

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA FREITAS DE OLIVEIRA

MORFOANATOMIA, CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS  
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Psychotria fractistipula* L.B. Sm., Klein &  
Delprete (RUBIACEAE).

CURITIBA

2015

CAMILA FREITAS DE OLIVEIRA

MORFOANATOMIA, CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS  
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Psychotria fractistipula* L.B. Sm., Klein &  
Delprete (RUBIACEAE).

Dissertação apresentada ao programa de  
Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas  
do Setor de Ciências da Saúde, da  
Universidade Federal do Paraná, como  
requisito parcial à obtenção do título de  
mestre em Ciências Farmacêuticas.  
Orientação: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marilis Dallarmi  
Miguel  
Co-orientação: Prof. Dr. Obdulio Gomes  
Miguel.

CURITIBA

2015

Oliveira, Camila Freitas de  
Morfoanatomia, caracterização fitoquímica e avaliação das atividades biológicas de  
*Psychotria fractistipula* L. B. Sm., Klein & Delprete (Rubiaceae) / Camila Freitas de  
Oliveira – Curitiba, 2015.  
101 f. il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Marilis Dallarmi Miguel

Coorientador: Professor Dr. Abdullio Gomes Miguel

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

Inclui bibliografia

1. *Psychotria fractistipula*. 2. Morfoanatomia. 3. Fitoquímica. 4. Atividade biológica.  
5. DPPH. 6. Fodfomolibdênio. I. Miguel, Marilis Dallarmi. II. Miguel, Abdullio Gomes.  
III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

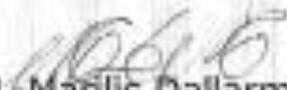
CDD 615.321

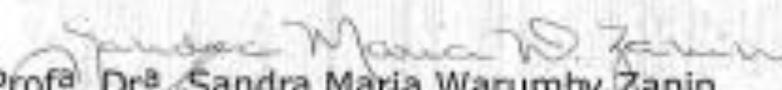
## TERMO DE APROVAÇÃO

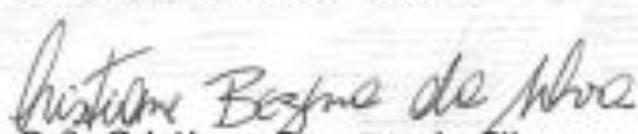
**CAMILA FREITAS DE OLIVEIRA**

Título: **"MORFOANATOMIA, CARACTERIZAÇÃO  
FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DE *Psychotria fractistipula* L.B. Sm., Klein &  
Delprete (RUBIACEAE)"**

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

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Maria Warumby Zanin  
Universidade Federal do Paraná

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Bezerra da Silva  
Faculdades Integradas Espírita

Curitiba, 09 de fevereiro de 2015.

Dedico esse trabalho a meus pais, Dirceu e Maria Lúcia, que sempre me apoiaram e não contiveram esforços para minha formação.

## **Agradecimento**

À Deus pelo dom vida e por iluminar o meu caminho todos os dias.

A minha mãe, Maria Lúcia, pelo amor e pelos esforços para me ver feliz, que sempre foi modelo de caráter e competência, sendo exemplo a ser seguido.

Ao meu Pai, Dirceu, que sempre me demonstrou amor, atenção e incentivou meus estudos.

Aos meus irmãos, Fernanda e Daniel, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos, sendo os melhores companheiros de uma vida.

Ao meu Noivo, Paulo Ricardo, pelo apoio, compreensão e incentivo, sendo essencial para que esse trabalho fosse concluído.

Aos meus avôs maternos, pelas orações, e aos avôs paternos pelas interseções.

A Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em ciências farmacêutica pela oportunidade.

Aos meus orientadores, Dra Marilis Dallarmi Miguel e Obdulio Gomes Miguel, pela confiança, ensinamento, dedicação e amizade.

A todos os professores do programa de graduação de ciências Farmacêuticas por repassarem os seus conhecimentos.

A Profª Drª Cleusa Bona, do Departamento de Botânica da UFPR, por ceder seu laboratório e disponibilizar tempo para me auxiliar nas caracterizações morfológicas.

Ao Biólogo Osmar dos Santos dias, pela identificação botânica.

Ao departamento de química da Universidade Federal do Paraná pelos espectros de ressonância magnética nuclear.

A professores, Josiane Dias, Sandra Zanin e Vitor Kerber, pelos ensinamentos e pela amizade.

Ao coordenador Prof. Dr. Roberto Pontarolo, por sempre estar disposto a ajudar.

Aos técnicos de laboratório, Paulo Diniz, Luciane Mendes, Maria da Graça e Nilson por sempre estarem dispostos a ajudar.

Ao secretario Jean Godoi, por todo o auxílio e dedicação.

As funcionárias da limpeza, pela dedicação e alegria.

A meus amigos e colegas: Angela Souza pela ajuda na microbiologia e pelas correções desse trabalho, contribuindo muito para meu crescimento científico; Cristiane Bezerra essencial para a realização de técnica de *Aedes*, dedicando seu tempo para a realização dessa prática; Vinicius Bednarczuk por toda a ajuda prestada em toda realização deste trabalho, pelas "dicas" e observações.

A Hellen Abreu, Samanta Golin, Isabel Mignoni (Bel), Fernanda Ocampos, Ellis Szado e Maislian pelo auxílio nas práticas, pela amizade e pelas conversas descontraídas.

A minha Amiga Vanessa Bobek, que me incentivou a entrar no mestrado e auxiliou na morfologia.

As minhas colegas de mestrado Fernanda, Beatriz, Taila e Janice, obrigada pela amizade e carinho.

A todo nosso grupo de pesquisa pelo auxílio e carinho, somos mais que colegas, somos amigos.

## RESUMO

A espécie *Psychotria fractistipula* L.B. Sm., Klein & Delprete, pertence família Rubiaceae, é encontrada no Paraná e Santa Catarina, na região da Floresta Atlântica. A ausência de trabalhos sobre essa espécie motivou o desenvolvimento desse estudo, que teve por objetivos investigar a composição química desta espécie vegetal verificando suas atividades biológicas e antioxidantes, além de analisar suas características morfológicas. A material botânico foi coletado no Capão do Cifloma, dependências da UFPR, Campus Jardim Botânico nos meses de março e abril de 2014 e identificado por um botânico especialista. A caracterização morfológica foi realizada de acordo com metodologia padrão de microscopia ótica e eletrônica. O extrato bruto da folha e do caule, obtido a partir do material seco, foi fracionado com solventes de polaridade crescente para obter as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e remanescente. As atividades dos extratos e frações foram: toxicidade frente a *Artemia salina*; larvicida contra *Aedes aegypti*; atividade antimicrobiana pelo método CIM; atividade hemolítica, doseamento de fenóis totais pelo método de Folin Ciocalteau; atividades antioxidantes pelos métodos de fosfomolibdênio e DPPH. A *Psychotria fractistipula* apresentou folhas pecioladas e base atenuada em pecíolo. A lamina foliar apresenta cutícula lisa em ambas as superfícies, estômato paracítico e mesofilo dorsiventral. Os tricomas foram encontrados tanto nas folhas quanto nos caules. Na fração hexânica do caule foram identificados os fitoesteróides  $\beta$  –sitosterol e campesterol. Nos ensaios biológicos frente a *Artemia salina* foi encontrado toxicidade nas frações acetato de etila da folha e do caule e na fração remanescente da folha. A atividade larvicida contra *Aedes aegypti* foi verificada na fração hexânica do caule, porém alterações morfológicas foram avaliadas para todas as frações. Os extratos brutos e frações acetato de etila das folhas e caule apresentaram atividade antimicrobiana significativa *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. A fração hexânica da folha em 1.000  $\mu\text{g.mL}$  apresentou hemólise de 75,12% quando comparada ao controle. Com relação ao teor de fenóis totais, todas as amostras apresentam estes compostos em sua constituição destacando os extratos brutos e as frações acetato de etila de ambas as partes morfológicas. As frações acetado de etila da folha e do caule apresentaram atividade antioxidante de fosfomolibdênio e DPPH semelhante aos padrões utilizados.

Palavra-chave: *Psychotria fractistipula*, morfoanatomia, fitoquímica, atividade biológica, DPPH e fosfomolibdênio.

## Abstract

The *Psychotria fractistipula* L.B. Sm., Klein & Delprete species, which belongs to the Rubiaceae family, is found in Paraná and Santa Catarina Brazilian Atlantic Florest. The species lack of researches was the main motivation of this work, which aims to investigate the species chemical composition analyzing its biological and antioxidant activities, besides studying its morphological characteristics. All botanical material was collected at the Capão do Cifloma, inside the Jardim Botânico UFPR campus, between March and April 2014. A taxonomist identified the material, and its morphological characterization were performed according to the optical and electron microscopy standards. The leaf and stem gross extract, obtained from the dry materials, was fractionized using increasing polarity solvents in order to obtain the hexane, chloroform, ethyl acetate and remaining fractions. The extract and fractions activities found were: toxicity front *Artemia salina*, larvicide against the *Aedes aegypti*, antimicrobial activity by the CIM method, hemolytic activity, total phenols dosage by the Folin Ciocalteau method, antioxidant activities by the phosphomolibdenic method and DPPH. The *Psychotria fractistipula* presented petiolate leaves and petiole attenuated basis. The leaf blade presented smooth cuticle on both surfaces, paracitic stomata, dorsiventral mesophyll, and the trichomes were found in the leaves and stems. In the stalk hexane fraction were identified the  $\beta$ -sitosterol e campesterol phytosterols. In the biological assays on *Artemia salina*, toxicity was found in the ethyl acetate of the leafs and stem, and in the remaining portion of the leafs. The larvicidal activity on *Aedes aegypti* was observed in the hexane fraction of the stem, however morphological changes were evaluated for all fractions. Gross extracts and fractions of ethyl acetate leaves and stems showed significant antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. The hexane fraction of leaf in 1,000  $\mu\text{g.mL}$  presented 75.12% hemolysis when compared to the control. Regarding the total phenols, all samples presented these compounds in its constitution highlighting the extracts and ethyl acetate fractions of both morphological regions. The leaves and stem Ethyl acetate fractions showed fosfomolibdenum antioxidant activity in DPPH similar to the standards employed.

Key-words: *Psychotria fractistipula*, morphoanatomy, phytochemical, biological activities, DPPH, phosphomolybdenum.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - EXTRUTURA QUÍMICA DA N,N-DIMETILTRIPTAMINA (DMT) E DA SEROTONINA (5HT) .....	25
FIGURA 2 - PRINCIPAIS NÚCLEOS ALCALOÍDICOS.....	28
FIGURA 3 - ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONOIDES .....	30
FIGURA 4 - EXSICATA DE <i>P. fractistipula</i> .....	31
FIGURA 5 - FLUXOGRAMA DOS ESTUDOS FITOQUÍMICO E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS REALIZADOS EM PARTES AÉREAS DE <i>Psychotria fractistipula</i> .....	32
FIGURA 6 - ESQUEMA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM DPPH .....	47
FIGURA 7 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS EXTERNAS DE <i>Psychotria fractistipula</i> .....	49
FIGURA 8 - <i>Psychotria fractistipula</i> - CORTE PARADÉRMICO E SECÇÃO TRANSVERSAL DA FOLHA .....	52
FIGURA 9 - <i>Psychotria fractistipula</i> - CAULE EM SECÇÃO TRANSVERSAL ....	54
FIGURA 10 - ESPECTRO DE <sup>1</sup> H.....	58
FIGURA 11 - ESPECTRO DE <sup>1</sup> H AMPLIADO ENTRE A REGIÃO 5,6 A 4,9 ppm .....	58
FIGURA 12 - ESPECTRO DE <sup>13</sup> C.....	59
FIGURA 13- ESPECTRO DE <sup>13</sup> C AMPLIADO ENTRE A REGIÃO 122 A 144 ppm .....	59
FIGURA 14 - ESPECTRO DE <sup>13</sup> C AMPLIADO ENTRE A REGIÃO 10 A 74 ppm .....	60

FIGURA 15 - ESTRUTURA $\beta$ -SITOSTEROL .....	62
FIGURA 16 - ESTRUTURA DO CAMPESTEROL .....	62
FIGURA 17 - MORFOLOGIA EXTERNA DA LARVA DO MOSQUITO <i>Aedes aegypti</i> .....	66
FIGURA 18 - MORFOLOGIA EXTERNA DAS LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> . CONTROLES E TRATADAS COM EXTRATOS E FRAÇÕES NA CONCENTRAÇÃO DE 10 $\mu\text{g/mL}$ .....	67
FIGURA 19 - MORFOLOGIA EXTERNA DAS LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> . CONTROLES E TRATADAS COM EXTRATOS E FRAÇÕES NA CONCENTRAÇÃO DE 100 $\mu\text{g/mL}$ .....	68
FIGURA 20 - MORFOLOGIA EXTERNA DAS LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> . CONTROLES E TRATADAS COM EXTRATOS E FRAÇÕES NA CONCENTRAÇÃO DE 1000 $\mu\text{g/mL}$ .....	69
FIGURA 21 - MORFOLOGIA INTERNA DAS LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> . EXPOSTAS AMOSTRAS NA CONCENTRAÇÃO DE 10 $\mu\text{g/mL}$ . 70	
FIGURA 22 - MORFOLOGIA INTERNA DAS LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> . EXPOSTAS AMOSTRAS NA CONCENTRAÇÃO DE 100 $\mu\text{g/mL}$ .....	71
FIGURA 23 - MORFOLOGIA INTERNA DAS LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> . EXPOSTAS AMOSTRAS NA CONCENTRAÇÃO DE 1000 $\mu\text{g/mL}$ .....	73

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - NÚMERO DE NOMES ACEITOS DE ESPÉCIE DE RUBIACEAE POR REGIÃO .....	21
GRÁFICO 2 - NOMES ACEITOS DAS ESPÉCIES DE <i>Psychotria</i> POR REGIÃO BRASILEIRA .....	23
GRÁFICO 3 - ARTIGOS DO GÊNERO <i>Psychotria</i> PUBLICADOS DESDE 1972. ....	24
GRÁFICO 4 - PESQUISAS REALIZADAS COM <i>Psychotria</i> NO BRASIL E NO MUNDO.....	24
GRÁFICO 5 - COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE <i>Psychotria fractistipula</i>	78
GRÁFICO 6 - COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DE <i>Psychotria fractistipula</i> ....	79
GRÁFICO 7 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE <i>Psychotria fractistipula</i> PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO COMPARADA COM A VITAMINA C .....	83
GRÁFICO 8 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DE <i>Psychotria fractistipula</i> PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO COMPARADA COM A VITAMINA C. ....	83
GRÁFICO 9 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DE <i>Psychotria fractistipula</i> PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO COMPARADA COM A RUTINA .....	84
GRÁFICO 10 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DE <i>Psychotria fractistipula</i> PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO COMPARADA COM A RUTINA .....	84
GRÁFICO 11 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE <i>Psychotria fractistipula</i> PELA REDUÇÃO DO DPPH .....	85
GRÁFICO 12 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO HEXANO DAS FOLHAS DE <i>Psychotria fractistipula</i> PELA REDUÇÃO DO DPPH .....	86
GRÁFICO 13 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DAS FOLHAS DE <i>Psychotria fractistipula</i> PELA REDUÇÃO DO DPPH.....	86

GRÁFICO 14 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDADE DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE <i>Psychotria fractistipula</i> PELA REDUÇÃO DO DPPH.....	87
GRÁFICO 15 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDADE DO EXTRATO BRUTO DO CAULE DE <i>Psychotria fractistipula</i> PELA REDUÇÃO DO DPPH .....	87
GRÁFICO 16 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDADE DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DO CAULE DE <i>Psychotria fractistipula</i> PELA REDUÇÃO DO DPPH.....	88
GRÁFICO 17 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDADE DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO CAULE DE <i>Psychotria fractistipula</i> PELA REDUÇÃO DO DPPH.....	88
GRÁFICO 18 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDADE DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA RESIDUAL DO CAULE DE <i>Psychotria fractistipula</i> PELA REDUÇÃO DO DPPH.....	89

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ORGANIZAÇÃO DA HIERARQUIA DA ESPÉCIE <i>Psychotria fractistipula</i> .....	26
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DOS SOLVENTES DAS FASES MOVEIS E REVELADORES DA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA REALIZADA PARA EXTRATOS E FRAÇÕES.....	37
TABELA 3 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ACORDO COM A CIM	42
TABELA 4 - MEIO REACIONAL DE QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS. ....	44
TABELA 5 - ANÁLISES FÍSICO QUÍMICAS DO MATERIAL VEGETAL.....	55
TABELA 6 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS POR SOXHLET .	56
TABELA 7 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES.....	56
TABELA 8 - COMPORAÇÃO DO $\beta$ - SITOSTEROL E CAMPESTEROL.....	61
TABELA 9 - TOXICIDADE FRENTE A <i>Artemia salina</i> NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATOS E FRAÇÕES. ....	63
TABELA 10 - ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE <i>Aedes aegypti</i> , NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, DE EXTRATOS E FRAÇÕES.....	64
TABELA 11 - TAMANHO DAS LARVAS DE <i>A. aegypti</i> CONFORME AMOSTRA E CONCENTRAÇÃO.....	65
TABELA 12 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>Psychotria fractistipula</i> .....	74
TABELA 13 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>Psychotria fractistipula</i> UTILIZANDO SANGUE DE CARNEIRO .....	77
TABELA 14 - QUANTIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS (EQUIVALENTE EM ÁCIDO GÁLICO - EAG) NO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>Psychotria fractistipula</i> .....	80
TABELA 15 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO DE FOSFOMOLIBDÊNIOEM RELAÇÃO A RUTINA DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÃO DE <i>Psychotria fractistipula</i> .	82

TABELA 16 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO DE FOSFOMOLIBDÊNIOEM RELAÇÃO À VITAMINA C DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÃO DE *Psychotria fractistipula* . 82

TABELA 17 - ATIVIDADE ANTIXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Psychotria fractistipula* PELO MÉTODO DE DPPH..... 90

## LISTA DE SIGLAS

AA –	Atividade antioxidante
Abs –	Absorbância
ANOVA –	Análise de variância
BHT –	Butil hidróxidotolueno
CCD –	Cromatografia em Camada Delgada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CL50 –	Concentração letal 50%
DMT -	N,N-dimetitriptamina
DMSO –	Dimetilsulfóxido
DP –	Desvio Padrão
DPPH –	2,2- difenil-1-picril-hidrazila
EAG –	Equivalente de ácido gálico
EB	Extrato Bruto
FAE –	Fração acetato de etila
FCL –	Fração clorofórmio
FR –	Fração hidroalcoólica residual
HPLC –	<i>High Performance Liquid Cromatography</i>
MAO -	Monoamina Oxidase Periférica
MDA –	Malonaldeído
MEV –	Microscopia Eletrônica de Varredura
PBS –	Tampão fosfato-salino
pH -	Potencial Hidrogeniônico
QSP –	Quantidade Suficiente Para
RMN –	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de 1H –	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de 13C –	Ressonância magnética nuclear de carbono treze
RPM –	Rotações por minuto
SDS –	Dodecil sulfato de sódio
SNC –	Sistema Nervoso Central

## Lista de Símbolos

% –	Por cento
> –	maior que
< –	menor que
µg –	Micrograma
µg/mL –	Micrograma por mililitro
µL –	Microlitro
°C –	Grau celsius
Cm –	Centímetro
g –	Grama
KCl –	Cloreto de potássio
HCl –	Ácido clorídrico
mg –	Miligramas
mg/mL –	Miligramas por mililitro
mL –	Mililitro
mm –	Milímetros
NaCl –	Cloreto de sódio
nm –	Nanômetro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	20
2.1 OBJETIVO GERAL .....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>3. REVISÃO</b> .....	21
3.1 FAMÍLIA Rubiaceae .....	21
3.2 O gênero <i>Psychotria</i> .....	22
3.3 <i>Psychotria fractistipula</i> L.B. Sm. <i>et al.</i> .....	26
3.4 composição fitoquímica .....	27
3.4.1 Alcaloides .....	27
3.4.2 Taninos .....	29
3.4.3 Terpenos .....	29
3.4.4 Flavonoides .....	30
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
4.1 MATERIAL BOTÂNICO .....	31
4.2 ESTUDO FARMACOBOTÂNICO .....	32
4.2.1 Preparo das lâminas .....	33
4.2.2 Testes microquímicos .....	33
4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura .....	33
4.3 SECAGEM E RASURA DO MATERIAL BOTÂNICO .....	34
4.4. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS .....	34
4.4.1 Umidade .....	34
4.4.2 Cinzas totais .....	34
4.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO POR SOXHLET MODIFICADO ....	35

4.5.1 Determinação do teor de sólidos .....	35
4.5.2 Obtenção das frações.....	35
4.6 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	36
4.7 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS CONTITUENTES QUÍMICOS .....	37
4.7.1 Isolamento .....	37
4.7.2 Identificação.....	38
4.8 ATIVIDADE TÓXICA SOBRE <i>Artemia salina</i> .....	38
4.9 ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE <i>Aedes aegypti</i> .....	39
4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	40
4.10.1 Micro-organismos .....	40
4.10.2 Determinação da concentração inibitória mínima pela técnica de microdiluição.....	41
4.10.3 Interpretação dos resultados .....	42
4.11 ATIVIDADE HEMOLÍTICA .....	42
4.12 QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS .....	43
4.13 ATIVIDADES ANTIOXIDANTE .....	45
4.13.1 Ensaio de Redução do Complexo Fosfomolibdênio.....	45
4.13.2 Redução do Radical DPPH.....	46
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
5.1 ESTUDO MORFOANATÔMICO .....	48
5.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE E CINZAS TOTAIS .....	54
5.3 RENDIMENTO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>Psychotria fractistipula</i> .....	55
5.4 ANÁLISE DE COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR CCD.....	56
5.5 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO CONSTITUINTE QUÍMICO ISOLADO .....	57

5.5.1 Composto FH-25.....	57
5.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i> .....	62
5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE <i>Aedes aegypti</i> .....	64
5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	74
5.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA .....	75
5.10 DETERMINAÇÕES DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS ATRAVÉS DO TESTE DE FOLIN – CIOCALTEAU .....	79
5.11 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES .....	81
5.11.1 Atividade antioxidante pela redução do complexo fosfomolibdênio .	81
5.11.2 Redução do radical DPPH .....	85
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	91
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	93

## 1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais ainda desempenham um papel significativo na descoberta de novos medicamentos. Dos agentes terapêuticos aprovados, em todo o mundo, nos últimos 30 anos (1981 a 2010), 29% foram obtidos de origem natural. Dos medicamentos anticancerígenos, 48,6% são obtidos de produtos naturais ou diretamente derivados destes, e dos medicamentos aprovados para tratamento de infecções 33,7% são obtidos a partir de fontes naturais. Esta constatação mostra como os produtos naturais são uma fonte expressiva para a obtenção de medicamentos, e que estes foram e ainda são valorizados como fonte de protótipos para a descoberta de novos fármacos (CHAPLA, 2012). Muitas pesquisas já foram realizadas nas áreas de produtos naturais, destacando a presença de estruturas privilegiadas presentes em algumas plantas. Estas oferecem aos produtos naturais um efeito farmacológico diferenciado e são utilizadas para o tratamento de várias doenças (CALIXTO, 2005).

No Brasil a fitoterapia é antiga, relatos apontam que a utilização de plantas para fins medicinais ocorre desde a época da colonização, onde os médicos não possuíam recursos e utilizavam as plantas como alternativa terapêutica, atrelado a cultura indígena e africana (GURIB-FAKIM, 2006).

Assim o Brasil possui a maior diversidade biológica do mundo, essa compreende entre plantas, animais e micro-organismos, porém muitas plantas ainda não possuem estudos fitoquímicos, farmacológicos e não foram classificados botanicamente, fornecendo possibilidades para serem pesquisadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Um gênero ainda pouco explorado é o *Psychotria*, que é representado por um grande número de espécies com taxonomia complexa (DAVIS *et al.*, 2009; FRODIN, 2004). Alguns estudos quimiotaxonômicos do gênero *Psychotria* apresentam a produção de alcaloides na sua rota metabólica secundária, tornando-se alvo de farmacologistas (LIU, Y *et al.*, 2013).

Em estudos com *Psychotria* encontrou-se um conjunto novo de monoterpenos alcaloides chamados bioativos (O'CONNOR; MARESH, 2006), esses são derivados do metabolismo secundário da planta e apresentaram

atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC), como analgésico, ansiolítico e antidepressivo. (BOTH, 2005).

Devido a esses dados, a atual pesquisa justifica-se à medida que a espécie *Psychotria fractistipula* não apresenta descrições da sua morfologia, composição fitoquímica e atividade biológicas, tornando possível a busca de novas substâncias de interesse científico.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a morfoanatomia e analisar a composição fitoquímica da espécie *Psychotria fractistipula* L.B. Sm., Klein & Delprete (Rubiaceae), e verificar as atividades biológicas e toxicológicas dos extratos e frações obtidos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar e identificar a espécie *Psychotria fractistipula* L.B. Sm., Klein & Delprete (Rubiaceae);
- Caracterizar morfoanatomicamente os elementos estruturais constituintes das folhas e caules para caracterização farmacobotânica;
- Obter o extrato etanólico bruto e suas frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e residual a partir das folhas e caules secos;
- Detectar diferentes classes de substâncias químicas através da análise da cromatografia em camada delgada;
- Averiguar o perfil toxicológico dos extratos e frações;
- Verificar a atividade larvicida dos extratos e frações;
- Avaliar a atividade antimicrobiana;
- Avaliar a atividade hemolítica;
- Avaliar o conteúdo de compostos fenólicos dos extratos e frações.
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos e frações;

### 3. REVISÃO

#### 3.1 FAMÍLIA RUBIACEAE

A Família Rubiaceae é bem diversificada, ela possui 630 gêneros e 13000 espécies, sendo assim considerada a sexta maior família presente nas angiospermas (KARAO *et al.*, 2011). Com exceção do Continente Antártico, podemos encontrar representantes dessa família no mundo todo, porém são mais predominantes em locais tropicais, em sua maioria nas florestas úmidas e de baixa altitude (DAVIS *et al.*, 2009).

