

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA MARIA MARINS OCAMPOS

**ESTUDOS FITOQUÍMICO, MORFOANATÔMICO E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS  
DE *Sapium glandulosum* (EUPHORBIACEAE) E ESTUDO FITOQUÍMICO DE  
*Schiekia orinocensis* (HAEMODORACEAE)**

CURITIBA

2017

FERNANDA MARIA MARINS OCAMPOS

**ESTUDOS FITOQUÍMICO, MORFOANATÔMICO E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS  
DE *Sapium glandulosum* (EUPHORBIACEAE) E ESTUDO FITOQUÍMICO DE  
*Schiekia orinocensis* (HAEMODORACEAE)**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel  
Coorientadores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Deise Prehs Montrucchio  
Dr. Bernd Schneider

CURITIBA

2017

Ocampos, Fernanda Maria Marins

Estudos fitoquímico, morfoanatômico e de atividades biológicas de *Sapium grandulosum* (Euphorbiaceae) e estudo fitoquímico de *Schiekia orinocensis* (Haemodoraceae) / Fernanda Maria Marins Ocampos – Curitiba, 2017.  
129 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Obdúlio Gomes Miguel

Coorientadora: Professora Dra. Deise Prehs Montrucchio

Coorientador: Dr. Bernd Schneider

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

Inclui bibliografia

1. Euphorbiaceae. 2. *Sapium*. 3. Compostos fenólicos. 4. *Lactuca sativa*.  
5. Cromatografia. I. Miguel, Obdúlio Gomes. II. Montrucchio, Deise Prehs. III. Schneider, Bernd. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.32



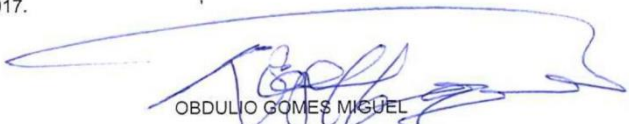
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Setor CIÊNCIAS DA SAÚDE  
Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS


## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **FERNANDA MARIA MARINS OCAMPOS** intitulada: **ESTUDOS FITOQUÍMICO, MORFOANATÔMICO E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Sapium glandulosum* (EUPHORBIACEAE) E ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Schiekia orinocensis* (HAEMODORACEAE)**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.


A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

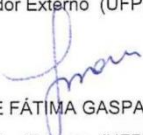
Curitiba, 29 de Junho de 2017.

  
OBDULIO GOMES MIGUEL  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
FERNANDO MOLIN  
Avaliador Externo (UTFPR)

  
PAULO ROBERTO DE OLIVEIRA  
Avaliador Externo (UTFPR)

  
VITOR ALBERTO KERBER  
Avaliador Externo (UFPR)

  
JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS  
Avaliador Externo (UFPR)

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná (UFPR) e ao programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade e ao Instituto Max Planck de Ecologia Química (MPI-CE) em Jena, na Alemanha, por permitir a estadia por um ano para a realização de parte deste trabalho.

Ao orientador Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel (UFPR) pelos ensinamentos e por ter, mais uma vez, acreditado em meu trabalho e me apoiado, à coorientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Deise Prehs Montrucchio (UFPR), não apenas pelos ensinamentos, mas pela dedicação a esta pesquisa e ao coorientador Dr. Bernd Schneider (MPI-CE) por permitir a minha presença em seu grupo de pesquisa e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Andersson Barison do centro de RMN da UFPR, pelos ensinamentos e conselhos durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Cristian Paetz (MPI-CE) pelos ensinamentos e pela supervisão do projeto realizado na Alemanha. À Dr<sup>a</sup> Riya C. Menezes (MPI-CE), pela realização dos espectros de massas de alta resolução.

Ao curador do museu botânico de Curitiba, Osmar dos Santos Ribas, pela identificação de *S. glandulosum* e ao botânico MSc. Guilherme de Medeiros Antar, da USP, pela coleta e identificação de *S. orinocensis*.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Josiane de Fátima G. Dias (UFPR) pelo esforço relacionado à obtenção das autorizações de acesso ao patrimonio genético e à Prof<sup>a</sup> Marilis D. Miguel (UFPR) pelo suporte à realização desta pesquisa.

Aos Professores Dr. Euclésio Simionatto (UEMS), Dr. Iguatemy L. Brunetti (UNESP), Dr. José Ederaldo Queiroz Telles (UFPR) e Dr<sup>a</sup> Maria de Fátima C. Matos (UFMS) pelo suporte na realização de estudos de atividades biológicas.

Aos amigos e colegas de laboratório MSc. Ana Flávia S. Duarte, Dr<sup>a</sup> Cristiane B. Da Silva, Dr<sup>a</sup> Daniella M. S. Oliveira, MSc. Luciane Dalarmi, MSc. Mariana S. Krause, Dr<sup>a</sup> Thais F. Moreira e Dr. Vinícius B. de Oliveira pelo suporte, apoio incondicional e colaboração na realização deste trabalho.

Às agências financiadoras CAPES, CNPq, Finep e Fundação Araucária.

E, finalmente, aos meus familiares e amigos, que direta ou indiretamente, contribuíram com a realização deste doutorado.

“Só sei que nada sei.”

**Socrates**

## RESUMO

*Sapium glandulosum* (L.) Morong pertence à família Euphorbiaceae e é uma árvore latescente, nativa do Brasil, porém não endêmica, também popularmente conhecida como leiteiro, pau de leite, burra leiteira, janaguba, seringarana, entre outros. *Schiekia orinocensis* (Kunth) Meisn é uma planta nativa do Brasil pertencente à família Haemodoraceae, família esta conhecida pela presença de fenilfenalenonas. Foram realizados estudos fitoquímicos das duas espécies, e a planta *S. glandulosum* foi pesquisada com relação à morfoanatomia e às atividades biológicas, antinociceptiva e toxicológica. No total, entre as duas espécies foram identificadas vinte e nove substâncias (fenilfenalenonas, derivado do ácido glicurônico, flavonoides e precursores de taninos hidrolisáveis), utilizando técnicas cromatográficas e métodos espectrométricos, das quais dez substâncias são inéditas na literatura. Com relação às atividades biológicas, extratos de *S. glandulosum*, especialmente o extrato acetato de etila, apresentaram atividade larvicida contra larvas do mosquito *Aedes aegypti*, baixa fitotoxicidade em *Lactuca sativa*, além de atividade antimicrobiana e citotóxica *in vitro*, com a vantagem de que não apresentou atividade tóxica *in vivo*, de acordo com os parâmetros avaliados. Os extratos de *S. glandulosum* são futuros candidatos para agentes antitumorais e larvicida.

Palavras-chave: *Sapium glandulosum*. *Schiekia orinocensis*. Compostos fenólicos. Larvicida. Antimicrobiano. Antitumoral.

## ABSTRACT

*Sapium glandulosum* (L.) Morong .belongs to the family Euphorbiaceae and is a latescent tree, which is native of Brazil, although not endemic. It is popularly known as leiteiro, pau de leite, burra leiteira, janaguba, seringarana, between others. *Schiekia orinocensis* (Kunth) Meisn is native of Brazil and belongs to Haemodoraceae. This family is known for the production of the phenalenones metabolites. The phytochemical profile of both species, while morphoanatomy, biological and antinociceptive activities, and toxicology were screened for *S. glandulosum*. In total, between both species, twenty nine compounds (phenylphenalenones, glucuronic acid derivative, flavonoids and hydrolysable tannins precursors) were identified by means of chromatographic and spectroscopic analysis, from which ten are still not reported in literature. In relation to the biological activities, the extracts of *S. glandulosum* presented larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae and low phytotoxicity in *Lactuca sativa*. Moreover, the extracts have *in vitro* antimicrobial and cytotoxic activity, with the advantage that it did not show to be toxic *in vivo* according to the evaluated parameters. *S. glandulosum* extracts are candidates to be future antitumor, antimicrobial and larvicide agents.

Key-words: *Sapium glandulosum*. *Schiekia orinocensis*. Phytochemistry. Larvicide. Antimicrobial. Antitumor.



## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA MUNDIAL DE EUPHORBIACEAE.....   | 19 |
| FIGURA 2 – <i>Sapium glandulosum</i> E A DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA NO BRASIL<br>.....  | 21 |
| FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS<br>ENCONTRADOS EM <i>Sapium glandulosum</i> .....  | 23 |
| FIGURA 4 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA MUNDIAL DE HAEMODORACEAE ..   | 24 |
| FIGURA 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS FENALENONAS.....  | 25 |
| FIGURA 6 – <i>Schiekia orinocensis</i> E A DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA NO BRASIL   | 26 |
| FIGURA 7 – FLUXOGRAMA DO TRABALHO REALIZADO COM A PLANTA <i>Sapium<br/>glandulosum</i> .....   | 31 |
| FIGURA 8 – ESQUEMA DO TRABALHO REALIZADO COM A PLANTA <i>Schiekia<br/>orinocensis</i> .....  | 32 |
| FIGURA 9 – A) CROMATOGRAMAS DAS DIFERENTES PARTES DE <i>Schiekia<br/>orinocensis</i> B) ESTRUTURA QUÍMICA DAS SUBSTÂNCIAS<br>ISOLADAS DE <i>Schiekia orinocensis</i> ..... | 48 |
| FIGURA 10 – ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H REGISTRADO PARA O COMPOSTO 10<br>(ACETONA- <i>d</i> <sub>6</sub> , 700 MHz, 20 °C).....                                      | 49 |
| FIGURA 11 – MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC REGISTRADO PARA O<br>COMPOSTO 10 (ACETONA- <i>d</i> <sub>6</sub> , 700 MHz, 20 °C).....  | 50 |
| FIGURA 12 – MAPA DE CORRELAÇÃO HMBC REGISTRADO PARA O<br>COMPOSTO 10 (ACETONA- <i>d</i> <sub>6</sub> , 700 MHz, 20 °C).....  | 50 |
| FIGURA 13 – ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H REGISTRADO PARA O COMPOSTO 9<br>(ACETONA- <i>d</i> <sub>6</sub> , 700 MHz, 20 °C).....                                       | 54 |
| FIGURA 14 – MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC REGISTRADO PARA O<br>COMPOSTO 9 (ACETONA- <i>d</i> <sub>6</sub> , 700 MHz, 20 °C).....   | 54 |
| FIGURA 15 – MAPA DE CORRELAÇÃO HMBC REGISTRADO PARA O<br>COMPOSTO 9 (ACETONA- <i>d</i> <sub>6</sub> , 700 MHz, 20 °C).....   | 55 |
| FIGURA 16 – ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H REGISTRADO PARA O COMPOSTO 11<br>(ACETONA- <i>d</i> <sub>6</sub> , 700 MHz, 20 °C).....                                      | 56 |
| FIGURA 17 – MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC REGISTRADO PARA O<br>COMPOSTO 11 (ACETONA- <i>d</i> <sub>6</sub> , 700 MHz, 20 °C).....  | 56 |

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 18 – MAPA DE CORRELAÇÃO HMBC REGISTRADO PARA O COMPOSTO 11 (ACETONA- $d_6$ , 700 MHz, 20 °C).....   | 57 |
| FIGURA 19 – ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ REGISTRADO PARA O COMPOSTO 14 (ACETONA- $d_6$ , 700 MHz, 20 °C).....                                       | 58 |
| FIGURA 20 – MAPA DE CORRELAÇÃO COSY REGISTRADO PARA O COMPOSTO 14 (ACETONA- $d_6$ , 700 MHz, 20 °C).....   | 58 |
| FIGURA 21 – MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC REGISTRADO PARA O COMPOSTO 14 (ACETONA- $d_6$ , 700 MHz, 20 °C).....   | 59 |
| FIGURA 22 – MAPA DE CORRELAÇÃO HMBC REGISTRADO PARA O COMPOSTO 14 (ACETONA- $d_6$ , 700 MHz, 20 °C).....   | 59 |
| FIGURA 23 – ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ REGISTRADO PARA O COMPOSTO 8 (MeOD- $d_4$ , 700 MHz, 20 °C).....   | 60 |
| FIGURA 24 – MAPA DE CORRELAÇÃO COSY REGISTRADO PARA O COMPOSTO 8 (MeOD- $d_4$ , 700 MHz, 20 °C).....   | 61 |
| FIGURA 25 – MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC REGISTRADO PARA O COMPOSTO 8 (MeOD- $d_4$ , 700 MHz, 20 °C).....   | 61 |
| FIGURA 26 – MAPA DE CORRELAÇÃO HMBC REGISTRADO PARA O COMPOSTO 8 (MeOD- $d_4$ , 700 MHz, 20 °C).....   | 62 |
| FIGURA 27 – ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ REGISTRADO PARA O COMPOSTO 2 (MeOD- $d_4$ , 700 MHz, 20 °C).....   | 63 |
| FIGURA 28 – MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC REGISTRADO PARA O COMPOSTO 2 (MeOD- $d_4$ , 700 MHz, 20 °C).....   | 63 |
| FIGURA 29 – MAPA DE CORRELAÇÃO HMBC REGISTRADO PARA O COMPOSTO 2 (MeOD- $d_4$ , 700 MHz, 20 °C).....   | 64 |
| FIGURA 30 – ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ REGISTRADO PARA O COMPOSTO 1 (MeOD- $d_4$ , 700 MHz, 20 °C).....   | 66 |
| FIGURA 31 – MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC REGISTRADO PARA O COMPOSTO 1 (MeOD- $d_4$ , 700 MHz, 20 °C).....   | 66 |
| FIGURA 32 – MAPA DE CORRELAÇÃO HMBC REGISTRADO PARA O COMPOSTO 1 (MeOD- $d_4$ , 700 MHz, 20 °C).....   | 67 |
| FIGURA 33 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS EM <i>Sapium glandulosum</i> .....   | 69 |
| FIGURA 34 – ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ REGISTRADO PARA OS COMPOSTOS a, b e c ( $\text{D}_2\text{O}+\text{GOTAS DMSO-}d_6$ , 600 MHz, 20 °C) ..... | 70 |

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 35 – MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC REGISTRADO PARA OS<br>COMPOSTOS a, b e c (D <sub>2</sub> O+GOTAS DMSO- <i>d</i> <sub>4</sub> , 600 MHz, 20 °C) ...                | 71 |
| FIGURA 36 – MAPA DE CORRELAÇÃO HMBC REGISTRADO PARA OS<br>COMPOSTOS a, b e c (D <sub>2</sub> O+GOTAS DMSO- <i>d</i> <sub>4</sub> , 600 MHz, 20 °C) ...                | 72 |
| FIGURA 37 – PRANCHA ILUSTRATIVA DE <i>Sapium glandulosum</i> .....  | 74 |
| FIGURA 38 – MORFOANATOMIA MACROSCÓPICA E MICROSCOPICA DE<br><i>Sapium glandulosum</i> .....   | 76 |
| FIGURA 39 – MORFOANATOMIA DA EPIDERME DE <i>Sapium glandulosum</i> .....  | 77 |
| FIGURA 40 – MORFOANATOMIA DAS FOLHAS DE <i>Sapium glandulosum</i> .....   | 79 |
| FIGURA 41 – MORFOANATOMIA DO PECÍOLO DE <i>Sapium glandulosum</i> .....   | 80 |
| FIGURA 42 – TESTES MICROQUÍMICOS I DE <i>Sapium glandulosum</i> .....   | 82 |
| FIGURA 43 – TESTES MICROQUÍMICOS II DE <i>Sapium glandulosum</i> .....  | 83 |
| FIGURA 44 – TESTES MICROQUÍMICOS III DE <i>Sapium glandulosum</i> .....   | 83 |
| FIGURA 45 – TESTES MICROQUÍMICOS DE <i>Sapium glandulosum</i> .....   | 85 |
| FIGURA 46 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELOS EXTRATOS<br>DAS FOLHAS DE <i>S. glandulosum</i> NO INTESTINO DAS LARVAS DE<br>MOSQUITOS <i>Aedes aegypti</i> ..... | 91 |
| FIGURA 47 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELOS EXTRATOS<br>DAS CASCAS DE <i>S. glandulosum</i> NO INTESTINO DAS LARVAS DE<br>MOSQUITOS <i>Aedes aegypti</i> ..... | 92 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|   |     |
|---|-----|
| GRÁFICO 1 – TESTE DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i><br>EXPOSTAS AOS EXTRATOS DE <i>S. glandulosum</i> .....  | 87  |
| GRÁFICO 2 – TESTE DE CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE <i>Lactuca sativa</i><br>EXPOSTAS AOS EXTRATOS DE <i>S. glandulosum</i> .....  | 88  |
| GRÁFICO 3 – TESTE DE CITOTOXICIDADE DOS ISOLADOS DE <i>S. glandulosum</i><br>SOBRE AS CÉLULAS SIHA .....  | 100 |
| GRÁFICO 4 – TESTE DE NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA DO<br>EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE <i>S. glandulosum</i> .....  | 101 |
| GRÁFICO 5 – TESTE DE NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO DO<br>EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE <i>S. glandulosum</i> .....  | 102 |
| GRÁFICO 6 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA APÓS A<br>ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE <i>S.</i><br><i>glandulosum</i> .....  | 103 |
| GRÁFICO 7 – AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DE PESO DOS ANIMAIS APÓS A<br>ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE <i>S.</i><br><i>glandulosum</i> .....  | 104 |
| GRÁFICO 8 – AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DE PESO DOS ÓRGÃOS DOS<br>ANIMAIS EM RELAÇÃO AO PESO TOTAL DO ANIMAL APÓS A<br>ADMINISTRAÇÃO DIÁRIA DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE<br><i>S. glandulosum</i> ..... | 105 |
| GRÁFICO 9 – AVALIAÇÃO DOS DADOS BIOQUÍMICOS DOS ANIMAIS APÓS A<br>ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE <i>S.</i><br><i>glandulosum</i> .....  | 106 |
| GRÁFICO 10 – AVALIAÇÃO DOS DADOS HEMATOLÓGICOS DOS ANIMAIS<br>APÓS A ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE<br><i>S. glandulosum</i> .....  | 108 |

## LISTA DE QUADROS

|   |    |
|---|----|
| QUADRO 1 – CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE <i>S. glandulosum</i> SEGUNDO<br>CRONQUIST.....                  | 20 |
| QUADRO 2 – CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE <i>S. orinocensis</i> SEGUNDO<br>CRONQUIST.....                  | 25 |
| QUADRO 3 – TESTES MICROQUÍMICOS.....  | 37 |
| QUADRO 4 – DISTRIBUIÇÃO DAS FENILFENALENONAS PELOS DIFERENTES<br>TECIDOS DE <i>S. orinocensis</i> ..... | 68 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| TABELA 1 – DADOS DE RMN de $^1\text{H}$ (700 MHz) e $^{13}\text{C}$ (175 MHz) DOS<br>COMPOSTOS 2 E 8 EM MeOD- $d_4$ E DO COMPOSTO 10 EM<br>ACETONA- $d_6$ . .....   | 51 |
| TABELA 2 – DADOS DE RMN de $^1\text{H}$ (700 MHz) e $^{13}\text{C}$ (175 MHz) DOS<br>COMPOSTOS 9, 11 e 14 EM ACETONA- $d_6$ . .....   | 52 |
| TABELA 3 – DADOS DE RMN de $^1\text{H}$ (700 MHz) e $^{13}\text{C}$ (175 MHz) DO COMPOSTO 1<br>MeOD- $d_4$ . .....  | 65 |
| TABELA 4 – DADOS DE RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz) e $^{13}\text{C}$ (150 MHz) DOS<br>COMPOSTOS a, b e c. ....   | 72 |
| TABELA 5 – PORCENTAGEM MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA INIBIÇÃO DO<br>CRESCIMENTO DE RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE <i>L. sativa</i><br>TRATADA COM EXTRATOS DE <i>S. glandulosum</i> CALCULADOS EM<br>RELAÇÃO AO CONTROLE. .... | 72 |
| TABELA 6 – EFEITO LARVICIDA DOS EXTRATOS DE <i>S. glandulosum</i> . ....  | 90 |
| TABELA 7 – VALORES DE CIM E CLM OBTIDOS PARA OS EXTRATOS DE <i>S.</i><br><i>glandulosum</i> , NA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA. ....  | 95 |
| TABELA 8 – VALORES DE CIM E CLM OBTIDOS PARA OS EXTRATOS DE <i>S.</i><br><i>glandulosum</i> , NA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA. ....   | 96 |
| TABELA 9 – VALORES DE $\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ), OBTIDOS NOS TESTES DE<br>CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS DE <i>S. glandulosum</i> . ....   | 98 |
| TABELA 10 – VALORES DE $\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ), OBTIDOS NOS TESTES DE<br>CITOTOXICIDADE DOS ISOLADOS FOCAM 1, FOCAM 2 E FOCAM<br>5. ....  | 99 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|        |   |
|--------|---|
| ALT    | - Alanina aminotransferase                      |
| ANOVA  | - Análise de variância de uma via               |
| AST    | - Aspartato aminotransferase                    |
| CIM    | - Concentração inibitória mínima                |
| CLAE   | - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência      |
| CLM    | - Concentração letal mínima                     |
| DAD    | - Detector Diode Array                          |
| DMSO   | - Dimetilsulfóxido                              |
| EFS    | - Extração em Fase Sólida                       |
| EM     | - Espectrometria de Massas                      |
| FAA    | - Ácido Acético e Formol                        |
| FOCAM  | - Nome de amostra (Fernanda Ocampos)            |
| HHDP   | - Ácido hexahidroxi-difênico                    |
| HMBC   | - Heteronuclear Multiple Bond Coherence         |
| HSQC   | - Heteronuclear Single Quantum Coherence        |
| IES    | - Ionização por Electrospray                    |
| I.P.   | - Intraperitoneal                               |
| IVG    | - Índice de velocidade de germinação            |
| MÊS    | - Ácido 2-( <i>N</i> -morfolino) etanosulfônico |
| MEV    | - Microscópio Eletrônico de Varredura           |
| MO     | - Microscópio Óptico                            |
| PA     | - Padrão Analítico                              |
| RMN    | - Ressonância Magnética Nuclear                 |
| TFA    | - Ácido Trifluoracético                         |
| TTC    | - Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio           |
| UFC    | - Unidades formadoras de colônias               |
| UHPLC  | - Ultra-High Performance Liquid Chromatography  |
| UV-Vis | - Ultravioleta-Visível                          |

## SUMÁRIO

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>17</b> |
| 1.1      | OBJETIVOS .....   | 18        |
| 1.1.1    | Objetivo Geral.....   | 18        |
| 1.1.2    | Objetivos Específicos .....   | 18        |
| 1.2      | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....   | 19        |
| 1.2.1    | <i>Sapium glandulosum</i> .....   | 19        |
| 1.2.2    | <i>Schiekia orinocensis</i> .....   | 23        |
| 1.2.3    | Atividades biológicas .....   | 26        |
| 1.2.4    | CLAE-RMN.....   | 29        |
| <b>2</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>  | <b>31</b> |
| 2.1      | MATERIAL BOTÂNICO .....   | 32        |
| 2.2      | OBTENÇÃO DOS EXTRATOS .....   | 33        |
| 2.3      | ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS.....  | 34        |
| 2.4      | IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS .....   | 34        |
| 2.5      | ESTUDO MORFOANATÔMICO.....  | 36        |
| 2.6      | AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ALELOPÁTICA.....   | 38        |
| 2.6.1    | Teste de germinação .....   | 38        |
| 2.6.2    | Teste de crescimento .....  | 39        |
| 2.7      | AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE LARVICIDA.....   | 39        |
| 2.7.1    | Avaliação de alterações na morfologia das larvas.....   | 40        |
| 2.8      | AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....  | 40        |
| 2.9      | AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE CITOTÓXICA.....  | 41        |
| 2.9.1    | Avaliação de citotoxicidade dos extratos pelo método da SRB .....   | 41        |
| 2.9.2    | Avaliação de citotoxicidade de substâncias pelo ensaio de MTT .....   | 43        |
| 2.10     | AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA .....  | 44        |
| 2.10.1   | Nocicepção induzida por formalina.....  | 44        |
| 2.10.2   | Nocicepção induzida por ácido acético.....  | 44        |
| 2.10.3   | Avaliação da atividade locomotora .....   | 45        |
| 2.11     | AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS EFEITOS TÓXICOS .....  | 45        |
| 2.11.1   | Ganho/perda de peso, peso relativo de órgãos, níveis de enzimas hepáticas e atividade locomotora após administração crônica ..... | 45        |
| 2.11.2   | Análise histopatológica .....   | 46        |



|          |   |            |
|----------|---|------------|
| <b>3</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>   | <b>47</b>  |
| 3.1      | SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS EM <i>Schiekia orinocensis</i>  | 47         |
| 3.1.1    | Avaliação tecido-específica de ocorrência dos metabólitos   | 67         |
| 3.2      | SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE <i>Sapium glandulosum</i>   | 69         |
| 3.3      | ESTUDO MORFOANATÔMICO   | 74         |
| 3.4      | AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ALELOPÁTICA  | 86         |
| 3.5      | AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE LARVICIDA  | 90         |
| 3.5.1    | Avaliação de alterações na morfologia das larvas  | 90         |
| 3.6      | AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA   | 94         |
| 3.7      | AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE CITOTÓXICA   | 97         |
| 3.7.1    | Avaliação de citotoxicidade dos extratos  | 97         |
| 3.7.2    | Avaliação de citotoxicidade de substâncias isoladas   | 98         |
| 3.8      | AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA  | 100        |
| 3.8.1    | Nocicepção induzida por formalina   | 100        |
| 3.8.2    | Nocicepção induzida por ácido acético   | 101        |
| 3.8.3    | Avaliação da atividade locomotora   | 103        |
| 3.9      | AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS EFEITOS TÓXICOS  | 104        |
| 3.9.1    | Ganho/perda de peso, peso relativo de órgãos, níveis de enzimas hepáticas e atividade locomotora após administração crônica | 104        |
| 3.9.2    | Análise histopatológica   | 109        |
| <b>4</b> | <b>CONCLUSÃO</b>  | <b>110</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b>  | <b>111</b> |
|          | <b>ANEXO 1 - AUTORIZAÇÃO DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO</b>   | <b>126</b> |
|          | <b>ANEXO 2 - AUTORIZAÇÃO DE COLETA</b>  | <b>127</b> |
|          | <b>ANEXO 3 - CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b>   | <b>128</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

As substâncias químicas são a chave para entender as complexas interações entre os organismos. Os compostos orgânicos são agentes químicos responsáveis por importantes tarefas nos organismos vivos. Neste contexto, vale ressaltar os metabólitos secundários, que são vitais para importantes processos biológicos, como a defesa da planta contra agentes agressores. (WILLIAMS et al., 1989; SCHNEIDER, 2013). Os metabólitos secundários são pequenas moléculas que, em condições laboratoriais, não necessariamente têm importância vital para a sobrevivência do seu hospedeiro, mas sem dúvida, são vantajosos para a sobrevivência da planta em seu *habitat* natural. (KATZ; BALTZ, 2016).

A investigação fitoquímica de metabólitos secundários é a primeira etapa para a compreensão da complexidade na comunicação entre os organismos vivos (ecologia química) e também para entender o papel de cada substância nessas interações. (OCAMPOS et al., 2017). A pesquisa de metabólitos secundários, os produtos naturais, é fundamental não apenas para entender a dinâmica envolvida nas interações entre organismos, mas também se faz útil na agricultura e na indústria alimentícia e farmacêutica. (STONE; WILLIAMS, 1992; NEWMAN; CRAGG, 2012; KATZ; BALTZ, 2016). Um exemplo clássico de produto natural utilizado na indústria farmacêutica é a penicilina, metabólito secundário com atividade antibiótica, isolada a partir de algumas bactérias. (BERDY, 2012; KATZ; BALTZ, 2016). A pesquisa de novos medicamentos muitas vezes parte da pesquisa básica de produtos naturais e do estudo de suas atividades biológicas.

O presente estudo foi realizado com duas plantas: *Sapium glandulosum* (L.) Morong. e *Schiekia orinocensis* (Kunth) Meisn., sendo que a presença de poucos estudos na literatura sobre tais plantas motivou a sua escolha para a realização do trabalho. Dessa forma, partindo-se de plantas com poucos estudos, pode-se futuramente chegar ao uso industrial dos seus extratos ou de suas substâncias isoladas, como por exemplo, o desenvolvimento de um novo medicamento. Trabalhos como este são de grande relevância para a ciência, já que trazem informações sobre o potencial dos recursos naturais.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Realizar um estudo morfoanatômico, identificar metabólitos secundários e avaliar as atividades alelopática, larvicida, antimicrobiana, citotóxica, antinociceptiva e tóxica dos extratos de *Sapium glandulosum*. Identificar o perfil metabólico da espécie *Schiekia orinocensis* utilizando a técnica de CLAE-EFS-RMN;

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Isolar e identificar, por técnicas cromatográficas e espectroscópicas, metabólitos secundários de *Sapium glandulosum* e de *Schiekia orinocensis*.
- b) Realizar o estudo morfoanatômico de *Sapium glandulosum*.
- c) Analisar a atividade alelopática dos extratos de folhas e cascas de *Sapium glandulosum* sobre as sementes de *Lactuca sativa*.
- d) Avaliar a atividade dos extratos de folhas e cascas de *Sapium glandulosum* contra larvas do mosquito *Aedes aegypti*.
- e) Avaliar atividade antimicrobiana dos extratos de folhas e cascas de *Sapium glandulosum*.
- f) Realizar o estudo citotóxico dos extratos de folhas e cascas de *Sapium glandulosum*.
- g) Avaliar a atividade antinociceptiva dos extratos brutos de folhas de *Sapium glandulosum* em camundongos;
- h) Avaliar o efeito dos extratos brutos de folhas de *Sapium glandulosum* sobre a atividade locomotora de camundongos;
- i) Avaliar possíveis efeitos tóxicos dos extratos brutos de folhas de *Sapium glandulosum* por meio de parâmetros bioquímicos, hematológicos, anatômicos e histopatológicos.

## 1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.2.1 *Sapium glandulosum*

A família Euphorbiaceae é composta por cerca de 313 gêneros e 8100 espécies distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais da América e da África e diversas espécies desta família apresentam alguma atividade farmacológica. (CONEGERO et al., 2003; DE OLIVERIA et al., 2007). A FIGURA 1 mostra a distribuição mundial de espécies pertencentes à família Euphorbiaceae, sendo que quanto mais intensa é a coloração de um país no mapa, maior quantidade de exemplares da família há na região. No Brasil, são 72 gêneros e aproximadamente 1100 espécies. (CONEGERO et al., 2003). Muitas espécies da família são tóxicas para os seres humanos e para outros animais. (DE OLIVERIA et al., 2007).

Diversos estudos fitoquímicos foram realizados em plantas da família Euphorbiaceae. Taninos hidrolisáveis foram encontrados em *Euphorbia thymifolia*, uma planta utilizada popularmente no sudeste da Ásia para tratar transtornos abdominais e problemas de pele. Estes compostos possuem na sua estrutura o ácido gálico e o ácido hexahidroxi-difênico (HHDP), moléculas estas que compõem os galotaninos e elagitaninos. (LEE et al., 1990).

FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA MUNDIAL DE EUPHORBIACEAE



A intensidade da coloração é maior nos países em que há maior número de exemplares da família.

FONTE: MISSOURI BOTANICAL GARDEN (2017)

O gênero *Sapium* consiste em 23 espécies aceitas e, apesar de muitas plantas desse gênero serem utilizadas popularmente para tratamentos de doenças ainda há poucos estudos fitoquímicos e de atividades biológicas que confirmem tal uso. (LAI et al., 2004; SHIMIZU et al., 2007; MWINE; VAN DAMME, 2011). Os diversos usos das espécies deste gênero na etnomedicina, desde para problemas de pele como dermatites até para o tratamento de dores nos joelhos, indicam a importância de estudá-las. (AL MUQARRABUN et al., 2014). Estudos fitoquímicos neste gênero indicam a presença de flavonoides, terpenoides, e outros compostos como ácidos fenólicos. (AL MUQARRABUN et al., 2014).

*Sapium glandulosum* (L.) Morong. (QUADRO 1) é uma árvore latescente da família Euphorbiaceae, também popularmente conhecida como leiteiro, pau de leite, burra leiteira, janaguba, seringarana, mata-olho, pela-cavalo, pau-branquilha, leiteiro de folha graúda, toropi, figueirinha, tapuru, entre outros. (CORDEIRO et al., 2015). O mapa disposto na FIGURA 2 mostra que a espécie é encontrada em todo o território brasileiro, já que todos os estados do país apresentam-se coloridos. As cores dispostas no mapa auxiliam a diferenciação das cinco regiões do país: Sul (azul), Sudeste (vermelho), Centro-oeste (amarelo), Nordeste (alaranjado) e Norte (verde).

QUADRO 1 – CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE *S. glandulosum* SEGUNDO CRONQUIST

|              |                           |
|--------------|---------------------------|
| <b>Reino</b> | <b>Plantae</b>            |
| Divisão      | Magnoliophyta             |
| Classe       | Magnoliopsida             |
| Subclasse    | Rosidae                   |
| Ordem        | Euphorbiales              |
| Família      | Euphorbiaceae             |
| Gênero       | <i>Sapium</i>             |
| Espécie      | <i>Sapium glandulosum</i> |

FONTE: SMITH ET AL. (1988)

FIGURA 2 – *Sapium glandulosum* E A DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA NO BRASIL

As cores do mapa diferenciam as cinco regiões do país: Sul (azul), Sudeste (vermelho), Centro-oeste (amarelo), Nordeste (alaranjado) e Norte (verde).

FONTE: adaptado de CORDEIRO ET AL. (2015)

Não há muitos registros sobre uso popular de *Sapium glandulosum*. Hajdu e Hohmann (2012) reportaram o uso de *S. glandulosum* para o tratamento de hérnias. Há registros no museu Botânico de Curitiba do uso da seiva de *Sapium glandulosum* para tratamento de verrugas. Segundo Breitbach et al. (2013), além da utilização para o tratamento de verrugas, *S. glandulosum* é popularmente utilizada contra elefantíase e sífilis.

No campo de atividades biológicas Silva et al. (2011) pesquisou a atividade antioxidante, que foi considerada moderada. Além disso, o mesmo trabalho avaliou o conteúdo de fenóis totais, taninos e flavonoides das cascas e folhas da planta. Extratos etanólicos de folhas e cascas de *Sapium glandulosum* foram testados microbiologicamente pelo método de difusão em ágar e demonstraram atividade contra cepas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase* negativa e as folhas mostraram-se ativas contra *Enterococcus faecalis*. Entretanto, quando os pesquisadores realizaram o teste pela metodologia de concentração inibitória mínima, os resultados foram negativos para todas as cepas testadas. O mesmo estudo analisou os constituintes fitoquímicos por métodos de cromatografia em camada delgada. As classes de metabólitos encontrados nas folhas e cascas foram flavonoides, lignanas, monoterpenos, taninos condensados, mas não hidrolisáveis, e derivados antracênicos. Nas folhas foi também detectada a presença de triterpenos,

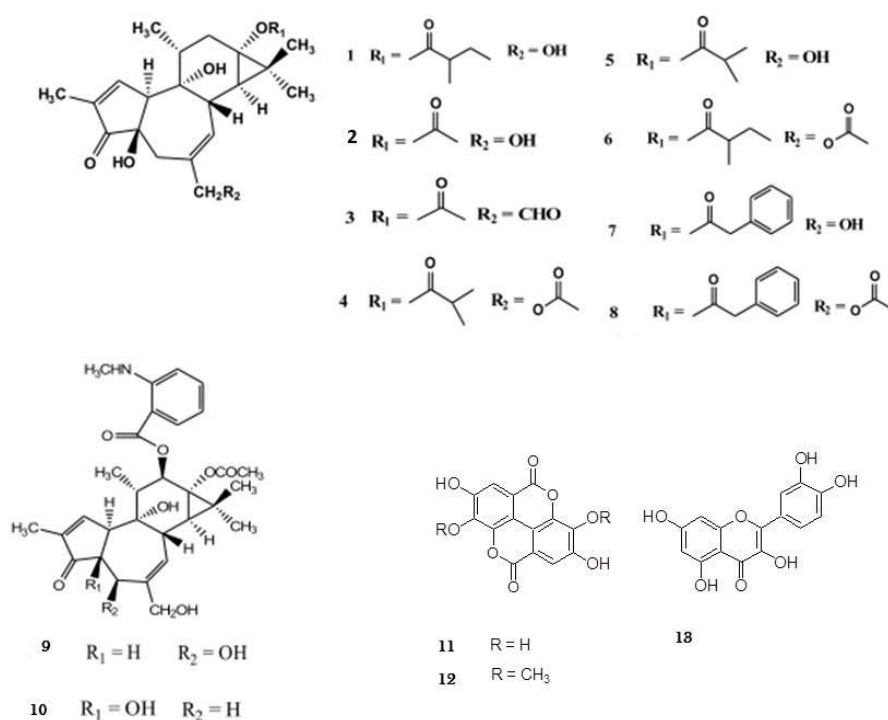
esteroides e antocianinas, enquanto que nas cascas foi observada a presença de cumarinas. (SILVA et al., 2012).

Ocampos (2013) realizou análise fitoquímica, por meio do ensaio sistemático fitoquímico, com o objetivo de se fazer uma triagem dos componentes fitoquímicos presentes na planta. Os dados obtidos corroboraram com as substâncias químicas posteriormente isoladas e identificadas (FIGURA 3) uma vez que foram encontrados um flavonóide e duas moléculas precursoras dos taninos hidrolisáveis classificados como elagitaninos. O flavonóide isolado tem uma estrutura bastante conhecida e estudada, trata-se da quercetina (13). As moléculas precursoras dos taninos hidrolisáveis foram identificadas como o ácido elágico (11) e, seu derivado, o 3,3'-di-O-metil ácido elágico (12). A atividade antioxidante dos extratos foi analisada para três diferentes métodos. No método da inibição da peroxidação lipídica foram obtidos bons resultados para as amostras da folha e para a fração hexano da casca, que se mostraram superiores ao padrão BHT. A análise da inibição do radical DPPH não mostrou atividade antioxidante significativa para as frações em relação aos padrões rutina e vitamina C. A análise da formação do complexo fosfomolibdênico apresentou resultado significativo para a fração acetato de etila casca, que apresentou resultados estatisticamente iguais ao do padrão rutina. A atividade tóxica das frações e extratos sobre o micro crustáceo *Artemia salina* foi testada para os extratos brutos de folhas e cascas e suas respectivas frações. Os extratos não apresentaram atividade tóxica contra os náuplios. A atividade hemolítica das frações e extratos foi testada por dois métodos e os resultados obtidos foram negativos, ou seja, os extratos não produziram hemólise. Este é mais um indício da baixa toxicidade da planta.

Sobottka et al. (2015), em estudo com o látex de *S. glandulosum*, identificou oito 12-deoxi diterpenos do tipo tigiano (1-8), compostos estes conhecidos pela sua atividade antitumoral, além de dois ésteres de forbol nitrogenados (9 e 10). São eles (FIGURA 3): 12-deoxiforbol-13-(2-metilbutirato) (1), 12-deoxiforbol-13-acetato (prostratin) (2), 12-deoxiforbaldeído-13-acetato (3), 12-deoxiforbol-13-isobutirato-20-acetato (4), 12-deoxiforbol-13-isobutirato (5), 12-deoxi-forbol-13-(2-metilbutirato)-20-acetato (6), 12-deoxiforbol-13-fenilacetato (DPP) (7), 12-deoxiforbol-13-fenil-acetato-20-acetato (8), 12-O-[2-metilaminobenzoil]-4-deoxi-5-hidroxforbol-13-acetato (sapintoxin B) (9) e 12-O-[2-metilaminobenzoil]-forbol-13-acetato (sapintoxin D) (10). Estes compostos são descritos como potentes agentes antitumorais e antivirais. O

látex de *S. glandulosum* também mostrou ter atividade proteolítica. (SOBOTTKA et al., 2014).

FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ENCONTRADOS EM *Sapium glandulosum*



Substâncias 1-10: diterpenos. Substâncias 11 e 12: precursores de taninos hidrolisáveis.

Substância 13: flavonóide.

FONTE: adaptado de SOBOTTKA et al. (2015)

Mendes et al. (2016) testou o extrato hidroalcoólico das folhas de *S. glandulosum* em modelo de inflamação aguda na pele de camundongos e mostrou que o extrato possui potente atividade anti-inflamatória.

### 1.2.2 *Schiekia orinocensis*

A família Haemodoraceae é composta por 101 espécies, distribuídas pelos gêneros *Anigozanthos*, *Barberetta*, *Blancoa*, *Conostylis*, *Dilatris*, *Haemodorum*, *Lachnanthes*, *Macropidia*, *Phlebocarya*, *Pyrrohiza*, *Schiekia*, *Tribonanthes*, *Wachendorfia* e *Xiphidium*. (THE PLANT LIST, 2013). Plantas desta família são



encontradas exclusivamente na Austrália, Tailândia, África do Sul e em grande parte das Américas (FIGURA 4). (MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2017).

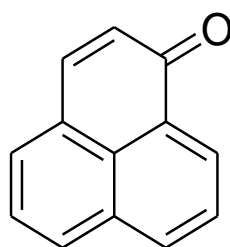
FIGURA 4 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA MUNDIAL DE HAEMODORACEAE



FONTE: MISSOURI BOTANICAL GARDEN (2017)

A família Haemodoraceae é conhecida pela produção dos metabólitos secundários fenilfenalenonas, cuja estrutura básica é a da fenalenona (FIGURA 5). (COOKE; EDWARDS, 1981). A primeira fenilfenalenona foi isolada de *Haemodorum corymbosum*. (COOKE; SEGAL, 1955). Posteriormente outras fenilfenalenonas foram encontradas em outras famílias como *Musaceae*, *Pontederiaceae* and *Strelitziaceae*. (DELLA GRECA et al., 1992; LUIS et al., 1994; HÖLSCHER; SCHNEIDER, 2000; 2005; DELLAGRECA et al., 2008). Sabe-se que em *Musa*, o gênero da banana, as fenilfenalenonas são fitoalexinas envolvidas no processo patogênico pelo fungo *Mycosphaerella fijensis* (HIDALGO et al., 2016) e contra o nematóide *Radopholus similis*. (HOLSCHER et al., 2014). Enquanto as fenilfenalenonas são induzíveis em *Musa*, em *Haemodoraceae* as fenilfenalenonas induzíveis coexistem com as constitutivas. (OTÁLVARO et al., 2010).

FIGURA 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS FENALENONAS



FONTE: O Autor (2017).

O gênero *Schiekia* é composto por apenas uma espécie, *Schiekia orinocensis* (Kunth) Meisn, a qual é justamente foco deste trabalho.

*Schiekia orinocensis* (Kunth) Meisn. (QUADRO 2) é uma espécie da América do Sul tropical, composta de duas subespécies de dois diferentes habitats: *S. orinocensis subsp. Silvestres*, proveniente dos desertos de areia branca da Colômbia, Venezuela e Guianas e *S. orinocensis subsp. Orinocensis*, que habita a parte norte da Amazônia, nos mesmos países supracitados, incluindo o Brasil. (SCHULTES, 1978; 1980; 1993; RODRÍGUEZ; COLONNELLO, 2009; MAAS; MAAS, 2015). A FIGURA 6 mostra a distribuição da planta pelos estados brasileiros, sendo que as cores dispostas no mapa auxiliam na diferenciação das regiões do país. Neste caso, a planta existe nas regiões Centro-oeste (amarelo), Nordeste (alaranjado) e Norte (verde). Os estados em que *S. orinocensis* não está presente estão em branco no mapa.

QUADRO 2 – CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE *S. orinocensis* SEGUNDO CRONQUIST

| Reino     | Plantae                     |
|-----------|-----------------------------|
| Divisão   | Magnoliophyta               |
| Classe    | Liliopsida                  |
| Subclasse | Liliidae                    |
| Ordem     | Liliales                    |
| Família   | Haemodoraceae               |
| Gênero    | <i>Schiekia</i>             |
| Espécie   | <i>Schiekia orinocensis</i> |

FONTE: SIMPSON (1998)

FIGURA 6 – *Schiekia orinocensis* E A DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA NO BRASIL

Os estados coloridos são onde *S. orinocensis* pode ser encontrada. Nos estados em branco *S. orinocensis* não está presente. As cores do mapa diferenciam as regiões do país: Centro-oeste (amarelo), Nordeste (alaranjado) e Norte (verde).

FONTE: adaptado de MAAS E MAAS (2015).

