

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**MAISLIAN DE OLIVEIRA**



**ESTUDO FITOQUÍMICO E DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS  
DE *Temnadenia stellaris* (Lindl.) Miers  
(APOCYNACEAE)**

**CURITIBA  
2015**

**MAISLIAN DE OLIVEIRA**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE  
*Temnadenia stellaris* (Lindl.) Miers (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.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Marilis Dallarmi Miguel.

Co-orientador: Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel

**CURITIBA  
2015**

Oliveira, Maislian de  
Estudo fitoquímico e das atividades biológicas de *Temnadenia stellaris* (Lindl.) Miers  
(Apocynaceae) / Maislian de Oliveira – Curitiba, 2015.  
114 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Marilis Dallarmi Miguel  
Coorientador: Professor Dr. Obdulio Gomes Miguel  
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,  
Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1.  $\beta$ -sitosterol. 2. Antioxidante. 3. Multivariada. 4. Artemia. 5. Larvicida. 6. Leishmanicida.  
7. Antimicrobiana. I. Miguel, Marilis Dallarmi. II. Miguel, Obdulio Gomes. III. Universidade  
Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.321

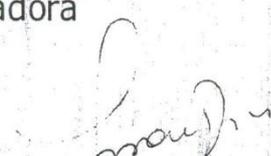
# TERMO DE APROVAÇÃO

**MAISLIAN DE OLIVEIRA**

Título: "ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Temnadenia stellaris* (Lindl.) Miers (APOCYNACEAE)"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.

  
Profª. Dra. Marilis Dallarmi Miguel  
Orientadora

  
Profª. Dra. Josiane de Fátima Gaspari Dias  
Universidade Federal do Paraná

  
Profª. Dra. Cristiane da Silva Paula  
Centro Universitário Campos de Andrade

Curitiba, 10 de fevereiro de 2015.

“A viagem não acaba nunca.  
Só os viajantes acabam.  
E mesmo estes podem prolongar-se em memória,  
em lembrança, em narrativa.  
Quando o visitante sentou na areia da praia e disse:  
“ Não há mais o que ver”,  
saiba que não era assim.  
O fim de uma viagem é apenas o começo de outra.  
É preciso ver o que não foi visto,  
ver outra vez o que se viu já,  
ver na primavera o que se vira no verão,  
ver de dia o que se viu de noite,  
com o sol onde primeiramente a chuva caía,  
ver a seara verde, o fruto maduro,  
a pedra que mudou de lugar,  
a sombra que aqui não estava.  
É preciso voltar aos passos que foram dados,  
para repetir e para traçar caminhos novos ao lado deles.  
É preciso recomeçar a viagem. Sempre.”

*José Saramago*

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente à Deus, pela sua graça e pela vida.*

*Aos meus pais Cleci e Santil, meus grandes professores, por todo o incentivo, apoio e amor, vocês que sempre abriram mão dos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus, por não medirem esforços pela minha felicidade, por estarem comigo em todos os momentos de minha vida, Obrigada Mãe! Obrigada Pai!*

*Ao meu irmão Maikon, minha inspiração,*

*Àos meus avós Elídio (in memoriam) e Melita, pelo carinho e incentivo,*

*À minha família,*

*Ao meu amor Max, pelo carinho e paciência, pela relação maravilhosa e por me apoiar em todos os momentos desta jornada, por me incentivar nos estudos e por sempre me inspirar a ir mais longe,*

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

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

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

*Aos técnicos dos laboratórios, Paulo e Gracinha pela disponibilidade e suporte,*

*A CAPES pelo suporte financeiro,*

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

*Aos colegas de laboratório Beatriz, Francis, Vinícius, Angela, Ana Flávia, Mariana, Luciane e Fernanda, obrigada por estarem comigo no dia-a-dia, nos momentos de descontração e por sempre estarem dispostos a me ajudar.*

*A Dr<sup>a</sup>. Cristiane Bezerra da Silva e a mestre Juliana Danna Kulik em especial pela parceria, companheirismo, nas aventuras e nos risos, obrigada por me aconselhar no era preciso e pela amizade construída, a vocês duas, Muito Obrigada!*

*Aos meus queridos amigos Maíra, Fabiana, Vanessa, Graziella, Renata, Jéssica, Daiane, Samara, Wellington, Leonardo, Nachalle, Onório, Pamela, Vanessa, Camila, Andrea, Ana Paula, Teka, Diego, Cristiane, Renato e Ymara obrigada por sempre estarem comigo nos momentos de tristeza e alegrias e porque mesmo distante a amizade nunca acaba.*

Aos meus amados pais.  
Por não terem medido esforços  
para que eu pudesse chegar até aqui

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo realizar o estudo fitoquímico e biológico do extrato etanólico e frações do caule e folhas de *Temnadenia stellaris* (Apocynaceae). A falta de estudos sobre esta espécie motivou o desenvolvimento deste estudo. O extrato etanólico foi fracionado obtendo-se as frações hexano, clorofórmio e diclorometano. As frações foram submetidas à cromatografia em coluna e a substância  $\beta$ -sitosterol foi isolada da fração hexano. No delineamento do perfil de atividade antioxidante e de acordo com a correlação dos experimentos por análise multivariada, as amostras de *T. stellaris* se mostraram mais ativas para o método teor de fenóis totais, seguido pelo ensaio de DPPH, poder redutor (azul da prússia) e o método de formação do complexo fosfomolibdênio quando comparado ao padrão rutina. Os demais métodos como o teste com espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), sequestro do  $H_2O_2$ , degradação da desoxirribose, método do tiocianato férrico e o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico demonstraram uma menor efetividade em relação aos outros métodos. As frações clorofórmio foram as que apresentaram maior atividade antioxidante, seguida pelas frações hexano que apresentaram maior correlação com métodos que se baseiam na peroxidação lipídica o que sugere que a natureza das substâncias presentes nas frações pode influenciar na atividade antioxidante das amostras de acordo com os ensaios a que foram submetidas. Os extratos etanólicos apresentaram uma atividade antioxidante menos expressiva quando comparado às outras frações. Quanto às partes morfológicas da planta ou o método de extração utilizado, não houve diferenças significativas. Para os testes de toxicidade as amostras *T. stellaris* frente à *Artemia salina* apresentaram resultados menores que  $1000 \mu\text{g/mL}^{-1}$ , indicativo de toxicidade. No ensaio de atividade hemolítica nenhuma das amostras demonstrou atividade. Para a atividade larvicida frente às larvas de *Aedes aegypti* as amostras ativas de *T. stellaris*, demonstraram uma atividade moderada. Entretanto, a avaliação da morfologia das larvas demonstra uma potencial toxicidade para as amostras. No ensaio de prospecção para a atividade leishmanicida, as amostras apresentaram baixo potencial, a fração hexano demonstrou atividade intermediária, o que sugere segundo a literatura, que o  $\beta$ -sitosterol isolado desta fração pode influenciar na ação leishmanicida. Na atividade antimicrobiana, observou-se que as amostras foram fracamente ativas ou não demonstraram atividade para os microrganismos estudados.

Palavras-chave:  $\beta$ -sitosterol. Antioxidante. Multivariada. *Artemia*. Larvicida. Leishmanicida. Antimicrobiana.

## ABSTRACT

This work was aimed at making the phytochemical and biological study of the ethanolic extract and stem fractions and leaves *Temnadenia Stellaris* (Apocynaceae). The lack of studies of this kind motivated the development of this study. The ethanolic extract was fractionated to yield fractions of hexane, chloroform and dichloromethane. The fractions were subjected to column chromatography and  $\beta$ -sitosterol substance was isolated from the hexane fraction. In the design of the antioxidant activity profile and according to the experiments by multivariate correlation analysis, *T. stellaris* samples were more active for the contents of total phenolic method, followed by DPPH assay, the reducing power (Prussian blue) and formation method of fosfomolibdênio complex when compared to standard routine. The other tests such as reactive species of thiobarbituric acid (TBARS),  $H_2O_2$ , sequestration, degradation of deoxyribose, ferric thiocyanate method and system  $\beta$ -carotene / linoleic acid demonstrated a less effective compared to other methods. The chloroform fractions showed the highest antioxidant activity, followed by hexane fractions showed the highest correlation with methods that are based on lipid peroxidation which suggests that the nature of the substances present in the fractions can influence the antioxidant activity of the samples according to the test that have been subjected. The ethanol extracts showed a less significant antioxidant activity when compared to other fractions. As for the morphological parts of the plant or the extraction method, there were no significant differences. For toxicity testing the samples *T. Stellaris* on *Artemia salina* showed lower results than 1000 mg/mL-1, indicative of toxicity. In the trial of hemolytic activity of the samples showed no activity. For larvicidal activity in the face of *Aedes aegypti* active samples *T. stellaris*, showed a moderate activity. However, the evaluation of the morphology of the larvae demonstrates a potential toxicity for the samples. In prospecçãp test for leishmanicidal activity, the samples showed low potential, the hexane fraction showed intermediate activity, suggesting according to the literature, the  $\beta$ -sitosterol isolated from this fraction can influence leishmanicidal action. In the antimicrobial activity, it was observed that the samples were weakly active or showed no activity for the microorganisms studied.

Keywords:  $\beta$ -sitosterol. Antioxidant. Multivariate. Artemia. Leishmanicidal. Antimicrobial.

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>12</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>16</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b> .....	<b>18</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
2.1 OBJETIVOS GERAIS .....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
3.1 A FAMÍLIA APOCYNACEAE .....	20
3.1.1 Taxonomia e distribuição .....	20
3.1.2 Morfologia .....	21
3.1.3 Aspectos econômicos .....	22
3.1.4 Importância farmacológica .....	24
3.2 O GÊNERO <i>TEMNADENIA</i> .....	26
3.2.1 Aspectos gerais .....	26
3.2.2 Morfologia e morfoanatomia .....	27
3.3 <i>Temnadenia stellaris</i> .....	28
3.3.1 Aspectos gerais .....	28
3.3.2 Morfologia e morfoanatomia .....	29
3.4 ALCALOIDES .....	33
3.5 COMPOSTOS FENÓLICOS .....	34
3.6 FITOESTERÓIS .....	35
3.7 ANTIOXIDANTES .....	36
3.8 ENSAIO DE TOXICIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i> .....	36
3.7 ATIVIDADE LARVICIDA EM <i>Aedes aegypti</i> (Culicidae) .....	37
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
4.1 MATERIAL VEGETAL .....	42
4.1.1 Coleta, identificação e exsicata .....	42
4.1.2 Análises físico-químicas .....	42
4.1.2.1 Umidade .....	42
4.1.2.2 Cinzas totais .....	43

4.1.3	Ensaio sistemático de análise fitoquímica .....	44
4.1.3.1	Extração dos metabólitos solúveis em etanol .....	44
4.1.3.2	Extração de metabólitos solúveis em água .....	44
4.1.3.3	Pesquisa de alcaloides .....	45
4.1.3.4	Pesquisa de leucoantocianidinas .....	45
4.1.3.5	Pesquisa de heterosídeos flavônicos .....	46
4.1.3.8	Pesquisa de cumarinas .....	47
4.1.3.8	Pesquisa de Iridoídes .....	48
4.1.3.9	Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos .....	49
4.1.3.10	Pesquisa de esteroides e triterpenos .....	49
4.1.3.11	Pesquisa de heterosídeos antociânicos .....	50
4.1.3.12	Pesquisa de heterosídeos saponínicos .....	50
4.1.3.13	Pesquisa de heterosídeos cianogênicos .....	51
4.1.3.14	Pesquisa de taninos .....	51
4.1.3.15	Pesquisa de ácidos voláteis .....	52
4.1.3.16	Pesquisa de ácidos fixos .....	52
4.1.3.17	Pesquisa de aminogrupos .....	53
4.2	ANÁLISE FITOQUÍMICA .....	53
4.2.1	Obtenção dos extratos .....	53
4.2.1.1	Extração do material vegetal .....	53
4.2.2	Determinação do teor de sólidos do extrato bruto .....	54
4.2.3	Obtenção das frações .....	54
4.2.4	Purificação das frações .....	55
4.2.5	Elucidação estrutural .....	55
4.3	ANÁLISE DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS .....	56
4.3.1	Atividade antioxidante .....	56
4.3.1.1	Teor de compostos fenólicos totais .....	56
4.3.1.2	Avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) .....	57
4.3.1.3	Teste com espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....	58
4.3.1.4	Formação do complexo fosfomolibdênio .....	59
4.3.1.5	Atividade antioxidante pelo método do poder redutor (azul da prússia) .....	59
4.3.1.6	Atividade antioxidante pelo método tiocianato férrico .....	60

4.3.1.7 Atividade antioxidante pelo método de degradação da desoxirribose .....	61
4.3.1.8 Atividade antioxidante pelo método de sequestro de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	61
4.3.1.9 Atividade antioxidante pelo método de oxidação acoplada do sistema .....	62
$\beta$ -caroteno/ácido linoleico .....	62
4.3.2 Correlação das atividades antioxidantes .....	63
4.3.3 Avaliação da toxicidade .....	64
4.3.2.1 Avaliação da toxicidade frente ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i> .....	64
4.3.2.2 Avaliação da atividade hemolítica .....	65
4.3.1 Atividade larvívora sobre <i>Aedes aegypti</i> .....	66
4.3.2 Análise da atividade leishmanicida .....	67
4.3.2.1 Viabilidade celular de <i>Leishmania</i> .....	67
4.3.3 Análise da atividade antimicrobiana .....	68
4.3.3.1 Determinação da concentração inibitória mínima .....	69
4.3.3.2 Interpretação dos resultados .....	69
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>70</b>
5.3 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO EXTRATO BRUTO .....	71
5.4 ESTUDO FITOQUÍMICO PRELIMINAR .....	71
5.4.1 Pesquisa de metabólitos solúveis em etanol .....	71
5.4.2 Pesquisa de metabólitos solúveis em água .....	74
5.5 ANÁLISE FITOQUÍMICA .....	75
5.5.1 Partição das frações .....	75
5.5.2 Purificação das frações e elucidação das estruturas .....	75
5.6 ANÁLISE DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS .....	81
5.6.1 Perfil de atividade antioxidante .....	81
5.6.1.1 Teor de compostos fenólicos totais .....	81
5.6.1.2 Atividade antioxidante pelo método de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) .....	82
5.6.1.3 Teste com espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....	85
5.6.1.4 Atividade antioxidante pela formação do complexo fosfomolibdênio .....	86
5.6.1.5 Atividade antioxidante pelo método do poder redutor (azul da prússia) .....	87
5.6.1.6 Atividade antioxidante pelo método do tiocianato férrico .....	88
5.6.1.7 Atividade Antioxidante pelo método de degradação da desoxirribose .....	89
5.6.1.8 Atividade antioxidante pelo método de sequestro de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	91

5.6.1.9 Atividade antioxidante pelo método de oxidação acoplado do sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.....	92
5.6.1.10 Correlação das atividades antioxidantes .....	94
5.6.2 Avaliação da toxicidade .....	96
5.6.2.1 Avaliação da toxicidade frente ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i> .....	96
5.6.2.2 Atividade larvicida sobre <i>Aedes aegypti</i> .....	97
5.6.2.2.1 Avaliação da mortalidade .....	97
5.6.2.2.2 Avaliação da morfologia das larvas .....	98
5.6.2.3 Hemólise.....	107
5.6.2.4 Análise da atividade leishmanicida .....	109
5.6.3 Análise da atividade antimicrobiana .....	110
5.6.3.1 Determinação da CIM.....	110
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>111</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>114</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DA FAMÍLIA APOCYNACEAE. ....	21
FIGURA 2 – <i>Temnadenia stellaris</i> APRESENTANDO INFLORESCÊNCIAS.....	30
FIGURA 3 – <i>Temnadenia stellaris</i> APRESENTANDO FOLHAS.....	31
FIGURA 4 – <i>Temnadenia stellaris</i> APRESENTANDO LIANA.....	31
FIGURA 5 – MORFOLOGIA <i>Temnadenia stellaris</i> . (A) RAMO FLORÍFERO, (B) FACE INTERNA DE SÉPALA E COLÉTER, (C) ANTERA (D) CABEÇA ESTIGMÁTICA, (E) OVÁRIO COM NECTÁRIO, (F) FOLÍCULOS, (G) SEMENTE.....	32
FIGURA 6 – ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H (200 MHZ EM CDCL <sub>3</sub> ). ....	77
FIGURA 7– EXPANSÃO DO EXPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H (200 MHZ EM CDCL <sub>3</sub> ) DA REGIÃO ALIFÁTICA DE (□ 1,30 – 0,50 ppm).....	77
FIGURA 8 – ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C (200 MHZ EM CDCL <sub>3</sub> ). ....	78
FIGURA 9 – EXPANSÃO DO EXPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C (200 MHZ EM CDCL <sub>3</sub> ) DA REGIÃO ALIFÁTICA DE (δ 60 – 1 ppm). ....	78
FIGURA 10 – ESTRUTURA QUÍMICA DO β– SITOSTEROL.....	80
FIGURA 11 – CURVAS REFERENTES AOS PADRÕES VITAMINA C, RUTINA, EXTRATOS E FRAÇÕES DO CAULE DE <i>Temnadenia stellaris</i> OBTIDOS POR MACERAÇÃO E SOXHLET, NA REDUÇÃO DO DPPH. ....	83
FIGURA 12 – CURVAS REFERENTES AOS PADRÕES VITAMINA C, RUTINA, EXTRATOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE <i>Temnadenia stellaris</i> OBTIDOS POR MACERAÇÃO E SOXHLET, NA REDUÇÃO DO DPPH. ....	84
FIGURA 13 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO CLOROFÓRIMO (FCI), FRAÇÃO HEXÂNICA (FHex), EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) DE <i>Temnadenia stellaris</i> , CAULE E FOLHAS EM RELAÇÃO AO PADRÃO BHT.. ....	85
FIGURA 14 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO CLOROFÓRIMO (FCI), FRAÇÃO HEXÂNICA (FHex), EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) DE <i>Temnadenia stellaris</i> , CAULE E FOLHAS	

EM RELAÇÃO AO PADRÃO VITAMINA C E EM RELAÇÃO AO PADRÃO RUTINA.....	86
FIGURA 15 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA DA FRAÇÃO CLOROFÓRIMO (FCI), FRAÇÃO HEXÂNICA (FHex), EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) DE <i>Temnadenia stellaris</i> , CAULE E FOLHAS E DO PADRÃO RUTINA EM RELAÇÃO AO PADRÃO VITAMINA C, PELO PODER REDUTOR (AZUL DA PRÚSSIA)..	88
FIGURA 16 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO CLOROFÓRIMO (FCI), FRAÇÃO HEXÂNICA (FHex), EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) DE <i>Temnadenia stellaris</i> , CAULE E FOLHAS E DO PADRÃO BHT PELO MÉTODO DO TIOCIANATO. ....	89
FIGURA 17 – PERCENTUAL DE DEGRADAÇÃO DA DESOXIRRIBOSE DO CAULE E FOLHAS DE <i>Temnadenia stellaris</i> .....	90
FIGURA 18 – PERCENTUAL DE ATIVIDADE DE SEQUESTRO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) DO CAULE E FOLHAS DE <i>Temnadenia stellaris</i> ..	92
FIGURA 19 – PERCENTUAL DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE OXIDAÇÃO ACOPLADO DO SISTEMA β-CAROTENO/ ÁCIDO LINOLEICO DO CAULE E FOLHAS DE <i>Temnadenia stellaris</i> .....	93
FIGURA 20 – DENDOGRAMA DA MATRIZ DE DISTÂNCIAS PELO MÉTODO DE LIGAÇÃO SIMPLES REPRESENTADO, UTILIZANDO O PROGRAMA COMPUTACIONAL STATISTICA. PARÂMETROS AVALIADOS PARA A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE FRAÇÕES DE <i>Temnadenia stellaris</i> .....	94
FIGURA 21 – ACP REPRESENTA OS PARÂMETROS AVALIADOS PARA A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE COM AS PARCELAS DE DADOS PARA OS EXTRATOS E FREÇÕES DE <i>Temnadenia stellaris</i> . AS PARCELAS MOSTRAM 54,45% E 33,63% DA VARIAÇÃO TOTAL APLICADA NO PC1 E PC2 RESPECTIVAMENTE.....	95

FIGURA 22 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE E FOLHAS DE <i>T. stellaris</i> SOBRE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM LARVAS DE <i>A. aegypti</i> - ALONGAMENTO DA CÉRVICE. ....	100
FIGURA 23 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE E FOLHAS DE <i>T. stellaris</i> SOBRE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM LARVAS DE <i>A. aegypti</i> – DESLOCAMENTO DAS PEÇAS DO ABDÔMEN. ....	100
FIGURA 24 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE E FOLHAS DE <i>T. stellaris</i> SOBRE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM LARVAS DE <i>A. aegypti</i> - SUPRESSÃO DAS PAPILAS ANAIS .....	101
FIGURA 25 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE E FOLHAS DE <i>T. stellaris</i> SOBRE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM LARVAS DE <i>A. aegypti</i> – SUPRESSÃO DO TÓRAX. ....	101
FIGURA 26 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE E FOLHAS DE <i>T. stellaris</i> SOBRE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM LARVAS DE <i>A. aegypti</i> – EXTRAVASAMENTO DO INTESTIDO.....	102
FIGURA 27 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES CLOROFÓRMIO DO CAULE E FOLHAS DE <i>T. stellaris</i> SOBRE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM LARVAS DE <i>A. aegypti</i> – ESTREITAMENTO DO MESÊNTERO, DIMINUIÇÃO DA GORDURA CORPORAL E ESPESSAMENTO DA MEMBRANA PERITRÓFICA.....	102
FIGURA 28 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES HEXANO DO CAULE E FOLHAS DE <i>T. stellaris</i> SOBRE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM LARVAS DE <i>A. aegypti</i> – ROMPIMENTO ENTRE A CAMADA DE	

	GORDURA E O EPITÉLIO MUSCULAR (1000 µg/mL), ESPESSAMENTO DA CUTÍCULA E DIMINUIÇÃO DA GORDURA CORPORAL .....	103
FIGURA 29	– EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DO CAULE E FOLHAS DE <i>T. stellaris</i> OBTIDOS POR MACERAÇÃO SOBRE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM LARVAS DE <i>A. aegypti</i> – ESTREITAMENTO DO MÊSÊNTERO E DIMINUIÇÃO DA GORDURA CORPORAL.....	103
FIGURA 30	– EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DO CAULE E FOLHAS DE <i>T. stellaris</i> SOBRE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM LARVAS DE <i>A. aegypti</i> – ESCURECIMENTO DA MUSCULATURA E NO CORPO GORDUROSO (EEBSC E EEBSF 1000 µg/MI), INIBIÇÃO DAS PAPILAS ANAIS (EEBSC 100 µg/MI EEBSF 1000 µg/mL) E DIMINUIÇÃO DA GORDURA CORPORAL .....	104
FIGURA 31	– PERCENTUAL DE ATIVIDADE LEISHMANICIDA PELO MÉTODO DE VIABILIDADE CELULAR DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DO CAULE E FOLHAS DE <i>Temnadenia stellaris</i> .....	109

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – TAXONOMIA GERAL DA ESPÉCIE <i>Temnadenia stellaris</i> (Lindl.) Miers .....	28
TABELA 2 – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE UMIDADE E CINZAS TOTAIS .....	70
TABELA 3 – RESULTADOS FÍSICO-QUÍMICOS OBTIDOS COM O EXTRATO BRUTO.....	71
TABELA 4 – RESULTADO DO ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO 20% de <i>Temnadenia stellaris</i> .....	72
TABELA 5 – RESULTADO DO ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO AQUOSO 20% .....	74
TABELA 6 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DE EXTRATOS ETANÓLICOS PREPARADOS POR MACERAÇÃO E SOXHLET .....	75
TABELA 7 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE <sup>13</sup> C E <sup>1</sup> H (200 MHz, 50 MHz, ppm, CDCl <sub>3</sub> ) DA SUBSTÂNCIA (H11) COM OS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA β-SITOSTEROL .....	79
TABELA 8 – TEOR DE FENÓIS TOTAIS EXPRESSOS COM ÁCIDO GÁLICO EQUIVALENTE (GAE).....	81
TABELA 9 – DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE SEQUESTRO DO RADICAL LIVRE (DPPH).....	82
TABELA 10 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO.....	86
TABELA 11 – ENSAIO DE TOXICIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i> DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>Temnadenia stellaris</i> E DO PADRÃO SULFATO DE QUINIDINA.....	96
TABELA 12 – ENSAIO LARVICIDA FRENTE À <i>Aedes aegypti</i> DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>Temnadenia stellaris</i> .....	98

TABELA 13 – MEDIDAS DAS LARVAS DE <i>A. aegypti</i> TESTADAS FRENTE À <i>T. stellaris</i> .....	99
TABELA 14 – ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>T. stellaris</i> .....	108
TABELA 15 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>T. stellaris</i> .....	110

## LISTA DE SÍMBOLOS

ARR% – Atividade Antioxidante Relativa  
ATCC – American Type Culture Collection  
BHT – Butilhidróxidotolueno  
BOD– Biological Organisms development  
CCD – Cromatografia em Camada Delgada  
DAD – Detector de Arranjo de Diodo  
DMSO – Dimetil Sulfóxido  
DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazila  
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético  
EEB – Extrato Etanólico Bruto  
EEBMC – Extrato Etanólico Bruto Maceração Caule  
EEBMF – Extrato Etanólico Bruto Maceração Folhas  
EEBSC – Extrato Etanólico Bruto Soxhlet Caule  
EEBSF – Extrato Etanólico Bruto Soxhlet Folhas  
FCI – Fração Clorofórmio  
FCIMC – Fração Clorofórmio Maceração Caule  
FCIMF – Fração Clorofórmio Maceração Folhas  
FCISC – Fração Clorofórmio Soxhlet Caule  
FCISF – Fração Clorofórmio Soxhlet Folhas  
FHex– Fração Hexano  
FHex – Fração Hexano Maceração Caule  
FHex – Fração Hexano Maceração Folhas  
FHex – Fração Hexano Soxhlet Caule  
FHex – Fração Hexano Soxhlet Folhas  
FT – Fenóis totais  
MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio  
MDA – Malonaldeído  
PBS – Salina Tamponada com Fosfato  
TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

## LISTA DE SÍMBOLOS

(<) – Menor que

(>) – Maior que

(+++)  
– Muito positivo

(++)  
– Positivo

(+)  
– Levemente positivo

(-)  
– Negativo

µg/mL – Micrograma por mililitro

µL – Microlitro

ABAP – 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidrocloreto

Abs – Absorbância

°C – Graus Celsius

CL<sub>50</sub> – Concentração letal média

DL<sub>50</sub> – Dose letal média

IC<sub>50</sub> – Concentração inibitória média

GAE – ácido gálico equivalente

Hz – Hertz

M – Molar

mg/mL – Miligrama por mililitro

mg/L – Miligrama por litro

Mol/L – Mol por litro

ms – Massa seca

nm – Nanômetros

n.d. – Não determinado

pH – Potencial hidrogeniônico

ppm – Parte por milhão

p/v – Peso/volume

UV – Ultra Violeta

v/v – Volume/volume

δ – Deslocamento químico

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas são de grande importância para a saúde humana, tanto nos aspectos culturais como nos medicinais. Desde as épocas mais remotas, a fitoterapia, que significa o tratamento pelas plantas é utilizada para a cura de doenças. No Brasil, o uso das plantas na medicina popular surgiu devido aos índios, negros e europeus, os quais recorriam ao uso das ervas medicinais e passaram adiante seus conhecimentos, que se expandiram até a atualidade (MACIEL *et al.*, 2002).

As plantas medicinais muitas vezes são o único recurso para ao tratamento de doenças. Sua extensiva utilização é associada à fácil obtenção, à grande tradição do uso de plantas e aos obstáculos, que vão desde o acesso ao atendimento médico à obtenção de exames e medicamentos (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005).

Desde as regiões mais pobres até as grandes cidades, as plantas medicinais são comercializadas em mercados, feiras livres e cultivadas em residências. A observação popular contribui de forma relevante para divulgar a eficácia terapêutica desses vegetais (STEIN, 2005).

O uso de plantas medicinais e da fitoterapia no Brasil é regulamentado pela portaria nº 2048 de 03 de setembro de 2009 que se refere aos recursos terapêuticos de medicina tradicional e complementar/alternativa, buscando estimular os mecanismos naturais de prevenção de agravos e recuperação da saúde (BRASIL, 2009).

De maneira indireta, o uso de plantas na cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural (MACIEL *et al.*, 2002). Desse modo pesquisas com produtos naturais sugerem novos compostos precursores a síntese de substâncias químicas e medicamentos (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005).

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).

Dessa forma, as plantas são reservatórios potenciais de fármacos, pois a partir do isolamento e identificação estrutural das substâncias ativas, é possível a síntese total em laboratório destes compostos químicos, ou a utilização dessas substâncias isoladas como material de partida para a produção de outros tipos de estruturas químicas, que podem ser obtidas por procedimentos de modelagem molecular (HEEMANN, 2006).

O valor medicinal das plantas reside em alguns produtos químicos que ocasionam em uma ação fisiológica sobre o organismo humano. Um grande número de espécies de plantas produzem esses produtos químicos, que são os chamados metabólitos secundários como alcaloides, flavonoides, fenóis, polissacarídeos, terpenos e cumarinas (MALAIRAJAN *et al.*, 2006). Os metabólitos são um conjunto de substâncias produzidas pelos vegetais, mas que não são essenciais à manutenção da vida. No entanto, estes apresentam funções auxiliares como defesa contra predadores, resistência contra pragas e doenças, atração de polinizadores, interação com microrganismos simbióticos, atrativos voláteis relacionados com a mesma ou outras espécies. Assim, compostos são utilizados para diversos fins na indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética e de pesticidas (SANTOS, 2004).

Entre as famílias com valor medicinal, está a família Apocynaceae, amplamente distribuídas por todos os continentes. A maioria das espécies ocorre em regiões tropicais sendo algumas dessas endêmicas do Brasil. A família é amplamente conhecida devido a profusão de seus metabólitos secundários, sendo uma grande fonte de compostos bioativos (RAPINI, 2012).

Dentre as plantas Apocynaceas, destaca-se, *Temnadenia stellaris* (Lindl.) Miers, com poucos estudos abrangentes sobre a composição química dessa planta. Assim, justifica-se sua pesquisa mais detalhada, uma vez que a família da planta é rica em componentes de interesse farmacológico.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Realizar estudos fitoquímicos e das atividades biológicas dos extratos e frações obtidos das folhas e do caule de *Temnadenia stellaris* (Lindl.) Miers.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a composição fitoquímica majoritária das folhas e do caule de *Temnadenia stellaris*;
- Realizar o isolamento de compostos químicos presentes nas folhas e caules de *Temnadenia stellaris*, através de métodos cromatográficos.
- Identificar os componentes isolados através de métodos químicos e espectroscópicos;
- Avaliar o perfil de atividade antioxidante por meio de ensaios antioxidantes: Teor de fenóis totais, sequestro do radical DPPH; Poder redutor (Azul da Prússia); Teste com espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); Sequestro do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Degradação da desoxirribose; Método do tiocianato férrico, Sistema β-caroteno/ ácido linoleico e correlacionar os dados por meio de técnicas estatísticas de análise multivariada.
- Avaliar a toxicidade do extrato e frações por meio de ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina*, hemolítico e leishmanicida;
- Avaliar a atividade antimicrobiana por meio de ensaios de concentração inibitória mínima;

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 A FAMÍLIA APOCYNACEAE

##### 3.1.1 Taxonomia e distribuição

A família Apocynaceae foi descrita por Antoine Laurent de Jussieu em 1789 (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). Pertence à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, subclasse Asteridae e ordem Gentianales. A ordem inclui: Loganiaceae, Saccifoliaceae, Gentianaceae, Apocynaceae e Asclepiadaceae (CRONQUIST, 1988).

Descrita entre as dez maiores famílias de angiospermas, a família Apocynaceae, consiste em aproximadamente 250 gêneros e 2000 espécies de árvores tropicais, arbustos lenhosos alpinistas, e ervas (RAPINI, 2012).

Nos últimos anos, a família Apocynaceae foi alvo de uma controvérsia quanto à sua circunscrição, e uma nova classificação foi proposta, baseada em caracteres morfológicos e apoiada por dados moleculares, que incluiu Asclepiadaceae (ENDRESS; BRUYNIS, 2000; RAPINI, 2012). Tradicionalmente, eram tratadas em duas famílias, Asclepiadaceae e Apocynaceae (s.str.), facilmente distinguidas pela presença ou não de polinários, respectivamente. A adoção dos princípios de sistemática filogenética na botânica levou a fusão dessas famílias em Apocynaceae s.l. (RAPINI, 2000).

