



UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

CINTHIA COSTA DE LIMA

ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADES LARVICIDA E ANTIOXIDANTE DE *Tetracera breyniana* Schltdl. (DILLENIACEAE)

Universidade Federal de Alagoas

Campus A. C. Simões
Tabuleiro do Martins
57072-970 - Maceió-AL



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



CINTHIA COSTA DE LIMA

ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADES LARVICIDA E ANTIOXIDANTE DE *Tetracera breyniana* Schltdl. (DILLENIACEAE)

Maceió-AL
2012

CINTHIA COSTA DE LIMA

ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADES LARVICIDA E ANTIOXIDANTE DE *Tetracera breyniana* Schlttdl. (DILLENIACEAE)

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, para obtenção do título de mestre em química orgânica.

Orientadora: **Prof^a. Dr^a. Lúcia Maria Conserva**

Maceió-AL
2012

**Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

L732e Lima, Cinthia Costa de.
Estudo químico e atividades larvicida e antioxidante de *Tetracera breyniana* Schltdl. (Dilleniaceae) / Cinthia Costa de Lima. – 2012.
94 f. : il., grafs. e tabs.

Orientador: Lucia Maria Conserva.
Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2012.

Bibliografia. f. 87-94.

1. Dilleniaceae. 2. *Tetracera breyniana*. 3. Dengue. 4. Antioxidante. I.
Título.

CDU: 543.6/.9



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1384, Fax (82) 3214-1384
email: cpgqb@qui.ufal.br

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de **Cinthia Costa de Lima**, intitulada: "**Estudo Químico e Atividades Larvicida e Antioxidante de *Tetracera breyniana* Schldl. (Dilleniaceae)**", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 13 de março de 2012, às 13h30min, na Sala de Aulas do PPGQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Prof.^a Dr.^a Lucia Maria Conserva
Orientadora – PPGQB/IQB/UFAL

Prof.^a Dr.^a Eurica Adélia Nogueira Ribeiro
ESENFAR/UFAL

Prof. Dr. Edson de Souza Bento
PPGQB/IQB/UFAL

Dedico a realização deste trabalho ao ser em si, Deus-Amor, que se revela e dá a conhecer na ordem e beleza do mundo, trazendo luz, à busca do conhecimento e ao sentido da vida;

A minha família em especial aos meus pais **José A. de Lima (*in memorian*) e Josefa Síría C. de Lima**, pela dedicação e amor durante toda a vida;

A minha irmã **Apoliana**, pela compreensão, amizade e apoio nesta trajetória trilhada;

Ao **Ruy**, pelo carinho e incentivo, durante estes anos, ao qual dedico gratidão extensiva.

AGRADECIMENTOS

A **Prof^a. Dr^a. Lucia Maria Conserva**, por todo conhecimento transmitido durante o desenvolvimento deste trabalho, bem como pelo exemplo de profissionalismo, oportunidade, amizade.

A botânica **MSc. Rosângela Pereira de Lyra Lemos**, do Instituto do Meio Ambiente/AL, pela coleta e identificação do material vegetal;

Ao **Prof. Dr. Edson de Souza Bento** e o técnico **MSc. Adilson Rodrigues Sabino** do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, pelos espectros de RMN;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela Bolsa de Mestrado concedida;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL), Ministério da Ciência e Tecnologia-Instituto do Milênio do Semi-Árido (MCT-IMSEAR) e Banco do Nordeste-Rede Nordestina de Biotecnologia (BNB-RENORBIO), pelo apoio financeiro;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química, pelos ensinamentos transmitidos, cujos frutos poderão ser colhidos permanentemente;

Aos colegas do LPqPN: **Anderson Marques, Rossiel Aslan, Fernando Maia, Jésus Costa, Thaisa Alyvia, Ewerton Henrique, Vívian Tenório, Aryana Torquato e Bruno Vasconcelos**, pela amizade, boa convivência e transmissão de conhecimentos;

E todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Este trabalho descreve pela primeira vez o isolamento e a identificação estrutural de alguns constituintes químicos, bem como avaliação do potencial larvicida (larvas do 4º estadio do *Aedes aegypti* L.) e atividade antioxidante (radical DPPH) de extratos das folhas e caule de *Tetracera breyniana* Schldtl. (Dilleniaceae). Para tanto, os materiais vegetais obtidos após secagem a temperatura ambiente e trituração, foram extraídos através de maceração com EtOH 90%. Após eliminação dos solventes sob vácuo, os extratos foram suspensos em solução MeOH-H₂O e extraídos sucessivamente com solventes de diferentes polaridades (hexano, CHCl₃ e AcOEt). Os extratos brutos, bem como as frações oriundas de partição, foram avaliados frente às larvas do *Aedes aegypti* e quanto a capacidade sequestradora de radicais livres. As frações que forneceram os melhores resultados nos ensaios foram investigadas através de técnicas cromatográficas e conduziram ao isolamento de três flavonoides (*Quercetina*, *7-O-Metilquercetina* e *7-O-metilcanferol*), um triterpeno (*Ácido betulínico*) e um fitoesteroide (*β-Sitosterol*). Estes compostos tiveram suas estruturas identificadas com base na análise dos dados de RMN em uma e duas dimensões (HSQC, HMBC e DOSY) e pela comparação com dados da literatura. Todos os compostos isolados estão sendo descritos pela primeira vez na espécie em estudo. Em relação aos ensaios larvicidas, dentre os extratos testados, somente a fração em hexano do caule (CL₅₀ 72,08 µg/mL; IC₉₅ 60,92 - 82,47 µg/mL) forneceu resultado promissor. Por outro lado, nos ensaios frente ao radical DPPH, quando comparados com os padrões positivos utilizados (BHT e ácido ascórbico), somente as frações em AcOEt das folhas (CI₅₀ 74,15 ± 14,73 µg/mL) e do caule (CI₅₀ 39,87 ± 13,46 µg/mL) apresentaram os melhores resultados. Da fração em AcOEt das folhas foi isolado o flavonóide quercetina, possivelmente o constituinte responsável em parte pela atividade observada nesta fração.

Palavras-Chave: Dilleniaceae. *Tetracera breyniana*. Dengue. Antioxidante.

ABSTRACT

This work describes for the first time the isolation and structural identification of some chemical constituents, as well as assessing the potential larvicide (4th instar larvae of *Aedes aegypti* L.) and antioxidant activity (DPPH radical) of the extracts from leaves and stems of *Tetracera breyniana* Schldtl. (Dilleniaceae). For this purpose, the materials obtained after drying at room temperature and powdered were extracted by maceration with EtOH 90%. After removal of solvents under vacuum, the crude extracts were suspended in MeOH-H₂O solution and extracted successively with solvents of different polarities (hexane, CHCl₃ and EtOAc). The crude extracts and fractions from partition were evaluated against larvae of *Aedes aegypti* and the capacity of scavenging free radicals. The fractions that yielded the best results were investigated using chromatographic techniques and led to the isolation of three flavonoids (*Quercetin*, *7-O-Methylquercetin*, *7-O-Methylkaempferol*), a phytosteroid (*β-sitosterol*) and a triterpene (*betulinic acid*). All isolated compounds had their structures identified on the basis of their NMR spectral data, including 2D experiments (HSQC, HMBC and DOSY), and by comparison with literature data. In the larvicidal assays, among the extracts tested, only the hexane fractions of the stems (LC₅₀ 72.08 μg/mL; IC₉₅ 60,92 - 82,47 μg/mL), gave promising results. On the other hand, in the DPPH assays, when compared with the positive standards used (BHT and ascorbic acid), the EtOAc fractions from the leaves (CI₅₀ 74.15 ± 14.73 μg/mL) and stems (IC₅₀ 39.87 ± 13.46 μg/mL) showed the best results. From EtOAc fraction from the leaves was isolated the flavonoid quercetin, possibly the constituent responsible in part for the observed activity in this fraction.

