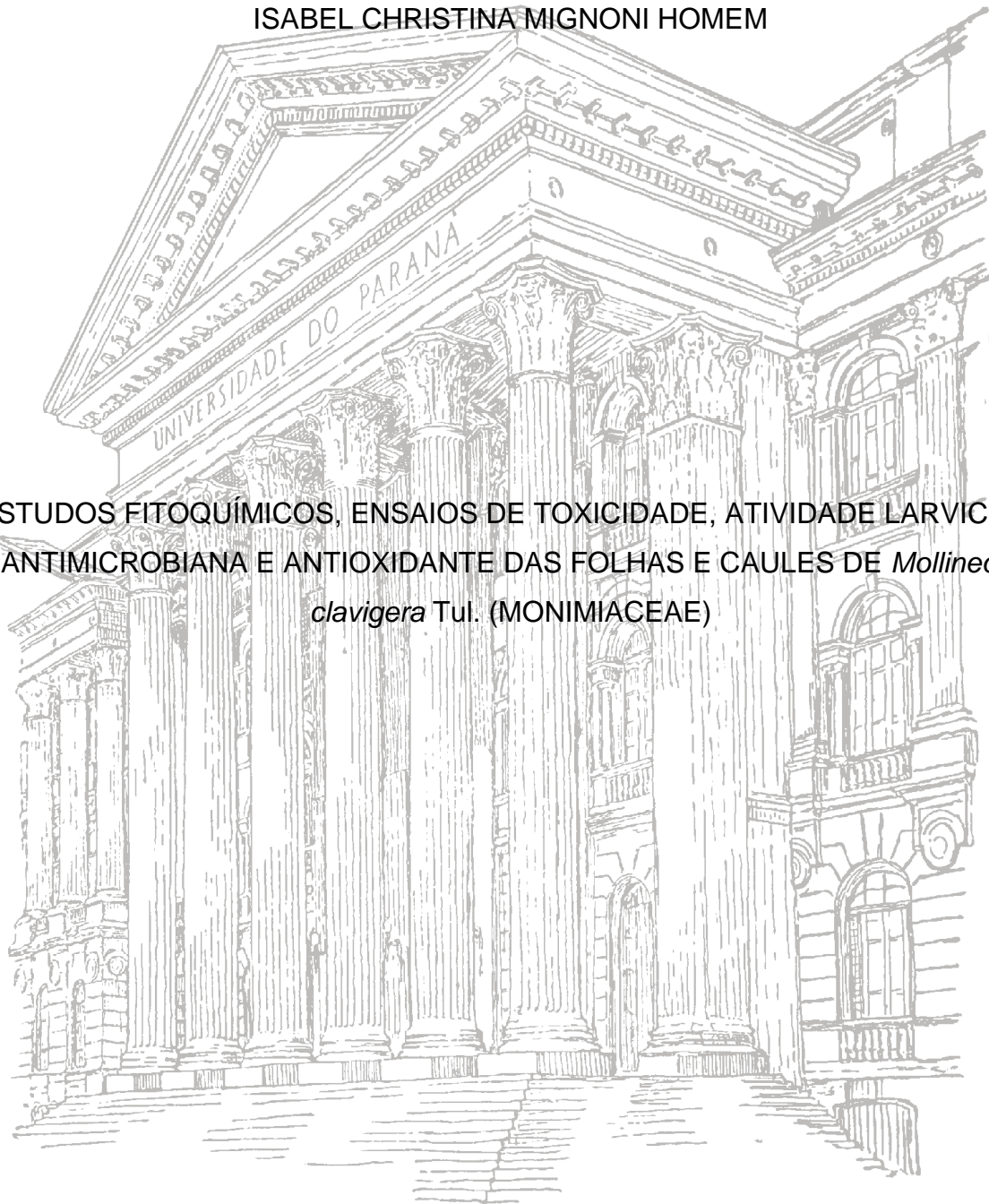


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISABEL CHRISTINA MIGNONI HOMEM

ESTUDOS FITOQUÍMICOS, ENSAIOS DE TOXICIDADE, ATIVIDADE LARVICIDA,
ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS E CAULES DE *Mollinedia*
clavigera Tul. (MONIMIACEAE)



CURITIBA

2015

ISABEL CHRISTINA MIGNONI HOMEM

ESTUDOS FITOQUÍMICOS, ENSAIOS DE TOXICIDADE, ATIVIDADE LARVICIDA,
ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS E CAULES DE *Mollinedia*
clavigera Tul. (MONIMIACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Marilis Dallarmi Miguel

CURITIBA

2015

Homem, Isabel Christina Mignoni

Estudos fitoquímicos, ensaios de toxicidade, atividade larvicida, antimicrobiana e antioxidante das folhas e caules de *Mollinedia clavigera Tul.* (Monimiaceae) / Isabel Christina Mignoni Homem – Curitiba, 2015.

106 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientadora: Professor Dr. Obdulio Gomes Miguel

Coorientadora: Professora Dra. Marilis Dallarmi Miguel

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. *Mollinedia clavigera*. 2. Monimiaceae. 3. β elemeno. 4. Toxicidade. 5. Antioxidante.
I. Miguel, Obdulio Gomes. II. Miguel, Marilis Dallarmi. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.32

TERMO DE APROVAÇÃO**ISABEL CHRISTINA MIGNONI HOMEM**

Título: "ESTUDOS FITOQUÍMICOS, ENSAIOS DE TOXICIDADE, ATIVIDADE LARVICIDA, ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS E CAULES DE *Mollinedia clavigera* Tul. (MONIMIACEAE)"

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.


Prof. Dr. Abdullo Gomes Miguel
Orientador


Prof. Dr. Clovis Antonio Rodrigues
Universidade do Vale do Itajaí


Profa. Dra. Deise Prehs Montrucchio
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 24 de fevereiro de 2015.

Dedico este trabalho aos meus pais, Aílto e Tânia, os meus mestres na arte da vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, Aílto e Tânia, por sempre me apoiarem em todas as minhas escolhas, por me ensinarem a ser forte e nunca desistir dos meus sonhos, por serem meus exemplos de humildade, honestidade, superação e perseverança e principalmente pelo amor incondicional que sempre demonstraram ter por mim. Amo vocês para todo o sempre. Obrigada por tudo.

Aos meus irmãos Marcel e Augusto e minhas cunhadas Vanessa e Sanny, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando nas minhas escolhas.

Aos meus afilhados Marcella e Caio, por iluminarem minha vida com seus sorrisos.

À minha família, tios e primos, principalmente a Branca, Valmir e Monique pela amizade e por terem me recebido tão bem em Curitiba.

Ao Dr. Ranieri Campos, por ter me incentivado e apoiado a entrar no Programa de Pós Graduação e por ajudar na minha adaptação em Curitiba.

Aos amigos Viviane, Patrícia, Susete e Lediel pelo carinho, amizade e companhia em todos os momentos, apesar da distância.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo auxílio financeiro.

Ao meu orientador Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel e co-orientadora Prof^a Dr^a Marilis Dallarmi Miguel pelos ensinamentos, paciência, confiança e amizade.

Ao Prof. Dr. Roberto Pontarolo, pela oportunidade e por ceder o laboratório em algumas etapas do desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Railson Henneberg, pela disponibilização do espaço e equipamentos para o andamento da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Fábio Murakami e a mestrandia Andressa, pelo suporte na realização da avaliação da atividade antimicrobiana e disponibilização do espaço e equipamentos.

Ao Curador do Museu Botânico Municipal de Curitiba, Osmar dos Santos Ribas, pela identificação e depósito do exemplar da espécie em estudo.

Ao Prof. Dr. Anderson Barison e ao Centro de Ressonância Magnética Nuclear do departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, pelo auxílio e disponibilização do espaço e equipamentos.

À professora Josiane Dias, Sandra Zanin e Vitor Kerber, por compartilhar seus conhecimentos e colaborar na execução do trabalho.

Ao Prof. Dr. Clóvis, meu primeiro orientador, pela amizade, carinho, paciência e por sempre me ajudar, seja na época do TCC ou agora no mestrado, com carta de recomendação, auxílio para realização de alguns testes e por aceitar ser parte da minha banca.

Ao grupo de pesquisa de Produtos Naturais, principalmente ao Vinícius, Fernanda, Ana Flávia, Beatriz, Cristiane Bezerra, Francis, Juliana, Camila, Angela, Luciane e Hellen, pelas sugestões e auxílio na realização de alguns ensaios

Às companheiras de mestrado Vanessa Santos, Jéssica Domingues e Mariana Amorim por dividirem comigo lágrimas e sorrisos.

À minha dupla dinâmica, Ellis Marina, pela ajuda e parceria em todas as fases da elaboração deste trabalho. Pela amizade e companheirismo dentro e fora da universidade. Minha vizinha, amiga-irmã.

Aos meus vizinhos, Sr. Luiz e Sra Ademilde, pelo zelo, atenção e carinho.

Aos técnicos dos laboratórios, Paulo e Graça e ao secretário Jean Godoi.

E a todos aqueles que eventualmente não foram citados, mas que, com certeza, participaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo investigar a composição fitoquímica e possíveis atividades antioxidante, antimicrobiana, larvívica e toxicidade da espécie *Mollinedia clavígera* Tul., família Monimiaceae. O material foi coletado na cidade de Curitiba, Paraná, Brasil. O estudo foi realizado a partir das folhas e caules, onde verificou-se os parâmetros físicos-químicos e os metabólitos secundários presentes, sendo qualitativamente detectados alcalóides, flavonóides, esteróides, triterpenos e saponinas. Obteve-se os extratos brutos etanólicos, que em seguida foram particionados utilizando solventes em escala crescente de polaridade e obteve-se as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente. Realizou-se também a extração do óleo essencial das folhas secas a temperatura ambiente em aparato de Clevenger modificado e o composto químico majoritário identificado foi o β -elemeno (14,38%). Na atividade larvívica e ensaios de toxicidade as frações com resultados mais significantes foram a fração hexano das folhas e a fração hexano dos caules. A fração hexano das folhas apresentou uma boa atividade antimicrobiana (15,625 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) sobre a cepa *S. epidermidis*. Os ensaios antioxidantes indicaram que a espécie possui boa capacidade antioxidante, destacando-se no ensaio de redução do fosfomolibdênio onde o óleo apresentou atividade antioxidante de 86,47% em relação ao padrão vitamina C e superou em 190,63% a atividade do padrão rutina. No ensaio de redução do radical DPPH, o extrato bruto etanólico dos caules apresentou o melhor desempenho ($\text{IC}_{50} = 33,59 \pm 0,82$), assim como a fração acetato de etila dos caules ($\text{IC}_{50} = 34,16 \pm 0,58$).

Palavras-chave: *Mollinedia clavígera*. Monimiaceae. β elemeno. Toxicidade Antioxidante.

ABSTRACT

The present work aimed investigation of phytochemical composition and activities such as antioxidant, antimicrobial, larvicidal and toxicity of *Mollinedia clavigera* Tul. species, Monimiaceae family. Species material was collected in Curitiba city, Paraná, Brasil. The study evaluated physical-chemical parameters and present secondary metabolites in leaves and stems, detecting alkaloids, flavonoids, esteroids, triterpenes and saponins. Crude ethanolic extracts were partitioned using solvents in increasing polarity scale, producing hexane, dichloromethane, ethyl acetate and water-alcohol remaining fractions. Essencial oil from dried leaves was obtained at room temperature in modified Clevenger apparatus, being β -elemen the major chemical compound (14,38%). Leaves' and stems' hexane fracions had most significant results in toxicity and larvicidal activities. Leaves' hexane fraction presented good antimicrobial activity in *S. epidermidis* (15,625 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Antioxidant essays indicate the species present good antioxidant capacity, highlighting oil activity in phosphomolybdenum reduction essay, representing 86,47% of vitamin C activity, overcoming in 190,63% rutin activity. DPPH reduction essay, stems' crude ethanolic extract presented the best performance ($\text{IC}_{50} = 33,59 \pm 0,82$), as good as stems' ethyl acetate fraction ($\text{IC}_{50} = 34,16 \pm 0,58$).

Keywords: *Mollinedia clavigera*. Monimiaceae. β -elemene. Toxicity. Antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA MUNDIAL DA FAMÍLIA MONIMIACEAE.....	22
FIGURA 2 –	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA FAMÍLIA MONIMIACEAE NO BRASIL.....	23
FIGURA 3 –	<i>Mollinedia clavigera</i> Tul.	29
FIGURA 4 –	FRUTOS DE <i>Mollinedia clavigera</i> Tul.	29
FIGURA 5 –	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE <i>M. clavigera</i> Tul.	30
FIGURA 6 –	BIOSSÍNTESE DE COMPOSTOS TERPÊNICOS: VIA CLÁSSICA (MVA) E VIA ALTERNATIVA (MEP)	33
FIGURA 7 –	LOCAL DA COLETA DA ESPÉCIE <i>Mollinedia clavigera</i> Tul.	35
FIGURA 8 –	EXSICATA DE <i>M. clavigera</i> DEPOSITADA NO MBM DE CURITIBA SOB O REGISTRO MBM 384847.....	35
FIGURA 9 –	REAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO COM MOLIBDÊNIO, COMPONENTE DO REAGENTE DE FOLIN-CIOCALTEU.....	58
FIGURA 10 –	REDUÇÃO DO RADICAL DPPH.....	62
FIGURA 11 –	ESPECTRO DE RMN ¹ H DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA.....	68
FIGURA 12 –	ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS <i>M. clavigera</i>	71
FIGURA 13 –	ESTRUTURA QUÍMICA β-ELEMENO.....	73
FIGURA 14 –	ESTRUTURA QUÍMICA β-SELINENO.....	73
FIGURA 15 –	ESTRUTURA QUÍMICA α-SELINENO.....	74
FIGURA 16 –	ESTRUTURA QUÍMICA CARIOFILENO.....	74

FIGURA 17 – ESTRUTURA QUÍMICA COPAENO.....	74
FIGURA 18 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i> SOBRE <i>S. epidermidis</i>	82
FIGURA 19 – COMPARAÇÃO VISUAL ENTRE ÓLEO ESSENCIAL DE <i>M. clavigera</i> E O PADRÃO VITAMINA C ATRAVÉS DA METODOLOGIA ANITOXIDANTE DA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO.....	86

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE PERDA POR DESSECAÇÃO E CINZAS TOTAIS DAS FOLHAS E CAULES DE <i>M. clavigera</i>	63
TABELA 2 –	RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DAS FOLHAS E CAULES DE <i>M. clavigera</i>	64
TABELA 3 –	ANÁLISE SISTEMÁTICA DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DAS FOLHAS E CAULES DE <i>M. clavigera</i>	65
TABELA 4 –	ANÁLISE SISTEMÁTICA DOS EXTRATOS AQUOSOS DAS FOLHAS E CAULES DE <i>M. clavigera</i>	66
TABELA 5 –	SOLUBILIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>M. clavigera</i> EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ETANOL.....	70
TABELA 6 –	COMPOSTOS QUÍMICOS IDENTIFICADOS NA ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i>	72
TABELA 7 –	ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA SOBRE <i>Artemia salina</i> e DL50 UTILIZANDO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO, FRAÇÕES E ÓLEO DAS FOLHAS E CAULES DE <i>M. clavigera</i>	75
TABELA 8 –	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS E CAULES DE <i>M. clavigera</i>	77
TABELA 9 –	ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE <i>Aedes aegypti</i> e DL50 UTILIZANDO EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS E CAULES DE <i>M. clavigera</i>	79
TABELA 10 –	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS E CAULES DE <i>M. clavigera</i>	81

TABELA 11 –	DETERMINAÇÃO DOS FENÓIS TOTAIS (FT) PELO MÉTODO DO RAGENTE FOLIN CIOCALTEU, EXPRESSOS COMO EQUIVALENTES DE ÁCIDO GÁLICO (EAG) POR G DE EXTRATO DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS E CAULES DE <i>M. clavigera</i>	83
TABELA 12 –	RESULTADO DA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO NOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS E CAULES DE <i>M. clavigera</i>	85
TABELA 13 –	RESULTADO DE IC50 E TESTE DE TUKEY PARA REDUÇÃO DO DPPH NOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS E CAULES DE <i>M. clavigera</i>	93

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 –	TAXONOMIA DA ESPÉCIE <i>Mollinedia clavigera</i> Tul.	30
------------	--	----

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 –	CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A DOSAGEM DE FENÓLICOS TOTAIS.....	59
GRÁFICO 2 –	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA PELA INIBIÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DE <i>M. clavigera</i> EM RELAÇÃO AOS PADRÕES RUTINA E VITAMINA C.....	85
GRÁFICO 3 –	CURVA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i>	87
GRÁFICO 4 –	CURVA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DE FOLHAS DE <i>M. clavigera</i>	88
GRÁFICO 5 –	CURVA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELA REMANESCENTE DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i>	88
GRÁFICO 6 –	CURVA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE CAULES DE <i>M. clavigera</i>	89
GRÁFICO 7 –	CURVA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELA FRAÇÃO HEXANO DE CAULES DE <i>M. clavigera</i>	89
GRÁFICO 8 –	CURVA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DE CAULES DE <i>M. clavigera</i>	90
GRÁFICO 9 –	URVA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE CAULES DE <i>M. clavigera</i>	90
GRÁFICO 10 –	CURVA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELA FRAÇÃO REMANESCENTE DE CAULES DE <i>M. clavigera</i>	91
GRÁFICO 11 –	CURVA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELO PADRÃO VIT. C.....	91
GRÁFICO 12 –	CURVA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELO PADRÃO RUTINA.....	92

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°GL	– Graus Gay Lussac
AAR %	– Atividade antioxidante relativa
ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APG	– Grupo para a filogenia das Angiospermas
CC	– Cromatografia em coluna
CG/EM	– Cromatografia Gasosa acoplada a espectrômetro de massas
CIM	– Concentração Inibitória Mínima
CIT/SC	– Centro de Investigação Toxicológica de Santa Catarina
CLAE	– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	– Clinical and Laboratory Standards Institute
DL ₅₀	– Dose Letal Média
DMAPP	– Difosfato de dimetilalila
DMSO	– Dimetilsulfóxido
DP	– Desvio Padrão
DPPH	– 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EAG	– Equivalente de ácido gálico
FPP	– Difosfato de farnesila
FT	– Fenóis Totais
GGPP	– Difosfato de geranil geranila
H ₂ SO ₄	– Ácido sulfúrico
HCl	– Ácido Clorídrico
HCN	– Ácido Cianídrico
IC ₅₀	– 50% da concentração inicial
IPP	– Difosfato de isopentinila
ISSO	– International Standard Organization
KOH	– Hidróxido de potássio
MBM	– Museu Botânico Municipal
MEP	– Metileritritol fosfato
MVA	– Mevalonato
N	– Normal

NaOH	– Hidróxido de Sódio
NH ₄ OH	– Hidróxido de amônio
nm	– Nanômetro
PBS	– Tampão fosfato salina
pH	– Potencial hidrogeniônico
ppm	– Partes por milhão
RMN ¹ H	– Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
SDS	– Dodecil Sulfato de Sódio
TMS	– Tetrametilsilano
TTC	– Cloreto de Trifenil Tetrazólio
UFC	– Unidade Formadora de Colônia
UNIVALI	– Universidade do Vale do Itajaí
UV	– Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 GERAL.....	21
2.2 ESPECÍFICOS.....	21
3 REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1 FAMÍLIA MONIMIACEAE JUSS.....	22
3.2 GÊNERO <i>Mollinedia Ruiz & Pav.</i>	26
3.3 ESPÉCIE <i>Mollinedia clavigera Tul.</i>	29
3.4 ÓLEOS ESSENCIAIS	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	35
4.2 TRATAMENTO DO MATERIAL BOTÂNICO	36
4.3 ENSAIOS FÍSICO QUÍMICOS	37
4.3.1 Cinzas totais	37
4.3.2 Perda por dessecação	37
4.4 ENSAIO SISTEMÁTICO FITOQUÍMICO.....	38
4.4.1 Metabólitos solúveis em álcool	38
4.4.1.1 Pesquisa de alcaloides.....	39
4.4.1.2 Pesquisa de leucoantocianidinas	40
4.4.1.3 Pesquisa de heterosídeo flavônico.....	40
4.4.1.3.1 Teste do Oxálico Bórico ou Reação de Taubock	41
4.4.1.3.2 Ensaio de Pacheco.....	41
4.4.1.3.3 Ensaio com Zinco em ácido clorídrico	41
4.4.1.4 Pesquisa de cumarinas	42
4.4.1.5 Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos.....	43
4.4.1.6 Pesquisa de esteroides e triterpenos	43
4.4.2 Metabólitos solúveis em água.....	44
4.4.2.1 Pesquisa de heterosídeos antociânicos	44
4.4.2.1 Pesquisa de heterosídeos saponínicos	45
4.4.2.2 Pesquisa de heterosídeos cianogênicos	45
4.4.2.3 Pesquisa de taninos	46

4.5	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS E FRAÇÕES	47
4.5.1	Extratos brutos etanólicos	47
4.5.2	Particionamento dos extratos brutos etanólicos.....	47
4.6	TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROSCÓPICAS.....	48
4.6.1	Cromatografia em coluna.....	48
4.6.2	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	48
4.7	EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>M.clavigera</i>	49
4.7.1	Extração do óleo essencial.....	49
4.7.2	Rendimento do óleo essencial	49
4.7.3	Caracterização do óleo essencial	49
4.7.3.1	Características organolépticas	49
4.7.3.2	Determinação da densidade.....	50
4.7.3.3	Determinação da solubilidade em etanol.....	50
4.7.3.4	Determinação do índice de refração $^{20}n_D$	51
4.7.4	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM)	51
4.8	ENSAIOS DE TOXICIDADE	51
4.8.1	Ensaio de toxicidade aguda sobre <i>Artemia salina</i>	52
4.8.2	Avaliação da atividade hemolítica in vitro	53
4.9	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA EM <i>Aedes aegypti</i>	54
4.10	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	55
4.10.1	Método da difusão em disco.....	56
4.10.2	Método da microdiluição em caldo	57
4.11	DOSEAMENTO DE FENÓLICOS TOTAIS	57
4.12	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	59
4.12.1	Método da Redução do Complexo Fosfomolibdênio	60
4.12.2	Método do Sequestro de Radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH).....	61
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1	ENSAIOS FÍSICO QUÍMICOS	63
5.2	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS E FRAÇÕES.....	63
5.3	ENSAIO SISTEMÁTICO FITOQUÍMICO.....	65
5.4	ESTUDO DAS FRAÇÕES DE <i>M. clavigera</i>	67
5.5	EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>M. clavigera</i>	68
5.5.1	Rendimento do óleo essencial	68
5.5.2	Caracterização do óleo essencial	69

5.5.2.1	Caraterísticas organolépticas	69
5.5.2.2	Determinação da densidade	69
5.5.2.3	Determinação da solubilidade em etanol.....	69
5.5.2.4	Determinação do índice de refração $^{20}n_D$	70
5.5.3	Cromatografia Gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM)	70
5.6	ENSAIOS DE TOXICIDADE.....	75
5.6.1	Ensaio de toxicidade aguda sobre <i>Artemia salina</i>	75
5.6.2	Avaliação da atividade hemolítica in vitro	76
5.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA EM <i>Aedes aegypti</i>	78
5.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	80
5.8.1	Difusão em ágar.....	80
5.8.2	Método de microdiluição em caldo.....	80
5.9	DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS	83
5.10	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	84
5.10.1	Método da Redução do Complexo Fosfomolibdênio	84
5.10.2	Método do Sequestro de Radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH).....	87
6	CONCLUSÃO	95
	REFERÊNCIAS.....	97

1 INTRODUÇÃO

A utilização de drogas de origem vegetal para fins terapêuticos data de milhares de anos e vem sendo propagada entre gerações. Alguns registros escritos pelos sumérios, datados de cinco mil anos, descrevem o uso medicinal de plantas como o tomilho, louro e cominho. Porém estudos arqueológicos demonstram o uso de plantas medicinais há 60 mil anos no Iraque e há oito mil anos na China (PAN *et al.*, 2014).