No Brasil é amplamente encontrada em todos os biomas brasileiros, sendo seus domínios fitogeográficos na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (BARBOSA *et al.* 2015), e são encontrados 1391 espécies de Rubiaceae, distribuídas em 125 gêneros. O Gráfico 1 demonstra o número de nomes aceitos de espécies por região brasileira (BARBOSA *et al.*, 2015).

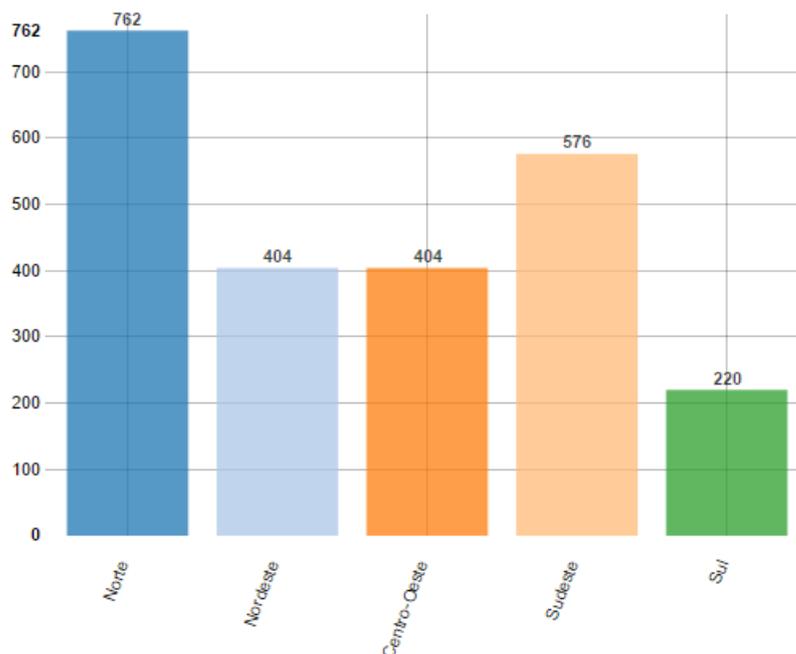


GRÁFICO 1 - NÚMERO DE NOMES ACEITOS DE ESPÉCIE DE RUBIACEAE POR REGIÃO  
FONTE: BARBOSA *et al.*, (2015)

Geralmente os representantes de Rubiaceae são árvores de pequeno porte ou arbustos. Suas folhas auxiliam na identificação dessa família, pois elas se encontram geralmente opostas e apresentam estípulas interpeciolares. As flores possuem diversos tamanhos, formas e cores e os frutos são carnosos e também possuem tamanhos e cores distintas (TAYLOR *et al.*, 2007).

Devido a diversidade da família foi necessário dividir esse grupo em 4 subfamílias (Cinchonoideae, Ixoroideae, Antirheoideae e Rubioideae) as quais reúnem juntas 44 tribos. A divisão foi baseada nas características morfológicas de cada gênero (PEREIRA, 2007). Muitas de suas espécies apresentam importância econômica, sendo utilizadas de maneira alimentar, medicinal, ornamental. *Psychotria sp.* é o gênero mais pesquisado dessa família devido a presença de alcaloides, porém deve-se ressaltar que as Rubiaceas também apresentam em sua composição cumarinas, triterpenos, esteróides, saponinas, taninos, iridoides e antraquinonas (SOUZA *et al.*, 2013) .

### 3.2 O GÊNERO *Psychotria*

O Gênero possui aproximadamente 2000 espécies e é considerado o maior gênero de Rubiaceae, sendo o terceiro maior grupo das angiospermas (DAVIS *et al.*, 2009). Pertence a subfamília Rubioideae e sua tribo é a Psychotrieae (NEPROKROFF *et al.*, 1999). Espécies do gênero *Psychotria* apresentam-se como arvoretas, árvores, e arbustos, encontram-se em locais com bastante sombra, solo com características sílico-argilo-humífero e rico em ferro e sua preferência ainda é por locais úmidos e perto de rios (SANZIO *et al.*, 2009).

Esse gênero possui representantes hermafroditas com ramos cilíndricos ou quadrangulares e madeira quebradiça. As estípulas são características para identificação do gênero, sendo interpeciolares, unidas ao redor do caule numa bainha geralmente bilobada ou num capuz cônico, que podem apresentar-se tanto persistentes como decíduas. As suas folhas são geralmente pecioladas mas podem ser opostas, decussadas ou subsésseis. As flores da *Psychotria* são

caracterizadas por serem pequenas, terminais, alvas a amarelas e com inflorescências terminais, seus frutos são drupáceos (TAYLOR *et al.*, 2007).

Na América do Sul a *Psychotria* corresponde a dois subgêneros, o subgênero *Psychotria* e o subgênero *Heteropsychotria*, suas diferenças estão nos frutos. No gênero *Psychotria* seus frutos possuem coloração de alaranjado a avermelhado. No subgênero *Heteropsychotria* seus frutos são azulados ou negros (TAYLOR *et al.*, 2007). No Brasil podemos encontrar aproximadamente 252 espécies de *Psychotria* distribuídas por todo território nacional. O Gráfico 2 apresenta os nomes aceitos e distribuídos por regiões (TAYLOR *et al.* 2015).

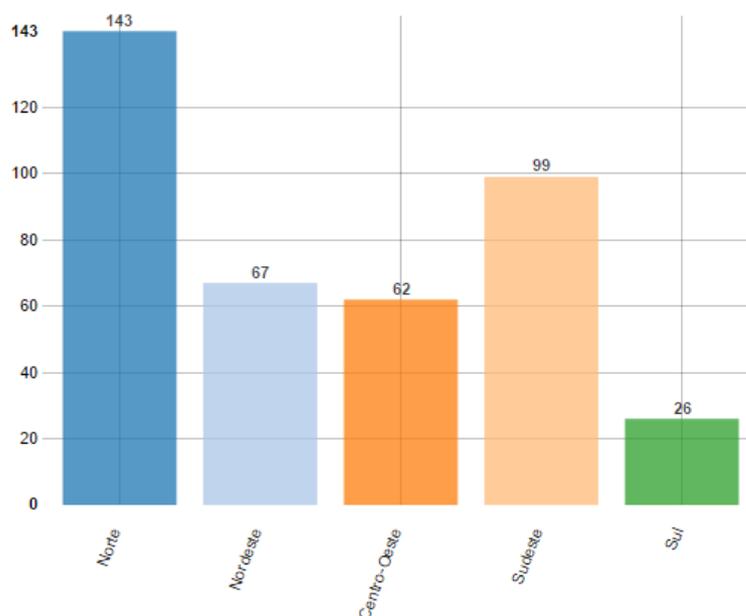


GRÁFICO 2 - NOMES ACEITOS DAS ESPÉCIES DE *Psychotria* POR REGIÃO BRASILEIRA  
 FONTE: TAYLOR *et al.*, (2015)

O uso da *Psychotria* no tratamento de doenças na medicina popular é amplo, indiscriminado e descontrolado, podendo trazer alto risco a saúde da população que a consome, sendo importante os estudos sobre a toxicidade desta espécie realizados por pesquisadores (FRESCURA, 2012).

Nos últimos anos houve um aumento no número de pesquisas científicas com o gênero *Psychotrias*, como podemos ver no Gráfico 3 retirado do site GOPUBMED, o qual relata os artigos científicos publicados sobre o gênero desde o ano de 1972 até 2014.

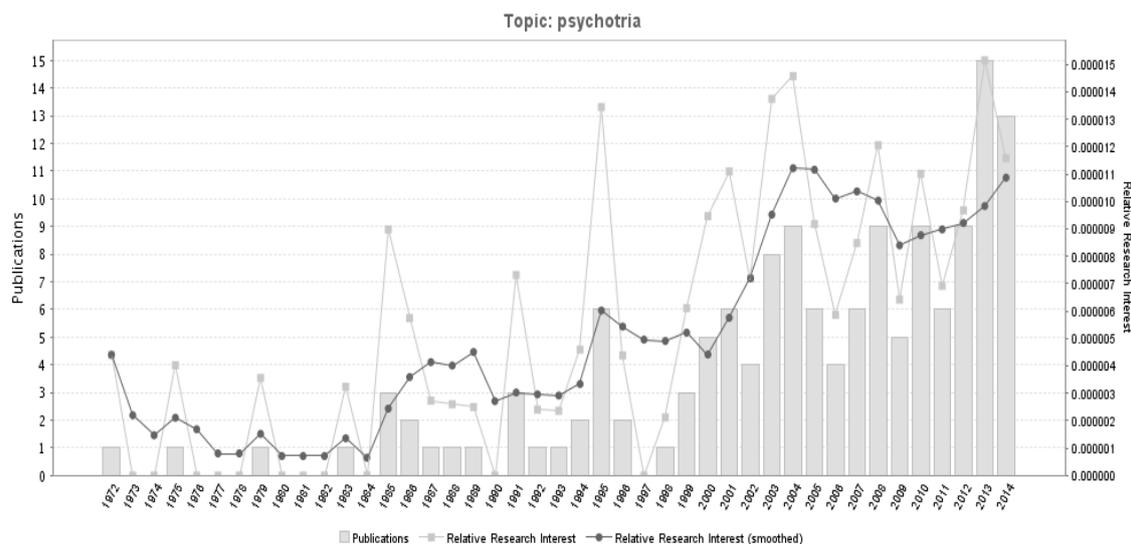


GRÁFICO 3 - ARTIGOS SOBRE GÊNERO *Psychotria* PUBLICADOS DESDE 1972.

O Brasil lidera o ranking no número de publicações de artigos científicos sobre espécies do gênero, sendo que Porto Alegre é a cidade que mais e apresentou pesquisas sobre essas plantas. O Gráfico 4 foi retirado do site GOPUMED (2015) demonstra o estudo das *Psychotrias* no Brasil e no mundo.

Top Countries	Publications	Top Cities	Publications
🇧🇷 Brazil	43	🇧🇷 Porto Alegre	20
🇺🇸 United States	27	🇧🇪 Leuven	6
🇫🇷 France	11	🇺🇸 Saint Louis	4
🇧🇪 Belgium	10	🇫🇷 Gif-sur-Yvette	4
🇯🇵 Japan	6	🇧🇪 Antwerp	4
🇨🇳 China	5	🇧🇷 São Paulo	3
🇵🇦 Panama	5	🇵🇦 Panamá	3
🇪🇸 Spain	4	🇫🇷 Strasbourg	3
🇨🇭 Switzerland	2	🇧🇷 Rio Grande	2
🇸🇪 Sweden	2	🇨🇳 Nanjing	2
🇿🇦 South Africa	2	🇧🇷 Viçosa	2
🇦🇹 Austria	2	🇿🇦 Pretoria	2
🇦🇺 Australia	2	🇦🇹 Vienna	2
🇮🇹 Italy	2	🇨🇳 Guangzhou	2
🇫🇮 Finland	2	🇦🇺 Melbourne	2
🇱🇰 Sri Lanka	2	🇪🇸 Barcelona	2
🇷🇺 Reunion	1	🇧🇷 Campos	2
🇲🇽 Mexico	1	🇧🇷 Alfenas	2
🇬🇧 United Kingdom	1	🇧🇷 Rio Claro	2
🇵🇪 Peru	1	🇯🇵 Chiba	2

GRÁFICO 4 - PESQUISAS REALIZADAS COM *Psychotria* NO BRASIL E NO MUNDO

O interesse no estudo do gênero *Psychotria*, provavelmente está ligado a presença de alcaloides em sua composição química, onde várias substâncias foram extraídas e identificados e estes estudos mostram que os alcaloides

encontrados nas espécies investigadas no sul do Brasil são do tipo monoterpene indólico (FRESCURA, 2012).

Algumas espécies de *Psychotria* apresentam alguns efeitos farmacológicos evidenciados: *Psychotria carthagenensis* (antifúngico e antibacteriano), *Psychotria ipercacuanha* (anti-inflamatório), *Psychotria microlabrasta* (antibacteriano), *Psychotria prunifolia* (citotóxico, antitumoral e antifúngico), *Psychotria umbrellata* (ansiolítico, anticonvulsivante) *Psychotria octosulcata* (anti-inflamatório). As espécies *Psychotria rigida* e *Psychotria bracteocardia* usada popularmente para matar rato (MARIYAMMAL; KAVIMANI, 2013; SOUZA *et al.*, 2013).

A espécie mais conhecida desse gênero é a *Psychotria viridis*, componente principal na produção da ayahuasca, uma bebida alucinógena utilizada pelos índios brasileiros. *P. viridis* possui um alcaloide indólico chamado N,N-dimetiltriptamina (DMT), uma substância semelhante a serotonina (5HT), que possui a capacidade se ligar ao mesmo sitio receptor e produzir efeito alucinógeno (FIGURA 1).

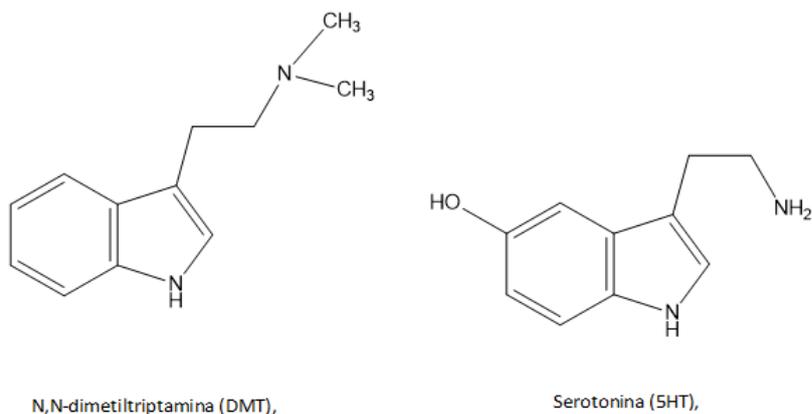


FIGURA 1 - EXTRUTURA QUÍMICA DA N,N-DIMETILTRIPTAMINA (DMT) E DA SEROTONINA (5HT)  
FONTE: STRASSMAN (2001)

Estudo conduzidos por Takayama *et al.*, 2004, possibilitaram o isolamento de dois alcaloides, denominados psychotrimine e psychopentamineque da espécie *Psychotria rosata*, planta utilizada na medicina popular da malásia no tratamento de constipação.

Os estudos conhecidos para este gênero não se baseiam apenas na medicina popular, onde estudos relacionados a ação antimutagênica, antioxidante (Fragoso *et al.* 2008) e genotóxica (Frescura, 2012) também foram encontrados.

### 3.3 *Psychotria fractistipula*

*P. fractistipula* é nativa e endêmica no Brasil, sendo encontrada somente nos estados do Paraná e Santa Catarina, apresentando domínios fitogeográfico na Mata Atlântica (TAYLOR *et al*; 2015). A Tabela 1 apresenta os níveis de organização taxonômica dessa espécie.

TABELA 1 - ORGANIZAÇÃO DA HIERARQUIA DA ESPÉCIE *Psychotria fractistipula*

HIERARQUIA	TAXONÔMIA
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Filo</b>	Tracheophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Ordem</b>	Gentianales
<b>Família</b>	Rubiaceae
<b>Gênero</b>	<i>Psychotria</i>
<b>Espécie</b>	<i>Psychotria fractistipula</i>

FONTE: ARCTOS (2015)

*P. fractistipula*, não possui nome popular ou sinônimo, é um arbusto, 0,5-4 m de altura, apresenta inflorescência nos meses de fevereiro a abril e de

setembro a dezembro, suas flores são brancas, bissexuais e podem medir 4-6 mm de comprimento. Os frutos podem ser encontrados em todos os meses do ano, possuem coloração verde quando imaturos e vermelhos quando maduros. *P. fractistipula* possui grande semelhança morfológica com a *P. carthagenensis*, podendo ser diferenciada pela presença de estípulas com ápice obtuso e inflorescência laxa presentes na *P. fractistipula* (JUNIOR; VIEIRA, 2013).

### 3.4 COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA

#### 3.4.1 Alcaloides

Os alcaloides são bases nitrogenadas orgânicas, encontrados principalmente no metabolismo secundário das plantas, porém em menor quantidade, podemos encontra-lo em micro-organismos e animais (DEWICK, 2002). Na Figura 2 podemos observar as estruturas dos principais núcleos alcaloídicos (SIMÕES, 2000).

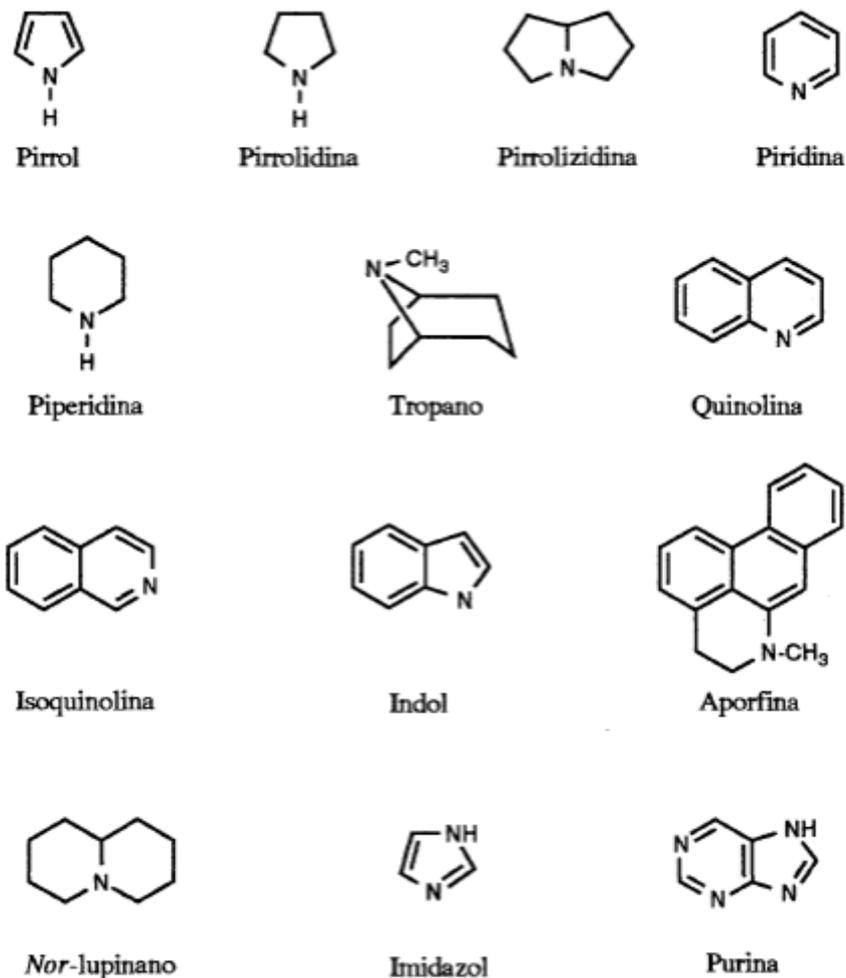


FIGURA 2 - PRINCIPAIS NÚCLEOS ALCALÓIDICOS  
 NOTA: FONTE SIMÕES *et al.*, (2000)

Os alcaloides encontrados no gênero *Psychotria* são os alcaloides indol (LIU *et al.*, 2013), caracterizados pela presença de um anel de seis membros fundido com um anel de cinco membros, o nitrogênio está presente no anel de cinco membros. A via metabólica desses alcalóides é a via do ácido chiquímico, sendo seu precursor o triptofano (DEWICK, 2002).

A principal característica dos alcaloides indol, é a atividade sobre o sistema nervoso central (SNC), onde induz a atividades alucinógenas (PREVATT-SMITH; PRISINZANO, 2010), porém outras atividades farmacológicas foram descritas na literatura: analgésicas, anti-inflamatória, antitumoral, antioxidante, neuroprotetores e anti-hipertensivo (BOTH, 2005).

### 3.4.2 Taninos

Os taninos são compostos do fenólicos derivado do metabolismo secundário, amplamente distribuídos no reino vegetal, são classificados em dois grupos os taninos hidrolisáveis e os condensados, os de maior abundância nos alimentos que consumimos são os taninos condensados (NOZELLA, 2001). Os compostos hidrolisáveis consistem de ésteres de ácido gálico e ácidos elágicos glicosilados, formado a partir da via do chiquimato. Os taninos condensados são constituídos por unidades de flavanol (flavan- 3-ols ou flavan 3,4 diols) (NOZELLA, 2001; MONTEIRO *et al.*, 2005).

A característica principal dos taninos é a adstringência devido capacidade de complexar com proteínas, essa atividade provavelmente ocorre através de pontes de hidrogênio entre o seu grupo fenólico e determinados sítios das proteínas. A utilização desses compostos como medicamento está relacionado a suas propriedades adstringentes, apresentando atividade antidiarreica, antisséptica, antimicrobiana, antifúngica e anti-inflamatória (MONTEIRO *et al.*, 2005).

### 3.4.3 Terpenos

Os terpenos são metabólitos secundários bastante conhecidos, podendo estar presente em fungos, animais e plantas, estando mais abundante no terceiro. As principais vias metabólicas são a Mevalonato e a Deoxixilulose. São classificados de acordo com o número de unidades isoprênicas em monoterpenos (C<sub>10</sub>), sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), diterpenos (C<sub>20</sub>), sesterterpenos (C<sub>25</sub>), triterpenos (C<sub>30</sub>) e tetraterpenos (C<sub>40</sub>) (DEWICK, 2002).

Os esteroides ou fitoesteróides são triterpenos modificados, cerca de 250 compostos desta classe foram identificados em espécies vegetais. Os 4 desmetilesteróis mais encontrados em plantas foram  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, campesterol e brassicasterol (QUEIROZ, 2009). As propriedades biológicas dos terpenos são diversificadas apresentando atividade antitumoral, antioxidante,

antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antiparasitária e anti-hipoglicêmica (LACIAR *et al.*, 2009).

#### 3.4.4 Flavonoides

Os flavonoides são compostos fenólicos oriundos do metabolismo secundário das plantas, representam uma ampla classe de substâncias de origem natural que não podem ser sintetizados pela espécie humana. Sua síntese ocorre através da união das vias metabólicas da acetil CoA e ácido chiquímico (DEWICK, 2002; SIMÕES *et al.*, 2000).

A estrutura fundamental dos flavonoides é representada por 15 átomos de carbono em três anéis, sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um pirano (C) (SIMÕES, 2000), conforme demonstrado na Figura 3.

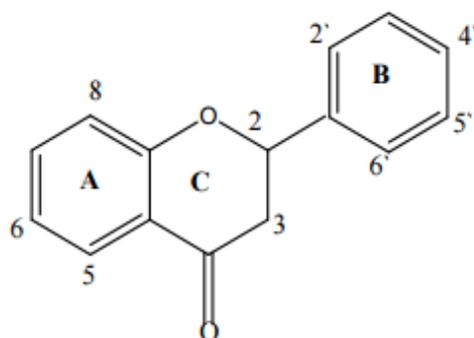


FIGURA 3 - ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONOIDES  
NOTA: FONTE SIMÕES *et al.*, (2000)

Os compostos fenólicos são biologicamente ativos e apresentam diversas atividades biológicas, podendo atuar como antibacteriano, antiviral, antiparasitário, anti-inflamatório, antioxidante, antitumoral, vasodilatador e hepatoprotetor (DORMAS *et al.*, 2008).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

A espécie *P. fractistipula* foi coletada entre os meses de março e abril de 2014, em Capão do Cifloma, cidade de Curitiba, Paraná, próximo das coordenadas 25°26'54"S 49°14'27"W. A identificação da espécie vegetal foi realizada pelo Biólogo e Curador do Museu Botânico Municipal de Curitiba Osmar dos Santos Ribas, a exsicata foi depositada no mesmo sob o número MBM 389153 (FIGURA 4).

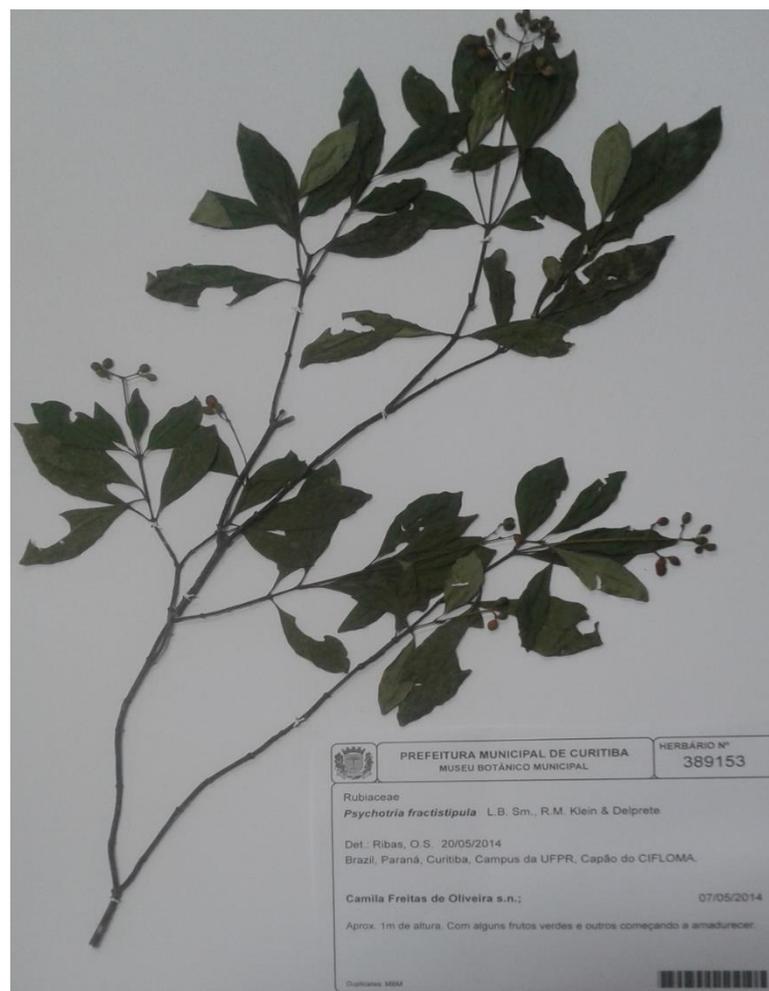


FIGURA 4 - EXSICATA DE *P. fractistipula*  
Fonte: O autor (2014)

O Trabalho foi realizado seguindo o fluxograma (FIGURA 5) e as metodologias utilizadas estão descritas a seguir.