Keywords: Dilleniaceae. *Tetracera breyniana*. Antioxidant. Dengue

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Princípios ativos de <i>Digitalis purpurea</i> L., <i>D. lanata</i> Ehr., <i>Cinchona officinalis</i> e de <i>Papaver somniferum</i> L.....	16
Figura 2 –	DPPH.....	18
Figura 3 –	Ciclo de transmissão do dengue.....	20
Figura 4 –	Estruturas de antioxidantes sintéticos.....	24
Figura 5 –	Visão microscópica de eritrócitos e monócitos.....	24
Figura 6 –	Substâncias isoladas de <i>Davilla rugosa</i>	26
Figura 7 –	Triterpenóides isolados de <i>T. boiviniana</i>	29
Figura 8 –	Isoflavonas isoladas de <i>T. scandens</i>	29
Figura 9 –	Isoflavonas isoladas de <i>T. scandens</i> e flavona de <i>T. Poggi</i>	30
Figura 10 –	Terpenóides de <i>T. asiática</i> , <i>T. indica</i> , <i>T. akara</i> e <i>T. sarmentosa</i>	31
Figura 11 –	Distribuição de <i>Tetracera breyniana</i>	32
Figura 12 –	Foto da exsicata da espécie <i>T. breyniana</i>	36
Figura 13 –	Procedimento experimental efetuado com as folhas (a) e caule (b).....	37
Figura 14 –	Instrumentação do insetário e fases evolutivas do mosquito (a = ovos, b = bacias com larvas, c = copos com pupas, d = foto ampliada de pupas e larvas, e = gaiola para criação, f = mosquito adulto.....	39
Figura 15 –	Cromatogramas dos ensaios qualitativos e estrutura da (+)-Catequina.....	41
Figura 16 –	(a) Representação esquemática da reação de redução do DPPH•; (b) Fotos reais da solução de DPPH, em cubetas, antes e depois da redução.....	42
Figura 17 –	Estruturas dos padrões antioxidantes utilizados.....	43
Figura 18 –	Curva de calibração de uma das soluções de DPPH, obtida do programa Microcal OriginPro 7.0.....	44
Figura 19 –	Curva da % DPPH _{REM} versus as concentrações da fração TbCC, obtida do programa Microcal OriginPro 7.0.....	46

Figura 20 – Cromatogramas de algumas das amostras após reação com DPPH.....	52
Figura 21 – Estrutura Química dos Compostos Isolados da espécie <i>T. breyniana</i>	55
Figura 22 – Estrutura Química de TbFH-1.....	57
Figura 23 – Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da substância TbFH-1...	58
Figura 24 – Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) da substância TbFH-1	59
Figura 25 – Espectro DEPT (100 MHz, CDCl ₃) da substância TbFH-1.....	60
Figura 26 – Estrutura Química de TbFC-1 (a) e TbFAc-1 (b).....	62
Figura 27 – Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) das substâncias codificadas de TbFC-1 (a) e TbFAc-1 (b).....	65
Figura 28 – Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) das substâncias codificadas de TbFC-1 (a) e TbFAc-1 (b).....	66
Figura 29 – Espectro DEPT 135 (100 MHz, CD ₃ OD) das substâncias codificadas de TbFC-1 (a) e TbFAc-1 (b).....	67
Figura 30 – Espectro HSQC (a) e HBMB (b) (¹ H: 400; ¹³ C: 100 MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD) da substância codificada de TbFC-1.....	68
Figura 31 – Estrutura Química de TbCC-1 (a), <i>Lupeol</i> (b) e <i>Ácido 3β-betulínico</i> (c).....	70
Figura 32 – Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD) da substância codificada de TbCC-1 (a) e expansão da região δ 0,5 a δ 3,5 (b).....	72
Figura 33 – Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD) da substância codificada de TbCC-1 (a) e expansão da região δ 10,0 a δ 60,0 (b).....	73
Figura 34 – Espectro DEPT 135 (100 MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD) da substância codificada de TbCC-1 (a) e expansão da região δ 15,0 a δ 115,0 (b).....	74
Figura 35 – Espectro HSQC (¹ H: 400; ¹³ C: 100 MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD) da substância codificada de TbCC-1 (a) e expansão da região δ 0,0 a δ 1,80 (b).....	75
Figura 36 – Estrutura Química de TbCC-2 (a) e do <i>Canferol</i> (b).....	77

Figura 37 – Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃/CD₃OD) da mistura das substâncias codificadas de TbCC-1 e TbCC-2 (a) e expansão da região entre δ 6,0 a δ 8,2 (b).....	79
Figura 38 – Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃/CD₃OD) da mistura das substâncias codificadas TbCC-1 e TbCC-2 (a) e expansão da região de δ 14,0 a δ 59,00 (b).....	80
Figura 39 – Espectro DEPT 135 (100 MHz, CDCl₃/CD₃OD) da mistura das substâncias codificadas de TbCC-1 e TbCC-2 (a) e expansão da região de δ 14,0 a δ 59,00 (b).....	81
Figura 40 – Espectro HSQC (100 MHz, CDCl₃/CD₃OD) da mistura das substâncias codificadas de TbCC-1 e TbCC-2 (a) e expansão da região de δ 3,0-10,0 e δ 50-180 (b).....	82
Figura 41 – Espectro HMBC (100 MHz, CDCl₃/CD₃OD) da mistura das substâncias codificadas de TbCC-1 e TbCC-2 (a) e expansão da região de δ 1,4- 7,8 e δ 68-180 (b).....	83
Figura 42 – Espectro ¹H-DOSY (400 MHz,CD₃OD) da mistura das substâncias codificadas de TbCC-1 e TbCC-2.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fármacos de origem natural	18
Tabela 2 – Ações de controle do <i>A. aegypti</i>	21
Tabela 3 – Resultados preliminares da atividade larvicida (250 ppm) com extratos e frações das folhas e do caule.....	51
Tabela 4 – Resultados da avaliação da atividade dos extratos e frações das folhas e do caule frente ao radical DPPH.....	53
Tabela 5 – Dados de RMN (¹ H: 400; ¹³ C: 100 MHz, CDCl ₃ , δ, J(Hz) da substância TbFH-1 e comparação com o <i>β-sitosterol</i>	57
Tabela 6 – Dados de RMN (¹ H: 400; ¹³ C: 100 MHz, CD ₃ OD, δ, J em Hz, da substância TbFC-1 e comparação com a <i>Quercetina</i>	63
Tabela 7 – Dados de RMN (¹ H: 400; ¹³ C: 100 MHz, CD ₃ OD, δ, J em Hz, da substância TbFAc-1 e comparação com a <i>Quercetina</i>	64
Tabela 8 – Dados de RMN (¹ H: 400; ¹³ C: 100 MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD, δ) da substância TbFCC-1 e comparação com dados dos Ácidos <i>3β-betulínico</i> e <i>3α-betulínico</i> e <i>Lupeol</i>	71
Tabela 9 – Dados de RMN (¹ H: 400; ¹³ C: 100 MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD, δ, J em Hz) da substância TbCC-2 e comparação com dados do <i>Canferol</i> e de <i>7-O-Metilcanferol</i>	78

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
BHT	Di- <i>tert</i> -butilidroxitolueno
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
Cols.	Colaboradores
IC ₉₅	Intervalo de Confiança
CI ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
CL ₅₀	Concentração Letal capaz de matar 50% da população
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
dl	Dupleto largo
<i>D</i>	Coeficiente de difusão
DEPT	Distortioless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
DOSY	Diffusion Ordered Spectroscopy
EtOH	Etanol
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamento
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
L ₁	Primeira muda de larva
L ₂	Segunda muda de larva
L ₃	Terceira muda de larva
L ₄	Quarta muda de larva
m	Multiplete
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
mg	Miligrama
mL	Mililitro

nm	Nanômetro
p.	Página
p.f.	Ponto de Fusão
ppm	Parte por milhão
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
s	Simpleto
t	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization
δ	Deslocamento Químico
μg	Micrograma
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: CONSIDERAÇÕES SOBRE DENGUE, RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES, FAMÍLIA E GÊNERO DA ESPÉCIE ESTUDADA	19
2.1	Considerações Sobre Dengue	19
2.2	Considerações Sobre Radicais Livres e Antioxidantes	22
2.3	Considerações Sobre a Família Dilleniaceae	25
2.4	Considerações Sobre o gênero <i>Tetracera</i>	28
3	OBJETIVOS	33
3.1	Objetivo geral	33
3.2	Objetivos específicos	33
4	EXPERIMENTAL	34
4.1	Solventes, Materiais e Equipamentos	34
4.2	Coleta e Identificação do Material Vegetal	35
4.3	Preparação dos Extratos e Frações das Folhas e do Caule	36
4.4	Avaliação do Potencial Biológico de Extratos e Frações	38
4.4.1	Avaliação da Atividade Larvicida.....	38
4.4.2	Avaliação da Capacidade Sequestradora de Radicais Livres (DPPH).....	40
4.5	Isolamento de Alguns dos Constituintes Químicos	46
5.5.1	Procedimento experimental efetuado com as Frações oriundas da Partição do Extrato em EtOH das Folhas.....	46
4.5.2	Procedimento experimental efetuado com as Frações Oriundas do Extrato em EtOH do Caule.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1	Resultados dos Ensaio Larvicidas	50
5.2	Resultados da Avaliação da Capacidade Sequestradora de Radicais Livres (DPPH)	51
5.2.1	Avaliação qualitativa.....	51
5.2.2	Avaliação quantitativa.....	52
5.3	Resultados do Estudo Fitoquímico	55
5.3.1	Identificação Estrutural da Substância Codificada de TbFH-1.....	56
5.3.2	Identificação Estrutural da Substância Codificada de TbFC-1 e TbFAc-1	61

5.3.3	Identificação Estrutural da Substância Codificada de TbCC-1.....	69
5.3.4	Identificação Estrutural da Substância Codificada de TbCC-2.....	76
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
	REFERÊNCIAS.....	87



... “E o seu fruto servirá de alimento e a sua folha para remédio”...