No Brasil, os índios, conhecedores da flora nativa, utilizavam muitas plantas em rituais e também para fins terapêuticos. Os imigrantes trouxeram para o Brasil algumas plantas medicinais e fundiram as tradições com os nativos. Assim acumulou-se a riqueza do conhecimento e a heterogeneidade sobre as espécies vegetais (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Com o surgimento dos avanços na química, teve início o isolamento e identificação de algumas substâncias de origem vegetal que apresentaram atividades terapêuticas. No fim do século XIX e início do século XX, foram isolados os primeiros compostos químicos de produtos vegetais, incluindo alcaloides como morfina, estricnina e quinina, marcando o início da pesquisa moderna com plantas medicinais (PHILLIPSON, 2001). As décadas de 1920 e 1930 podem ser caracterizadas pelo grande número de trabalhos sobre o isolamento e a identificação de substâncias de natureza esteroidal. Foi nesse período que o principal representante dessa classe, o colesterol, teve sua estrutura determinada. No entanto, sua síntese só foi realizada em 1951 (PINTO *et al.*, 2002).

Nas últimas décadas, observa-se um aumento expressivo nos estudos químicos e farmacológicos para obtenção de novos compostos com finalidades terapêuticas a partir de plantas medicinais. O desenvolvimento de novas técnicas espectroscópicas e o avanço da química orgânica auxiliam a elucidar as estruturas moleculares de compostos naturais com maior eficiência e rapidez (CECHINEL *et al.*, 1998).

A importância das plantas medicinais atualmente se dá pelo fato de fornecerem fármacos que dificilmente seriam obtidos por síntese química, além de poderem ser modificados, tornando-se mais eficazes e menos tóxicos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). Algumas espécies vegetais utilizadas na medicina popular

apresentam substâncias nocivas que podem causar efeitos indesejados, interações com outros medicamentos ou até mesmo intoxicação. A obtenção de um produto seguro e eficaz não pode basear-se apenas no uso popular, devendo ser fundamentado experimentalmente e validado para comprovar sua ação farmacológica, além da avaliação de toxicidade para o consumo humano (LAPA *et al.*, 2010). A normatização do uso e produção de medicamentos fitoterápicos por agências reguladoras, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), auxilia na avaliação de aspectos imprescindíveis como a eficácia e a segurança destes medicamentos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Parte das espécies da flora nativa brasileira ainda não apresentam estudos químicos e biológicos adequados e acredita-se que boa parte pode apresentar propriedades terapêuticas úteis à população. Entre essas espécies podemos citar a *Mollinedia clavigera*, Tul. pertencente à família Monimiaceae, encontrada na vegetação de Floresta Atlântica, instrumento de trabalho desta pesquisa. Tendo em vista os resultados encontrados em estudos fitoquímicos e ensaios de atividades biológicas de espécies do mesmo gênero, torna-se relevante o estudo da espécie.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a composição fitoquímica da espécie *Mollinedia clavigera* Tul. e verificar as atividades antioxidante, antimicrobiana, larvicida e a toxicidade dos extratos brutos etanólicos, frações e óleo essencial.

2.2 ESPECÍFICOS

- Realizar o ensaio sistemático fitoquímico das folhas e caules de *Mollinedia clavigera*;
- Determinar parâmetros físico-químicos das folhas e caules de *Mollinedia clavigera*;
- Avaliar os extratos brutos etanólicos e frações mais promissoras para um possível isolamento e identificação dos constituintes químicos da espécie *Mollinedia clavigera*;
- Realizar a extração, análise e caracterização do óleo essencial de *Mollinedia clavigera*;
- Realizar ensaios de toxicidade: toxicidade aguda em *Artemia salina* e atividade hemolítica dos extratos brutos etanólicos, frações e óleo essencial;
- Avaliar a atividade larvicida em *Aedes Aegypti* dos extratos brutos etanólicos, frações e óleo essencial;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos etanólicos, frações e óleo essencial;
- Realizar o doseamento de fenólicos totais dos extratos brutos etanólicos, frações e óleo essencial;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos brutos etanólicos, frações e óleo essencial.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FAMÍLIA MONIMIACEAE JUSS

A família Monimiaceae, membro das famílias basais de Angiospermas, pertence à ordem das Laurales englobando 28 gêneros e cerca de 200 espécies, distribuídas no hemisfério Sul (FIGURA 1), principalmente em regiões tropicais e subtropicais da América (RENNER, 2010).

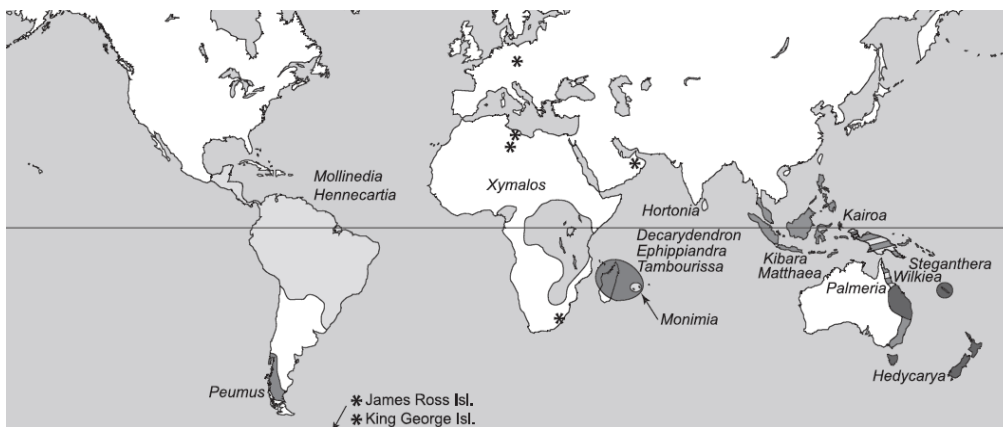


FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA MUNDIAL DA FAMÍLIA MONIMIACEAE
 FONTE: RENNER, 2010

No Brasil ocorrem cinco gêneros nativos e cerca de 40 espécies, distribuídas nos biomas Amazônia, Mata Atlântica, Caatinga, Cerrado e Pantanal, sendo o bioma Mata Atlântica que detém o maior número de táxons. Encontram-se representantes desta família em todas as regiões brasileiras: Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Roraima), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Pernambuco), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina), conforme FIGURA 2 (PEIXOTO; LIRIO, 2014).



FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA FAMÍLIA MONIMIACEAE NO BRASIL
 FONTE: REFLORA, 2014

Segundo Philipson (1998), *Siparuna* e *Mollinedia* são os maiores gêneros, tanto em complexidade quanto em número de espécies (150 e 94, respectivamente). O gênero *Siparuna* é reconhecido por muitos taxonomistas como pertencente à família Monimiaceae e citada sob essa classificação em inúmeros artigos, porém o sistema APG II (Grupo para a Filogenia das Angiospermas), de 2003, segregou o gênero *Siparuna* Aublet como sendo da família Siparunaceae (VALENTINE *et al.*, 2010).

A família Monimiaceae é composta de arbustos ou árvores, com folhas inteiras, opostas, anisofílicas, sem estípulas e em sua maioria aromáticas. Inflorescências e flores não vistosas, geralmente radiais, monoclamídeas, hermafroditas ou de sexos separados. Alguns gêneros apresentam as flores afundadas no receptáculo. Os números de tépalas variam de quatro a mais, livres ou soldadas. Estames também podem variar de um a muitos, livres entre si ou com dois apêndices na base, anteras abrem-se de diversas formas, inclusive por valvas. Carpelos em número variado, livres, soldados ao estilete ou mergulhados no receptáculo, apresentando apenas um óvulo, pêndulo ou basal. O fruto é apocárpico, com frutículos livres entre si ou mergulhados no receptáculo aumentado (JOLY, 1985).

A família é caracterizada pela presença de metabólitos secundários como: flavonoides, terpenoides, derivados do ácido cinâmico, óleos essenciais e alcaloides, sendo rica em alcaloides benzilisoquinolínicos, especialmente apomorfina e oxoapomorfina (SANTOS; PEIXOTO, 2001; LEITÃO *et al.*, 1999).

A seguir gêneros da família com maior expressão em estudos de caracterização fitoquímica e atividades biológicas.

- Gênero *Peumus* Molina

A única representante do gênero *Peumus* Molina é a espécie *Peumus boldus* Molina, conhecida como boldo do Chile. Uma espécie arbórea, nativa das regiões central e sul do Chile, que se destaca entre a família por seu uso medicinal popular e também é a mais mencionada em diversas farmacopeias pelo seu efeito anti-inflamatório e utilização no tratamento de transtornos hepáticos (RUIZ *et al.*, 2008; PEIXOTO; LIRIO, 2014). Os metabólitos secundários encontrados na espécie foram: alcaloides, taninos, óleo essencial, flavonoides e glicolipídios (SANTOS; PEIXOTO, 2001; RUIZ *et al.*, 2008; MARQUES *et al.*, 2009).

O óleo essencial da *P. boldus* apresentou também atividade antibacteriana contra *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* (VILA *et al.*, 1999) e antifúngica contra diversas espécies de *Candida* (LIMA *et al.*, 2006; SANTOS 2014). A presença de ascaridol na composição do óleo essencial confere a espécie uma significativa atividade anti-helmíntica. Diversos autores apontam o ascaridol como o principal componente do óleo essencial da *P. boldus* (VOGEL *et al.*, 1999); porém Vila *et al.* (1999) obtiveram um óleo contendo como componente majoritário o limoneno, enquanto ascaridol correspondeu a 1% do total de terpenóides (JOHNSON; CROTEAU, 1984).

A espécie é caracterizada pela presença de alcaloides benzilisoquinolínicos como boldina, isocordina, secoboldina e N-metillaurotetanina. A boldina é o principal alcaloide encontrado na espécie, representando cerca de 12 a 19% do conteúdo total de alcaloides e citada como principal componente responsável pelas atividades observadas na espécie (BASILA ; YUAN, 2005; RUIZ *et al.*, 2008). Os alcaloides boldina e secoboldina apresentaram atividade na inibição da agregação plaquetária *in vitro* em amostras de sangue humano e de coelhos (BASILA; YUAN, 2005), além de atividade anti-inflamatória (BACKHOUSE *et al.*, 1994). Outra atividade de destaque é a capacidade antioxidante *in vitro*, devido, principalmente, a presença do alcaloide boldina e do flavonoide catequina (YOUN *et al.*, 2002; QUEZADA *et al.*, 2004; FERNANDEZ *et al.*, 2009).

- Gênero *Hennecartia* J. Poiss.

Hennecartia J.Poiss. é um dos cinco gêneros neotropicais de Monimiaceae nativa do Brasil com ocorrência também no Paraguai e Argentina. *H. omphalandra* Poisson, a única espécie do gênero é popularmente conhecida como canemeira, pimenteira-do-mato, erva-mate-do-mato, gema-de-ovo, mata-olho-branco, cardo-santo, pimentão-do-mato, cangorosa-grande ou arreganha (PEIXOTO; LIRIO, 2014).

Marques *et al.*,2008; Marques *et al.*,2009, realizaram a identificação do óleo essencial de *H.omphalandra* a partir dos frutos e folhas. Nos frutos secos e identificou-se a presença de 33 sesquiterpenos, 13 monoterpênicos e um hidrocarboneto. O componente majoritário foi o sesquiterpeno biciclogermacreno (19,6%), seguido do β felandreno (8,7%). Outros sesquiterpenos também foram encontrados em proporções significativas como germacreno D (5,3%), α -bulneseno (5,1%) e valerianol (4,9%). Nas folhas desta mesma espécie, identificou-se a presença de 19 sesquiterpenos e 16 monoterpênicos. O constituinte químico majoritário foi o monoterpêneo β felandreno (24%), seguido do germacreno D (10,5%), sabineno (9,3%), biciclogermacreno (8,4%) e β -elemeno (5,3%).

H.omphalandra é considerada uma espécie tóxica pelo Centro de Investigação Toxicológica de Santa Catarina (CIT/SC), por ter causado grave intoxicação em crianças após a ingestão de sementes, no Estado do Paraná. Um fator que pode contribuir para a toxicidade desta espécie é presença de teores de felandreno superiores a 5% tanto nos frutos quanto nas folhas, visto que existem referências que a presença de teores de felandreno superiores a 5% pode causar ações cardíacas indesejáveis (MARQUES *et al.*, 2009).

- Gênero *Hortonia* Wight & Arn.

Hortonia Wight & Arn. é um gênero, da família Monimiaceae, endêmico do Sri Lanka, composta por três espécies: *H. angustifolia* Trimen, *H. floribunda* Wight ex Arn. e *H. ovalifolia* Wight (CARR *et al.*, 2012). Destas três espécies foram isoladas duas γ -lactonas α , β -insaturadas, caracterizadas como as substâncias responsáveis pela forte atividade larvicida sobre *Aedes aegypti*. Esta classe de compostos tem sido frequentemente isolada de Lauraceae e agora também em Monimiaceae, o que

corroborar com a proximidade filogenética destas duas famílias pertencentes à ordem Laurales (GARCEZ *et al.*, 2013).

- Gênero *Tambourissa* Sonn.

O gênero *Tambourissa* é um dos maiores da família Monimiaceae, composta por cerca de 40 espécies, encontrado em áreas tropicais e subtropicais do hemisfério sul. Investigações fitoquímicas com a fração volátil das cascas dos frutos da espécie *Tambourissa leptophylla* identificaram 27 terpenos não oxigenados e 10 terpenos oxigenados. O composto químico majoritário foi limoneno (24%), seguido por cis- α -bergamoteno (23,2%) e curcumeno (6%), além de outros compostos em menor quantidade. As cascas dos frutos de *T. leptophylla* foram submetidas a ensaios antifúngicos, apresentando leve atividade (GALLORI *et al.*, 2001). Das raízes de espécies desconhecidas de *Tambourissa* foi isolada uma nova lactona, tóxica, chamada tambouranolide (YODER *et al.*, 2007).

3.2 GÊNERO *Mollinedia* Ruiz & Pav.

O gênero *Mollinedia* compreende cerca de 70 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, que se estendem do México até a região sul do Brasil (MOREIRA; LEITÃO 2001). No Brasil está presente em todas as regiões, nos biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal. Segundo Philipson (1998), *Mollinedia* é o maior gênero da família Monimiaceae, tanto em complexidade quanto em número de espécies. Diversas espécies do gênero são endêmicas no Brasil como a *M. clavigera*, *M. marliae*, *M. gilgiana*, *M. brasiliensis*, *M. schottiana*, *M. glaziovii*, *M. salicifolia*. Outras são endêmicas da América Central como a *M. costaricensis* e da Colômbia como a *M. racemosa* (PEIXOTO; LIRIO, 2014).

Trata-se de um gênero caracterizado por arbustos muito ramificados ou pequenas árvores com troncos eretos que normalmente crescem perto de rios e córregos (NOVAES *et al.*, 2010; SCHERER *et al.*, 2011). O gênero *Mollinedia* apresenta semelhanças anatômicas e morfológicas com os gêneros *Macropeltis* e

Macrotorus, levando muitas vezes a identificação errada das espécies, geralmente classificadas como *Mollinedia* (COSTA *et al.*, 2010).

Algumas espécies do gênero *Mollinedia* fazem parte da dieta alimentar de aves, morcegos e macacos, contribuem na arborização e reflorestamento, além de apresentarem uso popular e serem vendidas em feiras livres. A *M. racemosa* é utilizada por comunidades indígenas colombianas para tratamento de gripes, como analgésica e para transtornos estomacais. As espécies *M. costaricensis*, *M. schottiana* e *M. brasiliensis* também são empregadas como estomáquicas e antiespasmódicas. A *M. schottiana* fornece uma madeira flexível, utilizada na fabricação de barris, bordas de peneiras e como fornecedora de lenha (DUQUE *et al.*, 2011; SANTOS; PEIXOTO, 2001; LEITÃO *et al.*, 1999; LOPEZ *et al.*, 1988). Os alcaloides benzilisoquinolínicos, fenilamidas, óleo essencial e esteroides são os metabólitos secundários mais encontrados no gênero *Mollinedia* Ruiz & Pav. (LOPEZ, 1998; CLAROS *et al.*, 2000; MOREIRA; LEITÃO 2001; MARQUES *et al.*, 2008; MURILLO *et al.*, 2011).

As espécies *M. gilgiana*, *M. schottiana*, *M. glaziovii* e *M. salicifolia*, tiveram a composição de seus óleos essenciais analisadas. Em todas as espécies foram relatadas a presença de óxido de cariofileno, sendo este o constituinte principal nas espécies *M. glaziovii*, e *M. salicifolia*. A presença de derivados do cariofileno representa importância ecológica, pois são repelentes naturais contra formigas cortadeiras. Outro componente presente no óleo das espécies estudadas foi o β -elemeno. Estudos com β -elemeno demonstram que esse composto apresenta atividade antineoplásica em diferentes tipos de câncer, como o câncer de pulmão, através da indução da apoptose celular (MARQUES *et al.*, 2008).

Moreira e Leitão (2001) analisaram os caules de cinco espécies de *Mollinedia* (*M. schottiana*, *M. gilgiana*, *M. glaziovii*, *M. marliae* e *M. salicifolia*) com o emprego de CLAE. Nessas espécies foi encontrado o alcaloide Liriodenina e a fenilamida Moupinamida. As concentrações dos componentes encontrados variaram de acordo com a espécie analisada e conforme sua fase biológica: estéril, com frutificação ou florescência. A Moupinamida foi detectada em quantidades muito pequenas nas plantas coletadas em sua fase biológica estéril e foi também detectado em pequenas concentrações em *M. glaziovii* com frutificação. Por outro lado, foi detectada em quantidades elevadas nas plantas com florificações. A concentração de Liriodenina aumentou de acordo com a fenofase da planta, sendo

menor em plantas estéreis, aumentando em plantas com flores e atingindo o seu máximo na planta com frutificação. A espécie *M. schottiana* apresentou os maiores níveis combinados de Liriodenina e Moupinamida, sendo considerada a fonte adequada de tais componentes.

A Liriodenina é um alcaloide bensilisoquinolínico aporfínico, que apresenta atividade citotóxica contra células tumorais do tipo KB, de pulmão e de cólon de útero (CHEN *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2012; SIQUEIRA *et al.*, 1998). Outros estudos demonstram atividade antimicrobiana *in vitro* sobre bactérias gram positivas (SCHIFF *et al.*, 1996), atuação como antagonista de receptores muscarínicos (LIN *et al.*, 1994), efeito tóxico em *Artemia salina* (SIQUEIRA *et al.*, 1998) e a atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* do referido alcaloide (JAVAÉ, 2014).

Outro alcaloide encontrado no gênero foi a Mollinedina, isolado das raízes da espécie *Mollinedia costaricensis*, enquanto das folhas foi isolado o flavonoide vitexina. Em testes farmacológicos a Mollinedina apresentou um possível efeito antiarrítmico, já em testes microbiológicos não apresentou atividade inibitória *in vitro* sobre bactérias padrão (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis*) e fungos (*Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans*) (LOPEZ, 1988).

Isolou-se das folhas de *Mollinedia marliae* uma nova α -lactona, marliolida. A presença dessa α -lactona foi descrito pela primeira vez na família Monimiaceae, mas já foi encontrada na família Lauraceae, também pertencente à ordem das Laurales. Nas folhas desta espécie identificou-se a mistura dos esteroides estigmasterol e sitosterol, assim como na espécie *M. gilgiana* (CLAROS *et al.*, 2000).

As folhas de *Mollinedia racemosa* (*M. lanciolata*) foram submetidas a estudos fitoquímicos e de atividade biológicas. Na análise do perfil fitoquímico do extrato etanólico das folhas observou-se a presença de compostos fenólicos como taninos, flavonoides e fenilpropanoides, alcaloides (bensilisoquinolínicos), óleos essenciais, triterpenos, esteroides e saponinas. Na análise do óleo essencial o componente majoritário foi a curzerenona (33,1%). Esse foi o primeiro estudo que descreveu a presença de curzerenona em uma espécie vegetal da família Monimiaceae, um composto reconhecido por sua ação anti-inflamatória. No ensaio de atividade anti-inflamatória *in vivo*, no modelo de edema auricular em ratos, a fração acetato de etila mostrou um efeito moderado sobre marcadores enzimáticos

da resposta anti-inflamatória. A espécie apresentou atividade antioxidante *in vitro* nos ensaios de DPPH, ABTS e peroxidação lipídica, ação esta atribuída a presença de compostos fenólicos. As cepas de *Salmonella tify* e *Candida albicans* mostraram-se sensíveis a extrato de *M. racemosa* no método de difusão em ágar e o extrato hexânico da espécie demonstrou-se ativo na avaliação de toxicidade com *Artemia salina* (MURILLO *et al.*, 2011; DUQUE *et al.*, 2011; SANCHEZ-PERALTA *et al.*, 2014).

3.3 ESPÉCIE *Mollinedia clavigera* Tul.

A espécie *Mollinedia clavigera* Tul. (FIGURA 3 e 4) popularmente conhecida com Pimenteira, Capixim-pimenteira ou Capixim, é um arbusto com cerca de 3 metros de altura, apresenta folhas inteiras, dentadas e opostas e frutifica no mês de março (FLORA DIGITAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2013).

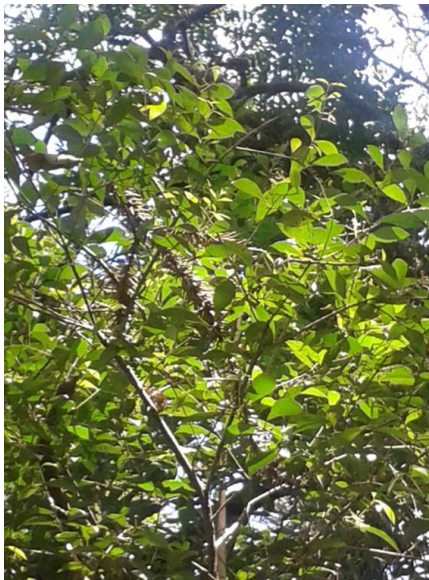


FIGURA 3 - *Mollinedia clavigera* Tul.
FONTE: A autora (2013)



FIGURA 4 - FRUTOS DE *Mollinedia clavigera* Tul.
FONTE: A autora (2013)

Trata-se de uma espécie nativa e endêmica no Brasil. Seu domínio fitogeográfico é a Floresta Atlântica, nas regiões sudeste (Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais) e sul (Santa Catarina e Paraná), como mostra a FIGURA 5.



FIGURA 5 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE *M. clavigera* Tul.
FONTE: REFLORA, 2013

A taxonomia da espécie *Mollinedia clavigera* (APGIII, 2009) está descrita no Quadro 1.

HIERARQUIA	TAXONOMIA
CLASSE	Equisetopsida
SUBCLASSE	Magnoliidae
SUPERORDEM	Magnolianaes
ORDEM	Laurales
FAMÍLIA	Monimiaceae
GÊNERO	<i>Mollinedia</i>
ESPÉCIE	<i>Mollinedia clavigera</i> Tul.

QUADRO 1 - TAXONOMIA DA ESPÉCIE *Mollinedia clavigera* Tul.
FONTE: TRÓPICOS, 2014

Frente à escassez de informações atribuídas ao gênero *Mollinedia* e principalmente à espécie *M. clavigera*, torna-se clara a importância do enriquecimento de estudos existentes, produzindo um compilado de dados sobre *M.*

clavigera além dos levantamentos botânicos já realizados. O presente trabalho contribui com a caracterização fitoquímica e delineamento de possíveis atividades biológicas da espécie.