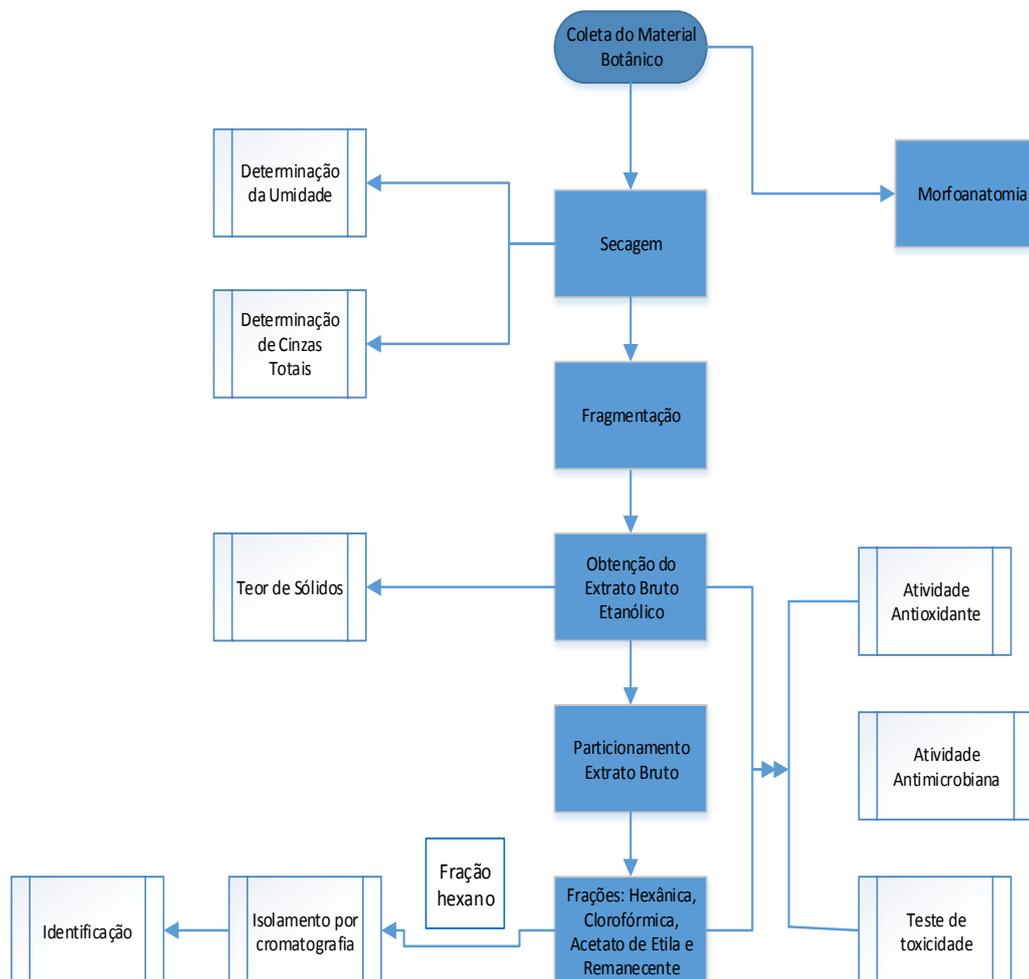


FIGURA 5 - FLUXOGRAMA DOS ESTUDOS FITOQUÍMICO E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS REALIZADOS EM PARTES AÉREAS DE *Psychotria fractistipula*  
 FONTE: O Autor

## 4.2 ESTUDO FARMACOBOTÂNICO

As pesquisas referentes aos caracteres farmacobotânico foram efetuados com as folhas e caules de *P. fractistipula*. O material foi fixado em FAA (90% de etanol 70%, 5% de formaldeído 37% e 5% de ácido acético glacial) onde permaneceu em solução por 7 dias e depois foi estocado em etanol 70% (v/v) até a realização das análises (BERLYN; MIKSCHE, 1976).

#### 4.2.1 Preparo das lâminas

As lâminas semipermanentes foram obtidas através de secções transversais e longitudinais, à mão livre (OLIVEIRA; AKISUE, 1997). Os cortes corados com azul de Astra, fucsina básica e toluidina (O'BRIEN, FEDER, McCULLY, 1964). Para a montagem das lâminas foi utilizado a glicerina a 50% (BERLYN; MIKSCHE, 1976) e a montagem foi realizada com esmalte incolor (BEÇAK; PAULETE, 1976).

#### 4.2.2 Testes microquímicos

Os testes microquímicos foram realizados através de secções transversais à mão livre do material fixado. A verificação da lignina ocorreu através da floroglucina clorídrica (FOSTER, 1949). Para os compostos lipofílicos foi empregado o reativo de Sudam III (SASS, 1951). Os compostos fenólicos foram detectados com cloreto férrico e lugol para o amido (JOHANSEN, 1940; BERLYN; MIKSCHE, 1976). As lâminas foram examinadas e ilustradas com fotos feitas ao microscópio ótico Olympus CX 31 ligado a câmera Olympus C-7070.

#### 4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura

Para a análise ultraestrutural de superfície por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (SOUZA, 1998) em alto vácuo as amostras foram fixadas em FAA 70, desidratadas em série etanólica crescente e pelo ponto crítico no equipamento Balzers CPD-010, após montagem em suporte, submetidas à metalização com ouro no aparelho. As eletromicrografias foram realizadas no

microscópio eletrônico Philips SEM 505 na Universidade Estadual de Ponta Grossa.

### 4.3 SECAGEM E RASURA DO MATERIAL BOTÂNICO

As partes coletadas foram caules e folhas, submetidos a dessecação em temperatura ambiente em local fresco e arejado, protegidas de raios solares e umidade. O seccionamento foi realizado em moinho de facas com o objetivo de aumentar a superfície de contato do solvente com a planta durante a extração (SONAGLIO *et al.*, 1999).

### 4.4. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

#### 4.4.1 Umidade

Para a determinação da umidade foi utilizada a metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010). Para os cálculos de umidade foi empregada a fórmula abaixo:

$$\frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100$$

Onde  $P_u$  = Peso da amostra,  $P_a$  peso da amostra + cadinho antes da dessecação e  $P_s$  = peso do cadinho + amostra após a dessecação.

#### 4.4.2 Cinzas totais

As cinzas totais têm como objetivo estabelecer a quantidade de substâncias residuais não voláteis no processo de incineração (CÍRIO *et al.*,

2003) pois esses dados contribuem no controle de qualidade e padronização da matéria prima. O método para determinação de cinzas totais a ser utilizados está presente na Farmacopéia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010). O material vegetal foi pesado em cadinhos (calcinados, resfriados e pesados) e levados a incineração até a eliminação do carvão e após, resfriados em dessecador. Esta análise foi realizada em sextuplicatas.

#### 4.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO POR SOXHLET MODIFICADO

Após a planta seca e moída a obtenção do extrato bruto ocorreu em aparelho de Soxhlet modificado, utilizando como solvente o etanol 96°GL. Este foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo e armazenado até o momento do fracionamento.

##### 4.5.1 Determinação do teor de sólidos

A determinação de sólidos foi realizada segundo a Farmacopéia Brasileira 5ª edição. Foram pipetados 10 mL do extrato bruto e transferidos para uma placa de Petri que foi previamente dessecada e deixada em sílica. Essa placa foi levada a estufa a 105°C até que adquiriu peso constante, o ensaio foi realizado em triplicata. O valor foi analisado após o seguinte cálculo:

$$\text{Placa com resíduo do extrato} - \text{placa vazia} = \text{teor de sólidos}$$

##### 4.5.2 Obtenção das frações

A obtenção das frações ocorreu a partir do extrato bruto concentrado. Para a partição líquido/líquido utilizou-se o aparelho de Soxhlet modificado com

solventes de polaridade diferentes na seguinte ordem: n-hexano, clorofórmio e acetato de etila, obtendo assim as frações Hexânica (FH), Clorofórmica (FC) e Acetato de etila (FAE). O extrato restante foi denominado fração remanescente hidroalcoólica (FR).

Este método de fracionamento é bastante eficiente e muito utilizado, uma vez que, utiliza-se pouco solvente e consegue-se fazer uma extração total dos compostos solúveis nas diferentes polaridades.

#### 4.6 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A cromatografia em camada delgada (CCD) é um método considerado rápido, eficiente de baixo custo e fácil reprodutibilidade. Esta análise tem como objetivo avaliar as características qualitativas dos principais grupos químicos presentes no EB e nas frações, utilizando reações de coloração e inflorescência.

Para a realização do ensaio de CCD foram utilizadas cromatoplasmas de sílica gel 60 UV<sub>254</sub>, da marca Whatman®, de dimensões 20 x 20 cm, onde foram aplicados de 5 a 10 µL de cada amostra com microseringas. As análises de CCD foram realizadas conforme a Tabela 2.

As placas foram visualizadas sob luz ultravioleta antes e após a revelação com seus respectivos reveladores. A análise foi realizada em triplicata.

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DOS SOLVENTES DAS FASES MÓVEIS E REVELADORES DA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA REALIZADA PARA EXTRATOS E FRAÇÕES.

<b>Constituinte químico</b>	<b>Fase móvel/ proporção</b>	<b>Revelador</b>	<b>Metodologia</b>
Esteroides	Tolueno: acetato de etila (93:7)	Vanilina 1%:ácido sulfúrico(1:1)	Wagner (1996)
Flavonoides	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26)	Reativo de NEU (flavonoide) Cloreto férrico 1% (tanino)	Wagner (1996)
Taninos			
Alcaloides	Clorofórmio: metanol (95:5) universo amônio	Dragendorff	Valente <i>et al.</i> , (2006)

NOTA: Difenolboriloxietilamino a 1% em metanol (Reativo de NEU); tetraiodeto bismuto de potássio (Dragendorff)

## 4.7 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS CONTITUINTE QUÍMICOS

### 4.7.1 Isolamento

A fração hexano foi utilizada para o isolamento dos compostos, onde previamente obteve-se uma pastilha, preparada com sílica gel 60 Merck®, mantendo a proporção de 5 partes de sílica em relação a amostra. Essas foram misturadas e levadas a secura em banho-maria.

A partir da pastilha de hexano foi realizada a coluna cromatográfica, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 Merck® (0,063 – 0,200mm), como fase móvel a mistura de solventes hexano e acetato de etila. Foram utilizados 100 mL de cada fase móvel, iniciando-se com 100% de hexano, com acréscimo de 5% de acetato de etila gradativamente, até chegar ao total de 100%. Os eluatos foram coletados em 62 frascos com aproximadamente 20 mL e levados

a secura, em temperatura ambiente para a cristalização dos compostos. Após foi utilizado como fase móvel 200 mL de metanol para extrair compostos de maior polaridade.

Após a secura foi selecionado para análise o frasco 25 (FH-25) que apresentava cristais, neste foi adicionado éter de petróleo e levado ao freezer até completa precipitação dos cristais e retirada da clorofila.

#### 4.7.2 Identificação

As substâncias isoladas foram submetidas a análises espectrométricas para determinação da estrutura, para isso realizou-se RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , utilizando o aparelho RMN Bruker DPX 200, operando a 4,7 Tesla, observando os núcleos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  à 200,13 e 50,62 MHz, respectivamente. Esse procedimento foi realizado no departamento de Química (UFPR).

#### 4.8 ATIVIDADE TÓXICA SOBRE *Artemia salina*

Este ensaio foi baseado nas normas da Petrobrás N-2588 (1996), sendo utilizada água do mar artificial, preparada com 38 gramas de sal marinho (23 g NaCl, 11 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 4 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; 1,3 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ou  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,7 g KCl) e 1.000 mL de água destilada. O pH foi ajustado com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  para a faixa de 8-9, para evitar a morte das larvas que são sensíveis ao pH abaixo de 6 ou acima de 10,5 (LEWAN *et al.*, 1992).

Os ovos de *Artemia salina* (200 mg/400 mL) foram colocados em contato com a água do mar artificial e aerados por uma hora e então incubados em temperatura 27-30°C por 48 horas, com iluminação constante.

Os ensaios de *Artemia salina* foram realizados com os extratos e frações nas concentrações de 1000  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  e 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , a diluição dos extratos foi realizada com 1% de DMSO (dimetilsulfóxido) e água do mar

artificial. Como controle negativo (branco) foi utilizada solução salina e como controle positivo SDS (Dodecil sulfato de sódio) nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL.

Foram colocadas em cada tubo contendo a amostra e controles, 10 náuplios de *Artemia salina*, os quais foram novamente incubados em temperatura de 27-30°C por 24 horas. Em seguida, foi realizada a contagem das larvas mortas, os dados obtidos foram analisados pelo método estatístico Probitos para a determinação dos valores de CL50 e 95% de intervalos de confiança. Todos os testes foram realizados em triplicata.

#### 4.9 ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE *Aedes aegypti* (CULICIDADE)

A metodologia utilizada para a avaliação da atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* baseou-se no Word Health Organization (1981 a) com algumas modificações. Os ovos utilizados de *Aedes aegypti* utilizados nos ensaios foram da linhagem Rockefeller, fornecidos pela Fundação Oswaldo Cruz – RJ; sendo usada como padrão de susceptibilidade á inseticida para esta espécie (HARTBERG; CRAIG, 1970).

A eclosão dos ovos foi realizada em uma bandeja plástica, onde os ovos foram colocados juntamente com 500 mL de água e levados a estufa BOD (marca Novatecnica modelo NT 704) em temperatura de 27°C ( $\pm$  2°C) e umidade relativa de 80% ( $\pm$  5%). As larvas foram alimentadas com ração de peixe (aldo basic, MEP 200 complex) desde a eclosão até o 3º estágio larval.

Os extratos e frações foram solubilizados em 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) e água sem cloro para a preparação da “solução mãe” na concentração de 1000 µg.mL<sup>-1</sup>, desta solução foram realizadas diluições para a obtenção das concentrações testadas, as quais foram 1000, 100 e 10 µg.mL<sup>-1</sup> o volume utilizado foi de 5 mL.

As amostras foram colocadas em copos plásticos contendo 10 larvas no 3º estágio. Como controle negativo foi utilizado solução aquosa de DMSO 0,5% e a análise foi realizada em triplicata. A avaliação da atividade larvicida ocorreu

após 24 horas de contato das larvas com a amostra, considerando como larvas mortas as que estavam paralisadas totalmente ou com dificuldade de subir a superfície quando tocadas. Como método de análise foi utilizado o Probitos para a determinação dos valores de CL50 e 95% de intervalos de confiança.

O controle positivo (que causa a mortalidade das larvas) utilizado foi o temofós grau técnico 90% lote 005/2011 fabricado pelo laboratório Fersol Mairinque – SP, a calibração foi realizada segundo o protocolo recomendado pela Organização Mundial da Saúde descrito por Who (1981 a,b), Lima e colaboradores (2003); Braga e colaboradores (2004) utilizando como concentração diagnóstico (CD) 0,060mg/mL, duas vezes a concentração letal que causa a mortalidade de 99% das cepas susceptíveis, como definiu WHO (1981 a,b). O protocolo compreende a resposta de mortalidade frente à exposição em concentração diagnóstico (CD) na exposição a um gradiente de concentração (concentrações múltiplas – CM).

As larvas foram analisadas e fotografadas no microscópio Olympus CX41 no aumento de 4X. As análises têm como intuito de verificar alterações na morfologia das larvas, também foi verificado o tamanho das larvas e para comparação das médias dos tamanhos utilizou-se o teste de Duncan. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ .

#### 4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

##### 4.10.1 Micro-organismos

As cepas utilizadas para a atividade antimicrobiana foram as seguintes: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

#### 4.10.2 Determinação da concentração inibitória mínima pela técnica de microdiluição

Para a determinação dos valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi utilizado a técnica da microdiluição em caldo (CLSI, 2008). Os extratos e frações foram preparados através de diluição seriada em 100 µL de caldo Muller-Hilton (MHB – Merck, Darmstadt, Alemanha), em concentrações que variaram de 7,81 a 1000 µg/mL, em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de “U”.

A Vancomicina foi o antimicrobiano de escolha para a validação da técnica e controle metodológico. Para a determinação da CIM foram preparadas diluições seriadas em 100 µL de caldo MHB nas concentrações de 0,015 a 32 µg/mL, dentro do intervalo de confiança estipulado pelo CLSI (2008).

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

Como controle da atividade inibitória dos diluentes (etanol e DMSO) foram realizados adicionando-se 100 µL da solução de etanol (10%) e DMSO (2%) em 100 µL de MHB e 5 µL dos inóculos bacterianos. O controle de esterilidade foi realizado utilizando 100 µL de MHB e 100 µL dos extratos e frações. Para verificar a viabilidade bacteriana foi utilizado 100 µL de MHB e 5 µL dos inóculos bacterianos.

A incubação das microplacas foi realizada em estufa bacteriológica em temperatura constante de 35°C por 16 a 20 horas, após foi adicionado 20 µL de solução aquosa de TTC a 0,5% e as microplacas foram incubadas novamente por três horas a 35°C. Logo em seguida foi realizada a leitura dos resultados.

#### 4.10.3 Interpretação dos resultados

Para a interpretação dos resultados foi utilizada a classificação descrita pelos autores Tanaka e colaboradores (2005); Ayres e colaboradores (2008); Santos *et al.*, (2008), conforme a Tabela 3.

TABELA 3 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ACORDO COM A CIM

CIM	ATIVIDADE INIBITÓRIA
<b>Até 100 µg/mL</b>	BOA
<b>100 – 500 µg/mL</b>	MODERADA
<b>500 - 1000 µg/mL</b>	FRACA
<b>Maior que 1000 µg/mL</b>	INATIVA

Fonte: Santos *et al.*, (2008)

#### 4.11 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Este método foi realizado segundo Banerjee *et al.* (2008), com adaptações. O sangue de carneiro utilizado foi adquirido da empresa Newprov® e no momento dos ensaios o sangue de carneiro foi levemente homogeneizado e 5 mL foram transferidos para um tubo de ensaio levado a centrifugação durante 5 minutos a 3000 rpm, sendo o sobrenadante desprezado e o restante lavado com PBS (tampão fosfato-salino) gelado e centrifugado por 5 minutos a 3000 rpm e o sobrenadante foi descartado, sendo feita a lavagem com PBS até que o sobrenadante ficasse completamente incolor. Em seguida a papa de eritrócitos foi diluída com PBS para obter uma diluição de 2%.

Para a realização da prova de hemólise foram utilizados extratos brutos e frações nas concentrações de 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 200 µg/mL e 100 µg/mL. A diluição das amostras foi feita com 10% de metanol e PBS. Como controle negativo foi utilizado 200 µL de PBS em 200 µL de solução de eritrócito a 2%. Como controle positivo foi utilizado 200 µL de água destilada e, como branco foi utilizado 200 µL de metanol. Essa análise foi realizada em eppendorfs onde

foram colocadas 200  $\mu$ L das amostras e controles, e 200  $\mu$ L de solução de eritrócitos a 2%.

Os tubos de eppendorfs foram homogeneizados manualmente sobre leve agitação e incubados durante 3 horas em estufa a temperatura de 37°C. Após, foram levados a centrifugação em centrífuga Minispin Plus da empresa Eppendorf® a 3000 rpm durante 5 minutos. .

O sobrenadante foi colocado em placa de Elisa de 96 poços, e em espectrofotômetro foram realizadas a leitura na faixa de 540 nm. O fotômetro de microplaca utilizado foi Multiscan FC da empresa Thermo Scientific®. Para comparação entre as médias dos índices de atividade (IA%), utilizou-se o teste de Duncan. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ .

#### 4.12 QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS

O reagente de Folin Ciocalteu contém os ânions heteopoli-fosfotungstato-molibdatos que, em meio básico, reage com compostos fenólicos e forma um ânion fenolato pela retirada de um hidrogênio ácido, que tem a capacidade de reduzir o reagente de molibdato em óxido de molibdênio formando um complexo molibdênio-tungstênio de coloração azul intensa provavelmente pelo mecanismo de transferência de elétrons (ROGINSKY; LISSI, 2005).

Para esta análise foi utilizado este método colorimétrico conforme Singleton (1999) com modificações. As amostras foram diluídas em metanol para obter a concentração de 1 mg.ml<sup>-1</sup>. Conforme a Tabela 4 os componentes foram adicionados para a reação.

O preparo deste ensaio consistiu em duas etapas, primeiro a amostra, a água e o Folin-Ciocalteu foram misturados, agitados e deixados em repouso por 10 minutos. Na segunda etapa, após o repouso, foi adicionado o carbonato de cálcio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 10%. As amostras foram deixadas em contato com o Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> por 30 minutos, a leitura foi realizada no espectrofotômetro a 760 nm. Como

controle foi realizado uma curva com ácido gálico nas concentrações 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5 e 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . As leituras foram feitas em triplicata.

TABELA 4 - MEIO REACIONAL DE QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.

	Amostra (mL)	Água (mL)	Folin-Ciocalteu (mL)	$\text{Na}_2\text{CO}_3$ (mL)
<b>AMOSTRAS</b>			<b>FOLHAS</b>	
EB	0,2	3,2	0,2	0,4
FH	0,3	3,1	0,2	0,4
FC	0,32	3,080	0,2	0,4
FAE	0,160	3,24	0,2	0,4
<b>AMOSTRAS</b>			<b>CAULE</b>	
EB	0,2	3,2	0,2	0,4
FH	0,3	3,1	0,2	0,4
FC	0,32	3,08	0,2	0,4
FAE	0,08	3,32	0,2	0,4
FC	0,1	3,0	0,2	0,4

NOTA: Fração hexânica (FH), Fração clorofórmio (FC), Fração acetato de etila (FAE) e Fração remanescente (FR).

Os resultados do padrão de ácido gálico obtidos foram colocados no programa Excel em forma de tabela (concentração/absorbância) e com base nestes dados foi construído um gráfico de dispersão, adicionando linha de tendência, exibindo equação do gráfico e valor de  $R^2$  no gráfico.

Os teores de fenóis totais foram determinados em miligramas de ácido gálico por grama de amostra. Para a curva de calibração foi utilizada a seguinte equação:

$$Y = 0,0392x - 0,0583; R^2 = 0,9964$$

Onde y é a absorbância e x a concentração final de equivalentes de ácido gálico pela concentração utilizada de extrato.

## 4.13 ATIVIDADES ANTIOXIDANTE

### 4.13.1 Ensaio de Redução do Complexo Fosfomolibdênio

Essa técnica foi realizada com base no método descrito por Prieto, Pineda e Aguilar (1999), com fundamento na redução do molibdênio (VI) em molibdênio (V) na presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, formando um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V). A vantagem desse método é a capacidade de avaliar a atividade antioxidante de compostos lipofílicos e hidrofílicos.

Para a realização deste método foi preparado o reativo através da adição de uma solução com fosfato de sódio 0,1M (28 mL), molibdato de amônio 0,03M (12 mL) e ácido sulfúrico 3M (20 mL), completando com água QSP 100 mL. Esse reativo foi preparado no momento de sua utilização. As soluções padrões utilizados foram a vitamina C e a rutina. Os extratos, frações e soluções utilizadas como padrão estavam na concentração de 200 µg/mL em metanol (BIANCO, 2003).

Em um tubo de ensaio foi adicionado uma alíquota de 0,3 mL da amostra e adicionado 1 mL do reativo. O mesmo foi realizado para os padrões e para o controle negativo, constituído de 0,3 mL de metanol e 1 mL do reativo. Todos os tubos da análise foram levados para banho-maria à 95°C por 90 minutos, após foram resfriados a temperatura ambiente e a leitura realizada em absorbância (A) em 695 nm. O mesmo método foi utilizado nos padrões. As análises dos extratos, frações e padrões foram realizada em triplicata.

A atividade antioxidante foi avaliada através das fórmulas seguintes, sendo demonstrado a atividade dos extratos e frações frente a rutina e vitamina C.

$$\text{AA\% em relação à rutina} = \frac{\text{Abs. (amostra)} - \text{Abs. (branco)} \times 100}{\text{Abs. (rutina)} - \text{Abs. (Branco)}}$$

$$\text{AA\% em relação à vitamina C} = \frac{\text{Abs. (amostra)} - \text{Abs. (branco)} \times 100}{\text{Abs. (vitamina C)} - \text{Abs. (Branco)}}$$

Para a averiguação da diferença estatística foi aplicado a análise de variância – ANOVA e para localização das diferenças o teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).

#### 4.13.2 Redução do Radical DPPH

Este ensaio tem como objetivo avaliar a capacidade dos extratos e frações de reduzir o radical livre 2,2 - difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•), que possui coloração púrpura, para difenil-picril-hidrazina com coloração amarela (FIGURA 6). Nesta mudança de coloração, ocorre a diminuição da absorção, podendo assim ser avaliado a atividade antioxidante em espectrofotômetro.

A análise foi realizada de acordo com Mensor *et al* (2001). A solução de DPPH foi preparada a 0,03 mmol/mL em metanol absoluto no momento do ensaio. As amostras foram diluídas em metanol e as concentrações variaram de 5 µg/mL a 450 µg/mL, dependendo da intensidade da atividade antioxidante. Nos tubos contendo a amostra foi adicionado 1 mL da solução de DPPH. Como padrões foram utilizados a vitamina C (1,6 a 8 µg/mL) e a rutina (2,0 a 12 µg/mL). Como branco foi utilizado 2,5 mL de metanol e 1 mL de DPPH.

A amostra foi deixada em contato com o DPPH por 30 minutos, onde a absorbância foi medida em 518 nm, e a atividade antioxidante calculada. A análise foi realizada com 5 concentrações crescentes e em triplicata.