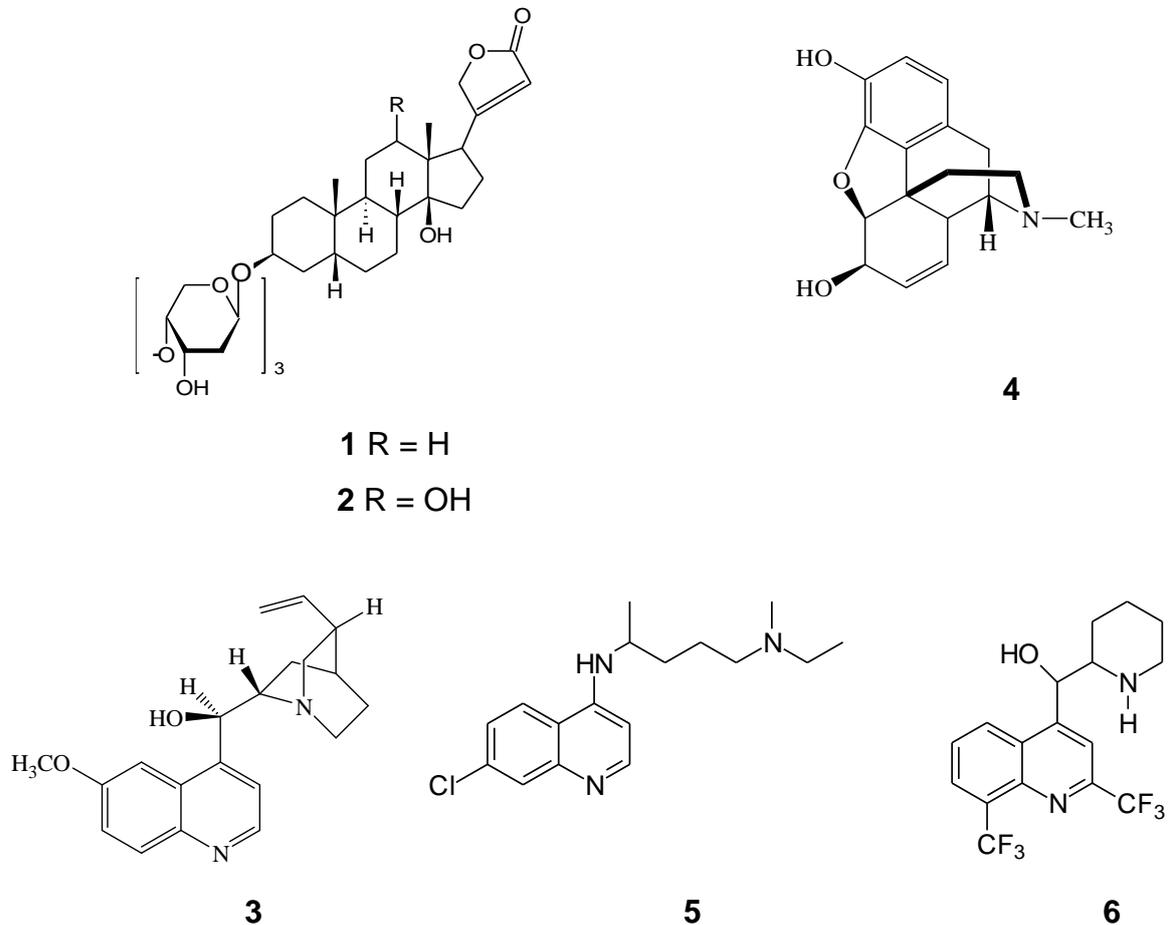
Ezequiel, 47:12.

1 INTRODUÇÃO

Desde o início das civilizações, o homem já utilizava a relação planta-cura, na busca por tratamento de doenças. O uso de plantas medicinais foi iniciado pelos egípcios, o que pôde ser confirmado através de registros antigos encontrados neste país, em papiros datados de cerca de 1500 anos antes de Cristo, conhecido como Papiros de Ebers, no qual se mencionam mais de 700 medicamentos com inúmeras prescrições, que em sua maior parte é constituído por vegetais (PAPROCKI, 2003). Durante esse período, vários filósofos criaram obras sobre a história dos produtos naturais onde se destacaram Hipócrates, considerado o pai da medicina, com a sua obra “*Natura medicatrix*”, que coloca a natureza como guia para a escolha de remédios, e Teofrasto, discípulo de Aristóteles, com várias obras sobre a história das plantas: “*Historia plantarum*”; “*De causis plantarum*” e etc (PINTO et al., 2002).

Dentre as diversas plantas medicinais registradas, encontra-se a *Digitalis purpurea* L. e a *D. lanata* Ehr., como fontes de glicosídeos cardiotônicos (BARREIRO, 1990), a *Cinchona officinalis*, utilizada como antitérmico (BARREIRO, 1990; 2001) e a *Papaver somniferum* L. (papoula), da qual se extrai o ópio, origem de medicamentos anestésicos, entre outras. No entanto, somente a partir do século XIX foi que iniciaram-se as pesquisas químicas, isolando respectivamente destas espécies; a digitoxina (1), digoxina (2), quinina (3) e morfina (4), sendo a quinina a precursora dos antimaláricos cloroquina (5) e mefloquina (6) (figura 1) (BARREIRO 1990; 2001; FOGLIO, 2006).

Figura 1 – Princípios ativos de *Digitalis purpurea* L., *D. lanata* Ehr., *Cinchona officinalis* e de *Papaver somniferum* L.



Fonte: BARREIRO 1990; 2001; FOGLIO, 2006.

Vale ressaltar também, a descoberta de importantes substâncias utilizadas no tratamento do câncer, enfermidade comum do século atual, visto que cerca de 60% dos fármacos para o seu tratamento, são de origem natural, como por exemplo, os alcalóides isolados de *Catharanthus roseus* G. Don, utilizados no tratamento de leucemia [Vimblastina (Velbam®)] e mama (vincristina), bem como os diterpenos extraídos de espécies *Taxus brevifolia* Nutt., e *T. baccata* L., originando o Paclitaxel, comercializado como (Taxol®), para o combate aos cânceres de mama e ginecológicos (FOGLIO, 2006; COSTA, 2010). Além de outros fármacos, de origem natural, encontrados no mercado para o tratamento de diferentes enfermidades (Tabela 1).

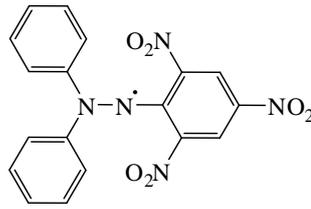
Visando o tratamento ideal para a cura de doenças, a química dos produtos naturais evoluiu desde Hipócrates, na antiga Grécia, até o desenvolvimento dos fármacos modernos no qual o reino vegetal tem contribuído de forma significativa com a sua imensa variedade e complexidade de compostos, que são naturalmente biossintetizados por um processo de adaptação, regulação e evolução, aliados ao desenvolvimento analítico de separação e de elucidação estrutural de substâncias nos centros de pesquisa, notadamente nas Universidades (MONTANARI, 2001).