Após a delimitação a família Apocynaceae foi subdividida em cinco subfamílias: Rauvolfioideae (cosmopolita; compreende 10 tribos e 83 gêneros), Apocynoideae (cosmopolita; 8 tribos e 80 gêneros), Periplocoideae (origem europeia; 33 gêneros), Secamonoideae (origem europeia; 8 gêneros) e Asclepiadoideae (cosmopolita; que conta com 4 tribos e 172 gêneros); as duas primeiras são subfamílias parafiléticas, enquanto as demais são monofiléticas. (ENDRESS; BRUYNIS, 2000).

Está amplamente distribuída por todo o globo, exceto na Antártica e em regiões mais frias (FIGURA 1). As espécies ocorrem predominantemente em regiões tropicais, mas com representantes também em regiões temperadas. Essas plantas crescem em vários ambientes que vão desde florestas úmidas até regiões semiáridas. Ocorrem desde o nível do mar até as montanhas, possuem crescimento diversificado, podem se desenvolver em solos secos, áreas alagadas e sobre rochas e raramente se encontram submersas na beira de rios (RAPINI, 2012).

No Brasil, a família Apocynaceae ocorre em 95 gêneros e 850 espécies. Os inventários florísticos envolvendo espécies de Apocynaceae (s. str.) estão concentrados especialmente na Região Sudeste, principalmente nos estados de Minas e São Paulo (RAPINI, 2012; LORENZI, 2009).

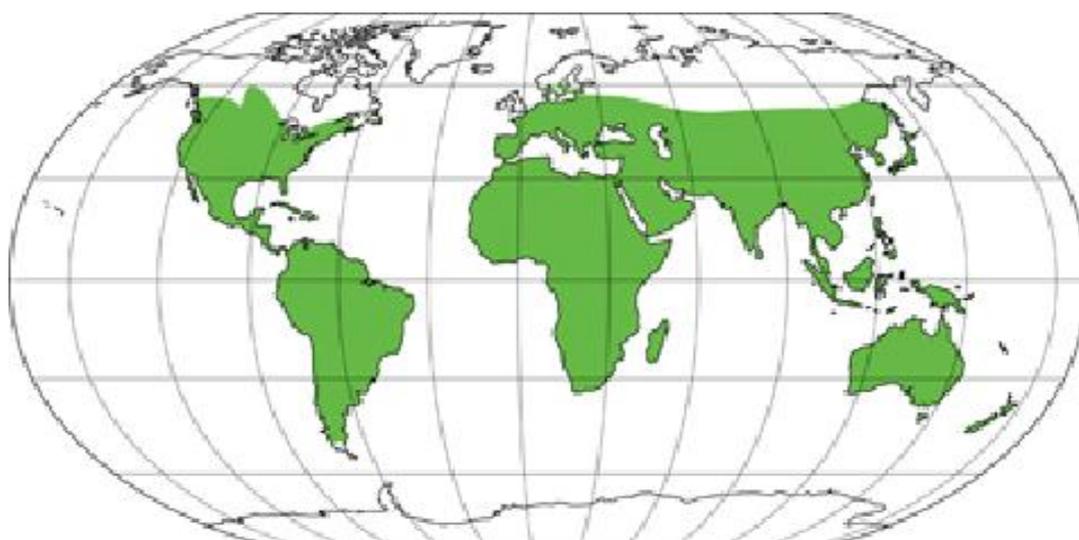


FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DA FAMÍLIA APOCYNACEAE.  
FONTE: <http://www.thecompositaehut.com/>

### 3.1.2 Morfologia

As espécies da família Apocynaceae são geralmente herbáceas, arbustivas, subarbustivas, arbóreas, frequentemente lianas ou cipós, laticíferas, com coléteres presentes; floema interno e látex geralmente leitoso (RAPINI, 2012).

As folhas apresentam-se opostas, menos frequentemente alternas como no gênero *Aspidosperma*. Não apresentam estípulas, as mesmas ocorrem raramente em algumas espécies, a margem de suas folhas é inteira, quase sempre com glândulas ou emergências glandulares na base do limbo ou no pecíolo. Essas folhas raramente são caducas ou reduzidas no período de floração (RAPINI, 2012).

As inflorescências da família Apocynaceae apresentam-se racemosas ou cimosas, por vezes reduzidas a uma única flor, as flores geralmente são bissexuadas ou hermafroditas e raramente dióicas ou ginodióicas, exemplos destas são encontrados em algumas espécies de *Rauwolfia*. De acordo com a classificação morfológica as flores são actinomorfas ou raramente ligeiramente zigomorfas, diclamídeas, o cálice é pentâmero e pode 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. As espécies apresentam gineceu bicarpelar ou dialicarpelar, os estiletos estão unidos, ou menos frequentemente gamocarpelar, neste caso ovário 1-2-locular. O ovário geralmente é súpero, sendo ínfero apenas nos gêneros *Himantus* e *Plumeria*, a placentação pode ser axial ou parietal, o ovário é pluriovulado e as glândulas nectíferas estão dispostas ao redor deste (RAPINI, 2012).

Os frutos, geralmente dois folículos raramente fundidos, apresentam baga, cápsula ou dois mericarpos indeiscentes, secos ou pouco carnosos, as sementes são geralmente comosas, às vezes aladas, ou envolvidas por arilo carnosos, apresenta endosperma nuclear, oleoso e embrião reto. (RAPINI, 2010; LORENZI, 2009; EVANS, 2002; MARTINS *et al.*, 2000).

### 3.1.3 Aspectos econômicos

A família Apocynaceae, devido a sua biodiversidade, apresenta um grande potencial econômico entre os seus representantes. Na cultura indígena, *Apocynum cannabinum* L. é utilizada como fonte de fibras para cordas e fios utilizados em artesanato. Os ramos fortes e flexíveis de *sarcostemma clausum* (Jacq.) (cipó de

leite) são usados como vara de pescar e os venenos para flechas de caça são extraídos de algumas espécies de *Matelea* (QUINET; ANDREATA, 2005).

Muitas espécies são utilizadas na indústria, *Landolphia* Beauv., e *Couma utilis* (Mart) Muell. Arg. (Sorva ou Sovinha) fornecem látex para o preparo da goma de mascar, *Apocynum* spp. e *Asclepias* spp., *Aspidosperma australe* Müll. Arg (Guatambu); *Blepharodon bicuspidatum* Fourn são utilizadas para a fabricação de produtos derivados da borracha. *Macoubea guianensis* Aubl. (piquiá), *Lacmellea pauciflora* Kuhlm. Monac. (chamarrão) e *Couma rigida* Müll. Arg. (mucugê), produzem um suco láteo de caráter adocicado utilizado como leite vegetal e *Hancornia speciosa* Müll. Arg. (mangabeira) que produz um fruto muito utilizado na alimentação (RAPINI, 2010; QUINET; ANDREATA, 2005; FALCÃO *et al.*, 2003).

Diversas espécies têm recebido destaque no Brasil, especialmente por fazerem parte do projeto “Extratativismo não-madeireiro e desenvolvimento sustentável na Amazônia, que tem por objetivo a proteção das florestas tropicais e espécies através do uso racional dos recursos proporcionados pela biodiversidade. Dentre as espécies protegidas encontra-se *Asclepias curassavica* L. (algodãozinho-do-campo), que pode ser utilizada para a produção de fibras para tecidos, a *Cascabela thevetia* Lippold. (Chapéu-de-napoleão), para a alimentação animal, a extração do óleo das sementes para fins cosméticos e de saboaria, *Aspidosperma excelsum* Benth. (carapanaúba), apresenta substâncias adstringentes que também podem ser utilizadas para fins cosméticos e de limpeza, a *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson (Agoniada), a *Hancornia speciosa* Müll. Arg. (mangabeira) e a *Parahancornia fasciculata* (Poir.) (látex do Amapá), são utilizadas para obtenção de fibras de celulose para produção de papel e alimentação, uma vez que, apresentam frutos carnosos e doces (LOGSDON, 2008).

Algumas espécies arbóreas fornecem madeira para construção civil e produção de móveis e ferramentas, o gênero *Aspidosperma*, compreende cerca de 43 espécies de distribuição neotropical. Dentre as espécies que mais se destacam encontram-se *Aspidosperma polyneuron* müll. Arg. (Peroba rosa), utilizada para móveis devido a sua resistência e a *Aspidosperma populifolium* A. DC., (Peroba mica) Cita-se também a *Aspidosperma desmanthum* Benth. ex Muell. Arg (Araracanga ou Piquiá Marfim Roxo) de coloração amarelo avermelhada. Outras madeiras importantes economicamente obtidas de Apocynaceas são: a

*Geissospermum sericeum* Bth. & Hook (Aquaricara branca), *Parahancornia amapa* (o Amapá Amargoso, ou Mogno dourado) e, *Rauwolfia paraensis* (Gogó-de-guariba) (LOGSDON, 2008; BRASIL, 2013).

### 3.1.4 Importância farmacológica

Devido a grande quantidade de metabólitos secundários isolados a partir de folhas e cascas de seus representantes a família Apocynaceae é uma importante fonte de compostos bioativos (RAPINI, 2010). Os constituintes químicos da família incluem alcaloides, glicosídeos cardioativos e cianogenéticos, saponinas, taninos, cumarinas, ácidos fenólicos e triterpenoides. Destacam-se os constituintes da subfamília Plumerioideae que incluem uma grande variedade de alcaloides indólicos, os quais representam os componentes mais utilizados na medicina, sendo mais de 500 nos gêneros *Alstonia*, *Aspidosperma*, *Catharanthus*, *Hunteria*, *Pleiocarpa*, *Rauwolfia* e *Voacanga* (EVANS, 2002).

As principais drogas vegetais, provenientes de espécies da família Apocynaceae são os alcaloides provenientes das raízes de Rauvólfia (*Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. Ex Kurz) e das partes aéreas da Vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don.), um subarbusto muito utilizado para fins ornamentais, originário da ilha de Madagascar. No caule desta planta existe uma mistura complexa de alcaloides indólicos de ampla utilização terapêutica (SCHRIPEMA *et al.*, 2000; LORENZI, 2009). Dentre eles a vincristina, a vimblastina, 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 (PRATT *et al.*, 1994).

*Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. Ex Kurz, é uma planta popularmente utilizada para o tratamento de hipertensão, psicoses, epilepsia, doenças mentais e 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 (PANWAR *et al.*, 2011; SCHRIPSEMA *et al.*, 2000).

No Brasil, o uso de Apocynaceae para fins medicinais não se limita somente às drogas clássicas, diversos estudos etnofarmacológicos relatam a utilização de plantas desta família em várias regiões e está amplamente distribuída em todos os domínios fitogeográficos (RAPINI, 2010).

Plantas utilizadas por caboclos do Parque Nacional do Jaú, no Amazonas foram avaliadas fitoquimicamente e farmacologicamente, uma das espécies estudadas foi *Himathantus sucuuba* (Spruce ex Müll. Arg.) Woodson, conhecida como sucuuba, os resultados mostraram que é válida a utilização popular da planta como analgésica, vermífuga, depurativa e antirreumática.

Na região nordeste, o uso da *Secondatia floribunda* DC. conhecida como catuaba, é extensivamente difundida entre a população por ser utilizada como afrodisíaco. *Allamanda violacea* Gardn, espécie que apresenta propriedades antimicrobianas e de *Geissospermum laeve* (Vell.) Miers, apresenta propriedades tônicas e antifebris, sendo os alcaloides de sua casca hipotensores eficientes, confirmados em testes laboratoriais. Uma planta nativa e endêmica do Cerrado é a *Mandevilla velutina* (Mart.) Woodson, conhecida popularmente como “batata-infalível”, é utilizada como anti-inflamatória, antibiótica e também pelas suas propriedades antiofídicas (QUINET; ANDREATA, 2005).

As plantas do gênero Apocynaceae possuem hábitos tropicais e subtropicais, desse modo, o uso medicinal das mesmas é amplamente difundido por todas essas regiões. Na América Central, *Aspidosperma myristicifolium* (Markgr.) Wood. cujo, nome popular é Remo kaspi e *Aspidosperma rigidum* Rusby, conhecida como Tashkum remo kaspi, ambas utilizadas para reumatismo, sendo preparados os caules em decocção. Outras plantas também apresentam atividade antirreumática, entre elas *Rauwolfia praecox* K. Schum. ex Mark., que apresenta também atividade emética, dessa forma 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 utilizadas pelas suas propriedades antiofídicas, e o látex de *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum, tem uso descrito para infecções dermatológicas (MARTINS *et al.*, 2000).

A toxicidade das plantas da família Apocynaceae é um fator importante a ser considerado, como exemplo, a espécie *Asclepias curassavica* L., uma planta herbácea com ampla distribuição na América do Sul, que embora tenha usos medicinais descritos, seu látex pode cegar, causar paralisia, dentre outros efeitos se ingerida em doses elevadas (DUKE; VASQUEZ, 1994). Estes efeitos são causados por um glicosídeo tóxico chamado asclepiadina, que tem ação sobre a musculatura lisa e sistema nervoso central. *Cascabela thevetia* (L.) Lippold, é outra planta tropical, que apresenta usos farmacológicos, porém apresenta também toxicidade elevada, exceto a polpa do fruto contém glicosídeos tóxicos, principalmente tevetina e peruvosídeo, sendo utilizada como inseticida, fungicida e bactericida. Outras plantas que produzem efeitos tóxicos são a *Allamanda catartica* L., que ocasiona distúrbios gastrointestinais severos, *Thevetia peruviana* (Pers.) Schum. popularmente chamada de “Chapéu de Napoleão”, pode causar efeitos neurológicos, arritmias cardíacas e náuseas, assim como a espécie *Nerium oleander* L., conhecida como Espirradeira (MORTON, 1971; SCHVARTZSMAN, 1979; SCHENKEL, 2000).

Considerada a relevância da família Apocynaceae e da ausência de estudos com espécies do gênero *Temnadenia* e na contribuição para a farmacobotânica e com a medicina tradicional frente ao isolamento e obtenção de drogas vegetais, faz-se necessário um aprofundamento no conhecimento sobre o principal grupo de metabólitos secundários aos quais pertencem os princípios ativos destas plantas: dentre eles os alcaloides, que são marcadores químicos da espécie Apocynaceae (MORALES, 2005; RAPINI, 2010).

## 3.2 O GÊNERO *TEMNADENIA*

### 3.2.1 Aspectos gerais

O pequeno gênero *Temnadenia* Miers (Apocynaceae), foi descrito originalmente por Miers (1878), no seu estudo “Apocynaceae da América do Sul”. No

entanto, este estudo tornou-se inadequado, uma vez que a maioria dos conceitos e mudanças taxonômicas propostas neste trabalho eram falhas, pois características genéricas importantes para a definição de diagnóstico das espécies como a forma das anteras, frutos e tipo de sementes foram ignoradas. O gênero foi definido com base apenas em uma variável de caráter supérfluo, o nectário pentalobulado, que também é comum por muitas outras espécies da família Apocynaceae. Isso fez com que muitas espécies de outros gêneros como *Mandevilla* e *Prestonia*, mesmo sendo espécies intimamente relacionadas fossem transferidas e erroneamente agrupadas dentro do gênero *Temnadenia*. Em 1935, Woodson em seu estudo, adequou e definiu os limites genéricos e reconheceu quatro espécies do gênero *Temnadenia*, transferindo o resto para diferentes gêneros (MORALES, 2005).

Desse modo, o gênero *Temnadenia* apresenta quatro espécies conhecidas, uma endêmica da Colômbia (*Temnadenia stenantha* Woodson), duas restritas ao Brasil (*Temnadenia stellaris* Miers. e *Temnadenia violacea* Vell. Miers) e outra distribuída no Brasil, Peru e Bolívia (*Temnadenia ornata* Hoehne. Woodson), (MORALES, 2005).

### 3.2.2 Morfologia e morfoanatomia

Segundo Morales (2005) as plantas do gênero *Temnadenia* são lianas lenhosas, semi-herbáceas, caracterizadas como trepadeiras com galhos terrestres ou aéreos, produtoras de látex ou secreção leitosa (MORALES, 2005).

As folhas das espécies deste gênero são opostas, pecioladas e com lâmina glabra, as espécies apresentam também coléteres nervosos centrais. A nervação ou venação das folhas são terciárias e aparentes em ambas as superfícies da lâmina foliar, embora ocasionalmente nas folhas de *Temnadenia ornata* essas venações são geralmente mais discretas (MORALES, 2005).

As quatro espécies do gênero *Temnadenia* possuem corolas sendo a mesma hipocrateriformes nas espécies *T. stellaris* e *T. stenantha* nas outras duas espécies *Temnadenia ornata* e *Temnadenia violacea*, as corolas apresentam-se infundibular e um tubo cônico estreito na parte superior, que predomina sobre a posição das anteras, as mesmas no gênero *Temnadenia* apresentam átrios basais e

acuminados, desse modo, a forma das aurículas basais das anteras é um caráter importante para agrupar as espécies em gêneros (MORALES, 2005).

Todos os folículos das espécies de *Temnadenia* se caracterizam por serem sincárpios e fundidos longitudinalmente de uma forma contínua podendo apresentar variações quanto à forma moniliformes. Dessa forma, essas características devem ser observadas juntamente com outros aspectos morfológicos para a classificação do gênero a que a planta pertence (MORALES, 2005).

### 3.3 *Temnadenia stellaris*

#### 3.3.1 Aspectos gerais

*Temnadenia stellaris* teve sua classificação botânica e taxonômica publicada por Miers em 1878 (TABELA 1).

TABELA 1 – TAXONOMIA GERAL DA ESPÉCIE *Temnadenia stellaris* (Lindl.) Miers

Taxonomia de <i>Temnadenia stellaris</i>	
Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Equisetopsida C. Agardh
Super ordem	Asteranae Takht.
Ordem	Gentianales Juss.
Família	Apocynaceae Juss.
Gênero	<i>Temnadenia</i> Miers
Espécie	<i>Temnadenia stellaris</i>

FONTE: [www.tropicos.org](http://www.tropicos.org)

Descrita também como sinônimo de *Temnadenia odorífera*. Caracteriza-se por uma liana, trepadeira ou cipó lenhoso (FIGURA 2), (FIGURA 3) e (FIGURA 4), se encontra de forma endêmica no Brasil (RAPINI, 2010), possui ampla distribuição

geográfica e é encontrada principalmente em áreas de restinga com algumas ocorrências em matas e áreas de caatinga (SANTOS,1996). Conhecida popularmente como cipó de leite, a floração e frutificação dessa espécie ocorre com mais frequência desde setembro até maio, mas também ocorre esporadicamente ao longo do ano (MORALES, 2005).

### 3.3.2 Morfologia e morfoanatomia

De acordo com a morfologia e morfoanatomia de *Temnadenia stellaris* (WOODSON, 1935), as flores desta espécie estão reunidas em cicinos com duas ou três flores abertas por dia. A corola é hipocrateriforme com tubo rosa escuro, que medem cerca de 22,4 mm de comprimento constricto um pouco acima da região mediana onde estão internamente inseridos os estames, a base das lacínias formam uma plataforma de pouso de 14,3mm de diâmetro. Existe uma variação entre os indivíduos na intensidade das cores, principalmente na fauce da corola e lacínias que geralmente são cor de rosa com a base creme. Na fauce da corola existe um guia de néctar em formato de estrela que, em geral, é rosa como a parte interna do tubo (SANTOS, 1996).



FIGURA 3 – *Temnadenia stellaris* APRESENTANDO INFLORESCÊNCIAS.  
FONTE: Stival (2010)

A antese ou abertura das flores se inicia ao amanhecer e dura apenas um dia, ao final do período as lacínias ficam ressecadas, voltam-se para cima fechando a flor e toda a corola cai, em geral, no final do segundo dia. A permanência dessas flores após seu fechamento ajuda na atração, já que a cor rosa da parte externa do tubo da corola é muito atrativa. Apresentam odor adocicado mais forte no período da manhã do que pela tarde. A viabilidade dos grãos de pólen são de aproximadamente 94,4%. A região receptiva do estigma localiza-se na parte superior do estilete, logo abaixo da cabeça estilar, a localização da região estigmática na parte superior dos estiletos ao invés de na parte inferior da cabeça estilar é uma peculiaridade no estudo da biologia oral da família Apocynaceae.

Os cinco nectarianos formam um anel ao redor do ovário, ultrapassando o mesmo em altura. O volume de néctar que existe no início da antese é em média de 46 mL e a concentração de açúcares em média de 39%, o que viabiliza a visita de polinizadores efetivos, principalmente por abelhas *Euglossini*, que é o principal polinizador de *Temnadenia stellaris* (SANTOS, 1996).



FIGURA 4 – *Temnadenia stellaris* APRESENTANDO FOLHAS.  
FONTE: O autor (2015)

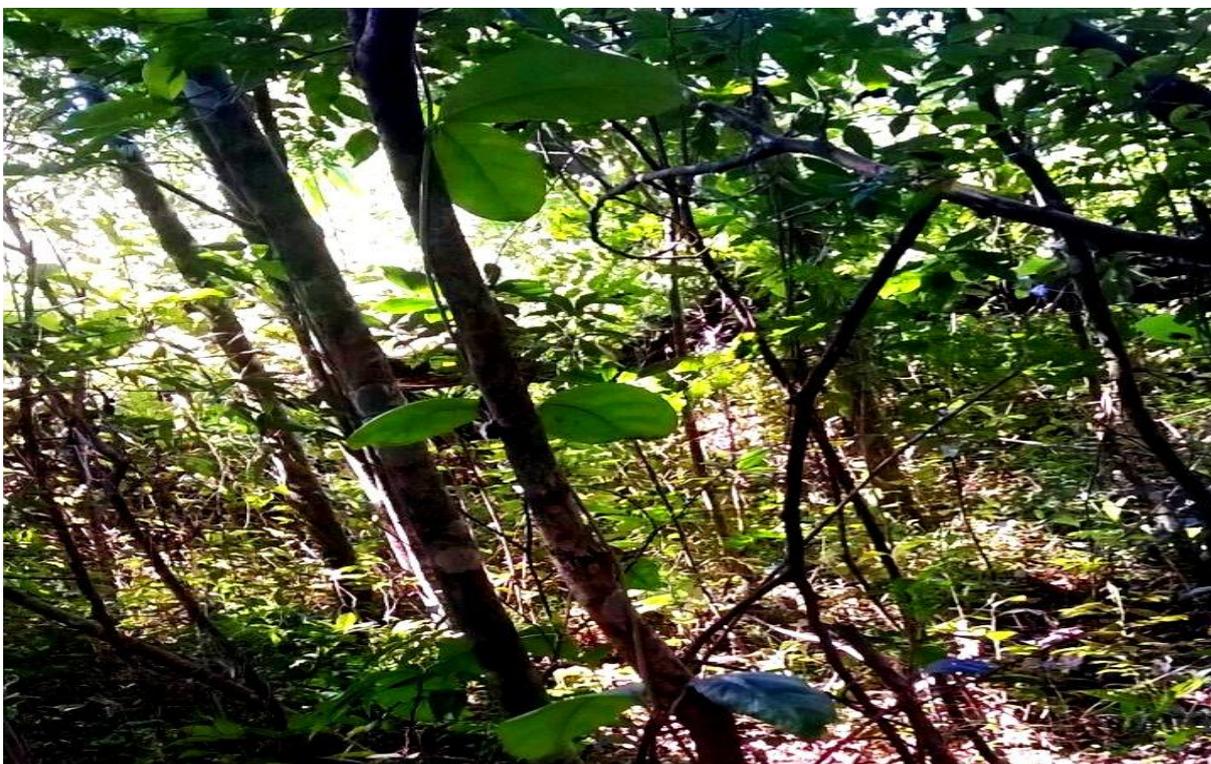


FIGURA 5 – *Temnadenia stellaris* APRESENTANDO LIANA.  
FONTE: O autor (2015)

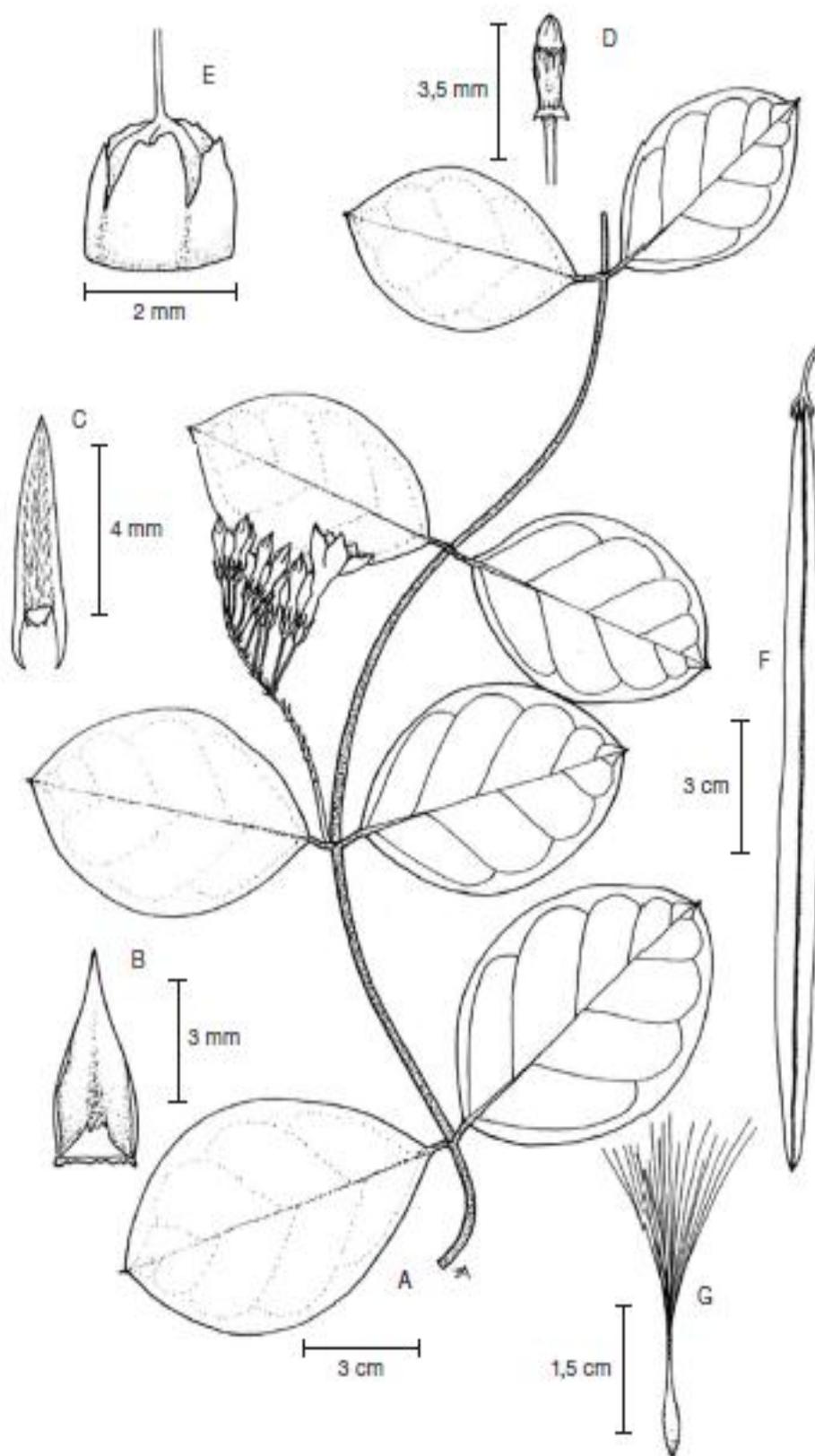


FIGURA 6 – MORFOLOGIA *Temnadenia stellaris*. (A) RAMO FLORÍFERO, (B) FACE INTERNA DE SÉPALA E COLÉTER, (C) ANTERA (D) CABEÇA ESTIGMÁTICA, (E) OVÁRIO COM NECTÁRIO, (F) FOLÍCULOS, (G) SEMENTE.  
 FONTE: Morales (2005)

### 3.4 ALCALOIDES

Segundo a literatura, a família Apocynaceae caracteriza-se quimicamente pela ocorrência frequente de estruturas alcaloídicas (PEREIRA *et al.*, 2007). Segundo Pelletier (1983): “Um alcaloide é uma substância orgânica cíclica contendo um nitrogênio em estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos”, esta definição é importante, pois exclui demais compostos orgânicos nitrogenados e substâncias sintéticas.

O termo alcaloide pode ter duas origens, na palavra árabe *al-quali*, planta que 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). Esses compostos são oriundos do metabolismo secundário vegetal, que se diferencia do primário por não apresentar reações e produtos comuns a todas as plantas, sendo específicos em determinados grupos (SANTOS *et al.*, 2004).

Os compostos alcaloídicos ocorrem principalmente nas angiospermas, e podem também ser derivados de animais ou fungos. Em geral são farmacologicamente ativos, e geram respostas fisiológicas bastante importantes (EVANS, 1996), 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 (CORDEL *et al.*, 2001).

Os aspectos mais favoráveis na busca de alcaloides que poderiam se tornar protótipos para novos fármacos, é que eles são derivados de uma fonte natural e abundante. Entretanto, a grande maioria das moléculas conhecidas até o momento foram insuficientemente avaliadas sob o aspecto biológico e há uma infinidade de plantas ricas em alcaloides que permanecem sem investigação (CORDEL *et al.*, 2001).

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).

São conhecidos mais de 5000 alcaloides com atividade biológica, representando cerca de 20% das substâncias naturais descritas e estudadas quanto a suas propriedades terapêuticas. Do ponto de vista quimiotaxonômico, os alcaloides indólicos constituem bons marcadores para a classificação botânica das espécies da família Apocynaceae (PEREIRA *et al.*, 2007).

Biologicamente os alcaloides indólicos, agem nos sistemas neurotransmissores opiáceos, GABAérgicos, colinérgicos, muscarínicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos, por isso são empregados como hipotensor arterial, simpatolítico, diurético, vasoconstrictor periférico, estimulante respiratório, anestésico, agente bloqueador adrenérgico, espasmogênico intestinal, sedativo e relaxante do músculo esquelético, essas atividades farmacológicas fazem com que os alcalóides indólicos sejam considerados interessantes e uma importante classe de compostos naturais (PEREIRA *et al.*, 2007).

### 3.5 COMPOSTOS FENÓLICOS

Dentre os principais grupamentos fitoquímicos, uma classe tem recebido muita atenção nos últimos anos, os compostos fenólicos, essas substâncias bioativas ocorrem frequentemente nas plantas e são conhecidas pelo potencial antioxidante e pelos benefícios que trazem à saúde, uma vez que, várias evidências indicam o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como responsáveis por doenças degenerativas e relacionadas ao envelhecimento (ROESLER *et al.*, 2007).

A atividade antioxidante desse grupamento químico deve-se às suas propriedades redutoras e estrutura química, características cruciais para neutralizar ou sequestrar radicais livres e quelar os metais de transição, dessa forma, esses compostos agem tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOUSA *et al.*, 2007).

Os ácidos fenólicos caracterizam-se pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, que conferem propriedades antioxidantes. Os produtos intermediários formados pela ação antioxidante dos ácidos fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância com o anel aromático (RAMALHO; JORGE, 2006). Os policompostos fenólicos são caracterizados estruturalmente pela presença de um ou mais anéis aromáticos de seis carbonos e duas ou mais grupos hidroxilas fenólicos (STEVENSON; HURST, 2007).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é influenciada por diversos fatores como a posição e grau de hidroxilação, a polaridade, a solubilidade, o poder de redução, e estabilidade do radical fenoxi formado (BALASUNDRAM *et al.*, 2005).

### 3.6 FITOESTERÓIS

Os fitoesteróis são substâncias amplamente encontradas em vegetais. São esteróis compostos por 27 a 29 átomos de carbono e estruturalmente semelhantes ao colesterol (C-27), diferenciando-se deste pelas configurações no núcleo ou na cadeia lateral, ou ainda, pelos seus grupos polares. Quimicamente os fitoesteróis são subdivididos, em três grupos, de acordo com sua estrutura química e biossíntese: esteróis 4-desmetil, esteróis  $\alpha$ -monometil e esteróis 4,4-dimetil. A subclasse mais abundante a qual é atribuído o principal efeito hipocolesterolêmico é a de 4-desmetil, que possui o  $\beta$ -sitosterol, campesterol e estigmasterol como principais representantes (BRUFAL; CANELA; RAFICAS, 2008).