Há relatos na literatura sobre o uso popular de *Schiekia orinocensis*. Entre os Índios Kofán, o caule desta espécie era utilizado como sabão. (SCHULTES, 1980). Há registros de uso medicinal para cura de tremores, em comunidades indígenas. (SCHULTES, 1978).

### 1.2.3 Atividades biológicas

As plantas são a base da medicina tradicional e são reconhecidamente uma fonte de medicamentos. (JONES; KINGHORN, 2012). Os metabólitos secundários das plantas são mensageiros químicos e atuam na defesa contra agentes agressores. (SCHULZ et al., 2015). Sendo assim, tendo em vista a atividade biológica no organismo que produz certo metabólito secundário, surge o interesse em pesquisar possíveis atividades biológicas que possam ser benéficas para o ser humano. Vale ressaltar que, quando se fala em benefícios para o ser humano, devem ser considerados outros benefícios que não apenas o desenvolvimento de novos medicamentos, já que dos produtos naturais, podem ser desenvolvidos produtos que beneficiam outras áreas, como a agricultura. (KATZ; BALTZ, 2016).

Historicamente, a mais importante aplicabilidade dos produtos naturais tem sido na área de anti-infecciosos, especialmente antibacterianos. A lista de exemplos

de ativos extraídos de plantas é extensa, passa pelo tradicional exemplo da penicilina e vai até o uso da capsaicina, derivada de pimentas. (KATZ; BALTZ, 2016).

Segundo Katz e Baltz (2016) são muitas as abordagens na pesquisa de produtos naturais:

- Triagem fenotípica (1940-1970): este tipo de teste é realizado testando-se extratos e substâncias isoladas contra cepas específicas de microrganismos e contra cultivos estáveis de linhagens de células tumorais. Neste caso, geralmente não se tem conhecimento prévio sobre o mecanismo de ação.
- Triagem baseada no alvo (1970-2000): Este tipo de metodologia é realizado para evitar a descoberta de compostos já conhecidos. A miniaturização dos cultivos celulares, os avanços na espectroscopia de RMN e EM, as tecnologias de DNA recombinante, entre outros avanços, permitiram este tipo de abordagem. Aqui, a abordagem é baseada no conhecimento existente sobre mecanismos de ação e atividades biológicas. Tem-se conhecimento sobre um alvo específico, geralmente uma enzima, e buscam-se moléculas que resultarão no efeito farmacológico desejado.
- Abordagens baseadas em genômica (a partir de 2000): Com a tecnologia do sequenciamento genético, o entendimento sobre os organismos e o metabolismo foi facilitado. Foram criados bancos de dados e metodologias de bioinformática e, a partir disso, é possível prever pelo menos estruturas parciais de novos metabólitos secundários, a partir de metabólitos conhecidos, e encontrar realmente metabólitos secundários inéditos pelo escaneamento de sequências de DNA.

Dentro da abordagem da triagem fenotípica, muitos testes de atividades biológicas podem ser realizados, a fim de encontrar novos medicamentos e substâncias ativas de interesse econômico. A seguir serão brevemente dispostos alguns testes biológicos possíveis e suas aplicabilidades dentro da pesquisa de produtos naturais.

O fenômeno da alelopatia, que ocorre quando uma planta interfere quimicamente na germinação, crescimento e desenvolvimento de outra espécie, é conhecido pela humanidade há mais de 2000 anos. (RICE, 1984). O termo alelopatia, dos termos gregos *allelon* 'de cada um' e *pathos* 'sofrer', foi inicialmente definido por Molisch (1937). Os agentes alelopáticos são, com algumas exceções,

metabólitos secundários, os quais parecem não ter uma função metabólica central, podendo ser produzidos em qualquer parte da planta e em concentrações variadas dentro de uma mesma espécie. Entretanto, usualmente o efeito se deve ao efeito sinérgico provocado por estes compostos. (MALHEIROS et al., 2001).

Segundo Duke (2015), a maioria dos estudos de alelopátia são superficiais, já que focam os esforços em identificar fitotoxinas que podem ser utilizadas como herbicidas, e não levam em conta fatores importantes, como a quantidade de fitotoxina produzida pela planta “alelopática” e o grau de fitotoxicidade no solo.

Segundo Scognamiglio et al. (2015), para que a atividade alelopática seja confirmada, os seguintes fatores devem ser estabelecidos:

- A existência de agentes químicos na planta doadora capazes de influenciar o desempenho da planta receptora;
- Identificação dos tecidos produtores e locais de armazenamento dos agentes químicos na planta doadora;
- Identificação das vias de emissão e mecanismos de liberação dos agentes químicos na planta doadora;
- Captação dos agentes químicos pela planta receptora;
- Mecanismo e modos de ação dos agentes químicos na planta receptora.

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor dos flavivírus da dengue, da febre amarela, do Chikungunya e do Zika vírus. Estes vírus são um problema de saúde pública, já que a falta de controle do mosquito transmissor permite a transmissão desses três vírus causadores de epidemias. Dessa forma, as maneiras de controlar o espalhamento destes vírus são a redução de contato dos vetores com os humanos susceptíveis e a redução da população dos mosquitos transmissores. Os inseticidas utilizados para a erradicação dos mosquitos, como o DDT, são tóxicos. As medidas de controle mais indicadas para o controle dos mosquitos estão relacionadas ao engajamento da população, que deve evitar deixar água parada nas suas casas. Além disso, é recomendável o uso de larvicidas nos locais onde o mosquito possa se reproduzir. (GOUVÊA JR, 2017; VASILAKIS; WEAVER, 2017). Neste sentido cabe a pesquisa de novos larvicidas, de baixa toxicidade ao ambiente.

Extratos e substâncias isoladas a partir de plantas têm sido investigados contra uma expressiva variedade de cepas, a fim de encontrar novos ativos. Entre

os polifenóis, flavan-3-óis, flavonóis e taninos possuem expressiva atividade antimicrobiana. A maioria dos polifenóis é capaz de suprimir agentes de virulência dos microrganismos, como a inibição da formação de biofilmes e neutralização de toxinas. Os agentes antimicrobianos provenientes de produtos naturais são aplicáveis à indústria farmacêutica (novos agentes terapêuticos) e à indústria alimentícia (agentes conservantes). (DAGLIA, 2012).

Assim, a pesquisa de novos produtos naturais, com atividades biológicas se faz necessária e atual, na produção de alimentos, de medicamentos, cosméticos, na agricultura, no controle de pestes, entre outras possíveis aplicações. Os ensaios para triagem de atividades biológicas são apenas o primeiro passo na descoberta de novas substâncias, já que estudos *in vivo* de atividade e de toxicidade, são muitas vezes necessários. No caso de medicamentos, estudos clínicos fazem parte do processo de desenvolvimento de produtos. Neste tipo de estudo, a segurança e eficácia das formulações são avaliadas em seres humanos de modo seguro e controlado, de forma a prever o comportamento das formulações na população.

#### 1.2.4 CLAE-RMN

Uma tendência dentro do campo das ferramentas analíticas utilizadas na pesquisa de produtos naturais são as tecnologias hífenadas, que são métodos que integram duas ou mais técnicas analíticas. Geralmente, um método cromatográfico é hífenado a um método espectrométrico, como no caso do CG-EM. Dessa forma, o principal objetivo da hífenação é unir um método de separação de compostos a um método de detecção, para a identificação dos compostos separados. (WATANABE; NIKI, 1978; BAYER et al., 1979; JAROSZEWSKI, 2005).

CLAE-RMN é uma ferramenta que acopla a cromatografia líquida de alta eficiência à espectroscopia de ressonância magnética nuclear. Esta técnica veio para solucionar os problemas usuais relacionados aos detectores universais. Uma das vantagens de utilizar a CLAE acoplada à RMN é que ambas são realizadas em meio líquido. A RMN permite a detecção da amostra como um todo, independentemente da massa molecular e, além disso, permite a elucidação estrutural inequívoca, devido à grande gama de experimentos possíveis. A única desvantagem desta técnica é a baixa sensibilidade quando comparada a demais técnicas espectrométricas. (WATANABE; NIKI, 1978). Entretanto, o desenvolvimento

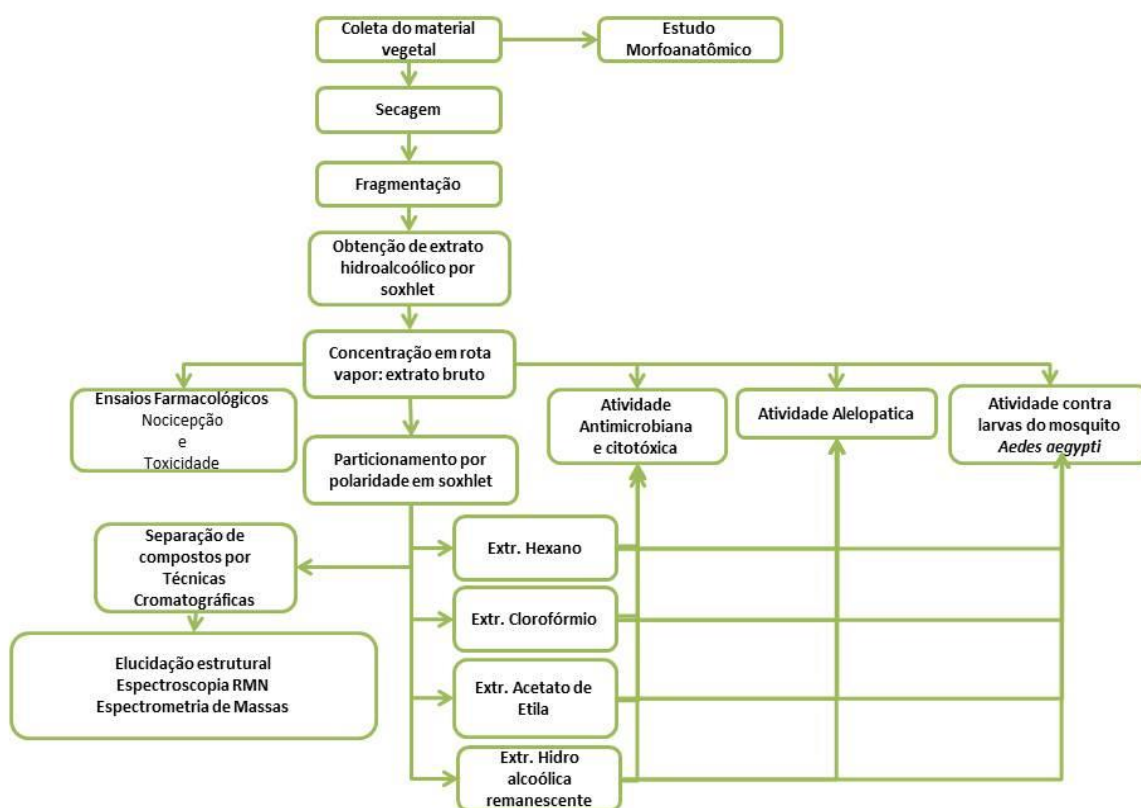
contínuo da tecnologia de RMN tem focado no aumento da sensibilidade da técnica, como por exemplo, pela criação de campos magnéticos cada vez mais potentes.

A CLAE-RMN já passou por diversos estágios de desenvolvimento. Os primeiros equipamentos faziam hifenação *online*, em tempo real e fluxo contínuo. Assim, este método trazia algumas desvantagens. Uma delas é que os experimentos de RMN, para completa elucidação estrutural, necessitam de diversos experimentos uni e bidimensionais, o que exige um longo tempo de máquina e impede a aquisição de dados de RMN para todos os picos cromatográficos (JAROSZEWSKI, 2005). Dessa forma, com o passar do tempo, esta hifenação deixou de ser realizada em fluxo contínuo, para serem utilizados sistemas que reservam os picos eluídos da coluna cromatográfica. Um exemplo deste tipo de hifenação é o CLAE-EFS-RMN, que utiliza um sistema de cartuchos de extração em fase sólida (EFS) para o armazenamento temporário das substâncias eluídas da coluna cromatográfica. Desta forma, a cromatografia pode ser realizada diversas vezes, em sequência, a fim de obter uma quantidade suficiente de compostos para a realização da RMN. (GRIFFITHS; HORTON, 1998; LINDON et al., 2000; SUMNER et al., 2003; JAROSZEWSKI, 2005; SUMNER et al., 2015).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

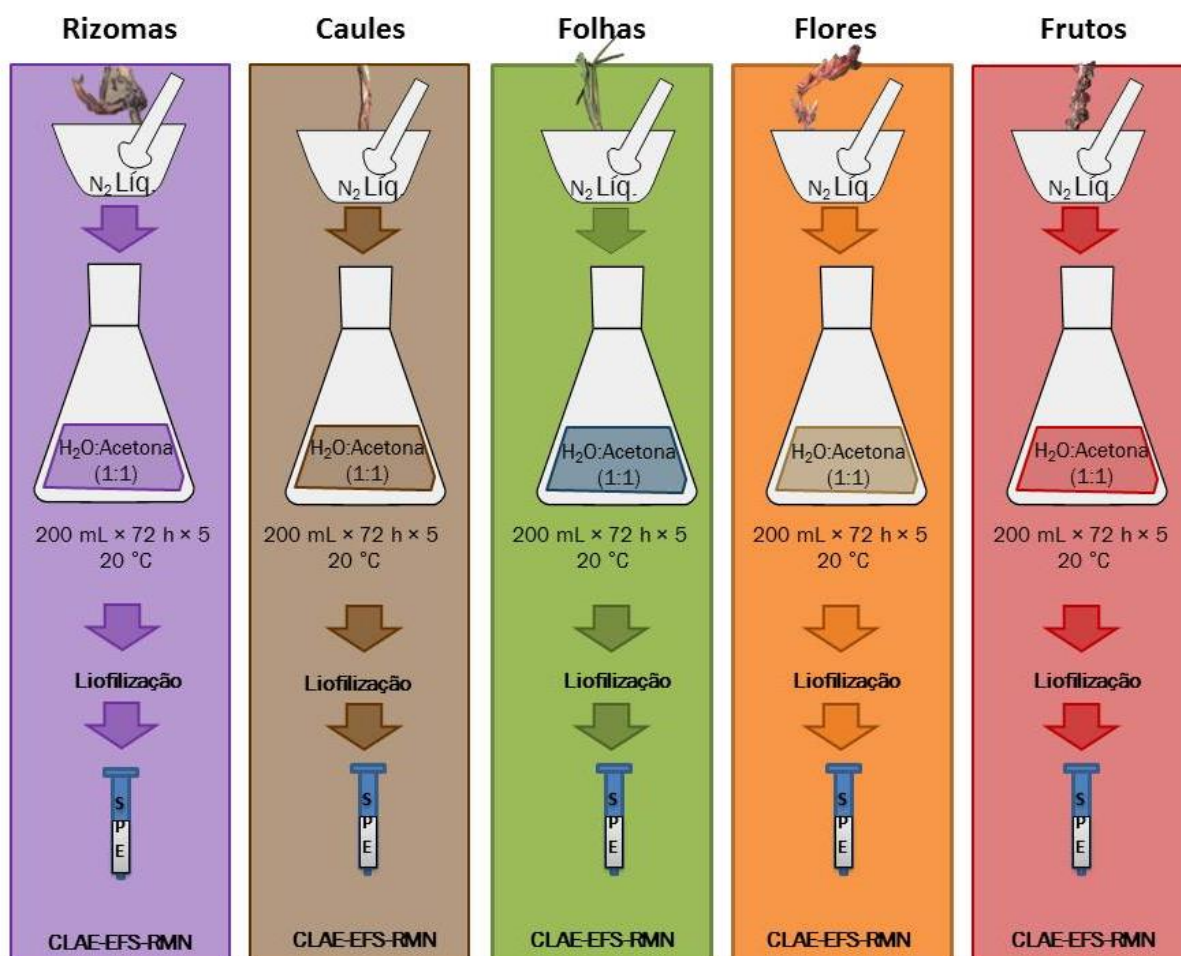
O presente trabalho foi realizado com duas espécies: *Sapium glandulosum* e *Schiekia orinocensis*. O fluxograma que segue na FIGURA 7 refere-se ao trabalho realizado com *Sapium glandulosum*, enquanto que com a planta *Schiekia orinocensis* foi realizada uma investigação fitoquímica conforme se pode observar na FIGURA 8, que resume a metodologia empregada.

FIGURA 7 – FLUXOGRAMA DO TRABALHO REALIZADO COM A PLANTA *Sapium glandulosum*



FONTE: o autor (2017)



FIGURA 8 – ESQUEMA DO TRABALHO REALIZADO COM A PLANTA *Schiekia orinocensis*

CLAE-EFS-RMN: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Extração em Fase Sólida-Ressonância Magnética Nuclear

FONTE: o autor (2017)

## 2.1 MATERIAL BOTÂNICO

Folhas e cascas de *Sapium glandulosum* foram coletadas no mês de abril de 2011, no campus Botânico da Universidade Federal do Paraná (coordenadas geográficas: 25° 26' 48.674" S, 49° 14' 22.520" O), município de Curitiba, estado do Paraná, Brasil. A identificação botânica foi realizada no herbário do Museu Botânico Municipal da cidade de Curitiba, estado do Paraná, pelo curador do museu, Osmar dos Santos Ribas. As exsicatas às quais as amostras foram comparadas estão depositadas neste local e registradas sob o número 332898.

Cinco exemplares de *Schiekia orinocensis* foram coletadas no mês de fevereiro de 2015, no município de São Felix do Tocantins, estado do Tocantins, Brasil, coordenadas geográficas: 10° 08' 39.96" S 46° 30' 59.05" O, 522 m. A

determinação botânica foi realizada pelo botânico Guilherme de Medeiros Antar, e um voucher depositado no herbário SPF da Universidade de São Paulo, sob o número SPF 219896.

## 2.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Para a preparação dos extratos da planta *Sapium glandulosum*, as amostras de planta seca das respectivas partes (folha e casca) e moídas foram pesadas e extraídas em aparelho de Soxhlet. Um aparelho de Soxhlet é conectado a um condensador de bolas e a um balão com capacidade de 3 L contendo pérolas de vidro. Todo o sistema é levado ao aquecimento em manta aquecedora e deixado em refluxo por 12 horas. Foi introduzido cerca de 500 g do material vegetal seco no suporte de vidro do aparelho, o qual contém uma placa porosa e uma camada de algodão para conter o material vegetal e 1500 mL de etanol a 70 % em água (v/v) foram adicionados. O processo foi repetido o número de vezes necessárias para extrair toda a quantidade de folhas ou cascas. O extrato filtrado a vácuo e concentrado em evaporador rotatório foi denominado extrato bruto.

A partir dos extratos brutos, foi realizada a obtenção dos extratos por partição líquido-líquido com os solventes de diferentes polaridades n-hexano, clorofórmio e acetato de etila, respectivamente. O resíduo foi denominado extrato hidroalcoólico remanescente. Todos os solventes utilizados foram de grau analítico. A extração líquido-líquido foi realizada com o aparelho de soxhlet modificado conectado ao condensador de bolas e a um balão com pérolas de vidro. Todo o sistema foi levado ao aquecimento em manta aquecedora e deixado em refluxo por cerca de 6 horas. (CARVALHO, 2001). Todos os extratos de diferentes polaridades foram concentrados e secos.

A extração das diferentes partes da planta de *Schiekia orinocensis* (flores, sementes, folhas, caule e raiz) foi realizada a partir da planta *in natura*, por maceração, em acetona:H<sub>2</sub>O (1:1). O extrato obtido foi seco em evaporador rotatório para eliminação da acetona e, posteriormente, liofilizado a fim de eliminar a água e, finalmente, armazenado sob refrigeração.

### 2.3 ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS

A separação das frações de *Sapium glandulosum* foi realizada através de cromatografia em coluna. As frações das folhas foram solubilizadas em metanol e incorporadas a 18 g de sílica-gel para a formação das pastilhas de sílica. O gradiente de polaridade da fase móvel teve início com uma mistura de hexano: acetato de etila (70:30, v/v), aumentando em 5% a proporção de acetato de etila a cada 50 mL até chegar a 100% de acetato de etila. Em seguida, foi adicionado metanol à fase móvel, aumentando em 5% a cada 50 mL, até chegar à proporção final de acetato de etila:metanol (40:60, v/v). Cada frasco foi coletado com aproximadamente 15 mL, totalizando 60 frascos para cada extrato.

A análise fitoquímica de *Schiekia orinocensis* foi realizada pela técnica hifenada de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Extração em Fase Sólida-Ressonância Magnética Nuclear (CLAE-EFS-RMN), utilizando um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, modelo Agilent 1100, com sistema de bombas quaternário) para a separação das substâncias presentes no extrato, acopladas a um equipamento de EFS (Extração em Fase Sólida) para remoção da fase móvel e eluição em solvente deuterado e, finalmente, seguido pelo acoplamento com o espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A coluna cromatográfica utilizada foi uma LiChrospher RP18e (5 µm, 250 mm x 10 mm), com um gradiente MeOH-0.1% aq. Ácido trifluoracético (TFA) de 35% a 100% em 25 min (fluxo de 0,8mL/min; comprimento de onda monitorado em 254 nm). Espectros UV-Vis foram obtidos pelo detector Diode Array (DAD, faixa de detecção 200-700 nm) do sistema CLAE-EFS. O equipamento de EFS Spark Prospekt 2 estava equipado com cartuchos HySphere de resina GP (10 X 2 mm, 10 µm).

### 2.4 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

As substâncias isoladas foram submetidas às análises espectrométricas para elucidação de sua estrutura. Todos os experimentos de RMN foram realizados em espectrômetros Bruker AVANCE III 500, AVANCE III HD 600 ou AVANCE III 700, operando a 11,7, 14,1 ou 16,5 Tesla, respectivamente, observando os núcleos de <sup>1</sup>H a 500,13, 600,13 e 700,45 MHz respectivamente e os núcleos de <sup>13</sup>C a 125,75, 150,90 e 176,13 MHz, respectivamente. O espectrômetro de 500 MHz estava

equipado com uma criossonda inversa de 5 mm com três canais com gradiente z. O espectrômetro de 600 MHz estava equipado com uma sonda inversa quadrinuclear de 5 mm com gradiente z. O espectrômetro de 700 MHz estava equipado com uma criossonda inversa de 1,7 mm com três canais com gradiente z. Os deslocamentos químicos foram referenciados em relação ao sinal do TMS, como referencia interna, em 0,00 ppm, ou ao sinal do metanol-d<sub>4</sub>, em 3,31 ppm ou da acetona-d<sub>6</sub>, em 2,05 ppm. Os espectros de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} foram adquiridos com uma janela espectral de ~11 ppm e ~240 ppm, respectivamente. Os espectros de RMN de correlação <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C a uma ligação (HSQC) e a longa distância (HMBC) foram otimizados para uma média de constantes de acoplamento <sup>1</sup>J<sub>(H,C)</sub> e <sup>LR</sup>J<sub>(H,C)</sub> de 140 e 8 Hz, respectivamente.

Os espectros de massas de baixa resolução de Ionização por Electrospray (IES-EM) foram obtidos nos modos de ionização positivo e negativo em um espectrômetro de massas Ion Trap Bruker Esquire 3000, acoplado ao cromatógrafo de CLAE, cuja configuração das condições cromatográficas foi a mesma que a usada no CLAE-EFS. Os dados dos experimentos CLAE-IES-EM foram obtidos e analisados com o software Esquire 5.3. Os eluentes foram diretamente transferidos para o espectrômetro de massas, após detecção por detector DAD, sem retenção dos picos cromatográficos nos cartuchos de EFS. Espectros de massas de baixa resolução IES-EM/EM foram obtidos nos modos de ionização positivo e negativo, em um espectrômetro de massas LTQ XL Linear Ion Trap da Thermo Scientific, equipado com uma fonte de IES.

Espectros de massas de alta resolução foram obtidos em um sistema de UHPLC-IES-EM composto por um cromatógrafo *Ultra-High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC) Ultimate 3000 series RSLC Dionex equipado com uma coluna C18 Acclaim (150 × 2.1 mm, 2.2 mm com um fluxo de 300 µL/ min) em um sistema binário de fase móvel de água e acetonitrila, ambos contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico. O gradiente da fase móvel teve início com um aumento linear de 0% a 100% de acetonitrila em 7,5 min, mantendo 100% de acetonitrila por 2,5 min seguido por 2,5 min de água a 100%. Este sistema estava acoplado a um espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap XL da Thermo Scientific. A ionização foi realizada utilizando um IES, cujos parâmetros foram estabelecidos para 4 kV para voltagem do spray, 35 V para voltagem de transferência capilar, com uma temperatura capilar de 275 °C. As amostras foram medidas nos modos positivo e negativo, nas faixas de massa

entre m/z 100 a 1000, usando 30.000 m/ $\Delta$ m de poder de resolução no analisador de massas Orbitrap. Os dados foram avaliados e interpretados usando o software XCALIBUR, da Thermo Scientific.

## 2.5 ESTUDO MORFOANATÔMICO

Para a análise morfoanatômica foram retiradas as folhas adultas e fixadas em Formalina-Aceto-Álcool (FAA) 70, sendo este composto de formol: ácido acético glacial: e álcool etílico a 70% (5:5:90, v/v). O tempo mínimo para fixar as amostras foi de 18 horas. A fixação foi realizada para bloquear imediatamente o metabolismo das células, preservando-as. (JOHANSEN, 1940). Para a preservação das folhas adultas utilizou-se álcool etílico a 70%. (BERLYN et al., 1976). Para a realização dos testes microquímicos foram empregados folhas adultas e fragmentos de caule frescos ou fixados no FAA.

As dimensões da planta foram estabelecidas através da metragem (comprimento e largura) por meio de média simples. Para as dimensões das folhas, foi utilizado um paquímetro digital. As análises macroscópicas foram realizadas segundo Stearn (1983) e as microscópicas segundo Metcalfe e Chalk (1950).

Foram realizados cortes, à mão livre, paradérmicos e transversais, com o auxílio de isopor como suporte. (QUINTAS, 1963). Para a coloração desses cortes foram utilizados o azul de astra e a safranina, para corar estruturas acidófilas e basófilas, respectivamente. (ROESER, 1972). A montagem da lâmina, com intuito de preservar o material e unir a lâmina com a lamínula, foi feita com glicerina a 50%. (PAULETE; BEÇAK, 1976; KRAUS; ARDUIN, 1997). E por fim, foi realizada a lutagem utilizando esmalte. Esse procedimento serve para retardar as modificações do material impedindo que o mesmo entre em contato com o ambiente. (PAULETE; BEÇAK, 1976). Os cortes foram analisados e fotografados em aumentos de 4x, 10x, 20x e 40x no microscópio fotônico BX40.

Para os testes microquímicos foram utilizados cinco indivíduos e retirados caules e folhas adultos que estavam fixados em FAA, exceto para os testes de terpenoides com grupo carbonila que foram usados materiais frescos. Foram realizados cortes transversais à mão livre, na porção mediana, selecionados os melhores cortes, aplicados os reagentes de acordo com cada teste, lavados em água destilada e montados na lâmina com glicerina a 50%. Em seguida, os

resultados foram observados e fotografados em microscópio fotônico BX40 nos aumentos de 4x, 10x, 20x e 40x.

Nos ensaios microquímicos utilizaram-se metodologias conhecidas, de acordo com a o QUADRO 3.

QUADRO 3 – TESTES MICROQUÍMICOS

| Grupo químico                   | Reagente  | Referência   |
|---------------------------------|---|--|
| Flavonoides                     | Cloreto de alumínio   | Charrière-Ladreix (1976)                             |
| Compostos fenólicos             | Cloreto férrico   | Johansen (1940)                                      |
| Amido                           | Lugol   | Berlyn et al. (1976)                                 |
| Lignina                         | Floroglucinol-HCl   | Johansen (1940)                                      |
| Lipídios totais                 | Sudan III   | Pearse e Stowarci (1980)                             |
| Polissacarídeos neutros         | PAS - Ácido Periódico/Reagente de Schiff  | Mcmanus (1948)                                       |
| Terpenoides com grupo carbonila | 2,4- dinitrofenil-hidrazina   | Ganter e Jollès (1969)                               |
| Proantocianidinas               | Vanilina sulfúrica - vanilina a 2% em ácido sulfúrico a 50%<br>Solução contendo 0,2 % de guaiacol, 2 mM 4-cloro-1-naftol e 0,05 % tetrametilbenzidina (TMB) | Adaptado de Price et al. (1978) e de Scalbert (1992) |
| Peroxidase                      |   | Senthilkumar e Krishnamurthy (1999)                  |
| Superóxido dismutase            | 1 mM nitroblue tetrazolium  | Gahan e Kalina (1968)                                |
| Proteínas totais                | Azul Brilhante de Comassie  | Fisher (1968)  |

Seções controle foram realizadas simultaneamente aos testes histoquímicos, conforme procedimento padrão. Para a verificação do aspecto natural dos órgãos e das secreções, foram montadas e observadas algumas seções sem tratamento.

A análise ultraestrutural de superfície em microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi realizada segundo Haddad et al. (2007). As amostras (partes aéreas vegetativas da planta) acondicionadas em FAA 70 sofreram uma desidratação etanólica crescente (80%, 90% e 100%), transferidas a cada 15 minutos. Essas amostras foram inseridas em uma câmara preenchida com álcool absoluto e colocadas no aparelho de ponto crítico. Nessa fase, ocorreu a substituição até a remoção completa de álcool etílico por CO<sub>2</sub> para que o material ficasse completamente seco. O material, após ponto crítico, foi aderido com uma fita de cobre a um suporte do MEV e metalizado com ouro. Essa etapa tem como finalidade o aumento da condutividade da superfície da amostra devido à presença da fina camada de metal que através de bombeamento de íons pesados de argônio, os átomos de ouro se depositam sobre todas as reentrâncias e proeminências da superfície da amostra. A última etapa foi a observação e a análise no microscópio eletrônico de varredura, o qual produz imagens tridimensionais.

## 2.6 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ALELOPÁTICA

A avaliação de atividade alelopática foi realizada apenas com os extratos de *Sapium glandulosum* e a metodologia foi adaptada de Jelassi et al. (2016).

Placas de Petri (9,0 cm de diâmetro) cobertas com papel filtro Whatman nº. 1,0, previamente autoclavados a 120°C por 20 minutos, receberam 5,0 mL da solução das amostras, preparadas nas concentrações de 250 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL. O preparo das concentrações citadas foi realizado do seguinte modo: foram pesadas 50 mg das amostras e a elas foram adicionados 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 500 µL de água. Os frascos contendo esta mistura foram sonicados e, em seguida, foi adicionado 1 mL de ácido 2-(*N*-morfolino) etanosulfônico (MES), 3 mL de água e o pH da solução foi ajustado para um intervalo entre 5,5 e 6,5. As soluções foram, em um balão volumétrico, completadas para 50 mL com água. Foram adicionados 5 mL (1000 µg/mL) dessas amostras sobre as placas, descartados 20 ml e completados novamente para 50 ml com água. Novamente, 5 ml (500 µg/mL) foram colocados sobre as placas e o processo foi repetido para obtenção da concentração de 250 µg/mL. Em seguida, foram semeados aleatoriamente sobre cada disco de papel filtro, 30 diásporos da espécie *Lactuca sativa*, distribuídos aleatoriamente, com quatro repetições para cada solução, conforme Brasil (2009). Como controle, procedimento similar foi utilizado, porém com ausência dos extratos e frações.

As placas de Petri contendo os diásporos foram levadas a uma câmara de germinação com fotoperíodo, com umidade relativa ( $\pm$  80%) e temperatura constante de 20°C, conforme Brasil (2009).

### 2.6.1 Teste de germinação

Para os bioensaios de germinação, foi aplicada a metodologia de Macías et al. (2000). A contagem para avaliar a germinação foi realizada diariamente, por sete dias, tendo como critério a protrusão radicular com no mínimo 2,0 mm de comprimento. O experimento foi considerado concluído quando a germinação foi nula por três dias consecutivos.

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado segundo Maguire (1962) para cada repetição de cada tratamento, utilizando-se a quantidade de

sementes germinadas, dividindo-se pelo número de dias da germinação e somando-se até o último dia de germinação. Foi realizada análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, para a comparação das médias.

### 2.6.2 Teste de crescimento

Para os bioensaios de crescimento utilizou-se a metodologia descrita por Barnes e Putnam (1987) e Macías et al. (2000). Após sete dias da protrusão radicular, mediu-se o alongamento da raiz e do hipocótilo/coleóptilo (dez plântulas por placa), utilizando paquímetro. Os resultados das leituras de crescimento foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, para comparação das médias, que foram comparadas em porcentagem em relação aos controles, cujas médias das medidas de crescimento foram consideradas 100%.

## 2.7 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE LARVICIDA

A avaliação da atividade larvicida contra larvas do mosquito *Aedes aegypti* foi realizada segundo a metodologia publicada pelo Who (1981), com algumas modificações. Os ovos de *Aedes aegypti* da linhagem Rockefeller, utilizada como padrão de susceptibilidade a larvicida para a espécie *Aedes aegypti*, foram fornecidos pela Fundação Oswaldo Cruz. (HARTBERG; CRAIG, 1970).

Para a eclosão dos ovos, estes foram colocados em bandeja de plástico e 500 mL de água sem cloro foram adicionados. Os ovos foram incubados em estufa BOD, com controle de temperatura a  $27 \pm 2$  °C e umidade relativa de  $80 \pm 5$  %. A dieta das larvas consistiu de ração de peixe, que foi administrada desde o período de eclosão até o quarto estágio larval. Os extratos de *S. glandulosum* foram preparados em concentrações de 250, 500 e 1000 µg/mL e em seguida solubilizados em DMSO a 0,5% e água sem cloro ou mineral.

As amostras foram preparadas em triplicatas para cada concentração de extrato. A pequenos copos de plástico foi adicionado 5 mL de extrato nas diferentes concentrações e 15 larvas no 4º estágio. Uma solução aquosa de DMSO 0,5 % foi utilizada em triplicata como controle negativo. Como controle positivo foi utilizado o



larvicida temefós (grau técnico 90%) em concentração de 0,060 mg/mL (duas vezes a concentração letal que causa mortalidade de 99% das larvas).

A atividade larvicida foi avaliada após 24 horas por meio da contagem do número de larvas mortas em cada amostra. Larvas moribundas, incapazes de atingir a superfície da água quando tocadas, foram consideradas como mortas. (WHO, 1981). Os valores da concentração letal ( $CL_{50}$ ) em  $\mu\text{g/mL}$  foram determinados utilizando o método de análise Probitos. (FINNEY, 1947).

### 2.7.1 Avaliação de alterações na morfologia das larvas

Para a avaliação da morfologia interna, larvas no 4º estágio foram selecionadas, uma vez que estas apresentam tecidos mais desenvolvidos. As larvas coletadas foram imediatamente fixadas em glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2% e sacarose 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 e armazenadas em temperatura ambiente até o momento das análises. (ARRUDA et al., 2003). As lâminas contendo as larvas foram preparadas e fotografadas usando uma câmera de vídeo digital conectado a um microscópio invertido Zeis (ampliação de 40X e 100X).

## 2.8 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para os testes de atividade antimicrobiana, a metodologia empregada foi a do método de concentração inibitória mínima (CIM). (RIOS et al., 1988). Uma coleção de dez microrganismos foi usada, incluindo oito bactérias: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 15305), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352), *Bacillus subtilis* (ATCC 23856), *Shigella sonnei* (ATCC 25931), e quatro fungos: *Candida albicans* (ATCC 14053), *Candida tropicalis* (ATCC 28707), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 36375); *Cryptococcus neoformans* (ATCC 90112) e os antibióticos cloranfenicol e nistatina foram utilizados como controle positivo.

Os extratos foram solubilizados em DMSO 0,5% em solução salina (cloreto de sódio a 0,9% em água) e testados nas concentrações de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , decrescendo 25  $\text{mg/mL}$  até chegar a 25  $\text{mg/mL}$ . A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada em placas de cultura de 96 poços, usando o método de

microdiluição e usando uma suspensão de microrganismos com uma densidade de  $10^5$  UFC/mL com caldo de caseína-soja, incubado por 24 horas a 37°C para bactérias. Para fungos foi utilizado caldo Sabouraud, com um período de incubação de 72 horas a 25°C. Decorrido o tempo de incubação, foram acrescentados 20 µL de solução aquosa de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) 0,5% e as microplacas foram incubadas por mais três horas a 35 °C.

As culturas que não apresentaram crescimento foram usadas para inocular placas de meio sólido (ágar Mueller Hinton para bactérias e ágar Sabouraud para fungos) com o objetivo de determinar a concentração letal mínima (CLM), ou seja, a menor concentração da substância capaz de alcançar uma redução maior que 99,9% do número de unidades formadoras de colônias (UFC). (BURT, 2004). As amostras controle e teste foram avaliadas simultaneamente, em triplicata, conforme técnica descrita na literatura. (HAMMER et al., 1999; NCCLS, 2002).

## 2.9 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE CITOTÓXICA

### 2.9.1 Avaliação de citotoxicidade dos extratos pelo método da SRB

O ensaio de sufrodamina B (SRB) consiste em um método colorimétrico adequado para a avaliação da viabilidade celular baseado na marcação de células previamente fixadas em placas de 96 poços. (SKEHAN et al., 1990; VOIGT, 2005). A inibição do crescimento celular, um indicador da citotoxicidade, foi avaliada nos extratos dissolvidos em DMSO (0,1%) nas concentrações de 0,25, 2,5, 25; 50; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 225; 250 µg/mL.

Para os testes, foram utilizadas células neoplásicas da linhagem U251 (glioma, SNC); NCI-ADR/RES (ovário, com fenótipo de resistência a múltiplas drogas); 786-0 (rim); OVCAR-3 (ovário); HT-29 (cólon). O mesmo ensaio foi realizado com células normais de rim de macaco, VERO (ATCC-CCL-81) e estas foram cedidas pelo Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/ UNICAMP).

O manuseio das células utilizadas para o ensaio foi realizado segundo Freshney (2010). As células foram cultivadas em frascos estéreis na presença de meio de cultura, RPMI 1640, contendo 10 % de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina (meio

completo) e mantidas a 37 °C em incubadora com atmosfera úmida e contendo CO<sub>2</sub> (5%). Uma vez que estas células são aderentes, foi necessário fazer a remoção com a solução de tripsina (0,25% + EDTA 1 mM) em tampão PBS, pH 7,4. Em seguida, foram transferidas para tubos cônicos contendo meio de cultura completo. Após centrifugação, o meio e a tripsina foram desprezados e as células ressuspensas em pequeno volume de meio completo. A contagem foi realizada a partir de uma alíquota dessas células em uma câmara de Neubauer onde em cada cavidade da placa de 96 poços foi depositado um volume de 100 µL de meio contendo 10.000 células (100.000/mL).

Após 20 horas, para permitir a fixação das células semeadas, o meio foi aspirado e os extratos nas diferentes concentrações foram adicionados em triplicata. Para o controle negativo, as células foram crescidas na ausência de qualquer extrato e contendo somente meio de cultura contendo DMSO 0,5% (o solvente utilizado para dissolver os extratos e frações).

Em todos os testes foi utilizado um controle positivo, doxorrubicina. Todas as placas foram novamente mantidas na mesma incubadora a 37°C, até o final do período de exposição das células aos compostos-teste (48 h).

O teste adotado baseia-se na coloração das proteínas, pelo corante sulforodamina B. Este corante possui dois grupos sulfônicos, e liga-se às proteínas das células fixadas na placa, as quais são precipitadas pelo ácido tricloro acético (TCA). Assim, em 48 horas o meio foi removido e substituído por 100 µL de TCA 20%. As placas foram então incubadas por meia hora a 40°C em geladeira. Posteriormente a solução de TCA foi removida e as placas lavadas 5 vezes com água corrente.

Em seguida foram adicionados 50 µL de SRB 0,1% (diluída em ácido acético 1%) e novamente incubada por meia hora em temperatura ambiente. Após a remoção da solução de SRB, as placas foram lavadas 4 vezes com ácido acético a 1%, secas e Tris Base 10mM foi adicionado. As placas foram agitadas por 10 minutos para a dissolução das proteínas coradas e a absorbância foi medida a 540 nm em leitor de microplacas. A viabilidade celular foi obtida pela fórmula:

$$\% \text{ de células vivas} = \frac{A_{540}(\text{Teste})}{A_{540}(\text{Controle})} \times 100$$

Onde  $A_{540}(\text{Controle})$  é a média da absorbância dos poços com controle (DMSO 0,5%) e  $A_{540}(\text{Teste})$  é a média da absorbância dos poços com a substância testada. Foram feitos três ensaios independentes, com duplicatas, e calculou-se a média  $\pm$  erro padrão ( $M \pm EP$ ).

### 2.9.2 Avaliação de citotoxicidade de substâncias pelo ensaio de MTT

O ensaio com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) é utilizado para determinar a atividade metabólica da mitocôndria e correlacionar com as células viáveis após tratamento com o agente quimioterápico. Trata-se de um ensaio colorimétrico baseado na capacidade das células viáveis reduzirem o sal de MTT, por ação da succinato desidrogenase mitocondrial, e formar cristais de azul de formazana. (MOSMANN, 1983).

Foram incubados por 24 h, 100  $\mu\text{L}$  da suspensão de células SIHA (Neoplasia de cérvix uterina escamosa humana com genoma de HPV16) a 105 células/mL em placas de 96 poços. Após a incubação, as células foram tratadas por 24h com as substâncias nas concentrações 3,125, 6,25, 12,5, 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$ . Doxorrubicina (DOX) foi usada como controle positivo (50  $\mu\text{g/mL}$ ). Depois do tratamento, descartou-se o meio de cultura da placa e 10  $\mu\text{L}$  de MTT a 5 mg/mL em PBS, foram adicionados em cada poço. Incubou-se a placa por mais 3 h nas mesmas condições de cultivo para que a redução do sal ocorresse. Então, solubilizou-se o sal de formazana com 100  $\mu\text{L}$  de isopropanol e fez-se a leitura em espectrofotômetro iMark Microplate Reader no comprimento de onda 570 nm, descontando a absorbância a 655 nm. A estimativa de células vivas foi obtida pela fórmula:

$$\% \text{ de células vivas} = \frac{A_{570}(\text{Teste}) - A_{570}(\text{Branco})}{A_{570}(\text{Controle}) - A_{570}(\text{Branco})} \times 100$$

Onde  $A_{570}(\text{Controle})$  é a média da absorbância dos poços com controle (DMSO 0,5%),  $A_{570}(\text{Branco})$  é a média da absorbância dos poços com branco (sem células) e  $A_{570}(\text{Teste})$  é a média da absorbância dos poços com a substância testada. Foram feitos três ensaios independentes, com duplicatas, e calculou-se a média  $\pm$  erro padrão ( $M \pm EP$ ).

## 2.10 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

As abordagens farmacológicas foram feitas utilizando modelos animais em camundongos Swiss, mantidos em temperatura controlada de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , em ciclo de 12h claro e 12h escuro e com água e ração à vontade. Os animais foram distribuídos homogeneamente entre os grupos experimentais e mantidos no laboratório para aclimatação por pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas éticas para o estudo de dor com animais de laboratório. (ZIMMERMANN, 1983). Os modelos experimentais descritos na sequência visaram à identificação de potencial atividade antinociceptiva dos extratos brutos das folhas de *S. glandulosum*.

Os ensaios foram aprovados pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) do setor de Ciências Biológicas da UFPR, pelo certificado nº 794.

### 2.10.1 Nociceção induzida por formalina

O teste de nociceção induzida por formalina foi executado conforme metodologia descrita por Hunskaar et al. (1985), a qual consiste na injeção de 20  $\mu\text{L}$  de uma solução de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) na superfície ventral da pata posterior direita. O indicativo de nociceção é o tempo que o animal permanece lambendo ou mordendo a pata injetada, durante os primeiros cinco minutos após a injeção (primeira fase ou fase neurogênica), e durante o intervalo de 15 a 30 minutos após a injeção (segunda fase ou fase inflamatória). Os animais foram pré-tratados com os extratos brutos das folhas de *S. glandulosum*, nas doses de 30, 100, 300 e 1000 mg/kg, por via oral, antes da injeção intraplantar de formalina, e observados com relação ao tempo de resposta nociceptiva durante as duas fases do modelo.

### 2.10.2 Nociceção induzida por ácido acético

O teste de nociceção induzida por ácido acético foi executado conforme metodologia adaptada de Koster et al. (1959), a qual consiste na injeção intraperitoneal de 450  $\mu\text{L}$  de uma solução de ácido acético a 0,6%. O indicativo de nociceção é o número de contrações da musculatura abdominal, associadas ao alongamento dos membros posteriores, durante o período de 20 minutos. Os

animais foram pré-tratados com os extratos brutos de *S. glandulosum*, por via oral, nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, antes da injeção intraperitoneal de ácido acético, e observados com relação ao número de contorções abdominais durante o período de avaliação.