3.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

Simões e Spitzer (2010) citam que os óleos essenciais são definidos pela International Standard Organization (ISO) como os “produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste de vapor d’água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos (Rutaceae)”. Usualmente denominados de óleos etéreos (por sua solubilidade em solventes orgânicos polares) ou essências (por seu aroma normalmente agradável), diferem dos óleos fixos (misturas lipídicas obtidas geralmente de sementes) devido a sua volatilidade, sua principal característica. Os óleos essenciais podem conter mais de 60 compostos diferentes nas mais variadas concentrações (BAKKALI *et al.*, 2008).

Metabólitos vegetais secundários, os óleos essenciais, são produzidos pelas plantas por outras necessidades além da nutrição, como atração ou repelência de insetos e ação alelopática. A sua produção está integrada à fisiologia de toda a planta, por isso sua composição e quantidade dependem de enzimas específicas e do estágio de desenvolvimento do vegetal. Além disso, sofrem influência do ambiente como a salinidade do solo, umidade e temperatura, variando sua produção e composição conforme o local de coleta e a sazonalidade (SOUZA *et al.*, 2007; FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

Encontrados em diversas espécies vegetais, nas flores (rosas), folhas (eucalipto), cascas (canela), rizomas (gengibre) e frutos (laranja). Apresentam larga aplicação em perfumaria, cosmética, alimentos e como coadjuvantes em medicamentos. Substâncias purificadas como o limoneno, citral, citronela, eugenol, mentol e safrol são amplamente utilizadas como aromas, fixadores, fragrâncias e em composições farmacêuticas (BIZZO *et al.*, 2009).

No Brasil, as primeiras pesquisas com óleos essenciais foram realizadas pelo farmacêutico Theodor Peckolt, que aqui chegou em 1847. Estudou e publicou cerca

de 170 trabalhos sobre a flora brasileira, incluindo dados sobre os rendimentos e as composições de diversos óleos essenciais (BIZZO *et al*,2009).

O termo óleo essencial foi introduzido, durante a Renascença, por Paracelso e este designava “a alma da planta”, a quintessência para a cura. Anterior a este período, em 753 a.C., Roma após invadir terras como o Egito, disseminou o uso de plantas aromáticas em banhos, época esta onde Roma chegou a ter mais de mil casas de banho (SILVA, 1198).

As propriedades farmacológicas atribuídas aos óleos essenciais são diversas e apresentam vantagens importantes, como a sua volatilidade, que os torna ideal para uso em nebulizações, banhos de imersão ou simplesmente em inalações. A volatilidade e o baixo peso molecular de seus componentes possibilitam sua rápida eliminação do organismo através das vias metabólicas (BANDONI; CZEPAK, 2008).

A extração de óleos essenciais pode ser realizada por inúmeras técnicas e suas propriedades dependem do tipo de metodologia aplicada, sendo as mais utilizadas: Enfloração, arraste por vapor d’água, extração com solventes orgânicos, prensagem ou expressão e extração por CO₂ supercrítico (SIMÕES; SPITZER, 2010).

Os constituintes químicos dos óleos essenciais podem ser divididos em duas classes que diferem na sua origem biossintética: a aromática, constituída pelos fenilpropanóides e a terpênica. Os fenilpropanóides são compostos que apresentam uma cadeia lateral de três átomos de carbono derivados de aminoácidos aromáticos (fenilalanina), oriundos da via do ácido chiquímico. Os compostos terpenóides são sintetizados pela condensação de unidades pentacarbonadas, o difosfato de isopentenila (IPP) e seu isômero difosfato de dimetilalila (DMAPP).

A formação do IPP pode ocorrer por duas vias biossintéticas (FIGURA 6): a via clássica ou via do mevalonato (MVA), responsável pela formação dos sesquiterpenos e triterpenos, cujos precursores são piruvato e acetilcoenzima A; e a via alternativa ou via do metileritritol fosfato (MEP), que origina os monoterpenos, diterpenos e tetraterpenos. A união de uma molécula de IPP a uma molécula de DMAPP forma o difosfato de geranila (GPP), precursor dos monoterpenos (C₁₀). À medida que são adicionadas unidades de IPP, formam-se o difosfato de farnesila (FPP), precursor dos sesquiterpenos (C₁₅) e o difosfato de geranil geranila (GGPP), precursor dos diterpenos (C₂₀). Estas estruturas são posteriormente modificadas por enzimas (hidroxilases, desidrogenases, redutases e glicosil, metil e acil transferases),

que juntas originam compostos diferentes e dão origem aos óleos essenciais, terebentinas e resinas. Os triterpenos (C30) são formados pela junção de duas unidades FPP e os tetraterpenos (C40) pela junção de duas unidades GGPP (OWEN; PEÑUELAS, 2005; AHARONI *et al.*, 2006).

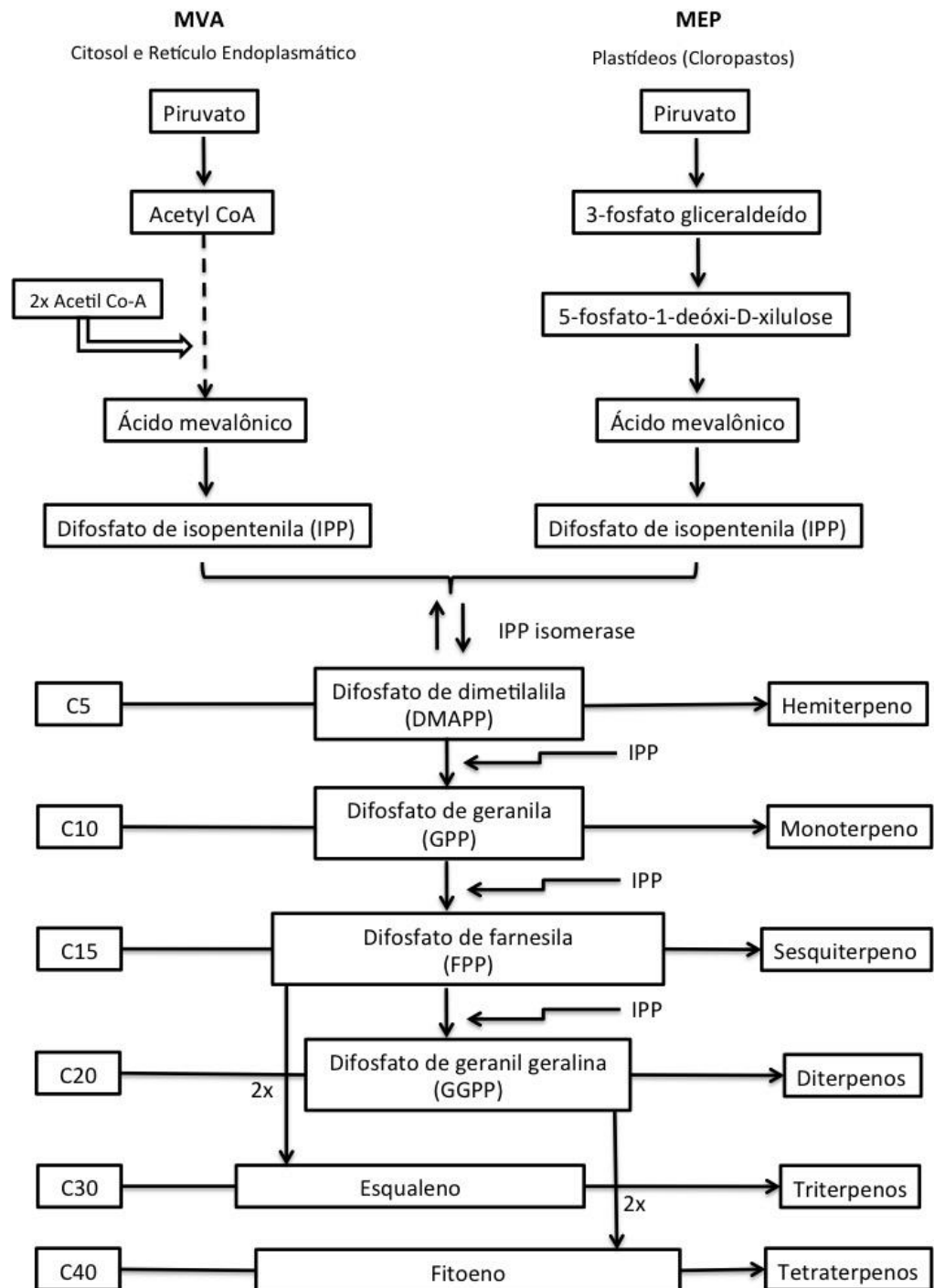


FIGURA 6 - BIOSÍNTESE DE COMPOSTOS TERPÊNICOS: VIA CLÁSSICA (MVA) E VIA ALTERNATIVA (MEP)
 FONTE: AHARONI *et al.*, 2006

A cromatografia gasosa é o método de análise indicado para determinações qualitativas e quantitativas dos óleos essenciais, por separar e quantificar os seus componentes. É um método simples que atualmente emprega colunas capilares, permitindo a análise de misturas com centenas de componentes, possibilitando também a detecção de possíveis fraudes. Por ser volátil, a amostra é solubilizada em solventes de baixa polaridade, como o hexano, e então injetada no cromatógrafo. A identificação dos compostos é realizada através da comparação do tempo de retenção relativo das amostras com os padrões. Associada a um espectrômetro de massas, permite obter informações completas em relação ao peso molecular e fragmentações dos constituintes, com maior segurança na identificação dos picos individuais e no controle da pureza de um pico cromatográfico (BRUNETON, 1991; SIMÕES; SPITZER, 2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

O material botânico de *Mollinedia clavigera* Tul. (folhas e caules) foi coletado no Campus Botânico da Universidade Federal do Paraná (FIGURA 7), na cidade de Curitiba, Paraná, sob as coordenadas geográficas 25°26'52"S 49°14'21"W, nos meses de Maio e Junho de 2013.



FIGURA 7 - LOCAL DA COLETA DA ESPÉCIE *Mollinedia Clavigera* Tul.
FONTE: GOOGLE MAPS, 2015

A identificação botânica foi realizada no Museu Botânico Municipal (MBM) de Curitiba pelo curador Osmar dos Santos Ribas por comparação com as exsicatas já existentes, onde foi depositada a exsicata sob o registro MBM 384847 (FIGURA 8).

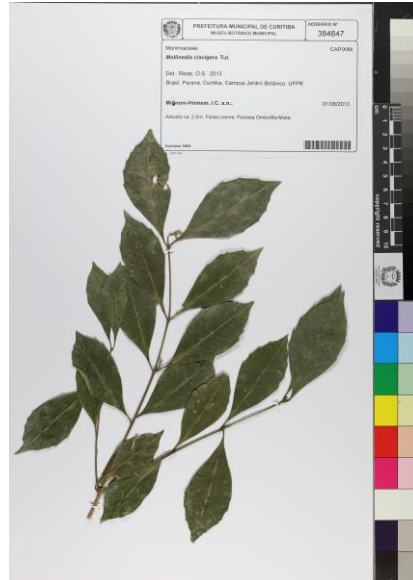


FIGURA 8 - EXSICATA DE *M. clavigera* DEPOSITADA NO MBM DE CURITIBA SOB O REGISTRO MBM 384847

FONTE: MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL DE CURITIBA (2015)

4.2 TRATAMENTO DO MATERIAL BOTÂNICO

O material vegetal (folhas e caules) foi seco e estabilizado em estufa (35°C) com circulação de ar ao longo de 24 horas. Separando as folhas dos caules, os materiais foram triturados em moinho de facas e martelos (marca TRAPP), para aumentar a superfície de contato do material com o solvente no momento da extração. Para a extração do óleo essencial foram coletadas folhas, estas secas à sombra em temperatura ambiente e trituradas manualmente. Os três materiais vegetais resultantes foram pesados e armazenados em local fresco, de baixa umidade e ao abrigo da luz.

4.3 ENSAIOS FÍSICO QUÍMICOS

A fim de estabelecer parâmetros mínimos de qualidade para o material vegetal, foram realizadas determinações de teor de cinzas totais e perda por dessecação (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

4.3.1 Cinzas totais

O teor de cinzas totais é um parâmetro físico-químico que estabelece a quantidade de substâncias inorgânicas não voláteis presentes na amostra. Esse parâmetro é utilizado pela indústria farmacêutica no controle de qualidade da matéria-prima utilizada na produção de fitoterápicos, tendo como finalidade detectar possíveis adulterações do material.

Para a determinação do teor de cinzas totais foi adotado o método gravimétrico descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010).

Os cadinhos de porcelana foram previamente calcinados em mufla a 600°C por 30 minutos e resfriados em dessecador. Pesou-se em cada cadinho tarado 1 g do material vegetal, sendo em seguida incinerado em mufla a 600°C por duas horas e posteriormente resfriado em dessecador.

Após resfriamento foi realizada a pesagem do resíduo. A análise foi feita em triplicata e o resultado foi calculado em porcentagem de cinzas em relação ao material vegetal seco a temperatura ambiente, através do seguinte cálculo (1):

$$\% \text{ de cinzas} = \frac{P_2 - P_1}{P_3} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

P_1 = Peso do cadinho após a calcinação e esfriamento (cadinho tarado);

P_2 = Peso do cadinho com amostra após a calcinação e esfriamento em dessecador;

P_3 = Peso da amostra inicial.

4.3.2 Perda por dessecação

Na determinação da perda por dessecação verifica-se se a secagem do material foi eficiente. A presença de umidade pode causar ação de enzimas que causam degradação de constituintes químicos além da contaminação microbiana do material (FARIAS, 2010).

Para a realização do ensaio pesou-se 1 g de material vegetal de folha e caule em cadinhos de porcelana, previamente dessecados e tarados, e colocou-se em estufa a 100°C, por um período de 3 horas, até a obtenção de peso constante. Retirou-se os cadinhos com as amostras da estufa e colocou-se em dessecador para resfriar. Após este processo pesou-se a amostra e aplicou-se a fórmula a seguir (2). O resultado foi dado pela porcentagem de água em relação ao material vegetal seco. A análise foi realizada em triplicata.

$$\% \text{ de umidade} = \frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

P_a = Peso da amostra;

P_u = Peso do cadinho contendo a amostra antes da dessecação;

P_s = Peso do cadinho contendo a amostra após a dessecação.

4.4 ENSAIO SISTEMÁTICO FITOQUÍMICO

O ensaio sistemático fitoquímico consiste na realização de reações de coloração e/ou precipitação para verificar qualitativamente a presença ou ausência de determinados metabólitos secundários na espécie vegetal.

Os ensaios foram realizados segundo Moreira (1979), contando com algumas modificações.

4.4.1 Metabólitos solúveis em álcool

Os extratos hidroetanólicos (20% p/v) de folhas e caules de *M. clavigera* foram obtidos por maceração. Separadamente, 40 g dos materiais vegetais

previamente secos e triturados e 200 mL de álcool etílico 70% (v/v) foram aquecidos em banho-maria (70°C) por 1 hora. Os extratos foram filtrados com papel de filtro e completou-se o volume para 200 mL com álcool etílico 70%, obtendo-se assim, dois extratos hidroetanólicos, destinados apenas a este ensaio.

4.4.1.1 Pesquisa de alcaloides

Os alcaloides são compostos de caráter básico e sua solubilidade em diferentes reagentes, modifica em função do pH. Os alcaloides na forma básica são solúveis em solventes orgânicos e insolúveis em solventes aquosos; na forma de sal, são solúveis em solventes aquosos e insolúveis em solventes orgânicos.

Esta pesquisa fundamenta-se na capacidade que os alcaloides possuem, em estado de sal, de combinar-se ao iodo e metais pesados como bismuto, mercúrio e tungstênio e formarem precipitados.

A pesquisa qualitativa de alcaloides foi realizada utilizando os reativos gerais para alcaloides: Reativo de Mayer (mercúrio tetraiodeto de potássio); Reativo de Dragendorff (tetraiodo bismuto de potássio), Reativo de Bouchardat e Reativo de Bertrand (ácido sílico tungstico).

Evaporou-se 50 mL dos extratos em banho-maria a 50°C. Em seguida, dissolveu-se o resíduo em 1 mL de etanol e acrescentou-se 20 mL de HCl 1%. Para cada amostra foi preparado cinco tubos de ensaio, cada um com 1 mL do respectivo extrato clorídrico, e então adicionou-se duas gotas do reativo.

Considerou-se positiva a presença de alcaloides na amostra com as seguintes visualizações para os reativos:

- Mayer: formação de precipitado branco ou leve turvação branca;
- Dragendorff: formação de precipitado de coloração tijolo;
- Bouchardat: formação de precipitado de coloração alaranjada;
- Bertrand: formação de precipitado branco ou leve turvação branca.

4.4.1.2 Pesquisa de leucoantocianidinas

As leucoantocianidinas são consideradas flavonoides monoméricos 3,4-dióis ou raramente 4-óis. Esta pesquisa explica-se com a reação de redução da leucoantocianidina (coloração amarela) em antocianidina (coloração vermelha) em presença de HCl.

Para a realização deste teste, utilizou-se 10 mL dos extratos levados a secura, em cápsula de porcelana. Os resíduos foram ressuspensos em 5 mL de álcool etílico e adicionou-se cinco gotas de HCl concentrado, sob aquecimento até ebulição. A reação é positiva quando há desenvolvimento de coloração vermelha.

4.4.1.3 Pesquisa de heterosídeo flavônico

Esta pesquisa baseia-se na modificação da estrutura do flavonoide em presença de ácido.

Utilizou-se 20 mL dos extratos levados à secura em cápsula de porcelana. O material foi ressuspensado em 10 mL de etanol. Transferiu-se 5 mL desta solução para o tubo de ensaio onde foi adicionado 200 mg de limalha de magnésio e HCl fumegante, lentamente, com ocorrência de reação exotérmica.

A reação positiva desenvolve coloração conforme as estruturas químicas presentes: flavona com coloração amarelo a vermelho; flavonol e dihidroflavonol com coloração vermelho a vermelho sangue; flavononas com coloração vermelho a violeta; derivados antociânicos com coloração vermelho tornando-se rosa e chalconas, auronas, dihidrochalconas, isoflavonas e isoflavononas não apresentam coloração.

4.4.1.3.1 Teste do Oxálico Bórico ou Reação de Taubock

Utilizou-se 10 mL dos extratos levados à secura em cápsula de porcelana. Ao resíduo adicionou-se cinco gotas de acetona e 30 mg da mistura de ácido bórico e ácido oxálico (1:1) sendo levado novamente à secura. Os resíduos foram ressuspensos com 5 mL de éter etílico. A visualização é realizada em ultravioleta, a presença de fluorescência amarela esverdeada indica reação positiva. Em geral, os flavonóis apresentam fluorescência amarelo esverdeada, enquanto as flavanonas e isoflavanonas não apresentam esta propriedade; antocianícos apresentam cor, mas não produzem fluorescência.

4.4.1.3.2 Ensaio de Pacheco

Neste ensaio 10 mL dos extratos foram levados a secura em cápsula de porcelana. Os resíduos foram aquecidos em bico de Bunsen com cristais de acetato de sódio e 0,1 mL de anidrido acético. Em seguida adicionou-se 0,1 mL de HCl fumegante. O desenvolvimento de coloração roxa indica resultado positivo para dihidroflavonois.

4.4.1.3.3 Ensaio com Zinco em ácido clorídrico

Utilizou-se 10 mL dos extratos levados a secura em cápsula de porcelana. O material foi ressuspensado em 10 mL de etanol. Transferiu-se então para tubo de ensaio com pastilha de zinco e adicionou-se lentamente HCl fumegante. A produção de coloração violeta indica presença de dihidroflavonóis. Flavononas e flavonóis não produzem coloração.

4.4.1.4 Pesquisa de cumarinas

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

Comparações efetuadas entre a forma *cis* e *trans* do ânion cumarínico demonstraram que apenas na forma *trans* o hidrogênio do grupo fenólico está localizado para possibilitar sua quelação (anel de seis membros), visto que, a insaturação não é bloqueada pelo grupo carboxila, havendo possibilidade da ligação quelato relacionar-se com a fluorescência. O foto efeito também aparece em soluções alcalinas dos derivados cumarínicos que não possuem hidroxila livre ligada ao grupo benzênico, havendo relação entre os substituintes e o grau de fluorescência. Derivados cumarínicos com grupos hidroxilas livres ligados ao anel benzênico apresentam fluorescência azul intensa no estado sólido e em soluções alcalinas. Em soluções alcalinas não ocorre foto efeito, dificultando o estabelecimento de um teste específico para hidroxí-cumarinas, visto que a observação de qualquer fluorescência produzida por irradiação é de difícil visualização, já que estes compostos possuem fluorescência própria.

Para a pesquisa de cumarinas concentrou-se 30 mL dos extratos acidificados a pH 1,0 com adição de HCl 2N até 5 mL. Os extratos foram resfriados e transferidos para um funil de separação para extração com éter etílico (2 x 10 mL). Essa frações foram reunidas e concentradas em banho-maria até 5 mL. Destas frações, transferiu-se 3 mL para um tubo de ensaio e adicionou-se 2 mL de NaOH 2N. Submeteu-se os tubos à luz ultravioleta em 366nm durante 15 minutos. A reação é positiva pela observação de fluorescência azul ou verde amarelada.

4.4.1.5 Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos

Naftoquinonas e antraquinonas são polifenóis que em solução alcalina formam fenolatos hidrossolúveis com coloração rósea, devido ionização das hidroxilas fenólicas.

Em balões de fundo chato adicionou-se 30 mL dos extratos e 5 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico a 10%. A mistura foi levada a refluxo por uma hora e posteriormente filtrada, adicionando-se, em seguida, 30 mL de água destilada e transferida para um funil de separação, para 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_4OH (Reação de Borntraeger). A reação é considerada positiva com observação de coloração vermelha.

4.4.1.6 Pesquisa de esteroides e triterpenos

A quantidade de 10 mL de extrato foi evaporada à secura e os resíduos redissolvidos em 5 mL de clorofórmio e filtrados em algodão. Pipetou-se 0,1; 0,5 e 1,0mL do extrato para três tubos de ensaio e o volume completado para 2 mL com clorofórmio.

– Reação de Liberman-Bouchard

Para essa reação adicionou-se aos tubos de ensaio 1 mL de anidrido acético e lentamente 2 mL de H_2SO_4 concentrado.

A coloração indica:

- Rósea ou azul: presença de função carbonila na posição 3 e duplo enlace nas posições 5 e 6 ou 7 e 8;
- Verde: função hidroxila em 3 e dupla ligação entre 5 e 6 ou 7 e 8;
- Amarela: grupamento metila no carbono 14.

- Reação de Keller Kelliani

Levou-se 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 tubo de ensaio contendo 2 mL de H₂SO₄.

O desenvolvimento de coloração azul ou verde na zona de contato entre as duas fases indica a presença de desoxiaçúcares, sendo:

- Azul: esteroides;
- Verde: triterpenos.

4.4.2 Metabólitos solúveis em água

Os extratos aquosos (20% p/v) de folhas e caules de *M. clavigera* foram obtidos por maceração. Separadamente, 40 g dos materiais vegetais previamente secos e triturados e 200 mL de água (v/v) foram aquecidos em banho-maria (70°C) por 1 hora. Os extratos foram filtrados com papel de filtro e completou-se o volume para 200 mL com água, obtendo-se assim, dois extratos aquosos, destinados apenas a este ensaio.

4.4.2.1 Pesquisa de heterosídeos antociânicos

As antocianinas são pigmentos hidrossolúveis presentes nas plantas, com colorações que modificam de acordo com o pH. Com ácidos, as antocianinas reagem formando sais de oxônio corados de vermelho e com bases reagem com hidroxilas fenólicas livres e adquirem coloração azul devido à estrutura quinóide.