Estudos epidemiológicos tem sugerido que a utilização de fitoesteróis pode estar associada com a redução da incidência de cânceres comuns como o câncer de pulmão, estômago, cólon, mama e próstata (RUDKOWSKA, 2010). Estima-se que o consumo de fitoesteróis pode reduzir significativamente o risco de câncer em até 20% (BRADFORD, AWAD, 2007).

Contudo, o mecanismo de ação dos fitoesteróis sobre o desenvolvimento de cânceres não foi completamente elucidada. Sugere-se que devam atuar sobre o

sistema hospedeiro afetando a sobrevivência do tumor ou agindo direta ou indiretamente sobre o seu ciclo biológico (RUDKOWSKA, 2010).

### 3.7 ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes são substâncias que funcionam como bloqueadores dos processos óxido-redutivos desencadeados pelos radicais livres. Frequentemente, o termo “antioxidante” é implicitamente restrito aos compostos inibidores da lipoperoxidação. Entretanto, podem ser definidos mais amplamente como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações (comparadas a outras que oxidam um substrato), previnem significativamente sua oxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000; TOSCAN, 2010). Os antioxidantes têm a função de capturar os radicais livres para assim inibir a peroxidação lipídica, a modificação de proteínas e os danos no DNA (SAITO *et al.*, 2004).

A avaliação de atividade antioxidante tem aumentado nos últimos anos devido às descobertas do efeito deletério dos radicais livres sobre as células e sua relação com certas doenças, agindo como causador ou agravante, impulsionou a busca por novas substâncias capazes de prevenir ou minimizar os danos oxidativo. (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). Dessa forma, muitas pesquisas têm sido realizadas com plantas e vegetais que possam ser descritas como fontes de antioxidantes naturais (MAISUTHISAKUL; PASUK; RITTHIRUANGDEJ, 2008).

### 3.8 ENSAIO DE TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina*

Os ensaios de toxicidade têm por objetivo avaliar ou prever os efeitos de substâncias tóxicas nos sistemas biológicos e averiguar a toxicidade das substâncias no ambiente (BAROSA *et al.* 2003). Suas técnicas compreendem uma série de dados que possam ser obtidos por meio de microrganismos e animais de laboratório ou seres humanos, visando classificar a toxicidade de uma substância química, ou seja, pode-se assim elucidar que se trata de testes preliminares

essenciais no estudo de substâncias com atividade biológica a fim de avaliar suas possíveis interações com o organismo (CAVALCANTE *et al.* 2000).

*Artemia salina* é uma espécie de microcrustáceo da ordem Anostraca, utilizada como bioindicador de toxicidade, o ensaio foi desenvolvido para detectar compostos bioativos em extratos vegetais (MEYER *et al.*, 1982). O crustáceo habita lagos de águas salgadas e salinas de todo o mundo, é adaptado à sobrevivência frente a grandes variações sazonais, pois teores de salinidades que flutuam de 3,5 a 70%. Segundo Siqueira *et al.* (1998). Os testes de toxicidade aguda com *Artemia sp* é um ensaio rápido, de baixo custo, eficiente, requer quantidades baixas de amostra (2 – 20 mg), não requer métodos assépticos, nem equipamentos especiais. Além disso, os ovos não eclodidos são metabolicamente inativos, e podem ser conservados por longos períodos se mantidos desidratados e quando reidratados os ovos de *Artemia sp* eclodem em cerca de 24 horas em condições adequadas, chegando à fase adulta com 20 a 30 dias de vida. Esse ciclo de vida relativamente curto favorece testes de toxicidade aguda e crônica.

Estudos demonstram que esse ensaio tem boa correlação com atividade citotóxica em alguns tumores humanos sólidos e levou à descoberta dos *Annonaceous acetogenins* como nova classe de agentes antitumorais ativos. Os autores observaram que os valores de ED<sub>50</sub> encontrados para citotoxicidade, em geral eram 1/10 dos valores de LC<sub>50</sub> encontrados nos testes realizados com *Artemia sp*, sugerindo que tal teste pode ser utilizado como uma primeira análise do potencial citotóxico de novos compostos (MCLAUGHLIN *et al.* 1998).

### 3.7 ATIVIDADE LARVICIDA EM *Aedes aegypti* (Culicidae)

A dengue é uma doença infecciosa, de origem viral transmitida para o homem por meio da picada de fêmeas de mosquitos contaminados pertencentes ao gênero *Aedes*. Essa doença se tornou uma das principais preocupações de saúde pública, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas estão em risco de infecção, e 50 milhões de casos são

registrados a cada ano em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

No Brasil, de acordo com o último boletim epidemiológico emitido pelo Ministério da Saúde, que refere - se à última semana de 2014, foram registrados 591.080 casos prováveis de dengue no país. A região Sudeste teve o maior número de casos prováveis (312.318 casos; 52,8%) em relação ao total do país, seguida das regiões Centro-Oeste (114.814 casos; 19,4%), Nordeste (90.192 casos; 15,3%), Norte (49.534 casos; 8,4%) e Sul (24.222 casos; 4,1%). Na análise comparativa em relação a 2013, observa-se redução de 59,3% dos casos no país. A análise das incidências (número de casos/100 mil hab.) demonstra redução em todas as regiões. No entanto, as seguintes Unidades da Federação (UFs), Acre, Alagoas e São Paulo apresentam aumento no número absoluto de casos prováveis e incidência acima de 300 casos/100 mil hab. (BRASIL, 2015).

Desse modo, é imprescindível a adoção de medidas de controle para evitar as infecções causadas pelo vírus da dengue e combater seu principal vetor urbano, o mosquito *A. aegypti*. A eliminação das larvas é o método ideal para o controle da doença, uma vez que os mosquitos habitam locais abrigados e de difícil acesso (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE, 1995).

De modo geral, os métodos utilizados para controlar as larvas e os mosquitos de *A. aegypti* são baseadas no uso de várias técnicas disponíveis, como o emprego do bioinseticida *Bacillus thuringiensis* h-14 (bti), peixes larvófagos das espécies *Gambusia affinis* e *Poecilia* sp. (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE, 1995) além dos inseticidas químicos das classes dos piretroides, carbamatos e organofosforados, e melhorias de saneamento (LEFEVRE *et al.*, 2003). Entretanto, o uso contínuo de inseticidas sintéticos tem causado descontrole da população do mosquito, levando ao surgimento de espécies resistentes a uma grande variedade de inseticidas. Esta estratégia também tem provocado outros efeitos indesejáveis, como a poluição ambiental, toxicidade para seres humanos e outros organismos (MACORIS *et al.*, 1999).

Em decorrência do intenso uso desses inseticidas, muitas espécies desenvolveram mecanismos de defesa para a sua sobrevivência, conseqüentemente, ocorreu uma redução na eficácia desses produtos devido à morte de todos os indivíduos suscetíveis e a permanência de indivíduos imunes a

essas substâncias (MACORIS *et al.*, 1999). O mosquito *Aedes aegypti*, cuja população se adapta rapidamente às condições de mudanças ambientais, apresenta rápida recuperação após as intervenções de controle (PAUL; HARRINGTON; SCOTT, 2006), neste sentido, existe a necessidade de mudanças periódicas nas atividades de controle desses insetos, isso requer a substituição das medidas convencionais por novos métodos, como os físicos, biológicos e a utilização de novos inseticidas, alternativas ambientalmente seguras, potencialmente adequadas e mais eficazes para uso em programas de combate à larva do *A. aegypti*. Uma das tendências é o estudo de produtos naturais de origem vegetal com propriedades larvicidas. Assim, na busca por novos compostos tem aumentado as pesquisas com recursos naturais e inseticidas biodegradáveis que visam minimizar impactos ambientais e encontrar novas substâncias que promovam a mortalidade das larvas e impeçam a criação de larvas resistentes devido à rotação de pesticidas. (JAMAL; HANSEN; JULU, 2002).

Alguns extratos de plantas apresentam atividade inseticida e esses potenciais fitoinseticidas podem ser considerados como alternativas mais seguras para o controle do mosquito, uma vez que, espera-se que os mesmos apresentem um elevado grau de biodegradação (PROMSIRI *et al.*, 2006; MURUGAN *et al.*, 2007;. RAHUMAN *et al.*, 2008).

A vantagem no uso de extratos de plantas contendo diferentes princípios ativos é que eles podem impedir o desenvolvimento da resistência larvar por conterem uma variedade de diferentes substâncias que podem atuar em vários mecanismos de ação inseticida (REGNAULT-ROGER *et al.*, 2004).

### 3.9 ATIVIDADE LEISHMANICIDA

A leishmaniose é uma doença infecciosa causada por parasitas do gênero *Leishmania* na família Trypanosomatida, manifesta-se de três formas: cutânea, mucocutânea e visceral. É uma doença grave e debilitante, caracterizada por febre prolongada, esplenomegalia, hipergamaglobulinemia e pancitopenia podendo evoluir a óbito se não tratada (TIUMAN *et al.*, 2011).

A doença é transmitida através da picada da fêmea de flebotomíneos infectados com o protozoário, o parasita é então internalizado através de macrófagos no fígado, no baço e no osso, apresentando duas formas morfológicas durante o seu ciclo de vida: amastigota no sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro mamífero, e promastigota nos órgãos digestivos do vetor (TIUMAN *et al.*, 2011).

Classificada como uma doença negligenciada, a Leishmaniose é um dos maiores problemas de saúde pública, causando significativa morbidade e mortalidade em vários países, é considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma das seis principais doenças infecciosas, com alta taxa de detecção e capacidade de produzir deformidades (CECHINEO FILHO *et al.*, 2013). Dados apontam que mais indivíduos humanos estão expostos ao vetor, o que faz com que os números de casos aumentem de modo alarmante (TIUMAN *et al.*, 2011).

A Leishmaniose é endêmica em mais de 70 países, 90% dos casos ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Paquistão, Peru, Arábia Saudita, e Síria. A forma visceral da doença ocorre predominantemente em áreas rurais e suburbanas de Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (BASANO; CAMARGO, 2004). Descrita em pelo menos 12 países da América Latina, apresenta uma ocorrência de 90% dos casos no Brasil, especialmente na região Nordeste (BRASIL, 2006).

A cada ano ocorrem cerca de 2 milhões de novos casos da doença, sendo de 1-1,5 milhões de leishmaniose cutânea. No entanto, apenas 600.000 casos são oficialmente notificados anualmente, pois a declaração é obrigatória em somente 32 países afetados pela doença. No Brasil ocorrem aproximadamente 20.000 casos anuais, atualmente em todas as unidades federativas há notificações de casos autóctones da doença (CARVALHO; FERREIRA, 2001; BRASIL, 2006).

O tratamento clássico para Leishmaniose requer a administração de drogas tóxicas e pouco toleradas, até o momento não existe terapêutica ideal para Leishmaniose, os principais medicamentos são os antimoniais que se apresentam como a melhor terapêutica disponível, ainda são usados: a pentamidina, a anfotericina B, a miltefosina, o alopurinol, a paramonicina e os antifúngicos, itraconazol e cetoconazol que tem demonstrado ser efetivos no tratamento de leishmaniose (URDAPILLETA, 2006).

O problema se torna mais grave, quando a má aplicação clínica dos medicamentos tem permitido o desenvolvimento de resistência a esses agentes de forma generalizada, além disso, não há vacinas eficazes para prevenir leishmaniose (TIUMAN *et al.*, 2011).

Desse modo, tem - se intensificado as pesquisas para se obter drogas mais eficazes e menos tóxicas aos pacientes. Os estudos recorrem aos produtos encontrados na natureza que são importantes fontes de compostos ativos biologicamente, muitos deles se tornam modelos para a síntese de novos fármacos (ACESTOR *et al.*, 2003; DAVIS *et al.*, 2004).

Extratos de algumas plantas têm apresentado atividade biológica anti-protozoários e podem servir como alternativa aos medicamentos convencionais para leishmaniose.

### 3.10 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As propriedades antimicrobianas de produtos naturais originários de plantas têm sido reconhecidas empiricamente durante séculos, mas foram confirmadas cientificamente apenas recentemente.

Os metabólitos secundários das plantas são compostos que demonstram propriedades antimicrobianas, dessa forma, essas substâncias podem contribuir no combate a bactérias patogênicas que afetam os seres humanos. Esses produtos de vegetal atuam através de duas maneiras, como “potencializadores da atividade antimicrobiana”, favorecendo a atividade dos antimicrobianos e como “atenuadores de virulência”, adequando a resposta do sistema imune do hospedeiro à invasão de patógenos (GONZALEZ-LAMOTHE *et al.*, 2009).

Atualmente o aumento à resistência a antimicrobianos conhecidos por microrganismos que causam prejuízos à saúde humana, tem incentivado ainda mais a procura por antibióticos de ocorrência natural. As propriedades antimicrobianas de plantas estão sendo amplamente pesquisadas, no entanto, há pouca informação disponível sobre os mecanismos de ação destes compostos antimicrobianos em bactérias e fungos (SÁNCHEZ; GARCÍA; HEREDIA, 2010).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL VEGETAL

#### 4.1.1 Coleta, identificação e exsicata

O material vegetal foi coletado no capão do CIFLOMA pertencente à Universidade Federal do Paraná, campus Jardim Botânico. A determinação 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 exsicata da espécie já tombada pelo museu sob o nº39484.

#### 4.1.2 Análises físico-químicas

##### 4.1.2.1 Umidade

O método utilizado para a determinação de umidade de *T. stellaris* foi o gravimétrico. Esse ensaio foi destinado a determinar a quantidade de substância volátil de qualquer natureza eliminada (BRASIL, 2010). Foram utilizados seis cadinhos, previamente dessecados, resfriados em dessecador e pesados. O material foi submetido à estufa a 100-105°C durante, 2 horas e resfriados em dessecador. O cadinho voltou à estufa até peso constante, não diferindo por mais de 5 mg entre as duas pesagens. O resultado foi dado pela porcentagem de água em relação ao material vegetal seco, através do seguinte cálculo:

$$\% \text{ de umidade} = \frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100$$

Pa = peso da amostra;

Pu = peso do cadinho contendo a amostra antes da dessecação;

Ps = peso do cadinho contendo a amostra após a dessecação.

#### 4.1.2.2 Cinzas totais

Para a determinação de cinzas totais das partes aéreas de *T. stellaris*, foi empregado o método gravimétrico descrito em Brasil (2010). Esse processo teve como objetivo estabelecer a quantidade de substâncias residuais não voláteis no processo de incineração. Foram utilizados seis cadinhos, previamente calcinados em mufla a 600°C durante um período de 30 minutos. O material foi incinerado na mesma temperatura de calcinação durante um período de 6 horas, até eliminação total do carvão. Após a incineração, os cadinhos foram esfriados em dessecador. Em seguida, procedeu-se a pesagem do resíduo presente e efetuados os cálculos em porcentagem de cinzas em relação ao material vegetal original, através do seguinte cálculo:

$$\% \text{ de cinzas} = \frac{P2 - P1}{P3} \times 100$$

P1 = Peso do cadinho após a calcinação e esfriamento;

P2 = Peso do cadinho com amostra após a calcinação e esfriamento em dessecador;

P3 = Peso da amostra inicial.

### 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 foi realizado segundo Moreira (1979), contando com algumas alterações. Todos os ensaios das análises fitoquímicas foram realizados em triplicata.

#### 4.1.3.1 Extração dos metabólitos solúveis em etanol

Os extratos hidroalcoólicos a 20% do caule e extratos hidroalcoólicos a 20% das folhas foram preparados por maceração. Utilizou-se 40 g do caule e 40 g das folhas de *Temnadenia stellaris*, previamente secos em estufa e triturados em moinhos de facas e martelos para cada uma das extrações, sendo estabilizados em 200 mL de álcool etílico a 77% v/v, por 1 hora em banho-maria a 70°C, posteriormente foram filtrados em papel e o volume completado para 200 mL.

Os extratos foram concentrados até um terço do volume em rotavapor e fracionado com solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano e acetato de etila. Para realizar o fracionamento sequencial, o extrato foi colocado em funil de separação, e agitado separadamente 10 vezes com 20 mL de cada solvente. Foram obtidas quatro frações: hexano, diclorometano, acetato de etila e os resíduos dos extratos que constituíram as frações hidroalcoólica. O volume das frações foram completados para 200 mL com os respectivos solventes.

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

#### 4.1.3.2 Extração de metabólitos solúveis em água

Os extratos aquosos do caule e os extratos aquosos das folhas foram preparados com 40 g do caule e 40 g das folhas de *Temnadenia stellaris*

respectivamente previamente secos e triturados, 200 mL de água foram adicionados aos extratos, permanecendo em banho-maria pelo período de 1 hora a 70 °C, posteriormente o material foi filtrado e o volumes completados com água até 200 mL.

Os extratos foram utilizados para a pesquisa de glicosídeos antocianos e ciano genéticos, saponinas, taninos condensados e hidrolisáveis e aminogrupos.

#### 4.1.3.3 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, que foram evaporadas em banho-maria a 50°C e ao resíduo seco foi 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. Foram utilizados tubos somente com o extrato, como controle negativo.

Foram 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.

#### 4.1.3.4 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 foram adicionados 5

gotas de HCl concentrado, levando ao aquecimento até ebulição. A reação é positiva quando há desenvolvimento de coloração vermelha.

#### 4.1.3.5 Pesquisa de heterosídeos flavônicos

Esta pesquisa baseou-se na modificação da estrutura do flavonoide em presença de ácido, como na reação de Shinoda ou cianidina, com HCl concentrado e magnésio em pó. Com essa reação pode-se caracterizar compostos contendo um núcleo  $\alpha$ -benzopirona, pelo desenvolvimento de cor laranja a vermelha. Levou-se à secura em banho-maria 10 mL das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila. Para a fração hidroalcoólica não houve a necessidade de secar. Adicionou-se 10 mL de etanol nas cápsulas com resíduo seco e foi transferido 5 mL para cada tubo de ensaio, inclusive 5 mL da fração hidroalcoólica. A cada tubo de ensaio adicionou-se 200 mg de limalha e ácido clorídrico fumegante (lentamente) com ocorrência de reação exotérmica (esta pesquisa será realizada com os tubos de ensaio dentro de um copo de béquer com gelo, dentro da capela). A reação positiva desenvolve coloração conforme as estruturas químicas presentes: flavonas com coloração amarela a vermelho; flavonol e dihidroflavonol com coloração vermelho a vermelho sangue; flavononas com coloração vermelha a violeta; derivados antociânicos com coloração vermelha tornando-se rosa e chalconas, auronas, dihidrochalconas, isoflavonas e isoflavononas não apresentam coloração.

##### a) Teste do oxálico bórico ou reação de Taubock

Levou-se à secura em banho-maria 10 mL de cada fração. Ao resíduo foi adicionado 5 gotas de acetona e 30 mg de ácido bórico misturado com ácido oxálico na proporção 1:1, agitou e levou-se novamente à secura. Ao resíduo foi adicionado 5 mL de éter etílico e foi transferido os respectivos resíduos para tubos de ensaio para verificação de fluorescência. Esta reação é explicada pela formação de quelatos,

que nos flavonoides, desenvolvem o aparecimento de fluorescência amarela esverdeada, enquanto que as flavonas e isoflavonas não apresentam esta propriedade. Os antociânicos coram-se, porém não produzem fluorescência.

#### b) Ensaio de Pacheco

Levou-se à secura em banho-maria 10 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica. Adicionaram-se alguns cristais de acetato de sódio e 0,1 mL de anidrido acético e foi aquecido em fogareiro. Em seguida, adicionou-se 0,1 mL de HCl concentrado. Os diidroflavonóis produzem um efeito batocrômico das bandas I e II, apresentando uma coloração roxa característica. Enquanto as flavonas, chalconas, auronas e os flavonóis, dão resposta negativa.

#### c) Ensaio com Zn e HCl

Levou-se à secura em banho-maria 10 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila. O resíduo foi dissolvido com 10 mL de etanol, por isso não houve necessidade de secar a fração hidroalcoólica. Transferiu-se para cada tubo de ensaio 5 mL do conteúdo das cápsulas, juntou-se uma pastilha de zinco e lentamente HCl fumegante. Essa reação é exotérmica e foi realizada em copo de becker contendo gelo e sob a capela. Apenas os diidroflavonóis produzem coloração rocha violeta. As flavononas e flavonol não produzem coloração.

#### 4.1.3.8 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 2N 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 foram marcados três pontos, e então foram efetuadas manchas de aproximadamente 1 cm de diâmetro com o restante das frações etéreas. As manchas 1 e 2 são tratadas com NaOH 1N 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 Iridoides

Para a pesquisa com substâncias iridoidais foi transferido para cada tubo de ensaio demarcado 2 mL das frações: hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica, adicionou-se uma pequena quantidade de cristais de Floroglucinol e 1 mL de HCL.

No caso de reação positiva observa-se o aparecimento de uma coloração verde escura.

Na segunda reação, transferiu-se para cada tubo de ensaio demarcado 2 mL das frações: hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica, adicionou-se 2 gotas de ácido sulfúrico.

No caso de reação positiva observa-se o aparecimento de uma coloração rosa violáceo.

Na terceira reação, transferiu-se para cada tubo de ensaio demarcado 2 mL das frações: hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica, adicionou-se 0,5 mL de uma solução alcoólica de vanilina 1%, e duas gotas de ácido sulfúrico.

No caso de reação positiva observa-se o aparecimento de uma coloração rosa cereja.

#### 4.1.3.9 Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos

A avaliação da presença de heterosídeos antraquinônicos foi realizada através da reação de Borntraeger, para tal, 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, foi feita então a filtragem e a adição de 30 mL de H<sub>2</sub>O.

Em um funil de separação foram realizadas extração 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 NH<sub>4</sub>OH. Observa-se a alteração da coloração para vermelho, a reação é considerada positiva.

#### 4.1.3.10 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 foram 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 foram ser transferidos para três tubos de ensaio, e o volume completado para 2 mL com clorofórmio.

Para a reação de Liberman-Bouchard foi adicionado aos tubos de ensaio 1 mL de anidrido acético e lentamente 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. A coloração pode

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%. Transferiu-se então as misturas para tubos de ensaio contendo 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

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.

#### 4.1.3.11 Pesquisa de heterosídeos antociânicos

Para análise qualitativa de heterosídeos antociânicos foram separados 5 mL do extrato aquoso do caule e 5 mL do extrato aquoso da folha em 3 tubos de ensaio respectivamente. No primeiro tubo foi adicionado HCl 1% até pH 4, o surgimento de tons avermelhados é indicativo de reação positiva; o segundo tubo foi alcalinizado com NaOH até pH 10, se positivo, observa-se tons azulados e o terceiro tubo foi 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 5 mL. Então, acrescentadas 5 gotas de HCl concentrado. Foi realizado o aquecimento até ebulição, havendo antocianidinas, ocorre o desenvolvimento de coloração vermelha.

#### 4.1.3.12 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Neste teste foram utilizados 3 tubos de ensaio com a mesma quantidade de extrato aquoso, ambos sofreram agitação intensa por cinco minutos, a espuma

formada foi 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 cianogênicos

Para a pesquisa de heterosídeos cianogênicos, 5 mL do extrato aquoso deve ser transferido para um tubo de ensaio de modo a não umedecer as paredes do tubo, e adicionado 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% ou 1N. 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, devem ser 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 picro-sódico.

#### 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 foi adicionado, 6 mL de formaldeído 40% e 4 mL de ácido clorídrico 37%. Essa mistura foi aquecida em refluxo por uma hora, e após resfriamento, filtrado.

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 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 1 mol/L, permanecendo em refluxo por 30 minutos. Após resfriamento, foi acidificado com 1 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 mol/L até o pH 4 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 5 mL de NH<sub>4</sub>OH 1 mol/L.

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, e sobre uma das manchas é gotejado o reativo de Nessler.

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

#### 4.1.3.17 Pesquisa de aminogrupos

A presença de aminogrupos foi avaliada através do uso de cromatografia em camada delgada, para isso, 10 mL do extrato aquoso foram concentrados até 5 mL á temperatura de 60°C, posteriormente 3 gotas desse extrato concentrado foram aplicados em uma cromatoplaça de CCD e após secas sobre uma das manchas foi colocada uma gota de ninhidrina.

A placa é aquecida em estufa por 15 min com temperatura de 90-100 °C e em caso de surgimento de coloração azul-violácea, há indicativo da presença de aminogrupos.

## 4.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA

### 4.2.1 Obtenção dos extratos

#### 4.2.1.1 Extração do material vegetal

Foram realizados extratos por dois tipos de extração: maceração e soxhlet respectivamente. O extrato do caule e o extrato das folhas (da planta fresca), foram realizados a partir de maceração dinâmica, cada parte morfológica da planta permaneceu por um período de duas semanas consecutivas em etanol à temperatura ambiente.

O extrato do caule e o extrato das folhas (da planta seca) foram realizados em aparelho de Soxhlet modificado. As amostras da planta foram estabilizadas, moídas em moinho de facas e martelos, pesadas e extraídas.

Na extração com Soxhlet, o aparelho é conectado um condensador de bolas e um balão de fundo chato contendo pérolas de vidro. A este sistema foram adicionados cerca de 6000 mL de álcool etílico 96°GL. 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).

#### 4.2.2 Determinação do teor de sólidos do extrato bruto

A análise do teor de sólidos foi realizada de acordo com adaptação da Farmacopeia brasileira IV. 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 forneceu o teor de sólidos em 10 mL do extrato.

#### 4.2.3 Obtenção das frações

Os extratos etanólicos bruto do caule e das folhas de *Temnadenia stellaris* obtidos por maceração ou por soxhlet foram submetidos ao fracionamento ácido/base devido à presença de alcaloides nesta estrutura vegetal de acordo com os testes realizados no ensaio fitoquímico preliminar.

Neste processo, os extrato etanólicos bruto das amostras foram submetidos à partição líquido-líquido com hexano para a remoção de substâncias apolares, o que deu origem a fração hexano, o volume restante foi acidificado com ácido clorídrico (HCl 0,1 mol/L), e submetido a extração líquido-líquido com clorofórmio com a finalidade de remover os componentes neutros e ácidos, sendo essa, a fração clorofórmio, o resíduo ácido restante foi alcalinizado até pH 10 com hidróxido de

amônio e submetido à partição líquido/líquido com diclorometano a fim de se obter a fração com alcaloides totais.

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, para eluição da amostra por meio de um sistema de passagem de solventes com gradientes de polaridades crescentes.

O controle de eluição foi realizado com o uso de lâmpada de luz UV a 360 nm. As características das frações recolhidas foram analisadas através de cromatografia em camada delgada, utilizando-se cromatoplaças de Sílica-gel 60 F254 Merck® e visualizadas com lâmpada UV no comprimento de onda de 360 nm.

#### 4.2.5 Elucidação estrutural

As substâncias isoladas foram submetidas às análises espectrométricas para elucidação de sua estrutura para isso, foram realizadas espectroscopia de absorção no ultravioleta, em infravermelho e espectroscopia de ressonância nuclear magnética de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

### 4.3 ANÁLISE DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Para cada amostra avaliada foram utilizadas triplicatas e os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA, quando se detectou diferença, as médias foram comparadas segundo o método estatístico de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Para realizar a leitura das absorvâncias das amostras foi utilizado espectrômetro UV- 1601 Shimadzu®).

#### 4.3.1 Atividade antioxidante

##### 4.3.1.1 Teor de compostos fenólicos totais

A determinação do teor de fenólicos totais seguiu o método descrito por Singleton *et al.* (1999) com pequenas modificações. O extrato bruto e frações do caule e folhas de *T. stellaris* foram diluídos em metanol, 1mg para 1 mL, foi adicionado aos tubos de ensaio e estes completado para 4 mL com água destilada. Após total solubilização foi adicionado 0,2 mL de reativo de Folin-Ciocalteau novamente homogeneizado e adicionado 0,4 mL de carbonato de sódio a 10%, agitado e depois 30 minutos de repouso em temperatura ambiente. Após este período foram realizadas as leituras em espectrofotômetro à 760 nm utilizando curva de calibração de ácido gálico nas concentrações de 2,5; 5,0; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5 e 20 µg/mL como padrão, as leituras foram realizadas em triplicata.

Os teores de fenólicos totais foram determinados em miligramas de ácido gálico por grama de extrato bruto, utilizando a seguinte equação com base na curva de calibração:  $y=0,0392x-0,0583$ ,  $R^2=0,9964$ , em que  $y$  é a absorvância e  $x$  a concentração final de equivalentes de ácido gálico pela concentração utilizada de extrato.

#### 4.3.1.2 Avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

O potencial de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) das amostras foram analisados por espectrofotometria. Foram preparados cinco soluções metanólicas das frações nas concentrações de 2,0 à 12,5 µg/mL, das quais 2,5 mL das soluções metanólicas dos extratos e frações foram adicionados a 1 mL de uma solução metanólica de DPPH• na concentração de 0,03 mmol/mL. Para as frações hexano foram utilizadas cinco soluções com concentrações entre 100 e 500 µg/mL. Para cada amostra foi preparado um branco com 2,5 mL da solução e 1 mL de metanol para cada concentração. Paralelamente foi feito um controle com 2,5 mL de metanol e 1 mL de DPPH•. Após trinta minutos de reação as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 518 nm, correspondente a absorção máxima do radical em estudo. Como padrões foram utilizados rutina e ácido ascórbico (MENSOR *et al.* 2001). Os resultados foram calculados da seguinte forma:

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

Onde Abs = Absorbância;

Para cada amostra testada foi calculada a porcentagem de inibição do DPPH• e por regressão linear foi possível calcular a  $CI_{50}$ , ou seja, a concentração da amostra que reduz 50% da concentração inicial de DPPH•. Os valores de  $CI_{50}$  foram comparados segundo o método estatístico de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 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 de acordo com o método proposto por Moraes *et al.* (2006) com adaptações.

Foram adicionados 0,1 mL dos extratos e frações na concentração de 70 µg/mL, 0,4 ml de H<sub>2</sub>O, 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 (cloreto de 2,2'-azo-bis-2-amidinopropano) 0,035M, 1,5 mL de ácido acético 20% (pH 3,5) e 1,5 mL de uma TBA 0,4% (ácido tiobarbitúrico) preparada em solução de SDS 0,55%, e como branco foi utilizado o butanol, e então levado a banho-maria a 95 °C por 1 hora.

Após o resfriamento da solução foram adicionados 1,5 mL de butanol, para extração da fase orgânica. Os tubos foram centrifugados a 3000rpm por 5 minutos e em seguida, foi lida a absorbância do sobrenadante a 532nm. Como controle negativo foi utilizada a mesma solução, sendo nesta a amostra substituída por 0,1 mL de etanol. O foi realizado em cinco repetições. O antioxidante BHT (Butilhidróxidotolueno) foi utilizado como padrão.

O cálculo das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico foi realizado com o auxílio da seguinte fórmula:

$$IA\% = \left(1 - \frac{Abs_A}{Abs_{CN}}\right) \times 100$$

Onde Abs<sub>A</sub> = Absorbância da amostra;

Abs<sub>CN</sub> = Absorbância do controle negativo;

#### 4.3.1.4 Formação do complexo fosfomolibdênio

O complexo fosfomolibdênio é formado pela reação da solução de fosfato de sódio 0,1 M (28 mL), molibdato de amônio 0,03 M (12 mL), ácido sulfúrico 3M (20 mL) e água destilada (q.s.p 100 mL), preparado no momento do uso (PRIETO, PINEDA, AGUILAR, 1999).

Soluções padrões de vitamina C e rutina, bem como as amostras de *T. stellaris*, foram preparadas na concentração de 200 µg/mL<sup>-1</sup> em metanol (BIANCO, 2003). Destas, 0,3 mL foram adicionados a 3 mL de solução reagente do complexo fosfomolibdênio. Os tubos foram fechados e mantidos em banho-maria à 95°C por 90 min. Após resfriamento, foi realizada a leitura a 695 nm, em um espectrofotômetro para obtenção das absorvâncias. A capacidade antioxidante das amostras foi expressa em relação à rutina e vitamina C, padrões considerados com 100% de atividade antioxidante.

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

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

Onde Abs = Absorvância;

#### 4.3.1.5 Atividade antioxidante pelo método do poder redutor (azul da prússia)

No teste de atividade antioxidante pelo método do poder redutor (azul da prússia), os extratos e frações nas concentrações de 200µg/mL foram transferidos

para tubos de ensaio de 25 mL, e adicionados tampão fosfato de potássio a 0,2 M (pH 7,0) e ferricianeto de potássio a 1,0%. A mistura foi incubada a 45°C por 20 min., e em seguida o ácido tricloroacético a 1% foi adicionado aos tubos de ensaio. Cerca de 2,5 mL foram transferidos para tubos de ensaio de 5,0 mL, e adicionados 1,5 mL de H<sub>2</sub>O destilada, 1,0 mL de etanol e 0,5 mL de FeCL<sup>3</sup> a 1,0% (p/v). A leitura foi realizada a 700 nm (YEN; CHEN, 1995).