### 2.10.3 Avaliação da atividade locomotora

Para avaliar se a atividade antinociceptiva dos extratos testados pode ser decorrente de efeitos inespecíficos, os animais foram submetidos a um teste para avaliação da atividade motora. No teste do campo aberto (RODRIGUES et al., 2002), os animais foram pré-tratados com veículo ou com os extratos por via oral e posteriormente colocados no interior de uma caixa de madeira (50x50x50 cm) com o assoalho dividido em 16 quadrados de tamanhos iguais. Imediatamente após a colocação do animal na caixa, foi contabilizado o número de quadrados cruzados com as quatro patas, durante o período de seis minutos.

## 2.11 AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS EFEITOS TÓXICOS

### 2.11.1 Ganho/perda de peso, peso relativo de órgãos, níveis de enzimas hepáticas e atividade locomotora após administração crônica

Para avaliar um possível efeito tóxico do extrato bruto das folhas após administração crônica foi utilizada metodologia descrita por Montrucchio (2012). Os animais foram tratados com veículo ou com os extratos brutos, por via oral, nas doses de 500 e 1000 mg/kg uma vez ao dia, durante 14 dias. Os animais foram observados e pesados diariamente, e após a última administração de extrato ou veículo foram submetidos ao teste do campo aberto, conforme descrito no item 2.10.3. Em seguida, foram deixados em jejum, com água à vontade, durante 12 horas. No 15º dia os animais foram anestesiados com cetamina (50 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.) para a coleta de 1 mL de sangue. Em seguida os animais foram sacrificados e os órgãos vitais – fígado, rins, estômago, baço, coração, pulmões e cérebro – foram retirados e pesados em relação ao peso corporal. As amostras de sangue foram separadas em dois tubos. O primeiro contendo anticoagulante EDTA para realização hemograma. O segundo tubo, sem

anticoagulante, em que as amostras foram centrifugadas a 3.500 rpm por 10 minutos a 4°C, e o soro foi posteriormente utilizado para a dosagem dos marcadores bioquímicos: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), ureia, creatinina e ácido úrico, com kit bioquímico específico.

### 2.11.2 Análise histopatológica

Cortes transversais do lóbulo direito do fígado e rins foram obtidos e fixados no líquido metacan, composto por 60 mL de metanol, 30 mL de clorofórmio e 10 mL de ácido acético glacial, por três horas. Na sequência, o material foi submetido a banhos consecutivos de etanol absoluto por três vezes durante 30 minutos e permaneceu em repouso por 16 horas em temperatura ambiente no etanol absoluto contendo xilol na mesma proporção. Após as 16 horas, o material sofreu diafanização em xilol três vezes consecutivas durante 30 minutos cada. O material foi então impregnado em parafina líquida por duas horas em estufa, sob temperatura de 58 °C. Os blocos histológicos foram submetidos à microtomia, obtendo-se cortes com três micrometros de espessura. As lâminas contendo os cortes histológicos foram desparafinizadas, hidratadas e coradas com hematoxilina de Harris, por 60 segundos. Após, as lâminas foram lavadas em água corrente com água destilada para posterior coloração com eosina durante 1 minuto, segundo Beutler e Coller (2001) e Culling et al. (2014). Após a coloração, as lâminas foram lavadas com água destilada, desidratadas em solução crescente de etanol (70 a 100%, durante cinco minutos em cada etapa), diafanizadas primeiramente em álcool e xilol (etapa única de cinco minutos) e após somente em xilol (duas etapas a 100%, durante cinco minutos cada). Ao final da preparação, as lâminas foram avaliadas em microscopia ótica.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho estão aqui dispostos, seguindo a ordem de apresentação da metodologia. Os dados fitoquímicos foram obtidos para as duas espécies estudadas, *Sapium glandulosum* e *Schiekia orinocensis*. Logo em seguida estão dispostos os dados dos testes biológicos de *Sapium glandulosum*, uma vez que estes não foram realizados para a planta *Schiekia orinocensis*. Tendo em vista que muitos dos testes biológicos foram realizados tanto com os extratos brutos como com os extratos após o particionamento com os solventes de diferentes polaridades, estes foram identificados da seguinte forma: EB (extrato bruto), EH (extrato hexânico), EC (extrato clorofórmico), EAE (extrato acetato de etila), EHR (extrato hidroalcoólico remanescente).

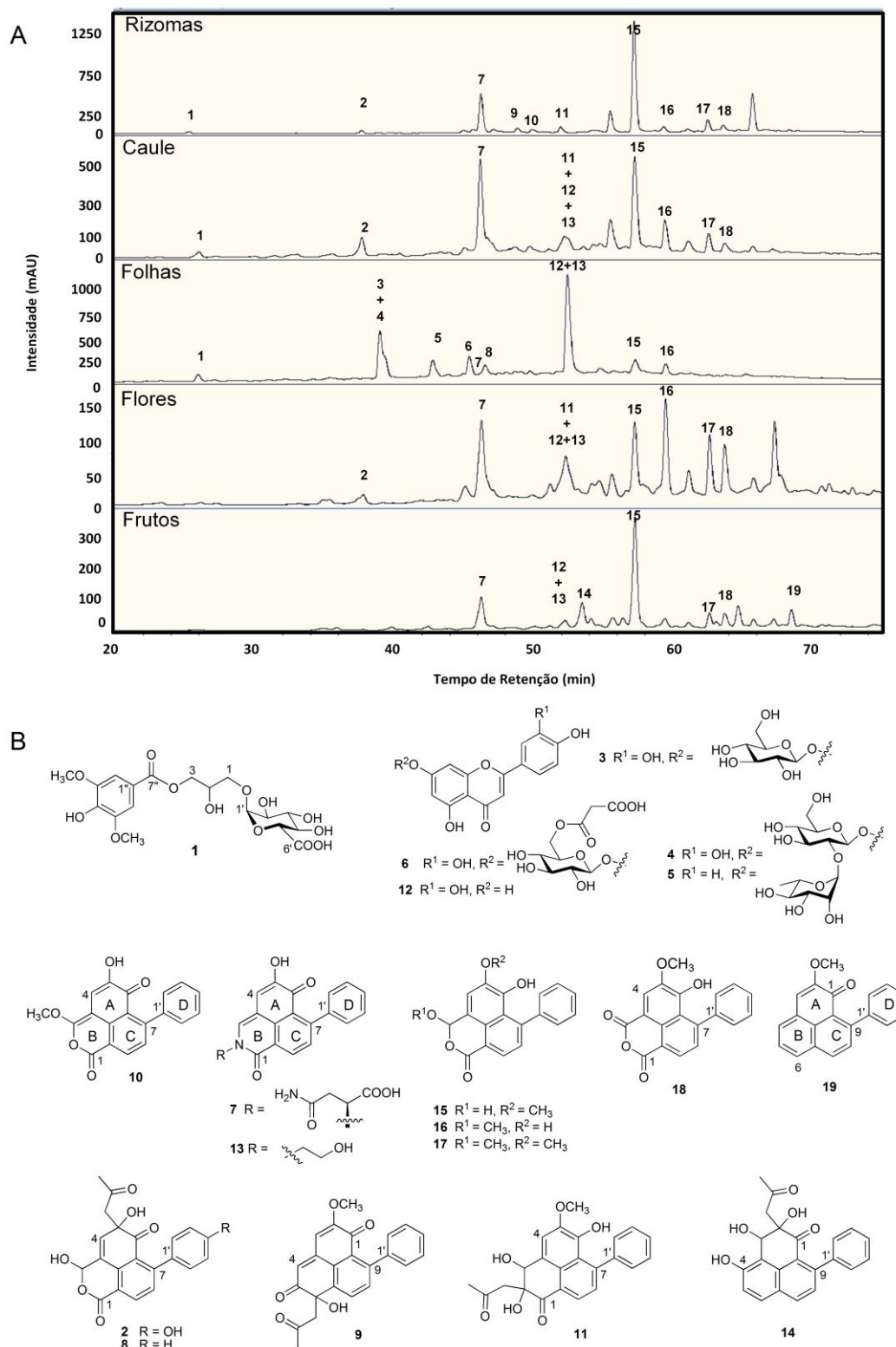
#### 3.1 SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS EM *Schiekia orinocensis*

Os extratos de *Schiekia orinocensis* foram cromatograficamente separados, conforme mostra a FIGURA 9A. No total foram isolados 19 compostos FIGURA 9B. Entre eles, 13 substâncias (2,7-11,13-19) podem ser classificadas como sendo fenilfenalenonas e estruturas relacionadas. O composto 19, conhecido como metoxianigofurona (COOKE; THOMAS, 1975; HÖLSCHER; SCHNEIDER, 1997) é a única fenilfenalenona nesta planta que apresenta um esqueleto C<sub>19</sub> não modificado. Os compostos 3,6-Dihidroxi-5-metoxi-7-fenil-3H-benzo[de]isocrome-1-ona (15) (OPITZ et al., 2002), haemodordiol (16) (BRKLJAČA; URBAN, 2015), 6-hidroxi-3,5-dimetoxi-7-phenil-3Hbenzo[de]isocromen-1-ona (17) (FANG et al., 2012) e 4-hidroxi-3-metoxi-5-fenil- 1,8- anidrido naftálico (18) (COOKE, 1970; OPITZ et al., 2002) são caracterizados por fenilfenalenonas de esqueleto oxidado (C<sub>18</sub>O) e, por isso, chamadas de oxafenilfenalenonas. (EDWARDS; WEISS, 1972; FANG et al., 2012). As oxafenilfenalenonas são consideradas marcadores taxonômicos das plantas pertencentes à subfamília Haemodoroideae, uma vez que não são encontradas na subfamília Conostylidoideae, a outra subfamília das Haemodoraceae. Todos os compostos conhecidos foram identificados pela comparação dos dados analíticos encontrados com os dados encontrados na literatura, enquanto que as estruturas dos metabólitos inéditos, cujas elucidação está discutida nas próximas páginas,



foram elucidados por RMN 1D e 2D, além de dados de espectro de massas de alta resolução por ionização por eletro spray (HRESIMS).

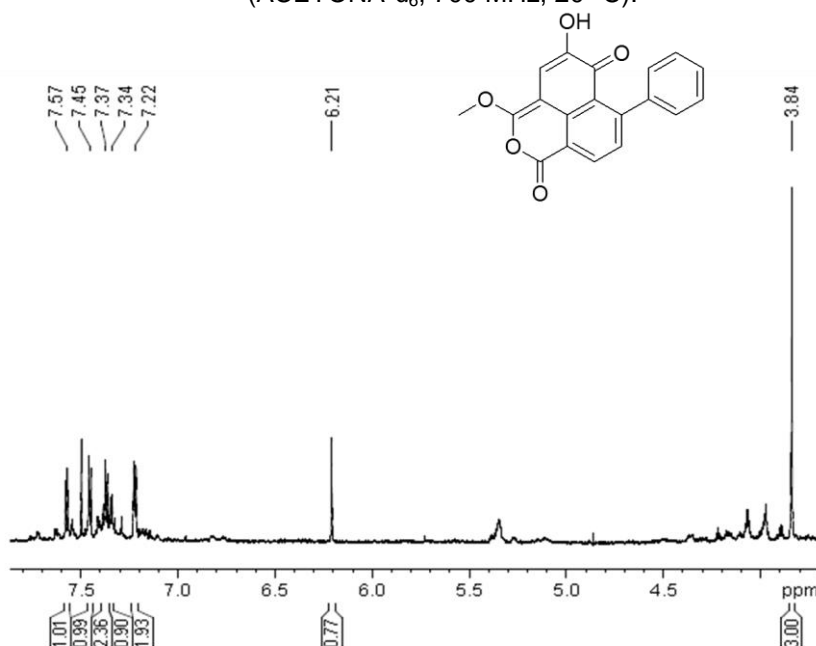
FIGURA 9 – A) CROMATOGRAMAS DAS DIFERENTES PARTES DE *Schiekia orinocensis* B) ESTRUTURA QUÍMICA DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Schiekia orinocensis*



FONTE: o autor (2017)

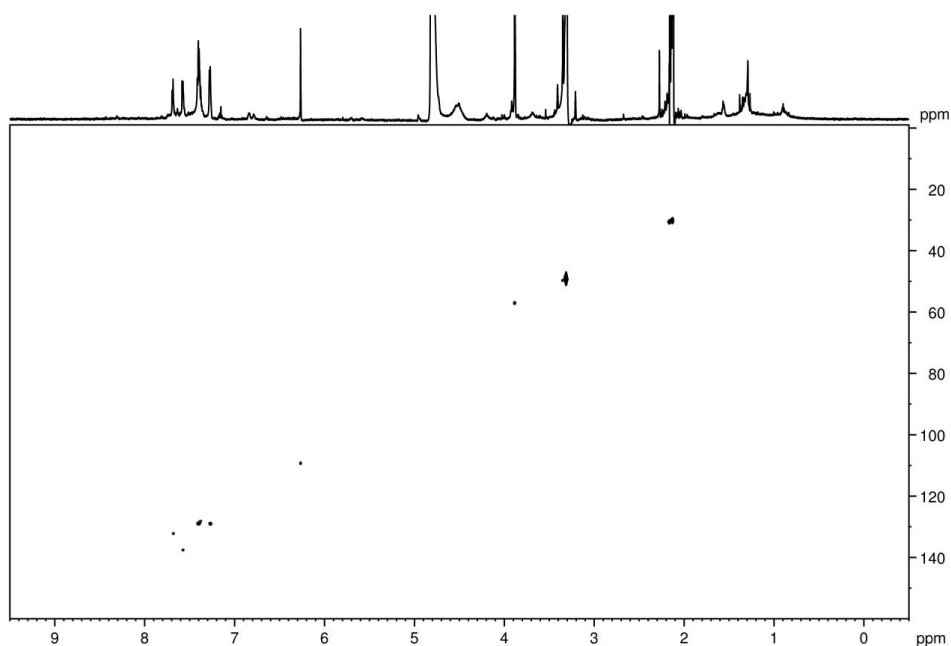
O composto 10 foi isolado como um pó amarelo, cuja fórmula molecular foi determinada como  $C_{19}H_{12}O_5$ , baseado no pico  $[M-H]^-$  a  $m/z$  319,0607 no espectro HRESIMS (calc. 319,0612). O espectro de RMN de  $^1H$  (FIGURA 10) apresentou sinais de multipletos em  $\delta$  7,22 (2H, H-2' e 6'),  $\delta$  7,37 (2H, H-3' e 5') e 7,34 (1H, H-4'), que foram atribuídos aos hidrogênios do anel fenila. Foram também observados um sistema de spins AB do H-8 ( $\delta$  7,45) e H-9 ( $\delta$  7,57) e os simpletos de H-4 ( $\delta$  6,21) e do grupo metoxila ( $\delta$  3,84). As correlações de HMBC (FIGURA 11) do H-8 com C-1' ( $\delta$  142,2), C-6a ( $\delta$  130,0) e C-9a ( $\delta$  137,2) e do H-9 com C-7 ( $\delta$  145,7), C-9b ( $\delta$  131,0) e C-1 ( $\delta$  174,1) estabeleceram a estrutura dos anéis C e D, incluindo a carbonila no C-1. Os sinais de HMBC de H-4 com C-5 ( $\delta$  144,8), C-6 ( $\delta$  181,9) e C-9b estavam de acordo com a típica estrutura de hidroxicetona do anel A das fenilfenalenonas. E a correlação com C-3 ( $\delta$  162,3) completou a atribuição dos sinais. Uma correlação entre o sinal da metoxila e o sinal de C-3 permitiu concluir que a metoxila se encontrava no C-3 e não no C-5. Assim, os dados de RMN (TABELA 1), confirmados pelas informações da espectrometria de massas, caracterizaram o composto 10 como sendo 5-hidroxi-3-metoxi-7-fenilbenzo[de]isocromen-1,6-diona, substância esta inédita na literatura.

FIGURA 10 – ESPECTRO DE RMN DE  $^1H$  REGISTRADO PARA O COMPOSTO 10 (ACETONA- $d_6$ , 700 MHz, 20 °C).



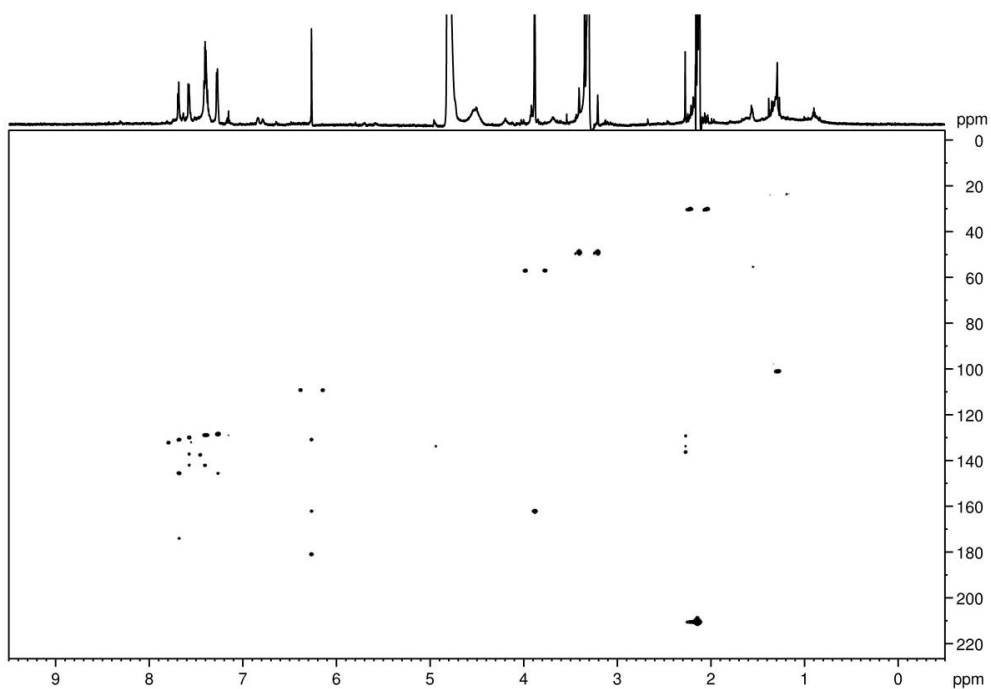
FONTE: o autor (2017)

FIGURA 11 – MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC REGISTRADO PARA O COMPOSTO 10  
(ACETONA- $d_6$ , 700 MHz, 20 °C).



FONTE: o autor (2017)

FIGURA 12 – MAPA DE CORRELAÇÃO HMBC REGISTRADO PARA O COMPOSTO 10  
(ACETONA- $d_6$ , 700 MHz, 20 °C).



FONTE: o autor (2017)

TABELA 1 – DADOS DE RMN de  $^1\text{H}$  (700 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (175 MHz) DOS COMPOSTOS 2 E 8 EM MeOD- $d_4$  E DO COMPOSTO 10 EM ACETONA- $d_6$ .

| Posição            | $\delta_{\text{H}}$ , mult.<br>(J em Hz) | 2 (MeOD- $d_4$ )<br>$\delta_{\text{C}}$ , mult. | HMBC             | $\delta_{\text{H}}$ , mult<br>(J em Hz) | 8 (MeOD- $d_4$ )<br>$\delta_{\text{C}}$ , mult. | HMBC         | $\delta_{\text{H}}$ , mult<br>(J em Hz) | 10 (Acetona- $d_6$ )<br>$\delta_{\text{C}}$ , mult. | HMBC        |
|--------------------|--|---|------------------|---|---|--------------|---|---|-------------|
| 1                  |  | 165,9, C  |                  |   | 164,6, C  |              |   | 174,1, C  |             |
| 2                  |  |   |                  |   |   |              |   |   |             |
| 3                  | 6,26, sl                                 | 96,6, CH  |                  | 6,29, sl                                | 96,6, CH  |              |   | 162,3, C  |             |
| 3a                 |  | 127,4, C  |                  |   | 127,8, C  |              |   | n.d.  |             |
| 4                  | 6,62, s                                  | 137,1, CH                                       | 3, 6, 9b         | 6,63, s                                 | 137,1, CH                                       | 3, 3a, 6, 9b | 6,27, s                                 | 109,3, CH   | 3, 5, 6, 9b |
| 5                  |  | 76,4, C   |                  |   | 76,4, C   |              |   | 144,8, C  |             |
| 6                  |  | 201,6, C  |                  |   | 201,1, C  |              |   | 181,1, C  |             |
| 6a                 |  | 121,3, C  |                  |   | 121,8, C  |              |   | 130,0, C  |             |
| 7                  |  | 150,7, C  |                  |   | 150,5, C  |              |   | 145,7, C  |             |
| 8                  | 7,46, d (8,1)                            | 133,5, CH                                       | 1, 6a, 7, 9a, 1' | 7,46, d (8,0)                           | 133,3, CH                                       | 6a, 9a, 1'   | 7,58, d (7,7)                           | 137,5, CH   | 6a, 9a, 1'  |
| 9                  | 8,25, d (8,1)                            | 134,5, CH                                       | 1, 3a, 7, 9b     | 8,30, d (8,0)                           | 134,5, CH                                       | 1, 7, 9b     | 7,69, d (7,7)                           | 132,1, CH   | 1, 7, 9b    |
| 9a                 |  | 127,0, C  |                  |   | 127,4, C  |              |   | 137,3, C  |             |
| 9b                 |  | 136,7, C  |                  |   | 136,7, C  |              |   | 131,0, C  |             |
| 1'                 |  | 131,9, C  |                  |   | 141,4, C  |              |   | 142,2, C  |             |
| 2' e 6'            | 7,20, d (8,5)                            | 130,8, CH                                       | 7, 4'            | 7,34, m                                 | 129,1, CH                                       |              | 7,28, m                                 | 128,6 –   | 7, 4'       |
| 3' e 5'            | 6,82, d (8,5)                            | 115,9, CH                                       | 1'               | 7,39, m                                 | 128,9, CH                                       |              | 7,40, m                                 | 129,0 <sup>a</sup> , CH                             | 1'          |
| 4'                 |  | 158,9, C  |                  | 7,38, m                                 | 128,8, CH                                       |              | 7,40, m                                 |   | 2', 6'      |
| 1''                | 3,03, d (15,7)                           | 51,9, CH <sub>2</sub>                           | 4, 5, 2''        | 3,03, d (15,8)                          | 52,1, CH <sub>2</sub>                           | 4, 5, 6, 2'' |   |   |             |
| 2''                | 3,21, d (15,7)                           |   | 4, 5, 6, 2''     | 3,22, d (15,8)                          |   | 5, 6         |   |   |             |
| 3''                |  | 207,5, C  |                  |   | 207,3, C  |              |   |   |             |
| 3-OCH <sub>3</sub> | 2,19, s                                  | 31,5, CH <sub>3</sub>                           | 1'', 2''         | 2,18, s                                 | 31,3, CH <sub>3</sub>                           | 1'', 2''     | 3,88, s                                 | 57,1, CH <sub>3</sub>                               | 3           |

FONTE: o autor (2017)

TABELA 2 – DADOS DE RMN de  $^1\text{H}$  (700 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (175 MHz) DOS COMPOSTOS 9, 11 e 14 EM ACETONA- $d_6$ .

| Posição            | 9 (Acetona- $d_6$ )                      |                             |                               | 11 (Acetona- $d_6$ )                    |                             |                           | 14 (Acetona- $d_6$ )                    |                             |                     |
|--------------------|--|-----------------------------|-------------------------------|---|-----------------------------|---------------------------|---|-----------------------------|---------------------|
|                    | $\delta_{\text{H}}$ , mult.<br>(J em Hz) | $\delta_{\text{C}}$ , mult. | HMBC                          | $\delta_{\text{H}}$ , mult<br>(J em Hz) | $\delta_{\text{C}}$ , mult. | HMBC                      | $\delta_{\text{H}}$ , mult<br>(J em Hz) | $\delta_{\text{C}}$ , mult. | HMBC                |
| 1                  |  | 179,4, C                    |                               |   | 199,4, C                    |                           |   | 201,5, C                    |                     |
| 2                  |  | 155,9, C                    |                               |   | 80,0, C                     |                           |   | 80,2, C                     |                     |
| 3                  | 6,90, s                                  | 110,4, CH                   | 1, 2, 4, 9b                   | 5,12, s                                 | 76,8, CH                    | 1, 2, 4, 9b               | 5,40, s                                 | 72,3, CH                    | 1, 2, 3a, 4, 9b, 1" |
| 3a                 |  | 142,8, C                    |                               |   | n.d.                        |                           |   | 115,9, C                    |                     |
| 4                  | 6,57, s                                  | 125,1, CH                   | 3, 6, 9b                      | 7,72, s                                 | 117,3, CH                   | 3, 5, 6, 9b               |   | 156,9, C                    |                     |
| 5                  |  | 199,6, C                    |                               |   | 143,8, C                    |                           | 7,26, d (8,9)                           | 119,7, CH                   | 3a, 6 <sup>a</sup>  |
| 6                  |  | 74,6, C                     |                               |   | 142,7, C                    |                           | 7,86, d (8,9)                           | 131,3, XH                   | 3a, 4, 6a, 7, 9b    |
| 6a                 |  | 143,0, C                    |                               |   | 122,1, C                    |                           |   | 128,4, C                    |                     |
| 7                  | 8,00, d (8,0)                            | 130,5, CH                   | 6,9, 9b                       |   | 145,2, C                    |                           | 8,01, d (8,4)                           | 133,6, CH                   | 6, 9, 9b            |
| 8                  | 7,45, d (8,0)                            | 134,3, CH                   | 6a, 9a, 1'                    | 7,34, d (7,3)                           | 129,3, CH                   | 6a, 9a, 1'                | 7,24, d (8,4)                           | 128,3, CH                   | 6a, 9a, 1'          |
| 9                  |  | 144,2, C                    |                               | 7,97, d (7,3)                           | 124,3, CH                   | 1, 7, 9b                  |   | 144,4, C                    |                     |
| 9a                 |  | 128,5, C                    |                               |   | 127,0, C                    |                           |   | 124,3, C                    |                     |
| 9b                 |  | 129,1, C                    |                               |   | 127,2, C                    |                           |   | 133,6, C                    |                     |
| 1'                 |  | 143,2, C                    |                               |   | 144,5, C                    |                           |   | 142,9, C                    |                     |
| 2' e 6'            | 7,25, m                                  | 128,8, CH                   | 9, 4'                         |   | 127,5 –                     |                           | 7,40, m                                 | 129,5, CH                   | 9, 4'               |
| 3' e 5'            | 7,36, m                                  | 128,8, CH                   | 1'                            | 7,36, m                                 | 129,2 <sup>a</sup> , CH     |                           | 7,37, m                                 | 128,4, CH                   | 1'                  |
| 4'                 | 7,34, m                                  | 127,9, CH                   | 2', 6'                        |   |                             |                           | 7,33, m                                 | 127,8, CH                   | 2', 6'              |
| 1''                | 3,42, s                                  | 56,0, CH <sub>2</sub>       | 5, 6, 3a, 2''<br>4, 5, 6, 2'' | 2,68, d (15,2)<br>2,85, d (15,2)        | 48,0, CH <sub>2</sub>       | 2, 3, 2''<br>1, 2, 3, 2'' | 2,72, d (15,2)<br>2,97, d (15,2)        | 49,3, CH <sub>2</sub>       | 1, 2, 3, 2''        |
| 2''                |  | 205,8, C                    |                               |   | 206,0, C                    |                           |   | 208,3, C                    |                     |
| 3''                | 2,07, s                                  | 30,3, CH <sub>3</sub>       | 1'', 2''                      | 2,13, s                                 | 31,8, CH <sub>3</sub>       | 1'', 2''                  | 2,12, s                                 | 31,9, CH <sub>3</sub>       | 1'', 2''            |
| 2-OCH <sub>3</sub> | 3,89, s                                  | 56,1, CH <sub>3</sub>       | 2                             |   |                             |                           |   |                             |                     |
| 5-OCH <sub>3</sub> |  |                             |                               | 4,01, s                                 | 57,4, CH <sub>3</sub>       | 5                         |   |                             |                     |

FONTE: o autor (2017)

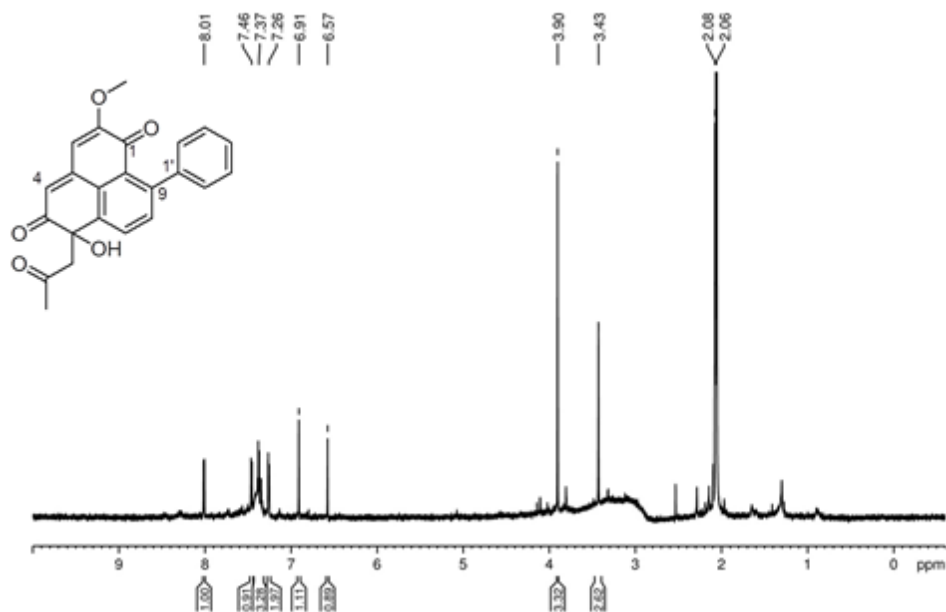
Este estudo também identificou em *S. orinocensis* duas aza-fenilfenalenonas, ou seja, estruturas com um esqueleto C18N. São elas *N*-(2-hidroxi-etil)-lachnanthopiridona (13) (EDWARDS; WEISS, 1972) e (1''S)-2-(1''-carboxi-2''-carboxamida-etil)-5-hidroxi-7-fenil-2*H*benzo[*de*]isoquinolina-1,6-diona (7) (CHEN et al., 2016). Todavia, ainda não está bem estabelecido na literatura se as aza-fenilfenalenonas são de fato produtos naturais ou se são produtos de reações de conversão espontânea, fato este que está ainda sendo investigado.

Cinco fenilfenalenonas inéditas, derivadas de acetônidas, são provavelmente produtos de fenilfenalenonas do tipo C19 (9, 11, 14) ou do tipo C18O (2, 8), provavelmente pela reação com o líquido extrator (acetona). Estas estruturas estão relacionadas e são semelhantes às estruturas recentemente reportadas por Chen et al. (2017), que realizou um estudo com acetona marcada com  $^{13}\text{C}$ , o que permitiu provar que tais compostos não são produtos naturais.

A fórmula molecular do composto 9 (pó amarelo) foi determinada como  $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{O}_5$ , baseada no pico [M-H]<sup>-</sup> em  $m/z$  373,1074 no espectro de HRESIMS (calc. 373,1082). O espectro de  $^1\text{H}$  (FIGURA 13) mostrou multipletos em  $\delta$  7,25 (H-2' e 6'),  $\delta$  7,34 (H-4') e  $\delta$  7,36 (H-3' e 5') dos hidrogênios do anel fenil, um sistema de spins dos H-7 ( $\delta$  8,00) e H-8 ( $\delta$  7,45), e simpletos dos H-3 ( $\delta$  6,90), H-4 ( $\delta$  6,57) e uma metoxila ( $\delta$  3,89) (TABELA 2). Outros simpletos dos grupos metila (H3-3''',  $\delta$  2,07) e metileno (H2-1''',  $\delta$  3,42) no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , juntamente com as correlações de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , claramente indicaram a presença da cadeia lateral acetônida (CHEN et al., 2017), ligada ao sistema de anéis da fanalenona. Correlações de HMBC (FIGURA 15) do H-8 com C-1' ( $\delta$  143,2), C-6a ( $\delta$  143,0) e C-9a ( $\delta$  128,5) e de H-7 com C-9 ( $\delta$  144,2) e C-9b ( $\delta$  129,1) estabeleceram a posição do anel fenil ligado ao C-9. As correlações de HMBC dos H-7 e H-4 com C-6 ( $\delta$  74,6) e as demais correlações do metileno H2-1''' com o mesmo átomo de carbono e com C-5 ( $\delta$  199,6) e C-6a ( $\delta$  143,0) permitiram a atribuição da cadeia lateral acetônida ao C-6, cujo valor de deslocamento químico de  $^{13}\text{C}$  indica que se trata de um carbono alifático hidroxilado. Outras correlações de HMBC do H-4 com C-3 ( $\delta$  110,4) e C-9b, bem como do H-3 com C-4 ( $\delta$  125,1), C-9b, C-2 ( $\delta$  155,9), e C-1 ( $\delta$  179,4) possibilitaram a atribuição dos sinais dos anéis A e B. Finalmente, uma correlação de HMBC entre a metoxila em  $\delta$  3,89 e o C-2 permitiu a atribuição deste grupo à este átomo. Assim, o

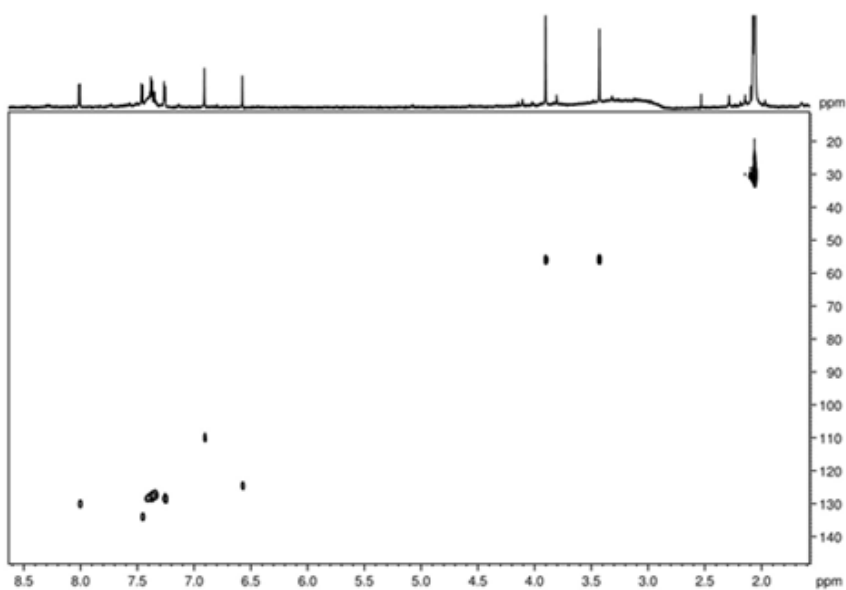
composto 9 (TABELA 2), foi identificado como 6-hidroxi-2-metoxi-6-(2-oxopropil)-9-fenil-6*H*-fenaeno-1,5-diona.

FIGURA 13 – ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  REGISTRADO PARA O COMPOSTO 9 (ACETONA- $d_6$ , 700 MHz, 20 °C).



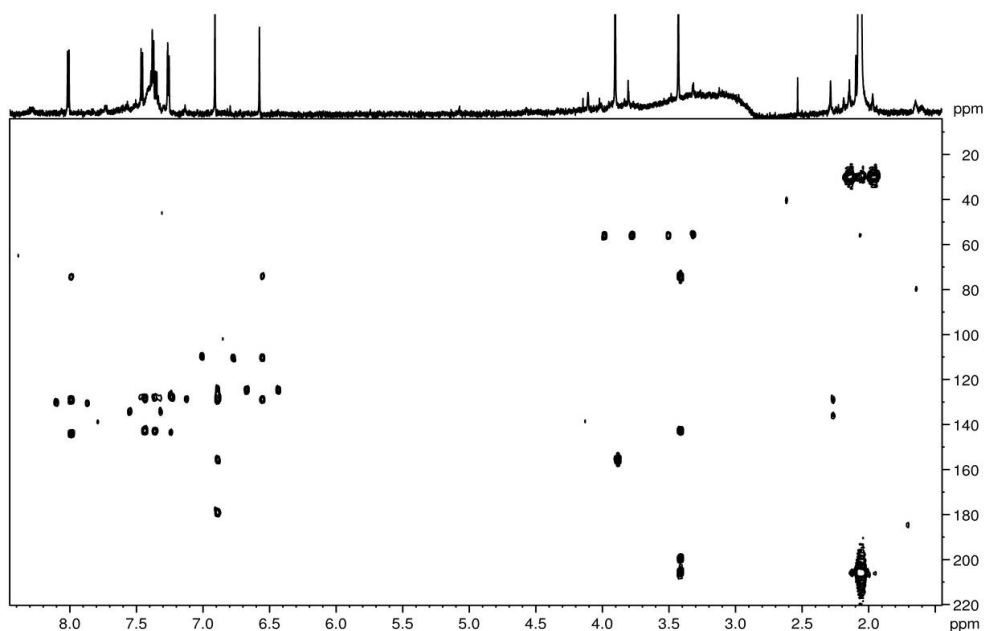
FONTE: o autor (2017)

FIGURA 14 – MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC REGISTRADO PARA O COMPOSTO 9 (ACETONA- $d_6$ , 700 MHz, 20 °C).



FONTE: o autor (2017)

FIGURA 15 – MAPA DE CORRELAÇÃO HMBC REGISTRADO PARA O COMPOSTO 9 (ACETONA- $d_6$ , 700 MHz, 20 °C).

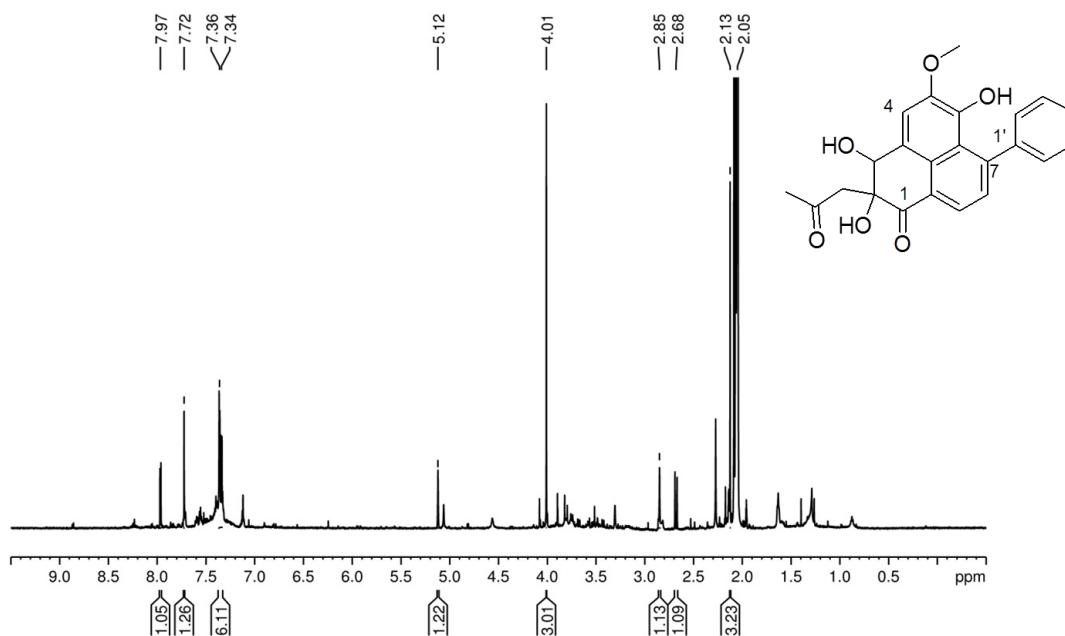


FONTE: o autor (2017)

O composto 11 também foi isolado como um pó amarelo e a sua fórmula molecular foi determinada como  $C_{23}H_{20}O_6$ , baseada no pico  $[M-H]^-$  em  $m/z$  391,1184 do espectro de HRESIMS (calc. 391,1187). Como nos espectro de RMN de  $^1H$  das substâncias 9 e 10, o espectro de RMN de  $^1H$  da substância 11 (FIGURA 16) também apresenta os sinais do anel fenil lateral ( $\delta$  7,36, 5H) e os dubletos (H-8:  $\delta$  7,34; H-9:  $\delta$  7,97), decorrentes do sistema do anel C. Os simpletos dos hidrogênios H-3 ( $\delta$  5,12), H-4 ( $\delta$  7,72), uma metoxila ( $\delta$  4,01) e os sinais da cadeia lateral acetona (H2-1'':  $\delta$  2,68 e 2,85; H3-3'':  $\delta$  2,13) completam o espectro de RMN de  $^1H$  desta substância (TABELA 2). São importantes as correlações de HMBC (FIGURA 18) dos hidrogênios H-3 e H-4 com C-9b ( $\delta$  127,2), H-3 com C-4 ( $\delta$  117,3) e H-4 com C-3 ( $\delta$  76,8), e C-4 com C-6 ( $\delta$  142,7), todos em concordância com a estrutura dos anéis A e B. Demais correlações dos sinais hidrogênios do metileno H2-1'' com C-1 ( $\delta$  199,4), C-2 ( $\delta$  80,0), e C-3 ( $\delta$  76,8) confirmam a posição da cadeia lateral acetona no C-2 e uma correlação entre o hidrogênio da metoxila com C-5 ( $\delta$  143,8) confirma a posição deste grupo. A partir destes dados, a substância 11 (TABELA 2), foi identificada como 2,3-dihidro-2,3,6-trihidroxi-5-metoxi-2-(2-oxopropil)-7-fenilfenalen-1-ona.

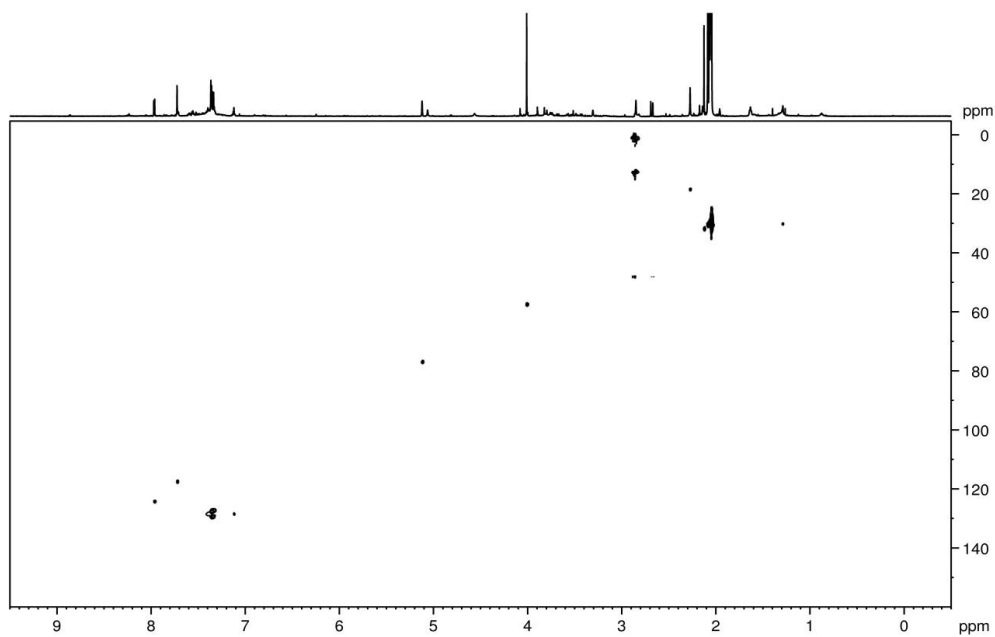


FIGURA 16 – ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  REGISTRADO PARA O COMPOSTO 11 (ACETONA- $d_6$ , 700 MHz, 20 °C).