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, aproximadamente 20% das espécies existentes em todo o planeta, se destacando internacionalmente, como país megadiverso (CALIXTO, 2003). Esse patrimônio biogenético, lhe confere um grande potencial para o desenvolvimento econômico, principalmente com a indústria farmacêutica, na descoberta de novos medicamentos (SALES; TOLEDO; TAVARES, 2003). Dentre as espécies vegetais presentes no país, estima-se que cerca de 100.000 espécies estão catalogadas, apenas 8.000 avaliadas quanto a sua composição química e 1.100 quanto as suas propriedades terapêuticas (NICOLETTI, 2010)

O desenvolvimento de um fármaco envolve diversas áreas sendo a fitoquímica responsável pelo preparo dos extratos de plantas onde estes são submetidos a ensaios farmacológicos, pelo qual a presença de atividade, direciona ao processo de isolamento do princípio ativo. Dispondo posteriormente a biologia molecular, de ferramentas para o estudo do mecanismo de ação desses compostos, permitindo determinar os sítios celulares e/ou fisiológicos envolvidos nesse processo. Isso demonstra que esse trabalho é necessariamente multidisciplinar e abrange vários campos de conhecimento (CARVALHO, 2006).

Considerando as atividades biológicas observadas em algumas espécies da família Dilleniaceae e a ausência de estudos sobre a espécie *Tetracera breyniana* Schltld., buscou-se com este trabalho avaliar a composição química e as atividades larvicida, frente larvas do mosquito *Aedes aegypti*, e antioxidante, frente ao radical sintético DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (Figura 2), da referida espécie, visando a busca de compostos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos e/ou inseticidas.

Figura 2 – DPPH



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Tabela 1 – Fármacos de origem natural.

Fármacos	Uso terapêutico	Fontes Naturais
Camptotecina	Câncer (côlon)	<i>Camptotheca</i>
Ciclosporina	Imunossupressor	<i>Tolypoclodium inflatum</i>
Cromolyn	Antiasmático	<i>Ammi visnoga</i>
Digoxina	Insuficiência cardíaca	<i>Digitalis purpurea</i>
Artemisinina	Antimalárico	<i>Artemisia annua</i>
Captopril	Anti-hipertensivo	<i>Bothrops jararaca</i>
Escopolamina	Doença de Parkinson	<i>Datura spp.</i>
Estatinas	Tratamento das dislipidemias	<i>Penicillium spp.</i> <i>Aspergillus terreus</i>
Etoposídeo	Câncer (testículo, pulmão)	<i>Pophyllum spp.</i>
Galantamina	Doença de Alzheimer	<i>Galanthus nivalis</i>
Irinotecan	Câncer (coloreta)	<i>Camptotheca acuminata</i>
Morfina	Analgésico	<i>Papaver somniferum</i>
Paclitaxel	Câncer (ovário)	<i>Taxus brevifolia</i>
Pilocarpina	Glaucoma	<i>Pilocarpus jaborandi</i>
Podofilotoxina	Câncer (pulmão)	<i>Podophyllum</i>
Quinina	Antimalárico	<i>Cinchona spp.</i>
Tacrolimus (FK506)	Imunossupressor	<i>Streptomyces tsukubaensis</i>
Topotecan	Câncer (ovário)	<i>Camptotheca acuminata</i>
Toxina Botulínica A	Analgésico, cosmético	<i>Clostridium botulinum</i>
Teniposídeo	Câncer (leucemia)	<i>Podophyllum peltatum</i>
Tubocurarina	Bloqueador neuromuscular	<i>Chondodendron tomentosum</i>
Vimblastina	Câncer (mama)	<i>Catharanthus roseus</i>
Vincristina	Câncer (leucemia)	<i>Catharanthus roseus</i>
Vinorelbina	Câncer (pulmão)	<i>Catharanthus roseus</i>
Ziconotida	Tratamento de dor crônica	<i>Conus spp. (caracol)</i>

Fonte: CALIXTO, 2003; COSTA, 2010.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: CONSIDERAÇÕES SOBRE DENGUE, RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES, FAMÍLIA E GÊNERO DA ESPÉCIE ESTUDADA

2.1 Considerações Sobre Dengue

Doenças como dengue e febre amarela, são endêmicas da América Central, América do Sul, Ásia e África (RIBEIRO et. al., 2009). Apresentam como principal vetor o mosquito *Aedes aegypti*, e são ocasionadas por um vírus classificado como arbovírus, integrante do gênero Flavivírus e família Flaviviridae (LUMJUAN et al., 2005; SANCHEZ et al., 2006; MURUGAN et al., 2007; STRODE et al., 2008).

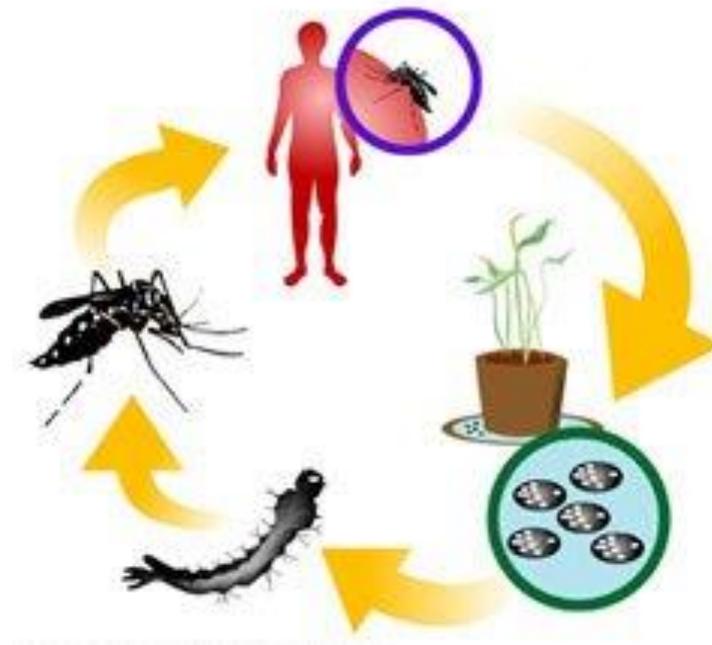
Cerca de dois terços da população mundial vive em áreas infestadas pelo *A. aegypti* (CLARO et al., 2006), sendo considerado o maior vetor de viroses urbanas, por ser antropofílico vivendo muitas vezes dentro de casa. Constatou-se que nos últimos 25 anos houve um aumento global quanto a sua distribuição, re-emergindo uma epidemia de dengue, atribuída a mudanças climáticas. E apesar deste mosquito ser de clima tropical, verificou-se sua presença também em áreas temperadas (JANSEN; BEEBE, 2010). O vírus da dengue vem causando aproximadamente 75 milhões de casos e milhares de mortes todos os anos, o quadro de infecções geralmente é assintomático e bastante suave, apresentando também quadros hemorrágicos e de choque, levando o infectado a um estado clínico fatal (HUBER et al., 2004).

Dengue é uma doença viral febril-aguda transmitida por um arbovírus que se divide em quatro sorotipos diferentes, denominados Den-1, Den-2, Den-3 e Den-4 (SANCHEZ et al., 2006; OTERO; SOLARI, 2010). Seus transmissores são fêmeas adultas dos mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus*, sendo a primeira espécie o principal transmissor devido a sua maior suscetibilidade quanto a inoculação oral e replicação dos mesmos em suas células (WIKAN et al., 2009), e a segunda espécie, um potencial vetor que está se disseminando no país (BRAGA; VALLE, 2007).

A transmissão da doença se dá da seguinte maneira: após a fase de ovos, larvas e pupas, fêmeas adultas dos mosquitos por precisarem de sangue para a sua oogênese, ao picar humanos infectados pelo vírus, se contaminam e os

desenvolvem no seu interior e posteriormente injeta-os em pessoas suscetíveis ao ataque (Figura 3). O vírus ao entrar na corrente sanguínea, ocasiona sintomas como dores de: cabeça, ossos, articulações, musculares, erupção cutânea e leucopenia (OTERO; SOLARI, 2010).

Figura 3 – Ciclo de transmissão do dengue.



Fonte: <http://elisabethjf.blogspot.com/2010/04/dengue-mata-ii.htm>

Infecções por estes mosquitos, representam um grande problema de saúde pública em países tropicais e subtropicais (RIBEIRO et al., 2009), apresentando os seguintes dados epidemiológicos: No Brasil, de acordo com a Organização Mundial Pan Americana de saúde (OPAS), foram registrados em 2011, 715.666 casos da doença, onde deste total, 10.840 notificados como casos graves e 1.102 mortes suspeitas. Estas notificações, comparadas com as de 2010, em um mesmo período, mostra uma redução de 18% dos casos, apesar desse alto índice de infestação atual. Dentre as regiões afetadas, a região Sudeste apresenta o maior número de casos (338.307 representando um total de 47% dos casos do país), seguida das regiões nordeste (157.297), Norte (110.711), Sul (56.930) e Centro-Oeste (52.421) (OPAS, 2011).