Os resultados foram expressos em atividade antioxidante relativa (AAR%) da amostra em relação à rutina, conforme a fórmula:

$$\text{AAR\%} = \frac{\text{Abs}_{(\text{amostra})}}{(\text{Abs}_{(\text{vitamina C})} - \text{Abs}_{(\text{branco})})}$$

Onde Abs= Absorbância;

#### 4.3.1.6 Atividade antioxidante pelo método tiocianato férrico

Os extratos e frações de *Temnadenia stellaris* na concentração de 200 µg/mL foram diluídos em 1,0 mL de etanol e em seguida, 250 µL de etanol, 550 µL de ácido linoleico a 2,51% (p/v) em etanol (99,0% v/v), 2,0 mL de tampão fosfato 0,05 mol/L (pH 7,0) e 900 µL de água destilada foram adicionados aos tubos deixados em banho-maria a (50,0 ± 0,5)°C. Para 25 µL desta solução foram adicionados 3,25 mL de etanol 75% (v/v), 25 µL de tiocianato de amônio a 30% (p/v) e 25 µL de cloreto ferroso 0,02 mol/L. Após 3 minutos de reação à temperatura ambiente (25,0 ± 0,5)°C, as amostras foram transferidas para microplacas e realizada leitura da absorbância a 500 nm, em leitor de microplacas, a leitura se repetiu a cada 24 horas, até que a cor púrpura do controle alcançasse um valor máximo (KIKUZAKI; NAKATANI, 1993; RAYMUNDO; HORTA; FETT, 2004). O antioxidante BHT (Butilhidróxidotolueno) foi utilizado como padrão para estes ensaios. A porcentagem de inibição na oxidação lipídica foi calculada de acordo com a fórmula:

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

Onde Abs = Absorbância;

#### 4.3.1.7 Atividade antioxidante pelo método de degradação da desoxirribose

A capacidade dos extratos para evitar a decomposição da desoxirribose induzida pelo Ferricianeto ( $\text{Fe}^{++}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) foi avaliada usando o método de Halliwell e Gutteridge (1981). Para os ensaios 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  da solução metanólica de cada extrato ou fração de *Temnadenia stellaris* foram adicionadas em 120  $\mu\text{L}$  de solução de desoxirribose (20  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ), 0,125 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 mol/L), 40  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio (20  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ), 40  $\mu\text{L}$  de sulfato ferroso (500  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) e 500  $\mu\text{L}$  de água destilada. A mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C. Foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de solução de ácido tricloroacético 2,8% e 400  $\mu\text{L}$  de ácido tiobarbitúrico 0,6%. A mistura foi novamente incubada a 30°C por 20 minutos. A leitura foi realizada em 532 nm. O antioxidante ácido ascórbico foi utilizado como padrão, na concentração de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

#### 4.3.1.8 Atividade antioxidante pelo método de sequestro de $\text{H}_2\text{O}_2$

A habilidade dos extratos em sequestrar peróxido de hidrogênio foi determinada de acordo com o método descrito por Ruch; Cheng; Klaunig (1989). Uma solução de peróxido de hidrogênio (4 mmol/L) foi preparada em tampão fosfato (pH 7,4) e a concentração de peróxido de hidrogênio foi determinada espectrofotometricamente no comprimento de onda de 230 nm. Para cada 100  $\mu\text{L}$  de solução metanólica dos extratos e frações semipurificadas de *Temnadenia stellaris* na concentração de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , foram adicionados 900  $\mu\text{L}$  de etanol e 600  $\mu\text{L}$  de

peróxido de hidrogênio 20 µmol/L. A vitamina C foi utilizada como padrão, na concentração de 500 µg/mL. Após 10 minutos de reação, à temperatura ambiente (25,0 ± 0,5)°C realizou-se leitura em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 230 nm, contra a solução branco contendo os extratos e frações em solução de tampão sem peróxido de hidrogênio. O cálculo da atividade sequestradora de peróxido de hidrogênio deu-se por meio da fórmula:

$$\% \text{ de Sequestro de H}_2\text{O}_2 = \frac{[100 - (\text{Abs}_{(\text{controle})} - \text{Abs}_{(\text{amostra})})] \times 100}{(\text{Abs}_{(\text{controle})})}$$

Onde Abs = Absorbância;

#### 4.3.1.9 Atividade antioxidante pelo método de oxidação acoplada do sistema β-caroteno/ácido linoleico

A medida da atividade antioxidante foi determinada pela oxidação acoplada do β-caroteno e do ácido linoleico, de acordo com Mattos *et al.*, 2009. Foram pesados 5mg de β-caroteno, os quais foram dissolvidos em 5 mL de clorofórmio. Posteriormente, foi retirada uma alíquota de 3 mL da solução clorofórmio – β-caroteno e adicionada a 50 mg de ácido linoleico e 200 mg de Tween 40. Na sequencia, o clorofórmio foi removido, e o resíduo obtido redissolvido em 50 mL de água aerada durante 30 min. Alíquotas de 5 mL da emulsão β-caroteno/ácido linoleico foram misturadas com 50 µL do EEB e frações e de *Temnadenia stellaris*. A oxidação da emulsão foi monitorada espectrometricamente a 470 nm, no tempo inicial e após 120 min de incubação a 50 °C. O antioxidante vitamina C foi utilizado como padrão. A atividade antioxidante foi expressa pela porcentagem de inibição relativa em relação ao controle depois de 120 min de incubação, de acordo com a seguinte equação:

$$AA\% = \frac{[1 - (Abs_{(controle)i} - Abs_{(controle)f})]}{(Abs_{(amostra)i} - Abs_{(amostra)f})} \times 100$$

Onde Abs = Absorbância;

i = inicial;

f = final;

#### 4.3.2 Correlação das atividades antioxidantes

Para a correlação entre as atividades antioxidantes dos de *T. stellaris* foi utilizado métodos de análise multivariada pelo software Statistica 7.0. Os extratos e frações foram submetidos ao método de análise de agrupamento hierárquico (HCA), este método agrupa as amostras em um espaço bidimensional (dendograma). A análise foi realizada em todos os dados experimentais relacionados à atividade antioxidante, desse modo, as amostras foram definidas de acordo com sua proximidade e representadas pelas distâncias euclidianas, utilizadas como métrica para esta análise pelo método de ligação simples. Foram formados pelas amostras mais próximas (semelhantes) um índice de similaridade próximo a 1 e para as amostras distantes (diferentes) um índice de similaridade próximo a zero (MONTEIRO *et al.*, 2009).

A análise da atividade antioxidante também foi agrupada de acordo com os métodos testados pela análise de componentes principais (ACP). A ACP permite transformar um conjunto de variáveis iniciais, correlacionadas entre si, num outro conjunto de variáveis que representam os componentes principais. É uma técnica de análise multivariada aplicada a um conjunto de variáveis para descobrir quais dessas são mais relevantes (VICINI, 2005).

### 4.3.3 Avaliação da toxicidade

#### 4.3.2.1 Avaliação da toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*

A avaliação da toxicidade utilizando o microcrustáceo *Artemia salina* foi utilizada a metodologia de Meyer (1982), com adaptações.

A água do mar artificial foi preparada utilizando 14,31 g de sal marinho (Instant Ocean Sea Salt) dissolvido em 400 mL de água destilada, com pH ajustado entre 8 a 9, com carbonato de sódio. Os ovos de *A. salina* (200 mg/ 400 mL) foram adicionados na água e mantidos sob agitação e aeração constantes por um período de 48 horas para a eclosão. Na primeira hora do processo foi mantida a iluminação de 20 W sendo a temperatura controlada entre 26 a 30° durante as 48 horas.

As amostras foram preparadas em uma solução com concentração de 10 mg/mL (solução 1), através da diluição 1:10 em solvente compatível, foi feita a solução 2. O ensaio de toxicidade foi realizado em tubos de ensaio. Ao primeiro tubo (1), adicionou-se 250 µL da solução 1; no segundo tubo (2), 25 µL da solução 1; e ao terceiro tubo (3), 25 µL da solução 2.

Como controle negativo, foram utilizados o mesmo solvente no qual as amostras foram diluídas em água do mar artificial, e como controle positivo foi utilizado 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.

Após a eclosão dos ovos, 30 náuplios de *Artemia salina* foram transferidos para tubos e volume de todos ajustado para 2,5 mL com água do mar artificial. Após 24 horas foi realizada a contagem de náuplios mortos e vivos. Os dados foram analisados pelo método estatístico Probitos, onde foram determinados os valores de DL<sub>50</sub>. As frações foram consideradas ativas quando os valores de DL<sub>50</sub> foram menores que 1000µg/mL (MEYER; 1982).

#### 4.3.2.2 Avaliação da atividade hemolítica

A determinação das porcentagens de hemólise foi realizada segundo método de Banerjee *et al.* (2008), adaptado. Foram transferidos 5 mL de sangue de carneiro de origem comercial da empresa Newprov®, previamente homogeneizado sob leve agitação, para um tubo de ensaio e centrifugado durante 5 minutos a 3000 rpm com PBS gelado. Foram realizadas 6 lavagens sequenciais com salina tamponada com fosfato (PBS) e descartando-se sempre o sobrenadante. Na última lavagem o sobrenadante encontrou-se incolor. Em seguida, foi realizado uma diluição a 2% com a papa de eritrócito utilizando como diluente o PBS. Para a realização da prova de hemólise foram preparados eppendorfs com hemólise a 100% (controle positivo), hemólise basal (branco), controle solvente e os testes (amostras). Na realização do controle positivo foram pipetados 200 µL de água potável em 200 µL de solução de eritrócito a 2%. Enquanto para o branco foram pipetados 200 µL de PBS em 200 µL de solução de eritrócito a 2%. No controle solvente foram adicionados 20 µL de etanol mais 180 µL de PBS em 200 µL de solução de eritrócito a 2%. Para o preparo das amostras foram preparadas soluções metanólicas dos extratos e frações nas concentrações de 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 200 µg/mL e 100 µg/mL em 200 µL de solução de eritrócito a 2%. Para dissolver melhor as amostras, adicionou-se 10% de etanol do volume total de cada amostra. Todas as amostras, os controles e o branco foram realizados em triplicatas. Em seguida os eppendorfs foram uniformemente homogeneizados com leve agitação manual. Após foram incubados durante 3 horas em estufa com temperatura controlada a 37 °C. Ao término da incubação os eppendorfs foram centrifugados em centrífuga Minispin Plus da empresa Eppendorf® a 3000 rpm durante 5 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em microplaca de Elisa de 96 poços, para onde foram pipetados 300 µL do sobrenadante das amostras. A leitura foi realizada no fotômetro de microplaca Multiscan FC Thermo Scientific®. A leitura foi realizada a 540nm.

#### 4.3.1 Atividade larvicida sobre *Aedes aegypti*

##### 4.3.1.1 Avaliação da mortalidade

A atividade larvicida dos extratos e frações de *Temnadenia stellaris* sobre *Aedes aegypti* foi realizada segundo World Health Organization (1981 a) com modificações. Os ovos de *Aedes aegypti* da linhagem Rockefeller foram fornecidos pela Fundação Osvaldo Cruz - RJ; 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  $(27 \pm 2)^\circ\text{C}$  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. Soluções de concentração de 1.000  $\mu\text{g/mL}$  dos extratos e frações, foram preparadas e solubilizadas em 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas com água sem cloro em concentrações distintas de 1.000, 500, 250 e 125  $\mu\text{g/mL}$  para os testes. Foram colocados em copos de plástico as amostras contendo 15 larvas nos 1º, 2º, 3º e 4º estádios e o volume foi completado para 5 mL. Para cada concentração foram usadas 10 larvas em triplicata. Solução aquosa de DMSO 0,5 % foi utilizada em triplicata como controle negativo.

O inseticida utilizado como controle positivo foi o temefós grau técnico 90% lote 005/2011 fabricado por laboratórios "Fersol Mairinque", São Paulo, e feita a calibração segundo o protocolo recomendado pela Organização Mundial da Saúde descrito em Who (1981 a,b), Lima e Colaboradores (2003); Braga e Colaboradores (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). O protocolo compreende a resposta de mortalidade frente à exposição em concentração diagnóstico (CD) na exposição a um gradiente de concentrações (concentrações múltiplas - CM). A atividade larvicida foi avaliada após 24 horas por meio da contagem do número de larvas mortas em cada amostra. Larvas moribundas, incapazes de atingir a superfície da água quando tocadas, foram consideradas como mortas (WHO, 1981a). Os valores da concentração letal

(DL<sub>50</sub>) em µg/mL foram determinados utilizando o método de análise Probitos (FINNEY, 1971).

#### 4.3.1.2 Avaliação da morfologia interna e externa das larvas

Larvas no 4<sup>o</sup> 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 Análise da atividade leishmanicida

##### 4.3.2.1 Viabilidade celular de Leishmania

O protocolo original deste ensaio foi descrito por Mosmann (1983) e adaptado por Palit (2008). A metodologia do MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) utilizou  $2 \times 10^6$  *Leishmania* amazonensis/ mL, após contagem. Após um período de 72h de incubação a 24°C, os meios contendo *Leishmania* foram centrifugadas a 4000g, a 4°C durante 10 minutos. O meio foi retirado com auxílio de micropipetador com ponteiros estéreis. O pellet foi então ressuspensão em solução de MTT. Para completa ressuspensão e padronização entre os ensaios utilizou-se agitador do tipo Vortex (10 segundos, agitação máxima). O meio com leishmania foi transferido para eppendorfs e adicionados 100 µL dos extratos e frações para teste. Essa solução foi mantida por um período de 4 horas a 24°C. Os cristais formados a partir do metabolismo dos parasitas ativos foram ressuspensos em dimetilsulfóxido (DMSO) após centrifugação e retirada do

sobrenadante não metabolizado. O conteúdo de 100 µL do meio e foi distribuído em poços de microplacas e lidos em leitor de absorvância para multipoços na frequência de 595 nm.

O percentual de células vivas em relação ao controle negativo foi calculado com o auxílio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de células vivas} = \frac{\text{Abs}_{(\text{teste})} - \text{Abs}_{(\text{branco})}}{\text{Abs}_{(\text{CN})} - \text{Abs}_{(\text{branco})}} \times 10$$

Onde: Abs = Absorvância;

CN = Controle Negativo;

#### 4.3.3 Análise da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana de produtos naturais pode ser avaliada por diferentes métodos laboratoriais *in vitro*, utilizados para determinar o potencial antimicrobiano (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2003). Para Rios, Recio e Villar (1988) a determinação da CIM é considerada a melhor metodologia para avaliar a suscetibilidade ou resistência de bactérias a antimicrobianos.

Para avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos e frações de *Temnadenia stellaris* foi empregado o método de microdiluição, para determinar a Concentração Inibitória Mínima (dissolução da amostra em meio de cultura líquido) de acordo com (SOUZA *et al.*, 2014). Para realização dos testes foram utilizadas cepas comerciais dos microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. O ensaio foi realizado em triplicata para cada amostra.

#### 4.3.3.1 Determinação da concentração inibitória mínima – atividade antibacteriana

Os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram determinados pela técnica da microdiluição em caldo (CLSI, 2008). Os extratos e frações foram preparados através de diluição seriada em 100 µL de caldo Mueller-Hinton (MHB – Merck, Darmstadt, Alemanha), em um intervalo de concentração de 1000 µg/mL a 7,81 µg/mL em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de “U”.

As suspensões bacterianas foram preparadas em solução salina fisiológica na concentração de  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL, equivalente ao tubo 0.5 de McFarland e em seguida foram inoculadas em um volume de 5 µL nos orifícios, permanecendo uma concentração final de  $10^4$  UFC/mL.

O controle negativo da atividade inibitória dos diluentes, etanol e DMSO, foram realizados adicionando-se 100 µL de solução de etanol 10% e DMSO 2% em 100 µL de MHB e 5 µL dos inóculos bacterianos. Para o controle de esterilidade, foram utilizados 100 µL de MHB e 100 µL do extrato, fração ou composto isolado. O controle positivo ou de viabilidade bacteriana, foi preparado com 100 µL de MHB e 5 µL dos inóculos bacterianos.

As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 16 a 20 horas. Decorrido este intervalo de tempo foram acrescentados 20 µL de solução aquosa de TTC a 0,5% e as microplacas foram reincubadas por três horas a 35 °C. Em seguida foi realizada a leitura dos resultados.

#### 4.3.3.2 Interpretação dos resultados

Os valores obtidos das CIMs foram classificados em bom potencial inibitório (até 100 µg/mL); moderada atividade inibitória (entre 100-500 µg/mL); fraca atividade inibitória (entre 500-1000 µg/mL) e inativos (maiores que 1000 µg/mL) (TANAKA *et al.*, 2005; AYRES *et al.*, 2008; HOLETZ *et al.*, 2002). Os compostos isolados foram classificados como inativos para valores de CIM maiores que 1000 µg/mL.

## 4. RESULTADOS

### 5.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

Foram realizadas duas coletas, no mês de março do ano de 2013, a identificação da planta foi realizada por análise comparativa de exsicata tombada no Museu Botânico Municipal de Curitiba, sob o número de registro 39484.

Foram obtidos na primeira coleta 605g de caule e 400g de folhas, que foram secos e estabilizados e posteriormente utilizados para extração etanólica em aparelho Soxhlet.

A segunda coleta permitiu a obtenção de 90g de folhas e 120g de caule, as amostras da planta fresca foram reservadas para extração por maceração.

### 5.2 UMIDADE E CINZAS TOTAIS

O teor de umidade pode ser utilizado como padrão para o controle de qualidade de matérias primas vegetal, o que possibilita segurança para análises posteriores, na preparação de extratos, rendimento e identificação dos constituintes. Os métodos de secagem em estufa determinam não somente a perda de água, como também dos demais constituintes volatilizados com a água (ISENGARD; FÄRBER, 1999; FARIAS, 2003).

O teor de cinzas totais 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 (FARIAS, 2003).

TABELA 2 – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE UMIDADE E CINZAS TOTAIS

DETERMINAÇÃO	CAULE	FOLHAS
UMIDADE%	7,71 ± 0,07	11,88 ± 0,02
CINZAS TOTAIS%	8,45 ± 1,08	9,98 ± 0,1

### 5.3 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO EXTRATO BRUTO

Para a obtenção do extrato bruto foi empregado o álcool 95% como solvente. Após a obtenção do extrato bruto foram realizados testes físico-químicos, que estão presentes na (TABELA 3).

TABELA 3 – RESULTADOS FÍSICO-QUÍMICOS OBTIDOS COM O EXTRATO BRUTO.

DETERMINAÇÃO	CAULE	FOLHAS
pH	4,7	4,5
TEOR DE SÓLIDOS (%)	8,5 ± 1,08	9,9 ± 0,1
COLORAÇÃO	MARRON	VERDE

### 5.4 ESTUDO FITOQUÍMICO PRELIMINAR

#### 5.4.1 Pesquisa de metabólitos solúveis em etanol

Para o estudo fitoquímico das amostras de *Temnadenia stellaris* utilizou-se extrato hidroalcoólico 20% e das frações hexano, diclorometano e acetato de etila os resultados obtidos estão presentes na (TABELA 4).

TABELA 4 – RESULTADO DO ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO 20% de *Temnadenia stellaris*

Extrato Etanólico	Frações							
	Caulé				Folhas			
Metabólito/ Teste	FHex	FD	FAE	FHA	FHex	FD	FAE	FHA
Alcaloide (Dragendorff)	(++)	(+++)	(-)	(++)	(+++)	(+++)	(-)	(+++)
Alcaloide (Bouchard)	(++)	(+++)	(-)	(++)	(+++)	(+++)	(-)	(+++)
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	(++)	(++)	(-)	(++)	(++)	(++)	(-)	(++)

NOTA: (FHex) Fração Hexano, (FD) Fração Diclorometano, (FAE) Fração Acetato de Etila, (FHA) Fração Hidroalcoólica; Resultados expressos em (+++) muito positivo; (++) positivo; (+) levemente positivo; (-) negativo;

As reações qualitativas para caracterização de alcalóides baseiam-se na formação de complexos insolúveis (precipitados). Na avaliação quanto a presença de alcaloides as amostras da planta demonstraram positividade para o teste, ocorrendo o aparecimento de precipitado de cor laranja avermelhado para o reagente de Dragendorff que constitui uma solução de iodo bismutado de potássio K(BiI<sub>4</sub>) em ácido diluído que forma precipitados laranja avermelhados quando em contato com alcaloides e compostos nitrogenados. Estes dados da prospecção fitoquímica estão de acordo com estudos que apontam para a presença de alcaloides como marcadores químicos para a família Apocynaceae (RIZZINI; MORS, 1976; MOURA; AGRA, 1989; SENNBLAGD *et al.*, 1998).

O ácido chiquímico dá origem aos alcaloides pelas vias do triptofano e da fenilalanina/tirosina, e o acetil-CoA, dá origem aos alcaloides da ornitina e da lisina através do clico do ácido cítrico que são os mesmos precursores das antraquinonas, assim, o resultado negativo para antraquinonas já era aguardado considerando a presença de alcaloides na planta, isso porque 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).

Por sua vez, dentro da rota de biogênese, os esteroides e os terpenoides, também encontrados na prospecção fitoquímica, compartilham das mesmas reações de síntese, sendo o triterpenoide escaleno um intermediário comum para as duas vias. A biossíntese dessas substâncias ocorre através da via metabólica que tem início na redução de acetil-CoA ao mevalonato (YANKAN, 2006). Nesta mesma via de origem encontram-se outra classe de alcaloides, denominadas pseudoalcaloides, que são substâncias derivadas de terpenos e esteroides (SANTOS, 2007).

Também foram positivas na avaliação, Leucoantocianidinas, heterosídeos flavônicos, que 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).

Além de alcaloides, foram detectadas também a presença de iridóides, o que indicam outras possibilidades promissoras para a pesquisa fitoquímica e de atividades biológicas desta espécie vegetal.

#### 5.4.2 Pesquisa de metabólitos solúveis em água

Os grupos de metabólitos secundários solúveis em água detectados no ensaio encontram-se na (TABELA 5).

TABELA 5 – RESULTADO DO ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO AQUOSO 20%

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

NOTA: Resultados expressos em (+) positivo; (-) negativo;

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).

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; MELLO, 2007), em caso de baixa 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; MELLO, 2007).

## 5.5 ANÁLISE FITOQUÍMICA

### 5.5.1 Partição das frações

A partição líquido-líquido das frações foi realizada em aparelho Soxhlet modificado após obtenção dos extratos brutos. Os solventes utilizados para a obtenção das frações foram de polaridade crescente (hexano, clorofórmio e diclorometano). Na (TABELA 6), está representado a quantidade das frações em grama e o rendimento em % em relação à quantidade de planta seca coletada.

TABELA 6 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DE EXTRATOS ETANÓLICOS PREPARADOS POR MACERAÇÃO E SOXHLET

Amostras	RENDIMENTOS			
	Caule		Folha	
	Maceração	Soxhlet	Maceração	Soxhlet
<b>FHex</b>	1,092g – 0,91%	5,684g – 0,93%	0,819g – 2,40%	13,080g – 3,27%
<b>FCI</b>	0,779g – 0,65%	11,365g – 1,87%	0,716g – 0,80%	5,540g – 1,38%
<b>FD</b>	0,137g – 0,11%	0,561g – 0,09%	0,163g – 0,18%	0,243g – 0,06%

NOTA: (**FHex**) Fração Hexano, (**FCI**) Fração Clorofórmio, (**FD**) Fração Diclorometano.

### 5.5.2 Purificação das frações e elucidação das estruturas

Com a realização da cromatografia em coluna com a FHex do caule extraído por soxhlet, foram recolhidos 85 frascos contendo aproximadamente 10 ml de eluato que foram levados à secura em temperatura ambiente para cristalização dos compostos. Os frascos de número 10 a 15 (4,67m g) foram reunidos, tendo em vista apresentarem mesmo perfil cromatográfico por análise em placas de CCDs. O composto H11 foi isolado na forma de cristais esbranquiçados solúveis em  $\text{CHCl}_3$ .

A identificação desta amostra foi realizada por meio de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e baseada nos dados espectrais e comparação com a literatura, sendo identificada a substância  $\beta$ -sitosterol.

O espectro RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz em  $\text{CHCl}_3$ ) da amostra H11 está demonstrado na (FIGURA 7) e (FIGURA 8), sinais intensos entre  $\delta 0,7$ - $2,4$  ppm, sugerem uma estrutura típica de esqueleto esteroidal. O singlete, em  $\delta 0,68$  ppm refere-se ao hidrogênios do grupo metílico do carbono 18. Por outro lado, os grupamentos metila dos carbonos 26, 27, 29, 21, e 19 estão representados pelos sinais  $\delta 0,80$ ;  $\delta 0,83$ ;  $\delta 0,85$ ;  $\delta 0,88$  e  $\delta 1,01$  ppm, respectivamente. A presença de um multiplete centrado em  $\delta 3,52$  ppm, refere-se ao hidrogênio do carbono 3, o que sugere a presença de um hidrogênio carbinólico típico da  $\beta$ -hidroxilação característica inerente aos fitoesteróis. O dubleto sinalizado em  $\delta 5,35$  corresponde a um hidrogênio olefínico ligado a carbono  $\text{sp}^2$  indicando a presença de uma ligação dupla endocíclica em carbono 6. Os demais sinais entre  $\delta 0,7$ - $1,0$  de grupamentos metílicos e entre  $\delta 1,0$  –  $2,0$  de grupos metilênicos, reforçam o indicio de se tratar da substância  $\beta$ -sitosterol. Esses dados corroboram aos obtidos no estudo realizado por Baratto (2010).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da amostra H11 está ilustrado na (FIGURA 9) e (FIGURA 10) sugerem uma estrutura com um esqueleto carbônico bastante extenso, foram observados 29 sinais de carbonos que evidenciam assim um esteroide. Verificou-se a presença de dois sinais  $\delta 140,78$  e  $121,75$  que correspondem aos carbonos olefínico da ligação dupla endocíclica C-5 e C-6, e ainda um sinal em  $\delta 71,86$  que corresponde ao carbono C-3 ligado a uma hidroxila (carbono carbinólico). Os sinais entre  $\delta 56,80$  e  $11,89$  são atribuídos aos carbonos metilênicos e metílicos das moléculas.

Os deslocamentos encontrados para  $^{13}\text{C}$  estão demonstrados na (TABELA 7). Os valores obtidos são similares aos encontrados por Dall' Stella (2008), na espécie *Dorstenia multiformis*.

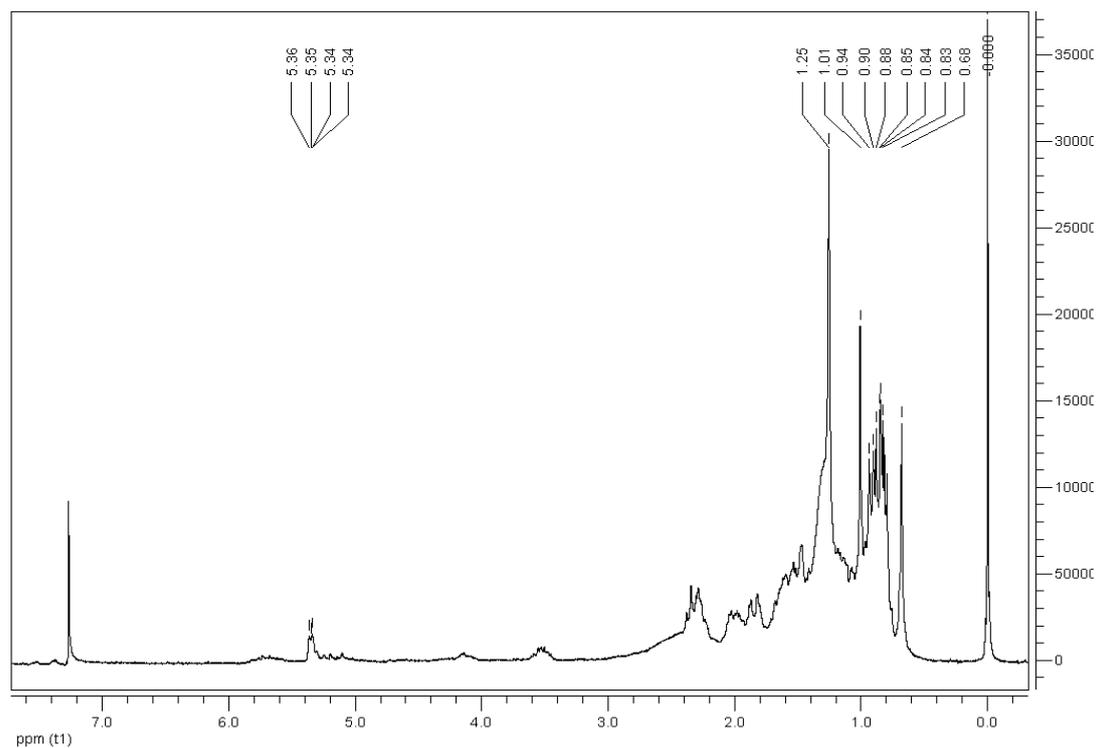


FIGURA 7 – ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup>H (200 MHZ EM CDCL<sub>3</sub>).

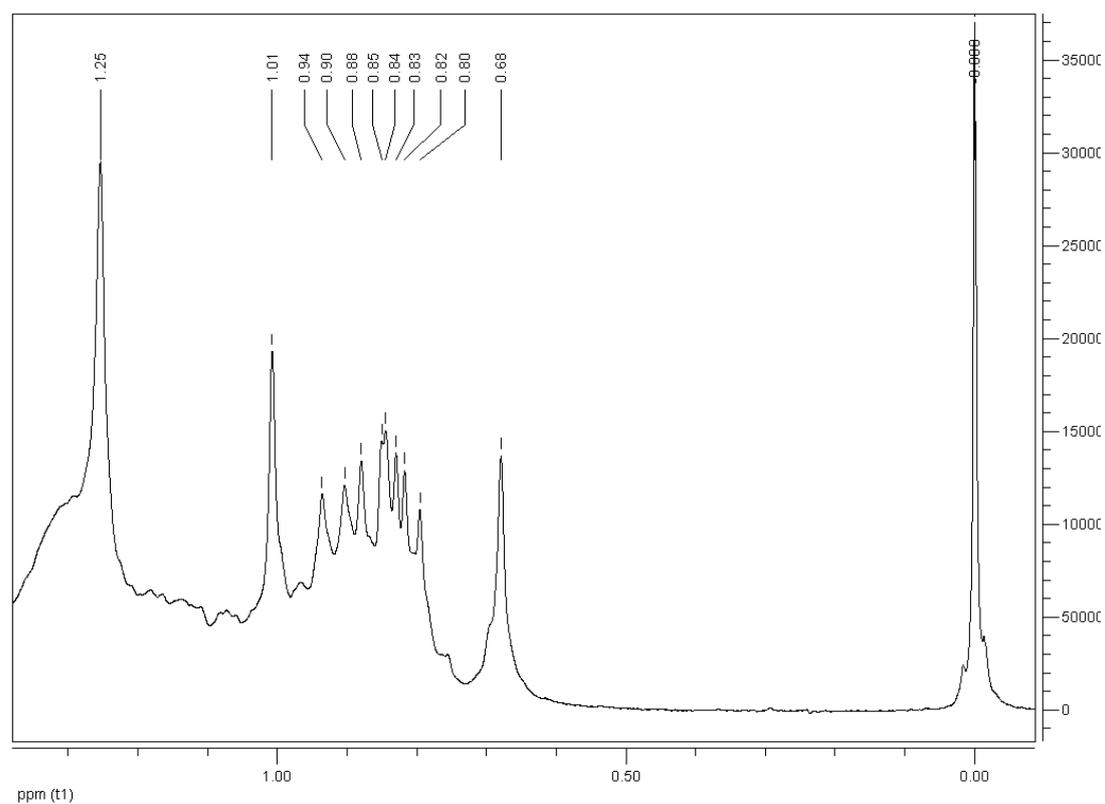


FIGURA 8 – EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup>H (200 MHZ EM CDCL<sub>3</sub>) DA REGIÃO ALIFÁTICA DE ( $\delta$  1,30 – 0,50 ppm).