Separou-se 3 tubos de ensaio contendo 5 mL dos extratos cada um. Adicionou-se então:

- No primeiro HCl 1% até pH 4: a presença de tons avermelhados indica reação positiva;

- No segundo NaOH até pH 10: a presença de tons azulados indica reação positiva;
- O terceiro foi neutralizado a pH 7: o aparecimento de tons violáceos indica reação positiva;
- Depois 10 mL dos extratos foram extraídos com álcool butílico em funil de separação por duas vezes. Reuniram-se as duas frações obtidas em uma cápsula de porcelana e concentrou-se até 5 mL. À fração foram adicionadas cinco gotas de HCl concentrado com posterior aquecimento até ebulição. O desenvolvimento de coloração vermelha indica a presença de antocianidinas.

4.4.2.1 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

As saponinas apresentam caráter anfótero, reduzindo a tensão superficial dos compostos em solução aquosa, com conseqüente formação de espuma mediante agitação.

Para esse teste utilizou-se três tubos de ensaio com a mesma quantidade dos extratos, agitou-se energeticamente por cinco minutos medindo em seguida a espuma formada. Após repouso de trinta minutos, a presença de saponinas é confirmada pela formação de espuma persistente com altura superior a 1 cm.

4.4.2.2 Pesquisa de heterosídeos cianogênicos

O ensaio fundamenta-se no ácido pícrico na presença de HCN, liberado da amostra ácida, formando isopurpurato alcalino, de coloração avermelhada.

Em um tubo de ensaio adicionou-se 5 mL dos extratos, de modo a não umedecer as paredes do tubo, e 1 ml de H₂SO₄ 10% ou 1N. Suspendeu-se uma tira de papel picro-sódico, com o auxílio de uma rolha de cortiça, mantendo em banho-maria a 60°C por 30 minutos. O resultado positivo para heterosídeos cianogênicos é observado pelo desenvolvimento de coloração marrom a vermelho no papel picro-sódico.

4.4.2.3 Pesquisa de taninos

Os taninos são divididos em duas classes considerando os núcleos fenólicos existentes e a união destes:

- Taninos hidrolisáveis: apresentam ácido gálico ou ácido hexaidroxidifênico com seus derivados esterificados com glicose. Estes ésteres são facilmente hidrolisados em ácidos fenólicos e açúcar.
 - Taninos condensados: contêm núcleos fenólicos que muitas vezes estão ligados a carboidratos ou a proteínas (ROBBERS *et al.*,1997).
- a) Reação com cloreto férrico 1%: A 5 mL dos extratos foram adicionadas cinco gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1 %. O desenvolvimento de coloração verde a azul, cinza, marrom ou formação de precipitado indicam a presença de taninos.
 - b) Reação com sulfato de ferro amoniacal 1%: A 5 mL dos extratos foram adicionadas duas gotas de solução aquosa de sulfato de ferro amoniacal a 1%. O desenvolvimento de coloração de verde a azul indica a presença de taninos.
 - c) Reação com acetato de chumbo 10%: A 5 mL dos extratos foram adicionados 5 mL de ácido acético a 10 % e 5 mL de solução aquosa de acetato de chumbo a 10 %, gota a gota. A formação de precipitado indica a presença de taninos.
 - d) Precipitação com solução de gelatina a 2,5 % em cloreto de sódio a 0,9%: Os extratos foram transferido para tubos de ensaio em frações de 0,5 mL, 1 mL e 2 mL. A cada tubo foram adicionados 2 mL da solução de gelatina a 2,5 %. A formação de precipitado nesta fase indica a presença de taninos.
 - e) Reação com formol-clorídrico: Transferiu-se 30 mL dos extratos para um balão de fundo chato acrescido de 6 mL de formaldeído 40% e 4 mL de ácido clorídrico 37%. Essa mistura foi aquecida em refluxo por uma hora, resfriada e posteriormente filtrada. A pesquisa de taninos condensados foi realizada através da lavagem do resíduo do papel de filtro com solução de álcool 50% e posterior adição gotas de KOH a 5%. A reação positiva é verificada pela presença de coloração verde. A pesquisa de taninos hidrolisáveis foi realizada através da adição de acetato de sódio e gotas de solução aquosa de cloreto

férrico 1% ao filtrado. A reação positiva é verificada pela presença de coloração azul.

4.5 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS E FRAÇÕES

4.5.1 Extratos brutos etanólicos

Os materiais vegetais (folhas e caules) foram submetido à extração com etanol (96°GL) em refluxo contínuo por 6 horas, a 50°C, em aparelho de Soxhlet. Terminada a extração, os materiais foram filtrados a vácuo em funil de Büchner e concentrados em evaporador rotatório e posteriormente levados a banho-maria a 70°C, obtendo-se assim o extrato bruto etanólico das folhas e o extrato bruto etanólico dos caules de *M. clavigera*.

Após a obtenção dos extratos determinou-se o teor de sólidos das folhas e caules, baseado na eliminação total da fase líquida por secagem do material proveniente da extração dos componentes solúveis. Para esta determinação, depositou-se 1 mL dos extratos brutos etanólicos em placa de Petri, previamente seca e tarada. Em seguida, foram levados à estufa a 100°C até peso constante. O resultado é apresentado em quantidade de sólidos em porcentagem em relação ao material vegetal seco.

4.5.2 Particionamento dos extratos brutos etanólicos

Em Soxhlet modificado (CARVALHO *et al.*, 2009), foi realizado o particionamento (líquido-líquido) dos extratos brutos etanólicos com solventes em ordem crescente de polaridade. Os solventes utilizados para a partição foram: hexano, clorofórmio e acetato de etila.

As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotatório, pesadas e armazenadas em geladeira para posterior estudo, tendo sido nomeadas como fração

hexano, fração clorofórmio, fração acetato de etila e fração hidroalcoólica remanescente.

4.6 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROSCÓPICAS

4.6.1 Cromatografia em coluna (CC)

A cromatografia em coluna (CC) foi realizada em coluna de vidro, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 (0,063-0,2 mm Merck®).

As frações acetato de etila, hexano e clorofórmio das folhas de *M. clavigera* foram incorporadas a sílica-gel 60, formando a pastilha de sílica. A coluna foi empacotada com sílica-gel na proporção de cinco partes em relação à pastilha, sendo que as mesmas foram separadas por um papel de filtro, a fim de minimizar possíveis perturbações na coluna. A eluição da amostra foi realizada por meio de um sistema de passagem de solventes com gradientes de polaridades crescentes, na qual a concentração do solvente mais polar é iniciada em 95: 5 e decresce em 5 mL a cada 100 mL utilizados. As frações recolhidas foram coletadas em frascos de vidro de 15 mL e secas em temperatura ambiente pela evaporação do solvente.

4.6.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

O espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) foi obtido em espectrômetro BRUKER Avance DRX 200 para os núcleos de ^1H . Esse procedimento foi realizado no Centro de Ressonância Magnética Nuclear do departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

4.7 ENSAIOS DE TOXICIDADE

Para a avaliação de toxicidade das folhas e caules da espécie *M. clavigera* empregou-se duas metodologias: toxicidade aguda sobre *Artemia salina* e atividade hemolítica *in vitro*.

4.7.1 Ensaio de toxicidade aguda sobre *Artemia salina*

Artemia salina é um microcrustáceo da classe Anostraca (sem carapaça) que vive em águas salinas e salobras em todo o mundo, sendo utilizado na dieta de peixes e crustáceos. Possui 4 estádios de desenvolvimento: ovo, náuplio, metanáuplio e adulto (ASEM, 2008).

Trata-se de um ensaio preliminar rápido, de baixo custo, boa eficiência, requer pequena quantidade de amostra (2-20 mg) e não requer métodos assépticos, nem equipamentos especiais. Este ensaio avalia de maneira preliminar se as amostras apresentam propriedades biológicas interessantes para serem submetidas a bioensaios mais específicos. Este teste vem sendo utilizado na triagem de agentes antitumorais *in vivo* e pesticidas provenientes de espécies vegetais. Diversos estudos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia Salina* com atividades antifúngica, viruscida, antimicrobiana, tripanossomicida e parasiticida (SIQUEIRA *et al.*, 1998; GHISALBERTI, 2008).

Para os ensaios de toxicidade dos extratos brutos etanólicos, frações e óleo essencial de *Mollinedia clavigera* sobre *Artemia salina* foi utilizado o método descrito por Meyer *et al.* (1982) com adaptações de Petrobrás (1996).

Como meio de eclosão e cultivo dos náuplios utilizou-se solução salina preparada com 30 g de sal marinho em 1000 mL de água destilada, com pH ajustado entre 8,0 e 9,0 para evitar o risco de morte das larvas por diminuição do pH durante a incubação. Os cistos de *Artemia salina*, adquiridos em loja de aquários, foram colocados em funil de separação com solução salina para eclodir por 48 horas sob aeração contínua e ausência de luz.

As amostras nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL, dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) 1% em salina para melhor solubilização, foram testadas em quadruplicata. Após a eclosão dos ovos, 10 larvas de *Artemia salina* foram transferidas para eppendorfs contendo as amostras e os controles, sendo o volume completado para 1,5 mL. Os controles negativos foram constituídos de tubos com solução salina e o controle positivo com soluções de dodecil sulfato de sódio (SDS) em concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL. As amostras e controles foram incubadas em estufa (27-30°C) por 24 horas, após esse período foi realizada a contagem dos náuplios mortos com auxílio de lupa e iluminação incandescente.

Os dados foram analisados com o método estatístico Probitos e determinados os valores de DL₅₀ a 95% de intervalos de confiança.

4.7.2 Avaliação da atividade hemolítica *in vitro*

A hemólise é caracterizada pela lise ou ruptura das membranas das hemácias permitindo a liberação da hemoglobina para o plasma, tendo como consequência a hemoglobinemia. A hemoglobina livre no plasma pode promover lesão em órgãos vitais tais como rins, fígado e coração, sendo necessário dessa maneira a observação da referida atividade (BEDNARCZUK *et al.*, 2010). A avaliação da atividade hemolítica *in vitro* já foi empregada por diversos autores para a avaliação toxicológica de diferentes plantas (PEQUENO; SOTO-BLANCO, 2006).

Para o ensaio de atividade hemolítica *in vitro* foi utilizada a técnica proposta por Banerjee (2008) adaptada por Henneberg (2013).

Para esta avaliação foi utilizada uma solução de sangue de carneiro a 2% em PBS (tampão fosfato), para isso, 2 mL de sangue de carneiro (Newprov®) foram previamente homogeneizados, lavados com tampão fosfato gelado e centrifugados três vezes a 3000 rpm por 5 minutos .

Os extratos brutos etanólicos, frações e o óleo de *M. clavigera* foram testados em concentrações de 1 mg/L, 500 µg/mL, 250 µg/mL e 100 µg/mL em triplicata. Em eppendorfs colocou-se 200 µL das amostras diluídas em PBS mais 200 µL de solução de eritrócitos a 2%. Para obter o controle negativo (hemólise basal) as amostras foram substituídas por PBS e por água destilada para o controle

positivo (hemólise total). As amostras foram incubadas em estufa por 3 horas a temperatura de 37°C. Em seguida centrifugou-se os eppendorfs por 5 minutos a 3000 rpm.

Os sobrenadantes foram observados para verificação da ocorrência ou não da formação de hemólise total (solução límpida, vermelha e sem depósito de eritrócitos). Para a quantificação da hemólise, os sobrenadantes foram pipetados para uma placa de ELISA e a absorbância lida em 540 nm em equipamento Multiskan FC – Thermo Scientific. A hemólise foi calculada com base nos valores de absorbância do tubo de hemólise total, cujo valor é considerado 100%. A taxa de hemólise foi calculada da seguinte forma (3):

$$\text{Hemólise \%} = \frac{(\text{Absorbância Teste} - \text{Absorbância PBS} - \text{Absorbância Branco})}{(\text{Absorbância Água} - \text{Absorbância PBS} - \text{Absorbância Branco})} \times 100 \quad (4)$$

Os valores obtidos foram submetidos aos testes estatísticos de variância avaliada pelo teste ANOVA e para localizar as diferenças o teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.8 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *M.clavigera*

4.8.1 Extração do óleo essencial

Utilizou-se como método para a extração e obtenção do óleo essencial das folhas de *M. clavigera* a hidrodestilação por arraste de vapor d'água, realizado em aparato de Clevenger modificado (Farmacopeia Brasileira 5ª edição, 2010).

As folhas secas a temperatura ambiente (337,8 g) foram trituradas e acondicionadas em balão de fundo redondo de 3000 mL, adicionando-se quantidade suficiente de água destilada (5 a 10 vezes o seu peso) para cobrir o material e permitir o andamento da extração, sendo este então conectado ao equipamento e submetido a uma temperatura em torno de 100°C, com tempo de extração de 6 horas. Decorrido este tempo, anotou-se o volume de óleo obtido pela leitura no tubo com escala de graduação.

4.8.2 Rendimento do óleo essencial

O rendimento foi calculado em mililitros de óleo essencial por 100 g do vegetal (mL%), conforme preconiza a Farmacopeia Brasileira (2010).

4.8.3 Caracterização do óleo essencial

A caracterização dos óleos essenciais auxilia na identificação correta do material vegetal e na avaliação do controle de qualidade, evitando adulterações ou falsificações.

4.8.3.1 Características organolépticas

Para a determinação das características organolépticas do óleo essencial de *M. clavigera* foram analisados parâmetros como coloração e odor.

4.8.3.2 Determinação da densidade

Devido à ausência de picnômetro de capacidade adequada para a pequena quantidade de óleo obtido na extração, o ensaio de determinação da densidade foi realizado a partir da média aritmética das massas de alíquotas de 20 µL (volume constante) de óleo essencial de *M. clavigera*, em 10 repetições, à temperatura de 25°C. A razão entre a massa e o volume constante (aferidos em balança analítica e pipeta automática), das alíquotas de óleo essencial foi determinada aplicando a seguinte fórmula (3):

$$d = \frac{m}{v} \quad (3)$$

Onde:

d = densidade

m = massa do óleo essencial

v = volume do óleo essencial

4.8.3.3 Determinação da solubilidade em etanol

Seguindo metodologia da Pharmacopea Helvetica VII (1990), foi determinada a solubilidade do óleo essencial em etanol a 70%, 80%, 90% e em etanol absoluto. Para esta determinação, utilizou-se bureta de 50 mL, contendo, separadamente as concentrações de etanol a serem testadas e tubos de ensaio com 0,1 ml de óleo essencial. Os solventes foram liberados gota a gota lentamente, até completa solubilização da amostra. Pela leitura do volume de etanol gasto na bureta foi obtida a proporção de solubilidade do óleo frente às diferentes concentrações de álcool etílico.

4.8.3.4 Determinação do índice de refração $^{20}n_D$

O índice de refração foi determinado em função da luz de sódio no comprimento de onda 589,3 nm (raia D) a $20 \pm 0,5$ °C, em refratômetro Aus Jena, previamente calibrado, segundo a Farmacopeia Brasileira (2010).

4.8.4 Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM)

Uma alíquota do óleo essencial, após a extração, foi armazenada em frasco apropriado, devidamente refrigerado e reservado para análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massa (CG/EM). Executou-se a análise cromatográfica em aparelho Shimadzu® modelo GCMS-QP 2010S e programa operacional GCMS solution, realizada na Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI.

4.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA EM *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti*, inseto pertencente à família Culicidae, é hoje, o mosquito com maior dispersão em áreas urbanas em todo o mundo, sendo o vetor dos quatro sorotipos da dengue, além do vírus da febre amarela (SILVA *et al.*, 2004). Para combater esse vetor são utilizados produtos inseticidas, mas várias populações de *Aedes aegypti* tornaram-se resistentes aos mesmos (CARVALHO; SILVA, 2000). Alguns estudos apontam compostos de origem vegetal com atividade larvicida e potencial para uso no controle deste vetor, auxiliando no possível desenvolvimento de novos produtos inseticidas. (GUIMARÃES *et al.*, 2001; PARKI *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2003).

A atividade larvicida dos extratos brutos etanólicos, frações e óleo essencial de *Mollinedia clavigera* sobre *Aedes aegypti* foi realizada segundo metodologia do World Health Organization (1981a) com algumas modificações. Os ovos de *Aedes aegypti* da linhagem Rockefeller foram fornecidos pela Fundação Oswaldo Cruz - RJ. Os ovos foram eclodidos em Becker de plástico e adicionados 500 mL de água sem cloro, e em seguida levada para estufa BOD (marca Novatecnica modelo NT 704) com temperatura a 27 ± 2 °C e umidade relativa de $80 \pm 5\%$.

As larvas foram alimentadas com ração de peixe (aldon basic, MEP 200 complex) do período de eclosão até o 3º estágio larval (48 horas de vida). Optou-se por utilizar larvas no 3º estágio de desenvolvimento, pois estas apresentam tecidos mais desenvolvidos. Evita-se utilizar larvas de 4º estágio, pois as mesmas podem virar pupa e evoluir para mosquito rapidamente, enquanto as larvas em 1º e 2º estágios são imaturas anatomicamente, com sistema vascular pouco desenvolvido, tornando-se sensíveis em demasia para avaliações de toxicidade.

Preparou-se soluções de concentração de 1.000 µg/mL das amostras, solubilizadas em DMSO 0,5% e diluídas com água sem cloro em concentrações de 1.000, 100 e 10 µg/mL para os testes. As amostras foram colocadas em copos de plástico contendo 10 larvas no 3º estágio e o volume foi completado para 5 mL com água sem cloro. O ensaio foi realizado em triplicata. Como controle negativo foi utilizado solução aquosa de DMSO 0,5 %. Como controle positivo foi utilizado o inseticida, organofosforado, temefós grau técnico 90% (lote 005/2011) fabricado por laboratórios "Fersol Mairinque, em concentração de 0,060 mg.mL (duas vezes a concentração letal que causa mortalidade de 99% de uma cepa susceptível), como definido pela World Health Organization (1981 a,b).

A atividade larvicida foi avaliada após 24 horas por meio da contagem do número de larvas mortas em cada amostra. Os dados foram analisados com o método estatístico Probitos e determinados os valores de DL₅₀ a 95% de intervalos de confiança.

4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O aumento da resistência aos antimicrobianos por diversos patógenos aumenta a cada dia, tornando-se de grande importância à pesquisa de novas substâncias para o combate de infecções. A obtenção de substâncias a partir de espécies vegetais que apresentem atividade antimicrobiana e baixa toxicidade pode vir a ser uma alternativa viável, de baixo custo e de fácil acesso pelas comunidades (COSTA *et al*; 2008).

A avaliação da atividade antimicrobiana das folhas e caules de *M. clavigera* foi realizada segundo duas metodologias: Difusão em ágar e microdiluição em caldo.

As amostras (extratos brutos etanólicos, frações e óleo essencial) foram testadas em relação à culturas de micro-organismos de duas bactérias gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), duas bactérias gram positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) *Staphylococcus epidermidis* (ATCC12228) e um fungo leveduriforme: *Candida albicans* (ATCC 10231).

4.10.1 Método da difusão em disco

O método de avaliação antimicrobiano de difusão em ágar utilizando discos de filtro de papel impregnados com as amostras foi realizado conforme metodologia descrita por Bauer *et al.* (1966), com adaptações. As amostras de *M. clavigera* foram testadas em concentração de 1000 µg.

Com o auxílio de uma alça de repique, colônias isoladas do micro-organismo teste foram transferidas para um tubo de solução salina a 0,45%. Após homogeneização as suspensões dos micro-organismos testes foram ajustadas para 10^8 células/mL, compatível com a escala 0,5 de McFarland. Com auxílio de swab estéril os inóculos microbianos foram espalhados sobre a superfície de ágar Müeller Hinton, quando bactérias, e ágar Sabouraud, quando levedura, em placa de Petri.

Os discos de filtro de papel foram impregnados com 10 µL das amostras e deixados secar a temperatura ambiente. Com o auxílio de uma pinça estéril foram colocados sobre as placas inoculadas com os micro-organismos. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica à 25°C por 48 horas, quando leveduras e a 35°C por 24 horas quando bactérias. Todo procedimento foi realizado dentro de câmara de fluxo laminar com material esterilizado em autoclave a 120°C por 15 minutos. As amostras padrões dos controles positivos, fungicida Cetoconazol (50 µg/disco) e do bactericida Cloranfenicol (30µg/disco), foram utilizadas para comparação de resultados entre os ensaios. Os diâmetros dos halos formados pelos controles serviram de comparação para a capacidade de inibição do crescimento dos micro-organismo pelas amostras. Todas as mostras foram testadas em duplicata.

4.10.2 Método da microdiluição em caldo

O método de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada segundo metodologia do Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2009). Para o teste com bactérias foi utilizando o caldo de

Mueller-Hinton e para o ensaio com a levedura foi utilizado o caldo Sabouraud Dextrose. Foram preparadas soluções-mãe na concentração de 2000 µg/mL a partir dos extratos brutos etanólicos, frações e óleo essencial de *M. clavigera*, empregando metanol (25%) em água como solvente.

Foram processadas diluições seriadas, para resultar em concentrações entre 1000 e 7,8 µg/mL das amostras em estudo e distribuídas em 100 µL em cada orifício da microplaca estéril com 96 poços em fundo U com auxílio de uma micropipeta de multicanal. Em seguida, adicionou-se 10 µL dos inóculos contendo 10⁸ UFC/mL e as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C ± 1°C por 24 horas quando bactérias e a 25°C por 48 horas quando leveduras. As amostras foram testadas em duplicatas, em microplacas individuais para cada cepa, evitando assim contaminação.

Após o período de incubação (20-23 horas) adicionaram-se 20 µL de uma solução aquosa do revelador TTC (cloreto de trifenil tetrazólio) a 0,5%, em cada cavidade da microplaca e estas foram novamente incubadas por mais uma hora para verificar o crescimento bacteriano. Utilizou-se Cloranfenicol (30 µg/mL) e Cetoconazol (50 µg/mL) como controles positivos e a solução de metanol 25% como controle negativo.

4.11 DOSEAMENTO DE FENÓLICOS TOTAIS

Os compostos fenólicos contém um grupo fenol, ou seja, um grupo hidroxila funcional em um anel aromático, constituindo um grupo bastante heterogêneo devido à sua diversidade química, o que reflete a variedade de funções deste grupo (TAIZ; ZEIGER, 2004). A atividade antioxidante dos compostos fenólicos se dá, devido a suas propriedades redox, que lhes permitem agirem como agentes redutores, doadores de hidrogênio e supressores de oxigênio singlete, assim como um potencial quelador de metais (RICE-EVANS *et al.*, 1995). Dividem-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas.

A quantificação espectrométrica de compostos fenólicos pode ser realizada por meio de uma variedade de técnicas, porém a mais utilizada é a do reagente de Folin-Ciocalteu. O reagente consiste de mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico, onde o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação VI (cor amarela), porém, em presença de alguns agentes redutores, como compostos fenólicos, formam os complexos molibdênio – tungstênio azuis, que apresentam média do estado de oxidação dos metais entre 5 (V) e 6 (VI) e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras (FIGURA 9). Essa reação de oxi-redução ocorre em meio alcalino e a solução de carbonato de sódio é a base mais indicada (SOUSA *et al.*, 2007).

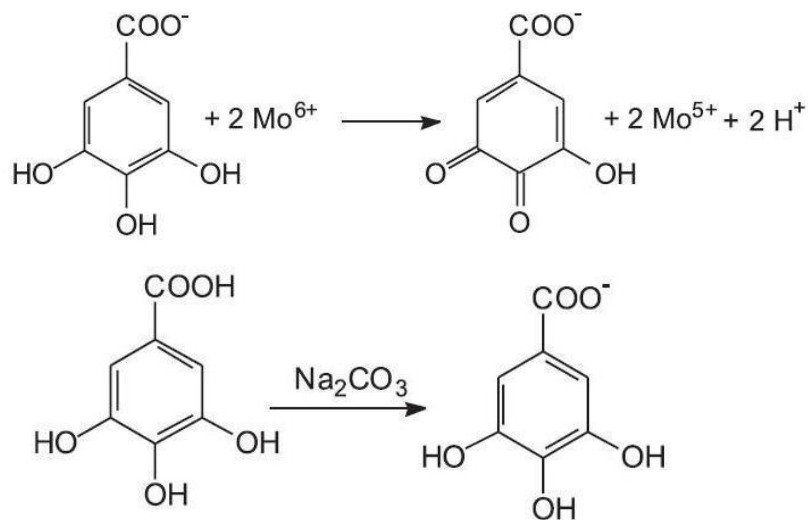


FIGURA 9 - REAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO COM MOLIBDÊNIO, COMPONENTE DO REAGENTE DE FOLIN-CIOCALTEU

O doseamento do teor de fenólicos totais foi determinado pelo método descrito por Singleton *et al.* (1965), com algumas modificações.