Segundo os dados da Secretaria de Saúde de Alagoas, em 2011 foram notificados 11.094 casos suspeitos de dengue distribuídos nos municípios

alagoanos, representando uma redução de 79,71% do número de casos suspeitos, comparados aos dados referentes de 2010. Destes, foram notificados 284 casos suspeitos como a forma mais grave da doença, dos quais 151 casos foram confirmados, 45 descartados e 88 estão sob investigação. Quanto aos óbitos a SESAU notificou 33 mortes suspeitas e destas 10 foram confirmadas (SESAU, 2012).

No entanto, em 2012 (até o dia 13 de abril) 94 dos 102 municípios alagoanos, notificaram 4.505 casos suspeitos da doença, representando um aumento de 1,78% do número de casos suspeitos em um mesmo período de 2011. Destes, foram registrados 153 casos como forma grave da doença, representando um aumento de 74% comparados com os dados de 2011 (88 casos). Até o momento foram notificados 6 óbitos, e destes 1 foi confirmado, 1 está sob investigação e 4 foram descartados. Apesar da significativa redução no número de casos, de 2010 para 2011, em 2012 houve um aumento do número de infecções (SESAU, 2012). Fazendo-se necessário a prevenção e intensificação das ações de controle para se evitar a ocorrência de novos casos (Tabela 2).

A prevenção das infecções causadas pelo vírus do dengue é promissora, onde a produção de uma vacina contra os sorotipos tem sido apontada pela OMS, e já se tem uma com os quatro sorotipos, porém ainda está em fase de teste, sendo o controle do vetor um desafio, devido a se centrar na erradicação do principal transmissor (TEIXEIRA et al., 1999).

Tabela 2 – Ações de controle do *A. aegypti*

Controle do Vetor	Medidas Utilizadas
Controle ambiental ou redução da fonte	Eliminação de criadouros; instalação de telas em portas e janelas, uso de mosquiteiros em camas e etc.
Controle químico	Uso de inseticidas: DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), BHC (benzenohexacloro) e etc; uso de repelentes.
Controle biológico	Uso de predadores como o peixe " <i>Gambusia affinis</i> " conhecido como peixe-mosquito-do-oeste; a bactéria " Bti (<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>)" e etc.

Fonte: BRAGA; VALLE, 2007.

2.2 Considerações Sobre Radicais Livres e Antioxidantes

Organismos aeróbicos necessitam de oxigênio molecular (O_2) para os processos vitais celulares. Como consequência da respiração e atividades enzimáticas, as células podem gerar formas de O_2 parcialmente reduzidas conhecidas como "Espécies Reativas de Oxigênio" (ERO), ou molécula de óxido nítrico gasoso (NO) e seus derivados, também produzido intracelularmente, definindo uma subclasse denominadas "espécies Reativas de Nitrogênio" (ERN) (VALKO et al., 2007). A produção de ERO/ERN em excesso pode causar modificação ou degradação progressiva de compostos bioquímicos celulares, incluindo DNA, proteínas, lipídios e carboidratos. Além da produção metabólica que é iniciada em parte pela redução do O_2 , uma multiplicidade de agressores, como drogas, citocinas e fatores ambientais (FINKEL; HOLBROOK, 2000) podem elevar a produção de ERO intracelular. Tais danos cumulativos induzidos por ERO podem levar à perda funcional das células ou apoptose celular. Por conseguinte, ERO têm sido implicados no processo de envelhecimento precoce e na progressão de diversas patologias, tais como doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas como alzheimer, artrite, reumatóide, doenças inflamatórias do pulmão, envelhecimento precoce e câncer (BANDYOPADHYAY; CHAKRABORTY; RAYCHAUDHURI, 2007; DE OLIVEIRA, 2011; RATNAM et al., 2006; ROELSER, 2007).

O oxigênio molecular (O_2) é encontrado no estado fundamental triplete que é pouco reativo, e neste contexto pode dar origem a outras espécies mais reativas, incluindo a produção de radicais livres, que é parte integral do metabolismo normal (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Um radical livre é definido como uma molécula com um ou mais elétrons não emparelhados na camada mais externa, o que lhe confere alta reatividade (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; RATNAM et al., 2006).

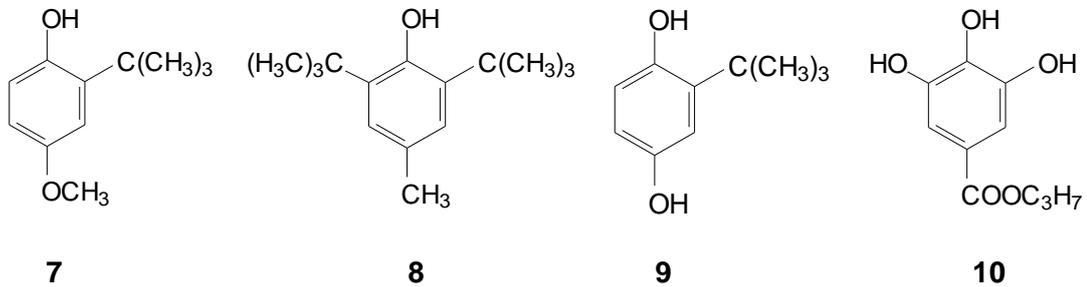
A presença de radicais livres no organismo desencadeia reações com substratos biológicos podendo danificar biomoléculas e, conseqüentemente, afetar a saúde humana. Os danos mais graves são aqueles causados ao DNA e RNA, onde a cadeia do DNA pode ser quebrada e reconectada em outra posição alterando, assim, a ordem de suas bases. Essa é a base da mutação, e o acúmulo de bases danificadas pode desencadear a oncogênese. As ERO incluem a produção de

oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e radicais livres: ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (HO^\bullet), peroxila (HOO^\bullet) e alcoxila (RO^\bullet). Dentre as ERN estão incluídos o radical óxido nítrico (NO^\bullet), e espécies moleculares ou iônicas como óxido nitroso (N_2O), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^{1-}), nitratos (NO_3^{1-}) e peroxinitritos (ONOO^{1-}). Essas espécies reativas são formadas por rotas que podem ser agrupadas em reações de transferência de energia ou transferência de elétron (VALKO et al., 2007; DE OLIVEIRA, 2011).

Sendo a oxidação química um processo metabólito que leva a produção de energia necessária para o funcionamento das células, e o metabolismo do oxigênio nas células vivas leva à produção de radicais livres, a produção excessiva destes oxidantes dão origem ao que chamamos de *Stress oxidativo* (ROELSER, 2007), que é a condição de desequilíbrio entre as EROs e ERNs (VANCINI et al., 2005). Diante disto, antioxidantes são substâncias químicas que tem a capacidade de seqüestrar ou impedir os radicais livres, reduzindo e/ou evitando a oxidação, possuindo capacidade de neutralizar os efeitos prejudiciais desses radicais no organismo, estando dessa forma associado à proteção contra doenças.

Alguns antioxidantes de origem sintética como, 2-*terc*-butil-hidroxianisol (BHA, **7**), 2,6-di-*terc*-butil-hidroxitolueno (BHT, **8**), *terc*-butil hidroquinona (TBHQ, **9**) e galato de propila (PG, **10**) (Figura 4), são utilizados pela indústria de alimentos (RAMALHO; JORGE, 2006; BANDYOPADHYAY; CHAKRABORTY; RAYCH AUDHURI, 2007). No entanto, estudos toxicológicos em animais demonstraram que estes podem ter efeitos carcinogênicos, fato que exige cautela quanto à sua utilização. Por exemplo, no Canadá e na Comunidade Econômica Européia é ilícito o uso de TBHQ. No Brasil, o uso destes antioxidantes é controlado pelo Ministério da Saúde, limitando como concentrações máximas permitidas, 200 mg/Kg para BHA e TBHQ e 100 mg/Kg para BHT (RAMALHO; JORGE, 2006), demonstrando a sua ineficácia quanto a saúde humana. Por isso a busca por novas substâncias antioxidantes tem se intensificado, sendo os produtos naturais uma boa alternativa para esta obtenção.