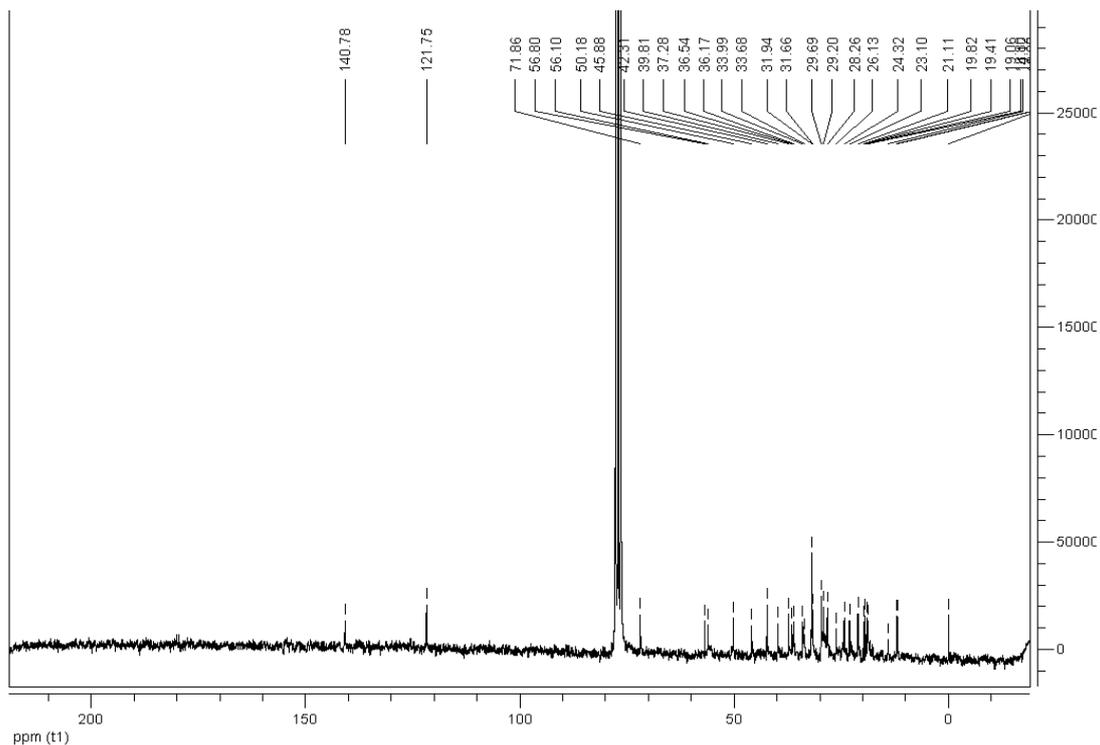


FIGURA 9 – ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  (200 MHz EM  $\text{CDCl}_3$ ).

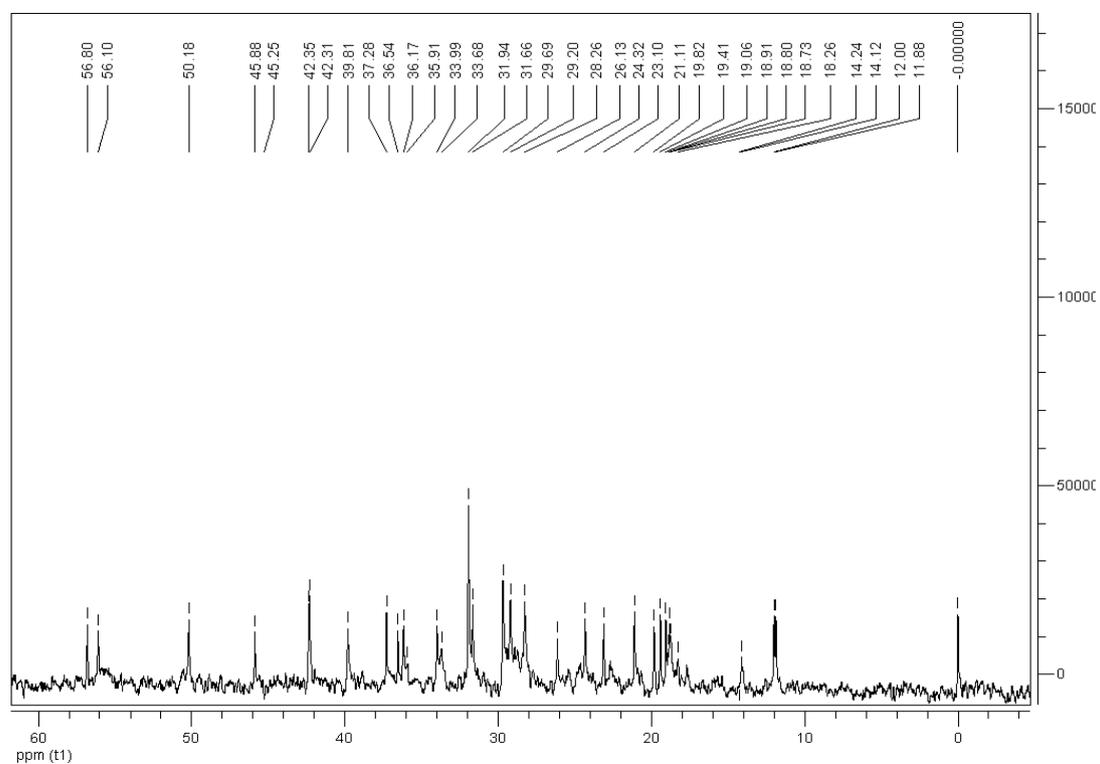


FIGURA 10 – EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  (200 MHz EM  $\text{CDCl}_3$ ) DA REGIÃO ALIFÁTICA DE ( $\delta$  60 – 1 ppm).

TABELA 7 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  E  $^1\text{H}$  (200 MHz, 50 MHz, ppm, CDCl<sub>3</sub>) DA SUBSTÂNCIA (H11) COM OS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA  $\beta$ -SITOSTEROL

Posição	RMN de $^{13}\text{C}$	RMN de $^{13}\text{C}$ Literatura <sup>a</sup>	RMN de $^1\text{H}$	RMN de $^1\text{H}$ Literatura <sup>b</sup>
1	37.28	37.26		
2	31.66	31.68		
3	71.86	71.81		
4	42.31	42.21		
5	140.78	140.75		
6	121.75	121.71	5,34 (H, <i>d</i> )	5,35 (1H, <i>d</i> )
7	31.94	31.92		
8	31.5	31.92		
9	50.18	50.14		
10	36.54	36.51		
11	21.11	21.09		
12	39.81	39.78		
13	42.37	42.32		
14	56.80	56.78		
15	24.32	24.31		
16	28.26	28.26		
17	56.10	56.06		
18	11.88	11.87	0,68 (3H,s, <i>J</i> = 3,8 Hz)	0,68 (3H,s, <i>J</i> = 3,8 Hz)
19	19.41	19.40	1,01 (3H, s)	1,01 (3H, s)
20	36.17	36.15		
21	11.81	18.79	0,88 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,5 Hz)	0,91 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,5 Hz)
22	33.99	33.95		
23	26.13	26.08		
24	45.88	45.84		
25	29.20	29.15		
26	19.82	19.83	0,80 (3H, s)	0,81 (3H, s)
27	19.06	19.04	0,83 (3H, s)	0,83 (3H, s)
28	23.10	23.07		
29	12	11.99	0,85 (3H, s)	0,85 (3H, s)

NOTA: <sup>a</sup>Dall' Stella (2008); <sup>b</sup>Baratto ( 2010);

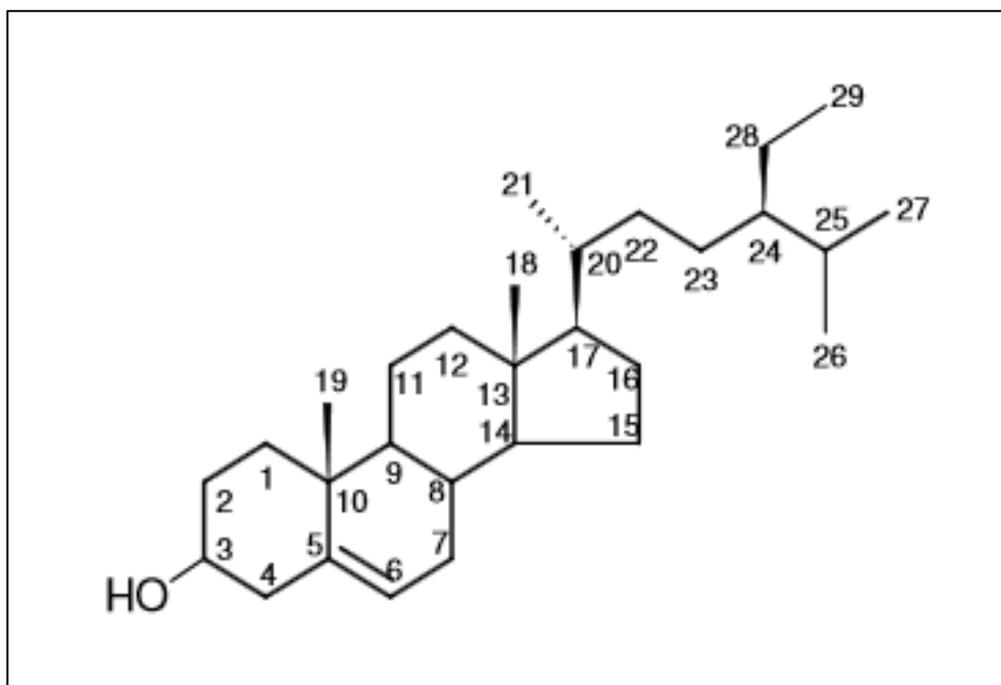


FIGURA 11 – ESTRUTURA QUÍMICA DO  $\beta$ - SITOSTEROL  
 FONTE: (DALL' STELLA, 2008).

O  $\beta$ -sitosterol é um fitoesterol encontrado amplamente em plantas superiores, possui uma estrutura química similar à do colesterol, mas com modificações na cadeia lateral com a adição de uma ligação dupla e/ou grupo metila ou ainda um grupamento etila. Essa substância juntamente com o campesterol e o estigmasterol são os fitoesteróis mais comuns encontrados na dieta (AWAD; FINK, 2000). Nas plantas essas substâncias tem a função de estabilizar as bicamadas de fosfolípídeos, assim como atua o colesterol nas membranas celulares dos animais (MOREAU *et al.*, 2002).

Estudos sugerem a atividade antitumoral do  $\beta$ -sitosterol, o mecanismo exato pelo qual essa substância oferece proteção contra o câncer não é bem conhecido (AWAD; FINK, 2000), entretanto, pesquisas apontam que o  $\beta$ -sitosterol está relacionado com a atividade protetora do câncer de cólon induzido quimicamente (BASKAR *et al.*, 2010), na inibição de células do tumor HT-29 e células de tumores de próstata (AWAD; FINK, 2000) e ainda na indução de apoptose em uma linhagem celular de câncer de mama (AWAD *et al.*, 2008).

## 5.6 ANÁLISE DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

### 5.6.1 Perfil de atividade antioxidante

#### 5.6.1.1 Teor de compostos fenólicos totais

Os extratos e frações de *Temnadenia stellaris* foram testados pelo método de Folin-Ciocalteu que permite quantificar compostos fenólicos presentes nas amostras. Os resultados obtidos foram calculados com base no ácido Gálico como padrão. A (TABELA 8) demonstra a quantidade de fenólicos totais provenientes do caule e folhas de *T. stellaris* submetidos à extração por maceração e por soxhlet. Verificou-se que o teor de fenóis totais foi variável entre as partes morfológicas, mas foi semelhante entre as frações e quanto à extração. As maiores concentrações foram observadas para a fração clorofórmio (FCI) do caule obtido por maceração (365,97g GAE/kg<sup>-1</sup>) e por soxhlet (307,55g GAE/kg<sup>-1</sup>), um menor teor foi observado nas folhas, (172,10g GAE/kg<sup>-1</sup>) e (218,35g GAE/kg<sup>-1</sup>) para maceração e soxhlet respectivamente. Entretanto, observou-se uma menor concentração para o extrato etanólico bruto (EEB) das amostras que foram menores quando comparadas a FCI.

Os dados demonstram um elevado potencial antioxidante para as amostras de *Temnadenia stellaris*.

TABELA 8 – TEOR DE FENÓIS TOTAIS EXPRESSOS COM ÁCIDO GÁLICO EQUIVALENTE (GAE).

Amostras	FT (g GAE/kg -1 ms)			
	Caule		Folhas	
	Maceração	Soxhlet	Maceração	Soxhlet
<b>FCI</b>	365,9 ± 0,01	307,5 ± 0,04	172,1 ± 0,04	218,3 ± 0,03
<b>FHex</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>EEB</b>	76,6 ± 0,02	82,5 ± 0,02	26,1 ± 0,01	50,7 ± 0,02

NOTA: Fração clorofórmio (FCI), Fração hexano (FHex), Extrato Etanólico Bruto (EEB). Cada valor foi obtido por meio da média ± desvio padrão de pelo menos três replicatas; FT = fenóis totais; n.d. = não determinado; ms = massa seca; GAE = ácido gálico equivalente; e Fenóis totais por kg de extrato comercial. \*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

### 5.6.1.2 Atividade antioxidante pelo método de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

De acordo com os resultados observados, a FCI do caule obtida por maceração (43,216  $\mu\text{g/mL}$ ) foi a amostra que apresentou maior potencial em sequestrar radicais livres, uma vez que, possui o valor mais baixo de  $\text{IC}_{50}$  e foi capaz de decrescer a quantidade inicial de DPPH em uma concentração abaixo de 50%, a FCI soxhlet do caule (46,363  $\mu\text{g/mL}$ ) e a FCI soxhlet da folha (49,885  $\mu\text{g/mL}$ ) também tiveram resultados expressivos para o sequestro de DPPH, o que parece ser uma correlação positiva para a atividade antioxidante de acordo com a quantidade de fenóis totais encontrados para essa fração por ambos os métodos de extração tanto para caule como para folha.

As concentrações dos controles e das amostras que são capazes de reduzir 50% da  $\text{CI}_{50}$  do DPPH• são apresentadas na (TABELA 9).

TABELA 9 – DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE SEQUESTRO DO RADICAL LIVRE (DPPH).

Amostras	$\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	Caule		Folhas	
	Maceração	Soxhlet	Maceração	Soxhlet
<b>FCI</b>	43,2 $\pm$ 1,0	46,3 $\pm$ 0,6	116,8 $\pm$ 7,6	49,8 $\pm$ 1,0
<b>FHex</b>	240,8 $\pm$ 76,2	580,4 $\pm$ 20,6	189,9 $\pm$ 0,6	571,9 $\pm$ 16,3
<b>EEB</b>	520,2 $\pm$ 9,8	238,7 $\pm$ 1,2	1.509,7 $\pm$ 96,5	574,5 $\pm$ 2,0
<b>Rutina</b>	6,155 $\pm$ 0,077			
<b>Vitamina C</b>	4,922 $\pm$ 0,066			

NOTA: Fração clorofórmio (FCI), Fração hexano (FHex), Extrato Etanólico Bruto (EEB). O valor  $\text{CI}_{50}$  ( $\mu\text{g}$ )  $\pm$  DP = concentração inibitória  $\pm$  desvio padrão. Os resultados foram obtidos por meio de três replicatas de pelo menos seis diferentes concentrações de extratos e frações, abrangendo a faixa de baixa inibição até alta inibição da oxidação do radical DPPH; \*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Esses dados corroboram com os resultados encontrados por outros autores, (ROESLER *et al.*, 2007; SOUSA *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2008; CATANEO *et al.*, 2008), em seus estudos demonstraram uma resposta maior entre o conteúdo total de polifenóis e o ensaio de DPPH.

As curvas de linearidade para o ensaio DPPH encontram-se dispostas em (FIGURA 12) E (FIGURA 13).

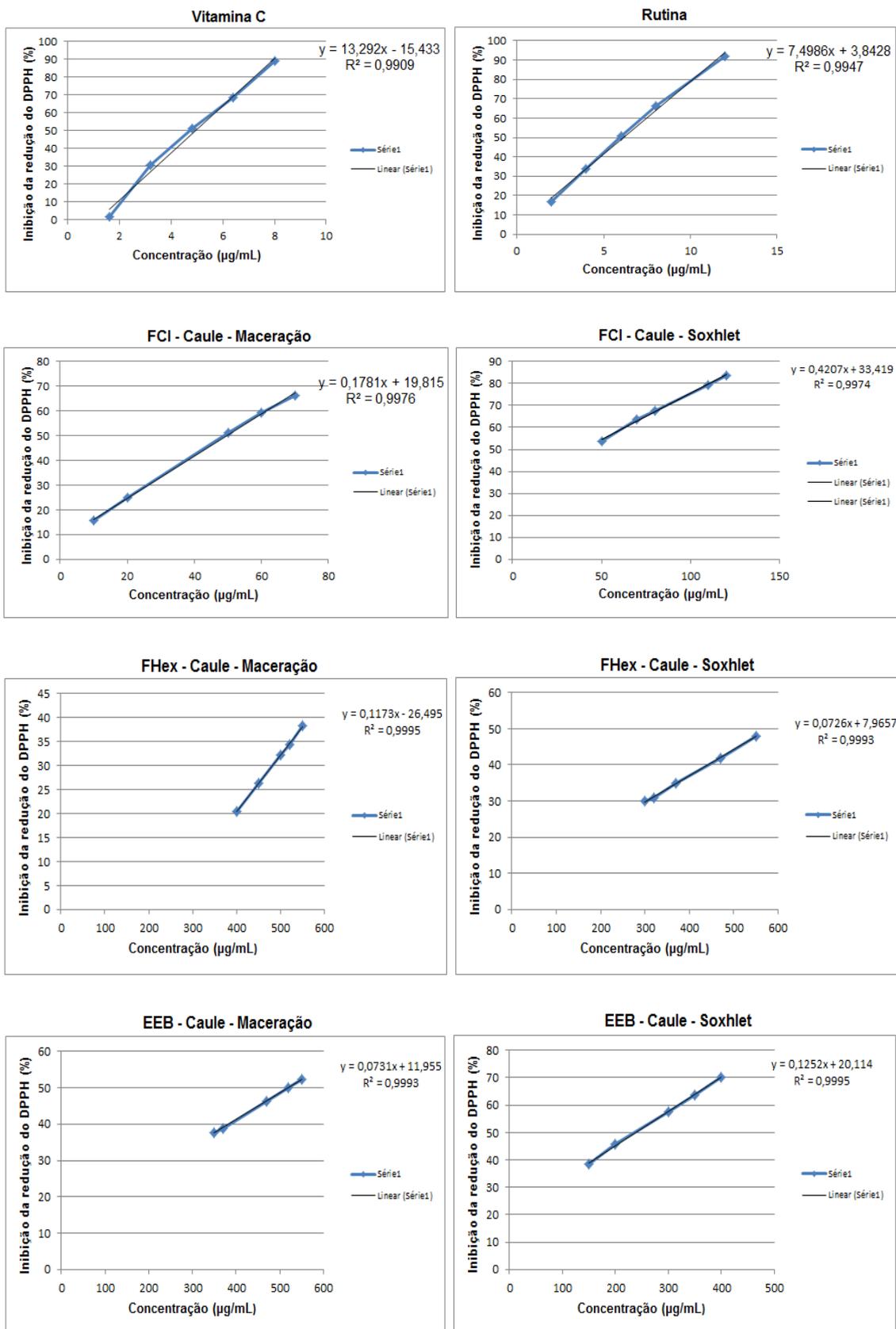


FIGURA 12 – CURVAS REFERENTES AOS PADRÕES VITAMINA C, RUTINA, EXTRATOS E FRAÇÕES DO CAULE DE *Temnadenia stellaris* OBTIDOS POR MACERAÇÃO E SOXHLET, NA REDUÇÃO DO DPPH.  
 FONTE: O autor (2015)

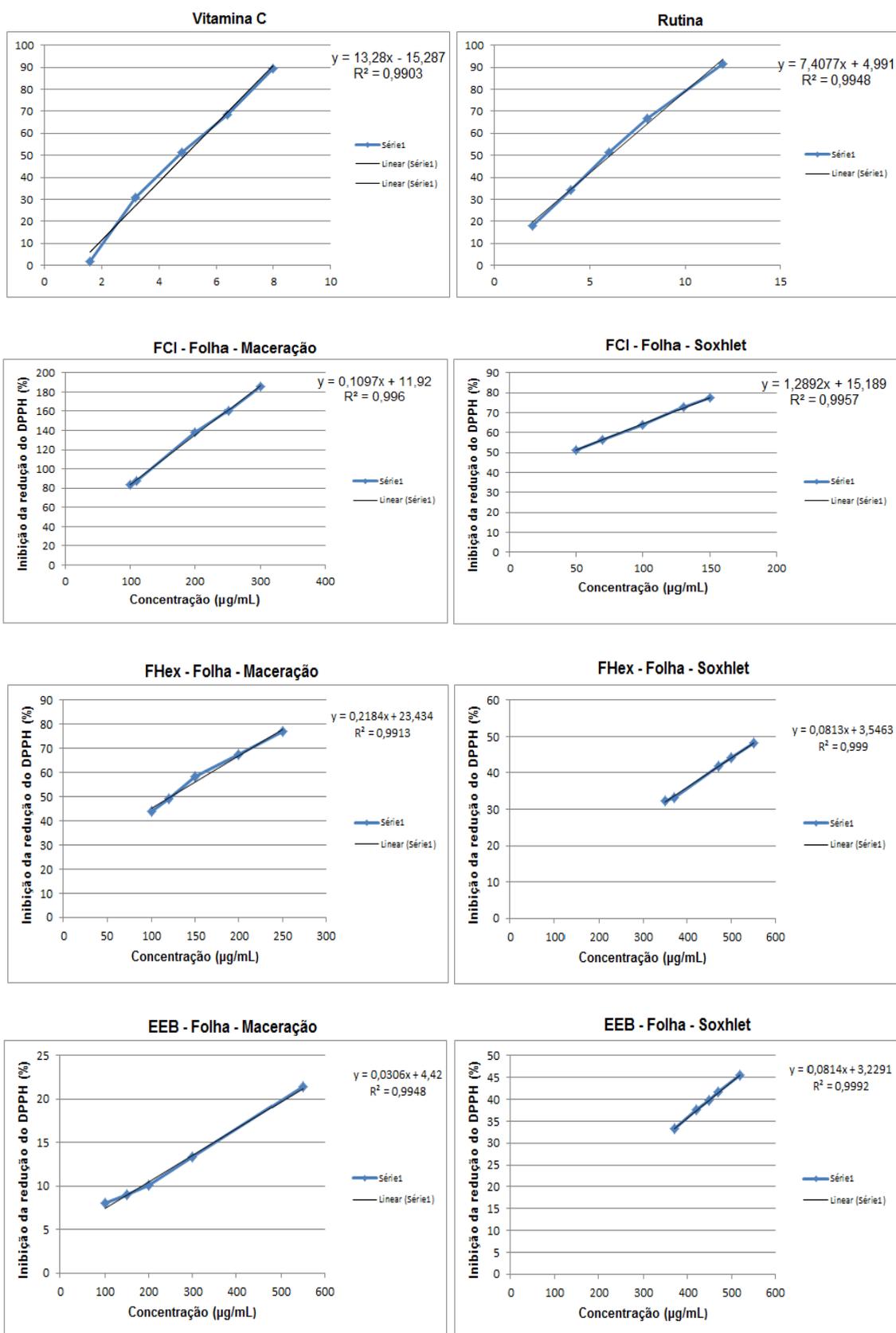


FIGURA 13 – CURVAS REFERENTES AOS PADRÕES VITAMINA C, RUTINA, EXTRATOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *Temnadenia stellaris* OBTIDOS POR MACERAÇÃO E SOXHLET, NA REDUÇÃO DO DPPH.

FONTE: O autor (2015)

### 5.6.1.3 Teste com espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Este teste baseia-se na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroxiperóxidos, de acordo com os resultados expressos na (FIGURA 13), todos os extratos e frações apresentaram um índice antioxidantes acima de 50%, a FCI do caule obtido por maceração (88,2%) e por soxhlet (86,4%), apresentaram o efeito protetor mais próximos ao padrão BHT (90,9%), utilizado como controle positivo, por ser um antioxidante sintético utilizado em alimentos (RAMALHO; JORGE, 2006).

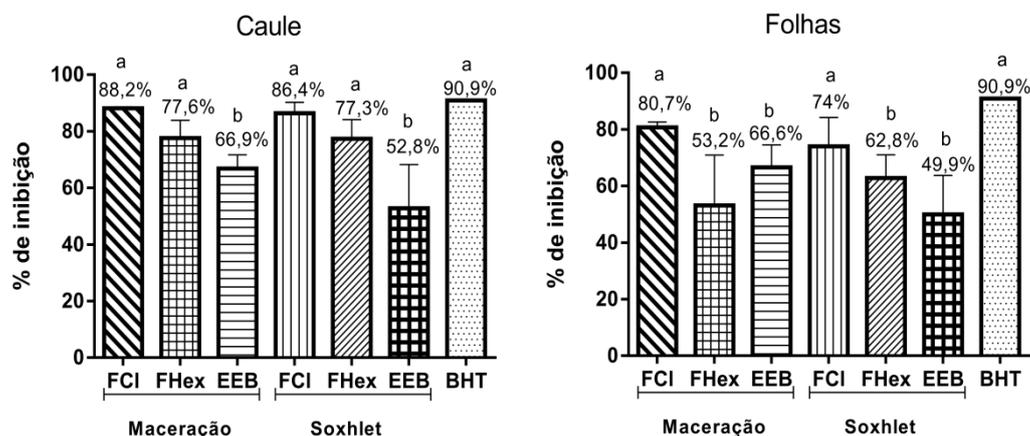


FIGURA 14 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO CLOROFÓRIMO (FCI), FRAÇÃO HEXÂNICA (FHex), EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) DE *T. stellaris*, CAULE E FOLHAS EM RELAÇÃO AO PADRÃO BHT. \*MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY ( $p < 0,05$ ).

FONTE: O autor (2015)

A determinação da peroxidação lipídica é de fundamental importância a nível industrial para a avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras de produtos comercializados (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1998), e em sistemas biológicos para avaliar a peroxidação das membranas lipídicas de células e organelas, uma vez que constituem a via final da lesão tecidual em uma variedade de doenças (VANNUCCHI *et al.*, 1998).

## 5.6.1.4 Atividade antioxidante pela formação do complexo fosfomolibdênio

TABELA 10 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO.

Amostra s	AA% Ácido ascórbico x ± DP				AAR % Rutina x ± DP			
	Caule		Folha		Caule		Folha	
	Maceração	Soxhlet	Maceração	Soxhlet	Maceração	Soxhlet	Maceração	Soxhlet
FC	20,1±0,4	25,5±3,6	28,6±1,3	17,0±1,8	102,4±2,2	127,5±7,6	140,7±4,3	87,8±8,7
FH	28,4±2,2	18,3±0,4	46,8±3,7	28,6±1,2	141,1±10,5	93,8±2,0	205,3±4,6	142,2±5,6
EEB	14,4±0,2	14,2±1,3	13,9±0,9	17,5±1,4	68,6±1,3	74,7±2,3	65±3,9	112,2±2,3

NOTA: Fração clorofórmio (FCI), Fração hexano (FHex), Extrato Etanólico Bruto (EEB), valores obtidos por meio da média ± desvio padrão de três replicatas em relação a vitamina C e em relação ao padrão Rutina;

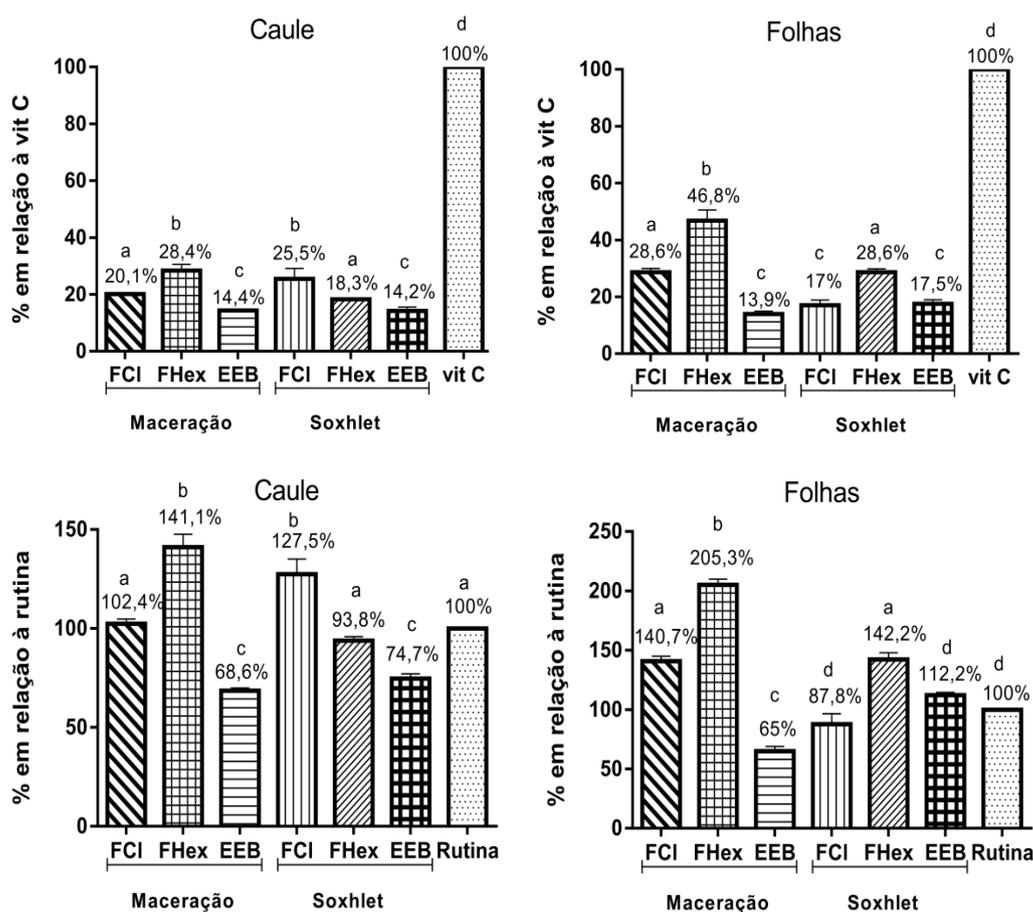


FIGURA 15 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO CLOROFÓRIMO (FCI), FRAÇÃO HEXANO (FHex), EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) DE *T. stellaris*, CAULE E FOLHAS EM RELAÇÃO AO PADRÃO VITAMINA C E EM RELAÇÃO AO PADRÃO RUTINA. \*MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY ( $p < 0,05$ ).

FONTE: O autor (2015)

As amostras do extrato etanólico bruto e das frações de *Temnadenia stellaris* foram avaliadas em relação à vitamina C e à rutina pela redução do complexo fosfomolibdênio (TABELA 10) e (FIGURA 14).

Em relação ao padrão vitamina C, observou-se que todas as amostras foram inferiores à atividade do padrão, os valores obtidos não foram variáveis entre os métodos de extração e nem entre as partes morfológicas da planta, com exceção da FHex das folhas obtida por soxhlet que apresentou uma maior atividade (47,8%). Entretanto, nenhuma das frações mostrou efetividade quanto ao método testado.

De acordo com os resultados das amostras testadas frente ao padrão Rutina, os extratos e frações de *Temnadenia stellaris* demonstraram atividade superior ao padrão e sugerem um alto potencial antioxidante. Os valores obtidos também indicaram variabilidade entre o método de extração e entre as partes morfológicas estudadas, as amostras obtidas por maceração apresentaram uma maior atividade do que as amostras obtidas por soxhlet, assim como, os extratos e frações das folhas foram mais efetivos, destacando-se a FHex da folha obtida por maceração que apresentou 205,3% de atividade em relação ao padrão Rutina

Este método é amplamente utilizado, uma vez que, mede a inibição do molibdato de amônio pela ação de extratos ou substâncias, baseia-se na redução do molibdênio IV a molibdênio V e subsequente à formação de um complexo verde que corresponde ao fosfato/molibdênio V em pH ácido. O ensaio se processa a temperatura elevada e por tempo prolongado, possui a vantagem de avaliar a capacidade antioxidante tanto em substâncias lipofílicas quanto substâncias hidrofílicas em meio ácido (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

#### 5.6.1.5 Atividade antioxidante pelo método do poder redutor (azul da prússia)

Observa-se na (FIGURA 15), um alto poder de redução para a amostra da FCI obtida por maceração do caule de *T. stellaris* (74,14%) e para a amostra obtida por soxhlet do caule (71,67%), valores semelhantes ao encontrado para o padrão rutina (82,33%). A FCI das folhas por maceração e por soxhlet apresentaram uma

atividade redutora de 50,26% e 57,30% respectivamente. As demais frações não apresentaram 50% de atividade redutora em relação à vitamina C.