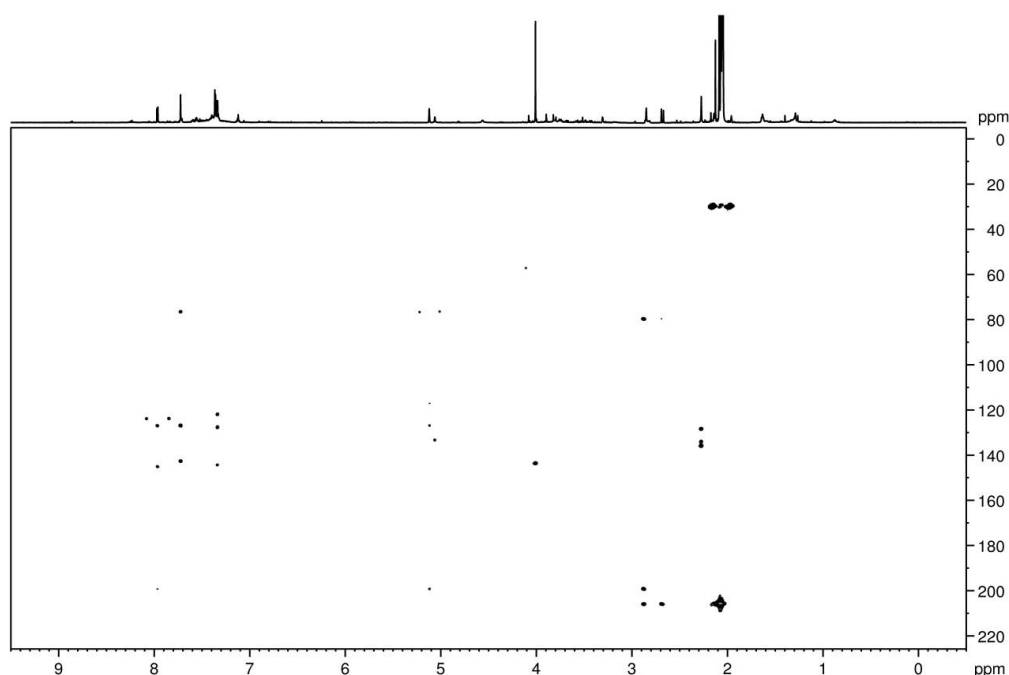
FONTE: o autor (2017)

FIGURA 17 – MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC REGISTRADO PARA O COMPOSTO 11 (ACETONA- $d_6$ , 700 MHz, 20 °C).



FONTE: o autor (2017)

FIGURA 18 – MAPA DE CORRELAÇÃO HMBC REGISTRADO PARA O COMPOSTO 11 (ACETONA- $d_6$ , 700 MHz, 20 °C).

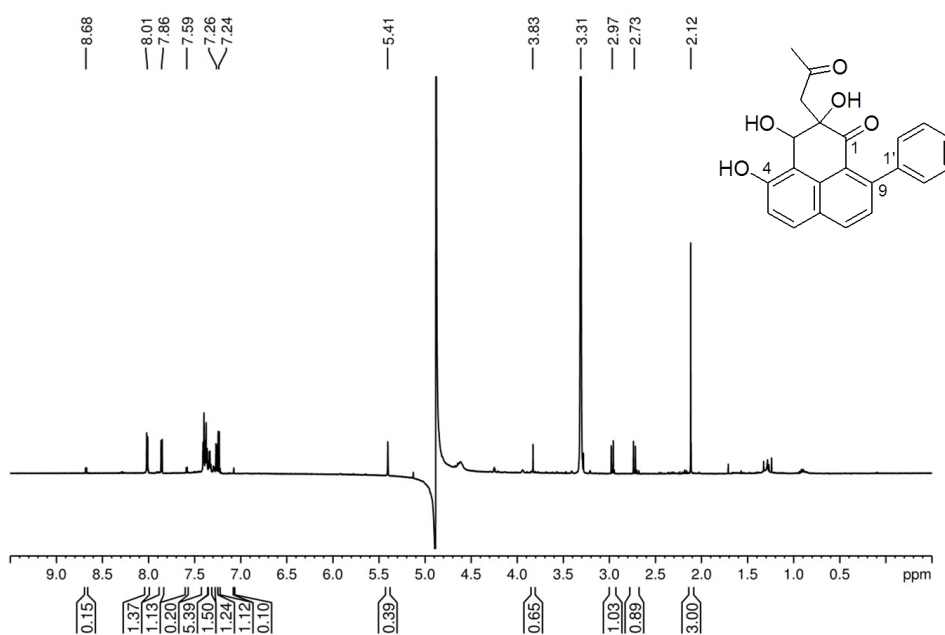


FONTE: o autor (2017)

A substância 14 (pó amarelo) teve sua fórmula determinada como  $C_{22}H_{18}O_5$  baseada no pico  $[M+H]^+$  em  $m/z$  363,1231 do espectro de HRESIMS (calc. 363,1227). O espectro de RMN de  $^1H$  (FIGURA 19), além dos sinais do anel fenil lateral (H-2' e 6':  $\delta$  7,40; H-3'e 5:  $\delta$  7,37; H-4':  $\delta$  7,33) apresentou quatro dubletos de dois sistemas de spins em  $\delta$  8,01 (H-7) acoplado com 7, 24 (H-8) e em  $\delta$  7,86 (H-6) acoplado com  $\delta$  7,26 (H-5), um simpleto em  $\delta$  5,41(H-4) e os sinais do metileno de uma cadeia lateral acetona ( $\delta$  2,97 e 2,73). As correlações observadas pelo HMBC (FIGURA 22) mostraram o hidrogênio H-6 correlacionando com C-4 ( $\delta$  156,9), C-9b ( $\delta$  133,6), e C-7 ( $\delta$  133,6) de o H-7 correlacionando com C-6 ( $\delta$  131,3), C-9b, e C-9 ( $\delta$  144,4), bem como o hidrogênio H-8 com C-6a ( $\delta$  128,4), C-9a ( $\delta$  124,3) e C-1' ( $\delta$  142,9). As correlações de HMBC do hidrogênio H-3 ( $\delta$  5,41) com C-1 ( $\delta$  201,5), C-2 ( $\delta$  80,2), C-3a ( $\delta$  115,9), C-4 ( $\delta$  157,2), C-9b, e C-1'' ( $\delta$  49,3) esclareceram a estrutura do anel A. Finalmente, as correlações de HMBC de H2-1'' com C-3'' ( $\delta$  31,9), C-1, C-2 e C-3 ( $\delta$  72,3) permitiram a confirmação da presença da cadeia lateral acetona, posicionada no carbono C-2. Portanto, a estrutura de 14 (TABELA 2)

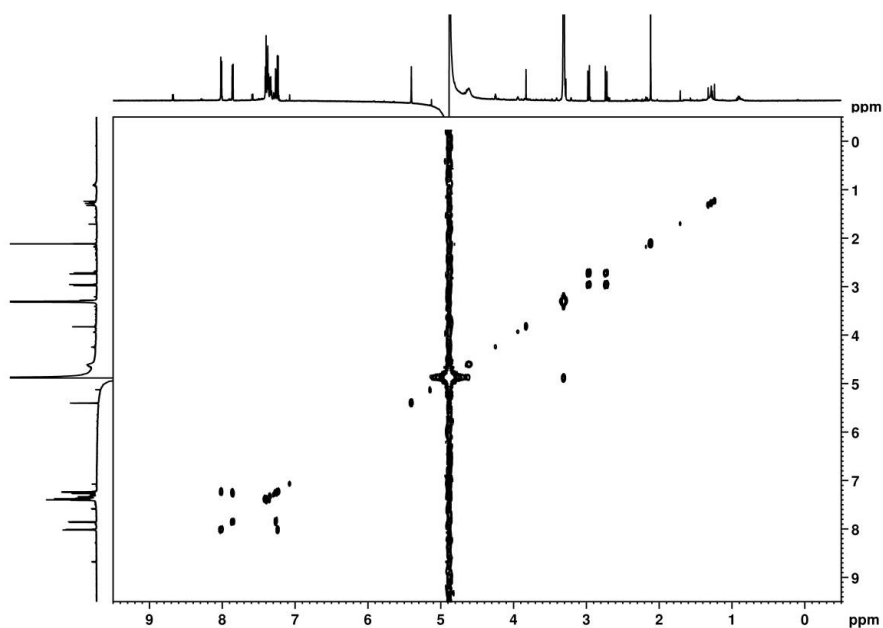
ficou confirmada como sendo 2,3-dihidro-2,3,4-trihidroxi-2-(2-oxopropil)-9-fenil-fenalen-1-ona, também uma molécula inédita na literatura.

FIGURA 19 – ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  REGISTRADO PARA O COMPOSTO 14 (ACETONA- $d_6$ , 700 MHz, 20 °C)



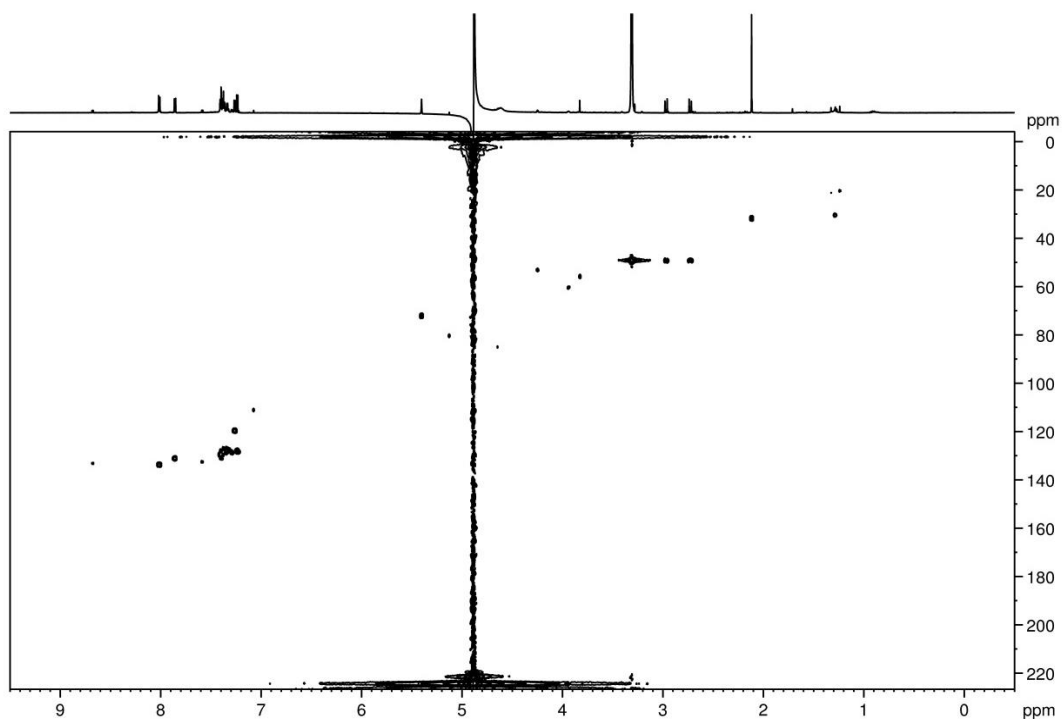
FONTE: o autor (2017)

FIGURA 20 – MAPA DE CORRELAÇÃO COSY REGISTRADO PARA O COMPOSTO 14 (ACETONA- $d_6$ , 700 MHz, 20 °C).



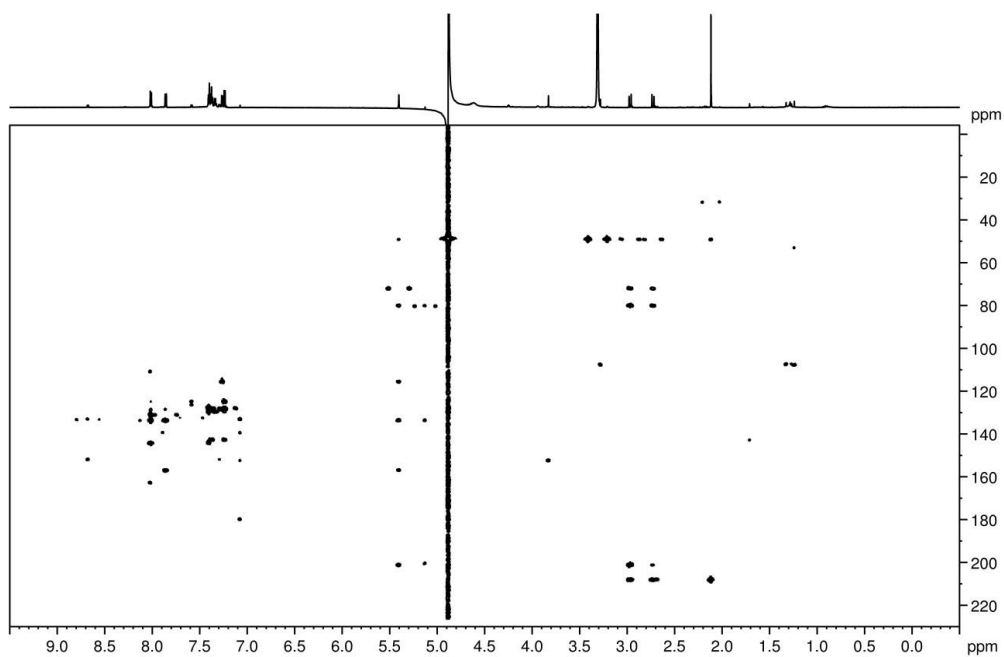
FONTE: o autor (2017)

FIGURA 21 – MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC REGISTRADO PARA O COMPOSTO 14  
(ACETONA- $d_6$ , 700 MHz, 20 °C).



FONTE: o autor (2017)

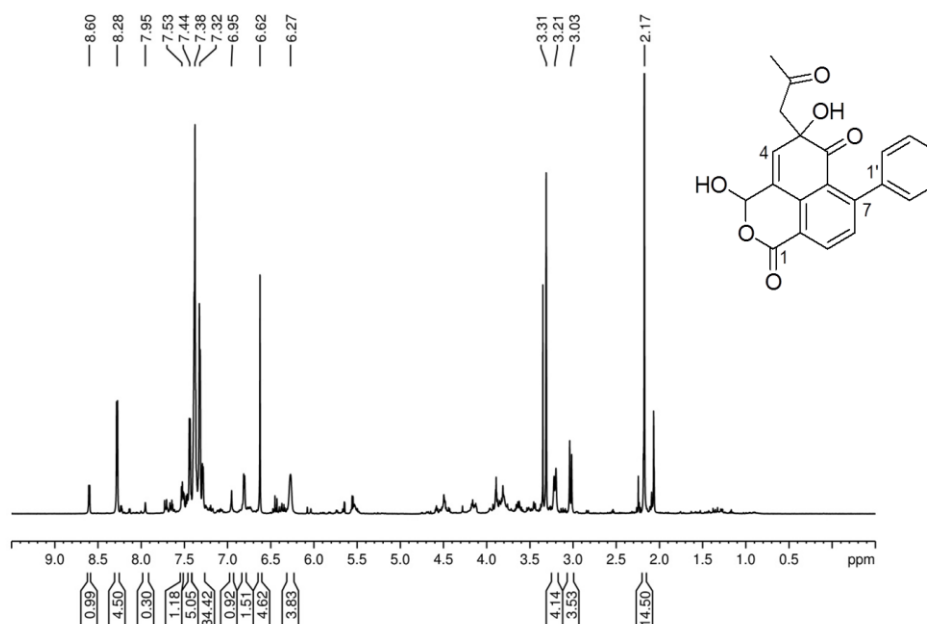
FIGURA 22 – MAPA DE CORRELAÇÃO HMBC REGISTRADO PARA O COMPOSTO 14  
(ACETONA- $d_6$ , 700 MHz, 20 °C).



FONTE: o autor (2017)

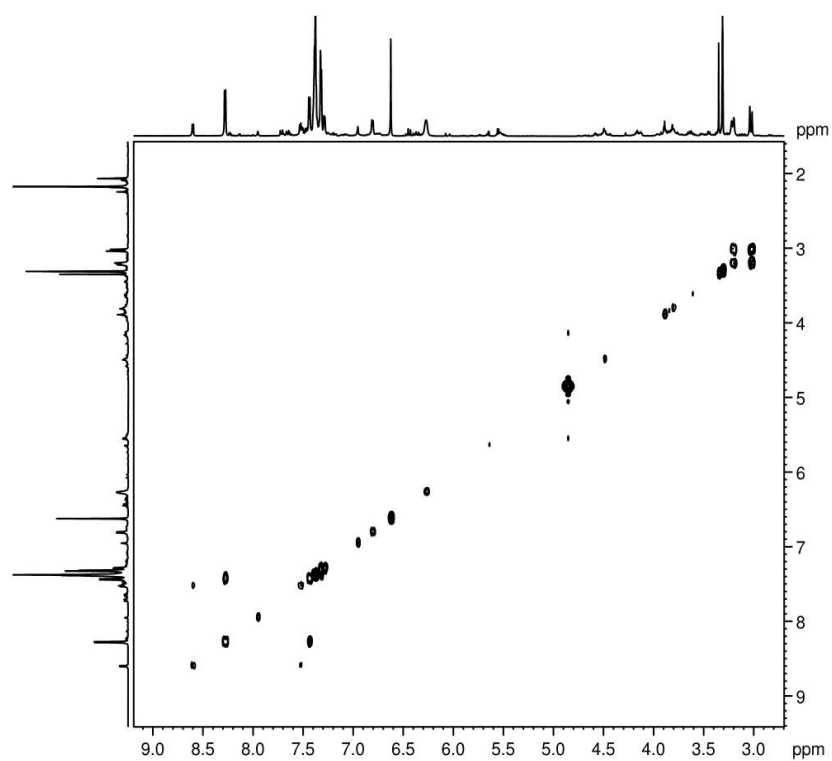
Também isolado como um pó amarelo, o composto 8 teve sua fórmula molecular determinada como  $C_{21}H_{16}O_6$  baseada no pico  $[M-H]^-$   $m/z$  363,0872 do espectro HRESIMS (calc. 363,0874). Como nas demais fenilfenalenonas, o espectro de RMN de  $^1H$  (FIGURA 23) mostrou multipletos entre  $\delta$  7,39 e  $\delta$  7,34, assinaláveis aos hidrogênios do anel fenil lateral. Ainda, apareceram os sinais característicos do sistema de spins do anel C, relativos aos hidrogênios H-8 ( $\delta$  7,46) e H-9 ( $\delta$  8,30), os simpletos dos H-3 ( $\delta$  6,29) e H-4 ( $\delta$  6,63), bem como os sinais da cadeia lateral acetoniil em  $\delta$  3,03 e  $\delta$  3,22 (H2-1''). As correlações de HMBC (FIGURA 26) de H-8 com C-1' ( $\delta$  141,4), C-6a ( $\delta$  127,4) e C-9a ( $\delta$  127,4) e de H-9 com C-7 ( $\delta$  150,6), C-9b ( $\delta$  136,7) e C-1 ( $\delta$  164,5) foram atribuídas às estruturas dos anéis C e D, incluindo a carbonila em C-1. As correlações no HMBC dos hidrogênios H-4 com C-3 ( $\delta$  96,6), C-6 ( $\delta$  201,1), e C-9b, bem como as correlações do H2-1'' com C-4 ( $\delta$  137,2), C-5 ( $\delta$  76,4), C-6 e C-2'' ( $\delta$  207,5) estabeleceram a estrutura do anel A e a ligação da cadeia lateral acetoniil ao carbono hidroxilado C-5. A partir dos dados aqui apresentados foi possível identificar o composto inédito 8 (TABELA 1) como 3,5-dihidroxi-5-(2-oxopropil)-7-fenil-3,5-dihidro-1*H*,6*H*benzo[*de*]isocromena-1,6-diona.

FIGURA 23 – ESPECTRO DE RMN DE  $^1H$  REGISTRADO PARA O COMPOSTO 8 (MeOD- $d_4$ , 700 MHz, 20 °C)



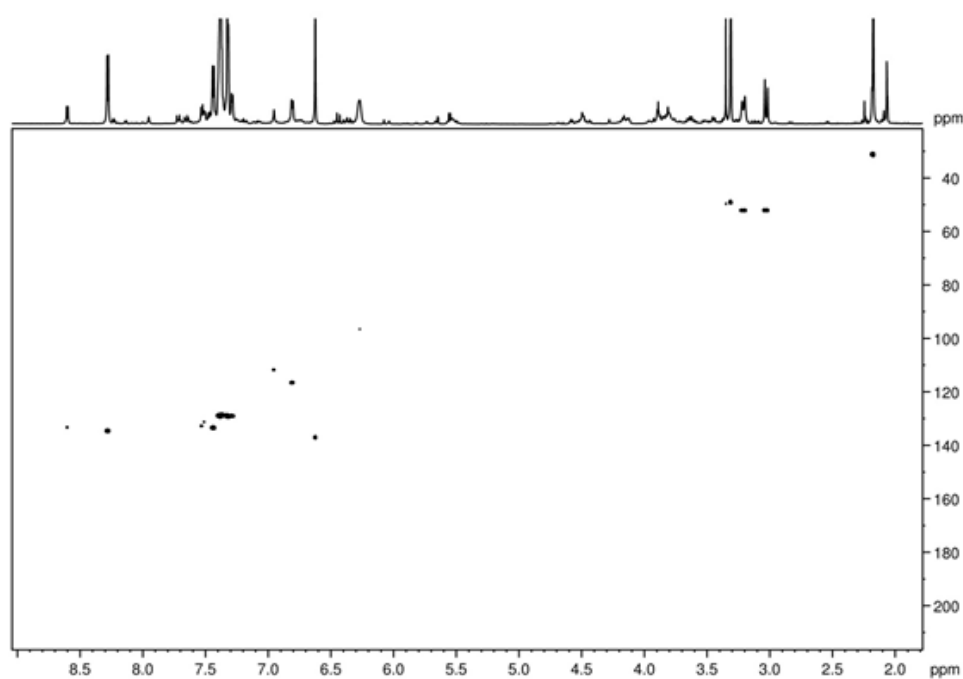
FONTE: o autor (2017)

FIGURA 24 – MAPA DE CORRELAÇÃO COSY REGISTRADO PARA O COMPOSTO 8 (MeOD- $d_4$ , 700 MHz, 20 °C).



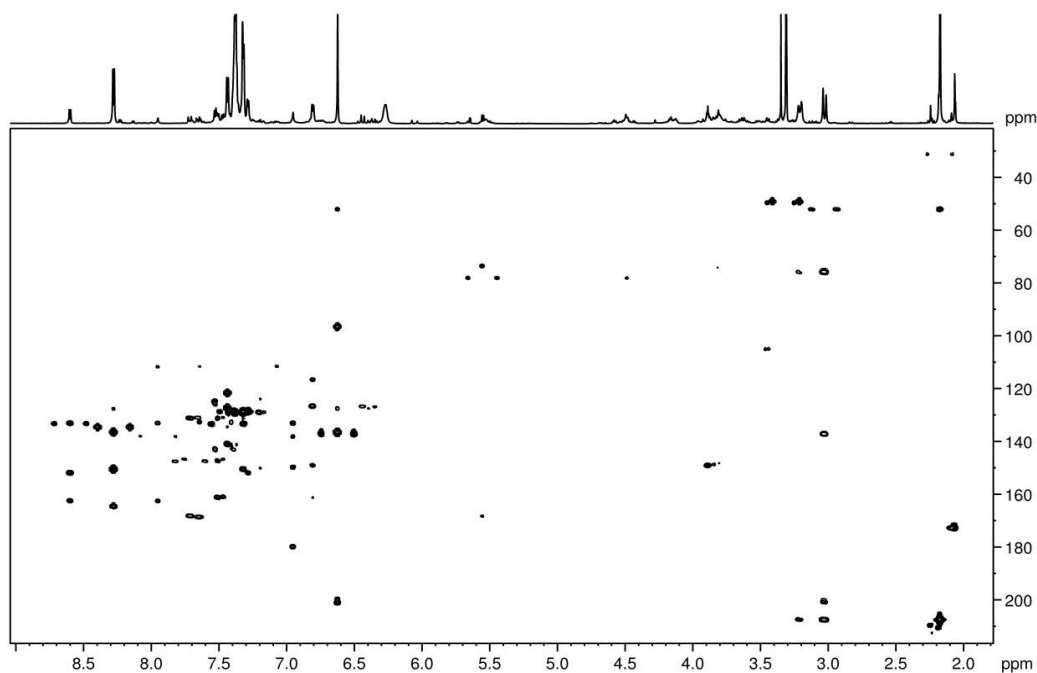
FONTE: o autor (2017)

FIGURA 25 – MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC REGISTRADO PARA O COMPOSTO 8 (MeOD- $d_4$ , 700 MHz, 20 °C)



FONTE: o autor (2017)

FIGURA 26 – MAPA DE CORRELAÇÃO HMBC REGISTRADO PARA O COMPOSTO 8 (MeOD- $d_4$ , 700 MHz, 20 °C)

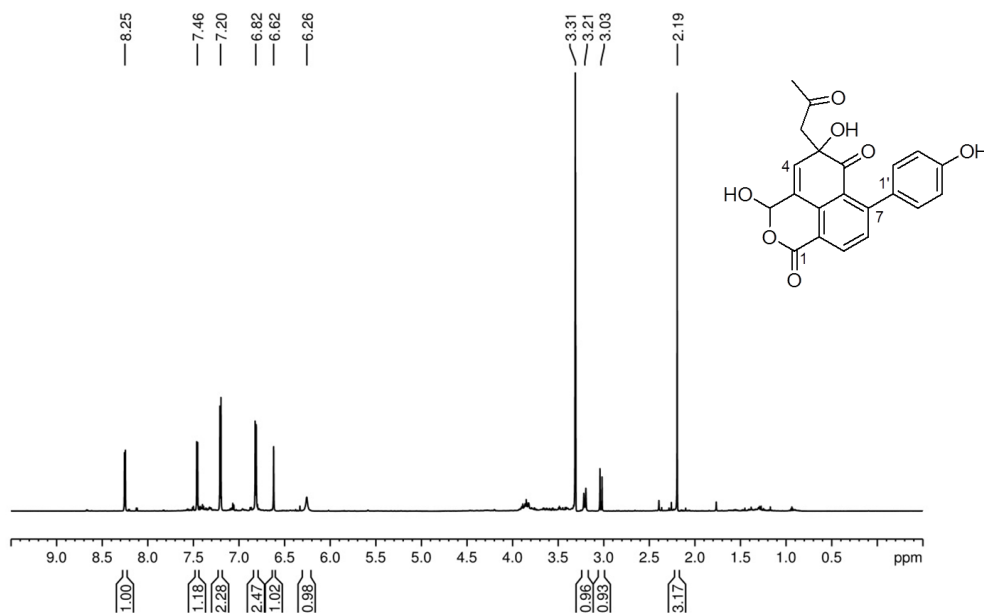


FONTE: o autor (2017)

A fórmula molecular do composto 2 (pó amarelo) foi determinada como  $C_{21}H_{16}O_7$  com base no pico  $[M-H]^-$  em  $m/z$  379,0822 do espectro de HRESIMS (calc. 379,0823). Esta massa molecular é 16 unidades maior que a do composto 8, sugerindo a presença de um átomo de oxigênio a mais. Os dados do RMN de  $^1H$  (FIGURA 27) são bastante similares ao do composto 8, com exceção dos dados do anel lateral fenil. Ao contrário dos sinais do multipletto do espectro de  $^1H$  do composto 8, que integra para 5 hidrogênios, o espectro de RMN de  $^1H$  do composto 2 mostra dois multipletos com aparência de dubleto, característico de um anel aromático *para*-substituído em  $\delta$  6,82 (2H,  $J = 8.5$  Hz, H-3' e H-5') e  $\delta$  7,20 (2H,  $J = 8.5$  Hz, H-2' e H-6'). Todos os dados do composto 2 (TABELA 1), incluindo as correlações de HMBC (FIGURA 29) estão de acordo com a estrutura do composto inédito

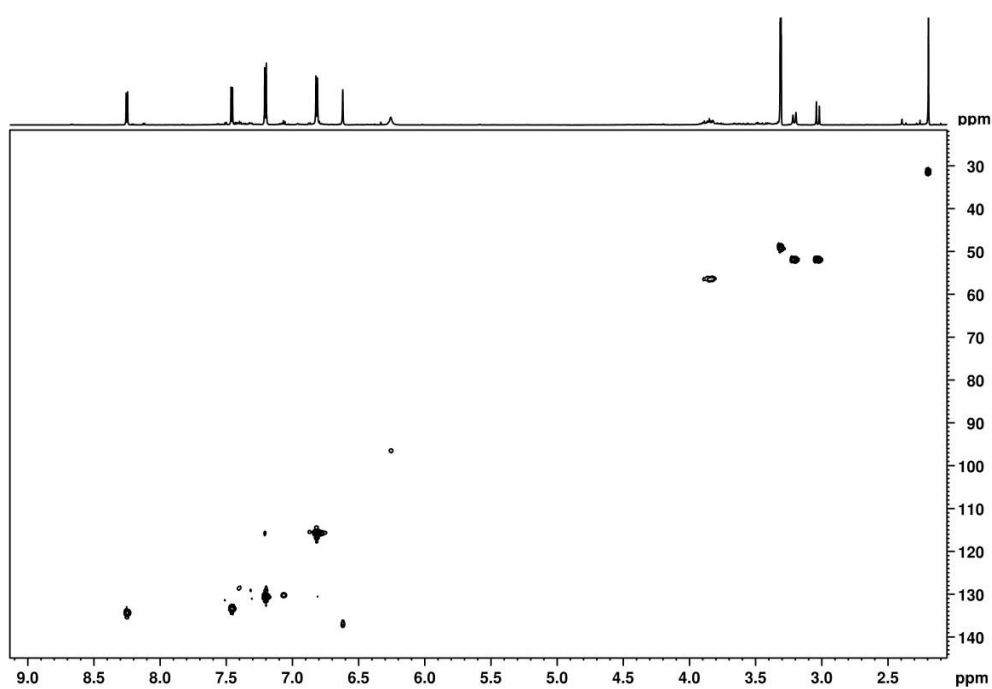
3,5-dihidroxi-7-(4-hidroxifenil)-5-(2-oxopropil)-3,5-dihidro-1*H*,6*H*benzo[*de*]isocromena-1,6-diona.

FIGURA 27 – ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  REGISTRADO PARA O COMPOSTO 2 (MeOD- $d_4$ , 700 MHz, 20 °C)



FONTE: o autor (2017)

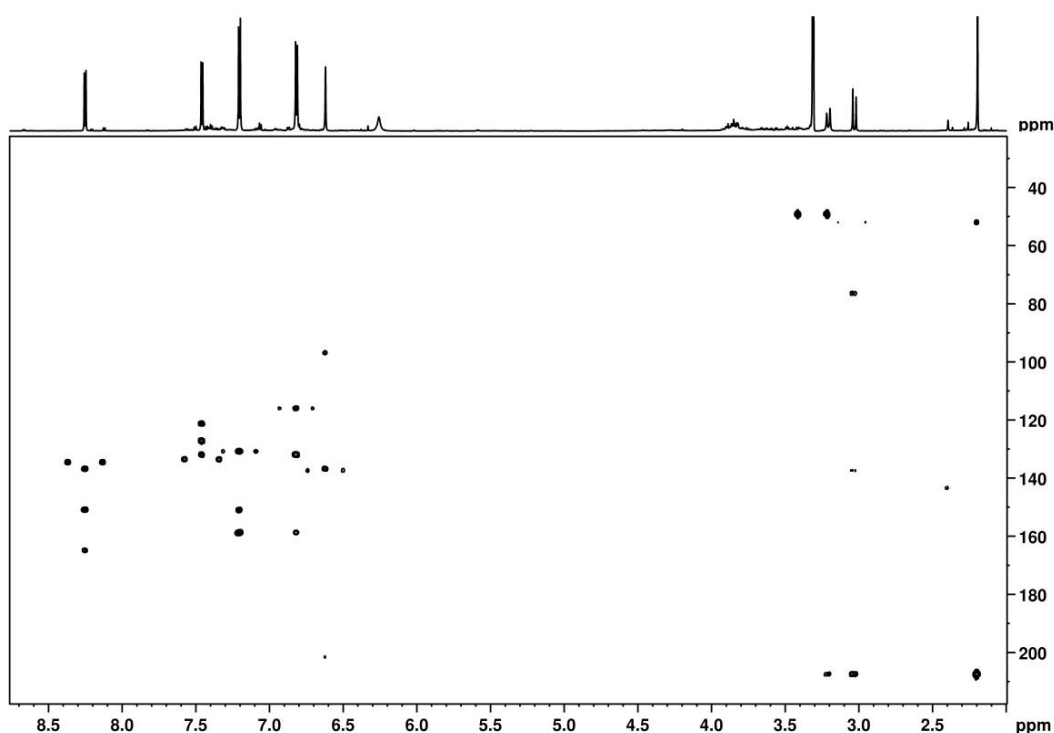
FIGURA 28 – MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC REGISTRADO PARA O COMPOSTO 2 (MeOD- $d_4$ , 700 MHz, 20 °C)



FONTE: o autor (2017)



FIGURA 29 – MAPA DE CORRELAÇÃO HMBC REGISTRADO PARA O COMPOSTO 2 (MeOD- $d_4$ , 700 MHz, 20 °C)



FONTE: o autor (2017)

Até então, na família Haemodoraceae flavonoides foram apenas reportados nas espécies *Macropidia fuliginosa* (BRKLJAČA et al., 2015) e nas flores de *Xiphidium caeruleum* (FANG; HÖLSCHER, et al., 2012). Com base nos dados obtidos da espectrometria de massa e de Ressonância Magnética Nuclear, foram identificados os seguintes flavonoides em *S. orinocensis*: luteolina (12) (TERNAI; MARKHAM, 1976; HAN et al., 2007), luteolina 7-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (3) (LI et al., 2008), luteolina 7-O- $\beta$ -D-neoesperidosídeo (4) (LI et al., 2008), luteolina 7-O-(6''-O-malonil)- $\beta$ -D-glucosídeo (6) (FEENY et al., 1988) e apigenina 7-O- $\beta$ -D-neoesperidosídeo (5) (YADAV et al., 2009).

A substância mais hidrofílica detectada neste estudo em *S. orinocensis* foi o composto 1, isolado como um pó branco amorfo. A fórmula molecular determinada foi  $C_{18}H_{24}O_{13}$ , com base no pico  $[M-H]^-$  em  $m/z$  447,1140 no espectro de HRESIMS (calc. 447.1144). Os espectros de RMN de  $^1H$ , HSQC e HMBC sugeriram que a estrutura de 1 fosse similar a da substância glicerol 1-O- $\alpha$ -glucuronídeo 3-O-benzoil éster, um composto já isolado de *Guettarda speciosa* (CAI et al., 2011). Entretanto,

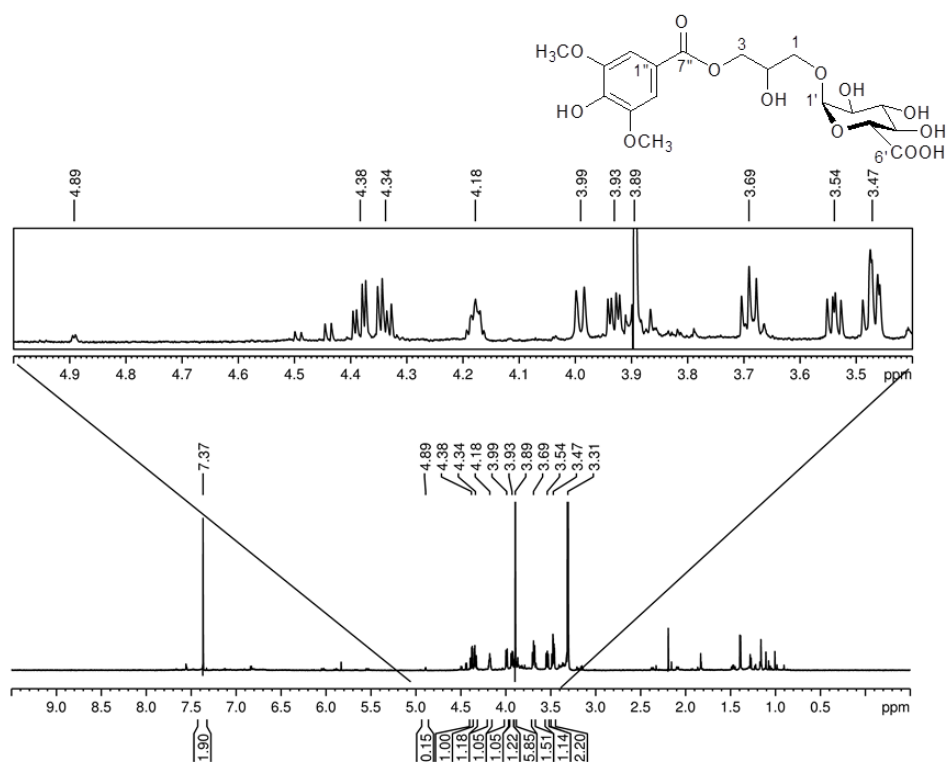
ao invés de sinais relativos à um anel fenil observados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de *G. speciosa*, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto 1 (FIGURA 30) apresentou simpletos em  $\delta$  7,37 correlacionando com um carbono em  $\delta$  108,0 na região aromática e um outro simpleto em  $\delta$  3,89 correlacionando com um carbono em  $\delta$  56,6. O simpleto em  $\delta$  7,37 é relativo a dois hidrogênios, sugerindo um anel aromático simétrico e tetrassubstituído. Do mesmo modo, o sinal da metoxila em  $\delta$  3,89 representa seis hidrogênios. As correlações de HMBC (FIGURA 32) do hidrogênio em  $\delta$  7,37 com os carbonos C-2'' e 6'' ( $\delta$  108,0), C-4'' ( $\delta$  141,8), e C-7'' ( $\delta$  167,8) e do hidrogênio em  $\delta$  3,89 com C-3'' e 5'' ( $\delta$  148,6), possibilitaram determinar a estrutura deste substituinte. A sequência de pulsos utilizada (ZGPURGE) resultou em uma supressão eficiente do sinal da água, entretanto também suprimiu parcialmente o sinal do hidrogênio H-1'. A (FIGURA 30) apresenta uma inserção de uma parte de um espectro do mesmo composto adquirido sem a supressão do sinal do solvente, mostrando o hidrogênio H-1' em  $\delta$  4,89. A partir destes dados, o composto 1 (TABELA 3) foi determinado como sendo 1- $\alpha$ -D-glucuronil-3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoil glicerol, um produto natural inédito na literatura.

TABELA 3 – DADOS DE RMN de  $^1\text{H}$  (700 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (175 MHz) DO COMPOSTO 1 MeOD- $d_4$

| Posição                  | $\delta_{\text{H}}$ , mult. (J in Hz) | $\delta_{\text{C}}$ , mult. | HMBC               |
|--------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|--------------------|
| 1a                       | 3,93, dd (10,3, 4,3)                  | 70,4, CH <sub>2</sub>       | 3, 1'              |
| 1b                       | 3,54, dd (10,3, 7,0)                  |                             | 2, 3, 1'           |
| 2                        | 4,18, m                               | 69,6, CH                    | 1                  |
| 3a                       | 4,38, (11,4, 4,5)                     | 66,4, CH <sub>2</sub>       | 1                  |
| 3b                       | 4,34, (11,4, 5,7)                     |                             | 2, 7''             |
| 1'                       | 4,89, d (4,3)                         | 100,5, CH                   | 1, 3', 5'          |
| 2'                       | 3,47, sobreposição                    | 73,5, CH                    | 3'                 |
| 3'                       | 3,69, dd (9,5, 9,0)                   | 74,6, CH                    | 2', 4'             |
| 4'                       | 3,47, sobreposição                    | 73,5, CH                    | 3', 5', 6'         |
| 5'                       | 3,98, d (9,9)                         | 72,2, CH                    | 4'                 |
| 6'                       |                                       | 174,8, C                    |                    |
| 1''                      |                                       | 121,0, C                    |                    |
| 2'' e 6''                | 7,37, s                               | 108,0, CH                   | 1'', 3'', 4'', 6'' |
| 3'' e 5''                |                                       | 148,6, C                    |                    |
| 4''                      |                                       | 141,8, C                    |                    |
| 7''                      |                                       | 167,8, C                    |                    |
| 3''/5''-OCH <sub>3</sub> | 3,89, s                               | 56,6, CH <sub>3</sub>       | 3'', 5''           |

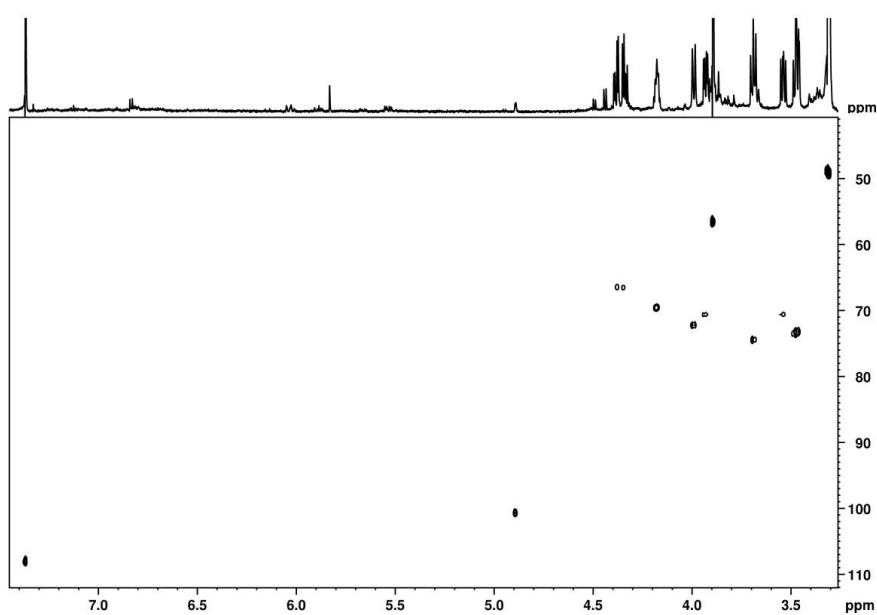
FONTE: o autor (2017)

FIGURA 30 – ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  REGISTRADO PARA O COMPOSTO 1 (MeOD- $d_4$ , 700 MHz, 20 °C)



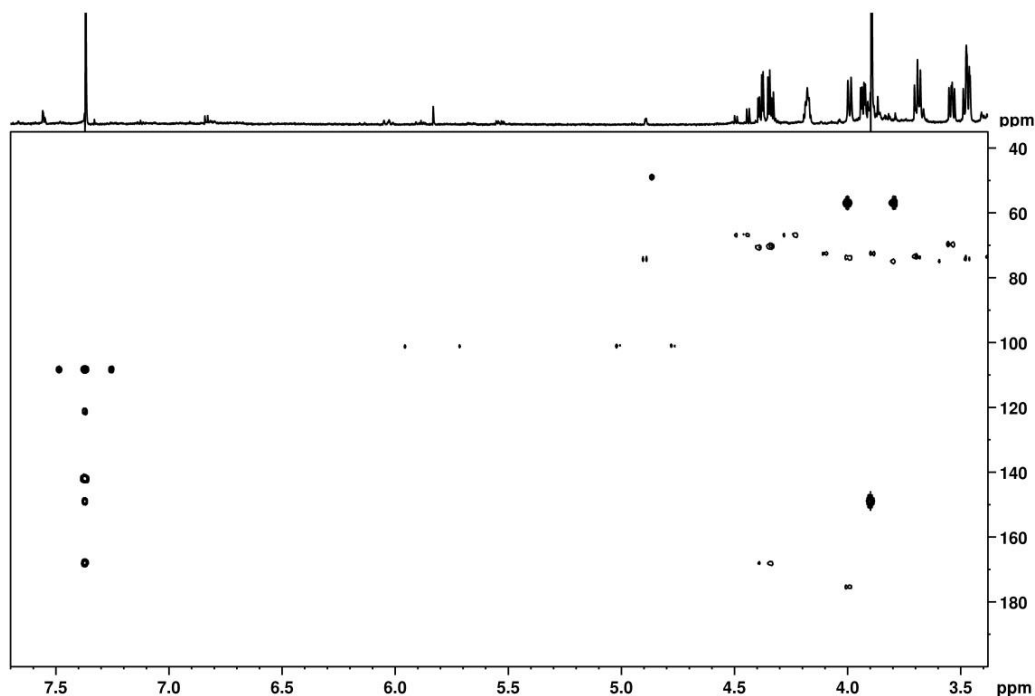
FONTE: o autor (2017)

FIGURA 31 – MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC REGISTRADO PARA O COMPOSTO 1 (MeOD- $d_4$ , 700 MHz, 20 °C)



FONTE: o autor (2017)

FIGURA 32 – MAPA DE CORRELAÇÃO HMBC REGISTRADO PARA O COMPOSTO 1 (MeOD- $d_4$ , 700 MHz, 20 °C)



FONTE: o autor (2017)

### 3.1.1 Avaliação tecido-específica de ocorrência dos metabólitos

Estudos preliminares revelaram os órgãos e até a especificidade celular de ocorrência das fenilfenalenonas. (OPITZ; SCHNEIDER, 2002; OPITZ et al., 2003; SCHNEIDER; HÖLSCHER, 2007; FANG; KAI, et al., 2012; CHEN et al., 2016). O perfil cromatográfico das diferentes partes de *S. orinocensis* (FIGURA 9A) confirmou parcialmente as investigações prévias. Como em *X. caeruleum*, as fenilbenzoisocromenonas (oxa-fenilfenalenonas) foram detectadas em partes das plantas que crescem sobre e sob a terra (QUADRO 4). A fenilbenzoisocromenona 15 é um composto majoritário em todos os tecidos de *S. orinocensis*, exceto nas folhas, onde se apresenta como um composto minoritário. Já os alcaloides fenilbenzoisoquinolinônicos (aza-fenilfenalenonas), que se acumulam nas flores de *Lachnanthes tinctoria* (BAZAN; EDWARDS, 1976) e de *X. caeruleum* (CHEN et al., 2016) foram encontrados na maioria das partes de *S. orinocensis*.