Para determinar o conteúdo de fenólicos totais, construiu-se uma curva de calibração (GRÁFICO 1), utilizando o ácido gálico como controle (2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5 e 20 $\mu\text{g/mL}$), frente a qual interpolou-se as absorbâncias das amostras. Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico por grama de amostra (mg EAG/g).

As amostras (extratos brutos etanólicos, frações e óleo essencial) em triplicata, foram diluídas em metanol, adicionadas a tubos de ensaio e o volume completado para 4 mL com água destilada. Após total solubilização foi adicionado 0,2 mL de reativo de Folin-Ciocalteu, novamente homogeneizado e adicionado 0,4 mL de carbonato de sódio a 10%. Os tubos foram mantidos em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente. Após este período foram realizadas as leituras em espectrofotômetro UV-1601 Shimadzu® a 760 nm.

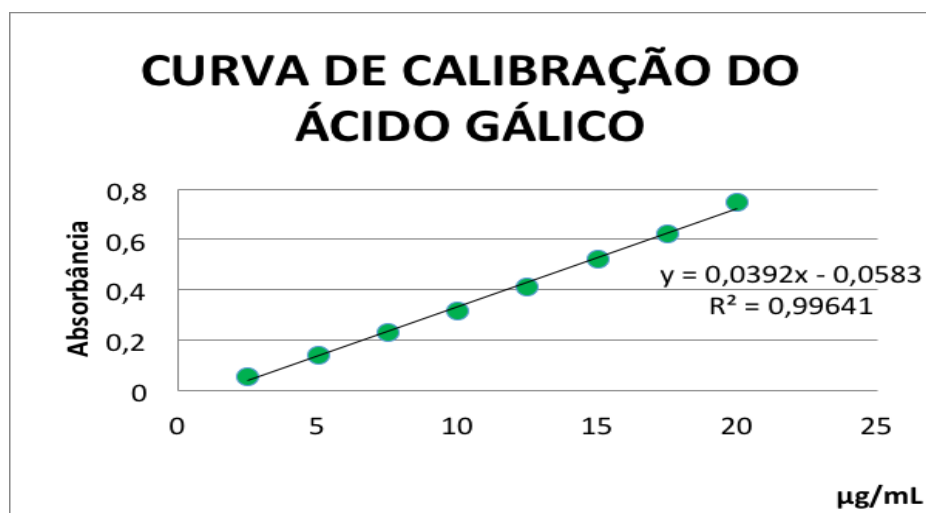


GRÁFICO 1 – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A DOSAGEM DE FENÓLICOS TOTAIS
 FONTE: A autora, 2014

4.12 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os antioxidantes são compostos que apresentam a capacidade de reverter ou inibir a oxidação de outras substâncias. Auxiliam na prevenção de diversas doenças e apresentam uma larga aplicação industrial, principalmente nos setores farmacêutico, cosmético e alimentício. O uso de agentes antioxidantes obtidos de produtos naturais torna-se uma alternativa aos obtidos quimicamente, pois estes produtos passam por rigorosos testes toxicológicos, de segurança e eficácia para o uso das suas propriedades medicinais, exigidos para medicamentos fitoterápicos (BARREIROS; DAVID, 2006; NIKI, 2010). No organismo, os danos causados pela presença de radicais livres e/ou espécies reativas de oxigênio e nitrogênio podem

estar relacionados a muitas patologias, entre elas a insuficiência cardíaca e respiratória, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, mutagênese e carcinogênese (NIKI, 2010).

Para avaliar a atividade antioxidante dos extratos brutos etanólicos, frações e óleo essencial da espécie *M. clavigera* utilizou-se duas metodologias: Redução do complexo fosfomolibdênio e Sequestro de radicais *2,2-difenil-1-picrilhidrazila* (DPPH).

4.12.1 Método da Redução do Complexo Fosfomolibdênio

O fundamento do método descrito por Prieto, Pineda e Aguilar (1999) consiste na redução em meio ácido, do molibdênio VI em molibdênio V quando em contato com alguma substância que tenha ação antioxidante. À medida que a reação se processa, a coloração amarelada, característica do molibdênio VI, transforma-se em um complexo de cor azul que é determinado espectrofotometricamente por UV a 695 nm. Esse método é usado para comparar a capacidade antioxidante de diversos extratos, além de ser simples e de baixo custo.

O reativo fosfomolibdênio é formado pela reação da solução de fosfato de sódio tribásico (28 mL, 0,1 mol/L) com solução de molibdato de amônio tetraidratado (12 mL, 0,03 mol/L) e solução de H₂SO₄ (20 mL, 3 mol/L), em meio aquoso, sendo o volume final ajustado com água destilada para 100 mL.

As amostras foram solubilizadas em metanol com concentração final de 200 µg/mL. Destas, alíquotas de 0,3 mL foram adicionadas a 3 mL de solução reagente do complexo fosfomolibdênio. Os tubos foram incubados em banho-maria a 95°C por 90 minutos. Após resfriamento, realizou-se a leitura a 695nm, em espectrofotômetro UV-1601 Shimadzu®, para obtenção das absorbâncias. O teste foi realizado em triplicata.

A capacidade antioxidante das amostras foi expressa em atividade antioxidante relativa (AAR%), em relação à rutina (200 µg/mL) e vitamina C (200 µg/mL), usadas como padrão. Os resultados foram calculados através das seguintes fórmulas (5 e 6):

$$\text{AAR \% RUTINA} = \frac{(\text{Absorbância teste} - \text{Absorbância branco})}{(\text{Absorbância rutina} - \text{Absorbância branco})} \times 100 \quad (5)$$

$$\text{AAR \% VITAMINA C} = \frac{(\text{Absorbância teste} - \text{Absorbância branco})}{(\text{Absorbância Vit. C} - \text{Absorbância branco})} \times 100 \quad (6)$$

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente, para verificar a diferença estatística entre as amostras utilizando-se ANOVA e para localizar as diferenças o teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.12.2 Método do Sequestro de Radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)

A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável e possui um elétron desemparelhado deslocalizado por toda a molécula. A metodologia baseia-se na capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina. Quando uma substância doa um átomo de hidrogênio ao radical DPPH, a redução ocorre e pode ser visualizada pela mudança de coloração (FIGURA 10), de violeta intenso para amarelo pálido (ALVES *et al.*, 2010).

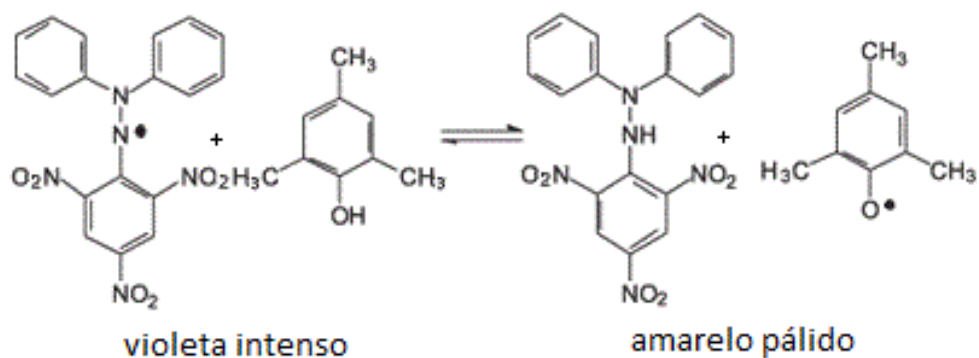


FIGURA 10 - REDUÇÃO DO RADICAL DPPH
 FONTE: SCIELO 2014

O potencial de redução do radical DPPH foi determinado segundo o método descrito por Mensor *et al.* (2001), utilizando rutina e vitamina C como padrões.

Preparou-se soluções metanólicas das amostras e dos padrões em diferentes concentrações, das quais alíquotas de 2,5 mL foram adicionadas a 1 mL de uma solução metanólica de DPPH na concentração de 0,03 mmol/mL. Como controle negativo utilizou-se uma solução 2,5 mL de metanol e 1 mL de DPPH. Após trinta minutos de reação, a temperatura ambiente, realizou-se as leituras em espectrofotômetro UV-1601 Shimadzu® a 518nm, tendo como branco o metanol.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente, para verificar a diferença estatística entre as amostras utilizando-se ANOVA e para localizar as diferenças o teste de Tukey ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIOS FÍSICO QUÍMICOS

O resultado da determinação do teor de cinzas totais (TABELA 1) mostrou-se maior para as folhas do que para os caules de *M. clavigera*, podendo-se inferir que as folhas possuem maior quantidade de substâncias inorgânicas não voláteis do que os caules.

A determinação de perda por dessecação (TABELA 1) do material vegetal (folhas e caules) expressou um teor de umidade inferior a faixa entre 8 e 14%, sendo este o limite máximo recomendado de umidade para drogas vegetais em diferentes farmacopeias (FARIAS, 2010).

Esses resultados podem contribuir para o estabelecimento de padrões de qualidade e caracterização da espécie vegetal.

TABELA 1 – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE PERDA POR DESSECAÇÃO E CINZAS TOTAIS DAS FOLHAS E CAULES DE *M. clavigera*

PARTE VEGETAL	PERDA POR DESSECAÇÃO	CINZAS TOTAIS %
FOLHAS	4,0931 ± 0,0787	9,3109 ± 0,0652
CAULES	4,5941 ± 0,2894	3,9465 ± 0,2179

FONTE: A autora, 2013

5.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS E FRAÇÕES

Após a obtenção dos extratos brutos etanólicos de *M. clavigera*, por extração em aparelho de Soxhlet, determinou-se o teor de sólidos em relação ao material vegetal seco (folhas e caules):

- Folhas: 7,72%
- Caule: 4,32%

Posteriormente, 5g de cada extrato bruto etanólico foi reservado para a realização dos demais ensaios (toxicidade, atividade larvicida, antimicrobiana e antioxidante) e com o restante realizou-se o particionamento em aparelho de Soxhlet modificado e as frações nomeadas como fração hexânica, fração clorofórmica, fração acetato de etila e a fração remanescente ou hidroalcoólica.

O rendimento das frações obtidas está descrito na TABELA 2.

TABELA 2 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DAS FOLHAS E CAULES DE *M. clavigera*

FRAÇÃO	RENDIMENTO	
	Gramas (g)	% (material vegetal seco)
	FOLHAS	
HEXANO	59,316	4,032
CLOROFÓRMIO	10,706	0,728
ACETATO DE ETILA	0,798	0,054
REMANESCENTE	42,978	2,922
	CAULES	
HEXANO	8,661	0,448
CLOROFÓRMIO	13,145	0,681
ACETATO DE TILA	0,815	0,0422
REMANESCENTE	57,771	2,991

FONTE: A autora, 2014

Devido ao baixo rendimento das frações acetato de etila das folhas e dos caules, foram realizados com este material apenas os ensaios de atividade antioxidante e doseamento de polifenóis, enquanto o restante reservou-se para a realização de cromatografia em coluna e posterior isolamento de compostos. Desta forma, não houve a realização dos demais ensaios (antimicrobiano, toxicidade, atividade larvicida) com estas frações.

5.3 ENSAIO SISTEMÁTICO FITOQUÍMICO

A análise fitoquímica preliminar nos informa quais são os principais grupos de metabólitos secundários presentes nos extratos. Esse conhecimento é utilizado como base para o posterior isolamento de substâncias. O resultado deste ensaio está representado nas TABELAS 3 e 4.

TABELA 3 – ANÁLISE SISTEMÁTICA DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DAS FOLHAS E CAULES DE *M. clavigera*

ANÁLISES		RESULTADOS FOLHAS	RESULTADOS CAULES
Alcaloides	Meyer	+	+
	Dragendorff	+	+
	Bouchardat	+	+
	Bertrand	+	+
Flavonoides	Leucoantocianidinas	-	-
	Heterosídeos flavônicos	+	+
	Flavonóis	-	-
	Dihidroflavonóis	-	-
Cumarinas		-	-
Heterosídeos antraquinônicos		-	-
Esteroides/Triterpenos	Reação de Liberman – Bouchard	+	-
	Reação de Keller – Kelliani	+	-

FONTE: A autora, 2014

Os ensaios realizados com os extratos hidroetanólicos das folhas e caules foram positivos para alcaloides e flavonoides, resultados estes compatíveis aos relatados na literatura para o gênero *Mollinedia*. Moreira e Leitão (2001) analisaram os caules de cinco espécies de *Mollinedia* (*M. schottiana*, *M. gilgiana*, *M. glaziovii*, *M. marliae* e *M. salicifolia*) onde identificaram o alcaloide aporfínico liriodenina. Duque *et al.* (2011), Murillo *et al.* (2011) e Sanchez-Peralta *et al.*(2014) também mencionam a presença de alcaloides e flavonoides nas folhas da espécie *Mollinedia racemosa*. Lopez (1988) relata o isolamento do flavonoide vitexina e do alcaloide benzilisoquinolínico mollinedina das folhas e raízes de *Mollinedia costaricensis*, respectivamente. A pesquisa de esteroides e triterpenos no extrato hidroetanólico das folhas também foi positivo, assim como relatado por Duque *et al.* (2011), Murillo *et al.* (2011) e Sanchez-Peralta *et al.*(2014) na espécie *M. racemosa* e por Claros *et al.* (1999), nas folhas de *M. marliae* e *M. gilgiana*. Nestas duas espécies citadas encontrou-se a mistura dos esteroides estigmasterol e sitosterol.

TABELA 4 – ANÁLISE SISTEMÁTICA DOS EXTRATOS AQUOSOS DAS FOLHAS E CAULES DE *M. clavigera*

ANÁLISES		RESULTADOS (FOLHAS)	RESULTADOS (CAULE)
Heterosídeos Antociânicos	pH 4	-	-
	pH 7	-	-
	pH 10	-	-
	Antocianidina	-	-
Heterosídeos saponínicos		-	+
Heterosídeos Cianogênicos		-	-
Taninos	Cloreto férrico	-	-
	Sulfato aminiacal	-	-
	Acetato de chumbo	-	-
	Precipitação com gelatina	-	-
	Formol- clorídrico	-	-

FONTE: A autora, 2014

No extrato aquoso dos caules determinou-se a presença de saponinas, resultado este citado por Sanchez-Peralta *et al.*(2014) para as folhas do gênero *M. racemosa*. No ensaio não observou-se resultado positivo para o teste de taninos, mas já houve citações da presença de taninos na espécie de *Mollinedia racemosa* (MURILLO *et al.*, 2011; DUQUE *et al.*, 2011; SANCHEZ-PERALTA *et al.* 2014).

5.4 ESTUDO DAS FRAÇÕES DE *M. clavigera*

As frações acetato de etila, hexano e clorofórmio das folhas foram submetidas à cromatografia em coluna (CC) para iniciar a purificação de possíveis compostos químicos.

- Fração acetato de etila das folhas: Solubilizada em metanol e como fase móvel utilizou-se acetato de etila e metanol.
- Fração hexano das folhas: Solubilizada em cloroformio e como fase móvel utilizou-se a combinação de hexano e acetato de etila.
- Fração clorofórmio das folhas: Solubilizada em metanol e como fase móvel utilizou-se a combinação de hexano e acetato de etila e metanol.

Estas frações encontram-se em processo de purificação em cromatografia por exclusão molecular (Sephadex), para posterior isolamento e identificação de compostos.

A fração acetato de etila dos caules foi solubilizada em metanol precipitando alguns pequenos cristais. Aproximadamente 10 µg do material foi solubilizado em 400 µL de metanol deuterado, utilizando-se tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interna e submetido a análise de RMN de ¹H para realizar o *fingerprinting* da fração. O espectro obtido a partir desta análise está representado na FIGURA 11.

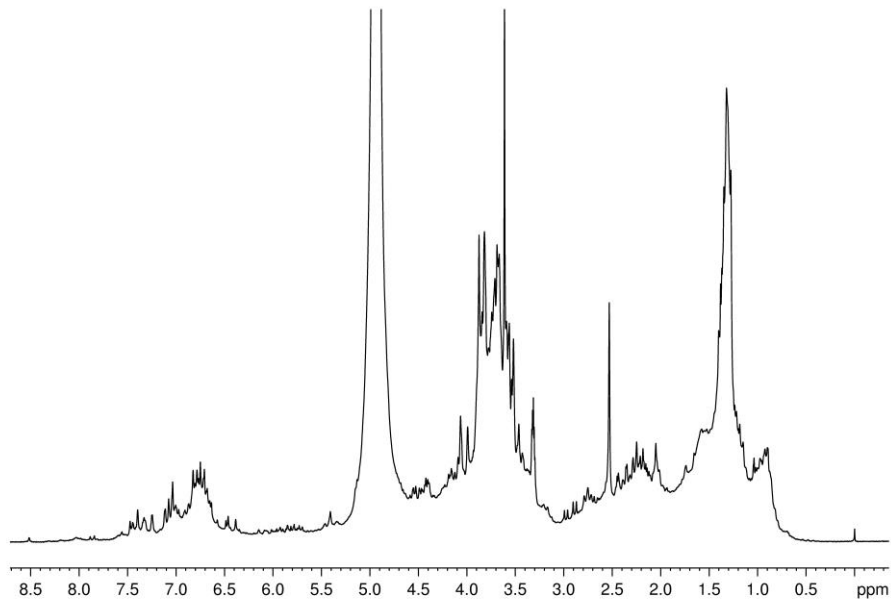


FIGURA 11 - ESPECTRO DE RMN ^1H DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA
 FONTE: TOPSPIN

O espectro nos mostra uma matriz complexa, mas alguns sinais em regiões características de grupos metabólitos traçam um perfil preliminar dos compostos presentes nesta fração.

Os sinais na região de 6-8 ppm sugerem a presença de polifenóis (anéis aromáticos), enquanto os sinais na região de 1-3 ppm sugerem a presença de terpenoides, além de açúcares na região de 4-5 ppm.

5.5 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *M. clavigera*

5.5.1 Rendimento do óleo essencial

O rendimento do óleo de *M. clavigera*, obtido através de hidrodestilação por arraste de vapor d'água em aparelho de Clevenger foi de 1,18% (p/v) em relação às folhas. Assim sendo, a partir de cada 100 g de folhas foi possível obter 1,18 mL de óleo essencial.

5.5.2 Caracterização do óleo essencial

Para a caracterização do óleo essencial realizou-se a determinação das características organolépticas, densidade, solubilidade em etanol e índice de refração.

5.5.2.1 Características organolépticas

Em relação às características organolépticas foram analisadas a coloração e odor do óleo essencial obtido das folhas de *M. clavigera*. O óleo apresentou-se translúcido, com coloração amarela clara e odor forte e não agradável.

5.5.2.2 Determinação da densidade

Determinou-se a densidade do óleo essencial de *M. clavigera* no valor de 0,967 mg/mL. De acordo com Simões e Spitzer (2010), os valores para a densidade dos óleos essenciais geralmente encontram-se entre 0,69 e 1,118 mg/mL. O valor determinado localiza-se nesta faixa e pode ser utilizado como parâmetro característico para a espécie vegetal em questão.

5.5.2.3 Determinação da solubilidade em etanol

A determinação da solubilidade em etanol serve como parâmetro para detectar possíveis falsificações já que, para cada óleo volátil natural, existe um valor que indica sua solubilidade numa solução de etanol/água, onde o óleo volátil é miscível de forma transparente ou opalescente (SIMÕES; SPITZER, 2010). A

TABELA 5 apresenta os resultados da solubilidade do óleo essencial de *M. clavigera* determinando as partes em que são solúveis nas concentrações abaixo testadas.

TABELA 5 – SOLUBILIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *M. clavigera* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ETANOL

[] ETANOL	70%	80%	90%	100%
Volume Gasto	35 mL	6,5 mL	0,2 mL	1 gota
Solubilidade do óleo	1:350	1:65	1:2	Completamente solúvel

FONTE: A autora, 2014

5.5.2.4 Determinação do índice de refração $^{20}n_D$

O índice de refração do óleo essencial de *M. clavigera* determinado foi de 1,5039. Segundo Simões e Spitzer (2010) os valores para o índice de refração de óleos essenciais variam entre 1,450 e 1,590, faixa na qual se enquadra o resultado obtido.

5.5.3 Cromatografia Gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM)

O cromatograma obtido a partir da análise de CG/EM do óleo essencial das folhas de *M. clavigera* está representado na FIGURA 12. A identificação dos compostos foi efetuada por comparação com os espectros da biblioteca NIST 2008 – banco de dados do sistema.

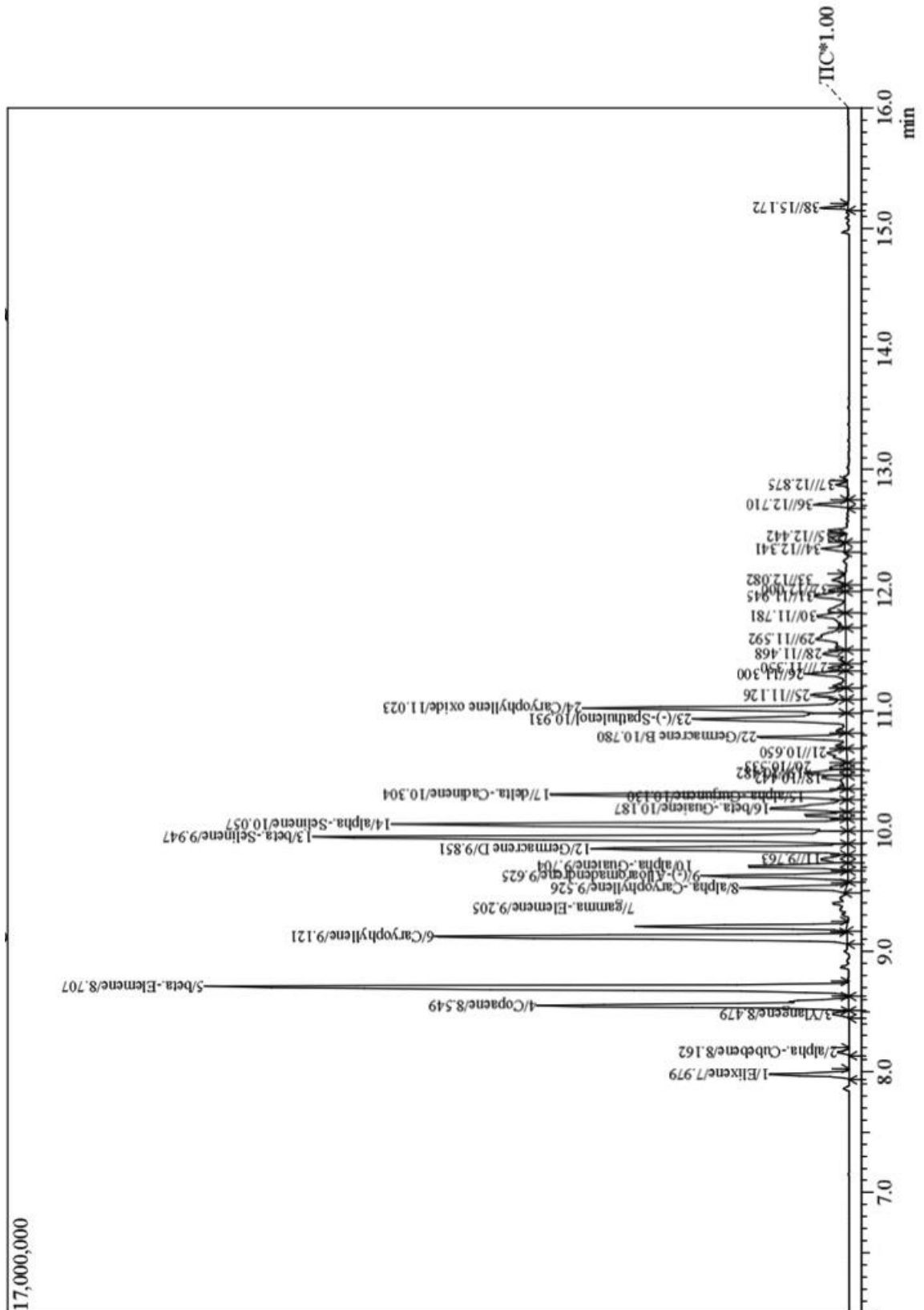


FIGURA 12 - ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS *M. clavigera*
 FONTE: Programa Operacional GCMS solution

Os compostos químicos identificados na composição do óleo essencial de *M. clavigera*, por análise em CG/EM está descrito na TABELA 6.