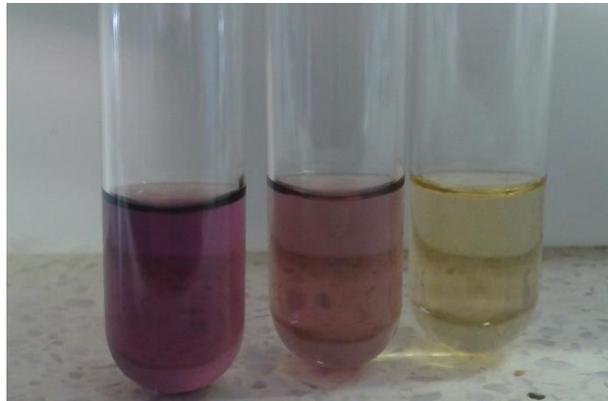
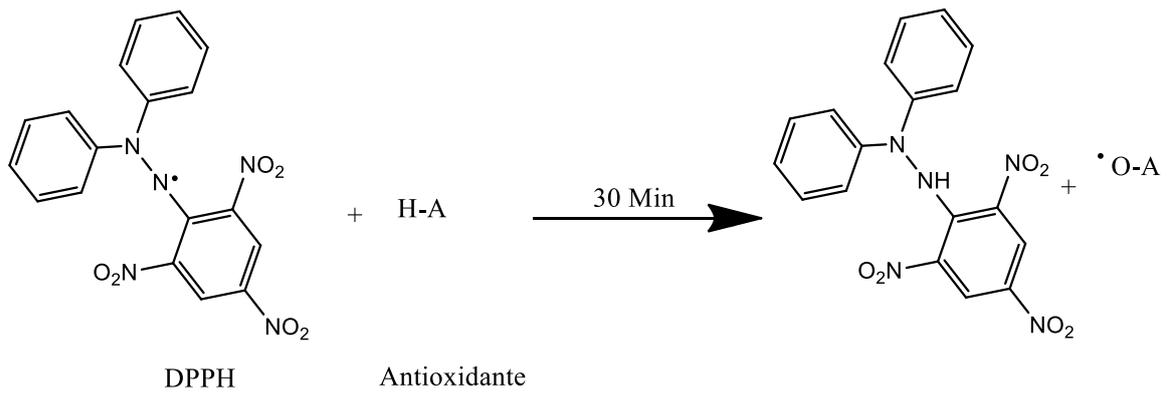


FIGURA 6 - ESQUEMA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM DPPH

A capacidade dos extratos e frações de reduzir o radical livre foi calculado segundo a seguinte fórmula

$$\% \text{ inibição do DPPH} = 100 - \frac{(\text{Abs. amostra} - \text{Abs. branco}) \times 100}{\text{Abs. Controle}}$$

A análise estatística para verificação da variância (ANOVA) foi aplicada juntamente com Duncan, o qual localizou a diferenças das amostras.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ESTUDO MORFOANATÔMICO

A análise morfológica de *P. fractistipula* (FIGURA 7) evidência a espécie utilizada nesse trabalho medindo 0,5-1,50 m de altura, diferenciando-se da *P. fractistipula* estudada por Junior e Vieira (2013), que chega até 4 m. As folhas de *P. fractistipula* medem 5,46 cm comprimento e 2 cm de largura (FIGURA 7C); possuem ápice agudo, base atenuada em pecíolo, margem foliar inteira e filotaxia oposta. Os frutos apresentam coloração verde quando imaturos e, alaranjado-avermelhado após maturação (FIGURA 7A). Apresenta estípulas apical e persistente (FIGURA 7D, 7E). A presença de estípulas é uma característica da família Rubiaceae com finalidade de proteger os primórdios foliares (MARGALHO *et al.*, 2009; VITARELLI, 2009).



FIGURA 7 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS EXTERNAS DE *Psychotria fractistipula*  
 NOTA: (1): **A E B** *Psychotria fractistipula* L.B. Sm. Klein & Delprete (CAPÃO DO CIFLOMA UFPR). **A**: PRESENÇA DE FRUTOS MADUROS NAS PARTES AÉREAS. **B**: PRESENÇA ÓRGÃOS REPRODUTIVOS JOVENS. **C**: ASPECTO DAS FOLHAS **D**: ESTÍPULA APICAL NO ÁPICE CAULINAR. **E**: ESTÍPULA PERSISTENTE.  
 (2): Face abaxial (AB), Face adaxial (AD), Estípula apical (EA), Estípula Persistente

A superfície da cutícula da folha de *P. fractistipula* é lisa e mais espessa sobre as nervuras (FIGURA 8A, 8D). Diferente da espécie aqui analisada, *Psychotria viridis* possui cutícula estriada em ambas as faces da folha, sendo mais espessa na face adaxial (MARTINS *et al.*, 2006). Por outro lado, *Psychotria stenocalix* apresentou cutícula estriada nas folhas de sol e lisa nas folhas de sombra (GOMES *et al.*, 1995) e *P. tenuinervis* com estrição também em folhas de sombra (GOMES *et al.*, 1995). Parece que as estriações na cutícula em *Psychotria* podem ou não estar relacionada ao ambiente de ocorrência. Como *P. fractistipula* é típica de ambiente sombreado podemos considerar a cutícula lisa como uma característica importante para sua distinção.

A folha de *P. fractistipula* é hipoestomática, com estômatos paracíticos localizados no mesmo nível das demais células epidérmicas (FIGURA 8B). Esse tipo de estômato e padrão de distribuição é característico para Rubiaceae (SOLEREDER, 1908; METCALFE; CHALK, 1957). A presença de estômatos foi registrada somente na face abaxial.

De acordo com Todzia e Almeida (1991), o tamanho, a forma e diferenças basais dos tricomas, fornecem caracteres úteis para identificação dos táxons. Em *P. fractistipula* os tricomas são tectores simples e unicelulares e estão presentes em ambas as faces da folha, principalmente na face abaxial da região da nervura central (FIGURA 8B, 8C, 8D, 8E). Embora as Rubiaceae são descritas como tendo tricomas simples, unicelulares e unisseriados (SOLEREDER, 1908; METCALFE; CHALK, 1957) algumas *Psychotrias* são glabras (*P. glaziovii*, *P. leiocarpa* e *P. racenosa*) (MORAIS *et al.*, 2011) Os tipos de tricomas são uma característica relevante para o controle da qualidade de drogas vegetais, visto que elas são comercializadas na forma rasurada ou pulverizada

O mesofilo das folhas de *P. fractistipula* é do tipo dorsiventral, sendo constituído por uma única camada de parênquima paliçádico com células pouco alongadas e cerca de quatro camadas de parênquima esponjoso (FIGURA 8H). Mesofilo dorsiventral é comum para as espécies de *P. hoffmannseggiana*, *P. carthagenensis*, *P. deflexa*, *P. glaziovii*, *P. leiocarpa*, *P. racemosa* e *P. vellosiana* (MORAIS *et al.*, 2011).

Em secção transversal da folha de *P. fractistipula* a nervura central é reta na face adaxial e proeminente e arredondada na face abaxial (FIGURA 8F, 8G). As células da extremidade da nervura central da *P. carthagenensis* tocam-se formando um círculo, diferenciando as duas espécies. A nervura central é biconvexa para *P. hoffmannseggiana*, *P. carthagenensis*, *P. deflexa*, *P. glaziovii*, *P. leiocarpa*, *P. racemosae* *P. vellosiana*. (MORAIS *et al.*, 2011).

Em posição subepidérmica são encontradas colênquima angular em ambas as faces (FIGURA 8F). Na face adaxial o parênquima clorofiliano é contínuo na nervura central (FIGURA 8F). A base da folha possui um feixe vascular colateral de maior porte em forma de ferradura e dois feixes laterais menores (FIGURA 8F). O feixe vascular colateral é típico de *Psychotria* (MORAIS *et al.*, 2011).

A epiderme da lâmina foliar de *P. fractistipula*, em vista frontal, apresenta células poligonais com paredes anticlinais retas em ambas as faces (FIGURA. 8H). Organização semelhante foi registrada para *Psychotria viridis* (MARTINS *et al.*, 2006). No entanto, essa espécie distingue-se da espécie aqui analisada por apresentar uma drusa por célula, além de cristais prismáticos. A epiderme da lâmina foliar de *P. fractistipula* também difere de *Psychotria hoffmannseggiana* e *Psychotria glaziovii*, que possuem células com paredes sinuosas na superfície abaxial (MORAIS *et al.*, 2011).

A presença de ráfides no parênquima paliçádico foi verificada para *P. fractistipula* (FIGURA 8I). A presença de ráfides é característica comum no gênero, já relatada para *P. carthagenensis* (VITARELLI, 2009), *P. hoffmannseggiana*, *P. carthagenensis*, *P. deflexa*, *P. glaziovii*, *P. leiocarpa*, *P. racemosa* e *P. vellosiana* (MORAIS *et al.*, 2011).

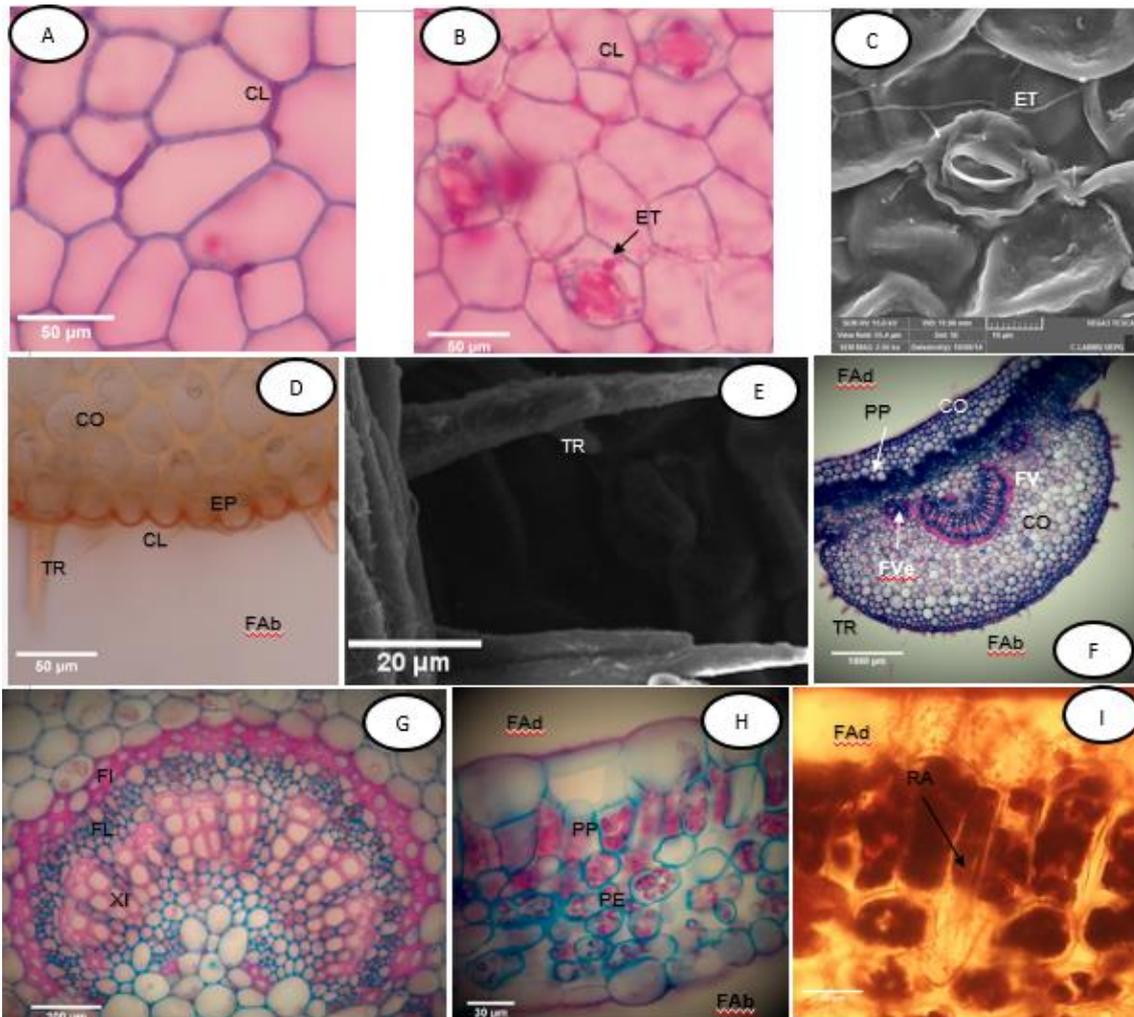


FIGURA 8 - *Psychotria fractistipula* L.B. Sm., Klein & Delprete - FOLHA EM CORTE PARADÉRMICO E SECÇÃO TRANSVERSAL

NOTA: (1) **A**: EPIDERME VISTA FRONTAL FACE ADAXIAL, CORTE PARADÉRMICO. **B**: CORTE PARADERMICO FACE ABAXIAL, PRESENÇA DE ESTÔMATOS. **C**: ESTÔMATOS EM MEV. **D**: DETALHE DOS TECIDOS DA FACE ABAXIAL, DESTACANDO O COLÊNQUIMA E TRICOMAS, COLORAÇÃO SUDAM III. **E**: TRICOMAS EM MEV. **F**: NERVURA CENTRAL EVIDENCIANDO O CILINDRO VASCULAR MEDULAR E FEIXE VASCULAR EXTERNO. **G**: SISTEMA VASCULAR.

(2) Cutícula lisa (CL); Estômato (ET); Colênquima (CO); Epiderme (EP); Tricoma (TR); Face abaxial (FAb); Face Adaxial (FAd); Parênquima paliçádico (PP); Parênquima esponjoso (PE); Feixe vascular (FV); Feixe vascular externo (FVe); Fibras (FI); Floema (FL); Xilema (XI); Ráfide (RA); Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

*P. fractistipula* não apresentou domácias, as quais foram relatadas próximas a nervura central para *P. viridis* (MARTINS *et al.*, 2006) *P. hoffmannseggiana*, *P. carthagenensis*, *P. deflexa* e *P. vellosiana* (MORAIS *et al.*, 2011).

O caule apresenta formato ovalado com ligeiras reentrâncias nas laterais (FIGURA 9A). A epiderme é uniestratificada, com estômatos, cutícula estriada

(FIGURA 9B) e presença de tricomas tectores simples e unicelulares (FIGURA 9E). O córtex possui várias camadas de colênquima angular contínuo subjacente à epiderme e várias camadas de parênquima fundamental, o córtex também é caracterizado pela presença de grãos de amido (FIGURA 9D). O cilindro vascular apresenta xilema e floema concêntrico seguindo o formato do caule, com xilema interno e floema externo (FIGURA 9B).

A medula é parenquimática apresenta numerosos grãos de amido na região periférica (FIGURA 9B). A *P. fractistipula* também caracterizou-se pela presença de cloroplastos nesse órgão. A presença de amido também foi detectada em *Psychotria ipecacuanha* (SOUZA *et al.*, 2008).

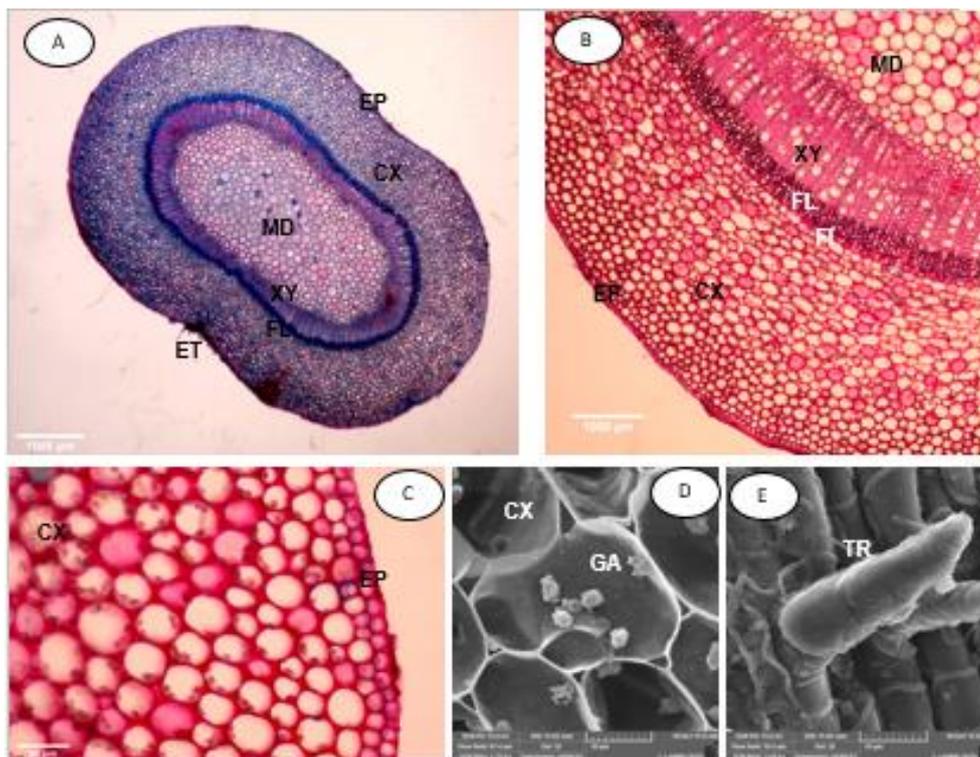


FIGURA 9 - *Psychotria fractistipula* L.B. Sm., Klein & Delprete - CAULE EM SECÇÃO TRANSVERSAL

NOTA: (1) **A:** CAULE EM CORTE TRANSVERSAL, EVIDENCIANDO CÓRTEX, FLOEMA, XILEMA, MEDULA E ESTOMATO. **B:** DETALHE DO SISTEMA VASCULAR DO CAULE. **C:** CÓRTEX APROXIMADO, DETALHANDO A EPIDERME. **D:** CORTE TRANSVERSAL EM MEV EVIDENCIANDO OS GRÃOS DE AMIDO. **E:** ESTÔMATO EM MEV.

(2) Medula (MD); CórTEX (CX); Epiderme (EP); Xilema (XY); Floema (FL); Tricoma (TR) Fibras (FI); Grãos de amido (GA);

## 5.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE E CINZAS TOTAIS

Os parâmetros de análise do teor de umidade e cinzas totais foram determinados pela primeira vez para a espécie *Psychotria fractistipula*. Esta análise tem grande importância para o controle de qualidade uma vez que pode auxiliar na identificação botânica e identificação de impurezas na amostra (BRASIL, 2010). O teor de umidade e cinzas mostram variações conforme a parte morfológica analisada. Foi encontrado um valor maior de umidade no caule e de cinzas na folha. Os resultados estão demonstrados como média  $\pm$  desvio padrão na Tabela 5.

TABELA 5 - ANÁLISES FÍSICO QUÍMICAS DO MATERIAL VEGETAL

<b>ANÁLISE</b>	<b>FOLHA</b>	<b>CAULE</b>
<b>Umidade</b>	10,77 ± 0,18	12,5 ± 0,79
<b>Cinzas</b>	9,48 ± 0,25	4,108 ± 0,25

FONTE: O autor (2015)

### 5.3 RENDIMENTO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Psychotria fractistipula*

O rendimento dos extratos brutos foi calculado à partir do valor obtido no teor de sólidos. O caule possui um rendimento de 4,3815% ± 0,166, enquanto para o extrato bruto das folhas foi de 12,588% ± 0,89.

Foram obtidos 68,08g de extrato bruto do caule e 27,0648g de extrato bruto das folhas de *Psychotria fractistipula*. Para a realização dos ensaios biológicos foram separados 2 gramas de cada um dos extratos bruto, o restante foi utilizado para a obtenção das frações: fração Hexânica (FH), fração clorofórmio (FC), fração acetato de etila (FAE) e fração remanescente (FR). Na Tabela 6 foi demonstrado o rendimento de cada fração em relação ao extrato bruto. Pode-se observar que a fração com maior rendimento foi a FAE do caule seguido da FH da folha, e a de menor rendimento foi a FC folhas seguindo da FC do caule.

TABELA 6 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS POR SOXHLET

AMOSTRA	Massa Obtida (g)	Rendimento (%) em relação ao extrato bruto total
		<b>FOLHAS</b>
FH	8,6107	31,8151
FC	0,7399	2,7338
FAE	8,265	30,5378
		<b>CAULE</b>
FH	10,3836	15,2520
FC	5,2538	7,71709
FAE	32,156	47,232
FR	20,2866	29,7981

NOTA: Fração hexânica (FH), Fração clorofórmio (FC), Fração Acetato de etila (FAE) e Fração remanescente (FR).

#### 5.4 ANÁLISE DE COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR CCD.

Através da análise de CCD foram encontrados os resultados descritos na Tabela 7.

TABELA 7 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES

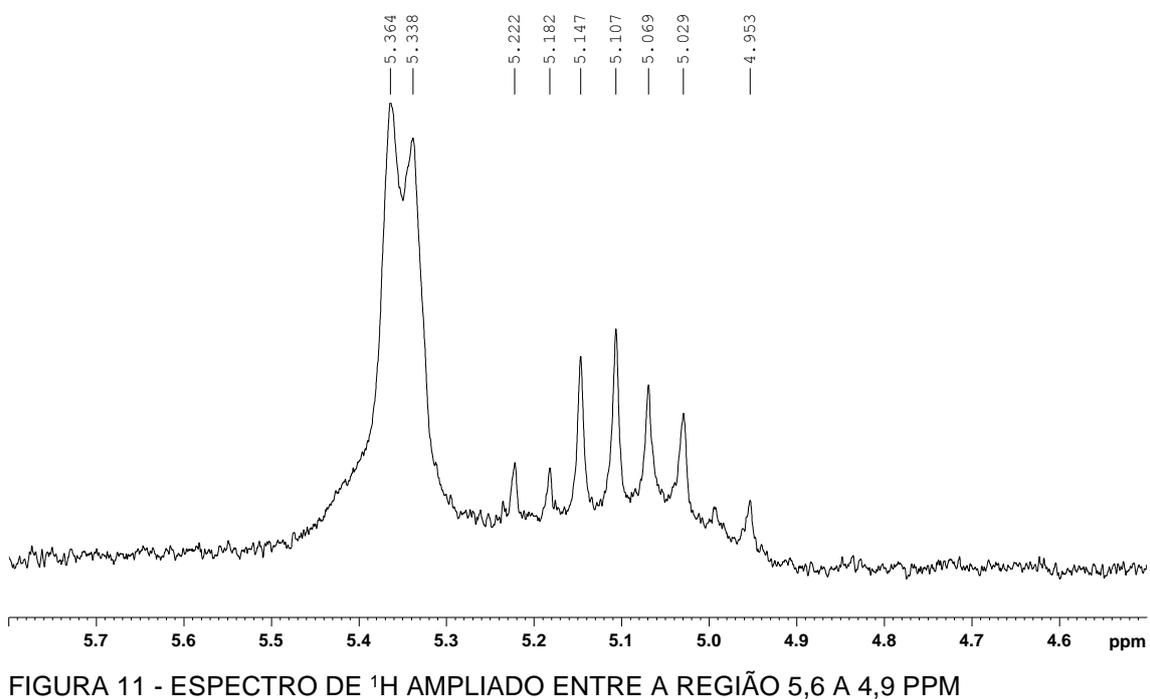
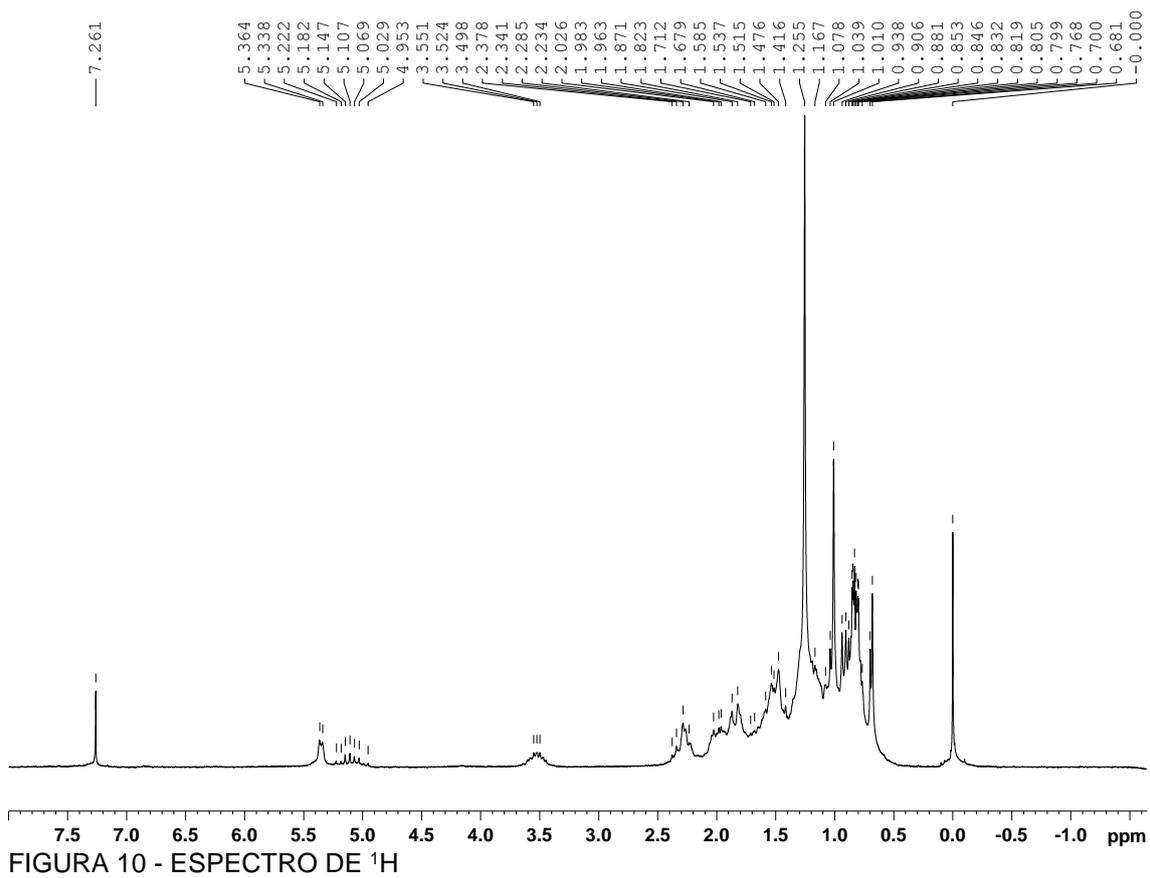
Componentes	Flavonoides	Taninos	Terpenos	Alcaloide
AMOSTRAS	<b>FOLHAS</b>			
EB	+	+	+	
FH			+	
FC	+			+
FAE	+	+	+	
	<b>CAULE</b>			
EB	+	+	+	
FH			+	
FC	+			+
FAE	+	+	+	
FR				

