V. 43, n. 1, p. 55- 60, 2006.

PELLETIER, S. W.; CHOKSHI, H. P.; DESAI, H. K., Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid-chromatography. **Journal of Natural Products** n.49, v.5, p.892-900, 1986.

PENNA, M. Dicionário brasileiro de plantas medicinais. Rio de Janeiro, Oficinas Gráficas de A Noite,1941.

PEREIRA,N.A.Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antidotes; IV. Protection against jararaca venom by isolated constituents. **Planta medica**, v. 60, p. 99-100, 1994.

PEREIRA, M.M.; JÁCOME, ROSE L. R. P.; ALCÂNTARA, A. F.C.; ALVES, R. B.; RASLAN, D. S. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p.970-983, 2007.

PERES, L.E.P. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba - São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. p.1-10, 2004.

PETERS W Peritrophic Membranes. In: BRADSHAW, S.D.; BURGGREN, W.; HELLER, H.C.; ISHII, S.; LANGER, H.; NEUWEILER, G.; RANDALL, D.J. (eds). **Zoophysiology** Nr, Springer, Berlin, Germany, p.1- 237.1992.

PIMENTEL, M. F. ; SILVA JÚNIOR, F. C. G. ; SANTAELLA, S. T. ; LOTUFO, L. V. C. O Uso de *Artemia* sp. como Organismo-Teste para Avaliação da Toxicidade das Águas Residuárias do Beneficiamento da Castanha de Caju Antes e Após Tratamento em Reator Biológico Experimental. **Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology**., v. 6, n. 1, p.15-22, 2011.

PINHEIRO, V.C.S.; TADEI, W.P. Evaluation of the residual effect of temephos on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae in artificial containers in Manaus, Amazonas State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, n.18, p.1529-1536, 2002.

PIRES, A.P.S.; OLIVEIRA, C.D.R.; YONAMINE, M. Ayahuasca: uma revisão dos aspectos farmacológicos e toxicológicos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas**. v.31, n.1,p.15-23, 2010.

PRATT, W.B.; RUDDON, R.W.; ENSMINGER, W.D.; MAYBAUM, J. **The Anticancer Drugs**. 2.ed. New York: Oxford, 1994.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p.337-341, 1999.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Cap.1 Biologia da Conservação e Diversidade Biológica. Londrina, 2002.

QUEIROZ-VOLTAN, R.B. ; STUBBLEBINE, W.H. ; SHEPHERD, G. The role of terpene variation in *Hyptis suaveolens* in the defense against herbivores. **Bragantia**, v.54, n.2, p.217-235, 1995.

QUINET, C.G. P.; ANDREATA, R. H. P. Estudo taxonômico e morfológico das espécies de Apocynaceae na reserva Rio das Pedras, município de Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. Pesquisas, **Botânica**, n.56 p.13-74, 2005.

RAHUMAN,A. A.; GOPALAKRISHNAN, G.; VENKATESAN, P.; GEETHA, K. Isolation and identification of mosquito larvicidal compound from *Abutilon indicum* (Linn) Sweet. **Parasitology Research**, v.102, p. 981-988, 2008.

RAPINI, A. Taxonomy “under construction”: advances in the systematics of Apocynaceae, with emphasis on the Brazilian Asclepiadoideae. **Rodriguésia**, v.63, p.75-88, 2012.

RAPINI, A.; KOCH, I.; KINOSHITA, L.S.; SIMÕES, A.O.; SPINA, A.P. Apocynaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB004591> Acesso em: 10/07/2012.

RATES, S.M.K. **Plants as source of drugs**. Toxicon. Amsterdam, v.39, p.603-613, 2001.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. cap.22, p. 516-522, 7° edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2007.

REGNAULT-ROGER, C.M.; RIBODEAU, A.; HAMRAOUI, I.; BAREAU, P.; BLANCHARD, M.; GIL-MUNOZ, F.T.; BARBERAN, F. Polyphenolic compounds of Mediterranean Lamiaceae and investigation of orientational effects on *Acanthoscelides obtectus* (Say). **Journal of Stored Products Research**, v. 40, p. 395-408, 2004.

RICHARDS, A.G.; RICHARDS, P.A. The peritrophic membranes of insects. **Annual Review of Entomology**, n. 22 p.219-240, 1977.