TABELA 6 – COMPOSTOS QUÍMICOS IDENTIFICADOS NA ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE *M. clavigera*

TEMPO DE RETENÇÃO (min)	COMPOSTO QUÍMICO	ÁREA (%)
8,707	β -elemeno	14,38
9,947	β -selineno	12,52
10,057	α -selineno	9,79
9,121	Cariofileno	8,31
8,549	Copaeno	6,48
10,304	δ -cadineno	5,85
9,851	Germacreno D	5,32
11,023	Óxido de cariofileno	5,23
10,931	espatulenol	4,07
9,205	γ -elemeno	3,60
9,625	alloaromadendreno	2,55
10,187	β -guaieno	1,98
9,704	α -guaieno	1,87
9,526	α -cariofileno	1,80
7,979	Elixeno	1,71
10,780	Germacreno B	1,79
10,13	α -gurjuneno	0,75
8,479	Ylangeno	0,33
8,162	α -cubeneno	0,18

FONTE: A autora, 2014

Encontraram-se 38 compostos químicos, dos quais identificou-se 19 sesquiterpenos na análise da composição do óleo essencial de *Mollinedia clavigera*. A presença de sesquiterpenos como elementos majoritários na composição de óleo essencial pode ser observada em várias espécies do gênero *Mollinedia*, bem como em famílias próximas como Siparunaceae e Lauraceae (Marques *et al.*, 2009).

O composto majoritário identificado no óleo essencial de *M. clavigera* foi o β -elemeno (14,38%), composto que tem sido estudado por apresentar atividade antineoplásica em diferentes tipos de câncer. O β -elemeno, cuja estrutura química

está representada na FIGURA 13, tem se mostrado um potente antitumoral por induzir a apoptose, limitar a diferenciação celular e pela inibição de metástases, provando ser um bom candidato para uso na quimioterapia no tratamento de neoplasias de pulmão, cólon, estômago, cérebro entre outros. (MARQUES *et al.*, 2008; BARRERO *et al.*, 2011).

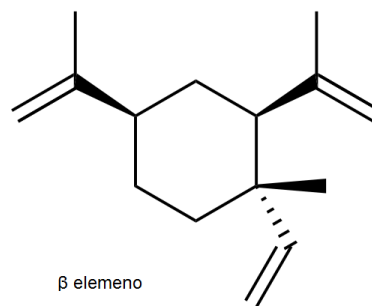


FIGURA 13 - ESTRUTURA QUÍMICA β-ELEMENO
FONTE: SCIELO, 2015

Os demais compostos majoritários são: β-selineno (12,52%), α-selineno (9,79%), cariofileno (8,31%) e copaeno (6,48%), cujas estruturas químicas estão representadas nas FIGURAS 14 a 17.

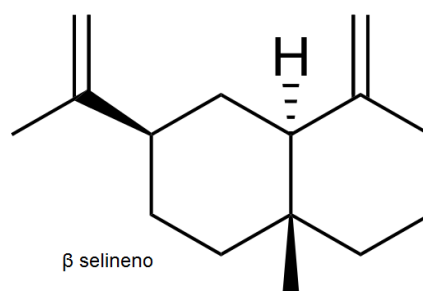


FIGURA 14 - ESTRUTURA QUÍMICA β-SELINENO
FONTE: SCIELO, 2015

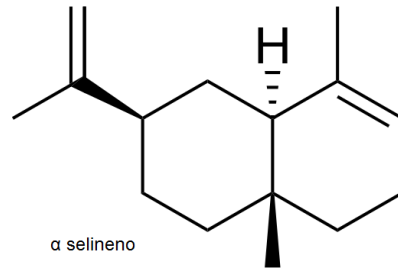


FIGURA 15 - ESTRUTURA QUÍMICA α-SELINENO
 FONTE: SCIELO, 2015

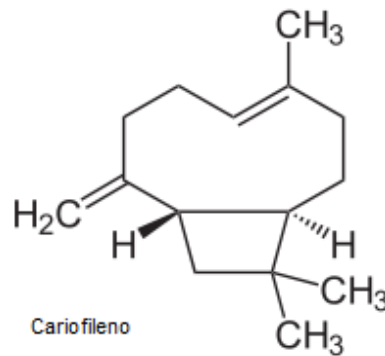


FIGURA 16 - ESTRUTURA QUÍMICA CARIOFILENO
 FONTE: SCIELO, 2015

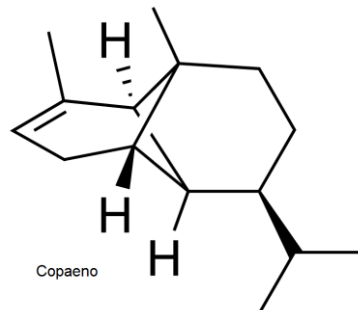


FIGURA 17 - ESTRUTURA QUÍMICA COPAENO
 FONTE: SCIELO, 2015

O β-elemeno também foi identificado no óleo essencial das espécies: *M. gilgiana*, *M. schottiana*, *M. glaziovii* e *M. salicifolia*. Em todas essas espécies estudadas também identificou-se a presença do óxido de cariofileno, sendo este o componente majoritário nas espécies *M. glaziovii*, e *M. salicifolia*. Na composição do óleo essencial de *M. schottiana* a curzerenona (33.1%) foi identificada como componente majoritário, resultado este citado pela primeira vez em espécies do gênero. (MARQUES *et al.*, 2008).

5.6 ENSAIOS DE TOXICIDADE

5.6.1 Ensaio de toxicidade aguda sobre *Artemia salina*

Meyer *et al.* (1982) estabeleceram uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, considerando tóxicas amostras que demonstravam DL₅₀ inferiores a 1000 µg/mL. Amarante *et al.* (2011), Valdes *et al.* (2009) e Iglesias *et al.* (2003), estabeleceram uma nova relação, considerando altamente tóxicas amostras com DL₅₀ menores que 100 µg/mL, moderadamente tóxicas com DL₅₀ entre 100 e 500 µg/mL e de baixa toxicidade amostras com DL₅₀ superiores a 500 µg/mL. Valdes *et al.* (2009) e Iglesias *et al.* (2003) complementam ainda considerando amostras extremamente tóxicas quando DL₅₀ inferior a 10 µg/mL.

Os resultados para o ensaio de toxicidade aguda sobre *Artemia salina* estão descritos na TABELA 7.

TABELA 7 – ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA SOBRE *Artemia salina* e DL₅₀ UTILIZANDO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO, FRAÇÕES E ÓLEO DAS FOLHAS E CAULES DE *M. clavigera*.

AMOSTRA	ALTA TOXICIDADE	MODERADA TOXICIDADE	BAIXA TOXICIDADE	SEM TOXICIDADE	INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (µg/mL)
FOLHAS					
Extrato bruto	82,62	-	-	-	79,21 – 86,33
Hexano	24,33	-	-	-	21,12 – 28,03
Clorofórmio	-	-	-	> 1000	-
Remanescente	-	-	-	> 1000	-
Óleo	24,33	-	-	-	21,12 – 28,03
CAULES					
Extrato bruto	-	216,49	-	-	165,27 – 283,59
Hexano	46,75	-	-	-	42,00 – 52,04
Clorofórmio	64,20	-	-	-	43,63 – 109,06
Remanescente	-	-	-	> 1000	-

FONTE: A autora, 2014

Nas amostras de folhas de *M. clavigera* analisadas as frações clorofórmio e remanescente não apresentaram atividade tóxica. Enquanto a fração hexano, o

extrato bruto etanólico e o óleo essencial mostraram-se tóxicos considerando-se a classificação de Meyer *et al.* (1982). Segundo Amarante *et al.* (2011), Iglesias *et al.* (2003) e Valdez *et al.* (2009) estas amostras foram classificadas como altamente tóxicas por apresentarem DL₅₀ menor que 100 µg/mL .

Nas amostras de caules de *M. clavigera* a fração remanescente não apresentou toxicidade. As frações hexano, clorofórmio e o extrato bruto etanólico foram considerados tóxicos segundo Meyer. Na classificação de Amarante *et al.* (2011), Iglesias *et al.* (2003) e Valdez *et al.* (2009) as frações hexano e clorofórmio apresentaram-se altamente tóxicas por apresentarem DL₅₀ menor que 100 µg/mL enquanto o extrato bruto etanólico apresentou toxicidade moderada com DL₅₀ entre 100 e 500 µg/mL.

Segundo Petrobrás (1996), o controle positivo SDS apresentou DL₅₀ de aproximadamente 13 µg/mL, valor este confirmado neste ensaio (DL₅₀ 13,88 µg/mL).

Murillo *et al.* (2011) avaliou a atividade tóxica da espécie *M. racemosa*, analisando a fração hexânica, diclorometano e a fração remanescente. A fração hexânica mostrou-se a mais ativa sobre *Artemia salina*, apesar de apresentar baixa toxicidade. As demais frações não apresentaram atividade tóxica no teste realizado.

Siqueira *et al.* (1998) cita que o alcaloide liriodenina apresenta atividade tóxica sobre *Artemia salina*. Este alcaloide foi encontrado em caules de diversas espécies de *Mollinedia*: *M. schottiana*, *M. gilgiana*, *M. glaziovii*, *M. marliae* e *M. salicifolia* (MOREIRA; LEITÃO, 2001). Apesar das demais espécies não apresentarem estudos sobre a toxicidade sobre *Artemia salina*, a presença deste alcaloide pode sugerir uma possível atividade tóxica do gênero.

5.6.2 Avaliação da atividade hemolítica *in vitro*

Os resultados obtidos a partir da avaliação da atividade hemolítica *in vitro* das amostras (extratos brutos etanólicos, frações e óleo essencial) de folhas e caules de *M. clavigera* estão descritos na TABELA 8.

TABELA 8 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS E CAULES DE *M. clavigera*

(Continua)

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA (µg/mL)	% HEMÓLISE	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE TUKEY*
EXTRATO BRUTO FOLHA	100	43,72	efghi
	250	25,68	c
	500	39,79	defgh
	1000	38,50	defg
HEXANO FOLHA	100	65,58	mn
	250	59,30	klm
	500	49,50	hijk
	1000	34,21	fghij
CLOROFÓRMIO FOLHA	100	1,75	a
	250	12,44	b
	500	29,69	cd
	1000	33,48	cde
REMANESCENTE FOLHA	100	0,00	a
	250	0,00	a
	500	0,00	a
	1000	0,00	a
ÓLEO	100	0,00	a
	250	0,00	a
	500	31,80	cde
	1000	41,97	efghi
EXTRATO BRUTO CAULE	100	50,44	ijk
	250	41,22	efghi
	500	40,72	efghi
	1000	35,19	ijk
HEXANO CAULE	100	77,02	o
	250	75,06	no
	500	60,71	lm
	1000	44,41	fghij
CLOROFORMIO CAULE	100	9,08	ab
	250	34,47	cdef
	500	46,93	ghij
	1000	52,94	ijkl

TABELA 8 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS E CAULES DE *M. clavigera*

(Conclusão)

	100	2,16	a
REMANESCENTE	250	2,78	a b
CAULE	500	3,47	a b
	1000	5,12	a b

FONTE: A autora, 2014

NOTA: *Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente

Na atividade hemolítica *in vitro* observa-se que a fração clorofórmio tanto das folhas quanto dos caules e o óleo essencial possuem uma relação diretamente proporcional entre a porcentagem de hemólise e a concentração das amostras testadas. Porém para os extratos brutos etanólicos e as frações hexano das folhas e dos caules esta proporcionalidade não ocorre. Na TABELA 8 observa-se que a fração hexano dos caules na concentração de 100 µg/mL (77,02%) foi a amostra que apresentou a maior porcentagem de hemólise em comparação ao controle positivo (hemólise 100%), seguida da concentração de 250 µg/mL (75,06%) da mesma fração. Já em comparação ao controle basal (hemólise 7,6%) as frações remanescente das folhas e caules, em todas as concentrações, assim como o óleo essencial nas concentrações 100 e 250 µg/mL e a fração clorofórmio das folhas na concentração de 100 µg/mL, não apresentaram atividade hemolítica.

Dados os resultados destes ensaios preliminares, ainda se faz necessária a realização de ensaios de toxicidade mais específicos e acurados.

5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA EM *Aedes aegypti*

Os resultados da avaliação da atividade larvicida dos extratos brutos etanólicos, frações e do óleo essencial de *M. clavigera* em *Aedes aegypti* estão descritos na TABELA 9.

TABELA 9 – ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE *Aedes aegypti* e DL₅₀ UTILIZANDO EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS E CAULES DE *M. clavigera*

AMOSTRAS	DL ₅₀ (µg/mL)	INTERVALO DE CONFIANÇA 95% (µg/mL)
EXTRATO BRUTO FOLHA	232,63	174,80 – 309,59
HEXANO FOLHA	24,33	21,12 – 28,03
CLOROFÓRMIO FOLHA	> 1000	-
REMANESCENTE FOLHA	> 1000	-
ÓLEO	267,39	202,36 – 353,31
EXTRATO BRUTO CAULE	> 1000	-
HEXANO CAULE	31,71	26,05 – 38,60
CLOROFÓRMIO CAULE	158,49	107,81 – 232,99
REMANESCENTE CAULE	> 1000	-

FONTE: A autora, 2014

Nas amostras de folhas de *M. clavigera* analisadas a fração clorofórmio e a remanescente não apresentaram atividade larvicida sobre *Aedes aegypti*. Tal atividade pode ser observada no extrato bruto etanólico, no óleo essencial e com destaque na fração hexano (24,33 µg/mL).

Nas amostras de caules de *M. clavigera* analisadas a fração remanescente e o extrato bruto etanólico não apresentaram atividade larvicida. Já a fração clorofórmio apresentou uma significativa atividade larvicida sobre *Aedes aegypti*, porém a atividade mais relevante foi expressada pela fração hexano (31,71 µg/mL), assim como observado nas folhas.

Este ensaio nunca foi realizado em espécies do gênero, não havendo assim possibilidade de fazer comparação da atividade larvicida entre espécies. Porém Javaé (2014) cita que o alcaloide liriodenina apresenta atividade contra larvas de 3º estágio do mosquito *Aedes aegypti*. Esse alcaloide é encontrado em caules de diversas espécies de *Mollinedia*: *M. schottiana*, *M. gilgiana*, *M. glaziovii*, *M. marliae* e *M. salicifolia* (MOREIRA; LEITÃO, 2001). A presença deste alcaloide pode sugerir uma possível atividade larvicida do gênero.

Na família Monimiaceae há relatos da atividade larvicida em três espécies de *Hortonia* (*H. angustifolia* Trimen, *H. floribunda* Wight ex Arn. e *H. ovalifolia* Wight), Destas três espécies foram isoladas duas γ -lactonas α , β -insaturadas,

caracterizadas como as substâncias responsáveis pela forte atividade larvicida destas espécies sobre larvas de *Aedes aegypti* (CARR *et al.*, 2012).

5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.8.1 Difusão em ágar

Nenhuma das amostras de *M. clavigera* testadas apresentou efetividade na inibição do crescimento ou morte celular das cepas testadas após o tempo máximo de observação: 24 horas para cepas bacterianas e 48 horas para *C. albicans*. Tal resultado pode ser observado pela ausência de formação de halo de inibição de crescimento dos micro-organismos pelas amostras impregnadas nos discos, assim como no controle negativo (solvente), enquanto observou-se nitidamente a formação de halo nos discos contendo os controles positivos (cloranfenicol e cetoconazol).

Murillo *et al.* (2011) realizou a avaliação do potencial antimicrobiano da espécie *M. racemosa*, através de difusão em ágar, onde as cepas de *Candida Albicans* e *Salmonella typhi* mostraram-se sensíveis ao extrato testado, mas o autor descreve que a grande quantidade de óleos essenciais pode ter influenciado em um falso resultado para esse teste.

5.8.2 Método de microdiluição em caldo

O método de microdiluição em caldo foi aplicado porque permite o contato direto das amostras em diferentes concentrações com os micro-organismos a serem testados em suspensão, diferentemente do método de difusão em ágar, no qual as substâncias testadas precisam se difundir por ele para exercerem seu efeito sobre os micro-organismos.

Os resultados obtidos na avaliação da atividade antimicrobiana utilizando o método de microdiluição em caldo estão descritos na TABELA 10.

TABELA 10 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS E CAULES DE *M. clavigera*

AMOSTRA	MICROORGANISMO				
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
EXTRATO BRUTO FOLHA	1000 µg/µL	125 µg/µL	>1000 µg/µL	>1000 µg/µL	>1000 µg/µL
HEXANO FOLHA	500 µg/µL	15,625 µg/µL	>1000 µg/µL	500 µg/µL	>1000 µg/µL
CLOROFORMIO FOLHA	>1000 µg/µL	>1000 µg/µL	>1000 µg/µL	>1000 µg/MI	>1000 µg/µL
REMANESCENTE FOLHA	>1000 µg/µL	>1000 µg/µL	>1000 µg/µL	>1000 µg/µL	>1000 µg/µL
ÓLEO	>1000 µg/µL	>1000 µg/µL	>1000 µg/µL	>1000 µg/µL	>1000 µg/µL
EXTRATO BRUTO CAULE	>1000 µg/µL	1000 µg/µL	>1000 µg/µL	>1000 µg/µL	>1000 µg/µL
HEXANO CAULE	500 µg/µL	500 µg/µL	>1000 µg/µL	>1000 µg/µL	>1000 µg/µL
CLOROFORMIO CAULE	1000 µg/µL	500 µg/µL	>1000 µg/µL	1000 µg/µL	>1000 µg/µL
REMANESCENTE CAULE	>1000 µg/µL	>1000 µg/µL	>1000 µg/µL	1000 µg/µL	>1000 µg/µL

FONTE: A autora, 2014

NOTA: CIM: <100 µg/mL – boa atividade inibitória; CIM: 100-500 µg/mL – moderada atividade inibitória; CIM: 500-1000 µg/mL – fraca atividade inibitória; CIM: >1000 µg/mL – inativos

Nenhuma das amostras testadas mostrou atividade antimicrobiana em relação à levedura *C. albicans* e a bactéria gram negativa *E. coli*.

As frações hexano dos caules e hexano das folhas apresentaram fraca atividade inibitória (500 µg/mL) em relação à bactéria gram positiva *S. aureus*, assim como a fração hexano das folhas em relação à bactéria gram negativa *P. aeruginosa*.

A cepa da bactéria gram positiva *S. epidermidis* mostrou maior sensibilidade às amostras testadas. As frações clorofórmio e hexano dos caules apresentaram fraca atividade inibitória (500 µg/mL) em relação à cepa. Já o extrato bruto etanólico das folhas apresentou atividade inibitória moderada (125 µg/µL), enquanto a fração hexano das folhas apresentou uma boa atividade inibitória (15,625 µg/µL), conforme FIGURA 18.

A presença de uma coloração róseo-avermelhada foi interpretada como prova negativa do efeito inibitório, enquanto que a transparência foi considerada prova positiva da ação inibitória. A CIM foi definida como a menor concentração das amostras em µg/mL capaz de impedir o crescimento microbiano.

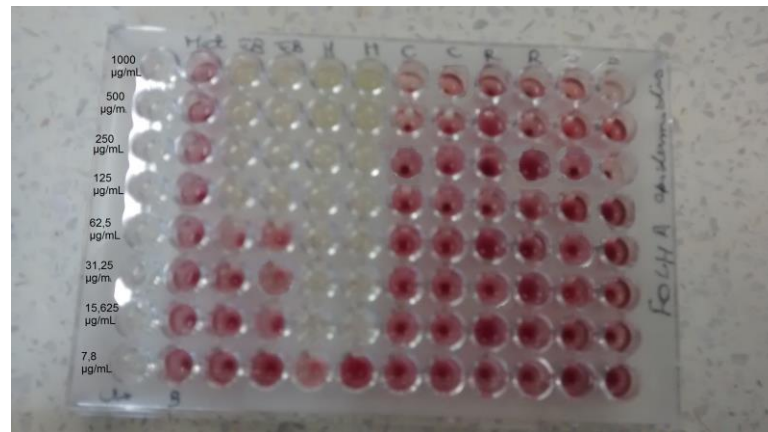


FIGURA 18 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO DAS FOLHAS DE *M. clavigera* SOBRE *S. epidermidis*
 FONTE: A autora, 2014

Neste estudo constatamos uma maior inibição das bactérias Gram positivas. Isto pode ter ocorrido pelo fato das bactérias Gram negativas apresentarem uma membrana externa em torno da parede celular, dificultando assim a permeabilidade das amostras testadas (CHEW *et al.*, 2011).

A realização de duas metodologias permitiu concluir que a técnica de microdiluição em caldo foi mais sensível em relação à difusão em disco, fato que provavelmente ocorreu devido à baixa solubilidade de produtos naturais no ágar e a dificuldade de difusão em disco de moléculas de alta polaridade e/ou maior massa molecular (ALVES *et al.*, 2008).

5.9 DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS

Os resultados obtidos na determinação dos fenóis totais (FT) pelo método reagente Folin Ciocalteu, expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extrato estão descritos na TABELA 11.

TABELA 11 – DETERMINAÇÃO DOS FENÓIS TOTAIS (FT) PELO MÉTODO DO REAGENTE FOLIN CIOCALTEU, EXPRESSOS COMO EQUIVALENTES DE ÁCIDO GÁLICO (EAG) POR G DE EXTRATO DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS E CAULES DE *M. clavigera*

AMOSTRA	mg EAG/g	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE TUKEY*
EXTRATO BRUTO FOLHA	96,91	a b
CLOROFÓRMIO FOLHA	144,29	c
ACETATO DE ETILA FOLHA	111,99	b
REMANESCENTE FOLHA	70,28	a
EXTRATO BRUTO CAULE	288,93	d
CLOROFÓRMIO CAULE	171,34	c
ACETATO DE ETILA CAULE	314,78	d
REMANESCENTE CAULE	113,00	b

FONTE: A autora, 2014

NOTA: *Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente

A amostra de óleo essencial e as frações hexano das folhas e caules de *M. clavigera* causaram turbidez no meio quando em contato com os reagentes, prejudicando e invalidando assim, a leitura dos resultados.

Segundo Chew *et al.*(2011) a quantidade de fenóis totais de espécies vegetais podem ser divididas em quatro classes: alta (superior a 50 mg EAG/g), média alta (entre 30 e 50 mg EAG/g), média baixa (entre 10 e 30 mg EAG/g) e baixa (inferior a 10 mg.EAG/g). Por esta classificação todas as amostras mostraram uma quantidade elevada de polifenóis, porém, destacamos a fração acetato de etila (314,78 mg EAG/g) e o extrato bruto etanólico (288,93 mg EAG/g) dos caules, por apresentarem os valores mais significativos no ensaio. O alto teor de fenólicos totais na fração acetato de etila dos caules pode estar justificada também no espectro de

RMN realizado como *fingerprinting* nos quais os sinais na região entre 6 e 8 ppm sugerem a presença de anéis aromáticos, característicos de polifenóis.