Os flavonoides, geralmente raros em Haemodoraceae, se acumulam especificamente nas flores de *X. caeruleum*. (FANG; HÖLSCHER, et al., 2012). Diferentemente daquele achado, os glicosídeos flavônicos foram encontrados principalmente nas folhas de *S. orinocensis*, sendo que apenas a aglicona luteolina foi encontrada nas demais partes da planta (QUADRO 4).

QUADRO 4 – DISTRIBUIÇÃO DAS FENILFENALENONS PELOS DIFERENTES TECIDOS DE *S. orinocensis*

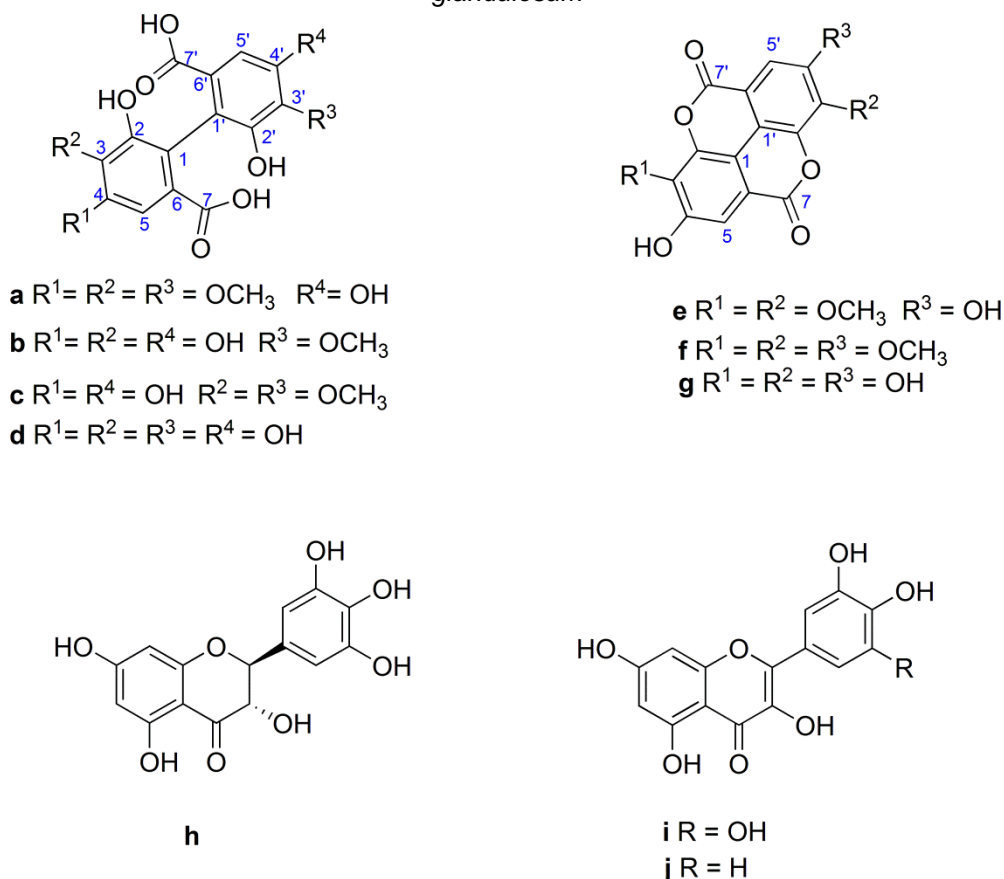
| Substância |                           | Tecido  |       |        |        |        |
|------------|---------------------------|---------|-------|--------|--------|--------|
| Nº.        | Tipo                      | Rizomas | Caule | Folhas | Flores | Frutas |
| 19         | Fenilfenalenona           |         |       |        |        | x      |
| 15         | Oxa-fenilfenalenona       | x       | x     | x      | x      | x      |
| 16         | Oxa-fenilfenalenona       | x       | x     | x      | x      |        |
| 17         | Oxa-fenilfenalenona       | x       | x     |        | x      | x      |
| 18         | Oxa-fenilfenalenona       | x       | x     |        | x      | x      |
| 10         | Oxa-fenilfenalenona       | x       |       |        |        |        |
| 7          | Aza- fenilfenalenona      | x       | x     | x      | x      | x      |
| 13         | Aza- fenilfenalenona      |         | x     | x      | x      | x      |
| 2          | Acetonil- fenilfenalenona | x       | x     |        | x      |        |
| 8          | Acetonil- fenilfenalenona |         |       | x      |        |        |
| 9          | Acetonil- fenilfenalenona | x       |       |        |        |        |
| 11         | Acetonil- fenilfenalenona | x       | x     |        | x      |        |
| 14         | Acetonil- fenilfenalenona |         |       |        |        | x      |
| 3          | Flavonoide                |         |       | x      |        |        |
| 4          | Flavonoide                |         |       | x      |        |        |
| 5          | Flavonoide                |         |       | x      |        |        |
| 6          | Flavonoide                |         |       | x      |        |        |
| 12         | Flavonoide                |         | x     | x      | x      | x      |
| 1          | Derivativo do glicerol    | x       | x     | x      |        |        |

FONTE: o autor (2017)

### 3.2 SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Sapium glandulosum*

Foram identificados dez compostos em *S. glandulosum*, conforme mostra a FIGURA 33. Três destes compostos, 'a', 'b' e 'c', são inéditos na literatura, enquanto que os demais sete foram previamente reportados.

FIGURA 33 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS EM *Sapium glandulosum*



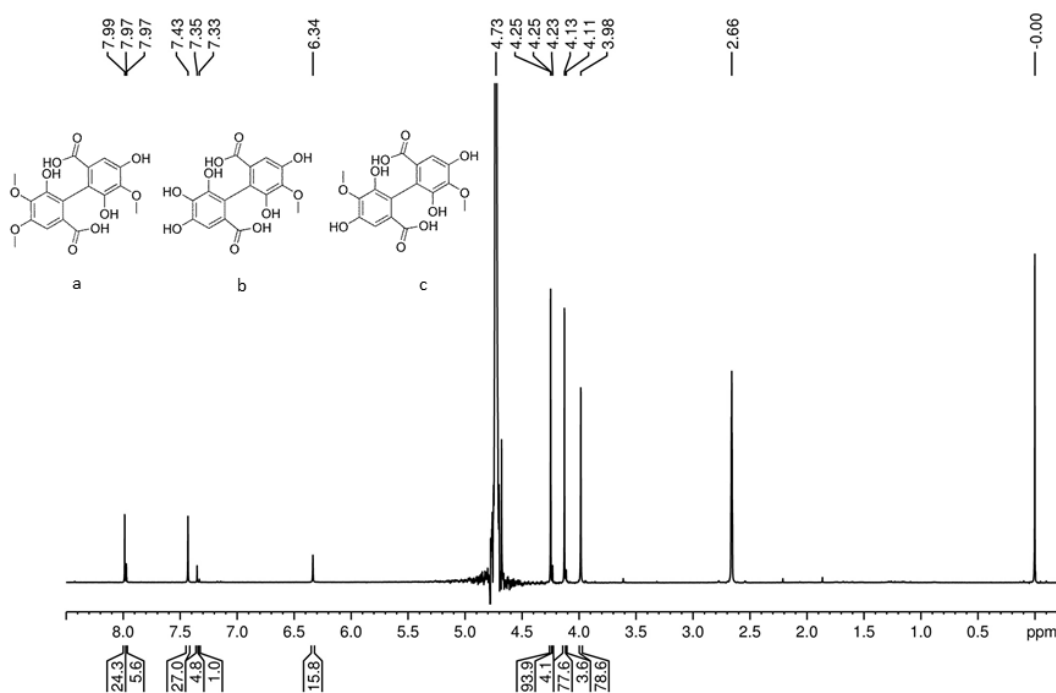
FONTE: o autor (2017)

A amostra denominada FOCAM1 (GRÁFICO 3, p. 100) foi obtida, após a lavagem com água do resíduo da filtragem do extrato bruto da casca. Houve a precipitação de aproximadamente 120 mg de um pó branco. As substâncias 'a', 'b' e 'c' que foram identificadas em mistura, parecem ser estruturas inéditas na literatura, de acordo com a avaliação dos dados de RMN. Entretanto, para a confirmação das estruturas é necessário espectro de massas de alta resolução.

O espectro de RMN de  $^1H$  (FIGURA 34) mostrou a presença de três conjuntos de dois simples de diferentes intensidades na região de aromáticos. São

eles  $\delta$  7,43 e  $\delta$  7,99,  $\delta$  7,35 e  $\delta$  7,97 e  $\delta$  7,33 e  $\delta$  7,97. A diferença entre as intensidades dos sinais indica que se trata de hidrogênios aromáticos de diferentes moléculas. De acordo com o cálculo das integrais, pode-se observar que a proporção entre as moléculas da mistura é de 27:5:1. Há em  $\delta$  3,98,  $\delta$  4,13 e  $\delta$  4,25 três simpletos com integrais proporcionais a três hidrogênios cada, que indicam a presença de três metoxilas na molécula em maior quantidade. Há também em  $\delta$  4,25, um sinal sobreposto à metoxila da molécula maior. De acordo com o valor da integral obtida, pode-se concluir que esta metoxila pertence à molécula em quantidade intermediária. Já a molécula em menor quantidade, apresenta duas metoxilas, em  $\delta$  4,11 e  $\delta$  4,23. Os demais sinais do espectro são relativos a artefatos, solventes (água e DMSO) e ao padrão interno TMSP.

FIGURA 34 – ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  REGISTRADO PARA OS COMPOSTOS a, b e c (D<sub>2</sub>O+GOTAS DMSO-*d*<sub>4</sub>, 600 MHz, 20 °C)

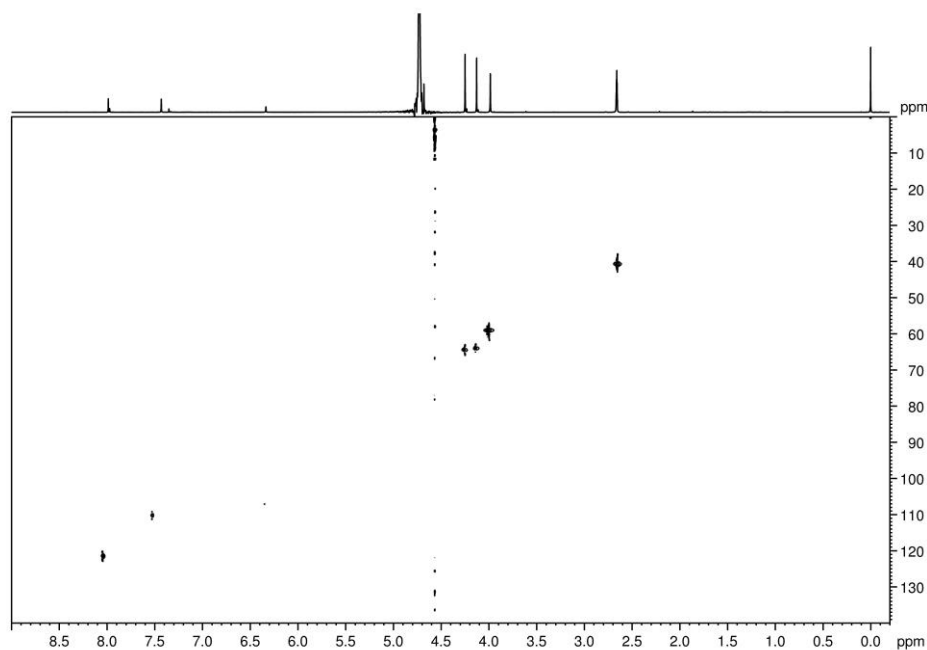


FONTE: o autor (2017)

O mapa de correlação HSQC (FIGURA 35), que indica as correlações diretas entre hidrogênios e carbonos, indica correlação apenas para a molécula em maior abundância e não detectou sinais para as outras duas moléculas. O

hidrogênio em  $\delta$  7,43 correlaciona com o carbono em  $\delta$  110,0 e o hidrogênio em  $\delta$  7,99 correlaciona com carbono em  $\delta$  121,5. As metoxilas em  $\delta$  3,98,  $\delta$  4,13 e em  $\delta$  4,25 estão conectadas aos carbonos em  $\delta$  59,0,  $\delta$  64,0 e  $\delta$  64,3.

FIGURA 35 – MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC REGISTRADO PARA OS COMPOSTOS a, b e c  
(D<sub>2</sub>O+GOTAS DMSO-d<sub>4</sub>, 600 MHz, 20 °C)



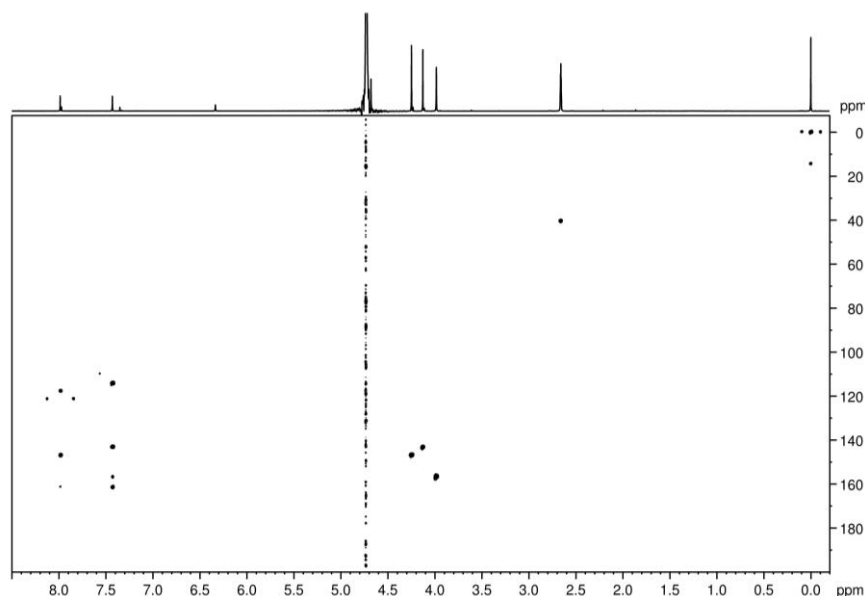
FONTE: o autor (2017)

A correlação a longa distância entre hidrogenios e carbonos, dada pelo experimento HMBC (FIGURA 36) também apareceu apenas para a molécula mais abundante. O <sup>1</sup>H em  $\delta$  7,43 correlaciona com os carbonos em  $\delta$  114,4 (C-1),  $\delta$  143,1 (C-3),  $\delta$  156,9 (C-4) e  $\delta$  161,5 (C-7). Do mesmo modo, o hidrogênio em  $\delta$  7,99 correlaciona com os carbonos em  $\delta$  117,7(C-1'),  $\delta$  146,9(C-3'),  $\delta$  112,8(C-6') e  $\delta$  161,2 (C-7'). As metoxilas em  $\delta$  3,98,  $\delta$  4,13 e em  $\delta$  4,25 correlacionam com os carbonos em  $\delta$  156,9 (C-4),  $\delta$  143,1 (C-3) e  $\delta$  146,9(C-3').

As fórmulas moleculares ainda precisam ser determinadas com base no espectro de HRESIMS. A partir destes dados, os compostos (TABELA 4) foram determinados como sendo ácido-3,4,3'-Tri-O-metil-2,2',4'-trihidroxi-difênico (a), 3'-O-metil-2,3,4,2',4'-Pentahidroxi-difênico (b) e 3,3'-Di-O-metil-2,4,2',4'-tetrahidroxi-difênico (c), os três produtos naturais inéditos na literatura.



FIGURA 36 – MAPA DE CORRELAÇÃO HMBC REGISTRADO PARA OS COMPOSTOS a, b e c  
(D<sub>2</sub>O+GOTAS DMSO-*d*<sub>4</sub>, 600 MHz, 20 °C)



FONTE: o autor (2017)

TABELA 4 – DADOS DE RMN de <sup>1</sup>H (600 MHz) e <sup>13</sup>C (150 MHz) DOS COMPOSTOS a, b e c

| Posição             | a (D <sub>2</sub> O+gotas DMSO- <i>d</i> <sub>4</sub> ) |                       |                | b (D <sub>2</sub> O+gotas DMSO- <i>d</i> <sub>4</sub> ) |                    | c (D <sub>2</sub> O+gotas DMSO- <i>d</i> <sub>4</sub> ) |                    |
|---------------------|---|-----------------------|----------------|---|--------------------|---|--------------------|
|                     | $\delta_H$ , mult.<br>(J em Hz)                         | $\delta_C$ , mult.    | HMBC           | $\delta_H$ , mult<br>(J em Hz)                          | $\delta_C$ , mult. | $\delta_H$ , mult<br>(J em Hz)                          | $\delta_C$ , mult. |
| 1                   |   | 114,4, C              |                |   | n.d                |   | n.d                |
| 2                   |   | n.d                   |                |   | n.d                |   | n.d                |
| 3                   |   | 143,1, C              |                |   | n.d                |   | n.d                |
| 4                   |   | 156,9, C              |                |   | n.d                |   | n.d                |
| 5                   | 7,43 s  | 110,0, CH             | 1, 3, 4, 7     | 7,35 s  | n.d                | 7,33 s  | n.d                |
| 6                   |   | n.d                   |                |   | n.d                |   | n.d                |
| 7                   |   | 161,5, C              |                |   | n.d                |   | n.d                |
| 3-OCH <sub>3</sub>  | 4,13 s  | 64,0, CH <sub>3</sub> | 3              |   | n.d                | 4,11 s  | n.d                |
| 4-OCH <sub>3</sub>  | 3,98 s  | 59,0, CH <sub>3</sub> | 4              |   | n.d                |   | n.d                |
| 1'                  |   | 117,7, C              |                |   | n.d                |   | n.d                |
| 2'                  |   | n.d                   |                |   | n.d                |   | n.d                |
| 3'                  |   | 146,9, C              |                |   | n.d                |   | n.d                |
| 4'                  |   | n.d                   |                |   | n.d                |   | n.d                |
| 5'                  | 7,99 s  | 121,5, CH             | 1', 3', 4', 7' | 7,97 s  | n.d                | 7,97 s  | n.d                |
| 6'                  |   | 112,8, C              |                |   | n.d                |   | n.d                |
| 7'                  |   | 161,2, C              |                |   | n.d                |   | n.d                |
| 3'-OCH <sub>3</sub> | 4,25 s  | 64,3, CH <sub>3</sub> | 3'             | 4,25 s  | n.d                | 4,23 s  | n.d                |

<sup>a</sup> Sinais sobrepostos no espectro de HSQC <sup>b</sup> Sinais sobrepostos com contaminantes <sup>n.d.</sup>: não detectado por HMBC.

FONTE: o autor (2017)

A amostra denominada FOCAM2 (GRÁFICO 3, p. 100) foi obtida após a realização da coluna cromatográfica da fração clorofórmio das folhas, os frascos 17

a 45 eluídos da coluna foram reunidos com metanol. Ocorreu a precipitação de aproximadamente 22 mg do composto. O precipitado foi separado por centrifugação e dados de RMN foram obtidos. Desta amostra foram identificados a substância 'e' e 'a', na proporção de 4:1, respectivamente, de acordo com o cálculo das integrais do espectro de RMN  $^1\text{H}$ .

A amostra FOCAM5 (GRÁFICO 3, p. 100) foi obtida da união dos frascos 13 a 26 em que, após a adição de uma solução de metanol e água (70:30, v/v), ocorreu a precipitação de aproximadamente 23 mg. (OCAMPOS, 2013). Os dados de RMN deste precipitado indicaram a presença de uma mistura de 'd', 'g' e 'e', na proporção de 8:5:1, respectivamente, de acordo com as integrais calculadas pelo espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .

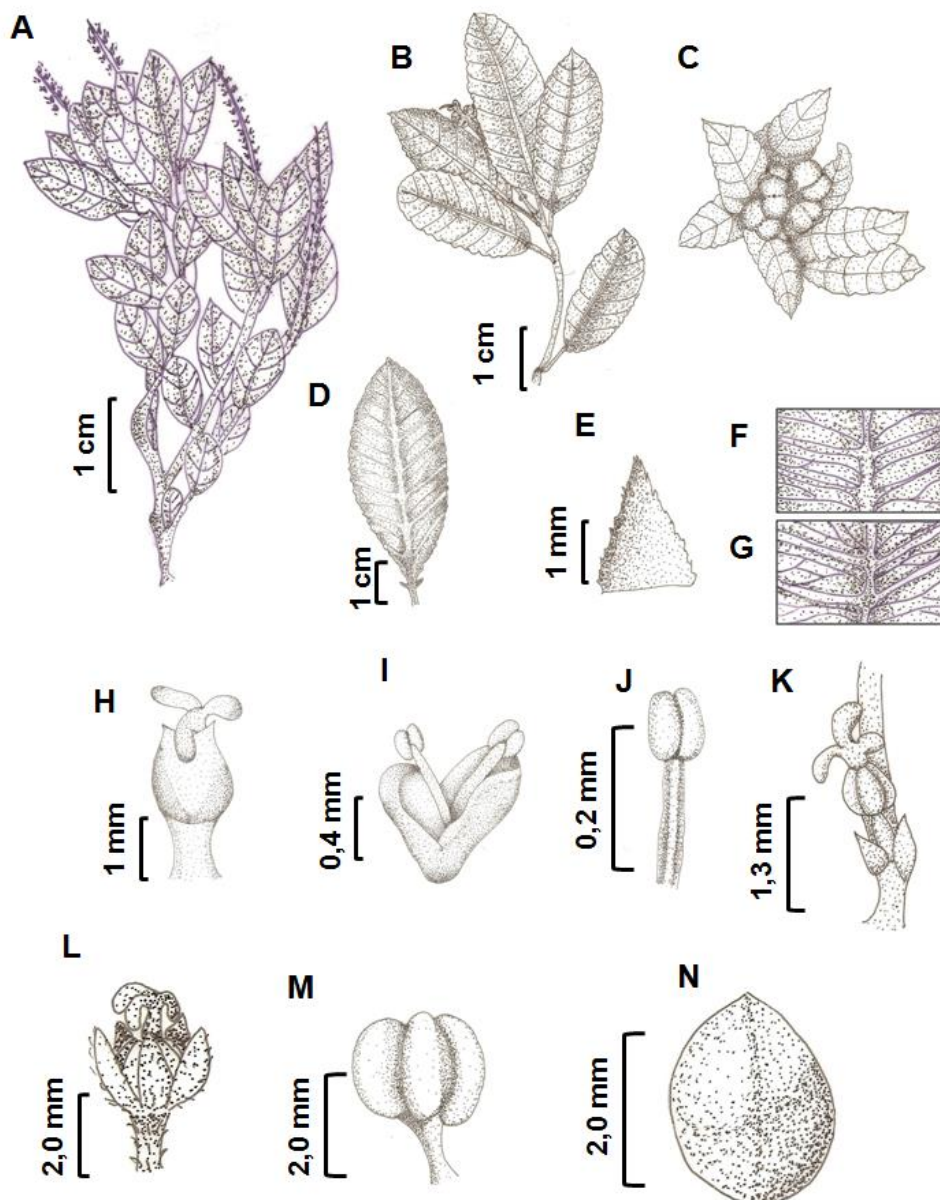
A substância 'g' foi identificada como sendo o ácido elágico. (LI et al., 1999). A substância 'e' foi identificada como sendo o 3,3'-Di-O-metil ácido elágico (DA SILVA et al., 2008), enquanto que a substância 3,4,3'-Tri-O-metil ácido elágico (f) apresentou uma metoxila a mais na posição 4 do esqueleto central do ácido elágico. (BINDRA et al., 1988; KHAC et al., 1990). O composto 'd' foi identificado como ácido hexahidroxidifênico. (SCHMIDT et al., 1952; SCHMIDT et al., 1954).

Foram ainda identificados três flavonoides a partir do extrato acetato de etila das folhas de *S. glandulosum*: ampelopsina, também conhecido como dihidromiricetina, (h) (MILLER; BOHM, 1979), miricetina (i) (HE et al., 2009) e canferol (j) (NAPOLITANO et al., 2012).

## 3.3 ESTUDO MORFOANATÔMICO

A FIGURA 37 representa a morfologia macroscópica de *S. glandulosum*.

FIGURA 37 – PRANCHA ILUSTRATIVA DE *Sapium glandulosum*



*Sapium glandulosum*. A- Vista geral, B- Ramo com inflorescência, C- Ramo com frutos, D- Folha, E- Estípula, F- Nervuras da folha, face abaxial, G- Nervuras da folha, face adaxial, H- Flor pistilada, I- Flor estaminada, J- Estame, K- Ramo com fruto, L, M- Fruto, N- Semente.

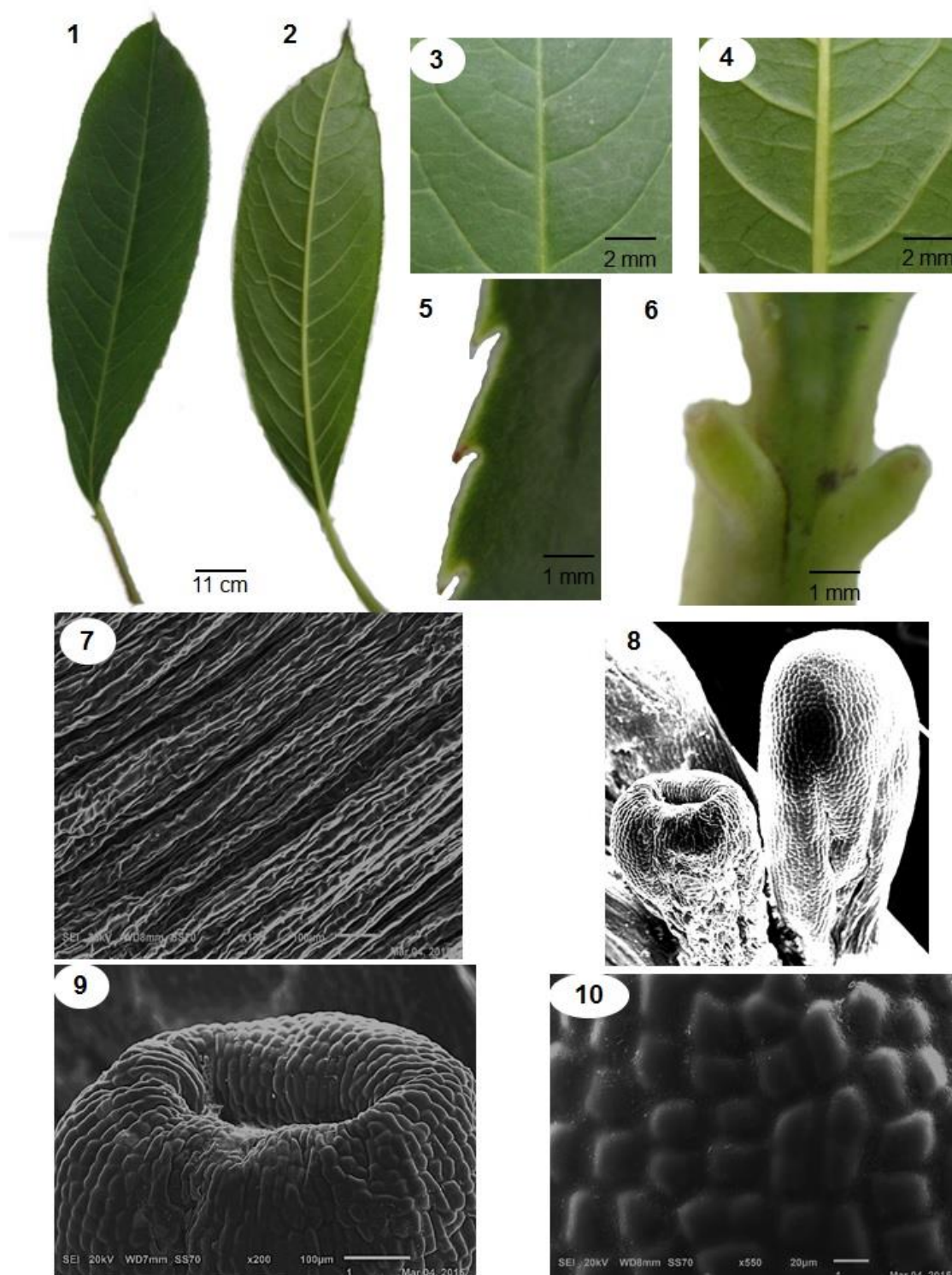
FONTE: o autor (2017)

As folhas são alternadas, simples, com margens serradas, ápice agudo e base atenuada, com margem serrada (FIGURA 38, IMAGENS 1, 2 e 5). A coloração é verde escura em ambas as superfícies, sendo a face adaxial brilhante e a abaxial opaca (FIGURA 38, IMAGENS 3 e 4). O tamanho médio das folhas é de 11 cm x 5 cm, com pecíolos longos, de aproximadamente 2 cm de comprimento (FIGURA 38, IMAGENS 1 e 2). A nervação é classificada como reticulada, apresentando uma nervura principal, com nervuras secundárias que não terminam nas margens e algumas formam arcos com as terminações das nervuras vizinhas (FIGURA 38, IMAGENS 1 e 2). Em vista frontal, em microscopia eletrônica de varredura (MEV), o pecíolo possui epiderme plissada e de aspecto irregular (FIGURA 38, IMAGEM 7). Possui um par de glândulas no ápice do pecíolo, (próximo à base da lâmina foliar) com formato subcônico e apresentam um orifício no ápice (FIGURA 38, IMAGENS 6 e 8). A epiderme das glândulas é ondulada e apresenta cutícula lisa (FIGURA 38, IMAGEM 10).

A lâmina foliar, em vista frontal, possui uma epiderme sinuosa na superfície adaxial (FIGURA 39, IMAGENS 11 e 12), e epiderme rugosa na superfície abaxial (FIGURA 39, IMAGENS 13 e 14) que são revestidas por uma cutícula lisa. Esta mesma lâmina é hipoestomática, e os estômatos encontram-se na face abaxial, e as células guardas são circundadas por duas células subsidiárias desiguais, paralelas ao ostíolo, o que caracteriza o tipo paracítico. Ambas as faces são constituídas por apenas um estrato de células irregulares, justapostas, com paredes sinuosas (FIGURA 39, IMAGENS 13, 14 e 15).

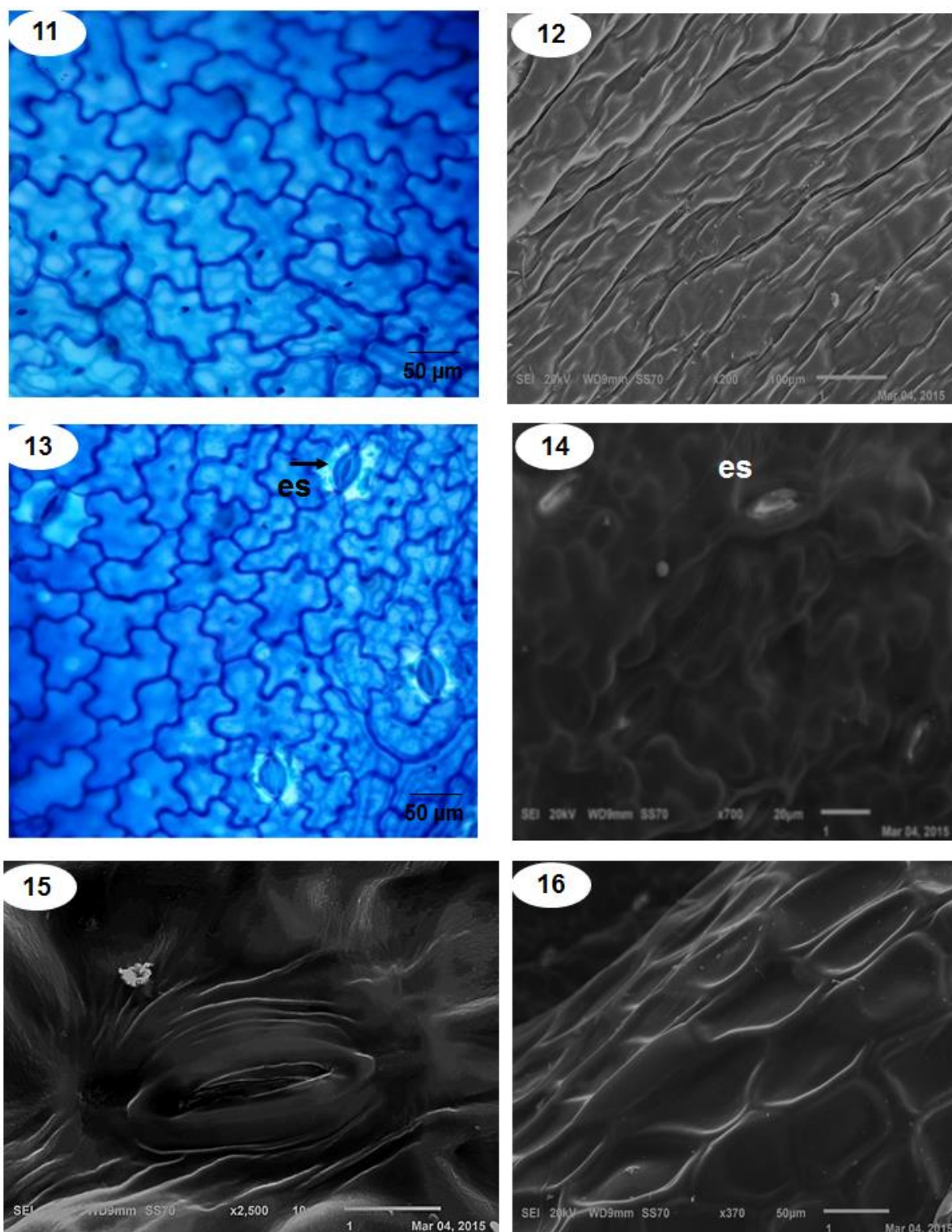
Em secção transversal, a epiderme é unisseriada com células maiores na face adaxial se comparadas com a face abaxial, e parede periclinal externa espessada com uma camada de parênquima paliçádico na face adaxial, logo abaixo da epiderme (FIGURA 40, IMAGENS 17, 19 e 20).

O sistema vascular na nervura mediana da folha apresenta unidades vasculares envolvidas por esclerênquima dispostos em 1-3 camadas em forma de ferradura margeando externamente o floema, que é contínuo e disposto ao redor do xilema. A unidade vascular dispõe-se em formato de "U", na região central da nervura (FIGURA 40, IMAGENS 17,18).

FIGURA 38 – MORFOANATOMIA MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA DE *Sapium glandulosum*

IMAGENS 1-10. *Sapium glandulosum* (L.) Morong. (Euphorbiaceae). Folha. 1 e 3. Face adaxial, 2 e 4. Face abaxial, 5. Aspecto da margem foliar, 6 e 8. Glândulas secretoras, 7. Aspecto geral da epiderme do pecíolo, observado em MEV 8 e 9. Orifício da glândula secretora, observado em MEV 10. Aspecto da epiderme das glândulas secretoras, observado em MEV.

FONTE: o autor (2017)

FIGURA 39 – MORFOANATOMIA DA EPIDERME DE *Sapium glandulosum*

IMAGENS 11-16. *Sapium glandulosum* (L.) Morong. (Euphorbiaceae). Folha. 11. Epiderme em vista adaxial, 12. Epiderme em vista adaxial (MEV), 13. Epiderme em vista abaxial, 14. Epiderme em vista abaxial (MEV), 15. Pormenor de um estômato, 16. Epiderme da nervura central (MEV).

es: estômato.

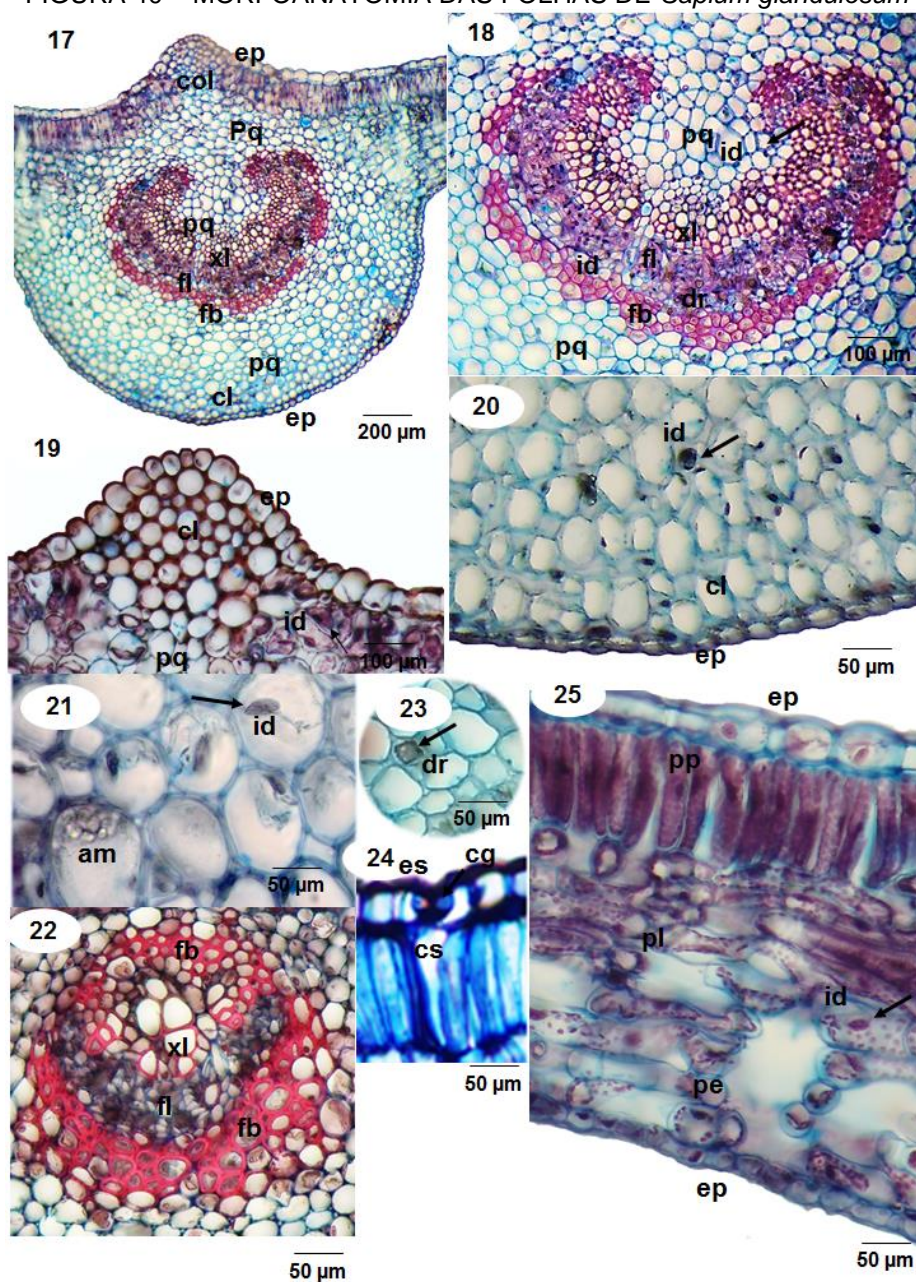
FONTE: o autor (2017)

O xilema apresenta os elementos traqueais dispostos em fileiras e que são separados por células parenquimáticas (FIGURA 40, IMAGEM 18). Há 8-10 camadas de parênquima fundamental, 2-5 de colênquima predominantemente angular e epiderme na face inferior unisseriada com cutícula lisa (FIGURA 40, IMAGENS 18 e 20)

Ao longo do mesofilo, há feixes vasculares de médio porte do tipo colateral, e está disposto em forma de arco aberto com uma calota de fibras abaixo do floema, com 3-4 fileiras (FIGURA 40, IMAGEM 22). O mesofilo é dorsiventral, apresentando apenas 1 camada de células paliçádicas voltadas à face adaxial, com parênquima esponjoso multiestratificado na superfície oposta, com 6-8 fileiras, e a epiderme da face superior é unisseriada com cutícula lisa (FIGURA 40, IMAGEM 25). Em secção transversal os estômatos estão situados no mesmo nível das demais células da epiderme com as duas células-guarda, projetando-se sobre a superfície da folha, na qual se observa o poro estomático, com câmara subestomática (FIGURA 40, IMAGEM 24).

O pecíolo, seccionado transversalmente, demonstra um contorno circular na região vascular, adquirindo formato de "U" (FIGURA 41, IMAGEM 26). A epiderme da face adaxial é unisseriada com células ovais, apresenta cutícula espessa e levemente plissada (FIGURA 41, IMAGEM 27). Logo abaixo à epiderme, há uma camada de colênquima, predominantemente do tipo anelar e nos ângulos passa a ter 3-5 camadas de parênquima (FIGURA 41, IMAGENS 27 e 28).

O feixe vascular é colateral e assume o formato de ferradura, encurvado nas extremidades. O floema apresenta 5-8 camadas de células e o xilema é percorrido por raios parenquimáticos (FIGURA 41, IMAGENS 29 e 30). Há 9-11 estratos de parênquima fundamental com 3-4 camadas de colênquima do tipo anelar-angular, e a estrutura da epiderme da face inferior é semelhante à da face oposta (FIGURA 41, IMAGENS 26, 28 e 29). Na região do córtex são observados entre 1 a 2 feixes de floema com 8-11 camadas (FIGURA 41, IMAGEM 31).