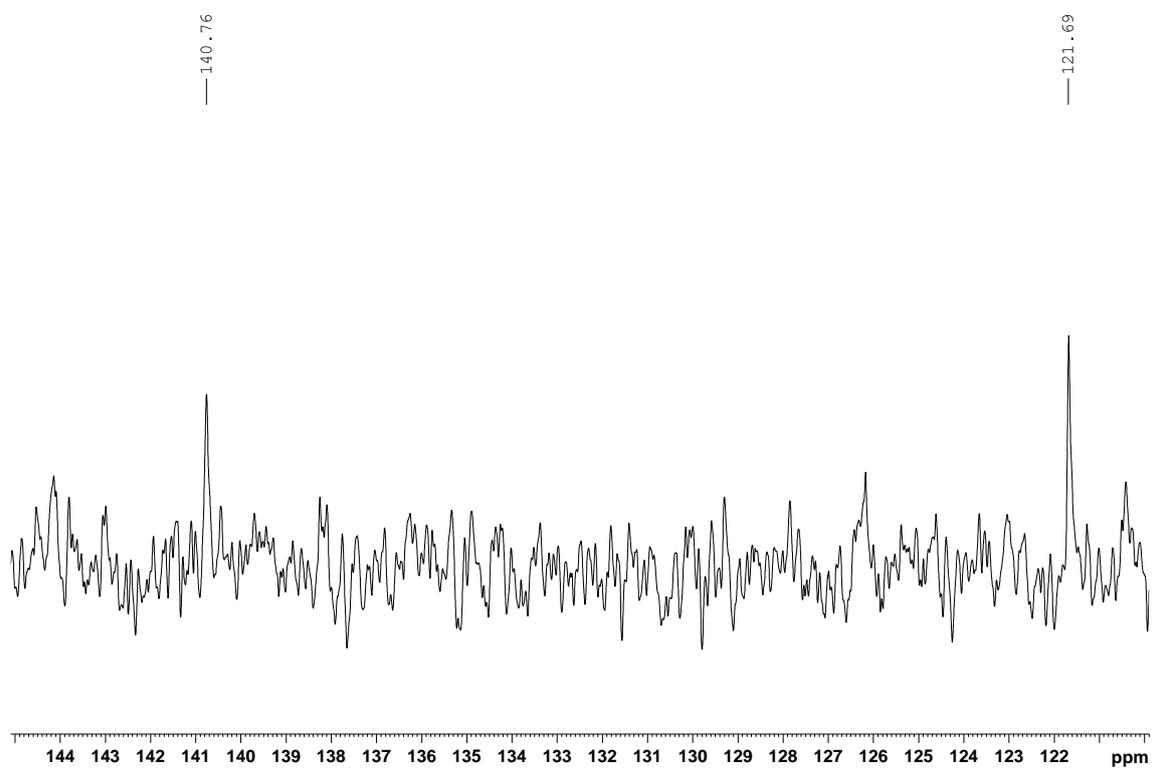
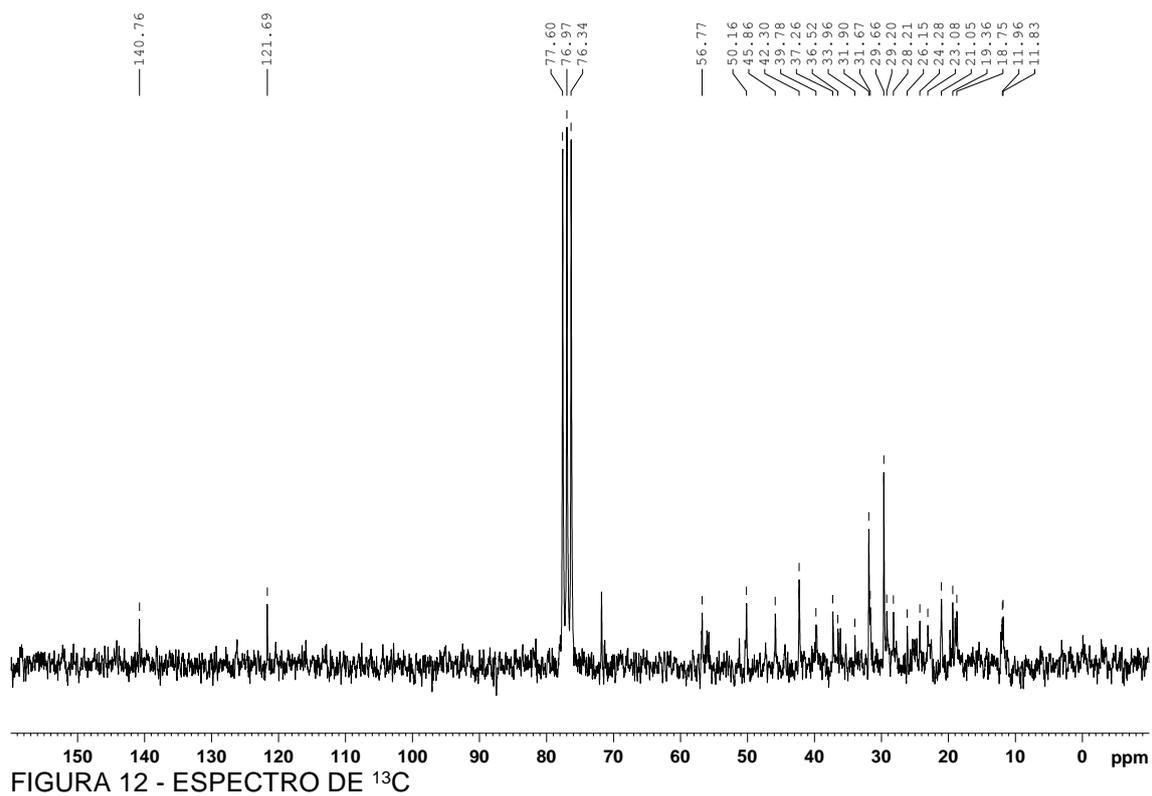
NOTA: Fração hexânica (FH), Fração clorofórmio (FC), Fração Acetato de etila (FAE) e Fração remanescente (FR).

## 5.5 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO CONSTITUINTE QUÍMICO ISOLADO

### 5.5.1 Identificação do Composto FH-25

O composto isolado obtido da fração hexano, das partes aéreas da espécie *Psychotria fractistipula*, apresenta a forma de cristais com formato de agulhas. Para identificação do composto isolado foi utilizado RMN conforme descrito no item 4.7.1. No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 10, 11) foram observados sinais característicos de hidrogênios na região de 3,52 ppm, do hidrogênio olefínico H-6 em  $\delta\text{H}$  5,35 ppm ( $J = 5,1$  Hz, d) e o acúmulo de sinais na região de 0,60 - 2,40 ppm atribuídos à presença de vários hidrogênios metílicos, metínicos e metilênicos que são sinais característicos dos esteróides  $\beta$ -sitosterol e campesterol. Pela análise do espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 12, 13, 14), foram observados sinais de carbonos insaturados em 140,77 (C) e 121,72 (CH). Baseado nos dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e por comparação destes com os dados encontrados na literatura (ANDRADE, 2003) (Tabela 8), o composto FH - 25 foi identificado como uma mistura dos esteróides  $\beta$ -sitosterol (FIGURA 15) e campesterol (FIGURA 16).





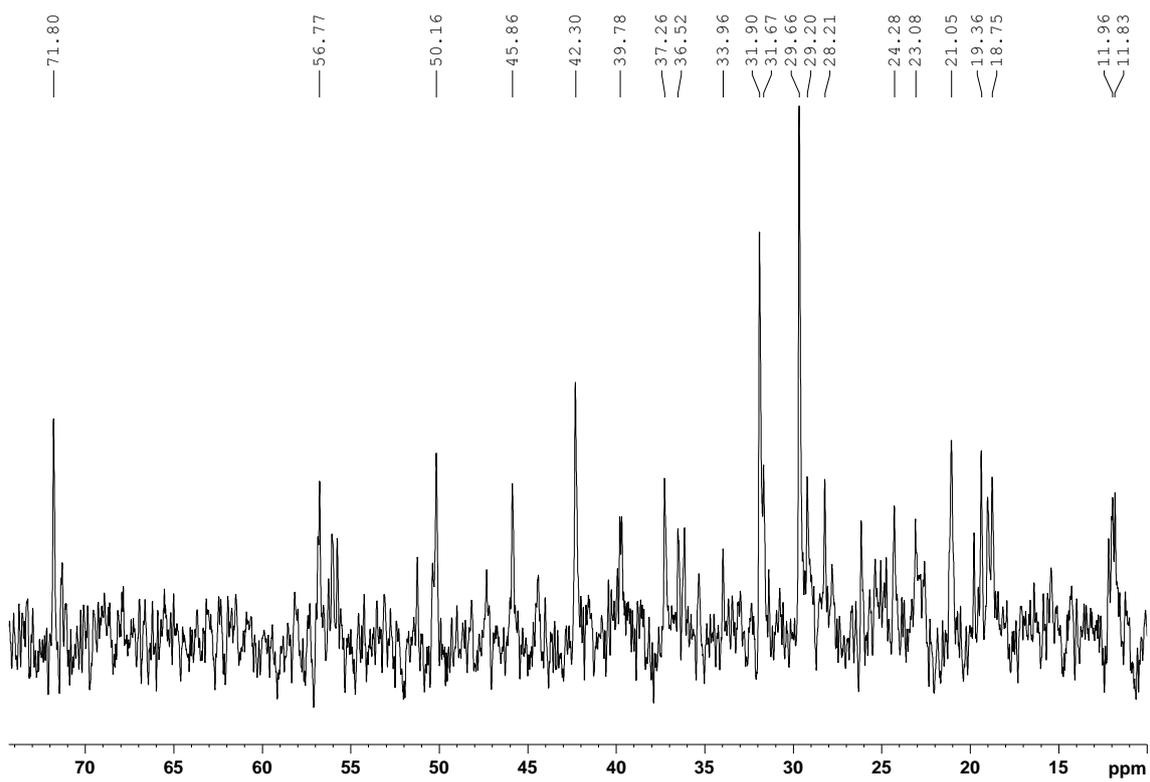


FIGURA 14 - ESPECTRO DE  $^{13}\text{C}$  AMPLIADO ENTRE A REGIÃO 10 A 74 ppm

TABELA 8 - COMPARAÇÃO DOS ESTERÓIDES  $\beta$  - SITOSTEROL E CAMPESTEROL

$^{13}\text{C}$	$\beta$ -Sitosterol	Campesterol	$\beta$ -Sitosterol (ANDRADE, 2003)	Campesterol (ANDRADE, 2003)
1	37,25	37,25	37,27	37,27
2	31,66	31,66	31,65	31,65
3	71,80	71,80	71,82	71,82
4	42,29	42,29	42,29	42,29
5	140,76	140,76	140,77	140,77
6	121,68	121,68	121,72	121,72
7	31,89	31,89	31,91	31,91
8	31,89	31,89	31,91	31,91
9	50,15	50,15	50,15	50,15
10	36,51	36,51	36,52	36,52
11	21,05	21,05	21,09	21,09
12	39,77	39,77	39,79	39,79
13	42,29	42,29	42,29	42,29
14	56,76	56,76	56,78	56,78
15	24,27	24,27	24,32	24,32
16	28,20	28,20	28,26	28,26
17	56,08	56,08	56,07	56,07
18	11,82	11,82	11,87	11,87
19	19,36	19,36	19,41	19,41
20	36,13	36,13	36,16	36,16
21	19,01	19,36	19,04	19,41
22	31,89	33,98	31,91	33,96
23	29,65	26,21	29,70	26,09
24	39,77	45,85	39,79	45,85
25	31,66	29,21	31,65	29,16
26	21,05	18,74	21,09	18,79
27	19,78	19,36	19,83	19,41
28	18,74	23,08	18,79	23,08
29	11,82	-	11,99	-

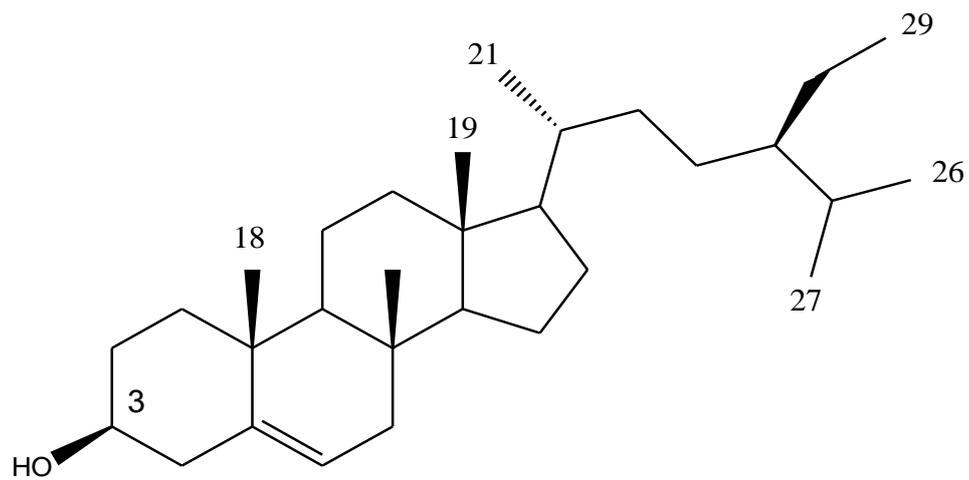
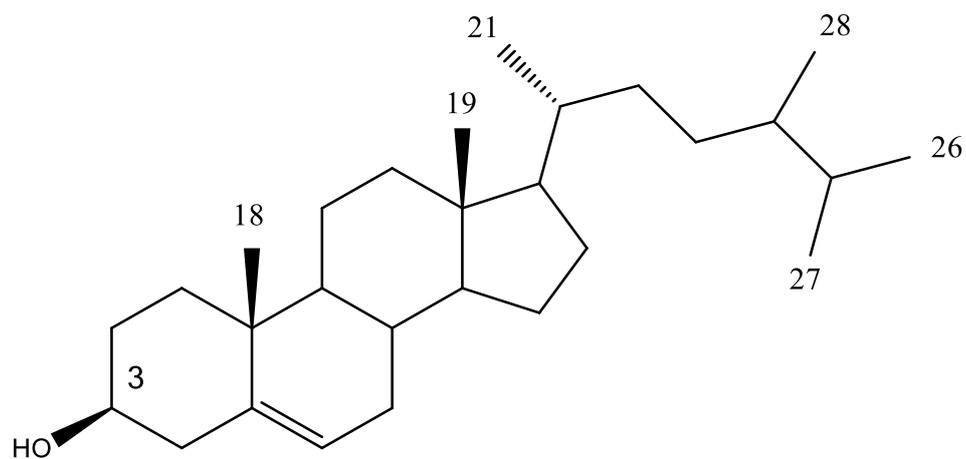
FIGURA 15 - ESTRUTURA  $\beta$  -SITOSTEROL

FIGURA 16 - ESTRUTURA DO CAMPESTEROL

## 5.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina*

*Artemia salina* é um microcrustáceo de água salgada, encontrado em lojas especializadas em aquários, sendo utilizado para alimentar peixes (MEYER *et al.*, 1982). Por ser um ensaio rápido de baixo custo e simples realização, esse microcrustáceo é utilizado para estimar a toxicidade por meio da concentração

letal média (CL<sub>50</sub>), podendo proporcionar uma análise de toxicidade geral (CAVALCANTE *et al.*, 2000; MEYER *et al.*, 1982; SIQUEIRA *et al.*, 2001). O número de crustáceos mortos e a CL<sub>50</sub> calculada pelo teste estatístico Probitos estão descritos na Tabela 9.

TABELA 9 - ENSAIO DE TOXICIDADE CONTRA *Artemia salina* NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATOS E FRAÇÕES.

Concentração AMOSTRA	MORTALIDADE ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )				CL <sub>50</sub> ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	IC de 95% ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
	10	100	500	1000		
	<b>FOLHAS</b>					
EB	0	1	2	3	> 1000	-
FH	0	0	0	0	> 1000	-
FC	0	1	4	4	> 1000	-
FAE	6	6	9	30	537,42	371,43 - 777,58
	<b>CAULE</b>					
EB	0	0	1	3	> 1000	-
FH	0	0	1	6	> 1000	-
FC	0	0	0	6	> 1000	-
FAE	0	1	2	19	849,51	719,9 - 1003,58
FR	0	0	1	19	857,24	731,23 - 1004,98

NOTA: Extrato bruto (EB), Fração hexânica (FH), Fração clorofórmio (FC), Fração Acetato de etila (FAE) e Fração remanescente (FR). Intervalo de confiança (IC). Concentração letal (CL<sub>50</sub>).

De acordo com Meyer *et al.* (1982), a amostra se caracteriza tóxica frente a *A. salina* quando a CL<sub>50</sub> for inferior a 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Desta forma podemos considerar que as frações acetato de etila da folha e do caule e a fração remanescente do caule apresentaram atividade tóxica frente ao microcrustáceo. Apesar das outras frações apresentarem mortalidade, sua atividade não foi estatisticamente significativa.

A prospecção fitoquímica demonstrou a presença de flavonóides na FAE, o qual pode ser responsável pela atividade contra *Artemia salina* (MOREIRA *et al.*, 2003). Diversos trabalhos correlacionam essa toxicidade frente ao crustáceo com atividade antiviral, antiparasitária e antitumoral (SIQUEIRA *et al.*, 2001; MCLAUGHLIN *et al.*, 1988).

## 5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE *Aedes aegypti*

A atividade larvicida dos extratos e frações sobre *A. aegypti* demonstrou baixa mortalidade ao comparar com a *A. salina*. A única fração que apresentou  $CL_{50}$  sobre as larvas de *A. aegypti* foi a FH do caule, como demonstrado na Tabela 10. Porém todas as frações apresentaram modificações sobre a estrutura dessas larvas, demonstrando causarem danos as larvas, impossibilitando sua sobrevivência.

TABELA 10 - ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE *A. aegypti*, NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, DE EXTRATOS E FRAÇÕES.

Concentração AMOSTRA	MORTALIDADE ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )			$CL_{50}$ ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	IC de 95% ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
	10	100	1000		
	<b>FOLHAS</b>				
EB	2	3	7	> 1000	-
FH	1	1	3	> 1000	-
FC	0	0	5	> 1000	-
FAE	0	0	1	> 1000	-
	<b>CAULE</b>				
EB	3	5	6	> 1000	-
FH	9	10	19	261,02	78,43 - 868,68
FC	1	5	6	> 1000	-
FAE	3	6	13	> 1000	-
FR	6	6	6	> 1000	-

NOTA: Extrato bruto (EB), Fração hexânica (FH), Fração clorofórmio (FC), Fração Acetato de etila (FAE) e Fração remanescente (FR). Intervalo de confiança (IC). Concentração letal ( $CL_{50}$ ).

As larvas apresentaram diferenças de tamanho quando comparadas ao controle negativo e a principal diferença ocorreu na FAE da folha onde as larvas apresentaram tamanho significativamente menor (TABELA 11). Esse tamanho em relação ao controle pode indicar um retardo no crescimento da larva, podendo aumentar seu tempo larval, dificultando a passagem entre os estágios até atingir a fase de pupa (FARNESI *et al.*, 2012).

TABELA 11 - TAMANHO DAS LARVAS DE *A. aegypti* CONFORME AMOSTRA E CONCENTRAÇÃO

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA ( $\mu\text{g/mL}$ )	TAMANHO LARVAL (cm)	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE DUNCAN			
FOLHAS						
CONTROLE	-	58,33	a			
EB	10	57,0	a	b		
	100	55,8	a	b	c	
	1000	55,5	a	b	c	
FH	10	51,9	a	b	c	
	100	58,6	a			
	1000	49,1	a	b	c	d
FC	10	54,9	a	b	c	d
	100	55,6	a	b	c	
	1000	49,5	a	b	c	d
FAE	10	48,0	a	b	c	d
	100	43,7			c	d
	1000	48,0				e
CAULE						
EB	10	55,5	a	b	c	
	100	49,3	a	b	c	d
	1000	51,6	a	b	c	d
FH	10	54,3	a	b	c	d
	100	55,2	a	b	c	d
	1000	42,6				d
FC	10	53,6	a	b	c	d
	100	49,9	a	b	c	d
	1000	44,4		b	c	d
FAE	10	54,2	a	b	c	d
	100	48,3	a	b	c	d
	1000	51,5	a	b	c	d
FR	10	59,5	a			
	100	54,4	a	b	c	d
	1000	57,7	a			

NOTA: Extrato bruto (EB), Fração hexânica (FH), Fração clorofórmio (FC), Fração Acetato de etila (FAE) e Fração remanescente (FR). Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente.

As alterações morfológicas externas e interna das larvas foram analisadas em todas as amostras e concentrações, sendo que o efeito sobre a anatomia das mesmas variou conforme o tipo de extrato, parte morfológica e a dose aplicada.

A morfologia externa das larvas foi realizada comparando com o controle negativo (FIGURA 18A). Estes apresentam aspecto vermiforme e coloração branca-esverdeada, o corpo é nitidamente dividido em cabeça, tórax e abdômen. O abdômen é composto por oito segmentos. O seguimento posterior e anal 4 brânquias lobuladas para regulação osmótica e um sifão respiratório (BRASIL, 2001). A Figura 17 demonstra a morfologia externa das larvas do mosquito *A. aegypti*.

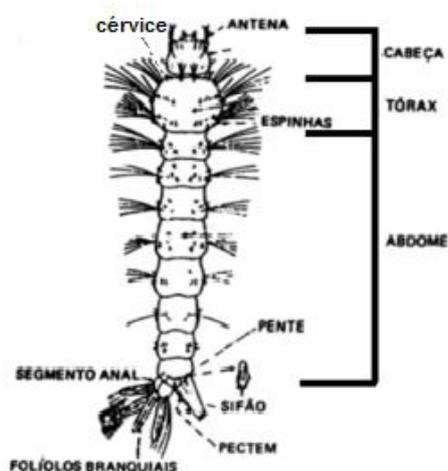


FIGURA 17 - MORFOLOGIA EXTERNA DA LARVA DO MOSQUITO *A. aegypti*  
 NOTA: Adaptado de (MONTEIRO, 2014).

As larvas expostas na concentração de 10 µg/mL apresentaram alterações externas, as expostas ao EB da folha apresentaram coloração escura desde o primeiro segmento até as papilas anais (FIGURA 18B), a FH da folha causou o alongamento das larvas entre o primeiro segmento e o tórax, as papilas anais também apresentaram coloração escurecida (FIGURA 18C). O alongamento entre o primeiro segmento e o tórax ocorreu também na FC da folha, porém sendo evidente entre o quinto segmento e as papilas anais (FIGURA 18D). As FH, FC E FAE do caule apresentaram deposição da camada de gordura expondo os segmentos (FIGURA 18E, 18F, 18G). FR do caule provocou as larvas alongamento da cervice entre o oitavo segmento e as papilas anais (FIGURA 18H).



FIGURA 18 - MORFOLOGIA EXTERNA DAS LARVAS DE *Aedes aegypti*. CONTROLES E TRATADAS COM EXTRATOS E FRAÇÕES NA CONCENTRAÇÃO DE 10  $\mu\text{g/mL}$ .

NOTA: (1) **A**: CONTROLE. **B**: EB DAS FOLHAS DEMONSTRANDO ESCURECIMENTO DOS SEGMENTOS E DA PAPILA ANAL. **C**: FH DAS FOLHAS EVIDENCIANDO ALONGAMENTO DA CÉVICE A ESCURECIMENTO DAS PAPILAS ANAIS **D**: FC FOLHA EVIDENCIANDO ALONGAMENTO DOS SEGUIMENTOS **E**: FH CAULE DEMONSTRANDO DEPOSIÇÃO DA CAMADA DE GORDURA **F**: FC CAULE APRESENTANDO DEPOSIÇÃO DA CAMADA DE GORDURA. **G**: FAE CAULE EVIDENCIANDO DEPOSIÇÃO DA CAMADA DE GORDURA. **H**: FR CAULE DEMONSTRANDO ALONGAMENTO DA CÉRVICE E SEGMENTO.

(2) Extrato bruto (EB), Fração hexânica (FH), Fração clorofórmio (FC), Fração Acetato de etila (FAE) e Fração remanescente (FR).

Na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  os extratos e frações também apresentaram alterações morfológicas externas. Na FH das folhas foram presenciadas alongamento traqueias dorsais e da cérvice (FIGURA 19B), a FC das folhas causou inibição das papilas anais (FIGURA 19C), o EB do caule causou má formação dos seguimentos na região mediana do abdómen e alongamento entre o tórax e o primeiro segmento, próximo as traqueias dorsais (FIGURA 19D). A FH do caule rompeu a cutícula e ocasionou perda de gordura corporal, expondo os segmentos do mesentero anterior (FIGURA 19E), a FC do caule reduziu o tórax e a gordura corporal e evidenciou os segmentos (FIGURA

19F). Ocorreu má formação dos seguimentos na região do mesentero médio nas larvas expostas a FAE do caule (FIGURA 19F), e as expostas a FR do caule causou alongamento da cervice (FIGURA 19H).



FIGURA 19 - MORFOLOGIA EXTERNA DAS LARVAS DE *Aedes aegypti*. CONTROLES E TRATADAS COM EXTRATOS E FRAÇÕES NA CONCENTRAÇÃO DE 100  $\mu\text{g/mL}$ .

NOTA: (1) **A:** CONTROLE. **B:** FH DAS FOLHAS, EVIDENCIANDO ALONGAMENTO DE CÉVICE E TRAQUÉIAS DORSAIS. **C:** FC DAS FOLHAS EVIDENCIANDO PAPILAS ANAIS **D:** EB CAULE EVIDENCIANDO ALTERAÇÕES NA REGIAO DO TORÁX E ABDOMEN **E:** FH CAULE APRESENTANDO ROMPIMENTO DA CUTÍCULA. **F:** FC CAULE APRESENTANDO REDUÇÃO DO TORÁX. **G:** FAE CAULE EVIDENCIANDO MÁ FORMAÇÃO DOS SEGUIMENTOS. **H:** FR CAULE DEMONSTRANDO ALONGAMENTO DA CÉVICE

(2) Extrato bruto (EB), Fração hexânica (FH), Fração clorofórmio (FC), Fração Acetato de etila (FAE) e Fração remanescente (FR).