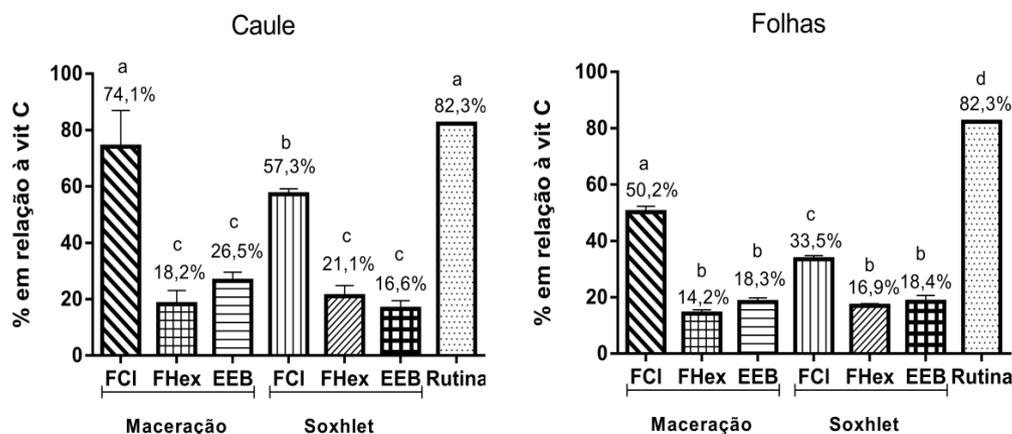


FIGURA 16 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA DA FRAÇÃO CLOROFÓRIMO (FCI), FRAÇÃO HEXÂNO (FHex), EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) DE *T. stellaris*, CAULE E FOLHAS E DO PADRÃO RUTINA EM RELAÇÃO AO PADRÃO VITAMINA C, PELO PODER REDUTOR (AZUL DA PRÚSSIA). \*MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY ( $p < 0,05$ ).

FONTE: O autor (2015)

Os métodos baseados na redução do  $Fe^{3+}$ , que determinam o poder redutor são também utilizados para avaliação da atividade antioxidante. O ensaio pelo método do poder redutor baseia-se na capacidade de compostos fenólicos reduzirem o  $Fe^{3+}$ , com conseqüente formação de um complexo colorido com  $Fe^{2+}$ . O íon ferricianeto é reduzido a ferrocianeto que, na presença do íon férrico (proveniente do  $FeCl_3$ ), formam o complexo azul da prússia,  $Fe^4[Fe(Cn)6]3$  (ROGINSKY; LISSI, 2005).

O método baseado na redução do  $Fe^{+3}$  é bastante efetivo para substâncias que apresentam compostos fenólicos. Desse modo, este teste é eficaz tanto para quantificar fenóis totais, quanto para determinar a atividade antioxidante (MONTEIRO *et al.*, 2005).

#### 5.6.1.6 Atividade antioxidante pelo método do tiocianato férrico

A avaliação da inibição da oxidação foi explanada na (FIGURA 16), os valores indicam que todas as frações e os EEBs apresentaram potencial inibição

para oxidação lipídica, os resultados também sugerem efeitos semelhantes ao encontrado para o padrão BHT (98,90%). Destacaram-se as FCI do caule obtidas por maceração (80,17%) e por soxhlet (82,95%), o EEB obtido por maceração também apresentou um bom índice para a inibição da oxidação (81,70%).

Esses resultados demonstram uma boa atividade antioxidante das amostras provenientes de *Temnadenia stellaris*. Extratos e frações com potencial antioxidante são fundamentais no combate aos radicais livres e na prevenção do efeito oxidante sobre substâncias como membranas celulares.

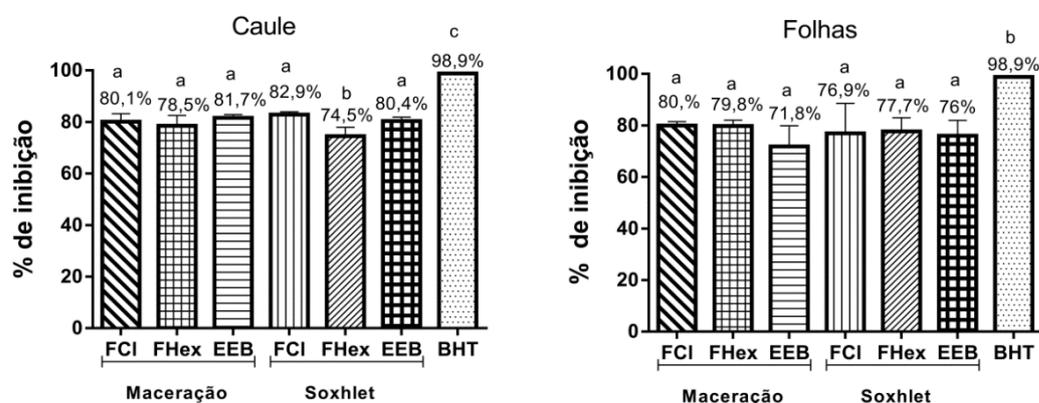


FIGURA 17 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO CLOROFÓRIMO (FCI), FRAÇÃO HEXANO (FHex), EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) DE *T. stellaris*, CAULE E FOLHAS E DO PADRÃO BHT PELO MÉTODO DO TIOCIANATO. \*MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY ( $p < 0,05$ ).

FONTE: O autor (2015)

A inibição da peroxidação do ácido linoleico foi avaliada pelo método Tiocianato Férrico. Neste teste, os hidroxiperóxidos gerados durante a oxidação do ácido linoleico reagem com o sulfato ferroso, dando origem ao sulfato férrico e, em seguida, ao tiocianato férrico que apresenta uma coloração vermelho sangue, que pode ser monitorada espectrofotometricamente. Os peróxidos presentes oxidam o  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$  (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

#### 5.6.1.7 Atividade Antioxidante pelo método de degradação da desoxirribose

Pelos resultados obtidos, descritos na (FIGURA 17), EEB e frações de *Temnadenia stellaris* foram testados frente ao método de inibição da degradação da desoxirribose, observou-se que os valores dos extratos etan

ólicos bruto do caule (76,3%) e das folhas (71,1%) obtidos por maceração foram mais efetivos quanto à inibição da degradação da desoxirribose, as FCI das amostras obtiveram uma porcentagem de inibição acima de 50%, e as FHex foram as que demonstraram menor habilidade em inibir a degradação da desoxirribose. Todas as amostras apresentaram resultados inferiores ao do padrão vitamina C, entretanto, levando-se em consideração que a mesma é uma substância pura, sugere-se que o EEB e as frações de *Temnadenia stellaris* tem um bom potencial antioxidante.

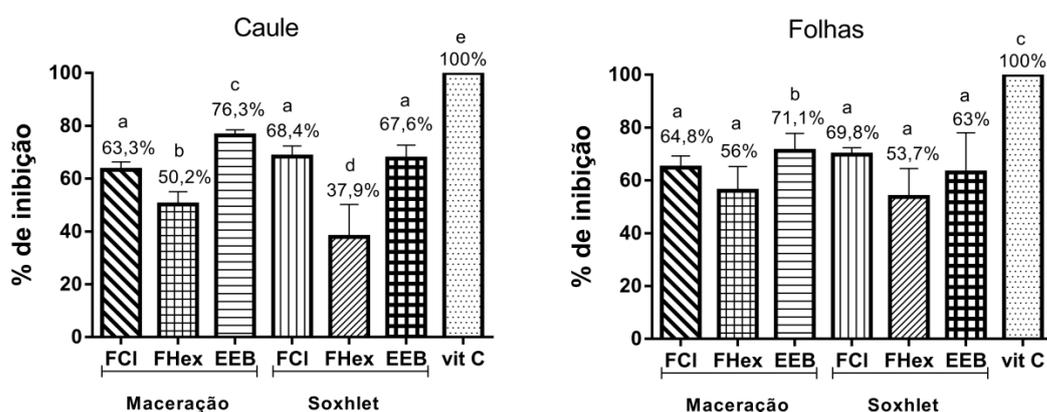


FIGURA 18 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO CLOROFÓRIMO (FCI), FRAÇÃO HEXANO (FHex), EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) DE *T. stellaris*, CAULE E FOLHAS. PERCENTUAL DE DEGRADAÇÃO DA DESOXIRRIBOSE. \*MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY ( $p < 0,05$ ).  
FONTE: O autor (2015)

Os valores de atividade antioxidante podem variar amplamente de acordo com a metodologia utilizada. A eficácia de um composto antioxidante é geralmente dependente da polaridade, dos sistemas testados, da natureza do radical e tipo de substrato protegido pelo antioxidante (POZO-INSFRAN; BRENE, TALCOTT, 2004).

O radical hidroxil ( $\text{HO}\cdot$ ) é um dos mais deletérios radicais livres, uma vez que, apresenta uma meia-vida muito curta e dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*. Em experimentos *in vitro* pode ser sequestrado facilmente devido a sua alta reatividade (HALLIWELL *et al.*, 2006).

O ensaio empregando-se a 2-desoxirribose é um dos métodos específicos para determinar o sequestro do radical hidroxil. Este ensaio se baseia na quantificação do principal produto desta degradação: o malonoildialdeído (MDA), um composto de três carbonos formado a partir do ataque do radical hidroxil a desoxirribose (CHEESEMAN; BEAVIS; ESTERBAUER, 1988).

A desoxirribose é degradada quando exposta ao radical hidroxil, gerado pela mistura de  $\text{Fe}^{3+}$ , ascorbato e  $\text{H}_2\text{O}_2$  na presença de uma pequena quantidade de EDTA. Se a mistura resultante for aquecida em condições ácidas, forma-se malondialdeído (MDA), que pode ser detectado por sua habilidade em reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um cromóforo róseo que pode ser monitorado por espectrofotometria na região do visível (532 nm) (HALLIWELL *et al.*, 1987).

Este método mede a combinação de dois fatores: a habilidade em remover íons ferro deste açúcar e habilidade em tornar tais íons inativos ou pouco ativos na degradação de OH. As únicas substâncias que podem inibir o OH nesse tipo de ensaio são aquelas que se ligam a íons ferro o suficiente para retirá-los da desoxirribose (HALLIWELL *et al.*, 1995). Desse modo, substâncias que tenham propriedades antioxidantes podem competir com a 2-desoxirribose pelo radical e produzir uma diminuição na intensidade da coloração (HALLIWELL *et al.*, 1987).

#### 5.6.1.8 Atividade antioxidante pelo método de sequestro de $\text{H}_2\text{O}_2$

A avaliação da atividade antioxidante pelo método sequestro do peróxido de hidrogênio está explanada na (FIGURA 18). As FCI do caule e das folhas obtida por maceração foram as que apresentaram maior atividade antioxidante 88,7% e 85,9% respectivamente, valores semelhantes ao encontrado para o padrão vitamina C (97,7%), Não foram constatados efeitos divergentes entre as partes morfológicas da planta e quanto ao método de obtenção das amostras. Todos os extratos e frações de *Temnadenia stellaris* apresentaram atividade sequestradora acima de 50%, o que demonstra uma potencial atividade antioxidante, no sequestro de peróxido de hidrogênio.

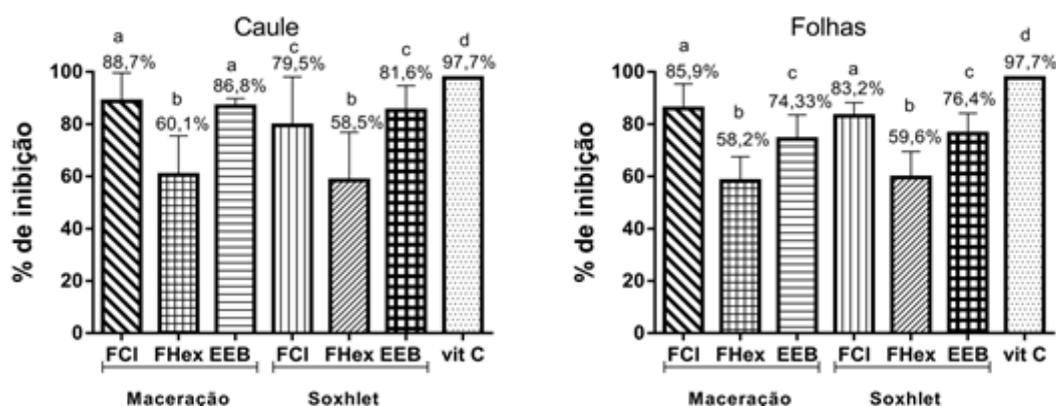


FIGURA 19 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO CLOROFÓRIMO (FCI), FRAÇÃO HEXANO (FHex), EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) DE *T. stellaris*, CAULE E FOLHAS. PERCENTUAL DE ATIVIDADE DE SEQUESTRO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). \*MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY (p < 0,05).  
 FONTE: O autor (2015)

Embora o peróxido de hidrogênio não seja considerado um radical livre, está envolvido de forma direta ou indireta em diversas patologias. Em termos químicos, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é fracamente reativo, no entanto exerce papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de transpor facilmente as membranas celulares e gerar o radical hidroxil (•OH) (ARUOMA *et al.*, 1989). Além disso, uma vez dentro da célula, o peróxido de hidrogênio pode reagir com os íons Fe<sup>2+</sup> e causar efeitos tóxicos, desse modo, é biologicamente vantajoso o controle de quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (NAGULENDRAN; MAHESH; BEGUM, 2007).

#### 5.6.1.9 Atividade antioxidante pelo método de oxidação acoplado do sistema β-caroteno/ácido linoleico

Os resultados obtidos (FIGURA 19) sugerem um bom potencial antioxidante dos extratos e frações de *T. stellaris*. A FHex do caule obtida por maceração (81%) foi a que demonstrou maior atividade antioxidante comparada ao padrão vitamina C, seguida pelas demais FHex e FCI. Todas as amostras demonstraram habilidade relativa em sequestrar o radical peróxido do ácido linolênico (LOO•), que oxida o β-caroteno presente na emulsão, contudo, o EEB do caule e folhas obtidos por soxhlet

e o EEB das folhas obtidas por maceração apresentaram atividade antioxidante menor que 50%.

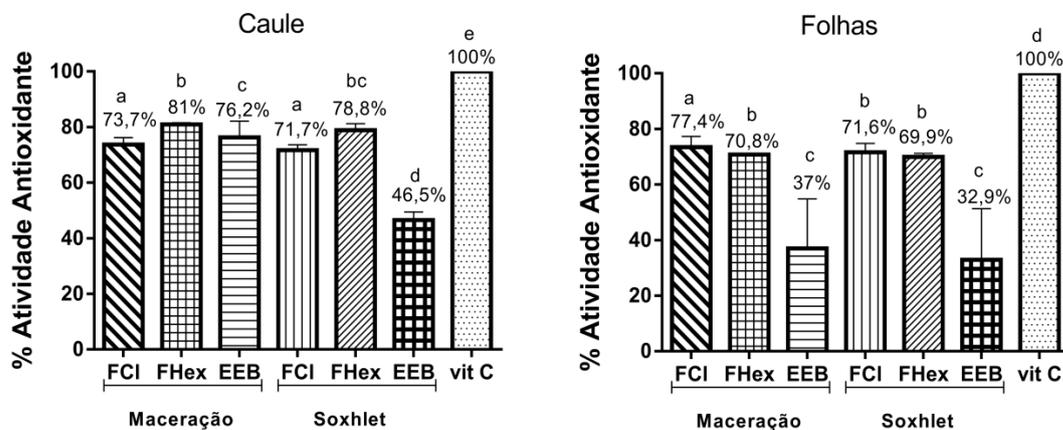


FIGURA 20 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO CLOROFÓRIMO (FCI), FRAÇÃO HEXANO (FHex), EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) DE *T. stellaris*, CAULE E FOLHAS ERCENTUAL DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE OXIDAÇÃO ACOPLADO DO SISTEMA  $\beta$ -CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO. \*MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY ( $p < 0,05$ ).

FONTE: O autor (2015)

Muitas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias potencialmente interessantes no que diz respeito à prevenção de doenças degenerativas, dentre elas, destaca-se o método de oxidação acoplado ao sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006).

O  $\beta$ -caroteno é o mais abundante dos carotenoides sendo extensivamente utilizado em terapias. Estudos demonstram que o  $\beta$ -caroteno exibe alta reatividade com eletrófilos e oxidantes e ainda, sugerem que ele inibe a auto oxidação de lipídios em tecidos biológicos e produtos alimentícios. E

Este ensaio permite avaliar a capacidade de uma determinada substância em prevenir a oxidação do  $\beta$ -caroteno e o proteger dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico, é um método amplamente utilizado para a avaliação da atividade antioxidante de matrizes alimentares. Como não ocorre a altas temperaturas, permite a determinação do poder antioxidante de compostos termolábeis e a avaliação qualitativa da eficácia antioxidante de extratos vegetais (BORGUINI, 2006).

## 5.6.1.10 Correlação das atividades antioxidantes

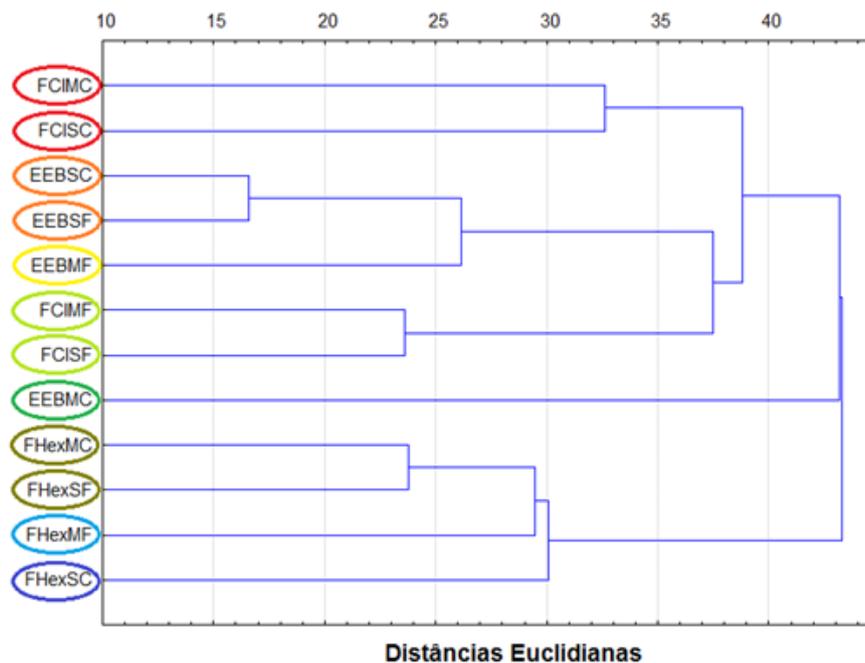


FIGURA 21 – DENDOGRAMA DA MATRIZ DE DISTÂNCIAS PELO MÉTODO DE LIGAÇÃO SIMPLES REPRESENTADO, UTILIZANDO O PROGRAMA COMPUTACIONAL STATISTICA. PARÂMETROS AVALIADOS PARA A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE *Temnadenia stellaris*. FRAÇÃO CLOROFÓRMIO MACERAÇÃO CAULE (FCIMC); FRAÇÃO CLOROFÓRMIO MACERAÇÃO FOLHAS (FCIMF); FRAÇÃO CLOROFÓRMIO SOXHLET CAULE (FCISC); FRAÇÃO CLOROFÓRMIO SOXHLET FOLHAS (FCISF); FRAÇÃO HEXANO MACERAÇÃO CAULE (FHexMC); FRAÇÃO HEXANO MACERAÇÃO FOLHAS (FHexMF); FRAÇÃO HEXANO SOXHLET CAULE (FHexSC); FRAÇÃO HEXANO SOXHLET FOLHAS (FHexSF); EXTRATO ETANÓLICO BRUTO MACERAÇÃO CAULE (EEBMC); EXTRATO ETANÓLICO BRUTO MACERAÇÃO FOLHAS (EEBMF); EXTRATO ETANÓLICO BRUTO SOXHLET CAULE (EEBSC); EXTRATO ETANÓLICO BRUTO SOXHLET FOLHAS (EEBSF).

FONTE: O autor (2015)

Os resultados obtidos (FIGURA 20) foram divididos em grupos distintos, que correspondem aos níveis antioxidantes dos extratos e frações. Alguns grupos importantes podem ser observados, o primeiro, caracteriza a FCI do caule obtida por maceração e a FCI do caule obtida por soxhlet, essas amostras apresentaram maior atividade antioxidante quando comparadas aos outros grupamentos. As análises indicaram também que não houve divergência entre os métodos de extração do material vegetal. Da mesma forma, esses dados foram constatados nos grupamentos seguintes, onde o EEB obtido por maceração e o obtido por soxhlet do

caule e das folhas de *Temnadenia stellaris* apresentaram um bom potencial antioxidante, seguido do EEB obtido por maceração das folhas. Para a FCI das folhas obtida por maceração e para a obtida por soxhlet foi observada uma atividade antioxidante considerada intermediária, assim como para o EEB extraído por maceração do caule. Os últimos três grupamentos foram os que apresentaram uma atividade antioxidante menos pronunciada, formados pelas FHex obtida por maceração do caule e a FHex extraída por soxhlet das folhas, seguidas pela FHex obtida por maceração das folhas e a menos ativa, FHex do caule obtida por soxhlet.

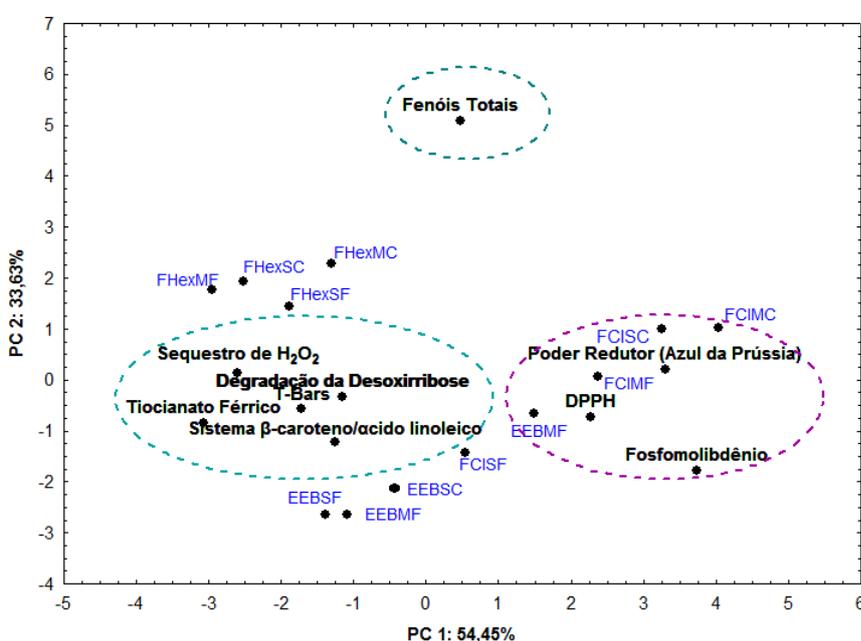


FIGURA 22 – ACP REPRESENTA OS PARÂMETROS AVALIADOS PARA A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE COM AS PARCELAS DE DADOS PARA OS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Temnadenia stellaris*. AS PARCELAS MOSTRAM 54,45% E 33,63% DA VARIAÇÃO TOTAL APLICADA NO PC1 E PC2 RESPECTIVAMENTE. FRAÇÃO CLOROFÓRMIO MACERAÇÃO CAULE (FCIMC); FRAÇÃO CLOROFÓRMIO MACERAÇÃO FOLHAS (FCIMF); FRAÇÃO CLOROFÓRMIO SOXHLET CAULE (FCISC); FRAÇÃO CLOROFÓRMIO SOXHLET FOLHAS (FCISF); FRAÇÃO HEXANO MACERAÇÃO CAULE (FHexMC); FRAÇÃO HEXANO MACERAÇÃO FOLHAS (FHexMF); FRAÇÃO HEXANO SOXHLET CAULE (FHexSC); FRAÇÃO HEXANO SOXHLET FOLHAS (FHexSF); EXTRATO ETANÓLICO BRUTO MACERAÇÃO CAULE (EEBMC); EXTRATO ETANÓLICO BRUTO MACERAÇÃO FOLHAS (EEBMF); EXTRATO ETANÓLICO BRUTO SOXHLET CAULE (EEBSC); EXTRATO ETANÓLICO BRUTO SOXHLET FOLHA (EEBSF).

FONTE: O autor (2015)

A (FIGURA 21) representa a análise de componentes principais e correlaciona os métodos antioxidantes com as amostras de *T. stellaris* testadas. Dessa forma, os valores positivos ao longo do eixo PC1 (54,45%) e PC2 (33,63%) foram os que apresentaram um maior poder antioxidante. Observa-se que a

atividade antioxidante mais elevada foi a encontrada para teor fenóis totais, seguida pelo método Poder redutor (Azul da Prússia), DPPH e fosfomolibdênio. Os métodos que estão mais perto de valores negativos para PC2 e PC1 indicam um menor potencial antioxidante, se encontram neste grupo os seguintes ensaios: sequestro do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, degradação da desoxirribose, método do tiocianato férrico e o sistema β-caroteno/ ácido linoleico, alguns ensaios deste grupo se correlacionam por se basearem na avaliação da peroxidação lipídica.

## 5.6.2 Avaliação da toxicidade

### 5.6.2.1 Avaliação da toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*

TABELA 11 – ENSAIO DE TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina* DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E FRAÇÕES DE *Temnadenia stellaris* E DO PADRÃO SULFATO DE QUINIDINA

AMOSTRA	FRAÇÃO	MORTALIDADE/ CONCENTRAÇÃO (µg/mL)			DL <sub>50</sub> (µg/mL)	Intervalo de Confiança de 95% (µg/mL)
		10	100	1000		
<b>Caule Maceração</b>	<b>FCI</b>	0	29	30	34,15	29,36 – 39,71
	<b>FHex</b>	0	1	21	501,19	332,54 – 755,37
	<b>EEB</b>	0	5	30	215,44	157,49 – 292,72
<b>Folhas Maceração</b>	<b>FCI</b>	5	6	30	224,41	129,91 – 387,65
	<b>FHex</b>	0	0	15	>1000	–
	<b>EEB</b>	1	1	27	345,51	289,72 – 412,05
<b>Caule Soxhlet</b>	<b>FCI</b>	1	20	28	66,85	41,44 – 108,24
	<b>FHex</b>	2	6	23	338,39	219,24 – 522,29
	<b>EEB</b>	1	0	22	472,52	331,88 – 672,75
<b>Folhas Soxhlet</b>	<b>FCI</b>	5	15	27	90,85	46,14 – 178,90
	<b>FHex</b>	1	8	10	>1000	–
	<b>EEB</b>	0	0	0	>1000	–
<b>Metanol</b>	–	0	0	0	>1000	–
<b>Sulfato de Quinidina</b>	–	3	10	18	50,12	–

NOTA: Fração clorofórmio (FCI), Fração hexano (FHex), Extrato Etanólico Bruto (EEB), valores obtidos por meio da média ± desvio padrão de três replicatas; \*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0.05).

Verificou-se (TABELA 11) que a FCI do caule obtida por maceração foi a que exibiu maior atividade tóxica (34,15 µg/mL), a FCI do caule obtida por Soxhlet (66,85 µg/mL) e a FCI da folha obtida por maceração (90,85 µg/mL) também demonstraram potencial toxicidade. As demais frações apresentaram atividade tóxica moderada com DL<sub>50</sub> variável, entre 215,44 µg/mL e 501,19 µg/mL, com exceção do EEB do caule obtido por soxhlet e das FHex obtidas por maceração e por soxhlet, que não foram consideradas tóxicas.

A classificação utilizada neste ensaio foi a adotada por Meyer e cols. (1982), onde compostos com a dose suficiente para matar 50% dos náuplios (DL<sub>50</sub>) menor que 1000 ppm (1 mg/mL) para o teste com *Artemia salina* são considerados potencialmente tóxicos.

Os resultados sugerem que devem ser realizados estudos mais aprofundados e específicos para as amostras de *T. stellaris*. Alguns autores correlacionam a atividade biológica de extratos contra *A. salina* como forte indicativo de atividade antitumoral e utilizam este bioensaio sistematicamente para a avaliação prévia de extratos de plantas. (MCLAUGHLIN *et al.*, 1991; ANDERSON *et al.*, 1991; ARCANJO *et al.*, 2012).

#### 5.6.2.2 Atividade larvicida sobre *Aedes aegypti*

##### 5.6.2.2.1 Avaliação da mortalidade

De acordo com s resultados (TABELA 12), a FHex das folhas obtida por soxhlet foi a que apresentou maior atividade com a DL<sub>50</sub> de 344,70 µg/mL a FHex do caule obtida por soxhlet obteve DL<sub>50</sub> de 543,11 µg/mL, seguida do EEB das folhas obtida por soxhlet, da FHex e da FCI das folhas obtidas por maceração, que apresentaram DL<sub>50</sub> de 575,70 µg/mL, 827,75 µg/mL e 905,72 µg/mL respectivamente. As demais frações não demonstraram toxicidade sendo a DL<sub>50</sub> destes, superior a 1000 µg/mL, o EEB do caule se demonstrou igual ao controle negativo, não havendo mortalidade.

TABELA 12 – ENSAIO LARVICIDA FRENTE À *Aedes aegypti* DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E FRAÇÕES DE *Temnadenia stellaris*.

AMOSTRA	FRAÇÃO	MORTALIDADE/ CONCENTRAÇÃO (µg/mL)				DL <sub>50</sub> (µg/mL)	Intervalo de Confiança de 95% (µg/mL)
		100	200	500	1000		
Caule Maceração	FCI	0	0	2	4	>1000	–
	FHex	4	1	11	13	>1000	–
	EEB	1	2	0	1	>1000	–
Folhas Maceração	FCI	0	0	3	17	905,72	718,52 – 1141,69
	FHex	3	6	7	18	827,75	639,19 – 1071,94
	EEB	0	1	0	2	>1000	–
Caule Soxhlet	FCI	0	1	2	4	>1000	–
	FHex	4	10	13	19	543,11	271,38 – 1038,95
	EEB	0	0	0	0	>1000	–
Folhas Soxhlet	FCI	3	4	5	7	>1000	–
	FHex	1	9	18	29	344,70	278,30 – 426,95
	EEB	2	3	13	22	575,70	394,88 – 839,34
<b>Temefós 75</b>	–	–	–	–	–	≤ 60	–

NOTA: Fração clorofórmio (FCI), Fração hexano (FHex), Extrato Etanólico Bruto (EEB), valores obtidos por meio da média ± desvio padrão de três replicatas; \*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

A resistência aos inseticidas é atualmente uma ameaça ao controle de mosquitos. Esse fato é resultante do uso extensivo de inseticidas de origem sintética que também levam à contaminação ambiental. É necessário o desenvolvimento de inseticidas biodegradáveis. Substâncias derivadas de plantas podem ser uma boa alternativa, por serem mais seguras para o meio ambiente e outros organismos associados (REEGAN *et al.*, 2014).

#### 5.6.2.2.2 Avaliação da morfologia das larvas

As larvas de *Aedes aegypti* foram medidas com auxílio do software BitRule 1.1 e comparadas em relação ao padrão Temefós. Os dados estão dispostos na (TABELA 13).

TABELA 13 – MEDIDAS DAS LARVAS DE *A. aegypti* TESTADAS FRENTE À *T. stellaris*.

AMOSTRA	FRAÇÃO	CONCENTRAÇÃO $\mu\text{g/mL}$	TAMANHO LARVAL (CM)
Caule Maceração	FCI	100	n.d
		200	n.d
		500	n.d
		1000	n.d
	FHex	100	77 $\pm$ 9,53 a
		200	67 $\pm$ 1,52 b
		500	48 $\pm$ 3,60 c
		1000	45 $\pm$ 8,71 c
	EEB	100	69 $\pm$ 3,46 b
		200	61 $\pm$ 4,04 b
		500	45 $\pm$ 8,62 c
		1000	61 $\pm$ 4,04 b
Folhas Maceração	FCI	100	n.d
		200	n.d
		500	n.d
		1000	n.d
	FHex	100	n.d
		200	n.d
		500	n.d
		1000	n.d
	EEB	100	76 $\pm$ 10,58 a
		200	69 $\pm$ 13,57 b
		500	60 $\pm$ 2,08 b
		1000	47 $\pm$ 7 c
Caule Soxhlet	FCI	100	63 $\pm$ 3,21 b
		200	55 $\pm$ 3,51 b
		500	47 $\pm$ 4,58 c
		1000	41 $\pm$ 10,40 c
	FHex	100	78 $\pm$ 3,70 a
		200	66 $\pm$ 4,50 b
		500	51 $\pm$ 3,05 c
		1000	45 $\pm$ 3,05 c
	EEB	100	77 $\pm$ 9,53 a
		200	70 $\pm$ 8,18 a
		500	64 $\pm$ 4,16 b
		1000	53 $\pm$ 7,21 b
Folhas Soxhlet	FCI	100	81 $\pm$ 3,51 a
		200	71 $\pm$ 5,03 a
		500	55 $\pm$ 9,07 b
		1000	42 $\pm$ 7,93 c
	FHex	100	75 $\pm$ 3,0 a
		200	58 $\pm$ 3,0 b
		500	52 $\pm$ 7,37 c
		1000	45 $\pm$ 6,55 c
	EEB	100	n.d
		200	n.d
		500	n.d
		1000	n.d
Temefós	–	–	52 $\pm$ 4,72 c
Controle negativo	–	–	92 $\pm$ 4,58 a

NOTA: Fração clorofórmio (FCI), Fração hexano (FHex), Extrato Etanólico Bruto (EEB), valores obtidos por meio da média  $\pm$  desvio padrão de três replicatas; \*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).