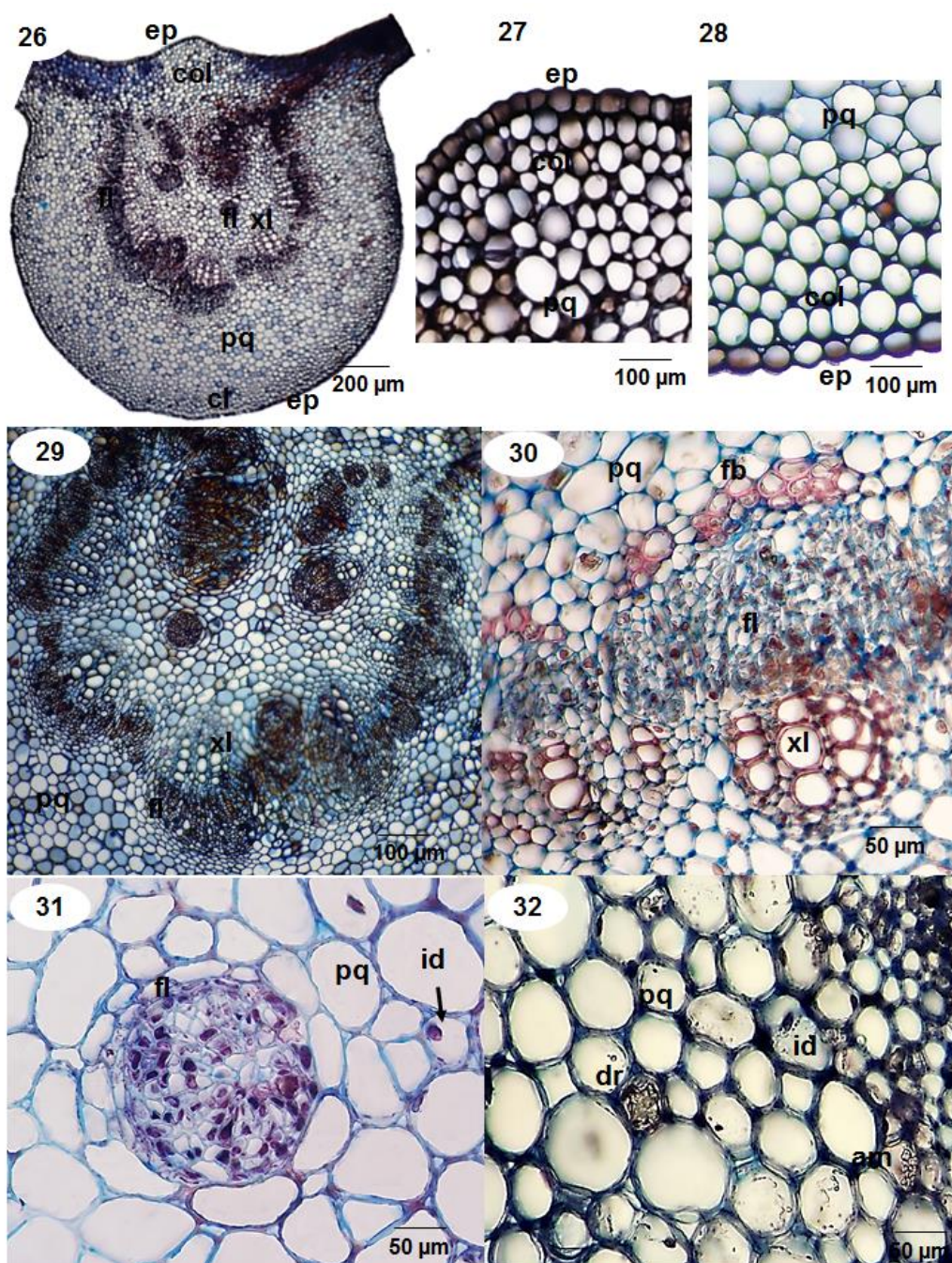
FIGURA 40 – MORFOANATOMIA DAS FOLHAS DE *Sapium glandulosum*

IMAGENS 17-25. *Sapium glandulosum* (L.) Morong. (Euphorbiaceae) observada ao MO.. Folha. 17 e 18. Aspecto geral da nervura central, demonstrando o contorno circular na região vascular, adquirindo formato de "U", 19. Pormenor da epiderme e colênquima na face adaxial, 20. Pormenor da epiderme (ep) e colênquima (col) na face abaxial, 21. Pormenor da região do parênquima (pq) de preenchimento, demonstrando os idioblastos e grãos de amido, 22. Detalhe do feixe vascular de médio porte presente no mesofilo, 23. Detalhe das drusas presentes na região do parênquima de preenchimento, 24. Detalhe do estômato (es) situado no mesmo nível das células epidérmicas, 25. Região do mesofilo foliar, contendo idioblastos.

ep: epiderme. col: colênquima. pq: parênquima. xl: xilema. fl: floema. id: idioblasto. dr: drusas. pp: parênquima paliçádico pl: parênquima lacunoso. pe: parênquima esponjoso.

FONTE: o autor (2017)



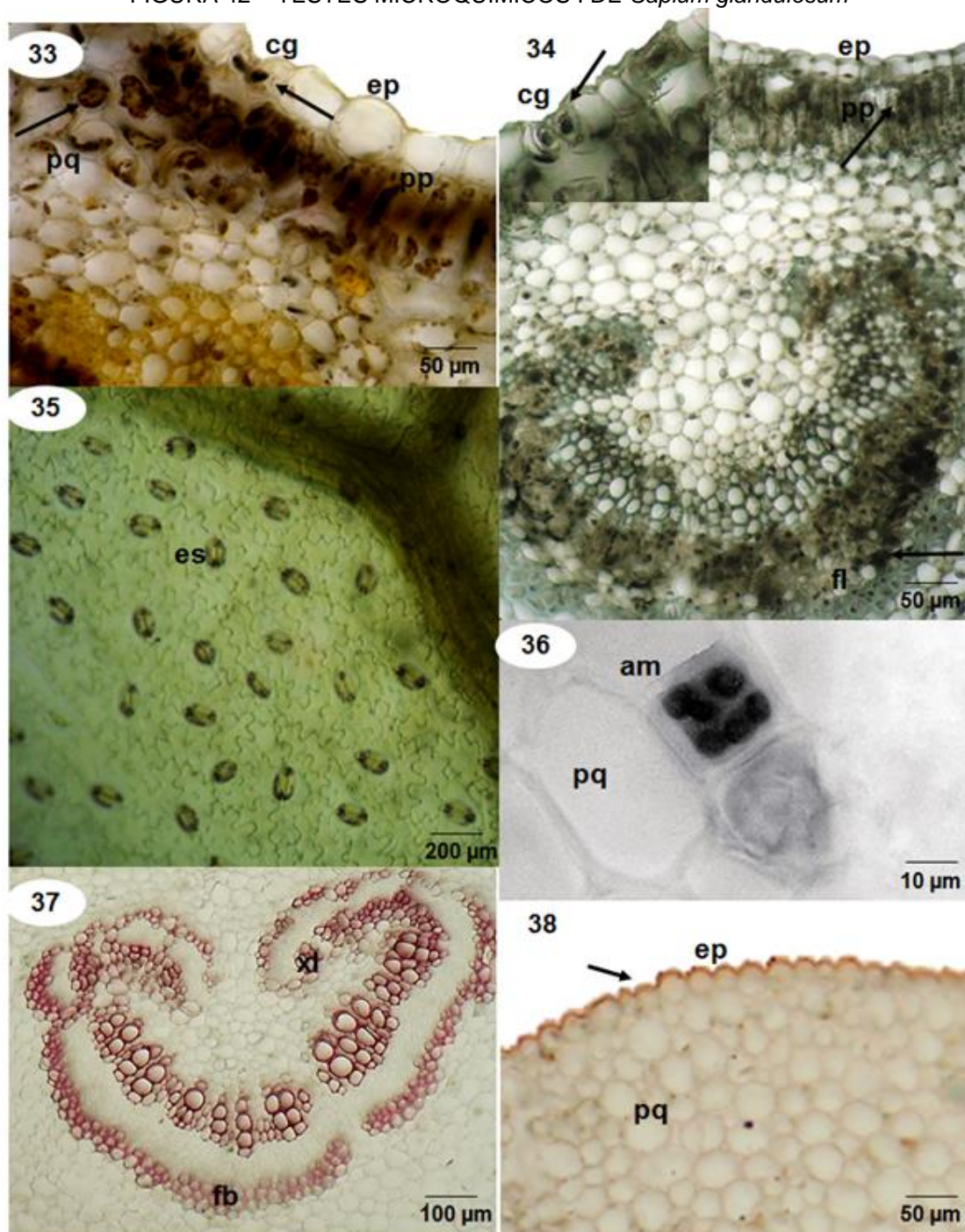
FIGURA 41 – MORFOANATOMIA DO PECÍOLO DE *Sapium glandulosum*

IMAGENS 26-32. *Sapium glandulosum* (L.) Morong. (Euphorbiaceae) observada ao MO. Pecíolo. 26. Aspecto geral do pecíolo, 27. Pormenor da epiderme e colênquima na face adaxial, 28. Pormenor da epiderme e colênquima na face abaxial, 29 e 30. Detalhe do feixe vascular demonstrando a disposição do xilema e floema, 31. Detalhe de um feixe constituído de floema primário, 32. Detalhe das drusas e idioblastos presentes na região do parênquima de preenchimento.  
 ep: epiderme. col: colênquima. pq: parênquima. xl: xilema. fl: floema. id: idioblasto. dr: drusas. pp parênquima paliçádico pl: parênquima lacunoso. pe: parênquima esponjoso.

FONTE: o autor (2017)

Nas células parenquimáticas da região abaxial são observadas drusas e grãos de amido (FIGURA 41, IMAGEM 32). Em secção longitudinal, é observada apenas uma drusa em cada célula parenquimática (FIGURA 44, IMAGEM 53), e os grãos de amido apresentam dois tipos de formatos: bastonete e esférico, que não se encontram presentes nas mesmas células parenquimáticas (FIGURA 44, IMAGEM 54 e FIGURA 45, IMAGEM 55).

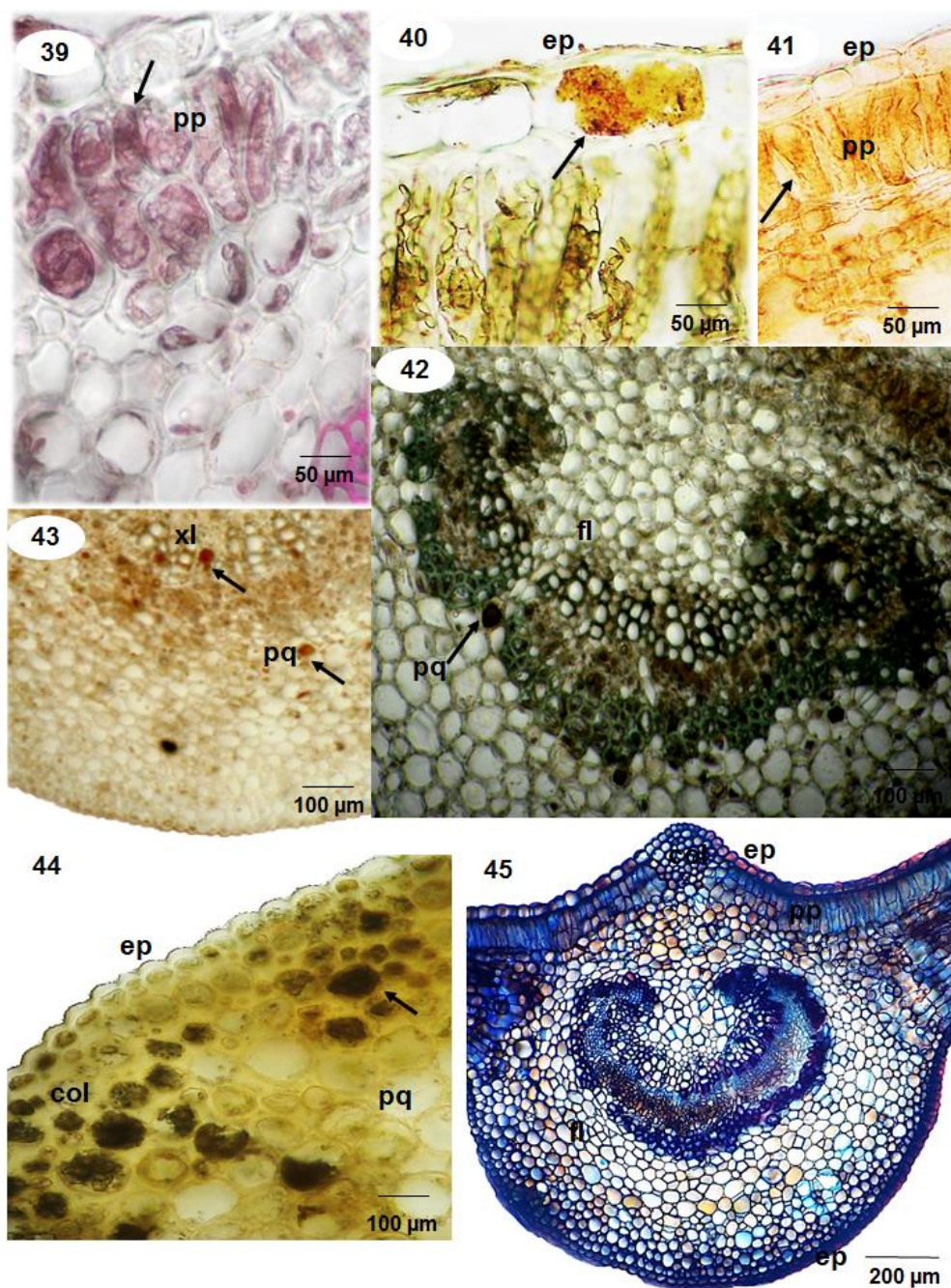
Com relação aos testes microquímicos, flavonoides e compostos fenólicos foram detectados nos idioblastos presentes no parênquima paliçádico e células guarda da folha (FIGURA 42, IMAGENS 33 e 34), colênquima, logo abaixo da epiderme abaxial e parênquima do pecíolo (FIGURA 44, IMAGENS 46 e 47) e alguns idioblastos contendo substâncias fenólicas podem ser visualizados no floema da folha e pecíolo (FIGURA 42, IMAGEM 33 e FIGURA 44, IMAGEM 48). Na folha, grãos de amido são observados em todo o mesofilo da folha, com maior distribuição nos cloroplastos e algumas regiões do parênquima de preenchimento (FIGURA 42, IMAGENS 35 e 36). A presença de lignina foi confirmada apenas no xilema, na nervura central das folhas e pecíolo, e na bainha esclerenquimática da folha (FIGURA 42, IMAGEM 37 e FIGURA 44, IMAGEM 49), e a presença de lipídios na cutícula secretada pela epiderme foi observada nas folhas e pecíolo (FIGURA 42, IMAGEM 38 e FIGURA 44, IMAGEM 50). Polissacarídeos neutros são observados nos idioblastos presentes no parênquima paliçádico (FIGURA 43, IMAGEM 39) e ao redor do xilema no feixe vascular e em células na epiderme do pecíolo (FIGURA 44, IMAGENS 51 e 52). Também foram observados terpenoides com grupo carbonila na epiderme, parênquima paliçádico das folhas (FIGURA 43, IMAGENS 40 e 41), e entre os feixes de xilema, no feixe vascular do pecíolo (FIGURA 45, IMAGEM 55). Idioblastos contendo proantocianidinas são visualizados no parênquima da folha e no floema do pecíolo (FIGURA 43, IMAGEM 42 e FIGURA 45, IMAGEM 56). A presença de atividade da peroxidase e superóxido dismutase é observada no parênquima, entre o floema e xilema das folhas (FIGURA 43, IMAGENS 43 e 44), e a coloração se apresenta mais intensa no feixe vascular, epiderme e parênquima do pecíolo (FIGURA 45, IMAGENS 57, 58 e 59). Proteínas totais estão presentes na epiderme, feixe vascular da folha e pecíolo (FIGURA 43, IMAGEM 45 e FIGURA 45, IMAGEM 60), e ao longo do parênquima paliçádico foliar (FIGURA 43, IMAGEM 45).

FIGURA 42 – TESTES MICROQUÍMICOS I DE *Sapium glandulosum*

IMAGENS 33-38. *Sapium glandulosum* (L.) Morong. (Euphorbiaceae). Folha. 33. Presença de flavonoides na região do parênquima de preenchimento, paliçádico e células guarda, 34. Parênquima paliçádico, células guarda e feixe vascular demonstrando a presença de compostos fenólicos, 35 e 36. Detalhe dos estômatos demonstrando a presença de grãos de amido, 37. Presença de lignina no feixe vascular, 38. Detalhe da epiderme evidenciando a presença de cutícula lipídica.

ep: epiderme. pq: parênquima. xl: xilema. fl: floema. es: estomato. pp parênquima paliçádico. am: amido. cg: células guarda.

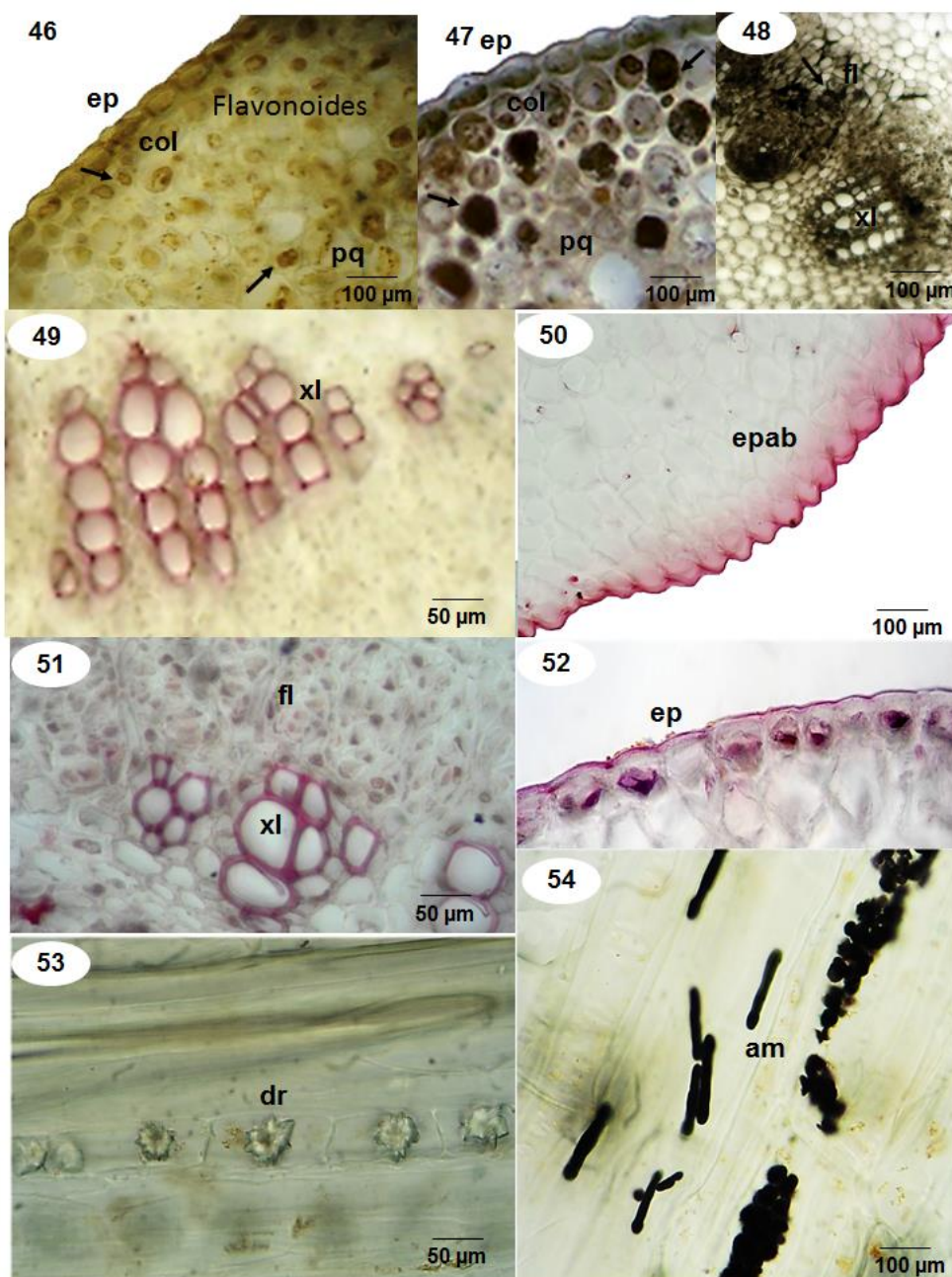
FONTE: o autor (2017)

FIGURA 43 – TESTES MICROQUÍMICOS II DE *Sapium glandulosum*

IMAGENS 39-45. *Sapium glandulosum* (L.) Morong. (Euphorbiaceae). Folha. 39. Presença de Polissacarídeos neutros na região do parênquima paliçádico, 40 e 41. Detalhe da epiderme e parênquima paliçádico demonstrando a presença de terpenoides com grupo carbonila, 42. Feixe vascular demonstrando a presença proantocianidinas, 43. Produção de peroxidase nos idioblastos presentes no parênquima e xilema, 44. Produção de superóxido dismutase no parênquima, 45. Proteínas presentes no feixe vascular, epiderme e parênquima paliçádico.

ep: epiderme. col: colênquima. pq: parênquima. xl: xilema. fl: floema. es: estomato. pp parênquima paliçádico.

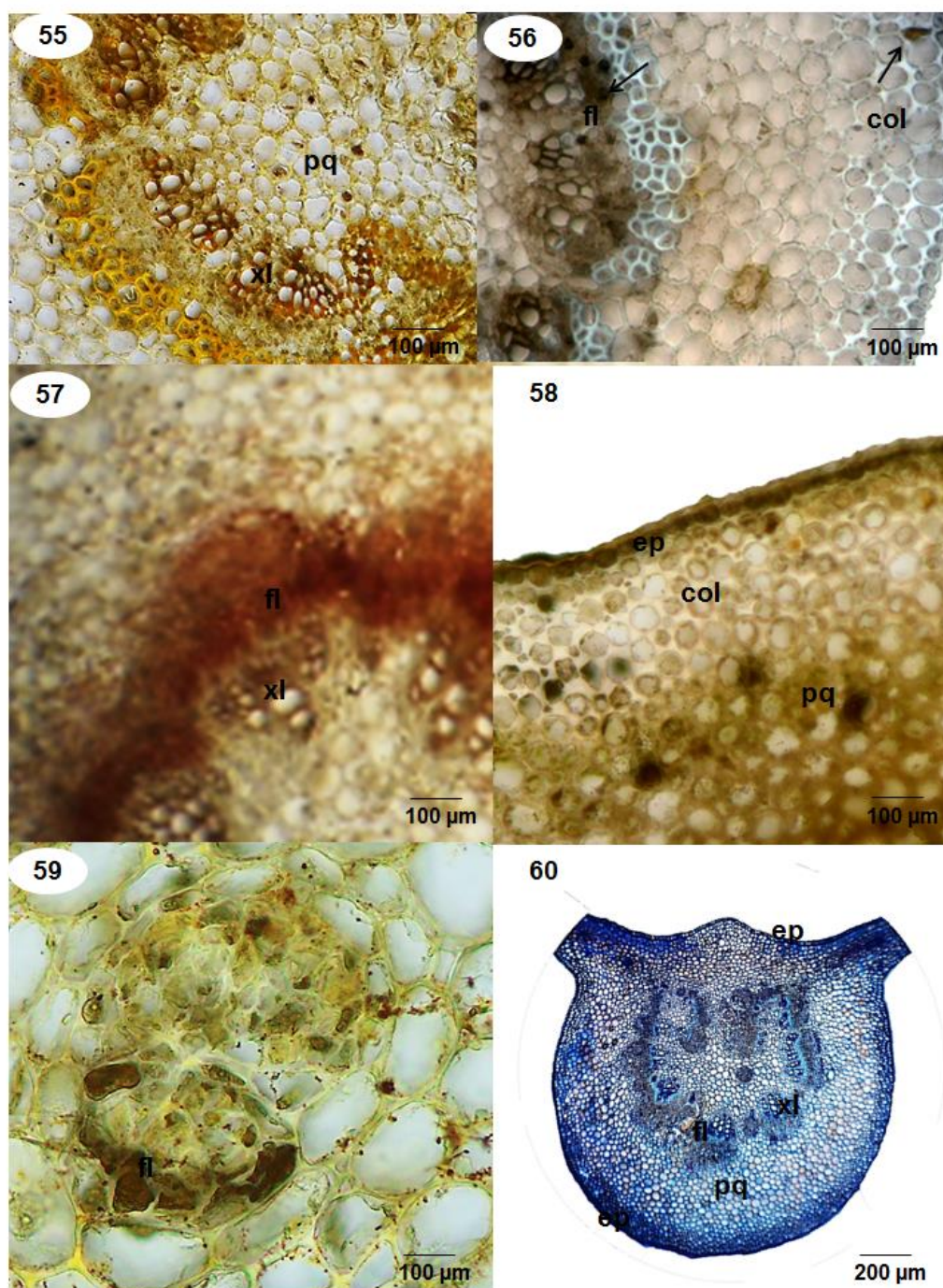
FONTE: o autor (2017)

FIGURA 44 – TESTES MICROQUÍMICOS III DE *Sapium glandulosum*

IMAGENS 46-54. *Sapium glandulosum* (L.) Morong. (Euphorbiaceae). Pecíolo. 46. Presença de flavonoides na região do parênquima de preenchimento e colênquima, 47 e 48. Parênquima paliçádico, colênquima e feixe vascular demonstrando a presença de compostos fenólicos, 49. Detalhe do xilema, demonstrando a presença de lignina, 50. Presença de cutícula lipídica na epiderme, 51 e 52. Presença de polissacarídeos neutros no xilema, floema e células da epiderme, 53. Aspecto das drusas presentes as células do parênquima, 54. Aspecto dos grãos de amido, com formato de bastonete e esférico.

ep: epiderme. col: colênquima. pq: parênquima. xl: xilema. fl: floema. es: estomato. pp parênquima paliçádico. dr: drusa. am: amido. epab: epiderme abaxial.

FONTE: o autor (2017)

FIGURA 45 – TESTES MICROQUÍMICOS DE *Sapium glandulosum*

IMAGENS 55-60. *Sapium glandulosum* (L.) Morong. (Euphorbiaceae). Pecíolo. 55. Presença de terpenoides com grupo carbonila na região do floema, 56. Detalhe do feixe vascular evidenciando a presença de compostos fenólicos no floema e colênquima, 57. Presença de peroxidase na região do feixe vascular, 58 e 59. Atividade da superóxido dismutase na epiderme e parênquima, e no floema, 60. Presença de proteínas na epiderme e feixe vascular.

ep: epiderme. col: colênquima. pq: parênquima. xl: xilema. fi: floema.

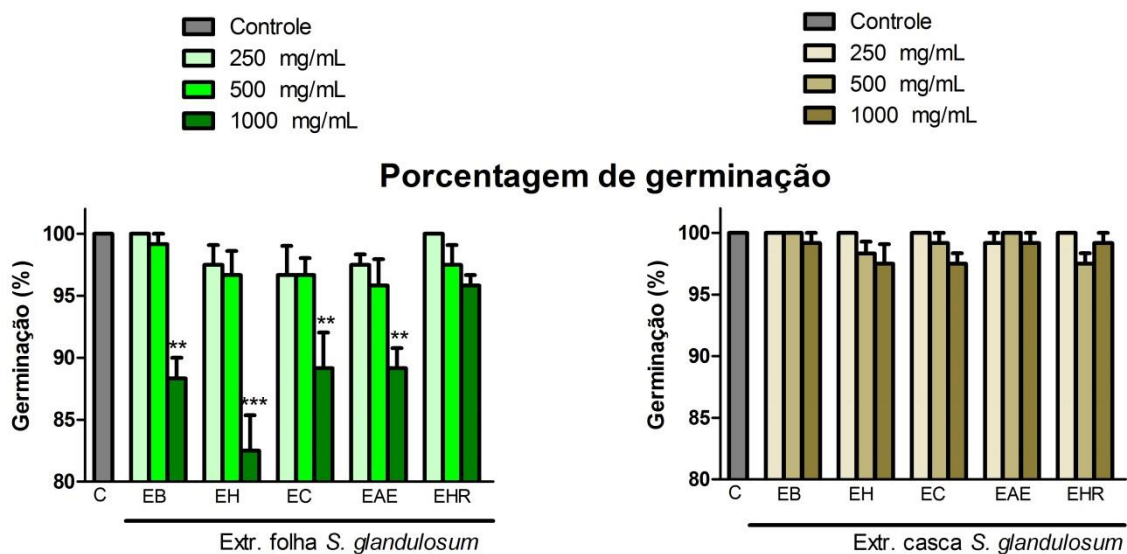
FONTE: o autor (2017)

### 3.4 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ALELOPÁTICA

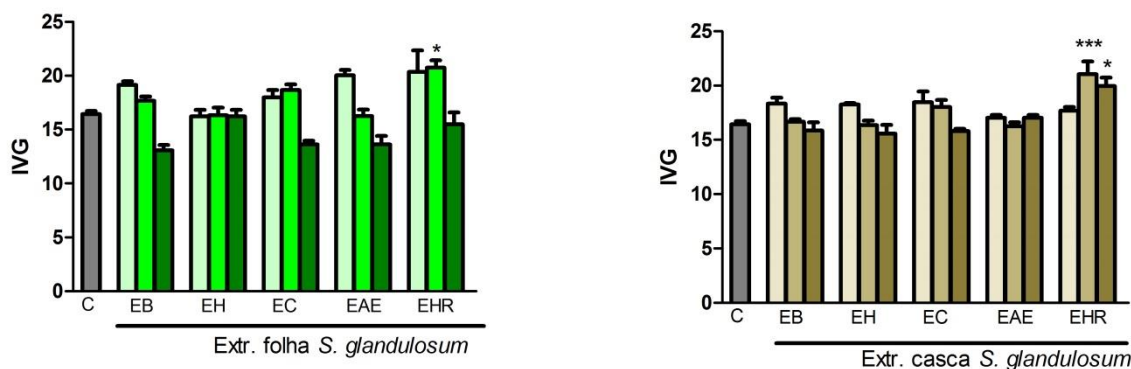
No teste de germinação, observa-se que, em relação ao controle, houve uma inibição da germinação das sementes de *Lactuca sativa* expostas aos extratos mais concentrados das folhas de *S. glandulosum* (GRÁFICO 1). Dentre os extratos ativos (1000 mg/mL), o mais ativo foi o EH, que inibiu a germinação em 17,5%. Os extratos da casca de *S. glandulosum* não provocaram inibição da germinação das sementes.

O índice de velocidade de germinação (IVG), calculado de acordo com Maguire (1962), revelou que os extratos de *S. glandulosum*, em geral, não afetaram a velocidade de germinação das sementes. A exceção foi para os extratos HR 500 de folhas e cascas e HR 1000 de cascas, que contém grande quantidade de açúcares, que aceleraram entre 11 a 15% a germinação das sementes. Provavelmente a alta quantidade de açúcar destes extratos cria um ambiente favorável para a germinação (GRÁFICO 1).

GRÁFICO 1 – TESTE DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Lactuca sativa* EXPOSTAS AOS EXTRATOS DE *S. glandulosum*



### Índice de velocidade de germinação (IVG)



C: controle negativo. EB: extrato bruto. EH: extrato hexano. EC: extrato clorofórmio. EAE: extrato acetato de etila. EHR: extrato hidroalcoólico remanescente.

Dados expressos em porcentagem das médias em relação ao controle  $\pm$  EPM, tratamento estatístico pelo teste de variância de uma via (ANOVA) e pós teste de Tukey de comparações múltiplas.

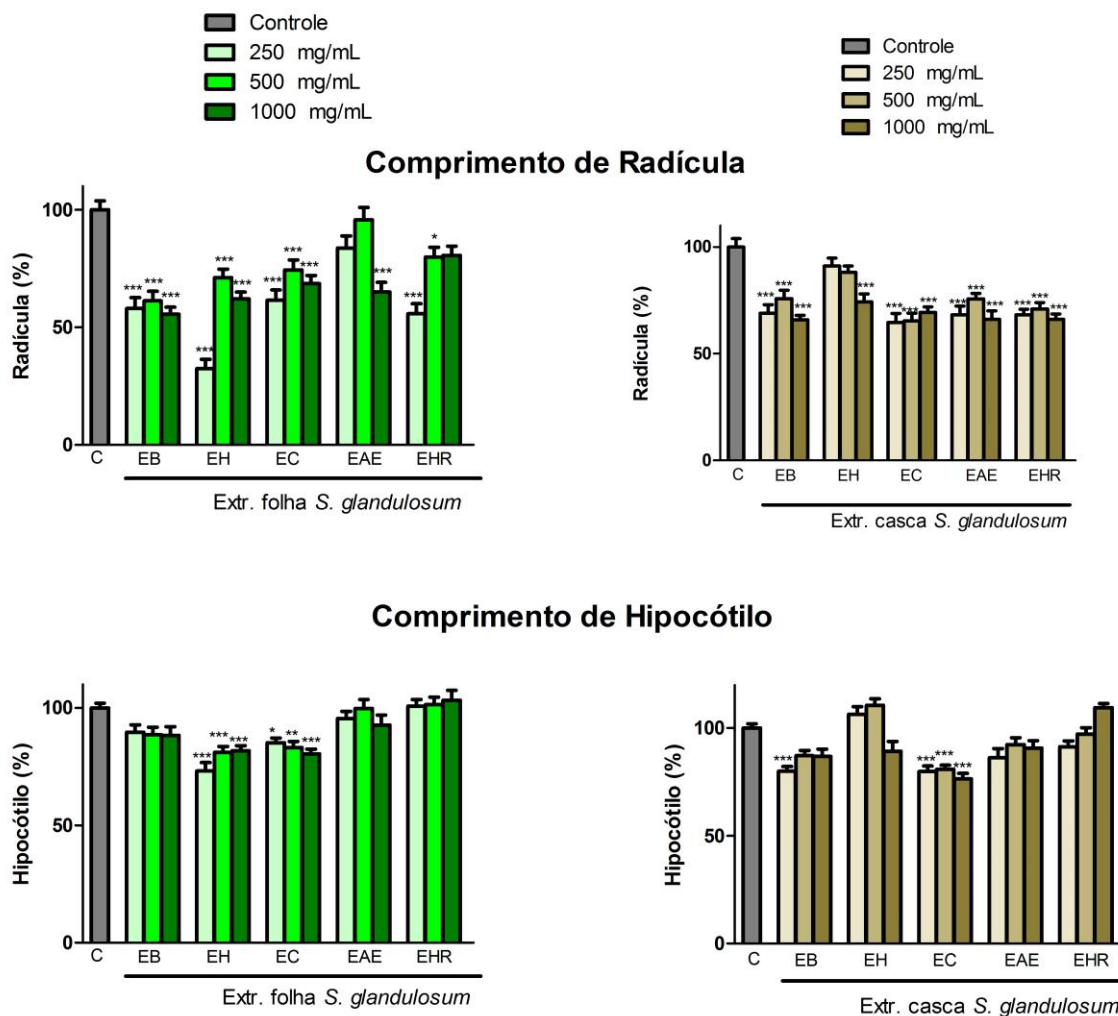
\* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$  em relação ao controle

FONTE: o autor (2017)

Nos testes de crescimento (GRÁFICO 2), observa-se que houve inibição dos comprimentos de radícula de hipocótilo medidos após sete dias da germinação.



GRÁFICO 2 – TESTE DE CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE *Lactuca sativa* EXPOSTAS AOS EXTRATOS DE *S. glandulosum*



C: controle negativo. EB: extrato bruto. EH: extrato hexano. EC: extrato clorofórmio. EAE: extrato acetato de etila. EHR: extrato hidroalcoólico remanescente

Dados expressos em porcentagem das médias em relação ao controle  $\pm$  EPM, tratamento estatístico pelo teste de variância de uma via (ANOVA) e pós-teste de Tukey de comparações múltiplas.

\* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$  em relação ao controle

FONTES: o autor (2017)

Nos casos das medidas das radículas das plântulas de *L. sativa*, a inibição foi significativa (entre 19 e 67% em relação ao controle), quando as plantas foram tratadas com os extratos das folhas de *S. glandulosum* (TABELA 5). Os extratos nas concentrações de 250 mg/mL das folhas estão entre os mais ativos, em relação a controle. O extrato que mais inibiu o crescimento (67,5%) das radículas das folhas foi o EH na concentração de 250 mg/mL. Os extratos não ativos foram os EAE das folhas nas concentrações de 250 mg/mL (exceção aos demais casos) e 500 mg/mL.

Nos tratamentos em que se utilizaram os extratos das cascas, a inibição do crescimento da radícula foi um pouco menor e a variação foi mais homogênea. Ao contrário do que foi observado no caso das folhas, os extratos que não foram ativos foram os EH de 250 e de 500 mg/mL. Este antagonismo de resultados do EH é possível devido à diferença morfológica e funcional entre os dois tipos de tecido, o que resulta em composição química diferente.

A inibição do crescimento do hipocótilo pelos extratos foi também menor. Neste caso foi observada ação nos EB de 250 mg/mL e nas três concentrações dos EC das cascas. No caso das folhas, as três concentrações dos EH e EC foram ativas. Os demais extratos mostraram-se similares em relação ao controle.

Cabe ressaltar que os cálculos de porcentagem foram realizados em relação à média as medidas feitas para as plântulas que não receberam o tratamento (controle negativo).

TABELA 5 – PORCENTAGEM MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE *L. sativa* TRATADA COM EXTRATOS DE *S. glandulosum* CALCULADOS EM RELAÇÃO AO CONTROLE

|               |       | EB<br>250 | EB<br>500 | EB<br>1000 | EH<br>250 | EH<br>500 | EH<br>1000 | EC<br>250 | EC<br>500 | EC<br>1000 | EAE<br>250 | EAE<br>500 | EAE<br>1000 | EHR<br>250 | EHR<br>500 | EHR<br>1000 |
|---------------|-------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|
| Rad. folhas   | média | -42,0     | -38,7     | -44,4      | -67,5     | -28,9     | -38,0      | -38,5     | -25,6     | -31,5      | -16,2      | -4,4       | -35,1       | -44,2      | -20,1      | -19,4       |
|               | dp    | 27,8      | 24,2      | 18,1       | 19,3      | 19,7      | 17,1       | 25,9      | 26,0      | 21,4       | 24,8       | 29,7       | 17,5        | 19,5       | 24,2       | 21,2        |
| Hipoc. Folhas | média | -10,4     | -11,4     | -11,7      | -26,9     | -18,9     | -18,3      | -14,9     | -16,9     | -19,6      | -4,7       | -0,3       | -7,4        | 0,7        | 1,5        | 3,2         |
|               | dp    | 18,8      | 18,9      | 22,0       | 17,7      | 13,4      | 12,6       | 12,2      | 15,7      | 12,8       | 15,2       | 21,2       | 17,6        | 14,0       | 18,9       | 22,5        |
| Rad. cascas   | média | -31,1     | -24,3     | -34,1      | -8,9      | -12,0     | -25,7      | -35,4     | -34,6     | -30,6      | -31,8      | -24,4      | -34,0       | -31,9      | -29,1      | -33,9       |
|               | dp    | 23,2      | 23,2      | 12,9       | 22,3      | 19,2      | 20,0       | 26,0      | 21,4      | 14,8       | 22,0       | 15,8       | 23,2        | 16,7       | 18,6       | 15,0        |
| Hipoc. Cascas | média | -19,9     | -12,7     | -13,1      | 6,5       | 10,6      | -10,7      | -20,1     | -19,2     | -23,6      | -13,7      | -7,7       | -9,3        | -8,6       | -2,8       | 9,5         |
|               | dp    | 12,8      | 14,4      | 20,9       | 20,9      | 18,7      | 24,4       | 15,5      | 12,8      | 15,0       | 23,9       | 20,1       | 20,7        | 16,3       | 18,7       | 12,4        |

C: controle negativo. EB: extrato bruto. EH: extrato hexano. EC: extrato clorofórmio. EAE: extrato acetato de etila. EHR: extrato hidroalcoólico remanescente

FONTE: o autor (2017)

Estes resultados demonstram que os extratos concentrados (1000 mg/mL) de folhas de *S. glandulosum* exercem efeito fitotóxico na germinação das sementes de *L. sativa*. Além disso, houve um efeito inibitório significativo no crescimento e desenvolvimento das plântulas causado pelos extratos de *S. glandulosum*. Dessa forma os extratos que podem ser considerados sem atividade alelopática, de acordo com este teste são os EAE das folhas e os EH das cascas, ambos nas concentrações de 250 e 500 mg/mL.

### 3.5 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE LARVICIDA

Nos ensaios de mortalidade (TABELA 6), foi verificado que o extrato bruto (EB), clorofórmio (EC) e acetato de etila (EAE) das folhas e cascas foram responsáveis por um maior número de indivíduos mortos. Os extratos EH e EHR não provocaram mortalidade significativa quando comparadas às demais.

Dentre os extratos avaliados EAE das folhas foi o que apresentou maior toxicidade para as larvas, uma vez que apresentou uma maior taxa de mortalidade, em menor concentração ( $CL_{50} > 176 \mu\text{g/mL}$ ), ou seja, apenas  $176 \mu\text{g/mL}$  são suficientes para causar a mortalidade de 50% dos indivíduos. Já nos extratos das cascas, os extratos EAE e EC foram os que apresentaram maior toxicidade.

TABELA 6 – EFEITO LARVICIDA DOS EXTRATOS DE *S. glandulosum*.

|  |     | Nº de mortos             |                          |                           | CL <sub>50</sub><br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Intervalo de<br>confiança 95% ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|--|-----|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--|--|
|  |     | 250 ( $\mu\text{g/mL}$ ) | 500 ( $\mu\text{g/mL}$ ) | 1000 ( $\mu\text{g/mL}$ ) |  |  |
| Folhas   | EB  | 6                        | 10                       | 11                        | 333,71                                   | 256,76-433,73                                      |
|  | EH  | 0                        | 0                        | 1                         | >1000                                    |  |
|  | EC  | 0                        | 4,7                      | 5,3                       | >1000                                    |  |
|  | EAE | 7,3                      | 9                        | 8                         | 304,75                                   |  |
|  | EHR | 0                        | 1                        | 1,3                       | >1000                                    |  |
| Cascas   | EB  | 0                        | 5                        | 5,7                       | >1000                                    | 342,95-2061,86                                     |
|  | EH  | 0,7                      | 0,7                      | 0                         | >1000                                    |  |
|  | EC  | 4,7                      | 5,3                      | 7,7                       | 840,9                                    |  |
|  | EAE | 6,3                      | 10                       | 12,7                      | 307,79                                   |  |
|  | EHR | 0                        | 2,7                      | 4,3                       | >1000                                    |  |
| Controle posit. (TEMEFÓS) (60 $\mu\text{g/mL}$ ) |     |                          | 15**                     | > 60                      |  | 136,85 - 229,93                                    |

C: controle negativo. EB: extrato bruto. EH: extrato hexano. EC: extrato clorofórmio. EAE: extrato acetato de etila. EHR: extrato hidroalcoólico remanescente.

Determinação da  $CL_{50}$  realizada pelo teste de Probitos e pós-teste de Dunnet realizado para a comparação das médias \* $p \leq 0,05$  \*\* $p \leq 0,01$  em relação ao controle negativo.

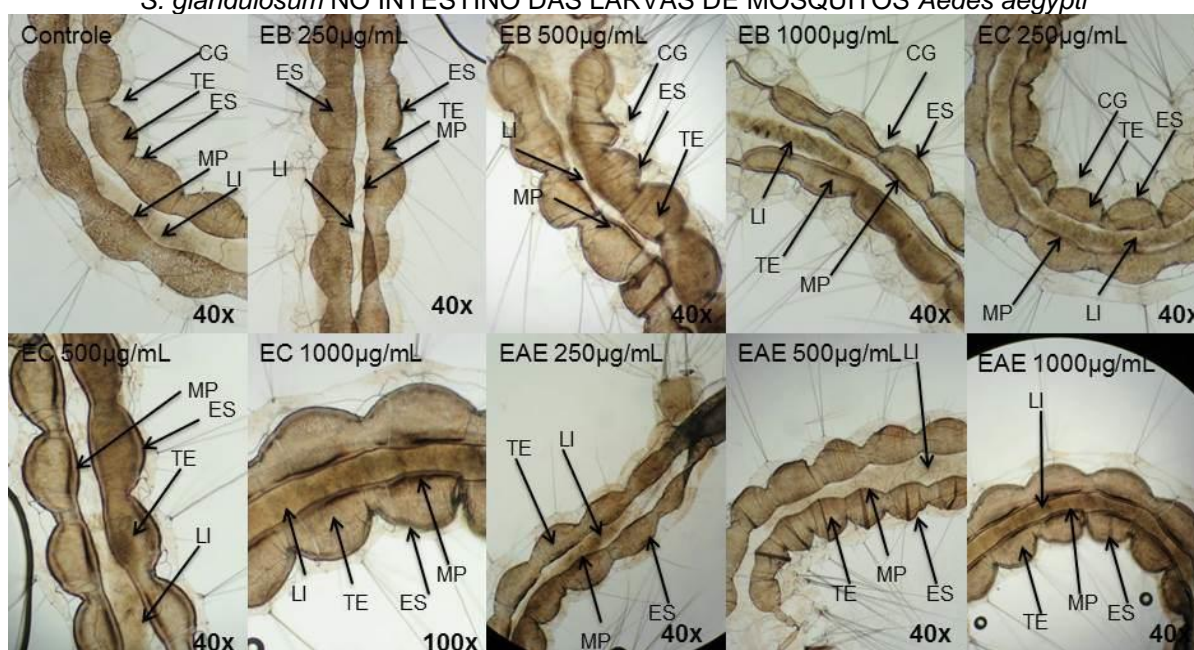
FONTE: o autor (2017)

#### 3.5.1 Avaliação de alterações na morfologia das larvas

Larvas no 4º estágio submetidas ao tratamento com os extratos EB, EH, EC, EAE e EHR das folhas e cascas foram analisadas em microscópio óptico e algumas alterações na morfologia foram observadas (FIGURA 46 e FIGURA 47). Larvas tratadas com a concentração de 500 e 1000  $\mu\text{g/mL}$  do EB, EC e EAE das folhas e cascas apresentaram espessamento da membrana peritrófica e do epitélio subperitrófico mais espesso, já que estes apresentaram alteração de coloração para

mais enegrecidos. O tecido epitelial se mostrou descontínuo nos segmentos do tecido para as concentrações de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  do EB e EAE das folhas, 250 e 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  da EC e EAE das cascas. O tecido epitelial também se apresentou menos espesso para as concentrações de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dos extratos EB, 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  do EAE das folhas, 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  da EC, 500 e 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  da EAE das cascas. Os extratos EH e HR das folhas e cascas não provocaram alterações morfológicas nas larvas tratadas.