Figura 4 – Estruturas de antioxidantes sintéticos.

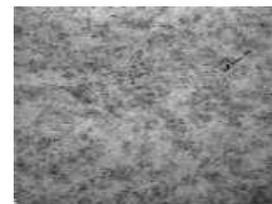
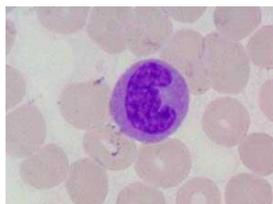


Fonte: RAMALHO; JORGE, 2006; BANDYOPADHYAY; CHAKRABORTY; RAYCH AUDHURI, 2007.

Os antioxidantes naturais, além de garantirem a conservação da qualidade do alimento, também preserva a saúde (PITARO, 2005; MOURA, 2010). Por exemplo, estudos farmacológicos e nutricionais demonstram que compostos fenólicos inibem a oxidação lipídica, a proliferação de fungos e ainda participam de processos ligados a aparência dos alimentos, como a cor, adstringência e aroma (SOARES, 2002). Verificou-se também a diminuição de doenças crônicas e degenerativas, cujos compostos pertencentes a esta classe podem ser citados os: ácidos fenólicos e seus derivados, flavonóides, tocoferóis, fosfolipídios, aminoácidos, ácido fítico, ácido ascórbico, pigmentos e esteróis (ROELSER, 2007).

Também, foi avaliada através de estudos *in vitro* a atuação de compostos fenólicos, como antioxidantes biológicos, onde foi verificada a inibição da peroxidação em microssomas, em células como eritrócitos e monócitos (Figura 5), e em lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (SOARES, 2002). Conferindo aos compostos fenólicos uma grande aplicabilidade quanto a sua ação como antioxidantes naturais.

Figura 5 – Visão microscópica de microssomas, eritrócitos, monócitos, respectivamente.



Fonte: ppsus.cederj.edu.br

No mercado atual aplicações de conservação da qualidade, feitas pela indústria cosmética e farmacêutica intensificam a corrida pela pesquisa sobre antioxidantes, o que o caracteriza como um fator econômico, havendo um grande interesse pelos mesmos e/ou seus análogos (RATNAM et al., 2006). Por exemplo, em cosméticos são adicionados bloqueadores de UV, uma vez que a ação da luz ultravioleta pode iniciar a oxidação lipídica destes cosméticos, como os tocoferóis, ácido fólico, ascórbico, entre outros. Esses compostos de origem natural, chamados antioxidantes naturais, bem como seus análogos vem trazendo resultados promissores. Nos laboratórios diversos pesquisadores vêm trabalhando para extrair, separar e purificar estes compostos, onde posteriormente serão avaliados quanto a sua reatividade.

2.3 Considerações Sobre a Família DILLENIACEAE

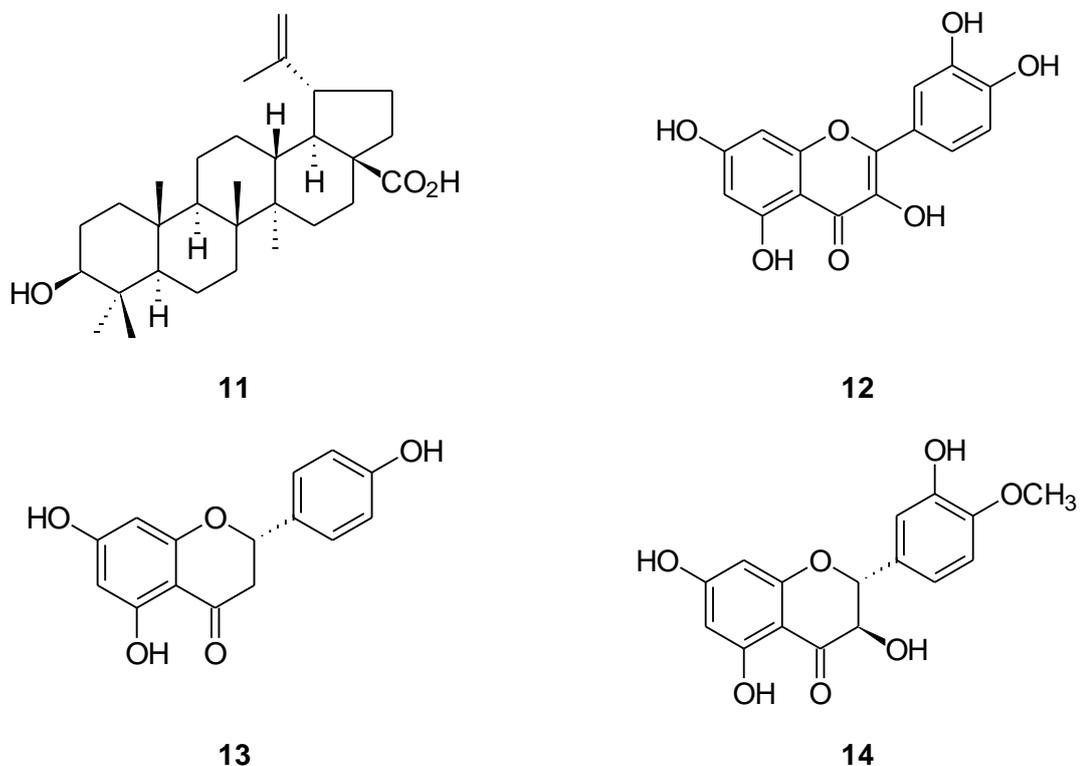
A família Dilleniaceae pertence ao grupo das angiospermas (HORN 2009; FRAGA 2010), consiste de cerca de 14 gêneros e 500 espécies, o que a caracteriza pequena. Apresenta distribuição predominantemente pantropical, concentrada na África, Austrália e América tropical (BRUNIERA; GROppo, 2010; PEREIRA; KLEIN, 2007), sendo constituída principalmente por árvores, arbustos e lianas (SOARES et al., 2005; PEREIRA; KLEIN, 2006). No Neotrópico, os gêneros desta família encontram-se distribuídos em duas subfamílias distintas: Delimoideae (*Tetracera* L.) e Doliocarpoidea (*Curatella* L., *Davilla* Vand., *Doliocarpus* Rol., *Neodillenia* Aymard e *Pinzona* Mart. & Zucc.) (FRAGA et al., 2010). Segundo Fraga e Stehmann (2010), a classificação taxonômica descrita relata a ocorrência de 102 espécies distribuídas nos gêneros *Curatella* (01 espécie), *Davilla* (31), *Doliocarpus* (49), *Neodillenia* (3), *Pinzona* (01) e *Tetracera* (17).

No Brasil foi constatada a ocorrência dos seis gêneros descritos anteriormente e de 82 espécies [*Davilla* (30), *Doliocarpus* (34), *Tetracera* (15), *Neodillenia* (01) e os dois gêneros monoespecíficos *Curatella* e *Pinzona*]. A região fitogeográfica rica em termos de abundância para a família Dilleniaceae é: Mata Atlântica (36), Amazônia (31) e cerrado (14) (FRAGA; STEHMANN, 2010).

Do ponto de vista químico, a família caracteriza-se pela presença de flavonóides muitas vezes na forma de glicosídeos (JACOMÉ et al., 2010). Estudos

fitoquímicos das espécies dos gêneros citados anteriormente ainda são limitados, entretanto, dados etnobotânicos de algumas espécies revelam a sua utilização como plantas medicinais tendo indicações específicas para o tratamento de algumas enfermidades (DAVID et al., 2006). Dentre os gêneros citados pertencentes à família Dilleniaceae, o que possui maior diversidade de aplicação na medicina popular é o *Davilla*, no qual várias espécies são utilizadas como antiúlceras e antiinflamatória (JACOMÉ et al., 2010). Por exemplo, espécies como a *D. rugosa*, conhecida como “cipó-caboclo”, é altamente empregada no tratamento da elefantíase, inchaço dos membros, diurético, afrodisíaco, antiúlceras (DAVID et al., 2006), antiinflamatório, purgativo, estimulante e tônico. Resultados de ensaios biológicos dos extratos hidroalcolóico e aquoso do caule, comprovam a atividade biológica antiúlcero-gênica (SOARES et al., 2005; DAVID et al., 2006; GUARALDO et al., 2000) e aumento na atividade motora, onde substâncias ativas, como o ácido betulínico (11), quercetina (12), narigenina (13) e 4'-O-metiltaxifolina (14) (Figura 6), foram encontradas nas frações mais polares (DAVID et al., 2006).