FIGURA 23 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE E FOLHAS DE *T. stellaris* SOBRE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM LARVAS DE *A. aegypti* - ALONGAMENTO DA CÉRVICE (SETAS); FRAÇÃO CLOROFÓRMIO SOXHLET CAULE (FCISC); FRAÇÃO HEXANO MACERAÇÃO FOLHA (FHexMF); EXTRATO ETANÓLICO BRUTO MACERAÇÃO CAULE (EEBMC); EXTRATO ETANÓLICO BRUTO MACERAÇÃO FOLHA (EEBMF); EXTRATO ETANÓLICO BRUTO SOXHLET CAULE (EEBSC); EXTRATO ETANÓLICO BRUTO SOXHLET FOLHA (EEBSF).

FONTE: O autor (2015)

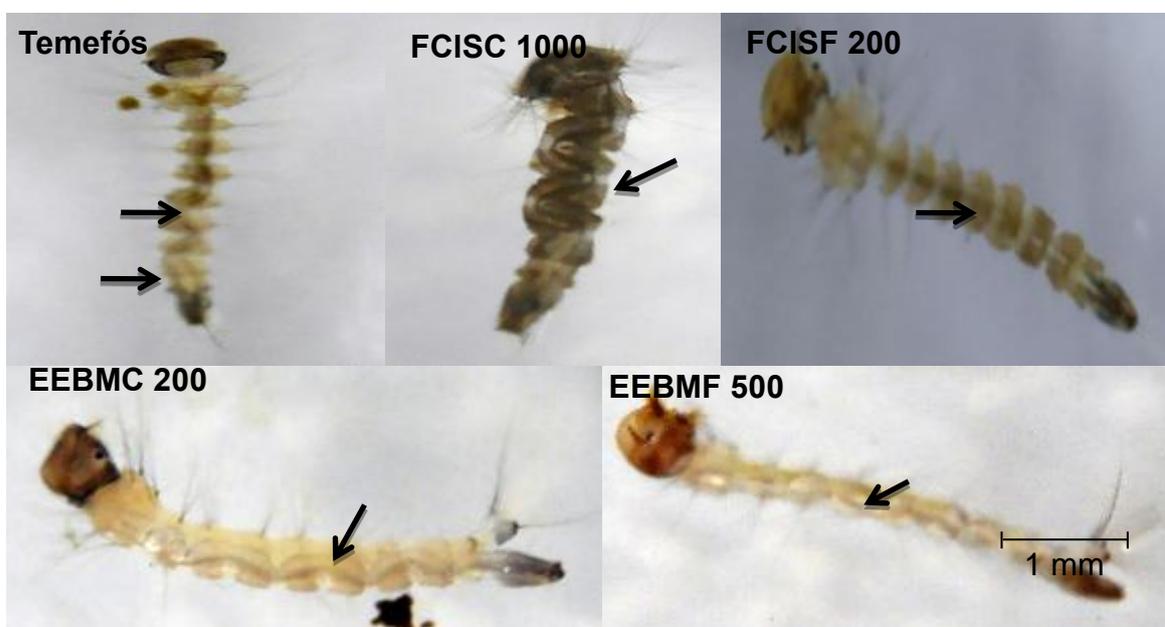


FIGURA 24 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE E FOLHAS DE *T. stellaris* SOBRE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM LARVAS DE *A. aegypti* – DESLOCAMENTO DAS PEÇAS DO ABDÔMEN (SETAS). FRAÇÃO CLOROFÓRMIO SOXHLET CAULE (FCISC); FRAÇÃO CLOROFÓRMIO SOXHLET FOLHAS (FCISS); EXTRATO ETANÓLICO BRUTO MACERAÇÃO CAULE (EEBMC); EXTRATO ETANÓLICO BRUTO MACERAÇÃO FOLHAS;

FONTE: O autor (2015)

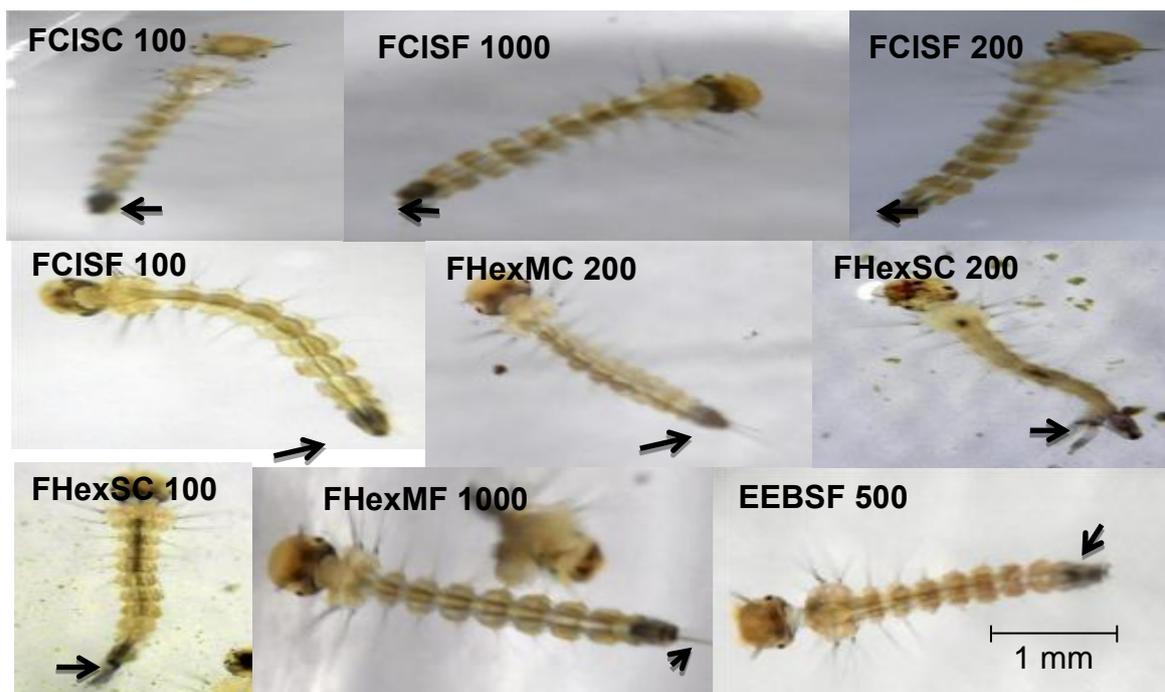


FIGURA 25 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE E FOLHAS DE *T. stellaris* SOBRE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM LARVAS DE *A. aegypti*- SUPRESSÃO DAS PAPILAS ANAIS (SETAS). FRAÇÃO CLOROFÓRMIO SOXHLET CAULE (FCISC); FRAÇÃO CLOROFÓRMIO SOXHLET FOLHAS (FCISF); FRAÇÃO HEXANO MACERAÇÃO CAULE (FHexMC); FRAÇÃO HEXANO MACERAÇÃO FOLHAS (FHexMF); FRAÇÃO HEXANO SOXHLET CAULE (FHexSC); FRAÇÃO HEXANO SOXHLET FOLHAS (FHexSF); EXTRATO ETANÓLICO BRUTO SOXHLET FOLHAS (EEBSF).  
 FONTE: O autor (2015)



FIGURA 26 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE E FOLHAS DE *T. stellaris* SOBRE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM LARVAS DE *A. aegypti* – SUPRESSÃO DO TÓRAX (SETAS). FRAÇÃO HEXANO MACERAÇÃO CAULE (FHexMC); FRAÇÃO HEXANO MACERAÇÃO FOLHAS (FHexMF); EXTRATO ETANÓLICO BRUTO SOXHLET CAULE (EEBSF); EXTRATO ETANÓLICO BRUTO SOXHLET FOLHAS (EEBSF).  
 FONTE: O autor (2015)

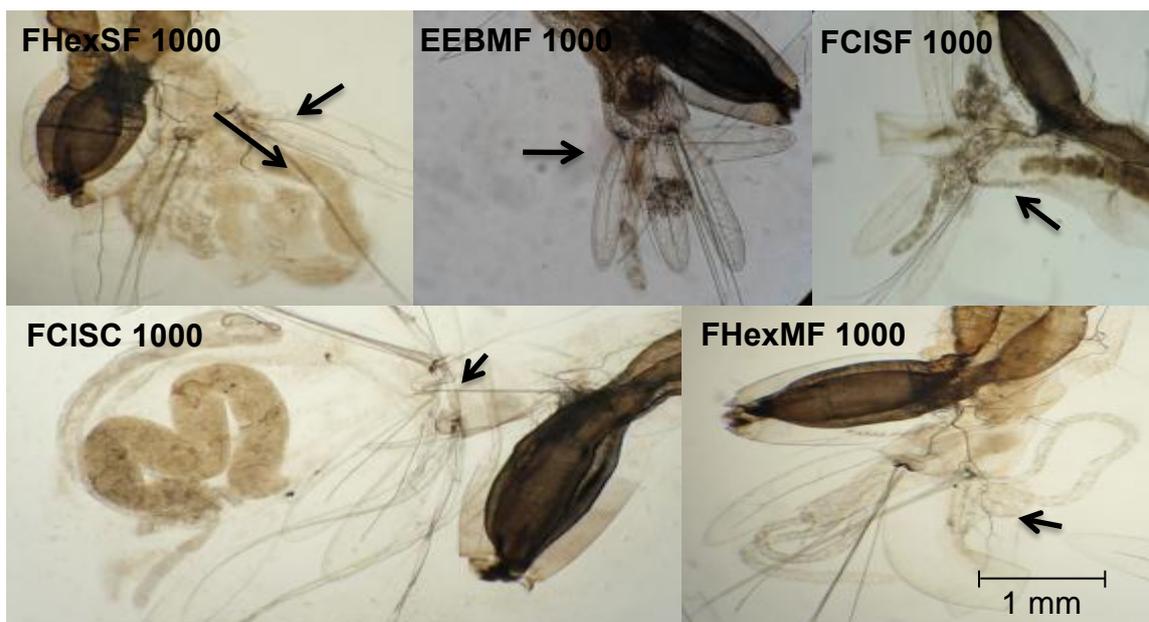


FIGURA 27 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE E FOLHAS DE *T. stellaris* SOBRE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM LARVAS DE *A. aegypti* – EXTRAVASAMENTO DO INTESSTIDO (SETAS). FRAÇÃO HEXANO MACERAÇÃO FOLHAS (FHexMF); FRAÇÃO CLOROFÓRMIO SOXHLET CAULE (FCISC); FRAÇÃO CLOROFÓRMIO SOXHLET FOLHAS (FCISF); EXTRATO ETANÓLICO BRUTO MACERAÇÃO FOLHAS (EEBMF);  
 FONTE: O autor (2015)

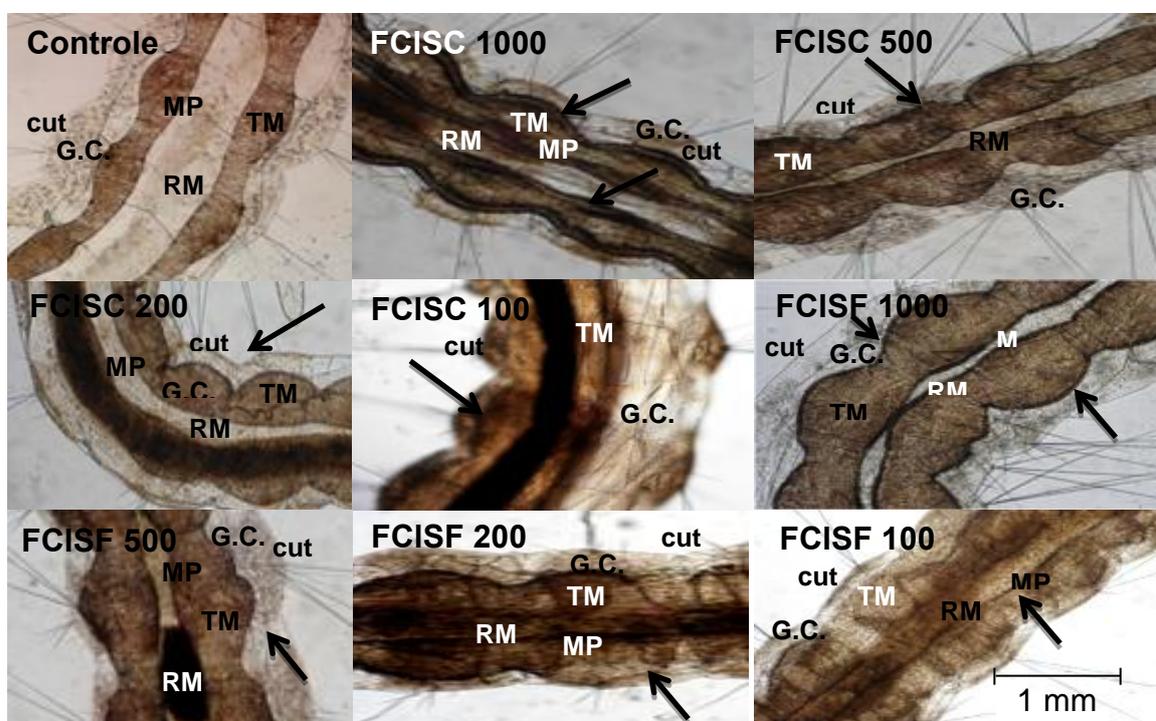


FIGURA 28 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES CLOROFÓRMIO DO CAULE E FOLHAS DE *T. stellaris* SOBRE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM LARVAS DE *A. aegypti* – ESTREITAMENTO DO MESÊNTERO, DIMINUIÇÃO DA GORDURA CORPORAL E ESPESSEAMENTO DA MEMBRANA PERITRÓFICA. FRAÇÃO CLOROFÓRMIO SOXHLET CAULE (FCISC); FRAÇÃO CLOROFÓRMIO SOXHLET FOLHAS (FCISF);  
 FONTE: O autor (2015)

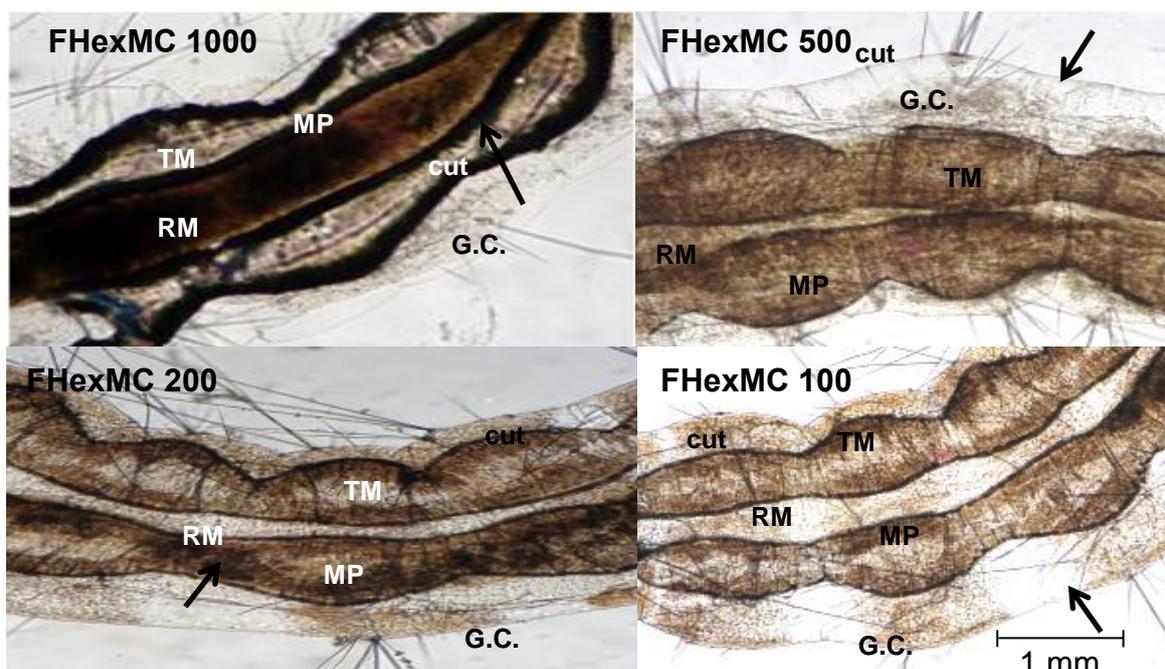


FIGURA 29 – EFEITO DAS DIFERENTES DE AMOSTRAS DE *T. stellaris* SOBRE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM LARVAS DE *A. aegypti* – ROMPIMENTO ENTRE A CAMADA DE GORDURA E O EPITÉLIO MUSCULAR (1000 µg/mL), ESPESSAMENTO DA CUTÍCULA E DIMINUIÇÃO DA GORDURA CORPORAL (SETAS). FRAÇÃO HEXANO MACERAÇÃO CAULE (FHexMC); FONTE: O autor (2015)

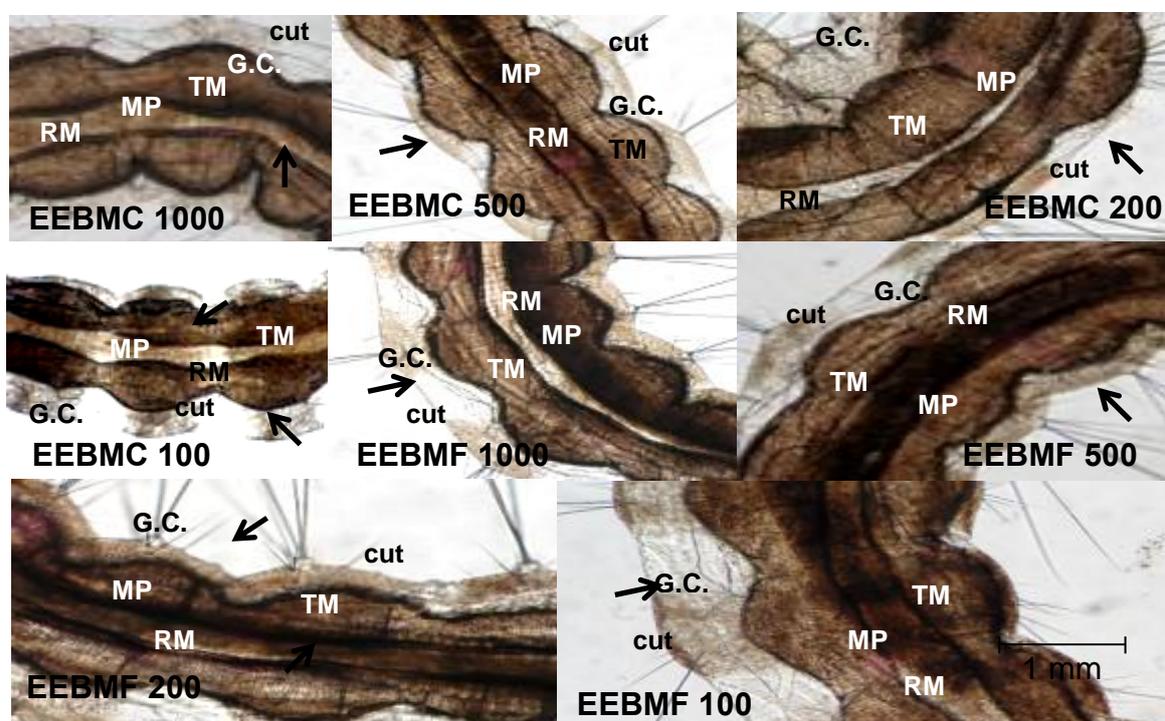


FIGURA 30 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS AMOSTRAS DE *T. stellaris* SOBRE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM LARVAS DE *A. aegypti* – ESTREITAMENTO DO MÊSÊNTERO E DIMINUIÇÃO DA GORDURA CORPORAL (SETAS). EXTRATO ETANÓLICO BRUTO MACERAÇÃO CAULE (EEBMC); EXTRATO ETANÓLICO BRUTO MACERAÇÃO FOLHAS (EEBMF); FONTE: O autor (2015)

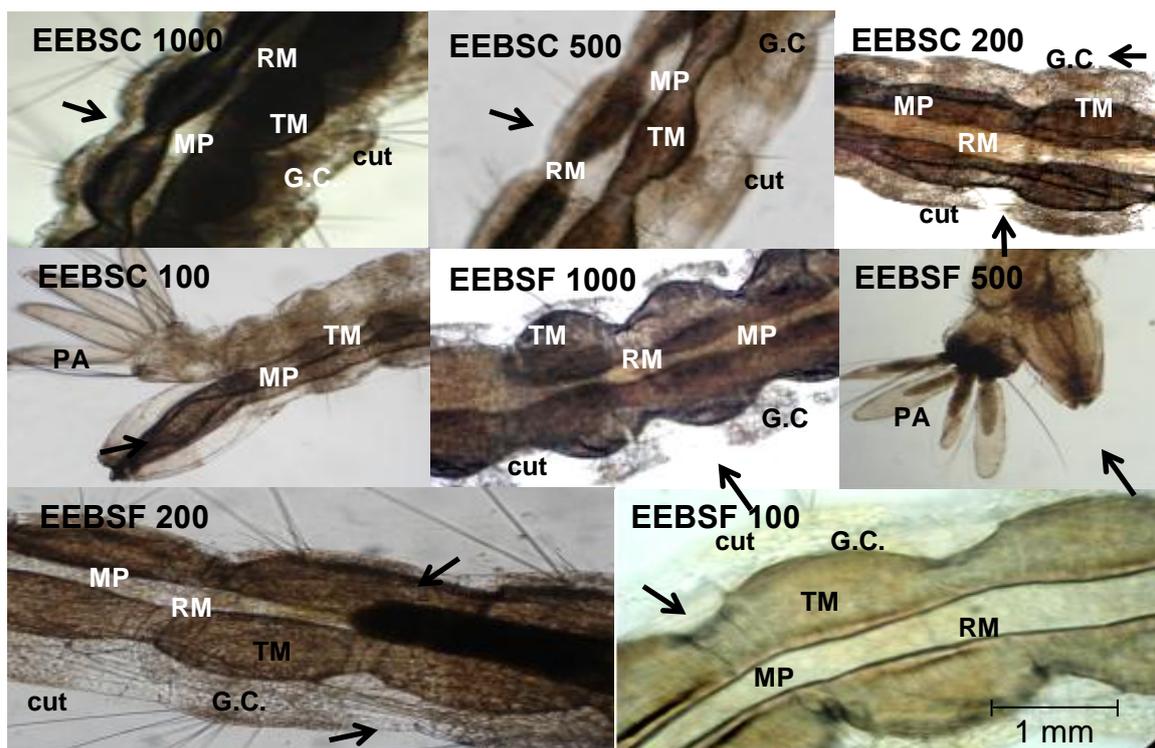


FIGURA 31 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS AMOSTRAS DE *T. stellaris* SOBRE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM LARVAS DE *A. aegypti* – ESCURECIMENTO DA MUSCULATURA E NO CORPO GORDUROSO, INIBIÇÃO DAS PAPILAS ANAIS E DIMINUIÇÃO DA GORDURA CORPORAL (SETAS). EXTRATO ETANÓLICO BRUTO SOXHLET CAULE (EEBSC); EXTRATO ETANÓLICO BRUTO SOXHLET FOLHAS (EEBSF).  
 FONTE: O autor (2015)

A avaliação da morfologia externa das larvas demonstrou que as alterações foram dependentes do tipo de extrato obtido. As larvas dos controles negativos (tratadas com água e DMSO) apresentaram aspecto normal, com corpo vermiforme e nitidamente dividido em cabeça, tórax e abdômen. Segundo Grzybowski (2011) *apud* Consoli (1994), larvas de aspecto normal apresentam cabeça e tórax globosos, enquanto do abdômen apresenta nove segmentos, sendo o último diferenciado em lobo anal. Ligado ao VIII segmento encontra-se o sifão respiratório.

A diminuição no tamanho das larvas pode ser um sintoma decorrente do achatamento das estruturas e segmentos, levando a uma desestruturação na organização destas estruturas. Entre as principais alterações observadas nas larvas tratadas com os extratos obtidos através de diferentes métodos, observa-se efeitos semelhantes como alongamento da cérvix (FIGURA 22), descolamento das peças do abdômen (FIGURA 23), supressão das papilas anais (FIGURA 24), má-formação do tórax e expansão do tórax (FIGURA 25). Nas larvas tratadas com o pesticida

temefós, o descolamento das peças do abdômen levou ao extravasamento do intestino (FIGURA 26). Além disso, algumas larvas apresentaram coloração mais escura do que o controle, o que pode ser um indicio de estresse oxidativo ocasionado pela exposição aos extratos.

Entretanto, estudos sobre o monitoramento da taxa de peroxidação lipídica encontra-se em andamento, com a finalidade de confirmar se o aumento da taxa de peroxidação lipídica é um dos mecanismos de ação dos extratos que provocaram o escurecimento das larvas, também observadas neste estudo (REEGAN *et al.*, 2014).

Os extratos de plantas ou substâncias isoladas de plantas afetam a biossíntese de ecdisona, causando efeitos perturbadores sobre o crescimento de larvas de mosquito e muda (ZEBITZ, 1984; PEREIRA; GURUDUTT, 1990; SAKTHIVADIVEL; THILAGAVATHY, 2003; SILVA *et al.*, 2013). Substâncias de origem natural, como triterpenoides e limonóides são frequentemente citados na literatura como agentes causadores de malformações em várias espécies de mosquitos (JAYAPRAKASHA, 1997). Senthil-Nathan (2013) discutiu em sua revisão que tais substâncias podem atuar diretamente sobre os receptores do intestino e causar grandes perturbações para o crescimento e desenvolvimento de um inseto ou larva.

No presente estudo, a extrusão do intestino foi registrada após 24 h de tratamento com os extratos da FHex, FCI do caule e da folha obtidas por soxhlet e da FHex e do EEB das folhas obtidas por maceração (FIGURA 26). A liberação do intestino para o meio externo é um mecanismo de defesa em larvas de *A. aegypti* expostas à intoxicação, levando a larva a eliminar todo o alimento contaminado com a substância larvicida, evitando maiores danos aos tecidos (VALOTTO *et al.*, 2011). Estes resultados corroboram com os obtidos por Prophiro *et al.* (2008), que relatou a emergência dos adultos incompletos de *Aedes aegypti* após o tratamento das larvas com 48 mg/L de óleo de *copaifera sp.* Estudos semelhantes com extrato de metanólico da casca, raiz e caule de *Kotschya uguenensis* resultaram no alongamento do intestino em larvas de *Anopheles. Gambiae*, Innocent *et al.* (2008), sugeriu que a o alongamento do corpo, pode ocorrer pelo alongamento da musculatura, que pode ser resultado de perturbações musculares, interferindo com o sistema endócrino. Do mesmo modo, o extrato metanólico das cascas e raízes de *Tessmannia Martiniana* causaram deformidades morfológicas através da formação

de estruturas semelhantes a uma cauda em larvas no 4º estágio de *A. gambiae*, após 24 h de exposição (KIHAMPA *et al.*, 2009).

Larvas tratadas com os diferentes extratos também apresentaram algumas alterações em sua morfologia interna. As concentrações de 1000, 500 e 200 µg/mL da FCI do caule obtida por soxhlet diminuiu a camada de gordura corporal após 24 horas de exposição (FIGURA 27). Nas concentrações de 1000 e 500 µg/mL observou-se uma membrana mais espessa ao redor da musculatura do segmento, evidenciando o espessamento da membrana peritrófica. A membrana peritrófica, é o tecido que separa a superfície interna do intestino e o sangue ingerido. Se um segundo repasto sanguíneo ocorre antes que o primeiro tenha sido totalmente digerido, forma-se uma segunda membrana peritrófica circundando a primeira e o novo sangue ingerido. A membrana peritrófica é permeável às enzimas proteolíticas e aos produtos da digestão que são absorvidos. Diferenças na formação da membrana peritrófica estão relacionadas com diferenças na suscetibilidade de *A. aegypti* e *Anopheles* a microrganismos patogênicos para o homem (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998). Segundo Gusmán *et al.* (2002), larvas de *A. aegypti* submetidas ao extrato de *Derris urucu*, tiveram a mortalidade larval relacionada com o rompimento da estrutura da membrana peritrófica. De maneira similar, os demais extratos também alteraram a camada de gordura corporal nas larvas tratadas com as maiores concentrações, bem como o fechamento da região mediana do mesêntero. A FHex do caule obtida por maceração na concentração de 1000 µg/mL (FIGURA 28) provocou um rompimento entre a camada de gordura e epitélio muscular do segmento. Aparentemente este efeito pode ter ocorrido por uma degeneração da epiderme, alterando a espessura da cutícula. O excesso de alimento ingerido pelas larvas (proteínas, carboidratos e lipídios) fica armazenado no corpo gorduroso, que serve como local de armazenamento de reservas, que serão utilizados na metamorfose, vôo e reprodução. É o que mantém reservas necessárias para a metamorfose, considerada fase de reorganização e reconstrução mediada por hormônios, quando então o inseto permanece sem se alimentar (CONTE, 1994; CRUZ-LANDIM; CRUZ-HOFLING, 2001). Assim, estes efeitos observados podem ocorrer devido ao aumento no estresse oxidativo. Grzybowski (2011), demonstrou que os extratos de *A. squamosa* em larvas de *A. aegypti* que inibiram a produção de NADH (ubiquinona oxidoreductase), impedindo o transporte de elétrons no complexo

mitocondrial I. Os elétrons no complexo mitocondrial I evita a produção de ATP e causa a morte do inseto, afetando a respiração celular. O aumento na respiração celular explicaria a diminuição na gordura corporal das larvas (FIGURA 29). O EEB do caule e o das folhas obtido por soxhlet (1000 µg/mL) (FIGURA 30) provocaram um escurecimento na musculatura do segmento, bem como no corpo gorduroso. Uma inibição nas papilas anais foi observada para o EEB do caule obtido por soxhlet, na concentração de 100 µg/mL e EEB da folha obtido por soxhlet (1000 µg/mL). Chaitong *et al.* (2006) observaram a atividade larvicida de três extratos etanólicos obtidos em plantas da família Piperaceae, *Piper longum*, *Piper ribesoides* e *Piper sarmentosum* sobre larvas de *A. aegypti*. A exposição a esses extratos não causou alteração morfológica visível a não ser nas papilas anais. A observação dessas papilas através de análise ultra-estrutural demonstrou que sua cutícula foi destruída. Estudos demonstrados por Shaalan *et al.* (2005) evidenciam que derivados de plantas podem, além dos efeitos larvicida e pupicida, influir no tempo de duração de larvas e pupas e reduzir a emergência de adultos. Assim, a aplicação de produtos naturais em doses subletais poderia levar a novas estratégias de controle, relacionados à resistência aos inseticidas sintéticos. Extratos de plantas que induzem a má formação durante (SHARMA *et al.*, 2006).

#### 5.6.2.3 Hemólise

De acordo com o teste para atividade hemolítica descrito na (TABELA 14), observou-se que a maioria das amostras possui uma resposta dose dependente. A FCI e a FHex do caule obtidas por maceração foram as que apresentaram maior porcentagem de hemólise em comparação ao controle nas concentrações de 200, 500 e 1000 µg/mL. As FCI das demais amostras demonstraram potencial atividade hemolítica, entretanto, as FHex e o extrato etanólico bruto apresentaram pouca ou nenhuma efetividade para hemólise. Constatou-se ainda, uma variabilidade de resultados de acordo com as partes morfológicas estudadas e o método de extração empregado, amostras do caule e amostras obtidas por maceração demonstraram maior capacidade em hemolisar eritrócitos quando submetidos a este ensaio.