FIGURA 46 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE *S. glandulosum* NO INTESTINO DAS LARVAS DE MOSQUITOS *Aedes aegypti*



EB: extrato bruto. EC: extrato clorofórmio. EAE: extrato acetato de etila.  
Evidenciando a Membrana peritrófica (MP), o Epitélio Subperitrófico (ES), Tecido Epitelial (TE), Lumen Intestinal (LI), Camada Gordurosa (CG).

FONTE: o autor (2017)

A alta mortalidade de larvas expostas aos extratos EB, EC e EAE das folhas indicam a possibilidade do seu uso como larvicida natural e as alterações na morfologia interna podem explicar a alta taxa de mortalidade decorrente da intoxicação. Isto pode ser afirmado, pois os processos de digestão e de absorção ocorrem no intestino médio e a organização espacial da digestão depende da relação de cada um dos compartimentos (célula, espaço endoperitrófico e subperitrófico) com o epitélio subperitrófico, com o tecido epitelial, com as diferentes fases da digestão e com as enzimas correspondentes (Terra, 2001). Assim, qualquer

alteração morfológica no sistema digestório das larvas pode influenciar na sobrevivência das larvas.

FIGURA 47 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELOS EXTRATOS DAS CASCAS DE *S. glandulosum* NO INTESTINO DAS LARVAS DE MOSQUITOS *Aedes aegypti*



EB: extrato bruto. EC: extrato clorofórmio. EAE: extrato acetato de etila.  
Evidenciando a Membrana peritrófica (MP), o Epitélio Subperitrófico (ES), Tecido Epitelial (TE), Lumen Intestinal (LI), Camada Gordurosa (CG).

FONTE: o autor (2017)

Os insetos não possuem a típica camada de muco no trato digestório, como os vertebrados. Entretanto, este é revestido por uma estrutura de proteção única, a membrana peritrófica. (RICHARDS; RICHARDS, 1977). A membrana peritrófica se apresenta como uma estrutura mucinosa que difere do muco presente nos vertebrados pela presença da quitina na estrutura proteica. (WANG; GRANADOS, 1997). O aumento da espessura da membrana peritrófica pode ser considerado um mecanismo de defesa da larva, visto que, uma das principais funções desta membrana é a proteção das células epiteliais contra a ação mecânica do alimento, além de barrar a invasão de microrganismos e patógenos ingeridos. (RICHARDS; RICHARDS, 1977).

Substâncias tóxicas interagem especificamente com receptores da membrana apical do intestino médio, causando sérios danos ao epitélio, que culminam com a morte da larva. (CHARLES; DE BARJAC, 1981; CHARLES;

NIELSEN-LEROUX, 2000; PERUMALSAMY et al., 2013). Portanto, a diminuição da espessura do tecido epitelial e a eventual descontinuação do mesmo, que ocorreram após o contato com os extratos de *S. glandulosum*, indicam que o extrato é agressivo para as células do sistema digestório das larvas do mosquito possivelmente pela interação com os receptores ali presentes.

O controle de mosquitos é uma importante ferramenta para o controle de doenças causadas por *aboviruses*, *flaviviruses* e *alfaviruses* como a febre amarela, a dengue, zika e chikungunya. (CHARLES E NIELSEN-LEROUX, 2000; SCHUFFENECKER et al., 2006; DE OMENA et al., 2007; CHOUIN-CARNEIRO et al., 2016). O mosquito *Aedes aegypti* é um vetor da febre amarela, dengue, Zika e Chikungunya, sendo que para estas últimas três não há vacina efetiva desenvolvida e a única maneira de controlar a doença é a controle da população de vetores, por meio do extermínio das larvas. (CICCIA et al., 2000).

O uso indiscriminado de inseticidas químicos levou ao surgimento de populações de mosquitos resistentes, o que trouxe a necessidade de pesquisa de novos inseticidas. (CHARLES; NIELSEN-LEROUX, 2000; MONTELLA et al., 2007). Uma alternativa para o uso de inseticidas químicos é o uso de inseticidas naturais visando minimizar os danos ambientais causados por inseticidas como organofosforados e piretróides. (MONTELLA et al., 2007). Alguns extratos de plantas possuem atividade inseticida comprovada, e esses potenciais fitoinseticidas podem ser alternativas mais seguras para o controle do mosquito, uma vez que se espera que apresentem um elevado grau de degradação no meio ambiente. (CICCIA et al., 2000; ARRUDA et al., 2003; CHAITHONG et al., 2006; DE OMENA et al., 2007; DA SILVA et al., 2014; DALARMI et al., 2015).

Rahuman et al. (2008) comprovou atividade larvicida de diversas espécies de plantas da família Euphorbiaceae, família à qual *S. glandulosum* pertence. Assim, é possível o uso de extratos de plantas, já que eles contêm diferentes compostos químicos que podem agir sinergicamente por diversos mecanismos de ação reduzindo o desenvolvimento da resistência ao larvicida.

Dessa forma, o uso de extratos oriundos de *S. glandulosum*, especialmente os extratos EC e EAE das folhas, no controle da população de larvas de *Aedes aegypti* é um método alternativo para minimizar os efeitos nocivos de pesticidas utilizados no controle do mosquito. Neste sentido, estes extratos se mostram uma alternativa para o uso de larvicidas químicos.

### 3.6 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação dos resultados dos testes de atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição foi realizada segundo Holetz et al. (2002), em que extratos com CIM menor que 100 mg/mL foram considerados com boa atividade, extratos com CIM entre 100 e 500 mg/mL foram considerados com atividade moderada, extratos com CIM entre 500 e 1000 mg/mL foram considerados com atividade fraca e extratos com CIM superior que 1000 mg/mL foram considerados inativos.

A avaliação da atividade dos extratos de *S. glandulosum* contra bactérias (TABELA 7) mostrou atividades moderadas a boas para todas as cepas avaliadas, segundo a classificação sugerida por Holetz et al. (2002). Cabe, entretanto, ressaltar as atividades avaliadas como boas dos extratos EC das folhas contra as espécies *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Klebsiella pneumoniae*, com CIM de 75mg/mL. Atividade antibacteriana similar, com CIM de 75mg/mL também foi obtida para o EB das cascas de *S. glandulosum* contra o microrganismo *Bacillus subtilis*. Além disso, boas atividades foram encontradas contra *Klebsiella pneumoniae* para os extratos EC (CIM de 50mg/mL) e EAE (CIM de 75mg/mL). Todos os extratos testados tiveram atividade bactericida.

TABELA 7 – VALORES DE CIM E CLM OBTIDOS PARA OS EXTRATOS DE *S. glandulosum*, NA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.

|                 |                 | <i>Bacillus subtilis</i> |                | <i>Staphylococcus aureus</i>  |                | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |                | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> |                |
|-----------------|-----------------|--------------------------|----------------|-------------------------------|----------------|-----------------------------------|----------------|-------------------------------------|----------------|
| Extratos        |                 | CIM<br>(mg/mL)           | CLM<br>(mg/mL) | CIM<br>(mg/mL)                | CLM<br>(mg/mL) | CIM<br>(mg/mL)                    | CLM<br>(mg/mL) | CIM<br>(mg/mL)                      | CLM<br>(mg/mL) |
| <b>Folhas</b>   | <b>EB</b>       | 125                      | 125            | 150                           | 150            | 155                               | 175            | 125                                 | 125            |
|                 | <b>EH</b>       | 250                      | 250            | 125                           | 125            | 125                               | 150            | 100                                 | 100            |
|                 | <b>EC</b>       | 75                       | 75             | 100                           | 100            | 100                               | 100            | 75                                  | 75             |
|                 | <b>EAE</b>      | 125                      | 125            | 150                           | 150            | 125                               | 125            | 125                                 | 125            |
|                 | <b>EHR</b>      | 250                      | 250            | 150                           | 150            | 125                               | 125            | 125                                 | 150            |
|                 | <b>EB</b>       | 75                       | 75             | 150                           | 150            | 125                               | 125            | 125                                 | 150            |
| <b>Cascas</b>   | <b>EH</b>       | 250                      | 250            | 175                           | 175            | 125                               | 125            | 125                                 | 150            |
|                 | <b>EC</b>       | 125                      | 125            | 150                           | 150            | 150                               | 150            | 150                                 | 150            |
|                 | <b>EAE</b>      | 250                      | 250            | 175                           | 175            | 150                               | 150            | 150                                 | 150            |
|                 | <b>EHR</b>      | 250                      | 250            | 175                           | 175            | 175                               | 175            | 175                                 | 150            |
|                 | <b>Cloranf.</b> | 4,23                     | -              | 3,12                          | -              | 3,12                              | -              | 4,22                                | -              |
|                 |                 | <i>Escherichia coli</i>  |                | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |                | <i>Shigella sonnei</i>            |                | <i>Klebsiella pneumoniae</i>        |                |
| Extratos        |                 | CIM<br>(mg/mL)           | CLM<br>(mg/mL) | CIM<br>(mg/mL)                | CLM<br>(mg/mL) | CIM<br>(mg/mL)                    | CLM<br>(mg/mL) | CIM<br>(mg/mL)                      | CLM<br>(mg/mL) |
| <b>Folhas</b>   | <b>EB</b>       | 125                      | 125            | 125                           | 125            | 125                               | 125            | 125                                 | 125            |
|                 | <b>EH</b>       | 250                      | 250            | 250                           | 250            | 250                               | 250            | 100                                 | 100            |
|                 | <b>EC</b>       | 150                      | 150            | 125                           | 125            | 125                               | 125            | 75                                  | 75             |
|                 | <b>EAE</b>      | 125                      | 125            | 250                           | 250            | 125                               | 125            | 125                                 | 125            |
|                 | <b>EHR</b>      | 125                      | 125            | 250                           | 250            | 250                               | 250            | 250                                 | 250            |
|                 | <b>EB</b>       | 125                      | 125            | 125                           | 125            | 125                               | 125            | 125                                 | 125            |
| <b>Cascas</b>   | <b>EH</b>       | 125                      | 125            | 250                           | 250            | 125                               | 125            | 250                                 | 250            |
|                 | <b>EC</b>       | 125                      | 125            | 125                           | 125            | 125                               | 125            | 50                                  | 50             |
|                 | <b>EAE</b>      | 250                      | 250            | 250                           | 250            | 250                               | 250            | 75                                  | 75             |
|                 | <b>EHR</b>      | 125                      | 125            | 125                           | 125            | 250                               | 250            | 250                                 | 250            |
| <b>Cloranf.</b> | 3,12            | -                        | 3,12           | -                             | 3,12           | -                                 | 4,22           | -                                   |                |

EB: extrato bruto. EH: extrato hexano. EC: extrato clorofórmio. EAE: extrato acetato de etila. EHR: extrato hidroalcoólico remanescente. Controle positivo: Coranfenicol.

CIM: Concentração inibitória mínima. CLM: concentração letal mínima.

FONTE: o autor (2017)

Os extratos de *S. glandulosum* também apresentaram atividade antifúngica de moderada a boa (TABELA 8). Os extratos com atividade mais elevada, cujas atividades são classificadas como boa segundo Holetz et al. (2002), foram os extratos EC das folhas e das cascas (ambos com CIM de 75mg/mL), ativos contra *Cryptococcus neoformans*. O extrato EC das cascas também apresentou atividade boa (CIM de 75mg/mL) contra *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Todos os extratos testados foram letais para as espécies fúngicas.



TABELA 8 – VALORES DE CIM E CLM OBTIDOS PARA OS EXTRATOS DE *S. glandulosum*, NA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.

|               |                  | <i>Candida albicans</i> |                | <i>Candida tropicalis</i> |                | <i>Sacharomices cerevisiae</i> |                | <i>Cryptococcus neoformans</i> |                |
|---------------|------------------|-------------------------|----------------|---------------------------|----------------|--------------------------------|----------------|--------------------------------|----------------|
|               |                  | CIM<br>(mg/mL)          | CLM<br>(mg/mL) | CIM<br>(mg/mL)            | CLM<br>(mg/mL) | CIM<br>(mg/mL)                 | CLM<br>(mg/mL) | CIM<br>(mg/mL)                 | CLM<br>(mg/mL) |
| <b>Folhas</b> | <b>EB</b>        | 250                     | 250            | 250                       | 250            | 125                            | 125            | 125                            | 125            |
|               | <b>EH</b>        | 250                     | 250            | 250                       | 250            | 125                            | 125            | 125                            | 125            |
|               | <b>EC</b>        | 125                     | 125            | 125                       | 125            | 125                            | 125            | 75                             | 75             |
|               | <b>EAE</b>       | 250                     | 250            | 250                       | 250            | 125                            | 125            | 250                            | 250            |
|               | <b>EHR</b>       | 250                     | 250            | 250                       | 250            | 125                            | 125            | 250                            | 250            |
|               | <b>EB</b>        | 125                     | 125            | 125                       | 125            | 125                            | 125            | 125                            | 125            |
| <b>Cascas</b> | <b>EH</b>        | 250                     | 250            | 250                       | 250            | 125                            | 125            | 125                            | 125            |
|               | <b>EC</b>        | 75                      | 75             | 75                        | 75             | 125                            | 125            | 75                             | 75             |
|               | <b>EAE</b>       | 250                     | 250            | 250                       | 250            | 125                            | 125            | 250                            | 500            |
|               | <b>EHR</b>       | 125                     | 125            | 125                       | 125            | 125                            | 125            | 250                            | 500            |
|               | <b>Nistatina</b> | 10,3                    | -              | 10,3                      | -              | 5,15                           | -              | -                              | -              |

EB: extrato bruto. EH: extrato hexano. EC: extrato clorofórmio. EAE: extrato acetato de etila. EHR: extrato hidroalcoólico remanescente. Controle positivo: Nistatina.

CIM: Concentração inibitória mínima. CLM: concentração letal mínima.

FONTE: o autor (2017)

Os resultados para CIM e CLM em todos os casos indicam a mesma dose ativa para as duas medidas. Isto significa que os extratos de *S. glandulosum* têm atividade bactericida e não apenas bacteriostática. Dessa forma, os extratos testados não apenas impedem a proliferação celular, mas também impedem a viabilidade celular destes organismos.

Compostos fitoquímicos com atividade antimicrobiana podem ser classificados em fenólicos e polifenólicos, terpenoides e óleos essenciais, alcaloides, lecitinas e polipeptídeos ou ainda misturas. (COWAN, 1999).

O mecanismo de ação da atividade antimicrobiana atribuída aos fenís e polifenóis inclui a inibição enzimática proferida pelos compostos oxidados, possivelmente pela reação com grupos sulfidríla ou por reações mais inespecíficas com proteínas. (MASON; BRUCE P, 1987; COWAN, 1999). No caso de *S. glandulosum*, a avaliação fitoquímica demonstrou a presença de flavonoides e precursores de taninos hidrolisáveis, os quais podem ser os responsáveis pela atividade biológica encontrada. Flavonoides estão envolvidos na defesa das plantas contra microrganismos invasores, portanto, nada mais natural que se espere atividade antimicrobiana relacionada a estas substâncias. (DIXON et al., 1983). Do mesmo modo os taninos também são capazes de interagir com as proteínas por meio de ligações inespecíficas, como pontes de hidrogênio e ligações covalentes e o seu provável mecanismo de ação seria a inativação de adesinas bacterianas,

enzimas e outras proteínas. Scalbert (1991) em um trabalho de revisão mostrou que taninos possuem atividade antimicrobiana contra fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Além disso, não se pode deixar de considerar a importância da ação de misturas, como ocorre com a aplicação de extratos, também foco deste estudo, já que as amostras testadas foram extratos. No caso de misturas muitas classes de metabólitos de plantas com atividade biológica agem de modo sinérgico, potencializando o efeito. Não se deve, entretanto, ignorar que tais misturas podem também possuir atividade tóxica, devendo ser estudadas mais profundamente para uso em seres humanos. (COWAN, 1999).

### 3.7 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE CITOTÓXICA

#### 3.7.1 Avaliação de citotoxicidade dos extratos

Segundo Suffness e Pezzuto (1990), valores de  $CI_{50}$  inferiores a 30  $\mu\text{g/mL}$  para extratos de produtos naturais podem ser considerados ativos, portanto que possuem atividade citotóxica. Dessa forma, em geral, os extratos de *S. glandulosum* possuem atividade citotóxica (TABELA 9) contra pelo menos uma das linhagens testadas: U251 (glioma, SNC), NCI-ADR/RES (ovário, com fenótipo de resistência a múltiplas drogas), 786-0 (rim), OVCAR-3 (ovário) e HT-29 (cólon). Cabe, além disso, destacar que um antineoplásico ideal é aquele que tem a capacidade de eliminar as células neoplásicas, mas não células normais, aqui representadas pelas células de rim de macaco, VERO (ATCC-CCL-81).

Os extratos bruto e hexano das folhas apresentou atividade contra a linhagem HT-29 (cólon) e não apresentaram atividade contra as células VERO. O extrato clorofórmio das folhas apresentou atividade contra todas as linhagens, inclusive contra as células VERO, o que o retira da lista de potencial antineoplásico. O extrato hidroalcoólico remanescente não teve atividade contra as células neoplásicas, mas teve contra as células normais. Já o extrato acetato de etila das folhas foi o que apresentou melhor atividade antineoplásica, já que teve atividade contra todas as células tumorais testadas, mas não apresentou atividade contra células VERO.

O extrato bruto das cascas não apresentou atividade. O extrato hexano das cascas apresentou atividade contra todas as células testadas, inclusive contra as

células normais, o que também ocorreu com os extratos clorofórmio e acetato de etila. A fração hidroalcoólica remanescente teve atividade contra as células 786-0 (rim), e HT-29 (côlon), porém teve, também, atividade contra as células normais.

TABELA 9 – VALORES DE  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ), OBTIDOS NOS TESTES DE CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS DE *S. glandulosum*

|               |                  | U251  | NCI-ADR/RES | 786-0 | OVCAR-3* | HT-29 | VERO  |
|---------------|------------------|-------|-------------|-------|----------|-------|-------|
|               | <b>Doxorrub.</b> | 0,036 | 1,1         | 0,25  | 0,28     | 0,27  | 0,023 |
| <b>Folhas</b> | <b>EB</b>        | 77    | 75          | 33    | 31       | 25    | 44    |
|               | <b>EH</b>        | 45    | 34          | 48    | 36       | 26    | 36    |
|               | <b>EC</b>        | 11    | 12          | 11    | 10       | 12    | 13    |
|               | <b>EAE</b>       | 23    | 22          | 20    | 21       | 20    | 51    |
|               | <b>EHR</b>       | 46    | 49          | 51    | 55       | 38    | 23    |
|               | <b>EB</b>        | 34    | 46          | 38    | 33       | 31    | 48    |
|               | <b>EH</b>        | 21    | 12          | 16    | 15,1     | 17    | 25    |
| <b>Cascas</b> | <b>EC</b>        | 8,9   | 10,1        | 7,2   | 5,5      | 8,3   | 12,6  |
|               | <b>EAE</b>       | 22    | 26          | 24,5  | 27,1     | 20,9  | 25    |
|               | <b>EHR</b>       | 32,2  | 34,5        | 21,3  | 33,9     | 21,2  | 25    |

EB: extrato bruto. EH: extrato hexano. EC: extrato clorofórmio. EAE: extrato acetato de etila. EHR: extrato hidroalcoólico remanescente. Controle positivo: Doxorubicina

FONTE: o autor (2017)

Assim, o teste de citotoxicidade revelou o EAE das folhas de *S. glandulosum* como detentor da melhor atividade antineoplásica, já que possui atividade contra todas as linhagens tumorais testadas, enquanto que não é tão ativo contra a linhagem de células normais utilizada neste teste. Já o controle positivo é ativo também contra as células VERO, fato este que não é ideal. Assim, o EAE pode ser um importante candidato a antitumoral, não ativo contra as células normais.

### 3.7.2 Avaliação de citotoxicidade de substâncias isoladas

Algumas das substâncias isoladas de *S. glandulosum* foram avaliadas para a citotoxicidade contra células SIHA (neoplasia de cérvix uterina escamosa humana com genoma de HPV16).

O isolado FOCAM02 apresentou atividade ( $CI_{50}$  11,03  $\mu\text{g/mL}$ ) contra a linhagem celular testada (TABELA 10), de acordo com Suffness e Pezzuto (1990) em que amostras ativas possuem  $CI_{50}$  inferior a 30  $\mu\text{g/mL}$ . Cabe ressaltar que esta amostra é a única entre as testadas que contém ácido elágico na sua composição, o

que sugere que este é o responsável pela atividade apresentada (GRÁFICO 3), fato este que condiz com relatos da literatura sobre esta substância. (KASIMSETTY et al., 2010; HUSSEIN; KHALIFA, 2014).

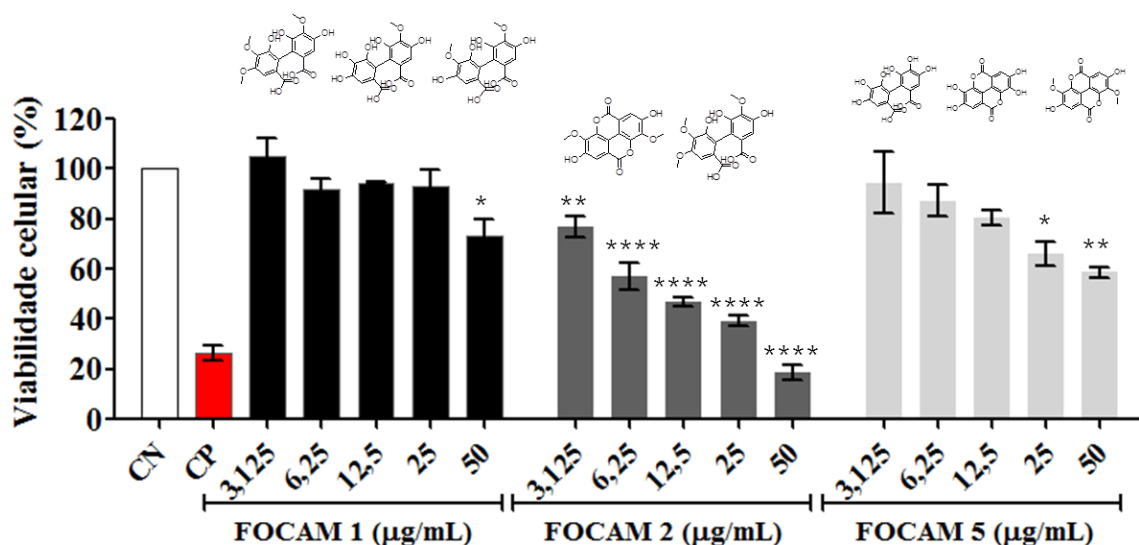
TABELA 10 – VALORES DE  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ), OBTIDOS NOS TESTES DE CITOTOXICIDADE DOS ISOLADOS FOCAM 1, FOCAM 2 E FOCAM 5

|        | <b>SIHA</b> |
|--------|-------------|
| FOCAM1 | 94,49       |
| FOCAM2 | 11,03       |
| FOCAM5 | 69,44       |

FONTE: o autor (2017)

O GRÁFICO 3 mostra que a dosagem de 50  $\mu\text{g/mL}$  da amostra FOCAM1 apresentou atividade estatisticamente diferente do controle negativo (CN). Do mesmo modo, todas as dosagens de FOCAM2 e as dosagens de 25  $\mu\text{g/mL}$  e 50  $\mu\text{g/mL}$  de FOCAM5 também foram ativas contra as células neoplásicas SIHA. As estruturas químicas presentes nas amostras estão representadas da esquerda para a direita em ordem decrescente de concentração em cada amostra. Dessa forma pode-se perceber que a atividade citotóxica é maior na amostra FOCAM2, amostra esta que contém derivados do ácido elágico como substância majoritária. Já a amostra FOCAM5, apesar de possuir ácido elágico na sua composição, tem maior concentração de ácido hexahidroxidifênico, o que possivelmente contribuiu com a menor atividade biológica. A amostra FOCAM1 conta apenas com derivados do ácido hexahidroxidifênico e nenhum derivado do ácido elágico e a sua atividade foi bastante inferior que das demais amostras.

GRÁFICO 3 – TESTE DE CITOTOXICIDADE DOS ISOLADOS DE *S. glandulosum* SOBRE AS CÉLULAS SIHA



Tratamento estatístico pelo teste de variância de uma via (ANOVA) e pós-teste de Tukey de comparações múltiplas. \* $p \leq 0,05$  \*\* $p \leq 0,01$  \*\*\* $p \leq 0,001$  \*\*\*\* $p \leq 0,0001$  em relação ao controle negativo. Controne negativo: DMSO. Controle positivo: Doxorrubicina

FONTE: o autor (2017)

Tais metabólitos secundários possuem a estrutura química derivada de duas unidades de ácido gálico, metabólito este que possui atividade contra a invasão de células de melanoma, mediada, pelo menos em parte pelas vias sinalizadoras Ras/ERK levando à redução da expressão gênica de MMP-2/9 e dos níveis de proteína. (ALQATHAMA; PRIETO, 2015).

Este teste mostra que a mistura de substâncias FOCAM2 é um candidato para futuro agente antitumoral contra a linhagem celular testada, uma vez que apresentou atividade estatisticamente diferente ( $p \leq 0,0001$ ) do controle negativo, no caso das amostras mais concentradas.

### 3.8 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

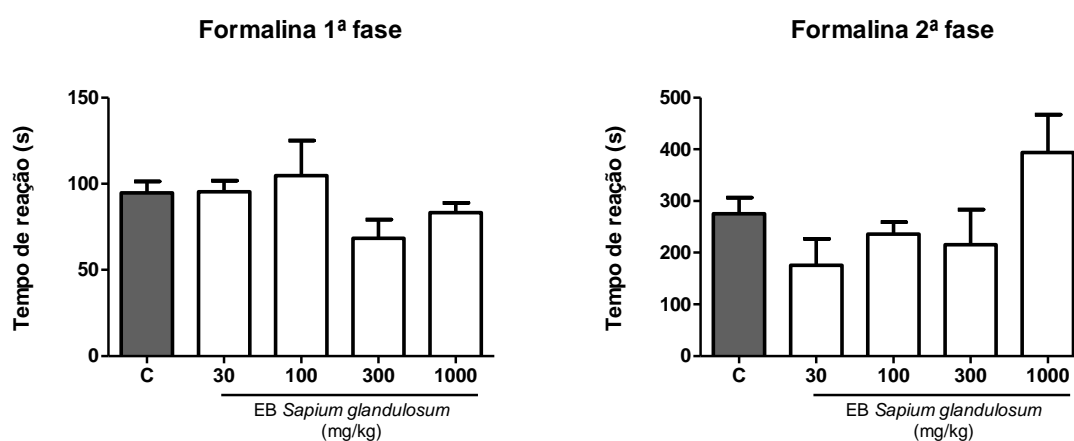
#### 3.8.1 Nocicepção induzida por formalina

O teste da formalina, originalmente desenvolvido por Dubuisson e Dennis (1977) foi planejado para testar analgesia por dor provocada por estímulo contínuo em ratos e gatos. Esta característica de estímulo contínuo se assemelha mais com a maioria das dores clínicas. Além disso, o teste da formalina permite a observação de

toda a gama de respostas comportamentais. Hunskaar et al. (1985) adaptaram o teste para a realização em camundongos. Este Teste avalia a resposta a dores moderadas e contínuas. O padrão de resposta a este estímulo de nocicepção provocado pela formalina é bifásico, isto é, se dá em duas fases. A primeira é a fase aguda, causada pelo estímulo direto dos nociceptores, e ocorre nos primeiros cinco minutos após a injeção e a segunda é a de origem inflamatória, de se dá após 15 a 30 min.

O GRÁFICO 4 mostra que as diferentes concentrações de extrato bruto das folhas de *S. glandulosum* não apresentaram ação antinociceptiva estatisticamente significativa em ambas as fases de dor aguda inflamatória (1ª fase) e de dor de origem inflamatória (2ª fase).

GRÁFICO 4 – TESTE DE NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *S. glandulosum*



C: controle negativo. EB: Extrato bruto. Tratamento estatístico pelo teste de variância de uma via (ANOVA) e pós-teste de Dunnett de comparações múltiplas

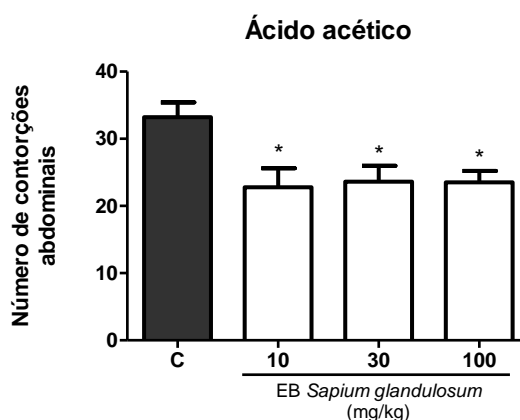
FONTE: o autor (2017)

### 3.8.2 Nocicepção induzida por ácido acético

Com a finalidade de avaliar a atividade antinociceptiva por mais de um método, foi também realizado o teste de nocicepção produzida pelo ácido acético. Neste caso, como mostra o GRÁFICO 5, houve atividade antinociceptiva estatisticamente diferente do controle negativo, porém a atividade obtida não foi dose-dependente, isto é, o teste demonstrou que todas as doses testadas obtiveram atividade estatisticamente equivalente entre si. O modelo de nocicepção induzida

pelo ácido acético é um modelo clássico de dor somato-visceral utilizado na triagem de substâncias com potencial analgésico. A administração intraperitoneal de uma solução de ácido acético provoca movimentos reflexivos, indicativos da presença de dor abdominal, caracterizados por contrações abdominais associadas à extensão das patas traseiras, além de diminuição da atividade motora. (LE BARS et al., 2001; MONTRUCCHIO, 2012). Esse método é um método mais sensível, que permite a identificação de analgésicos fracos (LE BARS et al., 2001), o que pode ser o caso dos extratos de *S. glandulosum*. Entretanto, este tipo de método é também menos específico, visto que muitas vezes é positivo para drogas não analgésicas, como anti-histamínicos, bloqueadores adrenérgicos, relaxantes musculares, entre outros. Assim, uma atividade positiva para este teste, não necessariamente significa que há, de fato, uma atividade analgésica. (LE BARS et al., 2001).

GRÁFICO 5 – TESTE DE NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *S. glandulosum*



C: controle negativo. EB: Extrato bruto. Tratamento estatístico pelo teste de variância de uma via (ANOVA) e pós-teste de Dunnett de comparações múltiplas \* $p \leq 0,05$  em relação ao controle  
 FONTE: o autor (2017)

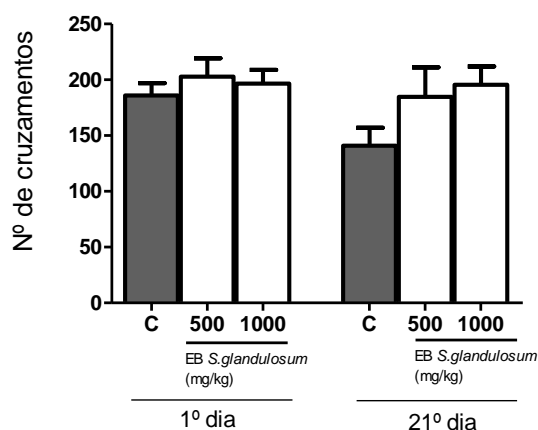
Ao realizar a avaliação comparativa entre os dois testes, mesmo levando-se em consideração a baixa especificidade do teste do ácido acético, não pode ser ignorada a possibilidade de que os extratos de *S. glandulosum* testados possuam um efeito analgésico fraco. O teste de formalina produz um estímulo relativamente forte de nocicepção e, no caso de analgésicos fracos, há a possibilidade de que a força do estímulo nociceptivo seja maior que a potência analgésica do extrato. Assim, considerando-se que o teste de nocicepção para formalina, menos sensível, não obteve resultado positivo e que houve uma atividade fraca no teste do ácido

acético e sabendo-se que este último não é um teste específico para nocicepção, seria recomendável realização de outros testes para esclarecer este ponto.

### 3.8.3 Avaliação da atividade locomotora

Os testes de atividade locomotora são realizados para verificar possíveis efeitos inespecíficos por parte dos extratos. O tratamento prolongado com as duas dosagens (500 e 1000 mg/kg) de extrato das folhas de *S. glandulosum* não causou alterações estatisticamente significativas no comportamento dos animais (GRÁFICO 6).

GRÁFICO 6 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA APÓS A ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *S. glandulosum*



C: controle negativo. EB: Extrato bruto. Tratamento estatístico pelo teste de variância de uma via (ANOVA) e pós-teste de Dunnett de comparações múltiplas

FONTE: o autor (2017)

Os dados obtidos no primeiro dia de avaliação da influência dos extratos administrados na atividade locomotora dos animais excluem a possibilidade de que o efeito antinociceptivo observado no teste do ácido acético esteja relacionado a uma diminuição da atividade locomotora causada por sedação. De acordo com este modelo experimental, pode-se então concluir que o uso dos extratos não interfere no comportamento locomotor dos animais e não causa sedação.

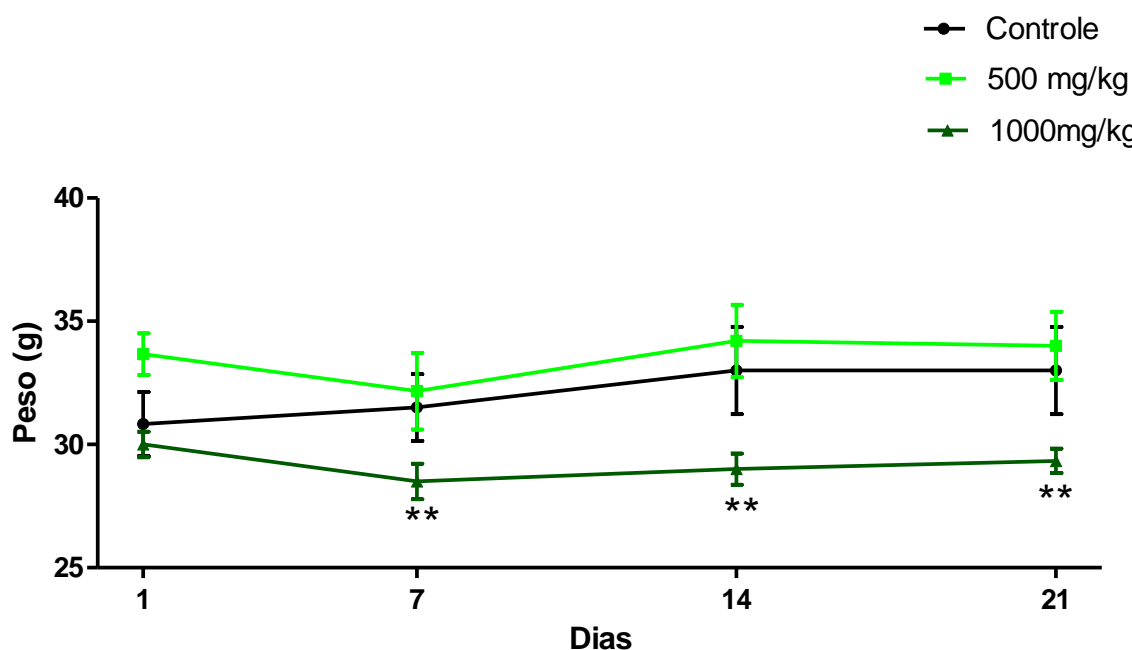


### 3.9 AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS EFEITOS TÓXICOS

#### 3.9.1 Ganho/perda de peso, peso relativo de órgãos, níveis de enzimas hepáticas e atividade locomotora após administração crônica

A avaliação de possíveis efeitos tóxicos se deu pela avaliação de distintos parâmetros. O primeiro fator observado foi o ganho ou a perda de peso dos animais, durante 21 dias de administração via oral do EB das folhas. De acordo com o GRÁFICO 7, observou-se que os animais que receberam diariamente o extrato das folhas de *S. glandulosum* na dosagem de 1000 mg/kg perderam peso em relação ao controle e aos animais que receberam o extrato das folhas de *S. glandulosum* na dosagem de 500 mg/kg.

GRÁFICO 7 – AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DE PESO DOS ANIMAIS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *S. glandulosum*



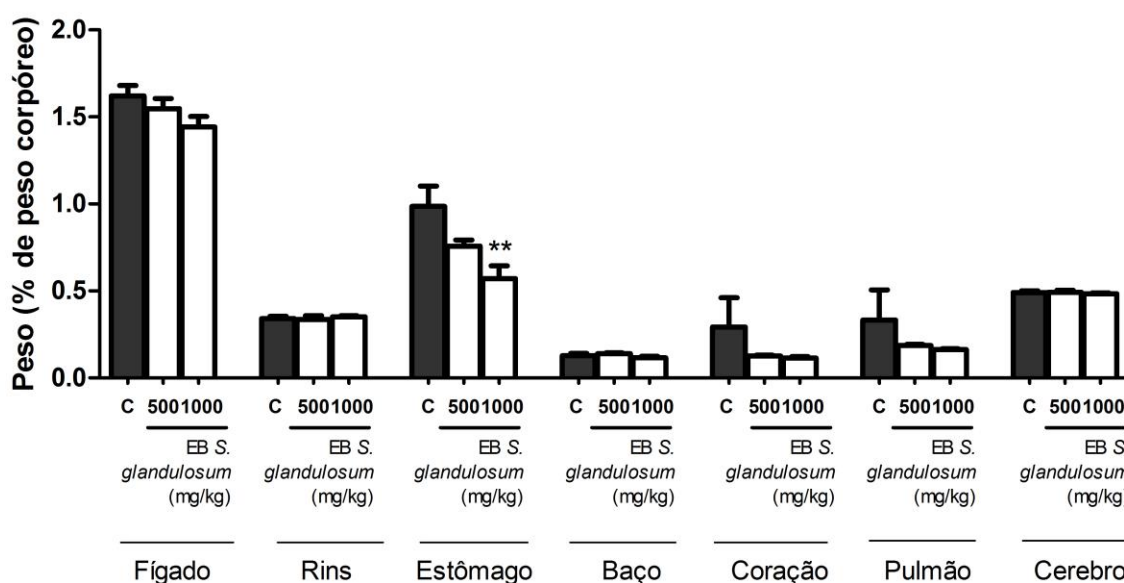
Tratamento estatístico pelo teste de variância de uma via (ANOVA) e pós-teste de Tukey de comparações múltiplas \* $p \leq 0,05$  \*\* $p \leq 0,01$  em relação ao controle negativo

FONTE: o autor (2017)

Esta perda de peso pode ser decorrente de uma diminuição no apetite em função da administração do extrato na dose mais alta. Tal diminuição poderia ser desencadeada por fatores organolépticos do referido extrato, ou por algum dano que ele cause ao aparelho digestório, que cause dor, ou que diminua a absorção de

nutrientes. De fato, ao observar o GRÁFICO 8 nota-se uma diminuição no peso do estômago, exatamente na mesma dose de 1000 mg/kg, mais um indício de que esta dose possa interferir de algum modo no aparelho digestório. Entretanto, mais testes seriam necessários para revelar a razão que levou à perda de peso destes animais.

GRÁFICO 8 – AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DE PESO DOS ÓRGÃOS DOS ANIMAIS EM RELAÇÃO AO PESO TOTAL DO ANIMAL APÓS A ADMINISTRAÇÃO DIÁRIA DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *S. glandulosum*



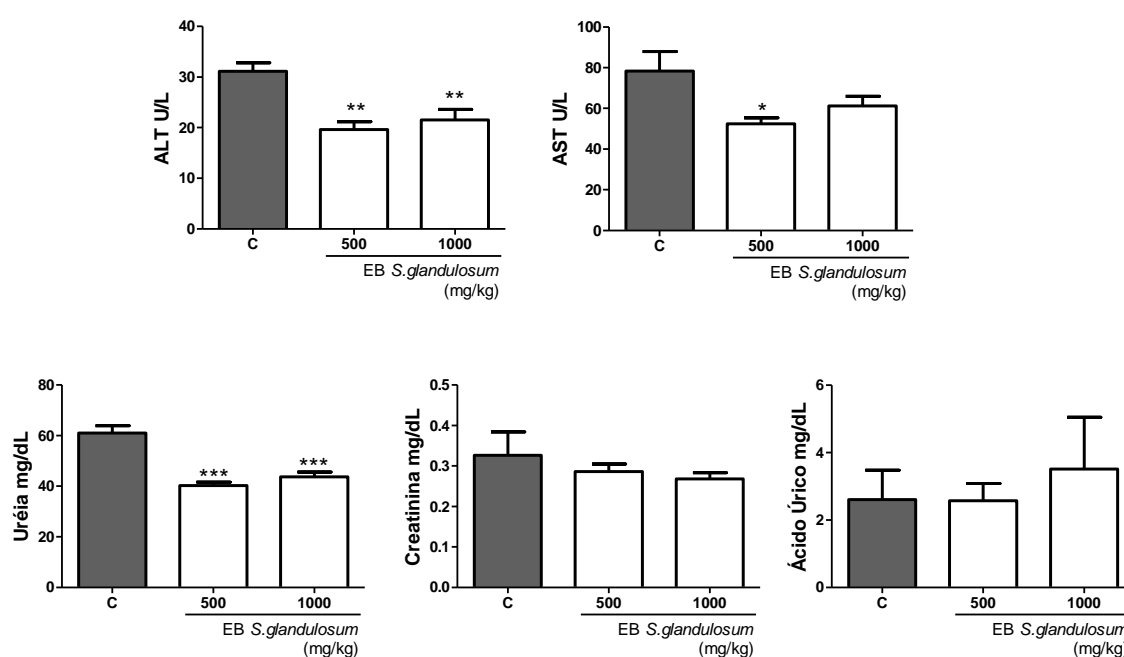
C: controle negativo. EB: Extrato bruto. Tratamento estatístico pelo teste de variância de uma via (ANOVA) e pós-teste de Tukey de comparações múltiplas  $**p \leq 0,01$  em relação ao controle negativo  
 FONTE: o autor (2017)

O GRÁFICO 8 também mostra que, em relação aos controles, não houve outras alterações estatisticamente significantes em relação ao peso dos órgãos dos animais que receberam os extratos das folhas de *S. glandulosum*.

Ainda buscando avaliar a segurança do extrato bruto das folhas de *S. glandulosum*, foram realizados testes bioquímicos, com o objetivo de avaliar a função hepática e renal dos animais tratados (GRÁFICO 9). A função hepática foi avaliada por meio da dosagem das transaminases aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Estas enzimas normalmente estão contidas dentro das células do fígado e, quando liberadas para a corrente sanguínea indicam a presença de algum problema no mesmo. A enzima AST é encontrada em diversos tecidos e não é um indicativo específico de lesões no fígado, podendo estar aumentada em caso de danos cardíacos, por exemplo. Já a enzima ALT é um

indicador mais específico de dano hepático. Os níveis enzimáticos séricos de AST e ALT (GRÁFICO 9) apresentaram-se reduzidos em relação ao controle. Isto significa que as doses testadas de extrato bruto das de *S. glandulosum* não apresentam toxicidade a nível hepático. O fato de que os níveis enzimáticos apresentaram-se reduzidos em relação ao controle poderia indicar um efeito hepatoprotetor, que pode ser causado pela presença de flavonoides como a rutina. (JANBAZ et al., 2002). Entretanto, para que este efeito fosse de fato confirmado seria necessária a realização de mais testes específicos. Já a função renal foi avaliada pelas dosagens de creatinina, ureia e de ácido úrico. Observou-se uma redução nos níveis séricos de ureia (GRÁFICO 9). Entretanto, um dano renal seria detectado apenas pelo aumento destes parâmetros bioquímicos, já que estes indicariam o mau funcionamento do sistema renal causado pela incapacidade de eliminar estas substâncias.