5.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos brutos etanólicos, frações e óleo essencial foi determinada através das metodologias *in vitro* de redução do complexo fosfomolibdênio e sequestro de radicais *2,2-difenil-1-picrilhidrazila* (DPPH).

5.10.1 Método da Redução do Complexo Fosfomolibdênio

A atividade antioxidante relativa (AAR %) de cada amostra (extratos brutos etanólicos, frações e óleo essencial) foi calculada em relação aos padrões vitamina C e rutina, atividades estas consideradas 100%. Para verificar a diferença estatística entre as amostras foi utilizado ANOVA e para localizar as diferenças o teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados deste ensaio estão descritos na TABELA 12 e melhor visualizados no GRÁFICO 2.

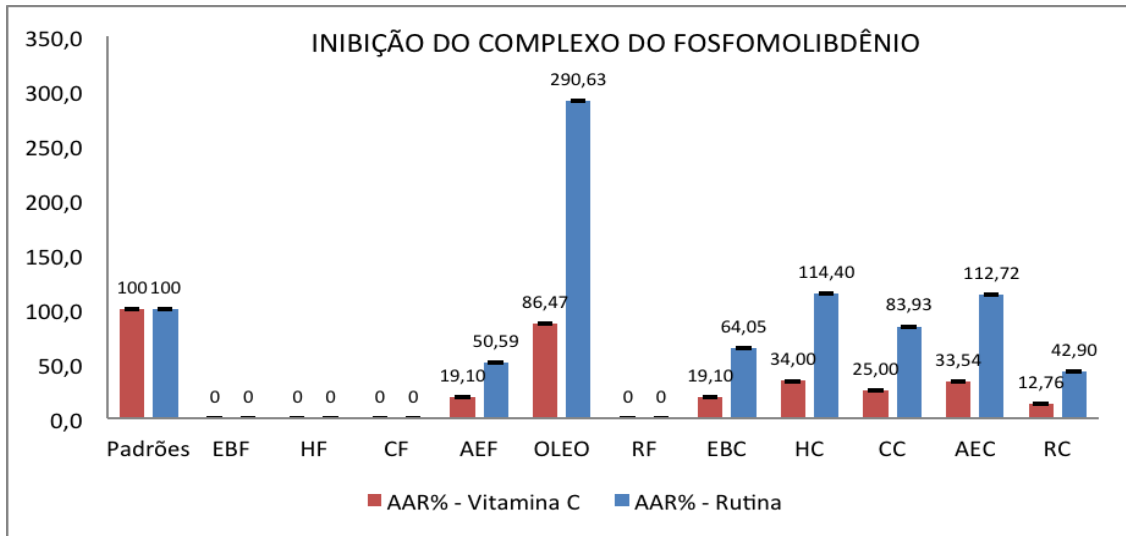


GRÁFICO 2 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA PELA INIBIÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DE *M. clavigera* EM RELAÇÃO AOS PADRÕES RUTINA E VITAMINA C.

FONTE: A autora, 2014

NOTA: AS FRAÇÕES ESTÃO APRESENTADAS NO GRÁFICO COMO: EBF (EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS), HF (FRAÇÃO HEXANO DAS FOLHAS), CF (FRAÇÃO CLOROFORMIO DAS FOLHAS), AEF (FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS), RF (FRAÇÃO REMANESCENTE DAS FOLHAS), EBC (EXTRATO BRUTO DOS CAULES), HC (FRAÇÃO HEXANO DOS CAULES), CC (FRAÇÃO CLOROFORMIO DOS CAULES), AEC (FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DOS CAULES), RC (FRAÇÃO REMANESCENTE DOS CAULES).

TABELA 12 – RESULTADO DA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO NOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS E CAULES DE *M. clavigera*

AMOSTRA	AA EM RELAÇÃO À RUTINA (%)	AA EM RELAÇÃO À VITAMINA C (%)	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE TUKEY*
EXTRATO BRUTO FOLHA	0,00	0,00	a
HEXANO FOLHA	0,00	0,00	a
CLOROFÓRMIO FOLHA	0,00	0,00	a
ACETATO DE ETILA FOLHA	50,59	19,10	b
REMANESCENTE FOLHA	0,00	0,00	a
ÓLEO	290,63	86,47	f
EXTRATO BRUTO CAULE	64,05	19,10	c
HEXANO CAULE	114,40	34,00	e
CLOROFÓRMIO CAULE	83,93	25,00	d
ACETATO DE ETILA CAULE	112,72	33,54	e
REMANESCENTE CAULE	42,90	12,76	b

FONTE: A autora, 2014

NOTA: *Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente

Considerando as atividades da rutina e da vitamina C como padrão de referência, o óleo essencial extraído das folhas de *M. clavigera* apresentou o melhor desempenho com atividade antioxidante de 86,47% em relação à vitamina C (conforme FIGURA 19), e quando comparada à rutina, um flavonoide de reconhecida ação antioxidante, se mostrou ainda mais ativa, superando em 190,63% a atividade da mesma, sendo, portanto o resultado mais promissor do ensaio.

O efeito antioxidante do óleo essencial pode ter decorrido do sinergismo entre seus componentes. Estudos demonstram que o germacreno D e o cariofileno apresentam possível ação antioxidante, compostos estes presentes na composição do óleo de *M. clavigera* (ARRUDA 2014; SOUZA 2007).

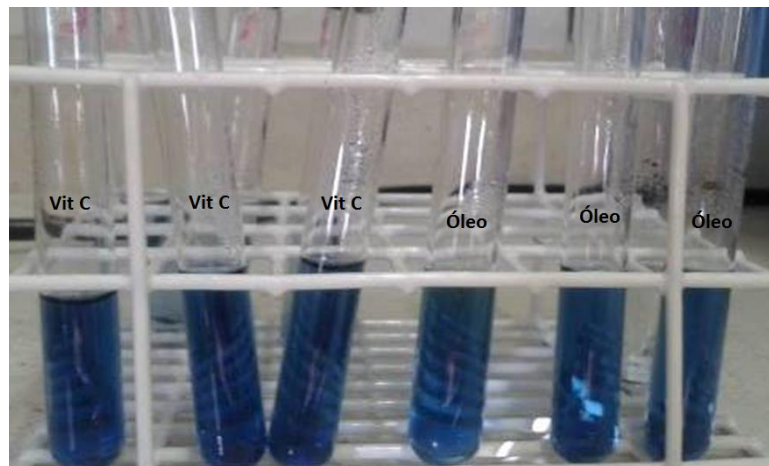


FIGURA 19 - COMPARAÇÃO VISUAL ENTRE ÓLEO ESSENCIAL DE *M. clavigera* E O PADRÃO VITAMINA C ATRAVÉS DA METODOLOGIA ANITOXIDANTE DA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO

A fração hexano dos caules também demonstrou uma relevante atividade antioxidante, atingindo 114,4% da atividade antioxidante exibida pelo padrão rutina e 34% de atividade antioxidante em relação ao padrão vitamina C, assim como a fração acetato de etila dos caules que atingiu 112,72% da atividade antioxidante do padrão rutina e 33,54% de atividade antioxidante do padrão vitamina C.

Com exceção do óleo essencial e da fração acetato de etila as demais frações das folhas de *M. clavigera* não apresentaram nenhuma atividade antioxidante em relação aos padrões rutina e vitamina C.

A avaliação em relação a diferentes padrões faz-se necessária, visto que apesar de ambos desempenharem papel de redutores, estes diferenciam-se na sua velocidade de redução e mecanismo de ação sendo que a vitamina C tende a ser mais rápida.

5.10.2 Método do Sequestro de Radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)

Em cada amostra testada foi calculada a porcentagem de inibição do DPPH e por regressão linear foi calculado o IC₅₀, ou seja, a concentração da amostra que reduz 50% da concentração inicial de DPPH. Os GRÁFICOS 3 a 12 apresentam os 5 pontos das concentrações utilizadas para cada amostra com sua respectiva porcentagem de atividade antioxidante do radical DPPH.

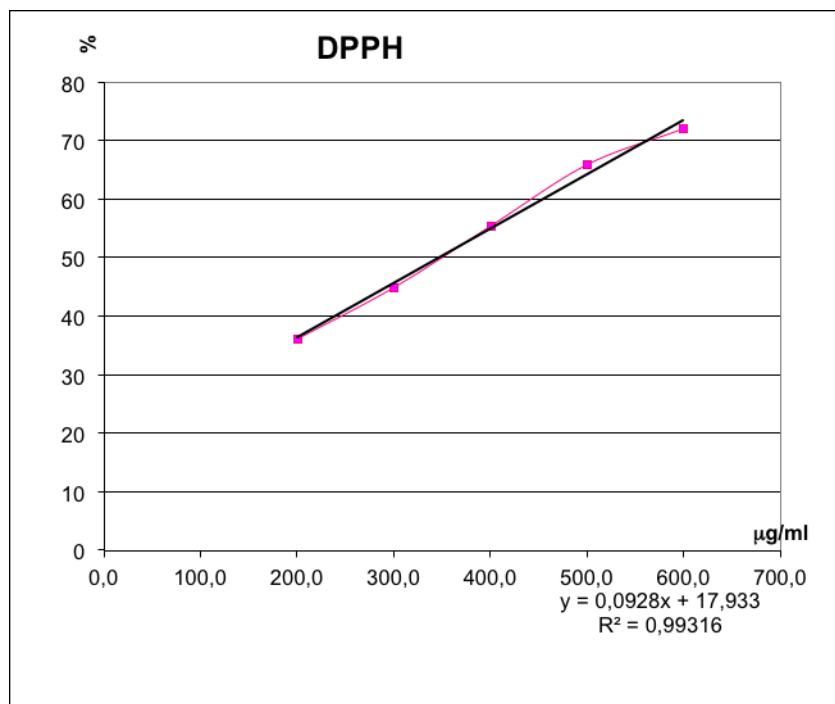


GRÁFICO 3 – CURVA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *M. clavigera*
 FONTE: A autora, 2014

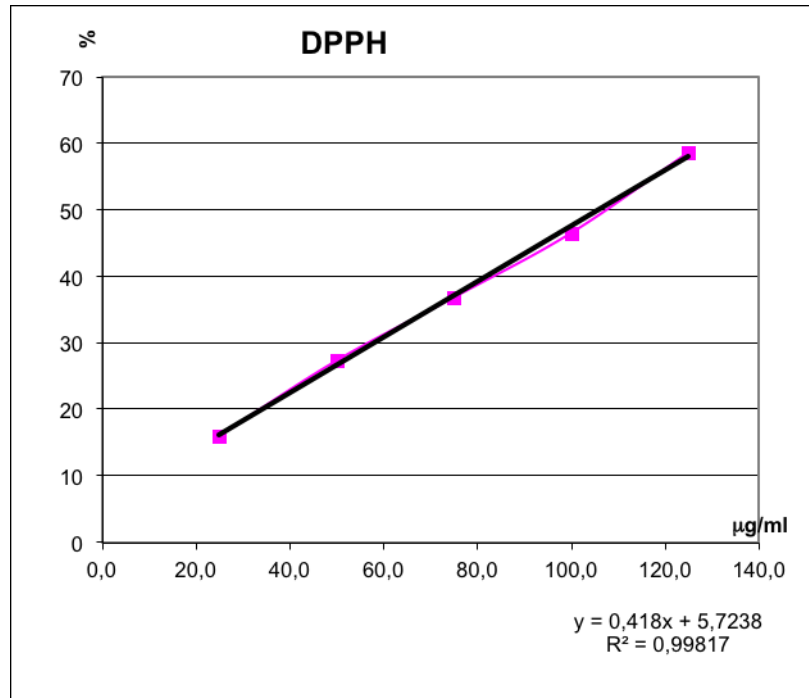


GRÁFICO 4 – CURVA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DE FOLHAS DE *M. clavigera*
FONTE: A autora, 2014

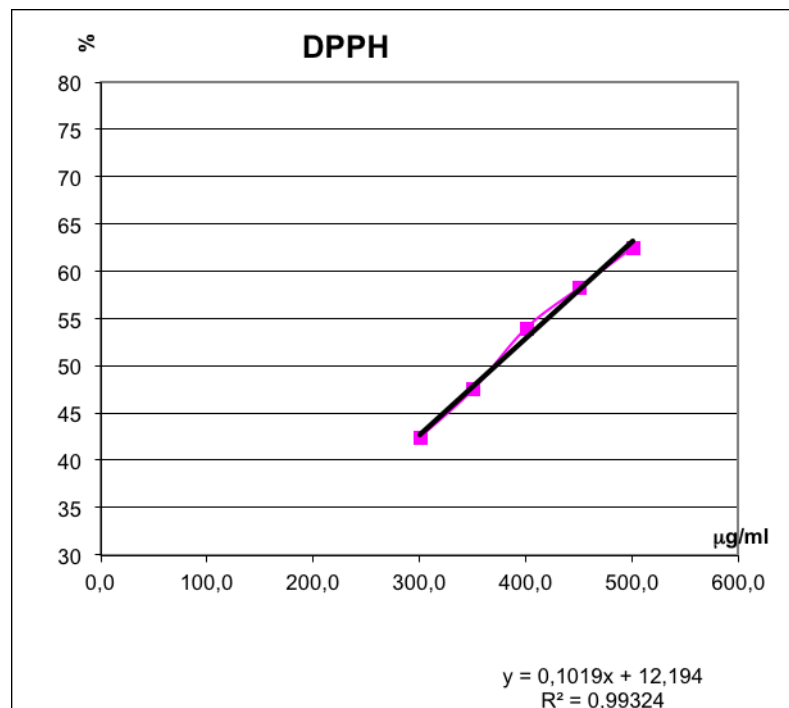


GRÁFICO 5 – CURVA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELA REMANESCENTE DAS FOLHAS DE *M. clavigera*
FONTE: A autora, 2014

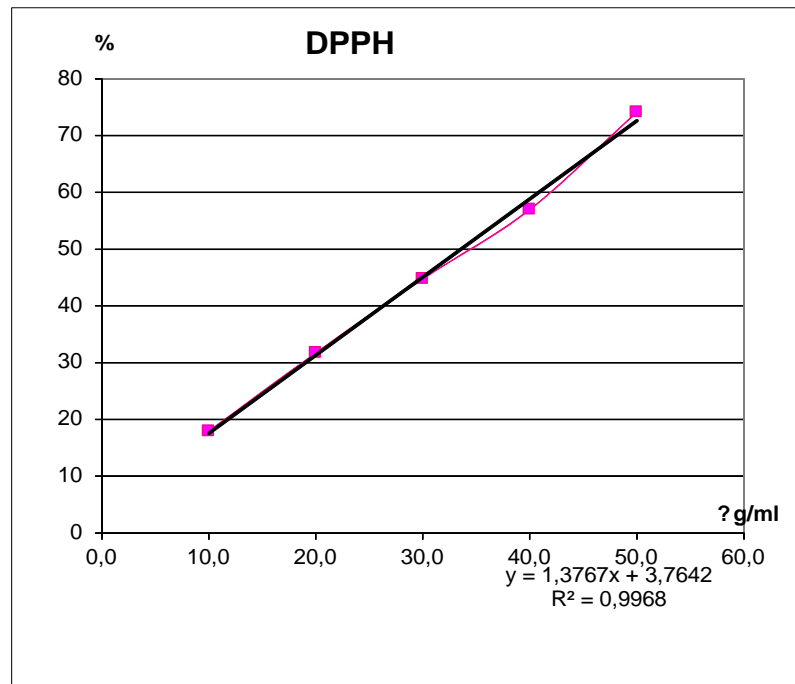


GRÁFICO 6 – CURVA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE CAULES DE *M. clavigera*
FONTE: A autora, 2014

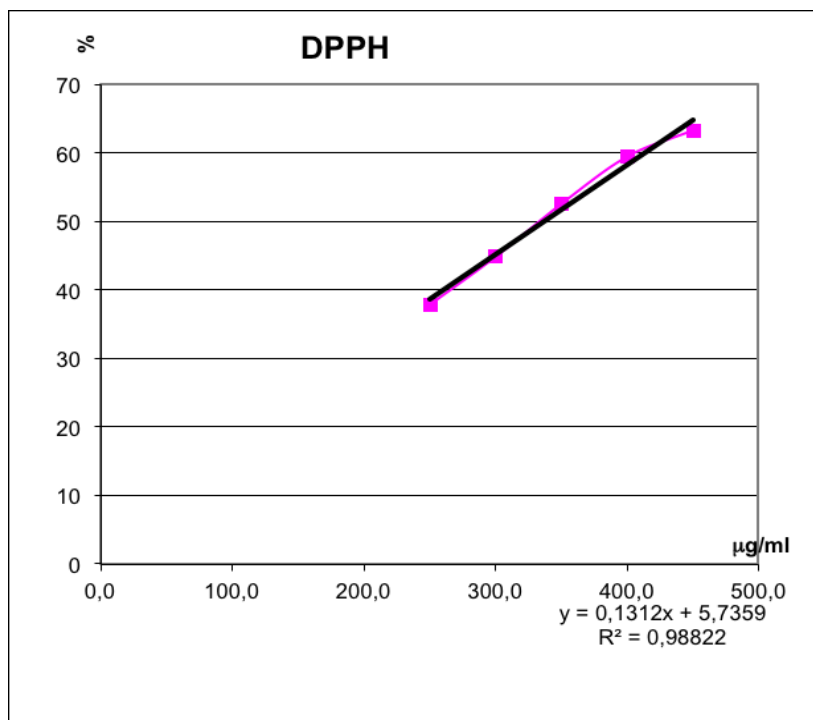


GRÁFICO 7 – CURVA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELA FRAÇÃO HEXANO DE CAULES DE *M. clavigera*
FONTE: A autora, 2014

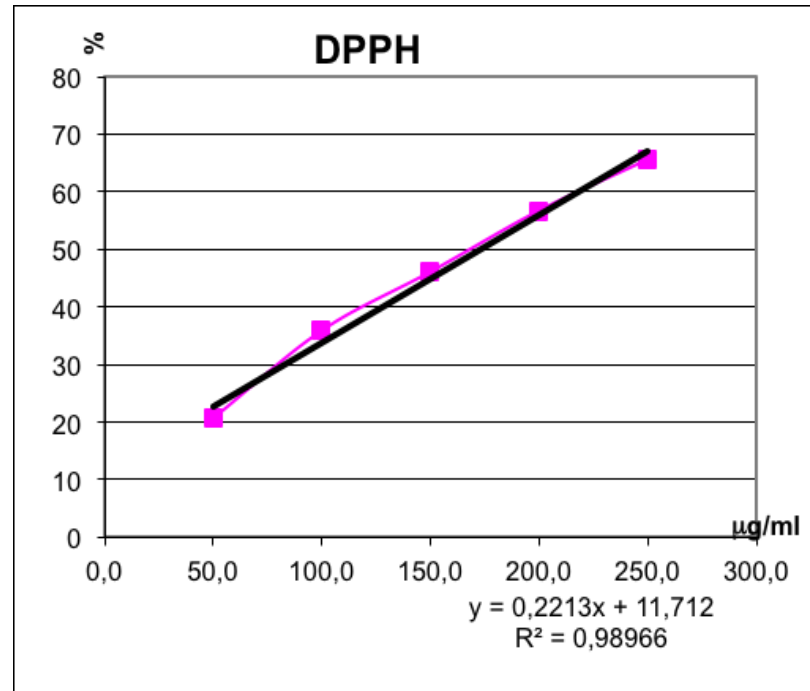


GRÁFICO 8 – CURVA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DE CAULES DE *M. clavigera*
 FONTE: A autora, 2014

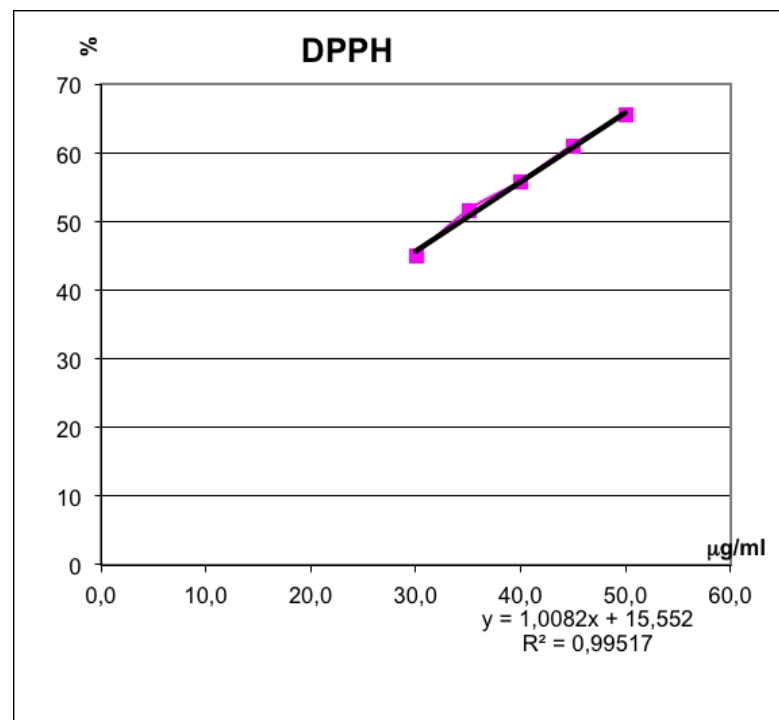


GRÁFICO 9 – CURVA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE CAULES DE *M. clavigera*
 FONTE: A autora, 2014

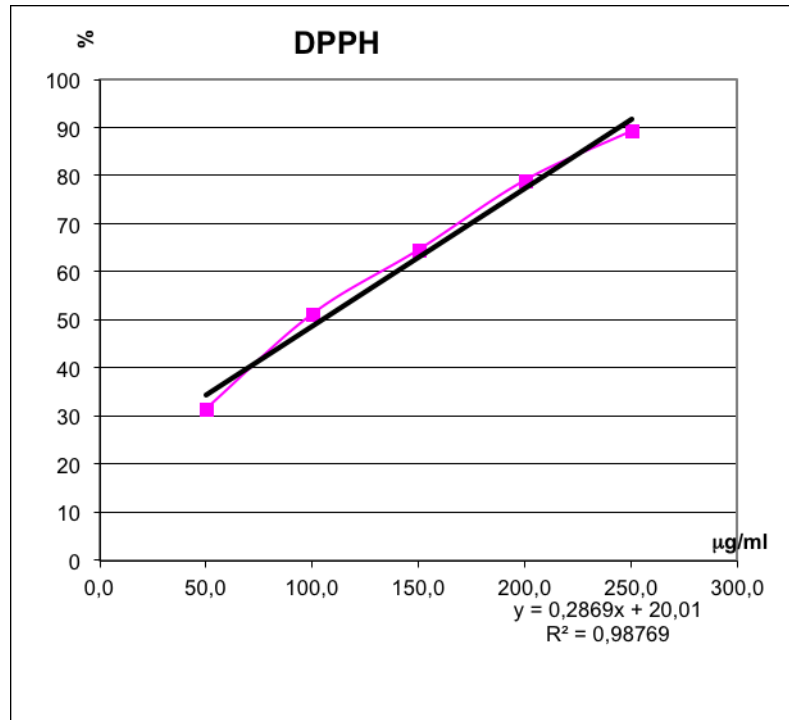


GRÁFICO 10 – CURVA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELA FRAÇÃO REMANESCENTE DE CAULES DE *M. clavigera*
 FONTE: A autora, 2014