Em relação a morfologia externa das larvas sobre a concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , a FC das folhas provocou ruptura na camada de gordura, expondo os segmentos das larvas (FIGURA 20B). O EB e a FC do caule causaram alongamento da cervice (FIGURA 20C, 20D).

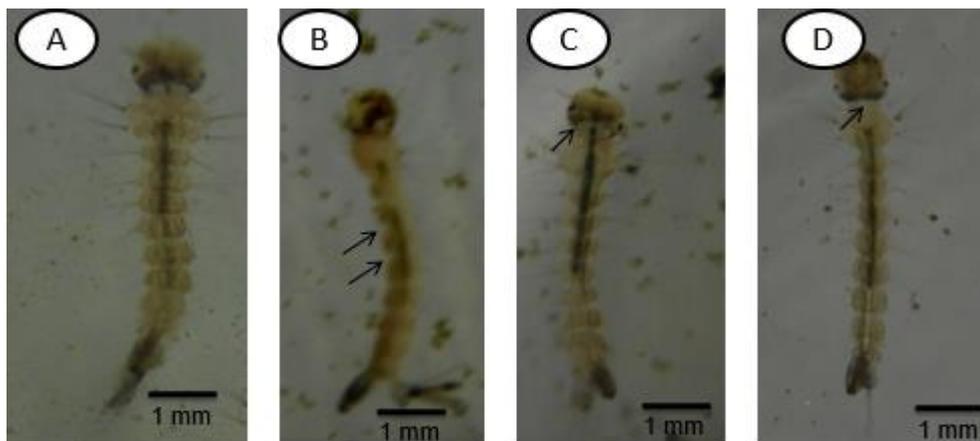


FIGURA 20 - MORFOLOGIA EXTERNA DAS LARVAS DE *Aedes aegypti*. CONTROLES E TRATADAS COM EXTRATOS E FRAÇÕES NA CONCENTRAÇÃO DE 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

NOTA: (1) **A:** CONTROLE. **B:** FC DAS FOLHAS, EVIDENCIANDO RUPTURA DA CAMADA DE GORDURA. **C:** EB CAULE EVIDENCIANDO AUMENTO DA CÉRVICE. **D:** FC CAULE EVIDENCIANDO AUMENTO DA CÉRVICE.

(2) Fração clorofórmio (FC); Extrato bruto (EB);

As larvas expostas aos extratos e frações também apresentaram deformações na morfologia interna em todas as concentrações (FIGURA 21, 22, 23). As amostras foram comparadas com o controle para verificar a sua diferenciação morfológica.

Na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  as larvas que ficaram em contato com o EB da folha diminuíram a camada de gordura e foi observado um escurecimento dos segmentos (FIGURA 21B). A FH das folhas causou espessamento do epitélio superitrófico e endoperitrófico dos segmentos larvais. Em algumas regiões, a cutícula se encontra menos espessa e com coloração mais clara (FIGURA 21C). As FC, FAE das folhas e FH do caule também causaram às larvas espessamento no epitélio subperitrófico (FIGURA 21D, 21E 21G), porém somente na FC das folhas foi possível visualizar uma espécie de capa, formada por células, provavelmente servindo como uma barreira de proteção (FIGURA 21D). A FAE das folhas também apresentou escurecimento dos segmentos (FIGURA 21E). Na EB do caule observou-se a expulsão parcial do intestino (FIGURA 21F).

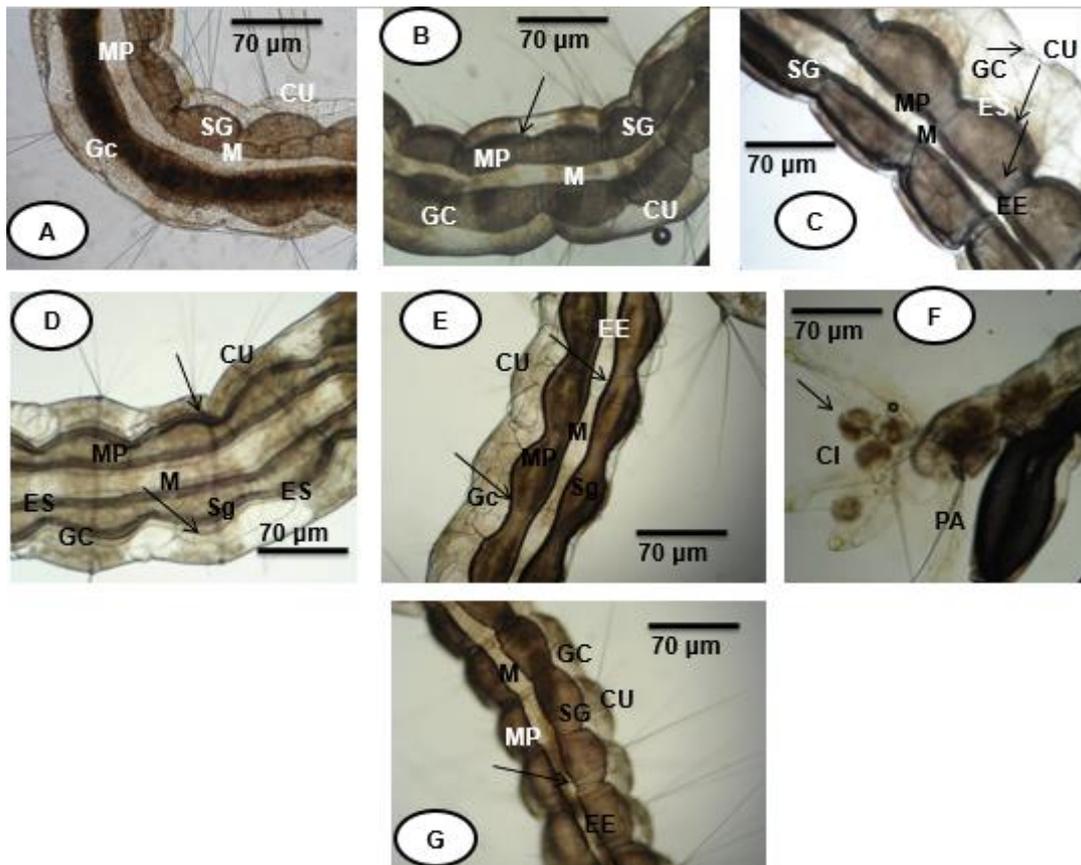


FIGURA 21 - MORFOLOGIA INTERNA DAS LARVAS DE *A. aegypti*. EXPOSTAS AMOSTRAS NA CONCENTRAÇÃO DE 10 µg/mL.

NOTA: (1) **A:** CONTROLE. **B:** EB DA FOLHA EVIDENCIANDO DIMINUIÇÃO DA GORDURA E ESCURECIMENTO DOS SEGMENTOS. **C:** FH DA FOLHA MOSTRANDO O ESPESSAMENTO DO EPITÉLIO. **D:** FC DAS FOLHAS DEMARCANDO O ESPESSAMENTO DO EPITÉLIO SUBPERITRÓFICO. **E:** FAE CAULE EVIDENCIANDO ESCURECIMENTO DOS SEGMENTOS E ESPESSAMENTO DO EPITÉLIO. **F:** EB DO CAULE APRESENTANDO EXPULSÃO PARCIAL DO INTESTINO. **G:** FH DO CAULE DEMONSTRANDO ESPESSAMENTO DO EPITÉLIO.

(2) Extrato bruto (EB), Fração hexânica (FH), Fração clorofórmio (FC), Fração Acetato de etila (FAE), Fração remanescente (FR), MP: Membrana peritrófica, Cutícula (CU) Gordura Corporal (GC), Espaço subperitrófico (ES), Segmento (SG), Mesentero (M), Papila anal (PA), Epitélio endoperitrófico (EE), Cordões do intestino (CI)

Na concentração de 100 µg/mL também foram observadas algumas alterações. As larvas expostas ao EB das folhas apresentaram ausência da camada de gordura e segmentos com aspecto escurecido (FIGURA 22B). Os segmentos das larvas que ficaram em contato com FH das folhas apresentaram bordas mais finas nos segmentos e inibição da papila anal (FIGURA 22C1, 22C2), enquanto que na FC das folhas as larvas tiveram um espessamento do epitélio que recobre os segmentos (FIGURA 22D). A FAE da folha, o EB, FH e FC do caule deixaram as larvas com os segmentos dobrados e diminuíram sua

gordura corporal (FIGURA 22E, 22F, 22G, 22H). Pode-se observar expulsão parcial do intestino na FAE do caule (FIGURA 22I). Na Figura 22J, larva exposta a FR do caule, apresentou um aspecto de claridade, provavelmente ocorreu a ruptura das células epiteliais que recobrem o mesentero, a ruptura de gordura e possível rompimento da cutícula.

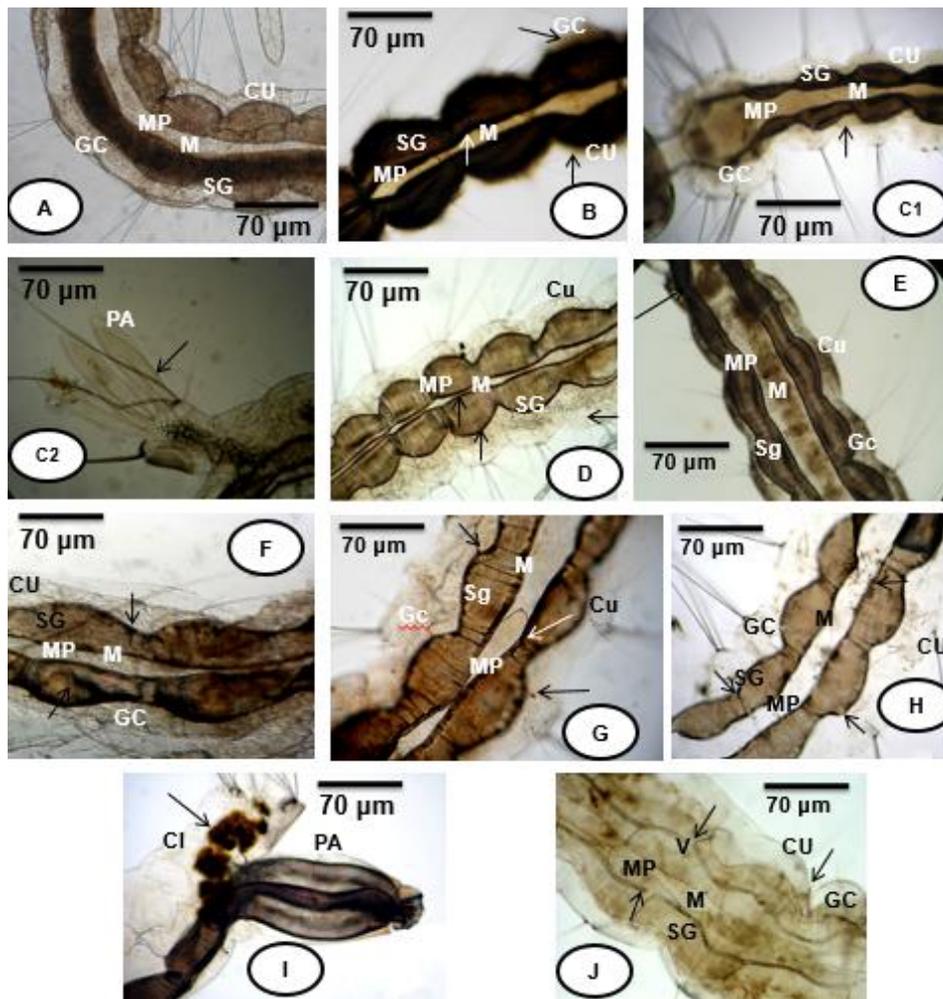


FIGURA 22 - MORFOLOGIA INTERNA DAS LARVAS DE *A. aegypti*. EXPOSTAS AMOSTRAS NA CONCENTRAÇÃO DE 100 µg/mL.

NOTA (1) **A:** CONTROLE. **B:** EB FOLHA DEMONSTRANDO ESCURECIMENTO DA LARVA E DIMINUIÇÃO DA CAMADA DE GORDURA. **C1:** FH FOLHA EVIDENCIANDO SEGUIMENTO MAIS FINO, **C2:** FH FOLHA RELATANDO INIBIÇÃO DA PAPILA ANAL. **D:** FC FOLHA APRESENTANDO O ESPESSAMENTO DO EPITÉLIO. **E:** FAE DA FOLHA EVIDENCIANDO OS SEGMENTOS DOBRADOS. **F:** EB CAULE DEMONSTRADO SEGMENTOS DOBRADOS. **G:** FH DO CAULE EVIDENCIANDO OS SEGMENTOS DOBRADOS. **H:** FC DO CAULE MOSTRANDO OS SEGMENTOS DOBRADOS. **I:** FAE DO CAULE DEMONSTRANDO A EXPULSÃO DO INTESTINO. **J:** FR DO CAULE EVIDENCIANDO DIVERSAS DEFORMAÇÕES.

(2) Extrato bruto (EB), Fração hexânica (FH), Fração clorofórmio (FC), Fração Acetato de etila (FAE), Fração remanescente (FR), MP: Membrana peritrófica, Cutícula (CU) Gordura Corporal (GC), Espaço subperitrófico (ES), Segmento (SG), Mesentero (M), Papila anal (PA), Epitélio endoperitrófico (EE), Cordões do intestino (CI)

Analisando a morfologia interna das larvas expostas a concentração de 1000 µg/mL, observamos várias deformações nas estruturas larvais. O EB da folha além de diminuir a gordura corporal das larvas também espessou o epitélio que reveste os segmentos bem como a membrana peritrófica (FIGURA 23B). Na FH e FC das folhas foi evidenciado o rompimento da gordura corporal próximo aos segmentos (FIGURA 23C, 23D), enquanto no EB do caule apresentou rompimento do epitélio subperitrófico, da camada de gordura e da cutícula próximo ao mesentero além do escurecimento dos segmentos próximos primeiro membrana peritrófica, também foi observado a diminuição do espessamento do epitélio que cobre o mesentero no primeiro segmento e a extrusão do intestino, com parte da membrana peritrófica na região próxima as papilas anais (FIGURA 23E1, 23E2, 23E3).

Nas larvas que ficaram em contato com FH do caule foi observado rompimento do epitélio endoperitrófico e subperitrófico dos segmentos, com possível dano mecânico da membrana peritrófica (FIGURA 23F). A FC do caule ocasionou as larvas deslocamento da camada de gordura próxima aos segmentos (FIGURA 23G). Quando analisamos a FAE e a FR do caule observamos a diminuição da camada de gordura, espessamento do epitélio subperitrófico e membrana peritrófica e aspecto irregular dos segmentos, formando bordas escovadas (FIGURA 23H, 23I).

Diante dessas alterações morfológicas provocada pelos extratos brutos e frações de *P. fractistipula*, pode-se enfim que esse produto se mostrou tóxico e apesar da baixa mortalidade sobre as larvas. O alongamento da cérvix é uma característica observada pelo uso do pesticida Diflubenzuron (BORGES *et al.*, 2004), a diminuição de gordura corporal foi demonstrado na utilização do pesticida Novaluron (FARNESI *et al.*, 2012), visto que a gordura corporal tem como objetivo a reserva de energia da larva essencial para a fase adulta do mosquito, podendo ocasionar a morte da larva por falta dessa reserva (SAUCEDO, 2011).

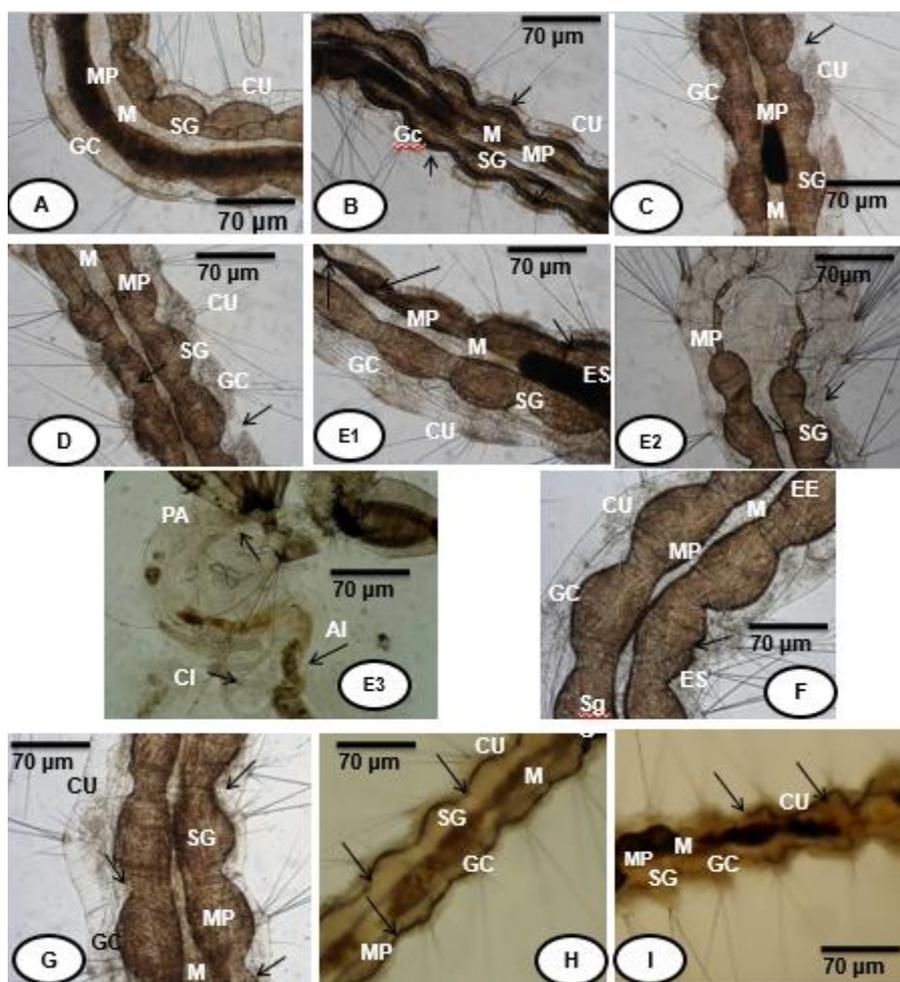


FIGURA 23 - MORFOLOGIA INTERNA DAS LARVAS DE *A. aegypti*. EXPOSTAS AMOSTRAS NA CONCENTRAÇÃO DE 1000 µg/mL.

NOTA: (1) **A:** CONTROLE. **B:** EB FOLHA EVIDENCIANDO ESPESSAMENTO DO EPITÉLIO. **C:** FH FOLHA MOSTRANDO ROMPIMENTO DA GORDURA CORPORAL. **D:** FC FOLHA RELATANDO ROPIMENTO DA GORDURA CORPORAL. **E1** EB CAULE EVIDENCIANDO O ROMPIMENTO DO EPITÉLIO E ESCURECIMENTO DOS SEGMENTOS. **E2:** EB CAULE DEMONSTRANDO DIMINUIÇÃO DO ESPESSAMENTO DO EPITÉLIO. **E3:** EB CAULE RELATANDO A EXTRUSÃO DO INTESTINO. **F:** FH CAULE INDICANDO ROMPIMENTO DO EPITÉLIO. **G:** FC CAULE EVIDENCIANDO O DESLOCAMENTO DA CAMADA DE GORDURA. **H:** FAE CAULE DEMONSTRANDO DIMINUIÇÃO DA CAMADA DE GORDURA CORPORAL. **I:** FR DO CAULE APRESENTANDO ASPECTO IRREGULAR.

(2) Extrato bruto (EB), Fração hexânica (FH), Fração clorofórmio (FC), Fração acetato de etila (FAE), Fração remanescente (FR), MP: Membrana peritrófica, Cutícula (CU) Gordura Corporal (GC), Espaço subperitrófico (ES), Segmento (SG), Mesentero (M), Papila anal (PA), Epitélio endoperitrófico (EE), Cordões do intestino (CI). Alimento (AL).

O escurecimento das larvas ocorre devido a sobreposição das cutículas dos segmentos abdominais e pode sugerir a morte da larva (BARRETO *et al.*, 2006) essa característica também foi observada no pesticida Diflubenzuron (BORGES *et al.*, 2004). A extrusão de parte do intestino e o espessamento do

epitélio são justificados por uma tentativa de defesa da larva. A extrusão do intestino é uma tentativa de isolar a parte afetada pelo extrato impedindo que os agentes tóxicos entrem em contato com mesentero e causem destruição celular, diminuindo a letalidade da lesão. O espessamento do epitélio pode ser em virtude da proliferação das células regenerativas, na tentativa de sobrevivência da larva (BARRETO *et al.*, 2006).

## 5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A CIM dos extratos e frações das folhas e do caule de *P. fractistipula* estão representados na Tabela 12.

TABELA 12 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Psychotria fractistipula*

MICRO-ORGANISMO AMOSTRA	CIM ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )				
	<i>S. a</i> **	<i>E. f</i> **	<i>P. a</i> *	<i>E. c</i> *	<i>K. p</i> *
	<b>FOLHAS</b>				
EB	62,5	250	500	500	500
FH	250	1000	1000	>1000	>1000
FC	500	500	>1000	>1000	>1000
FAE	31,25	62,5	125	250	250
	<b>CAULES</b>				
EB	500	125	500	1000	500
FH	1000	500	>1000	>1000	>1000
FC	125	500	1000	1000	>1000
FAE	31,25	250	62,5	250	250
FR	500	1000	>1000	1000	>1000

NOTA: Extrato bruto (EB), Fração hexânica (FH), Fração clorofórmio (FC), Fração acetato de etila (FAE), Fração remanente (FR), *Staphylococcus aureus* (*S.a*), *Escherichia coli* (*E.c*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P.a*), *Enterococcus faecalis* (*E.f*) e *Klebsiella pneumoniae* (*K.p*), Concentração inibitória mínima (CIM). \* Bactérias Gram-negativas. \*\*Bactérias gram-positivas.

Conforme a classificação apresentada na Tabela 3 pode-se destacar a atividade antimicrobiana da FAE da folha e do caule sobre os micro-organismos

testados. O potencial inibitório é considerado de bom a moderado em todas as cepas, destacando sua atividade contra *S. aureus* (CIM 31,25 µg/mL) e *E. faecalis* (CIM 62,5 µg/mL). O EB da folha também apresentou bom potencial inibitório para *S. aureus* (CIM 62,5 µg/mL).

Em estudo realizado por Khan e colaboradores (2001) a FAE da *Psychotria microlabrasta* apresentou ampla atividade antibacteriana contra as cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*. Essa atividade demonstrada pela FAE pode ser devido a presença de flavonóides, os quais atuam na inibição de ácidos nucleicos interferindo no metabolismo de energia da bactéria ou alterando sua membrana citoplasmática (FOWLER *et al.*, 2011; HENDRA *et al.*, 2011; KUREK *et al.*, 2011).

Alguns estudos demonstram que o triterpeno pode ser responsável pela atividade antimicrobiana (LIMA *et al.*, 2011), porém seu mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido, somente sabe-se que está ligada a ruptura da membrana plasmática (SALEEM *et al.*, 2009). A atividade moderada da FH do caule sobre o micro-organismo *Enterococcus faecalis* pode estar ligada a presença de β-sitosterol e campesterol, os esteroides isolados neste trabalho.

Neste estudo ao comparamos a atividade entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, observamos uma inibição maior nas bactérias Gram-positivas, essa inibição pode ser decorrente a estrutura da parede bacteriana, onde as bactérias Gram-negativas apresentam uma membrana externa em torno da parede celular e dificultam a permeabilidade dos compostos (CHEW *et al.*, 2011).

Estudos demonstraram que triterpenos e flavonóides apresentam maior atividade sobre micro-organismos Gram-positivos (SOUZA *et al.*, 2014 TALEB-CONTINI *et al.*, 2003; TIWARI *et al.*, 2009), justificando os resultados observados neste trabalho.

## 5.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Na atividade hemolítica das folhas e do caule o EB e as FH e FC foram dose dependentes, enquanto a FAE do caule e da folha não demonstraram esta uma resposta. Devido a atividade da FAE ser de 32,22% em 100 µg/mL, acredita-se que deverão ser realizados outros estudos em relação a atividade hemolítica dessa fração. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 13.

TABELA 13 - ENSAIO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE *Psychotria fraxistipula* UTILIZANDO SANGUE DE CARNEIRO

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO ( $\mu\text{g/mL}$ )	% HEMÓLISE	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE DUNCAN											
FOLHAS														
CONTROLE	-	100	a											
EB	100	4,36										j	k	L
	200	14,85								h	i			
	500	17,60								h				
	1000	28,75				e	f	g						
FH	100	1,68											k	L
	200	2,96											k	L
	500	33,19			d	e								
	1000	36,54			d									
FC	100	0,01										i	j	k
	200	9,54												
	500	16,96								h				
	1000	75,13		b										
FAE	100	25,18						f	g					
	200	2,81											k	L
	500	3,78											k	L
	1000	3,06											k	L
CAULE														
EB	100	0,00												l
	200	0,00												l
	500	0,00												l
	1000	0,00												l
FH	100	0,40												l
	200	28,90					e	f	g					
	500	36,40			d									
	1000	37,45			d									
FC	100	28,11					e	f	g					
	200	27,76					e	f	g					
	500	47,45			c									
	1000	51,20			c									
FAE	100	32,22				d	e	f						
	200	24,41							g					
	500	37,73			d									
	1000	11,91								h	i	j		
FR	100	0,00												l
	200	4,77										j	k	l
	500	5,08										j	k	l
	1000	6,68										j	k	l

NOTA: Extrato bruto (EB), Fração hexânica (FH), Fração clorofórmio (FC), Fração acetato de etila (FAE) e Fração remanescente (FR). Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente.

A maior porcentagem de hemólise em comparação com o controle ocorreu na FC da folha na concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , seguido pela FC do caule nas concentrações de 1000  $\mu\text{g/mL}$  e 500  $\mu\text{g/mL}$ . Demonstrando que a FC tem alta atividade hemolítica. Pode-se observar essa atividade nos Gráficos 5 e 6.