RIO, M.C.S. Estudos anatômicos em espécies de *Forsteronia* G.Mey. (Apocynaceae) de cerrado. Campinas, 2006. 158f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas).

RIVAS, P.; CASSELS, B. K.; MORELLO, A.; REPETTO, Y. Effects of some .beta.-carboline alkaloids on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Comp. Biochememistry Physiology**, v.122C, p. 27-31,1999.

RIZZINI, C.T. & MORS, W.B. *Botânica econômica brasileira*. EPU & USP, São Paulo, 1976.

RODRIGUES, E.; DUARTE-ALMEIDA, J.M.; PIRES, J. M. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicas. Parte I. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** , v.20, n.6, p.981-991, 2010.

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

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Roca, 1996.

SAITO, Y.; SHIGA, A.; YOSHIDA, Y.; FURUHASHI, T.; FUJITA, Y.; NIKI, E. Effects of a novel gaseous antioxidative system containing a rosemary extract on the oxidation induced by nitrogen dioxide and ultraviolet radiation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. n. 68, v.4, p. 781-786, 2004.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHERENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Florianópolis: UFSC, 2004.

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHERENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Florianópolis: UFSC, 2007.

SANTURIO, J. M; SANTURIO D.F.; POZZATTI, P.; MORAES, P.; FRANCHIN P.R.; ALVES, S.H. Antimicrobial activity of essential oils from oregano, thyme and cinnamon against *Salmonella enterica* sorovars from avian source. **Ciência Rural**, v.37, n.3, 2007.

SANZ-BISET, J.; CAMPOS-DE-LA-CRUZB, J.; EPIQUIÉN-RIVERAC, M. A. CNIGUERAL, S. A first survey on the medicinal plants of the Chazuta valley (Peruvian Amazon). **Journal of Ethnopharmacology**, v.122, p.333–362, 2009.

SANZ-BISET, J.; CNIGUERAL, S. Plant use in the medicinal practices known as “strict diets” in Chazuta valley (Peruvian Amazon). **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, p. 271– 288, 2011.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.M.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R., **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. cap.15, p.291-320. 2.ed. Florianópolis. UFSC; Porto Alegre: UFRGS, 2000.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V.E. **Medicinal plants, phytomedicines, and phytotherapy**. Rational phytotherapy: a physician’s guide to herbal medicine. 4.ed. cap.1, p.1-39. New York, Berlin: Springer, 2001.

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

SENBLAD, B.; ENDRESS, M.E.; BREMER, B. Morphology and molecular data in phylogenetic fraternity: the tribe Wrightieae (Apocynaceae) revisited. **American Journal of Botany**, v.85, p.1143-1158, 1998.

SIES H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. **American Journal of Medicine**. n.91, p.31-8S, 1991.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J.R. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. 4 ed. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS. 1994.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos Essenciais In: SIMÕES, C.M.O.; SCHERENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: UFSC, 2007.

SILVA, C.S.P.; PROENÇA, C.E.B. Uso e disponibilidade de recursos medicinais no município de Ouro Verde de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.22, n.2, p.481-492, 2008.

SILVA, L.B.; SILVA, W.; MACEDO, M.L.R.; PERES, M.T.L.P. Effects of croton urucurana extracts and crude resin on *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae)". **Brazilian Archives of Biology and Technology**. n.52, p. 653-664. 2009.

SILVA, M.S.; FANTINI, A.C.; SHANLEY, P. Látex de amapá (*Parahancornia fasciculata* (Poir) Benoist, Apocynaceae): remédio e renda na floresta e na cidade. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi de Ciências Humanas**, Belém, v. 6, n. 2, p. 287-305, 2011.

SIMÕES, A. O.; ENDRESS, M. E.; NIET, T. KINOSHITA, L. S.; CONTI, E. Tribal and intergeneric relationships of mesechiteae (apocynoideae, apocynaceae): evidence from three noncoding plastid dna regions and morphology. **American Journal of Botany**, vol.91, n.9, p.1409–1418, 2004.

SINDIMASP, Sindicato do comércio atacadista de madeiras de São Paulo. <http://www.sindimasp.org.br/conteudo/madeira/madeira.asp> Acesso em: 01/08/ 2012.

SMITH, J.A.; POOTED- SMTH, C.E. Identification of the First Specific Inhibitor of p90 Ribosomal S6 Kinase (RSK) Reveals an Unexpected Role for RSK in Cancer Cell Proliferation. **Cancer Research**. n. 65, p. 1027-1034, 2005.