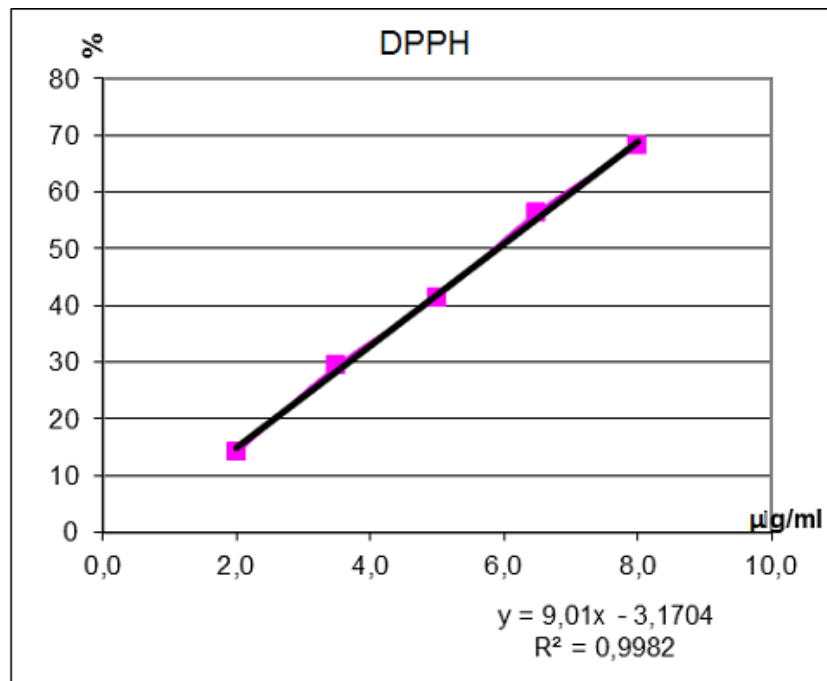


GRÁFICO 11 - CURVA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELO PADRÃO VIT. C
 FONTE: A autora, 2014

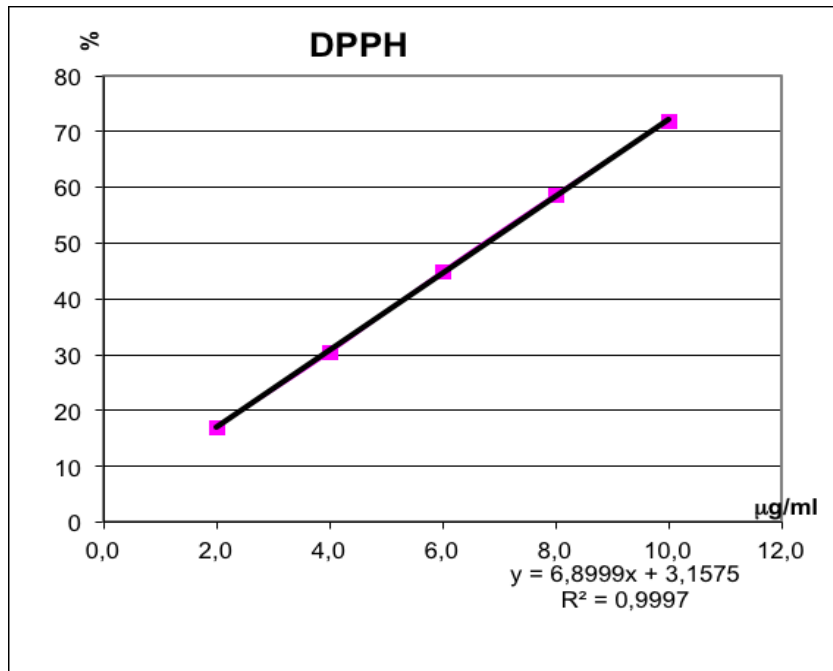


GRÁFICO 12 – CURVA GERADA PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH PELO PADRÃO RUTINA
 FONTE: A autora, 2014

Os resultados de IC_{50} correspondem às médias das triplicatas mais o desvio padrão. Quanto menor for o valor do IC_{50} , maior é a capacidade antioxidante da substância. Os resultados foram analisados estatisticamente, para verificar a diferença estatística entre as amostras utilizando-se ANOVA e para localizar as diferenças o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Comparando os valores de IC_{50} obtidos (TABELA 13) para as amostras e padrões analisados (vitamina C com $IC_{50} = 5,98 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$; rutina com $IC_{50} = 6,79 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$) podemos concluir que o extrato bruto etanólico dos caules apresentou o melhor desempenho ($IC_{50} = 33,59 \pm 0,82 \mu\text{g/mL}$), assim como a fração acetato de etila dos caules ($IC_{50} = 34,16 \pm 0,58 \mu\text{g/mL}$). Amostras estas que não diferem estatisticamente. No doseamento de polifenóis, o extrato bruto etanólico dos caules (288,93 mg EAG/g) e a fração acetato de etila dos caules (314,78 mg EAG/g) apresentaram o conteúdo de polifenóis mais elevados. Fato este que corrobora o bom desempenho destas frações na atividade antioxidante, visto que compostos fenólicos desempenham um papel importante no sequestro de radicais livres.

TABELA 13 – RESULTADO DE IC₅₀ E TESTE DE TUKEY PARA REDUÇÃO DO DPPH NOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS E CAULES *M. clavigera*.

AMOSTRA	IC ₅₀ (µg/mL)	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE TUKEY*
EXTRATO BRUTO FOLHA	345,30	e
HEXANO FOLHA	> 500	g
CLOROFÓRMIO FOLHA	106,24	c
ACETATO DE ETILA FOLHA	> 500	g
REMANESCENTE FOLHA	358,37	f
ÓLEO	> 500	g
EXTRATO BRUTO CAULE	33,59	b
HEXANO CAULE	337,40	e
CLOROFÓRMIO CAULE	173,08	d
ACETATO DE ETILA CAULE	34,16	b
REMANESCENTE CAULE	104,54	c
VITAMINA C	5,98	a
RUTINA	6,79	a

FONTE: A autora, 2014

NOTA: *Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente

As frações hexano e acetato de etila das folhas, assim como o óleo apresentaram IC₅₀ acima de 500 µg/mL, o que caracteriza a não atividade pela redução do radical DPPH.

O óleo essencial não apresentou atividade antioxidante na redução do radical DPPH, sendo considerado ineficiente como sequestrador de radicais livres. Isso pode ser explicado pelo fato do óleo essencial de *M. clavigera* ter apresentado uma composição exclusiva de terpenos, com ausência de fenilpropanóides, compostos estes caracterizados por suas propriedades sequestradoras de radicais livres.

Segundo Chew *et al.* a capacidade antioxidante por sequestro de radicais livres pode ser classificada da seguinte maneira: alta (IC₅₀ inferiores a 50 µg/mL) , média (IC₅₀ entre 50 e 100 µg/mL) e baixa (IC₅₀ acima de 100 µg/mL). Assim sendo, a fração acetato de etila e o extrato bruto etanólico dos caules demonstraram uma alta atividade antioxidante, enquanto o extrato bruto etanólico e as frações

clorofórmio e remanescente das folhas e as frações hexano, clorofórmio e remanescente dos caules apresentaram uma baixa atividade.

Podemos sugerir que os compostos com maior potencial antioxidante estão presentes nos caules de *M. clavigera*, solúveis no solvente de média polaridade, e que os compostos presentes no extrato bruto etanólico ajam de forma sinérgica contribuindo para o alto potencial antioxidante do mesmo.

Duque *et al.* (2011), Murillo *et al.* (2011) e Sanchez-Peralta *et al.* (2014) destacam a atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas de *M. racemosa* através do método de DPPH, conferindo esta ação a presença de compostos fenólicos na espécie.

Os resultados obtidos foram diferentes entre os testes antioxidantes realizados: Redução do Complexo Fosfomolibdênio e Sequestro de Radical Livre DPPH. Este fato pode ser explicado pelos diferentes mecanismos de reações envolvidos entre os compostos com características antioxidantes presentes nas amostras e os reagentes destas técnicas, apresentando maior ou menor afinidade por estes, conforme foi descrito por Sánchez-Moreno (2002).

6 CONCLUSÃO

A espécie *M. clavigera*, pertencente à família Monimiaceae, 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, flavonoides, esteroides, triterpenos e saponinas.

Em análise cromatográfica (CG/EM) do óleo essencial extraído das folhas de *M. clavigera* identificou-se a presença majoritária dos sesquiterpenos β - elemeno (14,38%), β - selineno (12,52%), α - selineno (9,79%), cariofileno (8,31%) e copaeno (6,48%). Realizou-se também a caracterização do óleo pela definição de parâmetros como características organolépticas, densidade, solubilidade em etanol e índice de refração

O ensaio de toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina* mostrou níveis de toxicidade significativos no extrato bruto etanólico das folhas e nas frações hexano, clorofórmio e no extrato bruto etanólico dos caules, destacando-se porém os resultados obtidos na fração hexano das folhas e no óleo essencial. Na avaliação da atividade hemolítica evidenciou-se níveis expressivos de hemólise, principalmente na fração hexano dos caules nas concentrações de 100 e 250 $\mu\text{g/mL}$.

Avaliando a atividade larvicida sobre o *Aedes aegypti* pode-se inferir que as frações hexano das folhas e dos caules apresentaram resultados relevantes. Este ensaio apesar de avaliar a atividade larvicida também nos apresenta indícios que corroboram com os ensaios de toxicidade por avaliarem doses letais sobre as larvas de *Aedes aegypti*. Observa-se que assim como os demais ensaios as frações hexano das folhas e caules apresentaram maior toxicidade.

A avaliação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana indicou que a fração hexano das folhas apresentou um bom potencial inibitório sobre a bactéria gram positiva *S. epidermidis*, através do emprego da metodologia de microdiluição em caldo.

A atividade antioxidante, nas duas metodologias empregadas, mostrou resultados bem expressivos. Pelo método da redução do fosfomolibdênio o óleo essencial apresentou a melhor atividade, 86,47% em relação ao padrão vitamina C. Já no método de sequestro de radicais livres (DPPH) as amostras que apresentaram

maior capacidade antioxidante foram a fração acetato de etila dos caules assim como o extrato bruto etanólico dos caules. A ação antioxidante destas duas amostras pode ser explicada por as mesmas terem apresentado a maior quantidade de polifenóis no doseamento de fenólicos totais através do uso do reagente de Folin Ciocalteu.

Tendo em vista os resultados obtidos nos ensaios realizados, mostra-se de suma importância a continuidade do isolamento e identificação dos compostos responsáveis por tais atividades, com destaque para as frações hexano e acetato de etila dos caules e a fração hexano das folhas, as quais mostraram um desempenho bastante significativo e relevante.

Este trabalho contribuiu para o enriquecimento dos dados a respeito da espécie *M. clavigera* Tul., que anteriormente se limitava ao levantamento botânico, além de revelar atividades interessantes que necessitam de estudos complementares.

REFERÊNCIAS

AHARONI, A. *et al.* Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 5, p. 49 - 58, 2006.

ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202 - 2210, 2010.

ALVES, E. G. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224 - 1229, 2008.

AMARANTE, C. B. *et al.* Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, v. 41, p. 431 - 434, 2011.

ARRUDA, C, *et al.* Oxidação do β -citronelol e do β -cariofileno por peróxido de hidrogênio catalisada por sistema mimético ao citocromo p-450. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 35, 2014.

ASEM, A. Historical record on brine shrimp *Artemia* more than one thousand years ago from Urmia Lake, Iran. **Journal of Biological Research**, p. 113 – 114, 2008.

BACKHOUSE, N. *et al.* Antiinflammatory and antipyreticeffects of boldine. **Agents and Actions**, v. 42, p. 114 - 117, 1994.

BANDONI, A. L.; CZEPACK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil**. Edufes, 624p. Vitória, 2008.

BANERJEE, A. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin. Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, p. 134 - 139, 2008.

BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446 - 475, 2008.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113 - 123, 2006.

BARRERO, A. F. *et al.* Efficient synthesis of the anticancer b-elemene and other bioactive elemanes from sustainable germacrone. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, p. 118 – 125, 2011.

BASILIA, D., YUAN C. S. Effects of dietary supplements oncoagulation and platelet function. **Thrombosis Research**, v. 117, p. 49 - 53, 2005.

BAUER, A. W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493 - 496, 1966.

BEDNARCZUK, V. O. *et al.* Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 2, p. 43-50, 2010.

BIZZO, H. R. *et al.* Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588 - 594, 2009.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Zaragoza: Acribia S.A., 1991. 594 p.

CARR, G. *et al.* Hortonones A to C, Hydroazulenones from the Genus Hortonia. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 1189 – 1191, 2012.

CARVALHO, L. A. F., SILVA I. G. Avaliação longitudinal da atividade do temephós a 1% sobre o *Aedes aegypti* (Lin,1762). **Entomologia y Vectores**, v. 7, p. 191 - 201, 2000.

CARVALHO, J. L. S. *et al.* Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., brassicaceae por sistema Soxhletmodificado. **Química Nova**, v.32, n.4, p. 1031 – 1035, 2009

CECHINEL FILHO, V. *et al.* Strategies for obtaining pharmacologically active compounds from medicinal plants: concepts about structural modification for improve the activity. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99 - 105, 1998.

CHEN, C. Y, *et al.* Liriodenine induces G1/S cell cycle arrest in human colon cancer cells via nitric oxide- and p53-mediated pathway. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 10, p. 1460 - 1468, 2012.

CHEN, Z. F, *et al.* Synthesis, characterization, and in vitro antitumor properties of gold(III) compounds with the traditional Chinese medicine (TCM) active ingredient liriodenine. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 247 - 261, 2012.

CHEW, Y. L *et al.* Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. **BMC Complementary and Alternative medicine**, v. 11, n. 12, 2011.

CLAROS, B. M. G., *et al.*; Chemical constituents of two *Mollinedia* species. **Phytochemistry**, v. 55, p. 859 – 862, 2000.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard – Eight edition. M7-A8, 2009.

COSTA, F. F., *et al.* Leaf Anatomy and histochemistry of *Macropeplus dentatus* (Perkins) I. Santos & Peixoto and *Macropeplus ligustrinus* (Tul.) Perkins (Monimiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 3, p. 852 - 861, 2010..

COSTA, J. G. M. *et al.* Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 4, p. 583 - 586, 2008.

DUQUE, J. F. S. *et al.* Valoración del potencial antioxidante de *Mollinedia racemosa* (romadizo). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 16, p. 151 -163, 2011.

FARIAS, M. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Capítulo 12, Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. Editora UFSC e UFRGS, 6ª edição. Florianópolis e Porto Alegre, 2010.

FARMACOPEIA Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ Fundação Oswaldo Cruz. 5. ed., v. 1. Brasília: Anvisa, 2010.

FERNÁNDEZ, J. *et al.* Effect of boldo (*Peumus boldus* Molina) infusion on lipoperoxidation induced by cisplatin in mice liver. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 1024 -1027, 2009.

FIGUEIREDO, A. C. *et al.* Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile componentes and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, n. 4, p. 213 - 26, 2008.

FLORA DIGITAL DO RIO GRANDE DO SUL
(http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=6276). Acesso em: 03/2014

GALLORI, S. *et al.*, Identification of Volatile Constituents of *Tambourissa leptophylla*. **Planta Medica**, v. 67, p. 290 - 292, 2001.

GARCEZ, W. S. *et al.* Substâncias de Origem Vegetal com Atividade Larvicida Contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 363 - 393, 2013.

GHISALBERTI, E. L. Detection and isolation of Bioactive Natural Products. In COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. **Bioactive Natural Products. Determination, Isolation and Structural Determination.**, 2 ed., p. 13 - 15, 2008.

GUIMARÃES V. P. *et al.* Atividade larvicida do extrato bruto etanólico de *Magonia pubescens* St. Hil. Sobre *Aedes albopictus* (Skuse,1894) (Diptera, Culicidae). **Revista de Patologia Tropical**, v. 34. p. 159 - 165, 2001.

HENNEBERG, R. Estudo do efeito antioxidante de polifenóis em eritrócitos de 108 portadores de hemoglobina S. Tese (Doutorado) em Ciências Farmacêuticas – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2013.

IGLESIAS, O. V. *et al.* Macroalgas de la plataforma insular Cubana como fuente de extractos bioactivos. **Avicennia**, v. 16, p. 36 - 45, 2003.

JAVAÉ, N. R. K. Possível toxicidade reprodutiva de *S. guianensis* – revisão de Literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, 2014.

JOHNSON, M. A.; CROTEAU, R. Biosynthesis of Ascaridole: Iodide Peroxidase-Catalyzed Synthesis of a Monoterpene Endoperoxide in Soluble Extracts of *Chenopodium ambrosioides* Fruit. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 235, n. 1, p. 254 - 266, 1984.

JOLY, A. B. Botânica – **Introdução à Taxonomia Vegetal**. 7^o edição. São Paulo: Companhia Editora Nacional; 1985.

LEITÃO, G. G. *et al.* Chemistry and pharmacology of Monimiaceae: a special focus on *Siparuna* and *Mollinedia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 65, p. 87 - 102, 1999.

LIMA, I. O. *et al.* Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.1 6, p. 197 - 201, 2006.

LIN, C. H., *et al.* Pharmacological characteristics of liriodenine, isolated from *Fissistigma glaucescens*, a novel muscarinic receptor antagonist in guinea-pigs. **British Journal of Pharmacology**, v. 113, p. 275 - 281, 1994.

LOPEZ, J. A. *et al.* Mollinedine, a new alkaloid from *Mollinedia costaricensis*. **Journal of Natural Products**, v. 51, p. 754 - 759, 1988.

MARQUES, C. A. *et al.* Considerações anatômicas e análise de óleo essencial do hipanto e do fruto de *Hennecartia omphalandra* J. Poisson (Monimiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 415 - 429, 2008.

MARQUES, C. A. *et al.* Anatomia e análise de óleo essencial das folhas de *Hennecartia omphalandra* J. Poisson (Monimiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 95 - 105, 2009.

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

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

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

MOREIRA, D. L.; LEITÃO, G. G. Quantitative Determination of Liriodenine and Moupinamide in Five Species of *Mollinedia* by High Performance Liquid Chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 12, n. 4, p. 223 - 225, 2001.

MURILLO, E. *et al.* Química y Funcionalidad Biológica de *Mollinedia racemosa* (Monimiaceae). **Información Tecnológica**, v. 22, p. 3 - 14, 2011.

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 503 - 515, 2010.

NOVAES, F. S. *et al.* Wood anatomy of *Mollinedia glabra* (Spreng.) Perkins (Monimiaceae) in two Restinga Vegetation Formations at Rio das Ostras, RJ, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, p. 915 – 924, 2010.

OWEN, S. M. ; PEÑUELAS, J. Opportunistic emissions of volatile isoprenoids. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 9, p. 420 - 426, 2005.

PAN, S. *et al.* Historical Perspective of Traditional Indigenous Medical Practices: The Current Renaissance and Conservation of Herbal Resources. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

PARK I. K. *et al.* Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1866 - 1870, 2002.

PEIXOTO, A. L.; LIRIO, E. J. *Monimiaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB166>>. Acesso em: 20/12/2014.

PEQUENO, N. F.; SOTO-BLANCO, B. Toxicidade in vitro de plantas tóxicas: avaliação do teste de ação hemolítica. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 1, p. 45 - 48, 2006.

PEREIRA, R. J. ; CARDOSO M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes (Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146 - 152, 2012.

PETROBRÁS Normas técnicas. Norma técnica N-2588. Determinação da toxicidade aguda de agentes tóxicos em relação à *Artemia sp.*, 1996.

PHARMACOPOEA Helvetica. Berne: Département Fédéral de l'Intérieur, 1990.

PINTO, A. C. *et al.* Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45 - 61, 2002.

PHILIPSON, W. R. A classification of the Monimiaceae - an additional note. **Nordic Journal of Botany**, Copenhagen, v. 8, n. 1, 1998.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 237 - 243, 2001.

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.

QUEZADA, N. *et al*, Antioxidant activity of crude extract, alkaloid fraction and flavonoid fraction from boldo (*Peumus boldus* Molina) leaves. **Journal Food Science**, v. 69, p. C371-C376, 2004.

REFLORA. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil>. Acesso em 06/2013.

RENNER, S. S. *et al*. Biogeography of the Monimiaceae (Laurales): a role for East Gondwana and long-distance dispersal, but not West Gondwana. **Journal of Biogeography**, v. 37, p.1227 - 1238, 2010.

RICE-EVANS, C. A. *et al*,. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**, v. 22, p. 375 - 383, 1995.

ROBBERS, J. E. *et al*. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, p. 159, 1997.

RUIZ, A. L. T. G. *et al*. Farmacologia e Toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 295 - 300, 2008.

SÁNCHEZ-MORENO C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science Technology International**, v. 8, p. 121 - 137, 2002.

SANCHEZ-PERALTA, W. E. *et al*. Caracterización química preliminar y evaluación de la actividad antioxidante in vitro y antiinflamatoria in vivo de los extractos y fracciones de diferente polaridad de *Mollinedia racemosa* (Romadizo). **Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica**, v. 21, 2014

SANTOS, I. S.; PEIXOTO, A. L. Taxonomia do gênero *Macropeplus* Perkins (Monimiaceae, Monimioideae). **Rodriguesia**, v. 52, p. 65 - 105, 2001.

SANTOS C. Z. *et al.* Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Peumus boldus* (Monimiaceae) frente à levedura da espécie *Candida albicans*. **Visão Acadêmica**, v. 15, n. 2, 2014.

SCHIFF JR, P. L. *et al.* Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives, **Pergamon**, v. 11, 1996.

SCHERER, C. *et al.* Pollen morphology of the species of Hernandiaceae, Monimiaceae and Siparunaceae from the Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas, Brazil. **Journal of Research in Biology**, v. 7, p. 535 - 542, 2011.

SCIELO. Disponível em: www.scielo.br. Acesso em: 12/2014.

SILVA, A. R. **Tudo sobre Aromaterapia**. Roca, 624 p. São Paulo, 1998.

SILVA, H. H. G. *et al.* Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil.(Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 396 - 399, 2004.

SILVA, I. G. *et al.* Efeito larvicida e toxicológico do extrato bruto etanólico da casca do caule de *Magonia pubescens* sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) em criadouros artificiais. **Revista de Patologia Tropical**, v. 32, p. 73 - 86, 2003.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Capítulo 18, Óleos voláteis. Editora UFSC e UFRGS, 6ª edição. Florianópolis e Porto Alegre, 2010.

SINGLETON, V. L. ; ROSSI JR, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144 - 158, 1965.

SIQUEIRA, J. M. *et al.* Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii*- annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* leach. **Química Nova**, v. 21, n. 5, 1998.

SOUSA, C. M. M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351 - 355, 2007.

SOUZA, T. J. T. *et al.* Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 368 - 372, 2007.

TAIZ, L. ; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Artmed, 3^o edição. Porto Alegre, 2004.

TRÓPICOS. Disponível em: www.tropicos.org/Name/100351648?projectid=3, Acesso em: 08/ 2014.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 290 - 306, 2006.

VALDÉS, A. F. C. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. **Revista Cubana de medicina tropical**, v. 61, n. 3, p. 254 - 258, 2009.

VALENTINI, C. M. A: *et al.* *Siparuna guianensis* Aublet (negramina): uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 1, 2010.

VILA, R. *et al.* Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Peumus boldus* leaves. **Planta Medica**, v. 65, p. 178 - 179, 1999.

VOGEL H. *et al.* Studies of genetic variation of essential oil and alkaloid content in boldo (*Peumus boldus*). **Planta Medica**, v. 65, p. 90 - 91, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION.1981a. **Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides**. Geneva.

WORLD HEALTH ORGANIZATION.1981b. **Criteria and Meaning of Tests for Determining the Susceptibility or Resistance of Insects to Insecticides**. Geneva

YODER, B. J. *et al.* Tambouranolide, a new cytotoxic hydroxybutanolide from a *Tambourissa* sp. (Monimiaceae). **Natural Product Research**, v. 21, p. 37 - 41, 2007.

YOUN, Y. C. *et al.* Protective effect of boldine on dopamine-induced membrane permeability transition in brain mitochondria and viability loss in PC12 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, p. 495 - 505, 2002.