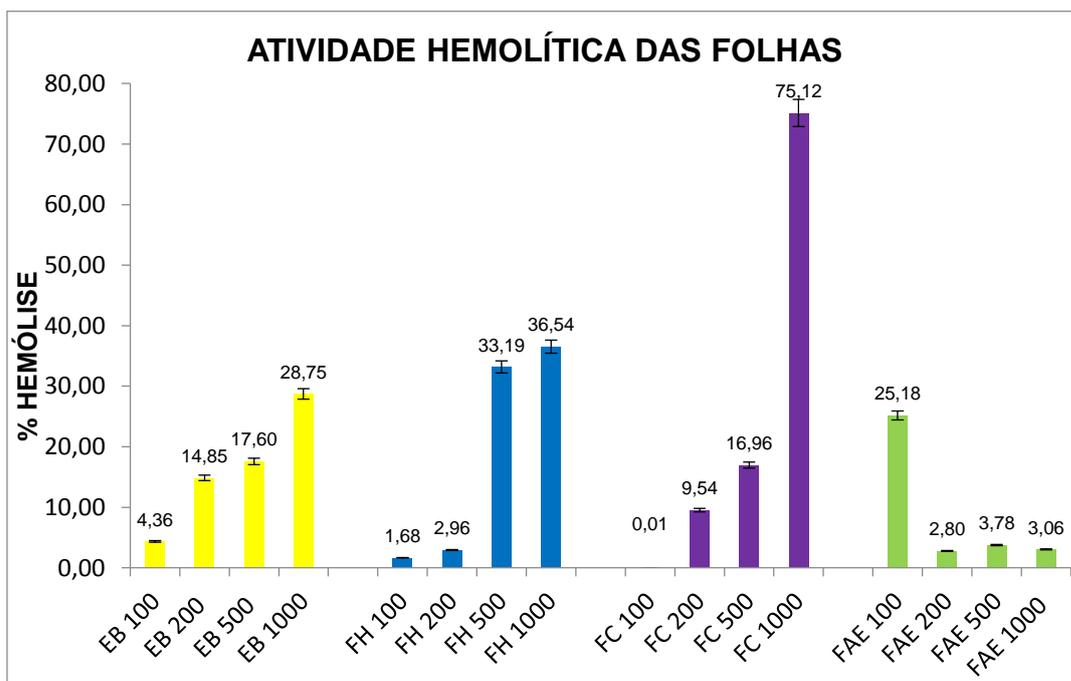


GRÁFICO 5 - COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *Psychotria fractistipula*

NOTA: Extrato Bruto (EB), Fração hexânica (FH), Fração clorofórmio (FC) E Fração Acetato de etila (FAE). Considere o controle como 100%.

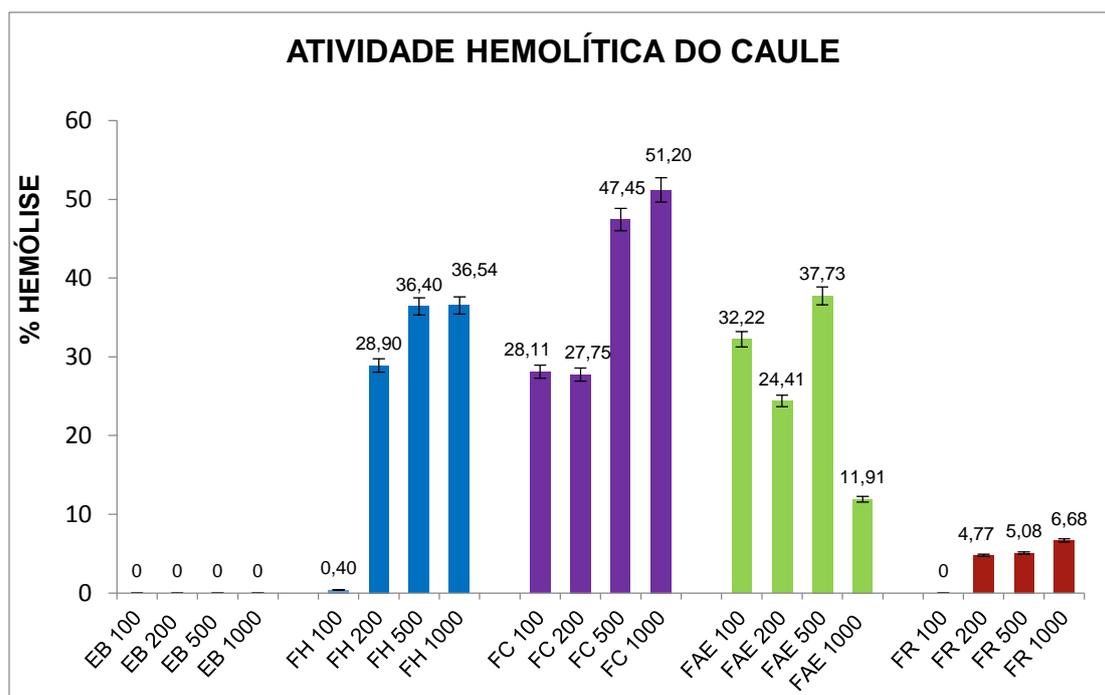


GRÁFICO 6 - COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DE *Psychotria fractistipula*  
 NOTA: Extrato Bruto (EB), Fração hexânica (FH), Fração clorofórmio (FC) E Fração Acetato de etila (FAE). Considere o controle como 100%.

A atividade tóxica da FC pode estar ligada a presença de alcaloide, pois esta classe de metabólitos secundário apresentam comprovação científica, apresentando toxicidade mesmo em pequenas doses (DEWICK, 2002). A presença de taninos no EB e FAE pode ser o responsável pela hemólise nestas amostras, uma vez que são capazes de interagir com proteínas e outras macromoléculas conferindo uma atividade tóxica e aglutinante nas hemácias (SILVA, 1999; MONTEIRO *et al*, 2005).

#### 5.10 DETERMINAÇÕES DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS ATRAVÉS DO TESTE DE FOLIN – CIOCALTEAU

Os resultados obtidos a partir da curva de ácido gálico estão expressos na Tabela 14.

TABELA 14 - QUANTIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS (EQUIVALENTE EM ÁCIDO GÁLICO - EAG) NO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *Psychotria fractistipula*

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS (mg EAG.g <sup>-1</sup> DA AMOSTRA)	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE DUNCAN				
FOLHAS						
EB	529,74 ± 0,11			c		
FH	-				d	
FC	78,22 ± 0,01					g
FAE	679,39 ± 0,07		b			
CAULE						
EB	503,89 ± 0,01			c		
FH	-					g
FC	286,23 ± 0,02				e	
FAE	783,70 ± 0,04	a				
FR	153,48 ± 0,03				f	

NOTA: Extrato Bruto (EB), Fração hexânica (FH), Fração clorofórmio (FC) E Fração Acetato de etila (FAE). Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente.

Segundo CHEW *et al.* (2011) concentrações de fenóis acima de 50 mg.EAG.g<sup>-1</sup> é considerado alta e de 50-30 mg.EAG.g<sup>-1</sup> média-alta. De acordo com esta classificação, pode-se dizer que todas as frações analisadas apresentaram alta concentração de fenóis. Os compostos secundários que possuem atividade positiva na análise de Folin Ciocalteu são: ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, fenóis simples, ligninas, lignanas, taninos hidrolisáveis e condensados (BLAINSKI *et al.*, 2013). A alta concentração de fenóis (MG EAG.G<sup>-1</sup>) nos EB e FAE da folha e do caule está de acordo com a CCD realizada para estas amostras, onde determinou a presença de flavonoides e taninos. Devido ao turvamento da Fração hexânica, não foi realizado a análise de Folin – Ciocalteu com essa fração.

A FAE das folhas de *P. fractistipula* (679,39 ± 0,07 mg EAG.g<sup>-1</sup>) apresentou maior concentração de fenóis totais em relação FAE das folhas de *Psychotrias stenocalix* (235,5 mg EAG.g<sup>-1</sup>), *Psychotria suterella* (117,1 mg EAG.g<sup>-1</sup>) (QUEIROZ *et al.*, 2000), demonstrando que a *P. fractistipula* apresenta grande potencial antioxidante, pelo fato que seus constituintes fenólicos reagiram com espécies reativas de oxigênio (ODABASOGLU *et al.*, 2004).

## 5.11 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES

### 511.1 Atividade antioxidante pela redução do complexo fosfomolibdênio

Esse método é uma maneira simples e barata de analisar a capacidade antioxidante total, podendo avaliar a atividade de componentes lipofílicos e hidrofílicos (PIETRO *at al.*, 1999).

Os resultados da atividade antioxidante pelo método de complexação foram calculados em relação aos padrões de vitamina C e rutina, cujas atividades foram consideradas 100%. Os resultados estão expressos nas Tabelas 15 e 16.

Os EB e frações de *P. fractistipula*, apresentaram atividade antioxidante pela redução do complexo do fosfomolibdênio. Considerando a atividade dos padrões (rutina e vitamina C), deve-se destacar a atividade das FAE das folhas e do caule que apresentaram atividades antioxidantes superiores a da rutina e quando comparadas com a vitamina C a FAE das folhas apresentou atividade de 90,17% e a do caule 87,37%.

TABELA 15 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO DE FOSFOMOLIBDÊNIO EM RELAÇÃO A RUTINA DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÃO DE *Psychotria fraxistipula*

AMOSTRA	EM RELAÇÃO A RUTINA AA (%) $\pm$ DP	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE DUNCAN							
<b>FOLHAS</b>									
RUTINA	100		b						
EB	63,04 $\pm$ 2,68			c					
FH	49,77 $\pm$ 5,93						f		
FC	39,89 $\pm$ 5,21				d	e			
FAE	142,98 $\pm$ 1,04	a							
<b>CAULE</b>									
EB	55,63 $\pm$ 2,02				d				
FH	25,38 $\pm$ 2,07					e			h
FC	50,77 $\pm$ 0,96								
FAE	138,54 $\pm$ 0,11	a							
FR	34,25 $\pm$ 2,08							g	

NOTA: Extrato bruto (EB), Fração hexânica (FH), Fração clorofórmio (FC), Fração acetato de etila (FAE) e Fração remanescente (FR). AA = atividade antioxidante. DP=desvio padrão. Amostras classificadas no mesmo grupo estando não diferem estatisticamente.

TABELA 16 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO DE FOSFOMOLIBDÊNIO EM RELAÇÃO A VITAMINA C DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÃO DE *Psychotria fraxistipula*

AMOSTRA	EM RELAÇÃO A VITAMINA C AA(%) $\pm$ DP	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE DUNCAN							
<b>FOLHAS</b>									
VIT C	100	a							
EB	39,75 $\pm$ 1,69			c					
FH	31,38,77 $\pm$ 3,74					e			
FC	25,15 $\pm$ 3,29						f		
FAE	90,17 $\pm$ 0,65		b						
<b>CAULE</b>									
EB	35,08 $\pm$ 1,27				d				
FH	16,00 $\pm$ 1,30								h
FC	32,02 $\pm$ 0,60				d	e			
FAE	87,37 $\pm$ 0,07		b						
FR	21,61 $\pm$ 1,31							g	

NOTA: Extrato bruto (EB), Fração hexânica (FH), Fração clorofórmio (FC), Fração acetato de etila (FAE) e Fração remanescente (FR). AA = atividade antioxidante. DP=desvio padrão. Amostras classificadas no mesmo grupo estando não diferem estatisticamente.

Os resultados do ensaio antioxidante pelo método do fosfomolibdênio estão representados nos Gráficos 7 ao 10.

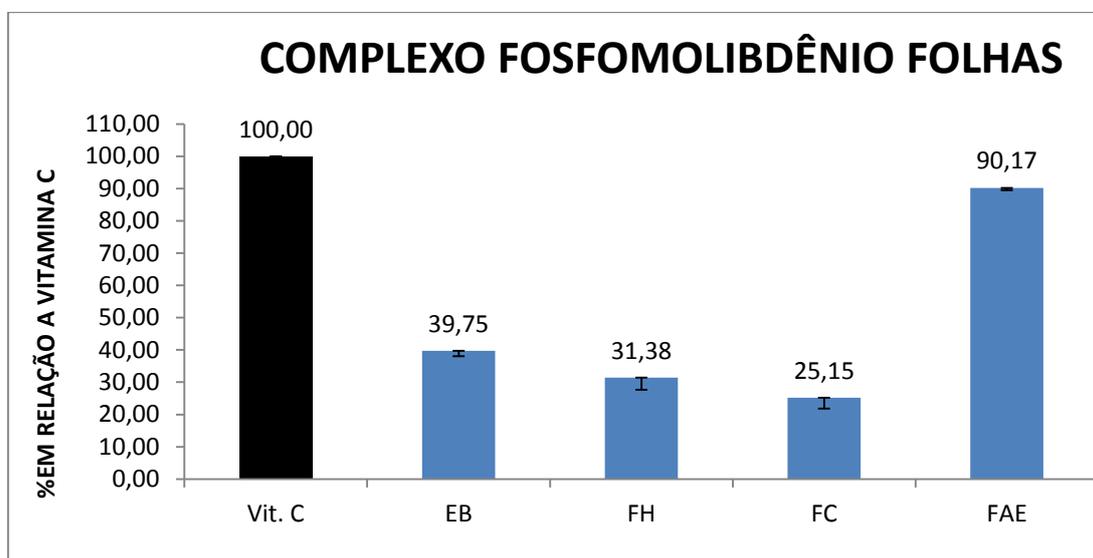


GRÁFICO 7 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *Psychotria fractistipula* PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO COMPARADA COM A VITAMINA C

NOTA: Vitamina C (VIT. C), Extrato bruto (EB), Fração hexânica (FH), Fração clorofórmio (FC), Fração acetato de etila (FAE).

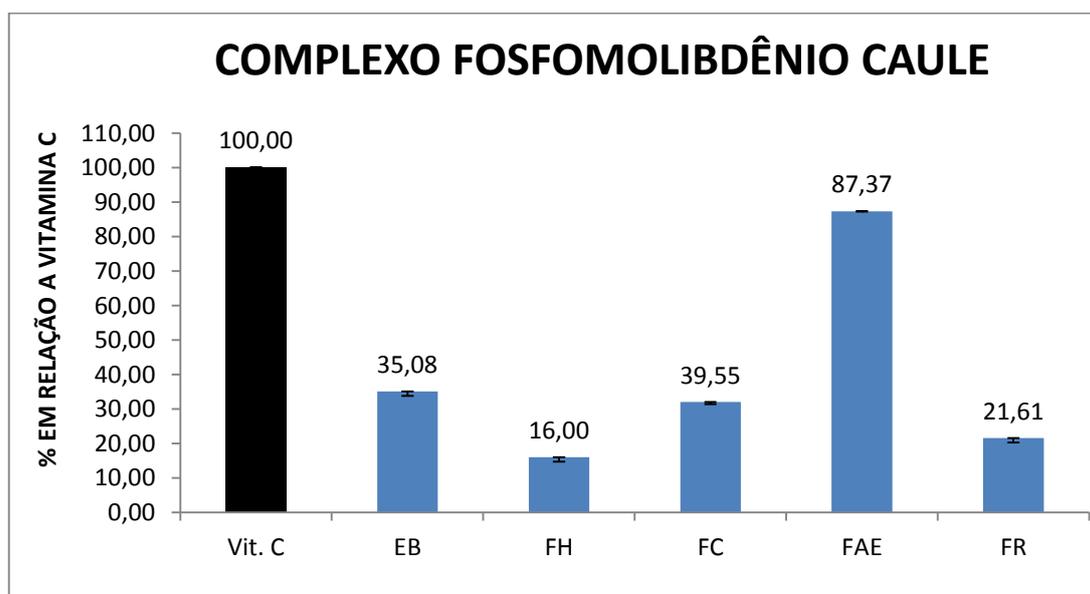


GRÁFICO 8 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DE *Psychotria fractistipula* PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO COMPARADA COM A VITAMINA C.

NOTA: Vitamina C (VIT. C), Extrato bruto (EB), Fração hexânica (FH), Fração clorofórmio (FC), Fração acetato de etila (FAE), Fração remanescente (FR).

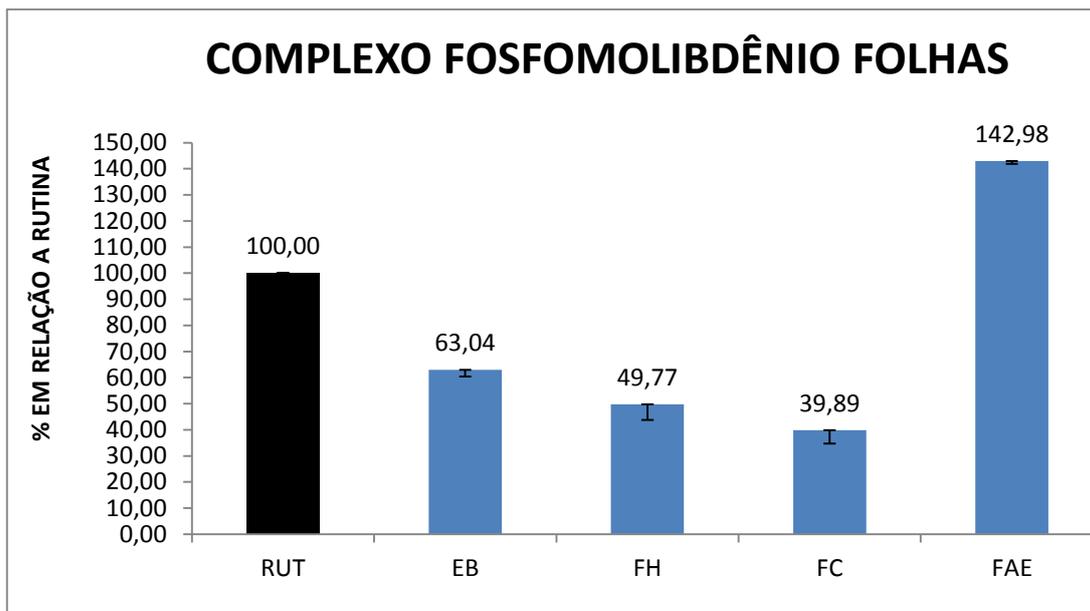


GRÁFICO 9 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DE *Psychotria fractistipula* PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO COMPARADA COM A RUTINA

NOTA: Vitamina C (VIT. C), Extrato bruto (EB), Fração hexânica (FH), Fração clorofórmio (FC), Fração acetato de etila (FAE).

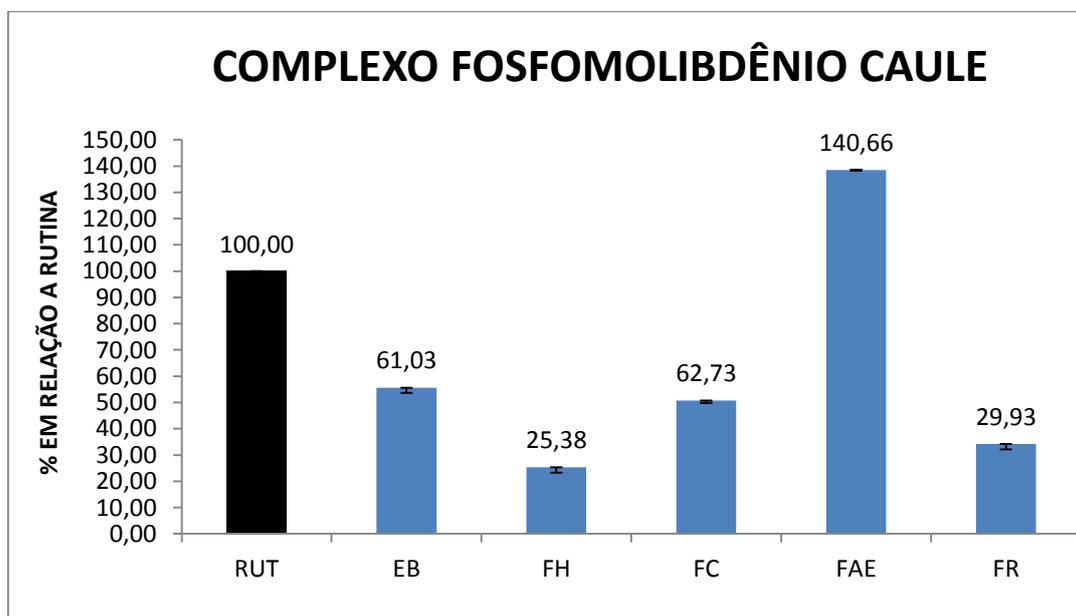


GRÁFICO 10 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DE *Psychotria fractistipula* PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO COMPARADA COM A RUTINA

NOTA: Vitamina C (VIT. C), Extrato bruto (EB), Fração hexânica (FH), Fração clorofórmio (FC), Fração acetato de etila (FAE), Fração remanescente (FR).

### 5.11.2 Redução do radical DPPH

Para avaliar os resultados desta análise foram calculados os valores da concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante ( $IC_{50}$ ) e representados graficamente, onde a abscissa representa a concentração da amostra e a ordenada é a média da AA% das amostras de cada concentração. A equação da reta desse gráfico, do tipo  $y = ax + b$ , serviu de base para determinação do valor de  $IC_{50}$ , como demonstrado nos gráficos 11 ao 18.

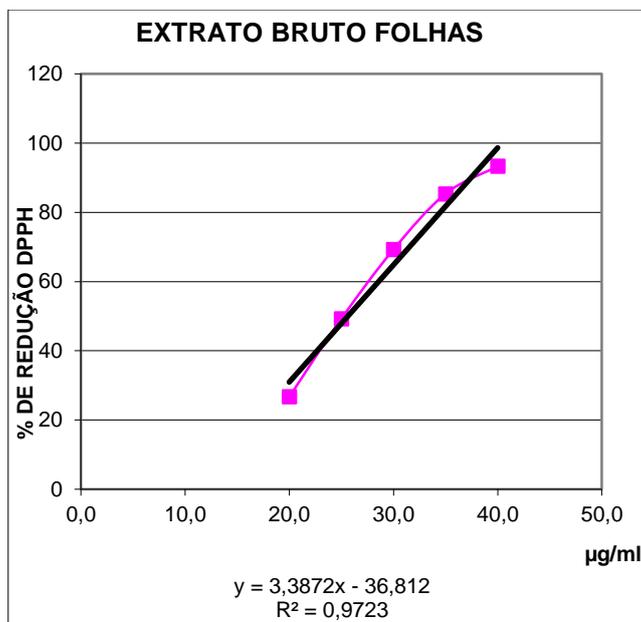


GRÁFICO 11 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *Psychotria fractistipula* PELA REDUÇÃO DO DPPH

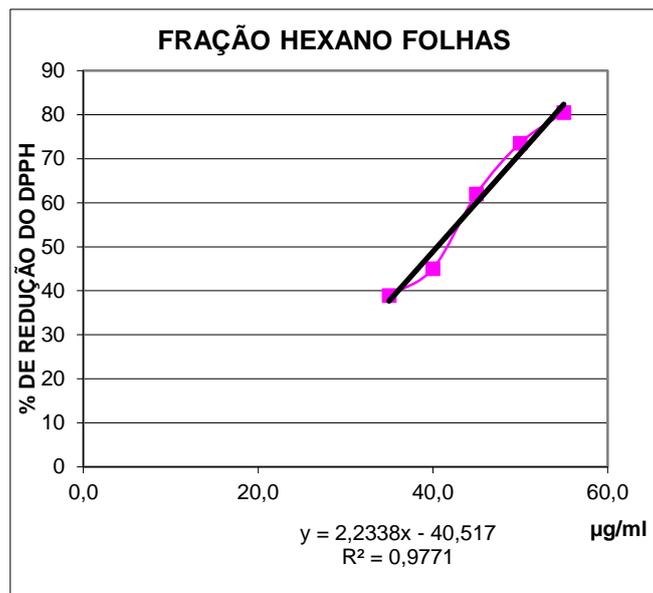


GRÁFICO 12 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO HEXANO DAS FOLHAS DE *Psychotria fractistipula* PELA REDUÇÃO DO DPPH

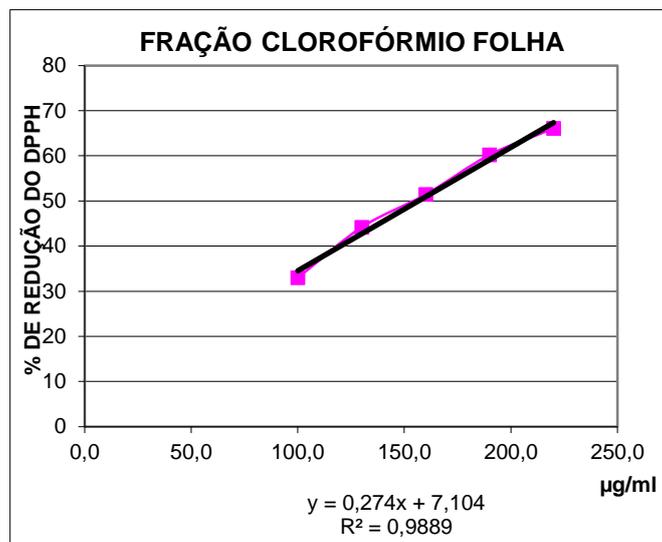


GRÁFICO 13 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DAS FOLHAS DE *Psychotria fractistipula* PELA REDUÇÃO DO DPPH

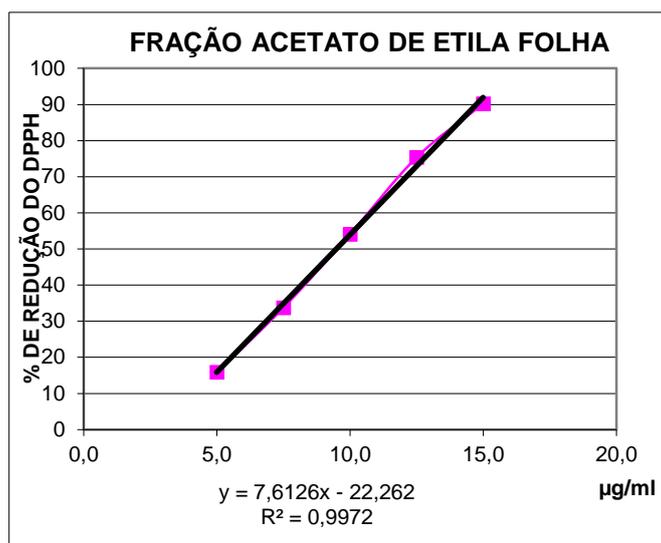


GRÁFICO 14 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE *Psychotria fractistipula* PELA REDUÇÃO DO DPPH