SOUZA, J.S.I.; PEIXOTO, A.M.; TOLEDO, F.F. **Enciclopédia Agrícola Brasileira**, v.4, EdUSP,1995.

SUN, H.X.; PAN, H.J. Immunological adjuvant effect of *Glycyrrhiza uralensis* saponins on the immune responses to ovalbumin in mice. **Vaccine**. n. 24. p. 1914-1920, 2006.

SVENSSON, B. M., MATHIASSEN, L., MARTENSSON, L.; BERGSTROM, S., *Artemia salina* as test organism for assessment of acute toxicity of leachatewater from landfills. **Environ.Monit. Assess**, n.102, p.309-321, 2005.

TAYLOR, P.R.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M.; LIN, H.H. Brown, G.D.; Gordon, S. Macrophage receptors and immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 901-944, 2005.

TEERARAK, M.; CHAROENYING, P.; LAOSINWATTANA, C. Physiological and cellular mechanisms of natural herbicide resource from *Aglaia odorata* Lour. On bioassay plants. **Acta Physiologiae Plantae**. v. 34, p.1277-1285, 2012.

TORRES, C.; GALETTO, L. Patterns and implications of floral nectar secretion, chemical composition, removal effects and standing crop in *Mandevilla pentlandiana* (Apocynaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.127, p.207-223,1998.

TOSCAN, C. M. Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenóides. Caxias do Sul, 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade de Caxias do Sul. Centro de Ciências Agrárias e Biológicas.

TURK, M.A.; TAWAHA, A. M. Allelopathic effect of black mustard (*Brassica nigra* L.) on germination and growth of wild oat (*Avena fatua* L.). **Crop Protection** . n. 22, p. 673–677, 2003.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.42, n.2,2006.

VALLILO, M.I.; BUSTILLOS, O.V.; AGUIAR, O.T. Identificação de terpenos no óleo essencial de frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg - Myrtaceae. **Revista do Instituto Florestal**, v.18, p.15-22, 2006.

VASCONCELLOS, M. B.; GOUVEA, L. S. K. As Apocynacea da Região de Poços de Caldas, Minas Gerais, Brasil. **Acta Brasileira de Botânica**. vol. 7, n.1, p. 107-127, 1993.

VENANCIO, T.M.; CRISTOFOLETTI, P.T.; FERREIRA, C.; VERJOVSKI-ALMEIDA; S.; TERRA, W.R. The *Aedes aegypti* larval transcriptome: a comparative perspective with emphasis on trypsins and the domain structure of peritrophins. **Insect Molecular Biology**, n.18, p.33–44, 2009.

VIEGAS JUNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Quím. Nova [online]**. vol. 26, n.3, p. 390-400, 2003.

WANG, P.; GRANADO, R.R An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancing. **P Natl Acad Sci USA**, n. 94, p. 6977–6982, 1997.

WHO. 1981a Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Geneva.

WHO. 1981b. Criteria and Meaning of Tests for Determining the Susceptibility or Resistance of Insects to Insecticides. Geneva.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. WHO/ VBC/ 81.807, p.1–6, 1981.

WORTHLEY, E. G.; SCHOTT C. D. Bioassay and chemical studies on some dicotyledonous plants. **Toxicon**, vol. 5, p.73-78, 1967.

XU ,Y. M.; SMITH, J. A. ; LANNIGANB, D. A.; HECHTA, S. M. Three acetylated flavonol glycosides from *Forsteronia refracta* that specifically inhibit p90 RSK. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.14, p. 3974–3977, 2006.

YANG, Y.J.; DAVIES, D.M. Trypsin and chymotrypsin during metamorphosis in *Aedes aegypti* and properties of the chymotrypsin. **Journal of Insect Physiology**. n.17, p.117-131, 1971.

YOSHIDA, Y.; NIKI, E. Antioxidant effects of phytosterol and its components. **Journal of Nutricional Science and Vitaminology**. n.49, v.4, p.277-280, 2003.

WANDSCHEER, A. C. D.; PASTORINI, L.H. Allelopathic interference of *Raphanus raphanistrum* L. on the germination of *Lactuca sativa* L. and *Solanum lycopersicon* L. **Ciência Rural**, v.38, n.4, p.949-953, 2008.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHERENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Florianópolis: UFSC, 2007.