Figura 6 – Substâncias isoladas de *Davilla rugosa*.



Fonte: DAVID et al., 2006.

Outro exemplo do gênero é a espécie *D. elliptica*, conhecida popularmente como “lixinha”, encontrada em áreas de cerrado brasileiro (JACOMÉ et al., 2010), é empregada no tratamento de distúrbios estomacais, diarreia e edema, particularmente de linfonodos e testículos (BISO et al., 2010), adstringente, tônico, laxativo, sedativo, diurético, no tratamento de hemorróidas, hérnia, e antisséptico de ferimentos. Foram realizados, ensaios biológicos utilizando os extratos em metanol e em etanol das folhas e comprovou-se a atividade imunestimulatória, que sugere um aumento na imunidade contra doenças (SOARES et al., 2009). De um modo geral, estudos realizados demonstraram que a planta *D. rugosa*, conhecida como cipó-de fogo, no estado do Rio de Janeiro, além de apresentar utilidade medicinal, a mesma possui importância econômica como: ornamental e artesanal (COSTA et al., 2006). Por outro lado, essas plantas podem ser confundidas e trocadas, devido a sua semelhança, e com isto medicamentos oriundos das mesmas podem ter sua qualidade diminuída, fazendo-se necessário o reforço de estudos etnobotânicos (JACOMÉ et al., 2010).

O gênero *Curatella*, constituído apenas da espécie *C. americana* L., ocorre na América Central e sul do México, e em parte do Brasil, com concentração em São Paulo (BRUNIERA; GROPPPO, 2010). Conhecida popularmente como “lixeira”, é utilizada no tratamento de doenças gástricas (LIMA et al., 2009) o que a torna adequada, pelo potencial farmacológico antiulcerogênico e anti-inflamatório, presentes no extrato hidroalcolico e aquoso das cascas (SOARES et al., 2005; MOREIRA et al., 1999). Foi identificado através de análise fitoquímica, terpenos, compostos fenólicos, saponinas, flavonóides e esteróides (MOREIRA et al., 1999); enquanto que no gênero *Dolicarpus*, foi identificado por HPLC a presença de ácido betulínico em *D. chottianus* (ZHAO; CAO, 2007), sendo este importante, por possuir propriedades antimelanoma, antineuroblastoma, antileucêmica, anti-HIV, e antimalárica (BASTOS et al., 2007). O extrato em clorofórmio das sementes de *D. dentatos* (ROCHA et al., 2005) e de *D. rol*, apresentaram atividade antileishmania (GACHET et al., 2010).

O gênero *Pinzona*, até então é monoespecífico, está representado pela espécie *P. coriacea* (PEREIRA; KLEIN, 2007) e o *Neodillenia* possui ocorrência na região amazônica (no Brasil), na Colômbia, Equador, Peru e Venezuela, com a

espécie *N. peruviana* descrita recentemente na literatura (FRAGA; STEHMANN 2010). Para estes gêneros, não foram encontrados dados referentes a estudos fitoquímicos, farmacológicos ou etnobotânicos.

2.4 Considerações Sobre o Gênero *Tetracera*

O gênero *Tetracera* L., pertencente à tribo Delimeae DC., está dividido em duas seções: sect. *Tetracera* e sect. *Akara*, com 35 espécies pertencentes a primeira e 9 a segunda. As espécies de *Tetracera* ocorrem nas porções tropicais de todos os continentes, com 29 espécies na América, onde 15 destas ocorrem no Brasil. Dentre as nove espécies de *Akara*, apenas uma tem ocorrência no continente americano (FRAGA; AYMARD, 2007).

Dentre as espécies do gênero, destacam-se por serem utilizadas na medicina tradicional e por apresentarem atividades farmacológicas as seguintes espécies:

T. loureire, é um arbusto que ocorre no sudeste da Ásia e distribuído em muitas partes da Tailândia, onde a decocção da erva é bastante utilizada na medicina popular no tratamento da icterícia e fadiga. Estudos farmacológicos com o extrato em etanol desta espécie revelaram uma forte atividade antioxidante e hepatoprotetora (KUKONGVIRIYAPAN et al., 2003).

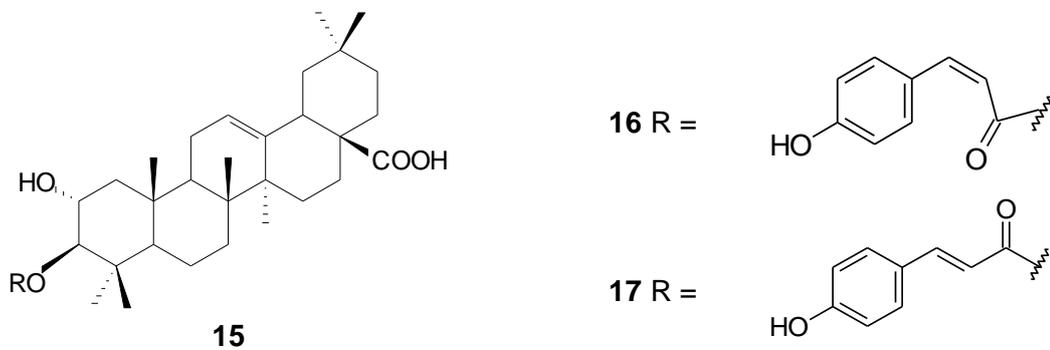
T. boiviniana, é um arbusto típico do cerrado no Quênia, cujo estudo fitoquímico resultou no isolamento do ácido betulínico (11) (Figura 6), ácido maslínico (15) e os seus derivados, o 3-*cis-p*-cumaroil (16) e o 3-*trans-p*-cumaroil (17) (Figura 7), que foram ativos como inibidores de DNA polimerase (enzima envolvida na reparação de danos ocasionados pela quimioterapia) e potencialização da bleomicina (medicamento usado no tratamento de câncer), o que demonstra a capacidade de inibição de danos causados por agentes tumorais, sendo desta forma rica em compostos anticarcinogênicos (MA; STARCK; HECHT, 1999).

T. scandens, originária do Vietnã e conhecida popularmente como “Day chieu”, é utilizada na medicina popular vietnamita no tratamento de hepatite e processos inflamatórios. Desta espécie foram isolados a genisteína (18) e seus derivados diprenilgenisteína (19), 6,8-diprenilgenisteína (20) (Figura 8), derrone (21) e alpinumisoflavona (22) (Figura 9), que apresentaram efeitos metabólicos benéficos

em pacientes com obesidade e diabetes mellitus (LEE et al., 2009; UMAR et al., 2010).

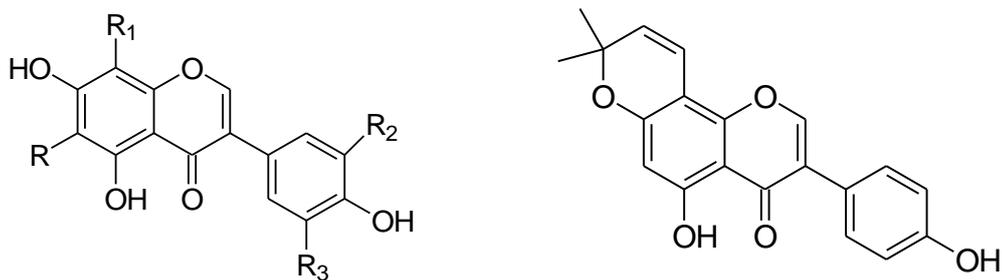
O decocto das folhas de *T. poggei* é utilizado na medicina tradicional da República Democrática do Congo no combate a disenteria, hepatite, blenorragia, como febrífugo e diurético. Desta planta, foi isolado o 3-sulfatoraminocitrina (23) (Figura 9) e o extrato em éter de petróleo demonstrou alta atividade antiplasmodial, o que apresenta efeitos contra a malária (TONA et al., 2004).

Figura 7 – Triterpenóides isolados de *T. boiviniana*.



Fonte: MA; STARCK; HECHT, 1999.

Figura 8 – Isoflavonas isoladas de *T. scandens*.