GRÁFICO 9 – AVALIAÇÃO DOS DADOS BIOQUÍMICOS DOS ANIMAIS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *S. glandulosum*



C: controle negativo. EB: Extrato bruto. Tratamento estatístico pelo teste de variância de uma via (ANOVA) e pós-teste de Tukey de comparações múltiplas \* $p \leq 0,05$  \*\* $p \leq 0,01$  \*\*\*  $p \leq 0,001$  em relação ao controle negativo

FONTE: o autor (2017)

Dessa forma, conclui-se que os parâmetros bioquímicos não sofreram alterações que revelem toxicidade pela administração do extrato bruto das folhas de *s. glandulosum*.

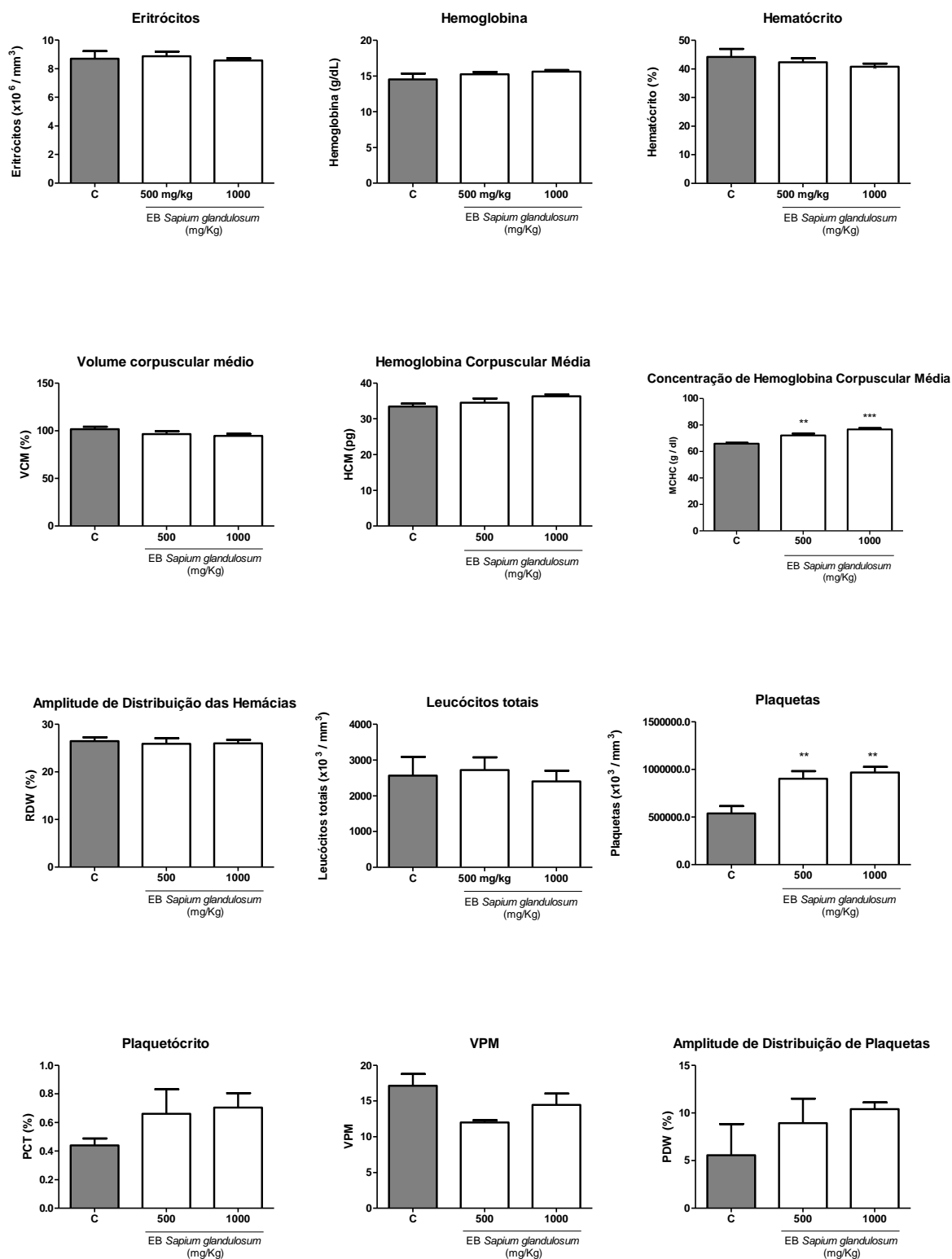
A avaliação dos parâmetros hematológicos (GRÁFICO 10) foi também realizada. No quesito série vermelha, todos os parâmetros avaliados obtiveram resultados estatisticamente iguais aos dos controles, com exceção do parâmetro Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). Os valores de CHCM para ambas as doses ficaram aumentados. Isto significa que houve uma hiperchromia em relação ao controle e que poderia haver esferocitose.

O perfil da série branca (GRÁFICO 10) foi considerado normal, já que a contagem de leucócitos dos animais tratados foi estatisticamente similar ao controle. Do mesmo modo, não houve alterações morfológicas nas células.

O perfil plaquetário (GRÁFICO 10) também foi considerado normal. Houve um aumento na contagem das plaquetas dos animais tratados em relação aos animais controle. Entretanto no caso da série plaquetária o principal problema seria uma trombocitopenia, ou seja, uma diminuição no número das plaquetas, fato este que não ocorreu com os animais tratados.

Dessa forma, os resultados das avaliações dos parâmetros de toxicidade *in vivo* indicam que a os extratos testados, apesar de serem ativos contra as linhagens de células tumorais testadas, não levaram a alterações bioquímicas, hematológicas e histopatológicas.

GRÁFICO 10 – AVALIAÇÃO DOS DADOS HEMATOLÓGICOS DOS ANIMAIS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *S. glandulosum*



C: controle negativo. EB: Extrato bruto. Tratamento estatístico pelo teste de variância de uma via (ANOVA) e pós-teste de Tukey de comparações múltiplas. \*\* $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle negativo

FONTE: o autor (2017)

### 3.9.2 Análise histopatológica

A análise histopatológica foi realizada nos órgãos fígado, rim e estômago. Foram avaliados fatores indicadores da presença de toxicidade. No fígado procurou-se observar inflamações, esteatose e necrose. Nos rins buscaram-se indícios como hialinização glomerular, glomerulite, cistificação e/ou inflamação dos túbulos renais e necrose tubular. No estômago os indicadores de alterações patológicas buscados foram gastrite, não integridade da mucosa, presença de inflamação e úlceras.

A avaliação das lâminas mostrou que não houve alterações indicativas de toxicidade por parte do extrato bruto das folhas de *S. glandulosum*. Os tecidos apresentaram-se morfológicamente normais.

## 4 CONCLUSÃO

O presente trabalho deu um passo adiante no estudo fitoquímico da família Haemodoraceae, identificando 19 metabólitos secundários da espécie *S. orinocensis*. O perfil metabólico da espécie apresentou-se similar ao perfil de outras espécies desta família. Foram identificados sete compostos inéditos na literatura, sendo que cinco são provavelmente artefatos relacionados à utilização do solvente acetona.

Ainda no campo da fitoquímica, o estudo da espécie *S. glandulosum* permitiu a identificação de dez compostos, dos quais três são inéditos na literatura. Os estudos de atividades biológicas de *S. glandulosum* detectaram atividades biológicas larvicida, antimicrobiana e citotóxica.

A atividade larvicida, contra o mosquito *Aedes aegypti* foi especialmente boa em alguns dos extratos avaliados. O objetivo da realização deste teste foi a detecção de fitotoxinas presentes nos extratos de *S. glandulosum*. Apesar de alguns extratos causarem algumas alterações no desenvolvimento das plântulas de *L. sativa*, as alterações não foram expressivas. Esta informação pode ser muito importante, se correlacionada com os estudos de atividade larvicida, já que mostram que a aplicação dos extratos, especialmente o extrato acetato de etila das folhas nas concentrações de até 500 mg/mL, para o controle da população de mosquitos possivelmente não vá afetar as plantas próximas ao local da aplicação do larvicida.

Outros resultados importantes foram as expressivas atividades antimicrobianas e citotóxica, que além de apresentarem números bastante importantes, não apresentaram toxicidade *in vivo* em relação aos parâmetros avaliados, já que estes não sofreram alteração em função da administração do extrato bruto das folhas de *s. glandulosum*. Estes resultados mostram que, apesar da atividade citotóxica *in vitro* obtida contra células tumorais, estes extratos não são tóxicos para as células normais dos camundongos, tornando a planta *S. glandulosum* uma importante candidata ao desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos e/ou antitumorais.

## REFERÊNCIAS

AL MUQARRABUN, L. M. R.; AHMAT, N.; ARIS, S. R. S. A review of the medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of the genus *Sapium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 1, p. 9-20, 8/8/ 2014. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874114003973> >.

ALQATHAMA, A.; PRIETO, J. M. Natural products with therapeutic potential in melanoma metastasis. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 8, p. 1170-1182, 2015. ISSN 0265-0568. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C4NP00130C> >.

ARRUDA, W.; OLIVEIRA, G. M. C.; SILVA, I. G. D. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 17-25, 2003. ISSN 0037-8682. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822003000100004&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822003000100004&nrm=iso) >.

BARNES, J. P.; PUTNAM, A. R. Role of benzoxazinones in allelopathy by rye (*Secale cereale* L.). **Journal of Chemical Ecology**, v. 13, n. 4, p. 889-906, 1987. ISSN 1573-1561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF01020168> >.

BAYER, E. et al. On-line coupling of high-performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance. **Journal of Chromatography A**, v. 186, n. 0, p. 497-507, 12/30/ 1979. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967300952701> >.

BAZAN, A. C.; EDWARDS, J. M. Phenalenone pigments of the flowers of *Lachnanthes tinctoria*. **Phytochemistry**, v. 15, n. 9, p. 1413-1415, // 1976. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942200971309> >.

BERDY, J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. **J Antibiot**, v. 65, n. 8, p. 385-395, 08//print 2012. ISSN 0021-8820. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2012.27> >.

BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P.; SASS, J. E. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Iowa State University Press, 1976. ISBN 0813802202.

BEUTLER, E.; COLLER, E. **Williams hematology**. McGraw-Hill, 2001. ISBN 0071162933.

BINDRA, R. S.; SATTI, N. K.; SURI, O. P. Isolation and structures of ellagic acid derivatives from *Euphorbia acaulis*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 7, p. 2313-2315, 1988/01/01 1988. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/003194228880150X> >.

BRASIL. **Regras para análise de sementes**: MAPA/ACS Brasília 2009.



BREITBACH, U. B. et al. Amazonian Brazilian medicinal plants described by C.F.P. von Martius in the 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 1, p. 180-189, 5/2/ 2013. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874113001396> >.

BRKLJAČA, R.; URBAN, S. HPLC-NMR and HPLC-MS Profiling and Bioassay-Guided Identification of Secondary Metabolites from the Australian Plant *Haemodorum spicatum*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 7, p. 1486-1494, 2015/07/24 2015. ISSN 0163-3864. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/np500905g> >.

BRKLJAČA, R.; WHITE, J. M.; URBAN, S. Phytochemical Investigation of the Constituents Derived from the Australian Plant *Macropidia fuliginosa*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 7, p. 1600-1608, 2015/07/24 2015. ISSN 0163-3864. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00161> >.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 8/1/ 2004. ISSN 0168-1605. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160504001680> >.

CAI, W.-H. et al. A glycerol  $\alpha$ -d-glucuronide and a megastigmane glycoside from the leaves of *Guettarda speciosa* L. **Journal of Natural Medicines**, v. 65, n. 2, p. 364-369, 2011. ISSN 1861-0293. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11418-010-0484-8> >.

CARVALHO, J. L. D. S. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico do *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae**. 2001. (Mestrado). Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná

CHAITHONG, U. et al. Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector Ecology**, v. 31, n. 1, p. 138-144, 2006/06/01 2006. ISSN 1081-1710. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.3376/1081-1710\(2006\)31\[138:LEOPPO\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.3376/1081-1710(2006)31[138:LEOPPO]2.0.CO;2) >. Acesso em: 2017/01/30.

CHARLES, J.-F.; NIELSEN-LEROUX, C. Mosquitocidal bacterial toxins: diversity, mode of action and resistance phenomena. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 201-206, 2000. ISSN 0074-0276. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762000000700034&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762000000700034&nrm=iso) >.

CHARLES, J. F.; DE BARJAC, H. Histopathologie de l'action de la  $\delta$ -endotoxine de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur les larves d'*Aedes aegypti* (Dip.:Culicidae). **Entomophaga**, v. 26, n. 2, p. 203-212, 1981. ISSN 1573-8248. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF02375033> >.

CHARRIÈRE-LADREIX, Y. Repartition intracellulaire du sécrétat flavonique de *Populus nigra* L. **Planta**, v. 129, n. 2, p. 167-174, 1976. ISSN 0032-0935.

CHEN, Y. et al. Phenylbenzoisoquinolindione alkaloids accumulate in stamens of *Xiphidium caeruleum* Aubl. flowers. **Phytochemistry**, 2016. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942216300917> >.

CHEN, Y. et al. Cultured roots of *Xiphidium caeruleum*: Phenylphenalenones and their biosynthetic and extractant-dependent conversion. **Phytochemistry**, v. 133, p. 15-25, 1// 2017. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942216302242> >.

CHOUIN-CARNEIRO, T. et al. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004543, 2016. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pntd.0004543> >.

CICCIA, G.; COUSSIO, J.; MONGELLI, E. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 1-2, p. 185-189, 9/1/ 2000. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874100002415> >.

CONEGERO, L. D. S. et al. Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). **Química Nova**, v. 26, p. 825-827, 2003. ISSN 0100-4042. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422003000600008&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000600008&nrm=iso) >.

COOKE, R.; SEGAL, W. Colouring matters of Australian plants. IV. Haemocorin: A unique glycoside from *Haemodorum corymbosum* Vahl. **Australian Journal of Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 107-113, 1955. Disponível em: < <http://www.publish.csiro.au/paper/CH9550107> >.

COOKE, R.; THOMAS, R. Colouring Matters of Australian Plants. XVIII. Constituents of *Anigozanthos rufus*. **Australian Journal of Chemistry**, v. 28, n. 5, p. 1053-1057, 1975. Disponível em: < <http://www.publish.csiro.au/paper/CH9751053> >.

COOKE, R. G. Phenylanthracene pigments of *Lachnanthes tinctoria*. **Phytochemistry**, v. 9, n. 5, p. 1103-1106, 5// 1970. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942200852334> >.

COOKE, R. G.; EDWARDS, J. M. Naturally occurring phenalenones and related compounds. **Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe**, v. 40, p. 153-90, 1981. ISSN 0071-7886 (Print) 0071-7886 (Linking).

CORDEIRO, I. et al. **Sapium. Lista de Espécies da Flora do Brasil**: Jardim Botânico do Rio de Janeiro 2015.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, October 1, 1999 1999. Disponível em: < <http://cmr.asm.org/content/12/4/564.abstract> >.

CULLING, C. F. A.; ALLISON, R.; BARR, W. **Cellular pathology technique**. Elsevier, 2014. ISBN 1483192199.

DA SILVA, C. B. et al. Byrsonima intermedia preparations inhibits trypsin and chymotrypsin activities from Aedes aegypti larval gut. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 8, n. 9, p. 416-422, 2014. ISSN 1996-0875.

DA SILVA, S. L. et al. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from Casearia sylvestris SW aqueous extract with anti-PLA2 activity. **Toxicon**, v. 52, n. 6, p. 655-666, 11// 2008. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010108004315> >.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174-181, 4// 2012. ISSN 0958-1669. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166911006756> >.

DALARMI, L. et al. Larvicidal activity of Dalbergia brasiliensis (Fabaceae-Papilionoideae) on Aedes aegypti. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 9, n. 35, p. 881-885, 2015. ISSN 1996-0816.

DE OLIVERIA, R. B.; GIMENEZ, V. M. M.; DE GODOY, S. A. P. Intoxicações com espécies da família Euphorbiaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. supl 1, p. 69-71, 2007.

DE OMENA, M. C. et al. Larvicidal activities against Aedes aegypti of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 13, p. 2549-2556, 9// 2007. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852406005049> >.

DELLA GRECA, M. et al. Phenalene metabolites from eichhornia crassipes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 2, n. 4, p. 311-314, // 1992. ISSN 0960-894X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X01802079> >.

DELLAGRECA, M.; PREVITERA, L.; ZARRELLI, A. Revised structures of phenylphenalene derivatives from Eichhornia crassipes. **Tetrahedron Letters**, v. 49, n. 20, p. 3268-3272, 5/12/ 2008. ISSN 0040-4039. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403908005194> >.

DIXON, R. A.; DEY, P. M.; LAMB, C. J. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 55, p. 1-136, 1983. ISSN 0065-258X (Print) 0065-258X (Linking).

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, n. 2, p. 161-74, Dec 1977. ISSN 0304-3959 (Print) 0304-3959 (Linking).

DUKE, S. O. Proving Allelopathy in Crop–Weed Interactions. **Weed Science**, v. 63, n. sp1, p. 121-132, 2015/01/01 2015. ISSN 0043-1745. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1614/WS-D-13-00130.1> >. Acesso em: 2016/06/22.

EDWARDS, J. M.; WEISS, U. Quinone methides derived from 5-oxa and 5-aza-9-phenyl-1-phenalenone in the flowers of *lachnanthes tinctoria* (haemodoraceae). **Tetrahedron Letters**, v. 13, n. 17, p. 1631-1634, // 1972. ISSN 0040-4039. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403901847055> >.

Euphorbiaceae. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. **Euphorbiaceae**, 2017. Disponível em: < <http://www.tropicos.org/Name/42000236> >. Acesso em: 27 Mar 2017.

FANG, J.; HÖLSCHER, D.; SCHNEIDER, B. Co-occurrence of phenylphenalenones and flavonoids in *Xiphidium caeruleum* Aubl. flowers. **Phytochemistry**, v. 82, n. 0, p. 143-148, 2012. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942212003081> >.

FANG, J.; KAI, M.; SCHNEIDER, B. Phytochemical profile of aerial parts and roots of *Wachendorfia thyrsiflora* L. studied by LC-DAD-SPE-NMR. **Phytochemistry**, v. 81, n. 0, p. 144-152, 9// 2012. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942212002452> >.

FEENY, P. et al. Luteolin 7-O-(6"-O-malonyl)- $\beta$ -d-glucoside and trans-chlorogenic acid: Oviposition stimulants for the black swallowtail butterfly. **Phytochemistry**, v. 27, n. 11, p. 3439-3448, 1988/01/01 1988. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0031942288807453> >.

FINNEY, D. J. **Probit analysis; a statistical treatment of the sigmoid response curve**. Oxford, England: Macmillan, 1947. xiii, 256.

FISHER, D. B. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. **Histochemie**, v. 16, n. 1, p. 92-96, 1968. ISSN 1432-119X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF00306214> >.

FRESHNEY, R. I. Cytotoxicity. In: (Ed.). **Culture of Animal Cells**: John Wiley & Sons, Inc., 2010. p.365-381. ISBN 9780470649367.

GAHAN, P.; KALINA, M. The use of tetrazolium salts in the histochemical demonstration of succinic dehydrogenase activity in plant tissues. **Histochemie**, v. 14, n. 1, p. 81-88, 1968. ISSN 0018-2222.

GANTER, P.; JOLLÈS, G. **Histochimie normale et pathologique**. Gauthier-Villars, 1969.

GOUVÊA JR, M. M. Time-spatial model on the dynamics of the proliferation of *Aedes aegypti*. **Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation**, v. 44, p. 130-143, 3// 2017. ISSN 1007-5704. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1007570416302593> >.

GRIFFITHS, L.; HORTON, R. Optimization of LC–NMR. III—Increased signal-to-noise ratio through column trapping. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 36, n. 2, p. 104-109, 1998. ISSN 1097-458X. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-458X\(199802\)36:2<104::AID-OMR230>3.0.CO;2-F](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-458X(199802)36:2<104::AID-OMR230>3.0.CO;2-F) >.

HADDAD, A. et al. Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas. **Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia**, 2007.

Haemodoraceae. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. **Haemodoraceae**, 2017. Disponível em: < <http://www.tropicos.org/Name/42000372> >. Acesso em: 27 Mar 2017.

HAJDU, Z.; HOHMANN, J. An ethnopharmacological survey of the traditional medicine utilized in the community of Porvenir, Bajo Paraguá Indian Reservation, Bolivia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 3, p. 838-857, 2/15/ 2012. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037887411100907X> >.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 985-990, 1999. ISSN 1365-2672. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x> >.

HAN, X. H. et al. Monoamine oxidase inhibitory components from *Cayratia japonica*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 30, n. 1, p. 13, 2007. ISSN 1976-3786. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF02977772> >.

HARTBERG, W. K.; CRAIG, G. B. Reproductive Isolation in *Stegomyia* Mosquitoes. II. Hybrid Breakdown Between *Aedes aegypti* and *A. mascarensis*. **Evolution**, v. 24, n. 4, p. 692-703, 1970. ISSN 00143820, 15585646. Disponível em: < <http://www.jstor.org/stable/2406550> >.

HE, D. et al. Separation and Purification of Phenolic Acids and Myricetin from Black Currant by High-Speed Countercurrent Chromatography. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 32, n. 20, p. 3077-3088, 2009/11/18 2009. ISSN 1082-6076. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/10826070903320756> >. Acesso em: 2014/01/29.

HIDALGO, W. et al. Phenylphenalenones protect banana plants from infection by *Mycosphaerella fijiensis* and are deactivated by metabolic conversion. **Plant, Cell & Environment**, v. 39, n. 3, p. 492-513, 2016. ISSN 1365-3040. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/pce.12630> >.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031, 2002. ISSN 0074-0276. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762002000700017&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762002000700017&nrm=iso) >.

HOLSCHER, D. et al. Phenalenone-type phytoalexins mediate resistance of banana plants (*Musa* spp.) to the burrowing nematode *Radopholus similis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 1, p. 105-10, Jan 7 2014. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24324151> >.

HÖLSCHER, D.; SCHNEIDER, B. Phenylphenalenones from root cultures of *Anigozanthos preissii*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 1, p. 87-91, 5// 1997. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942296006796> >.

HÖLSCHER, D.; SCHNEIDER, B. Phenalenones from *Strelitzia reginae*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1027-1028, 2000/07/01 2000. ISSN 0163-3864. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/np000035c> >.

HÖLSCHER, D.; SCHNEIDER, B. The biosynthesis of 8-phenylphenalenones from *Eichhornia crassipes* involves a putative aryl migration step. **Phytochemistry**, v. 66, n. 1, p. 59-64, 1// 2005. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942204005515> >.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 1, p. 69-76, 6// 1985. ISSN 0165-0270. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0165027085901165> >.

HUSSEIN, R. H.; KHALIFA, F. K. The protective role of ellagitannins flavonoids pretreatment against N-nitrosodiethylamine induced-hepatocellular carcinoma. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 6, p. 589-596, 12// 2014. ISSN 1319-562X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X14000333> >.

JANBAZ, K. H.; SAEED, S. A.; GILANI, A. H. Protective effect of rutin on paracetamol- and CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in rodents. **Fitoterapia**, v. 73, n. 7-8, p. 557-563, 12// 2002. ISSN 0367-326X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X02002174> >.

JAROSZEWSKI, J. W. Hyphenated NMR Methods in Natural Products Research, Part 1: Direct Hyphenation. **Planta Med**, v. 71, n. 08, p. 691-700, // 05.09.2005 2005. ISSN 0032-0943.

JELASSI, A. et al. Phytochemical composition and allelopathic potential of three Tunisian *Acacia* species. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 339-345, 5// 2016. ISSN 0926-6690. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669016300206> >.

JOHANSEN, D. A. Plant microtechnique. **Plant microtechnique.**, 1940.

JONES, W.; KINGHORN, A. D. Extraction of Plant Secondary Metabolites. In: SARKER, S. D. e NAHAR, L. (Ed.). **Natural Products Isolation**: Humana Press,

v.864, 2012. cap. 13, p.341-366. (Methods in Molecular Biology). ISBN 978-1-61779-623-4.

KASIMSETTY, S. G. et al. Colon Cancer Chemopreventive Activities of Pomegranate Ellagitannins and Urolithins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 2180-2187, 2010/02/24 2010. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf903762h> >.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, n. 2, p. 155-176, 2016. ISSN 1476-5535. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-015-1723-5> >.

KHAC, D. D. et al. Ellagic compounds from *Diplopanax stachyanthus*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 1, p. 251-256, 1990/01/01 1990. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/003194229089044A> >.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E. **Acetic acid for analgesic screening**. Federation Proceedings, v. 18, p. 412-417, 1959.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Edur Rio de Janeiro, 1997.

LAI, X. Z.; YANG, Y. B.; SHAN, X. L. The Investigation of Euphorbiaceous Medicinal Plants in Southern China. **Economic Botany**, v. 58, p. S307-S320, 2004. ISSN 00130001, 18749364. Disponível em: < <http://www.jstor.org/stable/4256927> >.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal Models of Nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.

LEE, S.-H. et al. Hydrolysable tannins from *Euphorbia thymifolia*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 11, p. 3621-3625, 1990/01/01 1990. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/003194229085288Q> >.

LI, X.-C. et al. NMR assignments of ellagic acid derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 37, n. 11, p. 856-859, 1999. ISSN 1097-458X. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-458X\(199911\)37:11<856::AID-MRC529>3.0.CO;2-X](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-458X(199911)37:11<856::AID-MRC529>3.0.CO;2-X) >.

LI, Y.-L. et al. Flavonoids and a New Polyacetylene from *Bidens parviflora* Willd. **Molecules**, v. 13, n. 8, p. 1931, 2008. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1420-3049/13/8/1931> >.

LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K.; WILSON, I. D. Directly coupled HPLC–NMR and HPLC–NMR–MS in pharmaceutical research and development. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 748, n. 1, p. 233-258, 10/1/ 2000. ISSN 0378-4347. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378434700003200> >.

LUIS, J. G. et al. Phenalenone-type phytoalexins from *Musa acuminata* synthesis of 4-phenyl-phenalenones. **Tetrahedron**, v. 50, n. 37, p. 10963-10970, // 1994. ISSN 0040-4020. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040402001857070> >.

MAAS, P.; MAAS, H. Maas, P., Maas, H. 2015. **Haemodoraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. 2015. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB110671> >. Acesso em: 22 Jan. 2017.

MACÍAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. G. Search for a Standard Phytotoxic Bioassay for Allelochemicals. Selection of Standard Target Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000/06/01 2000. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf9903051> >.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination—aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962. ISSN 0011-183X.

MALHEIROS, A. et al. Alelopatia: interações químicas entre espécies. **Yunes RA, Calixto JB. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos**, p. 503-523, 2001.

MASON, T. L.; BRUCE P, W. Inactivation of red beet  $\beta$ -glucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. **Phytochemistry**, v. 26, n. 8, p. 2197-2202, 1987/01/01 1987. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003194220084683X> >.

MCMANUS, J. F. A. Histological and Histochemical Uses of Periodic Acid. **Stain Technology**, v. 23, n. 3, p. 99-108, 1948/01/01 1948. ISSN 0038-9153. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/10520294809106232> >.

MENDES, D. A. G. B. et al. Hydroalcoholic extract of *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax displays potent anti-inflammatory activities through a glucocorticoid receptor-dependent pathway. **Phytomedicine**, v. 23, n. 13, p. 1610-1620, 12/1/ 2016. ISSN 0944-7113. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711316301787> >.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. Anatomy of the dicotyledons, Vols. 1 & 2. **Anatomy of the dicotyledons, Vols. 1 & 2**, 1950.

MILLER, J. M.; BOHM, B. A. Flavonoids of *Leptarrhena pyrolifolia*. **Phytochemistry**, v. 18, n. 8, p. 1412-1413, 1979/01/01 1979. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0031942279830411> >.

MOLISCH, H. **Der Einfluss einer Pflanze auf die andere, Allelopathie**. Jena: Fischer, 1937.

MONTELLA, I. R. et al. Insecticide Resistance Mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* Populations from 2001 to 2004. **The American Journal of Tropical**



**Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 3, p. 467-477, September 1, 2007 2007. Disponível em: < <http://www.ajtmh.org/content/77/3/467.abstract> >.

MONTRUCCHIO, D. P. **Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato e do alcalóide S-(+)-dicentrina extraído de frutos de Ocotea puberula (Lauraceae)**. 2012. 163 (Ph. D.). Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983/12/16 1983. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022175983903034> >.

MWINE, J. T.; VAN DAMME, P. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 5, p. 652-662, 2011. ISSN 1996-0875.

NAPOLITANO, J. G. et al. Complete <sup>1</sup>H NMR spectral analysis of ten chemical markers of Ginkgo biloba. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 50, n. 8, p. 569-575, 2012. ISSN 1097-458X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/mrc.3829> >.

NCCLS. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Second Edition**. NCCLS document M27-A2 (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA 2002.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, Mar 2012. ISSN 0163-3864. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000301810700002 > >.

OCAMPOS, F. M. M. **Estudo Fitoquímico, toxicológico e avaliação das atividades biológicas da espécie vegetal *Sapium glandulosum* (L.) Morong. (Euphorbiaceae)**. 2013. 100 (Mestrado). Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

OCAMPOS, F. M. M. et al. NMR in Chemical Ecology: An Overview Highlighting the Main NMR Approaches. In: (Ed.). **eMagRes**: John Wiley & Sons, Ltd, 2017. ISBN 9780470034590.

OPITZ, S. et al. Phenylphenalenone-Related Compounds: Chemotaxonomic Markers of the Haemodoraceae from Xiphidium caeruleum. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 8, p. 1122-1130, 2002/08/01 2002. ISSN 0163-3864. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/np020083s> >.

OPITZ, S.; SCHNEIDER, B. Organ-specific analysis of phenylphenalenone-related compounds in Xiphidium caeruleum. **Phytochemistry**, v. 61, n. 7, p. 819-825, 12// 2002. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003194220200359X> >.

OPITZ, S. et al. Histochemical analysis of phenylphenalenone-related compounds in *Xiphidium caeruleum* (Haemodoraceae). **Planta**, v. 216, n. 5, p. 881-889, 2003. ISSN 1432-2048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-002-0941-z> >.

OTÁLVARO, F. et al. O-Methylation of phenylphenalenone phytoalexins in *Musa acuminata* and *Wachendorfia thyrsiflora*. **Phytochemistry**, v. 71, n. 2–3, p. 206-213, 2010. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942209004580> >.

PAULETE, J.; BEÇAK, W. Técnicas de Citologia e Histologia. **Livros Técnicos e Científicos, São Paulo**, v. 2, 1976.

PEARSE, A.; STOWARCI, P. **Histochemistry, Theoretical and Applied, Vol 1. Preparative and Optical Technology, Vol 2. Analytical Technique, Vol 3. Enzyme Histochemistry**. Chur-chill-Livingstone. Edinburgh, v. 1985, p. 1991, 1980.

PERUMALSAMY, H. et al. Novel Histopathological and Molecular Effects of Natural Compound Pellitorine on Larval Midgut Epithelium and Anal Gills of *Aedes aegypti*. **PLOS ONE**, v. 8, n. 11, p. e80226, 2013. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0080226> >.

The Plant List. 2013. Disponível em: < <http://www.theplantlist.org/> >. Acesso em: 21/04/2016.

PRICE, M. L.; VAN SCOYOC, S.; BUTLER, L. G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 1214-1218, 1978. ISSN 0021-8561.

QUINTAS, A. Novo material de apoio para cortes histológicos. **Revista da Faculdade de Agronomia UFRGS**, v. 6, p. 51-55, 1963.

RAHUMAN, A. A. et al. Larvicidal activity of some Euphorbiaceae plant extracts against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 102, n. 5, p. 867-873, 2008. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-007-0839-6> >.

RICE, E. L. **Allelopathy**. Academic Press, 1984. ISBN 9780125870559. Disponível em: < <https://books.google.co.in/books?id=0WKA6fxeXpwC> >.

RICHARDS, A. G.; RICHARDS, P. A. The peritrophic membranes of insects. **Annual review of entomology**, v. 22, n. 1, p. 219-240, 1977. ISSN 0066-4170.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, n. 2–3, p. 127-149, 1988. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378874188900013> >. Acesso em: 1988/8//.

RODRIGUES, A. L. S. et al. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*.

**Life Sciences**, v. 70, n. 12, p. 1347-1358, 2002/02/08 2002. ISSN 0024-3205. Disponible em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320501014989> >.

RODRÍGUEZ, L.; COLONNELLO, G. Caracterización florística de ambientes de la cuenca baja del Río Cucurital, afluente del Río Caroní, Estado Bolívar, Guayana Venezolana. **Acta Amazonica**, v. 39, p. 35-52, 2009. ISSN 0044-5967. Disponible em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0044-59672009000100004&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59672009000100004&nrm=iso) >.

ROESER, K. Die nadel der schwarzkiefer-massenprodukt und kunstwerk der natur. **Mikrokosmos**, v. 61, n. 2, p. 33-36, 1972.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991/01/01 1991. ISSN 0031-9422. Disponible em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/003194229183426L> >.

SCALBERT, A. Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. In: (Ed.). **Plant polyphenols**: Springer, 1992. p.259-280.

SCHMIDT, O. T.; BLINN, F.; LADEMANN, R. Über die Bindung der Ellagsäure in Corilagin und Chebulagsäure. XII. Mitteilung über natürliche Gerbstoffe. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 576, n. 2, p. 75-84, 1952. ISSN 1099-0690. Disponible em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jlac.19525760202> >.

SCHMIDT, O. T. et al. Benzyläther der Ellagsäure und Hexaoxy-diphensäure XVI. Mitteilung über natürliche Gerbstoffe. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 586, n. 1, p. 165-178, 1954. ISSN 1099-0690. Disponible em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jlac.19545860111> >.

SCHNEIDER, B. Chemical Ecology. In: (Ed.). **eMagRes**: John Wiley & Sons, Ltd, v.2, 2013. p.451-466. ISBN 9780470034590.

SCHNEIDER, B.; HÖLSCHER, D. Laser microdissection and cryogenic nuclear magnetic resonance spectroscopy: an alliance for cell type-specific metabolite profiling. **Planta**, v. 225, n. 3, p. 763-770, 2007. ISSN 1432-2048. Disponible em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-006-0404-z> >.

SCHUFFENECKER, I. et al. Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak. **PLOS Medicine**, v. 3, n. 7, p. e263, 2006. Disponible em: < <http://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pmed.0030263> >.

SCHULTES, R. E. De Plantis Toxicariis e Mundo Novo Tropicale Commentationes XXIII: NOTES ON BIODYNAMIC PLANTS OF ABORIGINAL USE IN THE NORTHWESTERN AMAZONIA. **Botanical Museum Leaflets, Harvard University**, v. 26, n. 5, p. 177-197, 1978. ISSN 00068098. Disponible em: < <http://www.jstor.org/stable/41762796> >.

SCHULTES, R. E. DE PLANTIS TOXICARIIS E MUNDO NOVO TROPICALE COMMENTATIONES XXVI: ETHNOPHARMACOLOGICAL NOTES ON THE FLORA

OF NORTHWESTERN SOUTH AMERICA. **Botanical Museum Leaflets, Harvard University**, v. 28, n. 1, p. 1-45, 03/1980 1980.

SCHULTES, R. E. Plants in treating senile dementia in the northwest Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 38, n. 2–3, p. 121-128, 3// 1993. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037887419390007R> >.

SCHULZ, S.; KUBANEK, J.; PIEL, J. Editorial: Chemical Ecology. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 7, p. 886-887, 2015. ISSN 0265-0568. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C5NP90027A> >.

SCOGNAMIGLIO, M. et al. Metabolomics: an unexplored tool for allelopathy studies. **Journal of Allelochemical Interactions**, v. 1, p. 9-23, 2015.

SENTHILKUMAR, S.; KRISHNAMURTHY, K. Peroxidase and acid phosphatase activity in the ground orchid *Spathoglottis plicata* with special reference to mycorrhiza. **Mycorrhiza News**, v. 10, n. 4, p. 11-13, 1999.

SHIMIZU, K. et al. Screening of extracts of Japanese woods for melanin biosynthesis inhibition. **Journal of Wood Science**, v. 53, n. 2, p. 153-160, 2007. ISSN 1611-4663. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10086-006-0824-1> >.

SILVA, C. et al. Phytochemical profile and antibacterial activity of bark and leaves of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. and *Sapium glandulosum* (L.) Morong. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 32, p. 4766-4771, 2012. ISSN 1996-0875.

SILVA, C. H. T. P. D. et al. Antioxidant Capacity and Phenolic Content of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. and *Sapium glandulosum* (L.) Morong from Northeastern Brazil. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 4728, 2011. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1420-3049/16/6/4728> >.

SIMPSON, M. G. Haemodoraceae. In: KUBITZKI, K. (Ed.). **Flowering Plants Monocotyledons**: Springer Berlin Heidelberg, v.4, 1998. cap. 20, p.212-222. (The Families and Genera of Vascular Plants). ISBN 978-3-642-08378-5.

SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J Natl Cancer Inst**, v. 82, n. 13, p. 1107-12, Jul 04 1990. ISSN 0027-8874 (Print) 0027-8874 (Linking).

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J.; KLEIN, R. M. **Flora Ilustrada Catarinense planejada e editada por Raulino Reitz: Euphorbiáceas**. Itajaí, SC, Brasil: Herbário Barbosa Rodrigues, 1988.

SOBOTTKA, A. M.; GÖRICK, C.; MELZIG, M. F. Analysis of diterpenoid compounds from the latex of two Euphorbiaceae by liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry. **Natural Product Research**, p. 1-4, 2015. ISSN 1478-6419. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2015.1088542> >.

SOBOTTKA, A. M. et al. Proteinase activity in latex of three plants of the family Euphorbiaceae. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, p. 559-565, 2014. ISSN 1984-8250. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-82502014000300559&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-82502014000300559&nrm=iso) >.

STEARNS, W. T. Botanical Latin. revised. **David & Charles, Newton Abbot, London and North Pomfret, Vermont**, 1983.

STONE, M. J.; WILLIAMS, D. H. On the evolution of functional secondary metabolites (natural products). **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 29-34, 1992. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb00834.x> >.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. **Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity**, v. 6, p. 71-133, 1990.

SUMNER, L. W. et al. Modern plant metabolomics: advanced natural product gene discoveries, improved technologies, and future prospects. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 2, p. 212-229, 2015. ISSN 0265-0568. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C4NP00072B> >.

SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, n. 6, p. 817-836, 3// 2003. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942202007082> >.

TERNAI, B.; MARKHAM, K. R. Carbon-13 NMR studies of flavonoids—I : Flavones and flavonols. **Tetrahedron**, v. 32, n. 5, p. 565-569, // 1976. ISSN 0040-4020. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004040200193772X> >.

TERRA, W. R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 47, n. 2, p. 47-61, 2001. ISSN 1520-6327. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/arch.1036> >.

VASILAKIS, N.; WEAVER, S. C. Flavivirus transmission focusing on Zika. **Current Opinion in Virology**, v. 22, p. 30-35, 2// 2017. ISSN 1879-6257. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1879625716301870> >.

VOIGT, W. Sulforhodamine B Assay and Chemosensitivity. In: BLUMENTHAL, R. D. (Ed.). **Chemosensitivity: Volume 1 In Vitro Assays**. Totowa, NJ: Humana Press, 2005. p.39-48. ISBN 978-1-59259-869-4.

WANG, P.; GRANADOS, R. R. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 13, p. 6977-6982, 10/17/received 04/30/accepted 1997. ISSN 0027-8424 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC21270/> >.

WATANABE, N.; NIKI, E. Direct-Coupling of FT-NMR to High Performance Liquid Chromatography. **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 54, n. 4, p. 194-199, 1978.

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

WILLIAMS, D. H. et al. Why Are Secondary Metabolites (Natural Products) Biosynthesized? **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 6, p. 1189-1208, 1989/11/01 1989. ISSN 0163-3864. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/np50066a001> >.

YADAV, A. K. et al. Flavone Glycoside Based Validated RP-LC Method for Quality Evaluation of Prishniparni (*Uraria picta*). **Chromatographia**, v. 69, n. 7, p. 653-658, 2009. ISSN 1612-1112. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1365/s10337-009-0963-9> >.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **PAIN**, v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983. ISSN 0304-3959. Disponível em: < [http://journals.lww.com/pain/Fulltext/1983/06000/Ethical\\_guidelines\\_for\\_investigations\\_of.1.aspx](http://journals.lww.com/pain/Fulltext/1983/06000/Ethical_guidelines_for_investigations_of.1.aspx) >.

**ANEXO 1 - AUTORIZAÇÃO DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE  
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS

**AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO  
GENÉTICO REALIZADA DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO CGEN Nº35,  
DE 27 DE ABRIL DE 2011  
Nº 03/2014**

**O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS**, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 40, de 24 de setembro de 2003, para autorizar instituição nacional, pública ou privada, que exerça atividade de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, **autoriza** com amparo na Resolução CGEN nº 35, de 27 de abril de 2011, que dispõe sobre regularização de atividades de acesso ao patrimônio genético e/ou ao conhecimento tradicional associado e sua exploração econômica realizadas em desacordo com a Medida Provisória no 2.186-16, de 23 de agosto de 2001 e demais normas, **as atividades de acesso ao patrimônio genético desenvolvidas pela:**


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**, CNPJ/MF nº. 75.095.679/0001-49, situada na Rua XV de Novembro, 1299, Curitiba-PR, CEP: 80060-000, e representada na pessoa do Reitor Zaki Akel Sobrinho, RG nº. 1.439.536-9 SSP/PR, CPF nº. 359.063.759-53, no âmbito das atividades do projeto de pesquisa "*Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais*".

**Objetivo da Autorização:** Avaliar sob aspecto morfoanatômico, químico e biológico das espécies acessadas constantes do projeto de pesquisa.

**Período das atividades: 2000 a 2019.**

**Validade da Autorização: Cinco anos**, contados da assinatura. Em razão da continuidade do projeto de pesquisa, a instituição detentora desta autorização deverá enviar ao Ibama, a partir da emissão da licença, **relatório anual** sobre a execução das atividades de pesquisa, nos termos do Decreto nº. 4.946/2003 e Resolução CGEN nº 41/2013. Endereço para envio do relatório: IBAMA/DBFLO, SCEN L4 Norte, Bloco B, Brasília-DF, CEP: 70818-900.

Esta autorização das atividades de acesso está vinculada às informações e termos assinados pelo requerente, constantes do processo nº **02001.001165/2013-47**.

  
Volney Zanardi Junior  
Presidente

Brasília, 17 de março de 2014.

## ANEXO 2 - AUTORIZAÇÃO DE COLETA



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

|                 |                                   |
|-----------------|-----------------------------------|
| Número: 47350-4 | Data da Emissão: 10/12/2014 20:25 |
|-----------------|-----------------------------------|

#### Dados do titular

|                                     |                     |
|-------------------------------------|---------------------|
| Nome: Fernanda Maria Marins Ocampos | CPF: 052.552.749-41 |
|-------------------------------------|---------------------|

SISBIO

#### Observações e ressalvas

|   |   |
|---|---|
| 1 | As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.  |
| 2 | A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras. |
| 3 | O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.   |
| 4 | É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade   |
| 5 | Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.  |
| 6 | A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).  |
| 7 | Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.  |
| 8 | Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .   |

#### Táxons autorizados

| # | Nível taxonômico | Táxon(s)  |
|---|------------------|---|
| 1 | ESPÉCIE          | Sapium spp., Schiekia orinocensis, Sapium glandulosum |
| 2 | FAMÍLIA          | Haemodoraceae   |

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 19147124**



Página 1/1



## ANEXO 3 - CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
(CEUA)



Nº 794

### CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

### CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".


**PROCESSO:** 23075.011375/2014-31

**APROVADO:** 22/05/2014 – R.O. 04/2014

**TÍTULO:** Investigação farmacológica de extratos vegetais utilizados popularmente – ênfase em atividades antinociceptiva e anti-inflamatória

**AUTORES:** Deise Prehs Montrucchio, Fernanda Maria Martins Ocampos, Daniella Maria Soares de Oliveira, Ana Flávia Schvabe Duarte, Mariana Saragioto Krause, Vinicius Bednarczuck de Oliveira, Luciane Dalarmi

**DEPARTAMENTO:** Farmácia (Setor de Ciências da Saúde)

  
Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio  
Coordenador da CEUA