TABELA 14 – ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *T. stellaris*.

AMOSTRA	FRAÇÃO	CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA $\mu\text{g/mL}$	% HEMÓLISE
Caule Maceração	FCI	100	49,530 c
		200	60,719 b
		500	64,761 b
		1000	86,974 a
	FHex	100	0,000
		200	66,115 b
		500	69,979 b
		1000	84,472 a
	EEB	100	0,000
		200	5,659 h
		500	6,901 h
		1000	33,402 e
Folhas Maceração	FCI	100	42,834 c
		200	49,449 c
		500	55,084 b
		1000	67,497 b
	FHex	100	0,000
		200	0,000
		500	0,000
		1000	3,727 h
	EEB	100	0,000
		200	5,625 h
		500	11,422 g
		1000	28,295 f
Caule Soxhlet	FCI	100	36,709 e
		200	41,425 c
		500	43,814 c
		1000	46,345 c
	FHex	100	0,000
		200	0,000
		500	13,078 g
		1000	15,562 g
	EEB	100	0,000
		200	3,761 h
		500	21,256 f
		1000	27,950 f
Folhas Soxhlet	FCI	100	30,298 d
		200	43,201 c
		500	41,527 c
		1000	42,589 c
	FHex	100	0,000
		200	0,000
		500	0,000
		1000	4,348 h
	EEB	100	0,000
		200	0,000
		500	0,000
		1000	12,422 g

NOTA: Fração clorofórmio (FCI), Fração hexano (FHex), Extrato Etanólico Bruto (EEB), valores obtidos por meio da média  $\pm$  desvio padrão de três replicatas; \*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

#### 5.6.2.4 Análise da atividade leishmanicida

Os extratos e frações de *Temnadenia stellaris* foram testados quanto à atividade leishmanicida (FIGURA 31). A prospecção demonstrou que apesar da baixa efetividade das amostras, a FHex da folha obtida por soxhlet foi a que indicou maior atividade, esses resultados corroboram com os resultados obtidos na literatura que relacionam a atividade leishmanicida com substâncias esteroidais presentes nos extratos de plantas. Diversos estudos testaram a atividade de fitoesteróis contra espécies do gênero *Leishmania* obtendo resultados significativos (DELGADO-MÉNDEZ *et al.*, 2008; TELES *et al.*, 2011). Dentre eles o  $\beta$ -sitosterol, substância isolada da fração hexano 11 das folhas de *Temnadenia stellaris*, o que pode ser indicativo para a atividade leishmanicida da fração. Vários estudos também relatam a atividade leishmanicida de plantas da família Apocynaceae, onde alcalóides isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* foram ativos contra os parasitas de *Leishmania sp.* (FERREIRA *et al.*, 2004; TANAKA *et al.*, 2007).

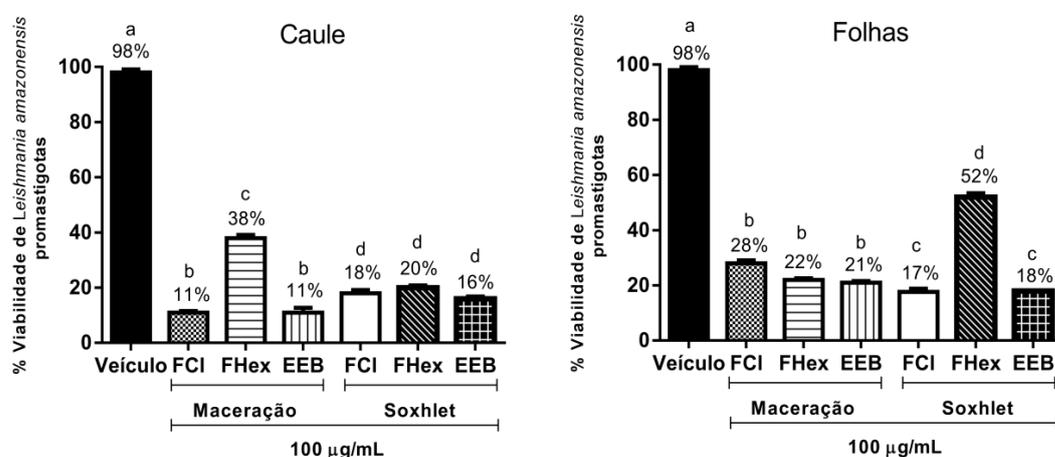


FIGURA 32 – PERCENTUAL DE ATIVIDADE LEISHMANICIDA PELO MÉTODO DE VIABILIDADE CELULAR DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DO CAULE E FOLHAS DE *Temnadenia stellaris*. \*MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY ( $p < 0,05$ ). FONTE: O autor (2015)

Os eventos adversos decorrentes do uso das drogas atualmente disponíveis para o tratamento da leishmaniose e a resistência adquirida pelo parasito a estes medicamentos tem motivado a busca por novas substâncias terapêuticas. Muitas

espécies de plantas apresentam atividade leishmanicida, esta atividade tem sido atribuída aos metabólitos secundários produzidos, destacam-se quinonas, alcaloides, terpenos, fenóis e derivados (CHANBACAB; PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001).

### 5.6.3 Análise da atividade antimicrobiana

#### 5.6.3.1 Determinação da CIM

Observa-se na (TABELA 15) que apenas a FCI obtida por maceração do caule apresentou uma atividade moderada para os microrganismos estudados, com destaque para *S. aureus* (125 µg/µl) e *P. aeruginosa* (250 µg/µl). Para as demais amostras a atividade não foi significativa e alternou de fraca (500-1000 µg/mL) a inativa (>1000 µg/mL).

TABELA 15 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *T. stellaris*

AMOSTRA	FRAÇÃO	MICROORGANISMO				
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Caule Maceração	FCI	125 µg/µl	500 µg/µl	250 µg/µl	500 µg/µl	1000 µg/µl
	FHex	>1000 µg/µl	1000 µg/µl	>1000 µg/µl	1000 µg/µl	>1000 µg/µl
	EEB	1000 µg/µl	>1000 µg/µl	>1000 µg/µl	1000 µg/µl	>1000 µg/µl
Folhas Maceração	FCI	1000 µg/µl	1000 µg/µl	1000 µg/µl	1000 µg/µl	1000 µg/µl
	FHex	1000 µg/µl	>1000 µg/µl	>1000 µg/µl	1000 µg/µl	>1000 µg/µl
	EEB	>1000 µg/µl	>1000 µg/µl	>1000 µg/µl	1000 µg/µl	>1000 µg/µl
Caule Soxhlet	FCI	1000 µg/µl	1000 µg/µl	1000 µg/µl	1000 µg/µl	>1000 µg/µl
	FHex	>1000 µg/µl	>1000 µg/µl	>1000 µg/µl	1000 µg/µl	>1000 µg/µl
	EEB	>1000 µg/µl	>1000 µg/µl	>1000 µg/µl	1000 µg/µl	>1000 µg/µl
Folhas Soxhlet	FCI	500 µg/µl	500 µg/µl	500 µg/µl	500 µg/µl	500 µg/µl
	FHex	>1000 µg/µl	1000 µg/µl	>1000 µg/µl	1000 µg/µl	>1000 µg/µl
	EEB	>1000 µg/µl	>1000 µg/µl	>1000 µg/µl	1000 µg/µl	>1000 µg/µl

NOTA: Fração clorofórmio (FCI), Fração hexano (FHex), Extrato Etanólico Bruto (EEB); CIM: <100 µg/mL – bom potencial inibitório; CIM: 100-500 µg/mL – moderada atividade inibitória; CIM: 500-1000 µg/mL – fraca atividade inibitória; CIM: >1000 µg/mL – inativos.

## 5. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que a espécie *Temnadenia stellaris* nas condições dos experimentos utilizados, obteve as seguintes conclusões: A espécie, *T. stellaris* pertencente à família Apocynaceae, não apresenta descrição na literatura sobre sua composição fitoquímica ou qualquer outro estudo descritivo.

Em uma pesquisa fitoquímica preliminar, esta espécie evidenciou a presença de grupos fitoquímicos como: alcaloides, leucoantocianidinas, heterosídeos flavônicos, iridóides, esteroides e/ou triterpenos. Foram isolados cristais da fração hexano e a substância identificada como  $\beta$ -sitosterol.

No estudo do perfil de atividade antioxidante e correlacionado os métodos e ensaios a que as amostras foram submetidas por análise multivariada, observa-se que o ensaio para fenóis totais demonstrou uma maior atividade antioxidante em relação aos outros experimentos, os resultados também indicaram uma correlação positiva entre o teor de fenóis totais e a capacidade de sequestro do radical livre DPPH, evidenciando a atividade antioxidante das amostras de *T. stellaris*, outro método que demonstrou bom potencial antioxidante foi o poder redutor azul da prússia. As frações clorofórmio foram as mais ativas para estes experimentos e em relação às partes morfológicas e ao método de extração, as amostras do caule obtidas por maceração obtiveram uma maior efetividade. O ensaio pela formação do complexo do fosfomolibdênio apresentou uma atividade antioxidante expressiva em relação ao padrão rotina e moderada em relação ao padrão vitamina c. Dentre os outros métodos utilizados para traçar o perfil antioxidante da espécie encontram-se: o teste com espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), sequestro do  $H_2O_2$ , degradação da desoxirribose, método do tiocianato férrico e o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, que apresentaram resultados intermediários para potencial antioxidante. As frações mais ativas para estes ensaios foram as frações hexano, sugestivas devido à natureza das substâncias extraídas nesta fração, mais lipofílicas, e que se correlacionam com alguns destes testes por se basearem na determinação da peroxidação lipídica. Os extratos etanólicos foram os que apresentaram uma menor atividade antioxidante frente aos experimentos utilizados e

não houve diferenças expressivas de acordo com as partes morfológicas da planta ou o método de extração empregado para obtenção dos extratos e frações.

Para os testes de toxicidade, o que apresentou maior relevância foi o teste de toxicidade frente à *Artemia salina*, onde a maioria dos extratos e frações de *T. stellaris* apresentaram valores de  $DL_{50}$  inferiores a  $1000 \mu\text{g/mL}^{-1}$ , concentração máxima para uma amostra ser considerada ativa, com destaque para a fração clorofórmio do caule obtida por maceração que exibiu uma  $DL_{50}$  de  $34,15 \mu\text{g/mL}$ , demonstrando a toxicidade da espécie contra os náupilos. No ensaio de atividade hemolítica nenhuma das amostras foi estatisticamente semelhante ao controle, porém, quando as amostras são comparadas em relação ao controle, observa-se que a fração clorofórmio e a fração hexano nas concentrações de  $1000 \mu\text{g/mL}$ , apresentaram valores de hemólise de 86,97% e 84,47%, respectivamente.

No teste larvicida sobre *Aedes aegypti*, as amostras ativas de *T. stellaris*, demonstraram uma atividade moderada. Contudo, a avaliação da morfologia das larvas demonstra uma potencial toxicidade para as amostras da espécie, em especial, a alteração do tamanho das larvas onde as medidas foram semelhantes ao do controle Temefós. Alterações morfoanatômicas também foram observadas: alongamento da cérvice, supressão das papilas anais, deslocamento do abdômen, supressão do tórax e extravasamento do intestino. Na avaliação da morfologia interna das larvas, foram encontradas alterações como o estreitamento do mesêntero, a diminuição da gordura corporal, o escurecimento da musculatura e o espessamento da membrana peritrófica. Essas alterações sugerem que as amostras foram tóxicas, interferindo diretamente no desenvolvimento das larvas e demonstrando reações do sistema de defesa das larvas em relação à intoxicação a fim de expulsar as substâncias que estejam causando a intoxicação.

Para a análise da atividade leishmanicida pelo método de viabilidade celular, observou-se que apesar da baixa efetividade a fração hexano demonstrou a maior atividade que pode ser atribuída à presença de  $\beta$ -sitosterol, substância isolada desta fração neste trabalho e que segundo a literatura apresenta atividade leishmanicida. Os resultados demonstram uma toxicidade relevante para as amostras de *Temnadenia stellaris*.

A atividade antibacteriana foi testada para a espécie *T. stellaris* utilizando os microrganismos *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* e *K. pneumoniae*,

porém a espécie apresentou-se com fraca atividade ou inativa contra os microrganismos escolhidos.

Os estudos para *Temnadenia stellaris* são inéditos, não foram encontrados estudo fitoquímicos ou de atividades biológicas para esta planta, esta pesquisa revelou importantes substâncias e atividades biológicas para *T. stellaris*, porém, por se tratar de uma espécie com abundante composição química e pertencer a uma família rica em metabólitos secundários, ainda restam substâncias a serem identificadas e testadas com relação as suas propriedades biológicas.

## REFERÊNCIAS

ACESTOR, N.; MASINA, S.; WALKER, J.; SAVIA, N.G.; FASEL, N.; QUADRON, M.; Establishing two-dimensional gels for analysis of Leishmaniasis proteomes. *Proteomics*, v.2, p. 877-879, 2003.

ANDERSON, J.E.; GOETZ, C.M.; McLAUGHLIN, J.L.; 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.

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.

ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B.; HOEY, B. M.; BUTLER, J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 6, n. 6, p. 593- 597, 1989.

AWAD, A.B.; FINK, C.F.; Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 130, 2127–2130, 2000.

AWAD, A.B.; BARTA, S.L.; FINK, C.S.; BRADFORD, P.G.; beta-Sitosterol enhances tamoxifen effectiveness on breast cancer cells by affecting ceramide metabolism. *Mol Nutr Food Res*. 52(4):419-26, 2008.

AYRES, M. C. B. *et al.* Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 90-97, 2008.

BASKAR, *et al.*; Chemopreventive potential of  $\beta$ -sitosterol in experimental colon cancer model: an in vitro and in vivo study. *Complementary e alternative medicine*, v.10, p. 24, 2010

BALASUNDRAM, N. *et al.*. Antioxidant properties of palm fruit extracts. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. v. 4, n.4, p. 319-324, 2005.

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.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose Tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectiva de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, n° 3. São Paulo, set., 2004.

BARATTO, L.C.; Estudo químico-analítico e morfoanatomia de espécies medicinais brasileiras da família Apocynaceae: *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson e *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg. Curitiba, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde). Universidade Federal do Paraná.

BAROSA, J.; FERREIRA, A., FONSECA, B. e SOUZA, I. Teste de toxicidade de cobre para *Artemia salina* – **Poluição e ecotoxicologia marinha**, Nov. 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.

BORGUINI, R. G.; Avaliação do Potencial Antioxidante e de Algumas Características Físico-Químicas do Tomate (*Lycopersicon esculentum*) Orgânico em Comparação ao Convencional. 2006. 178 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

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.

BRAFORD, G.P.; AWAD, B.; Phytosterols as anticancer compounds molecular. **Nutrition and research**, v.51, n.2, p. 161-170, 2007

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico. v. 46, n.3, 2015.

BRASIL, IBAMA. 2011b. [www.ibama.gov.br/ecossistemas/mata\\_atlantica.htm](http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/mata_atlantica.htm). Acesso em 20/06/2013.

BRASIL. Farmacopéia Brasileira, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 904, p. 2, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle de leishmaniose visceral. Brasília: *Ministério da Saúde*, 2006.

BRASIL, 2009. Ministério da Saúde. Portaria do Ministério da Saúde 2048/2009.

BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. Ciências Farmacêuticas Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: Editora Univali, 2003.

BRUFALL, G.; CANELA, A.M.; RAFECAS, M.; Phytoesterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. **Nutrition research**, v.28, n.4, p. 217-225, 2008.

CAVALCANTE, M. F.; OLIVEIRA, M. C. C.; VELANDIA, J. R. e ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,3,5-Triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach, **Química nova**, V. 23, p. 20-22, 2000.

CARVALHO, P.B.; FERREIRA, E.I.; *Leishmaniasis* phytotherapy, nature's leadership against an ancient disease – Review. *Fitoter.* v. 72, p. 599-619, 2001.

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.

CHAITHONG, U. W.; CHOOCOTE, K.; KAMSUK, A.; JITPAKDI, P. TIPPAWNGKOSOL, D.; CHAIVASIT, D.; CHAMPAKAEW, B.; TUETUN, & B. PITASAWATT. 2006. Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector Ecology** 31: 138-144.

CECHINEL-FILHO, et al.; Evaluation of Antileishmanial Activity of Selected Brazilian Plants and Identification of the Active Principles Evidence-Based **Complementary and Alternative Medicine**, p.1-7, 2013.

CHEESEMAN, K.H.; BEAVIS, A. & ESTERBAUER H. Hydroxyl-radical-induced iron-catalysed degradation of 2-deoxyribose. Quantitative determination of malondialdehyde. **Biochemical Journal**. v. 252, p. 649-653, 1988.

CONSOLI, R.; OLIVEIRA, L.S.; R. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Ed. Fiocruz, 1994.

CONTE, H. Morfologia do corpo gorduroso em larvas de *Diatrea saccharlis* (Lepidoptera: Pyralidae) não parasitadas e parasitadas pelo *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). 1994. 77f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro, 1994.

CORDEL, 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

CROQUIST, A. The evolution and classification of flowering plants. New York Botanical Garden. Nova York, 1988.

CRUZ-LANDIM, C.; CRUZ-HOFLING, M. A.; Ultrastructure of ovarian follicular epithelium of the amazonian fish *Pseudotilapia microps* (Gunther) (Teleostei, Belontiidae): I. the follicular cells cycle of development. **Rev. Bras. Zool.**, vol.18, n.1, p. 99-109, 2000.

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

DAVIS. A.J.; MURRAY, H.W.; HANDMAN, E.; Drugs against Leishmaniasis a synergy of technology and partnerships. *Trends parasitol*, v.20, n.2, p. 73-76, 2004.

DELGADO-MÉNDEZ, P.; HERRERA, N.; CHÁVEZ, H.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.;

- RAVELO, A. G.; CORTES, F.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. New terpenoids from *Maytenus apurimacensis* as MDR reversal agents in the parasite *Leishmania*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 1425-1430, 2008.
- DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. Gentianales medicinais. . Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2ª ed. **rev. e ampl.** Editora UNESP. 604p. São Paulo, 2002
- 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.
- DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema b-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.2,p.446-452, 2006.
- 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**. 14<sup>th</sup> edition. WB Saunders Company Ltd. London, 2002.
- FALCAO, 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**, v.17, n.4, p. 541-547, 2003.
- FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais In: Simões, C.M.O. et al (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade - UFRGS/ Ed. da UFSC, 2003.
- FERREIRA, I.C.P. *et al.* Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 325-327, 2004.
- FINNEY, D.J. 1971. **Probit Analysis**. Cambridge University Press, 3rd Edition.
- GONZALEZ-LAMOTHE, R. *et al.* Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. **Intitute Journal of Molecular Sciences**, Basel, v.10, n. 8, p. 3400-19, 2009.
- GRZYBOWSKI, A. *et. al.* Synergistic larvicidal effect and morphological alterations induced by ethanolic atracts of *Annona muricata* and *Piper nigrum* against the dengue fever vector *Aedes aegypti*. **Pest Manq. Sci.** 69(5): 589-601, 2013.
- GUSMÁN, M.G. e KOURÍ, G. **Dengue: un update**. *Lancet Infectious Diseases* 2: 33-42, 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Formation of a thiobarbituric-acidreactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts: the role of superoxide and hydroxyl radicals. **FEB Letters**. v. 128, p. 347–352, 1981.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C.; ARUOMA, O.I. The deoxyribose method: A simple “test- tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. **Analytical Biochemistry**, v. 165, n. 1, 215- 219, 1987. HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: Some new concepts. **The FASEB Journal**, v.1, p.358-364, 1987.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**. London, v. 33, n. 7, p. 601- 617, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3 ed. Clarendon, Oxford, 2000.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, p. 312–322, 2006.

HEEMANN, A. C. W. ; MIGUEL, O. G. ; MIGUEL, M. D. ; SASAKI, C. M. ; MONACHE, F. D.; Estudo fitoquímico da espécie *Pterocaulon interruptum*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 585-588, 2006.

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A.; LIMBERGER, R.P.; MORENO, P.R.H. Alcalóides: 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.

HOLETZ, F. B. *et al.* Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 1027-1031, Oct 2002.

INNOCENT, E.; JOSEPH, C. C.; GIKONIO N, K.; MOSHI, M. J.; NIKUNYA, M. H.H.; HASSANALI, A.; Mosquito larvicidal constituents from *Lantana viburnoides* sp *viburnoides* var *kisi* (A. rich) Verdc (Verbenaceae). **J Vector Borne Dis**. 45, pp. 240–244, 2008.

Instituto de ecología y ciencias ambientales - Laboratório de sistemática de plantas de plantas vasculares. Disponível em: <[http://www.thecompositaehut.com/www.tch/webcurso.spv/familias\\_pv/apocynaceae.html](http://www.thecompositaehut.com/www.tch/webcurso.spv/familias_pv/apocynaceae.html)>. Acesso em: 02/02/2015.

ISENGARD, H.D.; FÄRBER, J.M. Hidden parameters of infrared drying for determining low water contents in instant powders. **Talanta**, v.50, n.2, p. 239-246, 1999.

JAMAL, A.G; HANSEN. S.; JULU, P.O.O. Low level exposures to organophosphorus esters may cause neurotoxicity. **Toxicology**, v. 181-182, n. 48, p. 23-33, 2002.

JAYAPRAKASHA, G.K., et. al. Limonoids from *Citrus reticulata* and their moult inhibiting activity in mosquito *Culex quinquefasciatus* larvae. **Phytochemistry**. 44: 843-846, 1997.

KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N. Antioxidant effects of some ginger constituents. **Journal Food Science**. v. 58, p.1407-1410, 1993.

KIHAMPA, C., JOSEPH, C.C.; NKUNYA, M.H.H.; MAGESA, S.M.; HASSANALI, M.; HEYDENREICH, KLEINPETER, E.; Larvicidal and IGR activity of extract of Tanzanian plants against malaria vector mosquitoes. **Journal of Vector Borne Diseases**. 46: 145-152, 2009.

LEFEVRE, A. M. C.; LEFEVRE, F.; SCANDAR, S. A. S.; YASUMARO, S.; SAMPAIO, S. M. P. Representações dos agentes de combate ao *Aedes aegypti* sobre a estratégia de retirada do inseticida nas ações de controle do vetor. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, p. 353- 359, 2003.

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 Espirito Santo, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.68, p. 329-33, 2003.

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.

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.

MACORIS, M. L. G.; ANGRIGHETTI, M. T. M.; GLASSER, C. M.; GARBELOTI, V. C.; CIRINO, V. C. B. Alteração da resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 33, p. 521- 522, 1999.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JUNIOR, V.F.; GRYNBERG N.F.; ESCHEVARRIA, A.; PLANTAS MEDICINAIS: A NECESSIDADE DE ESTUDOS MULTIDISCIPLINARES. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MAISUTHISAKUL, P.; PASUK, S.; RITTHIRUANGDEJ, P. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. **J. Food Compos. Anal**, 21, 229–240, 2008.

MALAIRAJAN, P.; GOPALAKRISHNAN, G.; NARASIMHAN, S.; VENI, J.K.; Analgesic activity of some Indian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 425–428, 2006.

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

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.

MATTOS, L.M.; MORETTI, C.L.; MUNIZ, L.B.; SILVA, E.Y.Y.S.; Protocolo de análise para determinação da atividade antioxidante total em hortaliças no sistema  $\beta$ -caroteno ácido linoleico. Comunicado técnico 68, EMBRAPA, 2009.

MCLAUGHLIN, J.; CHANG, C.; SMITH, D.; Bench top bioassay for the discovery of bioactive natural products: an update. **Studies in Natural Productus Chemistry**, v. 9, p. 388-409, 1991.

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

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

MONTEIRO, M.R.; AMBROZIN, A.R.P.; LIÃO, L.M.; BOFFO, E.F.; TAVARES, L.A.; FERREIRA, M.M.C.; FERREIRA, G.; Study of Brazilian Gasoline Quality Using Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance ( $^1\text{H}$  NMR) Spectroscopy and Chemometrics. **Energy & Fuels** 23, 272–279, 2009.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.U.; ARAÚJO, E.L.; AMORIM, E.L.C.; Taninos: uma abordagem da química ecológica. **Quim. Nova**, vol. 28, N. 5, p. 892-896, 2005.

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.

MORALES, J. F.; Estudios en las Apocynaceae Neotropicales XIII: revisión del género *Temnadenia* (Apocynoideae, Echiteae). **Candollea** v.60, n.1, p. 207-231, 2005.

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.

MOREAU, R.A.; WHITAKER, B.D.; HICKS, K.B.; Phytosterols. Phytotanolos and tjeir conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. IN: **Prog. Lipia Res**, v.41, p. 457-500, 2002.

MOSMANN, T.; Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assay. **J Immunol Methods**. 65: 55-63, 1983.

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.

MURUGAN, K.; MURUGAN, P.; A. Noortheen. Larvicidal and repellent potential of *Albizzia amara* Boivin and *Ocimum basilium* Linn. against dengue vector, *Aedes aegypti*. **Biores. Technol.**, 98: 198-201, 2007.

NAGULENDRAN, K.R., S. VELAVAN, R. MAHESH, S.V.R. & HAZEENA BEGUM, V.H. *In vitro* antioxidant activity and total polyphenolic and content of *Cyperus rotundus* Rhizomes. **E-Journal of Chemistry**. v. 4, n. 3, p. 440-445, 2007.

OPAS; Organização Panamericana de la Salud. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control. Washington, DC: OPS; 1995.

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.

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

PEREIRA, J.K.N.; GURUDUTT. ; Growth inhibition of *Musca domestica* L. and *Culex quinquefasciatus* (Say) by (levo)-3-epicaryoptin isolated from leaves of *Clerodendron inerme* (Gaertn) (Verbenaceae). **J. Chem.Ecol.** 16: 2297-2306, 1990.

POZO-INSFRAN, D. D.; BRENES, C.H. & TALCOTT S. Phytochemical composition and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Martius). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 1539-1545, 2004.

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.

PROMSIRI, S.; NAKSATHIT, A.; KRUATRACHUE, M.; THAVARA, U. Evaluations of larvicidal activity of medicinal plant extracts to *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and other effects on a non-target fish. **Insect Science**, v. 13, p. 179–188, 2006.

PROPHIRO, J.S. **Susceptibilidade de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) a organofosforado e atividade inseticida de produtos de origem botânica.** Curitiba/PR, Universidade Federal do Paraná. Dissertação de Mestrado - Pós Graduação em Ciências Biológicas: 122,2008.

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.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Quím. Nova**. v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RAPINI, A.; Sistemática: estudo em *Asclepiadoideae* (Apocynaceae) na Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2000.

RAPINI, A; Revisitando as *Asclepiadoideae* (Apocynaceae) da cadeia do Espinhaço. In *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo*, p.97-123, São Paulo, 2010.

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.

RAHUMAN, A.A.; VENKATESAN, P. Larvicidal efficacy of five cucurbitaceous plant leaf extracts against mosquito species. **Parasitology Research**, v.103, n. 133–139, 2008.

RAYMUNDO, M.S.; HORTA, P.; FETT, R. Atividade antioxidante *in vitro* de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 40, n. 4, p. 495-503, 2004.

REEGAN, A.D. et. al. Effect of niloticin, a protolimonoid isolated from *Limonia acidissima* L. (Rutaceae) on the immature stages of dengue vector *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Acta Trop.*;139:67-76, 2014.

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.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.23, p.127-149, 1988.

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

ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas**, 27(1): 53-60, 2007.

ROGISNKY, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, n. 2, p. 235, 254, 2005.

RUCH, R. J.; CHENG, S. J.; KLAUNIG, J. E. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from chinese green tea. **Carcinogenesis**. v. 10, p.1003–1008, 1989.

RUDOWSKA, I.; Plantsterols and stanols for healthy ageing. *Maturitas*, v.66. n.2, p. 158-162, 2010.

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.

SÁNCHEZ, E.; GARCIA, S.; HEREDIA, N. Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 20, p. 6888-94, 2010.

SANTOS, L.B. Estudos morfológicos e taxinômicos do gênero *Temnadenia* Miers (Apocynaceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 97p. 1996.

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.

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.

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.

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

SCHRIPSEMA, J., DAGNINO, D., GOSMANN, G. (2004) Alcalóides indólicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.;

PETROCICK, P.R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, p. 819-846.

SHAALAN, E.A.S. et al. Effects of sub-lethal concentrations of synthetic insecticides and *Callitris glaucophylla* extracts on the development of *Aedes aegypti*. **Journal of Vector Ecology**. vol. 30, n.2, p.295-298, 2005

SHARMA, K.R. et al. Oviposition responses of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* to certain fatty acid esters. **Parasitol Res.** 103: 1065-1073, 2008.

SENNBLAD, 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.

SENTHIL-NATHAN, S.; REVATHI, K.; CHANDRASEKARAN, R.; THANIGAIVEL, A.; KIRUBAKARAN, S.; SATHISH-NARAYANAN, S.; Effects of *Bacillus subtilis* metabolites on larval *Aedes aegypti* L. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v.107, p. 369–376, 2013.

SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, v.22, n.1, p.95-103, 1999.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA- RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, v. 299, p. 152- 172, 1999.

SIQUEIRA, J.M.; BOMM, M.D.; PEREIRA, N.F.G.; GARCEZ, W.S.; BOAVENTURA, M.A.D.; Estudo Fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* –Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. **Revista Química Nova** 21(5), 1998.

SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSKI, E.M.; GONZAGA, L.; FETT, R.; Compostos fenólicos e antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 30, n. 1, p. 059-064, 2008.

SOUSA, C.M.M. et al.; Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 2, 351-355, 2007.

SOUZA, A.M.; ARMSTRONG, L.; MERINO, F.J.Z.; COGO, L.L.; MONTEIRO, C.L.B.; DUARTE, M.R.D.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D.; In vitro effects of *Eugenia pyriformis* Cambess; Myrtaceae: Antimicrobial activity and synergistic interactions with Vancomycin and Fluconazol. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. vol.8(35), p.862-867, 2014.

STEIN, A. C. Análise química de espécies de *Pterocaulon* (Asteraceae) e determinação da atividade antifúngica. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2005.

STEVENSON, D.E.; HURST, R.D. Polyphenolic phytochemicals – just antioxidant or much more? **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 64, p. 29000-2916, 2007.

STIVAL, A.; Flora difital do Rio Grande do Sul. Disponível em:<[http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=8453](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=8453)>. Acesso em: 02/02/2015.

TANAKA, J.C.A. *et al.* Antileishmanial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytomedicine**, v.14, p.377-380, 2007.

TANAKA, J. C. A. S. *et al.* Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 834-837, Jul 2005.

TELES, C. B. G.; MOREIRA, L. S.; SILVA, A. A. E.; FACUNDO, J. P. Z.; STÁBELI, R.G.; SILVA-JARDIM, I. Activity of the lupane isolated from *Combretum leprosum* against *Leishmania amazonensis* promastigotas. **Journal Braz. Chemical Society**, v. 22, p. 936-942, 2011.

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

TROPICOS. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/1803920> Acesso em: 03 /02/2015

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.

URDAPILLETA, A.A.A.; Atividades de substâncias isoladas de líquens sobre formas promastigotasde *Leishmania* (L.) *amazonensis* e *Leishmania* (V.) *braziliensis*. Brasília, 2006. 87f. dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília.

VALOTTO, C.F.B.; SILVA, H.H.G.; CAVASIN, G.; GERIS, R.; FILHO, E.R.; SILVA, I.G.; Alterações ultraestruturais em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao diterpeno labdano, isolado de *Copaifera reticulata* (Leguminosae), e à uma fração rica em taninos de *magonia pubescens* (Sapindaceae). **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 44(2), 194–200 (2011).

VANNUCCHI, H.; MOREIRA, E.A.M; CUNHA, D.F.; FRANCO, M.V.M.J.; BERNARDES, M. M.; JORDÃO- Jr.; A.A.J. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 1, p. 31-44, jan./mar. 1998.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M.; PLANTAS MEDICINAIS: CURA SEGURA? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

ZEBITZ, C.P.W.; Effect of some crude and azadirachtinenriched neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extracts on larvae of *Aedes aegypti*. **Entomol. Exp. Appl.** 35: 11-16, 1984

YANKAH, V.V.; Lipids phytosterols and human health. In: AKOH, C.C.; **Handbook of functional lipids**, 18, p. 403 – 408, 2006.

YEN, G.C.; CHEN, H.Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**.v. 43, n. 3, p. 27-32, 1995.

WOODSON, R. E., Jr. ; Studies in the Apocynaceae IV. The American genera of Echioideae. **Ann. Missouri Bot. Gard.** 20: 605–790. (1935).

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. **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. Fact sheet 117. 2009.