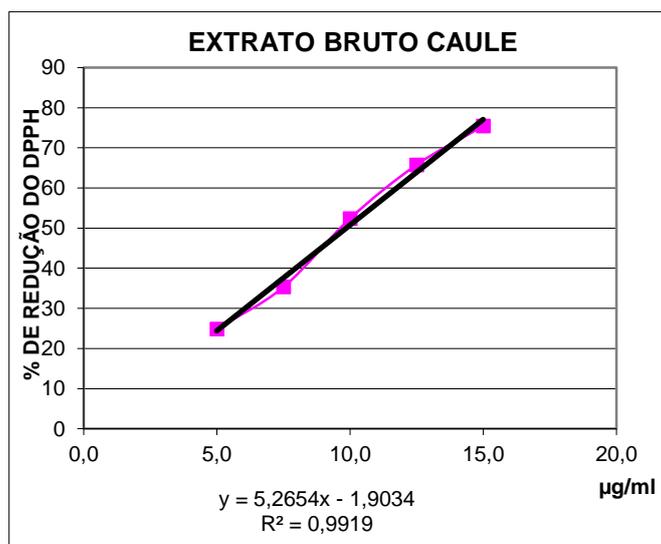


GRÁFICO 15 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO DO CAULE DE *Psychotria fractistipula* PELA REDUÇÃO DO DPPH

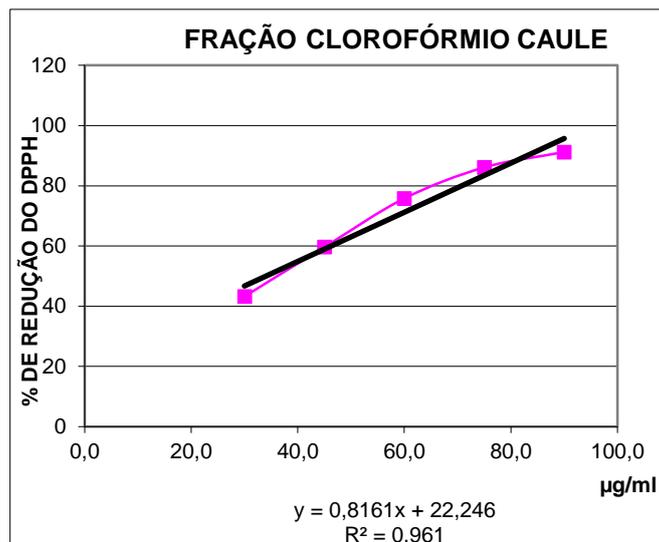


GRÁFICO 16 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DO CAULE DE *Psychotria fraxistipula* PELA REDUÇÃO DO DPPH

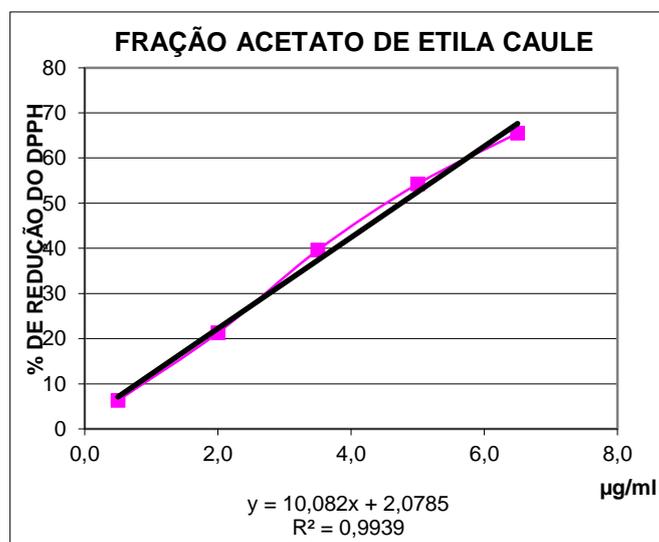


GRÁFICO 17 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO CAULE DE *Psychotria fraxistipula* PELA REDUÇÃO DO DPPH

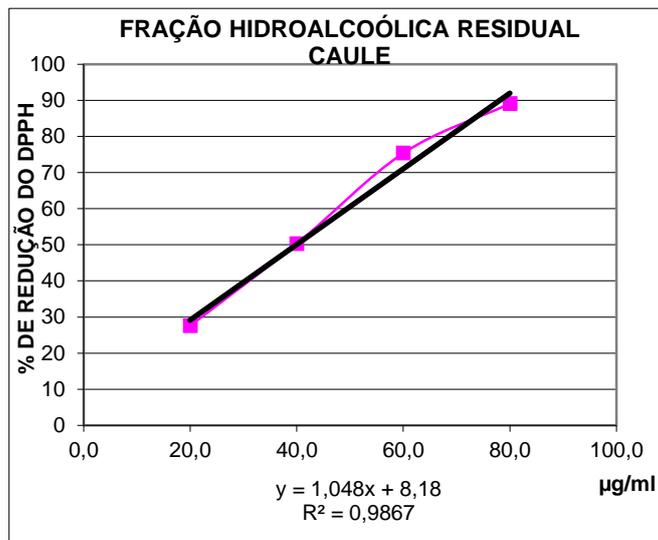


GRÁFICO 18 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA RESIDUAL DO CAULE DE *Psychotria fractistipula* PELA REDUÇÃO DO DPPH

Os dados obtidos foram comparados aos valores de vitamina C e rutina, esses resultados foram submetidos à análise de variância – ANOVA e para comparação das médias foi aplicado o teste de Duncan ( $p < 0,05$ ), essa análise e o resultado de  $IC_{50}$  estão representados na Tabela 17.

Avaliando a atividade antioxidante pelo método de DPPH, pode-se observar que todas as amostras apresentaram atividade antioxidante com exceção da FH do caule, pois seu  $IC_{50}$  foi acima de 500 µg.

A análise estatística demonstrou que a FAE do caule não demonstrou diferença estatística em relação aos padrões (rutina e vitamina C), possuindo o menor  $IC_{50}$  das amostras testadas, seguido pelas concentrações do EB do caule e da FAE da folha. Quanto menor o  $IC_{50}$  maior a atividade antioxidante.

O EB do caule apresentou uma atividade mais promissora que o EB da folha, essa correlação também ocorreu na *Psychotria prunifolia* (FARIA, 2009), quando comparamos o  $IC_{50}$  do EB das folhas e caule das duas espécies de *Psychotria*, observamos que a *P. fractistipula* apresentou uma atividade antioxidante maior em ambos os extratos.

TABELA 17 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE *Psychotria fractistipula* PELO MÉTODO DE DPPH

AMOSTRA	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM RELAÇÃO A VITAMINA C E A RUTINA AA (%) + DP	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE DUNCAN					
<b>FOLHAS</b>							
VIT C	4,92 ± 0,06	a					
RUT	6,15 ± 0,08	A					
EB	25,62 ± 0,85				d		
FH	40,52 ± 0,33					f	
FC	156,64 ± 2,80						g
FAE	9,49 ± 0,16		c				
<b>CAULE</b>							
EB	8,58 ± 0,75		b	c			
FH	>500,00						
FC	33,98 ± 1,85				e		
FAE	4,75 ± 0,19	a					
FR	39,08 ± 3,07					f	

NOTA: Rutina (RUT), Vitamina C (VITC), Extrato bruto (EB), Fração hexânica (FH), Fração clorofórmio (FC), Fração acetato de etila (FAE), Fração remanescente (FR). AA = Atividade antioxidante. DP = desvio padrão. Amostras classificadas no mesmo grupo estando não diferem estatisticamente

## 6. CONCLUSÃO

O estudo morfoanatômico, fitoquímico e biológico realizado com as folhas e caules de *Psychotria fractistipula* L.B. Sm., Klein & Delprete (RUBIACEAE) permitiram obter as seguintes conclusões:

O estudo morfoanatômico da espécie estudada apresentou folhas pecioladas, com ápice agudo e base atenuada em pecíolo, presença de tricomas em caules e folhas; cutícula lisa em ambas as superfícies, estômato paracítico, mesofilo dorsiventral.

A análise da composição fitoquímica realizada através da técnica de CCD revelou a diversidade de metabólitos secundários presentes na espécie como: esteróides, triterpenos, alcaloides, flavonoides e taninos.

Por procedimentos cromatográficos foi identificado da fração hexânica dois esteróides identificados por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  como sendo esteróides  $\beta$ -sitosterol e campesterol.

A toxicidade frente a *Artemia salina* foi demonstrada na Fração acetato de etila da folha e do caule e na Fração Remanecente do caule, com valores de CL50 inferiores a  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

A atividade larvicida foi evidenciada somente na FH do caule onde apresentou uma CL50 inferiores a  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , porém as alterações morfológicas das larvas de *Aedes aegypti*, foram relatadas em diversas amostras, dependendo da concentração utilizada, indicando o potencial tóxico desta espécie.

O extrato bruto da folha e as frações acetato de etila do caule e da folha apresentaram atividade significativa contra *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*. Essa atividade provavelmente está relacionada a presença de flavonoides nesta fração.

No ensaio de atividade hemolítica nenhuma das amostras foram estatisticamente semelhantes ao controle, porém, quando as amostras são comparadas ao controle observa-se que a fração clorofórmio da folha e do caule na concentração de  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , apresentou valores de hemólise de 75,12% e 50,20%, respectivamente.

Em relação à concentração de fenóis totais, o extrato bruto e a fração acetato de etila da folha e do caule, foram as amostras que apresentaram maior atividade pelo método de folin, estando de acordo com a CCD, que demonstrou a presença de flavonóides.

Nas atividades antioxidantes pelo método de DPPH, observa-se que as atividades mais significativas estão relacionadas as frações acetato de etila do caule e da folha, sendo comparado com a atividade da Rutina e da vitamina C. Em relação ao método fosfomolibdênio as atividades das mesmas frações foram significativas, apresentando atividade maior que a rutina e próximas a vitamina C.

Os estudos com a espécie *Psychotria fractistipula* são inéditos, revelando atividades biológicas e antioxidante significativas, devido esses dados, acredita-se que é promissor proceder a investigação química, e isolamento dos compostos das frações clorofórmica, acetato de etila e hidroalcoólica.

Sugere-se principalmente o estudo da fração acetato de etila de ambas as partes morfológicas, na tentativa de isolar o(s) constituinte(s) químico(s) que apresentaram maior potencial para os métodos testados.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. R. de. Alcalóides de Rutaceae: química e atividade biológica. **Tese de Doutorado**. UFSCar. São Carlos, 2003.

ARCTOS - **Multi-Institution, Multi-Collection and Museum Database**.

Disponível em:

<http://arctos.database.museum/name/Psychotria%20fractistipula>. Acessado em 18/01/2015.

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

BANERJEE, A.; KUNWAR A.; MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K. I. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of red blood cells. **Chemico-Biological Interactions**. Santa Fe, v. 172. n. 2. p. 134-139, jul. 2008.

BARBOSA, M. R. *et al.* 2015. **Rubiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB210> acessado em 16/01/2015.

BARRETO, C. F.; CAVASIN, G. M.; SILVA, H. H. G.; SILVA, E. G. ESTUDO DAS ALTERAÇÕES MORFO-HISTOLÓGICAS SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE *Sapindus Saponaria* Lin (SAPINDACEAE). **Rev. de Prologia Tropical**, v. 35, n. 1, p. 37-57, 2006.

BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia. Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro**. 1976.

BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. Botanical microtechnique and cytochemistry. **Ames: Iowa State University**, p. 121-276, 1976.

BIANCO, E. M. **Química e potencial antioxidante de folhas e caules de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macler. Caesalpiniacea**. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Setor de Ciências de Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

BLAINSKI, A.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. **Molecules**, n. 18, p. 6852-6865, 2013.

BOTH, F. L. **Avaliação do perfil psicofarmacológico de psicotrina isolada de *Psychotria umbellata* (Rubiaceae)**. Dissertação Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

BORGES, R. A.; CAVASIN, G. M.; SILVA, I.G.S.; ARRUDA, W.; OLIVEIRA, E.S.F.; SILVA, H.H.G.; MARTINS, F. Mortalidade e alterações morfológicas provocadas pela ação inibidora do diflubenzuron na ecdise de larvas de *A. aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista de Patologia Tropical**, v. 33, n. 1, p. 91-104, 2004.

BRASIL. **Controle de vetores: Procedimentos de segurança**. FUNASA. Brasília: Ministério da Saúde p. 208 2001

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira. 5 ed. Volume 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa. 2010.**

Calixto, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **J. Ethnofarmacol** v.100, p. 131-134. 2005

CARLINI, E. A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 75, n. 3, p. 501–512, 2003.

CAVALCANTE, M.F. *et al.* Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina*. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p.20-22, 2000.

CHAPLA, V. M. **Estudo químico e biológico do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado da *Senna spectabilis***. 179 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2012.

CHEW, Y. L.; CHAN, E. W. L.; TAN, P. L.; LIM, Y. Y.; STANSLAS, J.; GOH, J. K. 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

CIRIO, G.M.; DONI- FILHO, L.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; ZANIN, S.M.W. Interrelação de parâmetros agrônômicos e físicos de controle de qualidade de *Maytenus ilicifolia*, Mart ex. Reiss (Espinheira-santa) como insumo para indústria farmacêutica. **Visão Acadêmica**, v. 4, p. 67-76, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **M07-A8: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Wayne, PA, USA, 2008.

DAVIS, A. P.; GOVAERTS, R.; BRIDSON, D. M.; et al. A Global Assessment of Distribution, Diversity, Endemism, and Taxonomic Effort in the Rubiaceae 1. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 96, n. 1, p. 68–78, 2009.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic approach. 2 ed** editora John Willey & sons, LTD. 2002.

DORMAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R. G.; SNATOS, A. F.; NAGEM, T. J. Flavonóides : potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 241–249, 2008.

FARIA, E. O. D. E. Estudo Fitoquímico das Folhas da Espécie *Psychotria prunifolia* ( Kunth ) Steyererm ( Rubiaceae ) Estudo. Dissertação **Universidade Federal de Goiás**, 2009.

FARNESI, L. C.; BRITO, J. M.; LINSS, J. G.; Physiological and Morphological Aspects of *Aedes aegypti* Developing Larvae : Effects of the Chitin Synthesis Inhibitor Novaluron. **Plos one**, v. 7, n. 1, 2012.

FOSTER, A. S. Pratical plant anatomy. **D. van Nostrand Company Inc.**, n. Princeton, p. 217, 1949.

FOWLER, Z. L. *et al.* Development of non-natural flavanones as antimicrobial agents. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 10, 2011.

FRAGOSO, V. *et al.* Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpene indole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of *Psychotria umbellata* Vell. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, v. 22, n. 3, p. 559–66, 2008.

FRESCURA, V. D. **Avaliação do Potencialantiproliferativo, Genotóxico e Antimutagênico das Espécies *Psychotria brachypoda* ( MÜLL . ARG . ) BRITON E *Psychotria birotula* SMITH & DOWNS ( RUBIACEAE )**. Dissertação Universidade federal de Santa Maria. 2012.

Frodin, D. History and concepts of big plant genera. **Taxon** v 53, p. 741–752, 2004.

GOPUBMED - **base de dados**. disponível em <http://gopubmed.com/web/gopubmed/> acessado em: 01/01/2015.

GOMES, D.M.S.; MANTOVANI, A.; VIEIRA, R. C. Anatomia foliar de *Psychotria tenuinervis* Muell. Arg. e *Psychotria stenocalix* Muell. Arg. (Rubiaceae). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 38, n.1, p.15–33, 1995.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, n. 1, p. 1–93, 2006.

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

HENDRA, R. *et al.* Flavonoid Analyses and Antimicrobial Activity of Various Parts of *Phaleria macrocarpa*(Scheff.) Boerl Fruit. **Intitute Journal of Molecular Science**, Basel, v. 12, n. 6, p. 3422-3431, May 2011.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique. New York, Mc Graw Hill Book.** 1940.

JUNIOR, M.; VIEIRA, A. O. **Flora Arbóreo-arbustiva da Família Rubiaceae Juss. na Bacia do Rio Tibagi, Paraná, Brasil,** 2013.

KHAN, M. R. U.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A. D. Antimicrobial activity of *Psychotria microlabastra*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 818–821, 2001.

KARAO, S.; TCHACONDO, T.; ILBOUDO, D. . P.; SIMPORE, J. Sub-Saharan Rubiaceae: A Review of Their Traditional Uses, Phytochemistry and Biological Activities. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 14, p. 149–169, 2011.

KUREK, A. *et al.* New antibacterial therapeutics and strategies. **Polish Journal of Microbiology**, Warsaw, v. 60, n. 1, p. 3-12, 2011.

LACIAR, A. M. *et al.* Antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia echegarayi* Hieron. (Asteraceae). *Revista Argentina de Microbiología*, Buenos Aires, v. 41, n. 4, p. 226-231, 2009.

LEWAN, L.; ANDERSON M.; MORALES-GOMEZ P.. The use of *Artemia salina* in toxicity test. *Alternat Lab Animals*, v. 20, p. 297-301, 1992

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

LIMA, É. R.; MOREIRA, L. S.; FACUNDO, V. A.; SILVA-JARDIM, I.; TELES, CA. B. G. AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO E TRITERPENÓLICO LUPANO OBTIDOS DE *COMBRETUM LEPROSUM* CONTRA A INTRODUÇÃO A partir do século XIX a humanidade se deparou diante do diverso e inesgotável arsenal terapêutico presente nas plantas medicinais devido a. **Saber Científico**, v. 3, n. 1, p. 53–69, 2011.

LIU, Y.; WANG, J.-S.; WANG, X.-B.; KONG, L.-Y. Two novel dimeric indole alkaloids from the leaves and twigs of *Psychotria henryi*. **Fitoterapia**, v. 86, p. 178–82, 2013.

MARGALHO, L. F.; ROCHA, A. E. S.; SECCO, R. DE S. Rubiaceae Juss. da restinga da APA de Algodual/Maiandeuá, Pará, Brasil. **Bot. Mus. Para. Emílio Goeldi. Cienc. Nat.**, v. 4, n. 3, p. 303–339, 2009.

MARIYAMMAL, R.; KAVIMANI, S. Anti-Inflammatory Activity of Methanol Extract of the Whole Plant of *Psychotria*. **International Journal of Pharma Research & Review**, v. 2, n. 11, p. 1–5, 2013.

MCLAUGHLIN JL, ROGERS LL, ANDERSON JE. **The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals**, *Drug Information Journal* v. 32 513-524, 1998

MARTINS, M.; COSTA, D. A.; TEIXEIRA, D. C.; GARCIA, J.; SILVA, D. A. ANATOMIA FOLIAR DE *Psychotria viridis* RUIZ & PAV . ( RUBIACEAE ). **revi. Univ. Rural**, v. 26, p. 30–41, 2006.

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.

METCALFE, C. R. & CHALK, L. **Anatomy of Dicotyledons. v. II.** Clarendon Press, Oxford. p. 1500. 1957

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Cadernos de Atenção Básica**. 2012.

MONTEIRO, F. J. C. Monitoramento da dispersão de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) e da dengue no município de Macapá, Amapá, Brasil. **Universidade Federal do Amapá**, 2014.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. DE L. Taninos: Uma Abordagem da Química à ecologia. **Química nova**, v. 28, n. 5, p. 892–896, 2005.

MORAIS, T. M. DA S.; RABELO, G. R.; ALEXANDRINO, C. R.; JOSÉ, S.; CUNHA, M. DA. Comparative leaf anatomy and micromorphology of *Psychotria* species ( Rubiaceae ) from the Atlantic Rainforest. **Acta Botanica Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 178–190, 2011.

MOREIRA, F. DE P. M., *et al.* Favonóides e Triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* - BIOATIVIDADE SOBRE *Artemia salina*. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 309–311, 2003.

NEPROKROFF, M.; BREMER, B.; SYTSMA, KENNETH J. Reorganization of the Genus *Psychotria* and Tribe Psychotrieae ( Rubiaceae ) Inferred from ITS and rbcL Sequence Data. **American society of plant taxonomists**, v. 24, n. 1, p. 5–27, 1999.

NOZELLA, E. F. Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes. **Universidade de São paulo**, 2001.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic Staining of plant cell Walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368–373, 1964.

O'CONNOR, S. E.; MARESH, J. J. Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. **Natural product reports**, v. 23, n. 4, p. 532–47, 2006.

ODABASOGLU, F.; ASLAN, A.; CAKIR, A.; SULEYMAN, H.; KARAGOZ, Y. Comparison of antioxidant activity and total phenolic content of three lichen species. **Phytotherapy Research**, n. 18, p. 938-941, 2004.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. 2 ed. São Paulo, p. 178, 1997.

PEREIRA, G. FANECO. A família rubiaceae JUSS. na vegetação ripária de um trecho do alto rio Paraná, Brasil, com ênfase na tribo Spermaceae. **Universidade Estadual de Maringá**, 2007.

PREVATT-SMITH, K. M.; PRISINZANO, T. E. New therapeutic potential for psychoactive natural products. **Natural product reports**, v. 27, p. 23–31, 2010.

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, n. 2, p. 337–341, 1999.

PUBMED. **Base de dados**. Disponível em:  
<<http://pubmed.com/web/pubmed/>> acessado em :25/01/2015

QUEIROZ, G. S. Análise de Esteróides em Extratos Vegetais e Estudo Fitoquímicos e Biológico Preliminar de Brunfelsia uniflora. **UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**, , n. Qmc 5512, 2009.

QUEIROZ, G. S.; SOBRINHO, H. H. DE O.; PEREIRA, M.; MARIA, I.; BRIGHENTE, C. POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO E FRAÇÃO ALCALOÍDICA DE DUAS ESPÉCIES DE PSYCHOTRIA ( RUIACEAE ). Dissertação **Universidade Federal de Santa Catarina**, p. 755, 2000.  
ROGINSKY, V., LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in **food**, **Food chemistry**, v. 92, n. 2, p. 235-254, 2005.

SALEEM, M. et al. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural Products Reports**, Cambridge, v. 27, n. 2, p. 238-254, Feb 2009.

SANTOS, A. O. *et al.* Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the Copaifera genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 3, p. 277-281, 2008.

SANZIO, R. *et al.* Estudo morfoanatômico comparativo entre a poaia (Psychotria ipecacuanha (Brot.) Stokes - Rubiaceae) obtida da região Amazônica (habitat original) e proveniente de processo biotecnológico submetida a diferentes tratamentos de interceptação da radiação solar. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 276–283, 2009.

SASS, J. E. Botanical microtechnique. **Botanical Microtechnique** n. 2º ed Ames, Iowa State College Press., p. 1951, 1951.

SAUCEDO, É. M. **Estudo da Interação Entre Aedes aegypti e Acanthamoeba Polyphaga**. Dissertação de mestrado (Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

SILVA, T. S. S. **Estudo de tratabilidade físico-química com uso de taninos vegetais em água de abastecimento e de esgoto**. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, p.10-17, 1999.

SIMÕES, M.C.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. Da UFSC, 2000.

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

SIQUEIRA, J. M. *et al.* Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriuscula* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 185-187, 2001.

SOLEREDER, H. **Systematic anatomy of the dicotyledons**. Vol. II. Clarendon Press, Oxford. p .1182, 1908

SONAGLIO, D. *et al.* Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre e Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999

SOUZA, A. MARIA; ARMSTRONG, L.; MERINO, F. J. Z.; In vitro effects of *Eugenia pyriformis* Cambess., Myrtaceae: Antimicrobial activity and synergistic interactions with Vancomycin and Fluconazole. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 35, p. 862–867, 2014.

SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica. 1998.

SOUZA, M. M.; MARTINS, E. R.; NAIR, T.; PEREIRA, S. Reproductive Studies in Ipecac ( *Psychotria ipecacuanha* ( Brot .) Stockes ; Rubiaceae ): Pollen Development and Morphology. , v. 51, n. 8, p. 981–989, 2008.

SOUZA, R. K. D.; MENDONÇA, A. C. A. M.; SILVA, M. A. P. Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological aspects Rubiaceae species in Brazil. **revista cubana de plantas medicinales**, v. 18, n. 1, p. 140–156, 2013.

STRASSMAN, R. J; dmt: the spirit molecule. 1 ed. Rochester, Vermont: Park Street Press, p. 358, 2001.

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

TAKAYAMA, H.; MORI, I.; KITAJIMA, M.; AIMI, N.; LAJIS, N. H. New type of trimeric and pentameric indole alkaloids from *Psychotria rostrata*. **Organic letters**, v. 6, n. 17, p. 2945–8, 2004.

TALEB-CONTINI, S. H.; SALVADOR, M. J.; WATANABE, E.; ITO, I. Y. Antimicrobial activity of flavonoids and steroids isolated from two *Chromolaena* species. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n. 4, p. 403–408, 2003.

TAYLOR, C. M.; CAMPOS, M. T. V. A.; ZAPPI, D. Flora da reserva ducke, Amazonas, Brasil: Rubiaceae. **Rodriguésia**, v. 58, p. 549–616, 2007.

TAYLOR. *et al.* 2015. **Rubiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14153>. Acesso em: 16 Jan. 2015

TIWARI, B. K. *et al.* Application of natural antimicrobials for food preservation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 57, n. 14, p. 5987-6000, Jul 2009.

TODZIA C.A; ALMEIDA F. A revision of *Tibouchina* sect. *Lepidotae* (Melastomataceae: *Tibouchinae*). **Proceedings of the California Academy of Sciences** v. 47 n.6 p. 175-206. 1991.

VALENTE, L. M. M.; ALVES, F. F.; BEZERRA, G. M.; *et al.* em camada delgada para determinação do perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria* Artigo. , v. 16, n. 2, p. 216–223, 2006.

VITARELLI, N. C. Anatomia de estípulas e coléteres de *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). **Acta Botanica Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 923–928, 2009.

WAGNER, H.; **Plant Drugs analysis**. 2 ed. Berlin: Springer, p. 298-299 e 319-319, 1996.

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

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue and dengue hemorrhagic fever.  
Fact sheet p. 117. 2009.