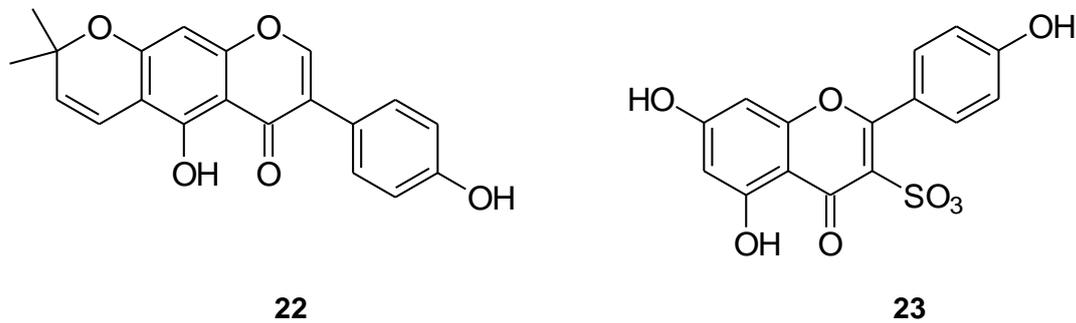
18 R = R₁ = R₂ = R

19 R = R₁ = H, R₂ = R₃ = Prenil

20 R = R₁ = Prenil, R₂ = R₃ = H

Fonte: LEE et al., 2009; UMAR et al., 2010.

Figura 9 – Isoflavona isolada de *T. scandens* e flavona de *T. Poggei*



Fonte: TONA et al., 2004; LEE et al., 2009; UMAR et al., 2010.

T. asiatica, apresenta compostos com potente atividade anti-câncer, anti-HIV, anti-diabético, anti-inflamatórios, da qual foi isolado o ácido 3-*trans*-feruloil-maslínico (24) (Figura 10), com relatos de uma possível estratégia promissora para o tratamento de câncer de cérebro (SUBRAMANYAM, 2009). Estudos com o extrato em metanol das raízes de *T. pectorata* demonstraram atividade antiúlcera, onde parte da propriedade gastroprotetora está associada com a capacidade em que o extrato tem de estimular a secreção de muco gástrico (OLUWOLE et al., 2008). Já o extrato bruto etanólico de *T. volubilis* foi ativo como antioxidante, revelando-se como melhor seqüestrador de radicais livres, frente ao radical DPPH, do que o natural antioxidante rutina com IC₅₀ de 7,16 µg/mL (LOCK et al., 2005).

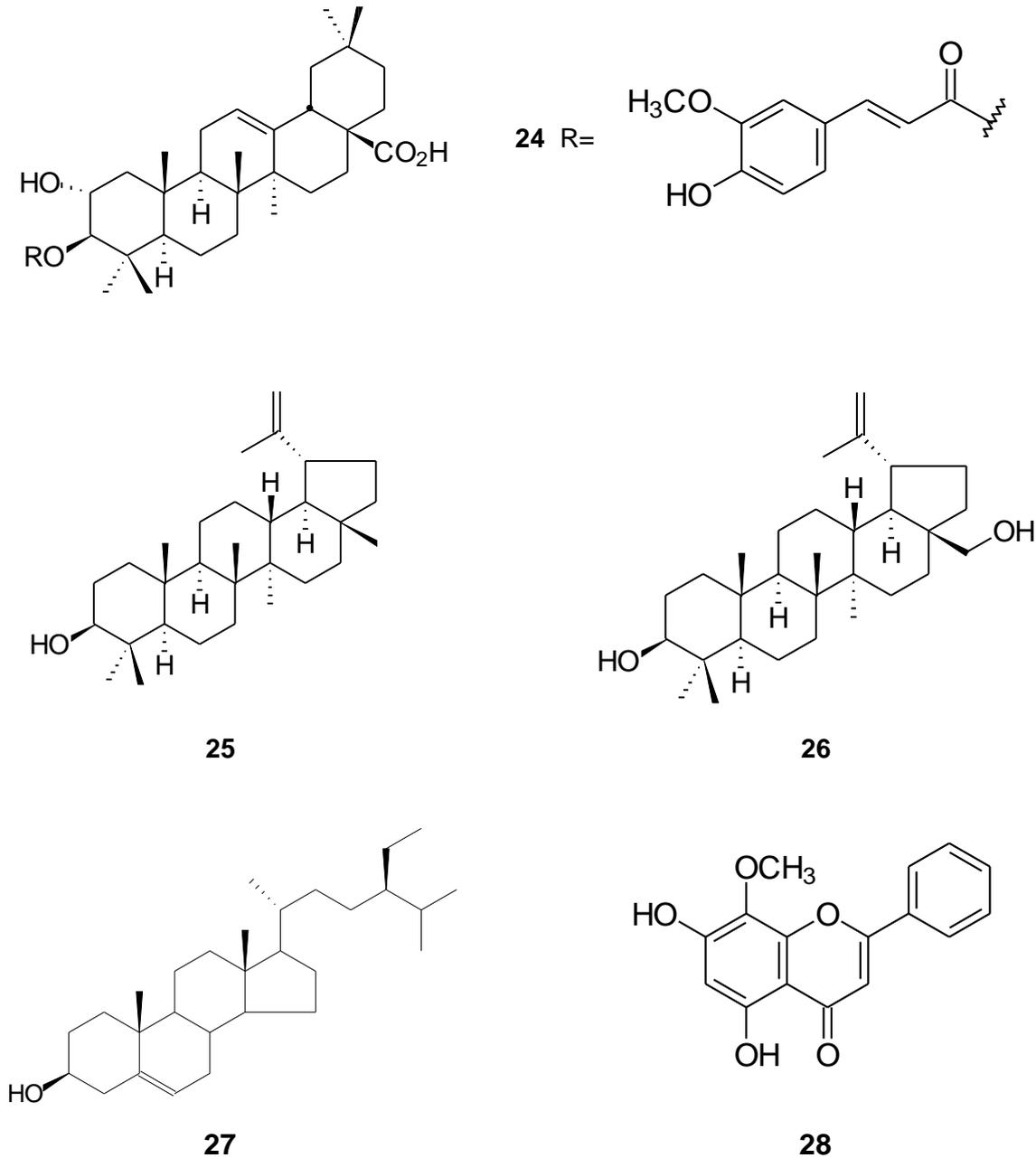
T. lima WILLD., conhecida popularmente como cipó de carijó, suas raízes e folhas são utilizadas no tratamento de úlcera (FENNER et al., 2006).

As espécies *T. indica*, *T. akara* e *T. sarmentosa* forneceram ácido betulínico (11), lupeol (25), betulina (26) e β-sitosterol (27) (SIPRA; DAN, 1980), e das partes aéreas de *T. indica* foi isolado o composto 5,7-diidroxi-8-metoxiflavona (28) (Figura 10) (HARRISON; SAI; SIM, 1994).

T. breyniana Schldl., é nativa e endêmica do Brasil, com domínio fitogeográfico na Mata Atlântica, e distribuição no Nordeste e no Sudeste (Figura 11) (FRAGA, 2010). É um arbusto com forma de vida fanerófita (ALMEIDA, 2009), conhecido popularmente na região litorânea do Rio Grande do Norte como “Lixeira”

(JÚNIOR; ZECKIEL, 2009) e como “cipó de fogo” na Paraíba (PEREIRA; ALVES, 2007). Considerando o pouco estudo de espécies do gênero e a ausência de estudos químicos ou biológicos desta espécie, objetivou-se no presente trabalho avaliar a composição química e as atividades larvívica e antioxidante da mesma.

Figura 10 – Terpenóides de *T. asiática*, *T. indica*, *T. akara* e *T. sarmentosa*.



Fonte: HARRISON; SAI; SIM, 1994; SUBRAMANYAM, 2009.

Figura 11 – Distribuição de *Tetracera brenyana*



Fonte: FRAGA, 2010.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo ampliar o conhecimento da composição química e do potencial biológico do gênero *Tetracera*, através do estudo químico e da avaliação das atividades larvicida e antioxidante de extratos da espécie vegetal *Tetracera breyniana* Schltdl. (Rubiaceae).

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial larvicida, frente larvas do 4^o instar do *Aedes aegypti*, de extratos e frações da espécie *Tetracera breyniana*;
- Avaliar, frente ao radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH), o potencial antioxidante de extratos e frações da espécie acima mencionada;
- Isolar e elucidar a estrutura química de alguns dos constituintes químicos presentes nos extratos e frações, especialmente daqueles com resultados promissores nos ensaios efetuados.

4 EXPERIMENTAL

4.1 Solventes, Materiais e Equipamentos

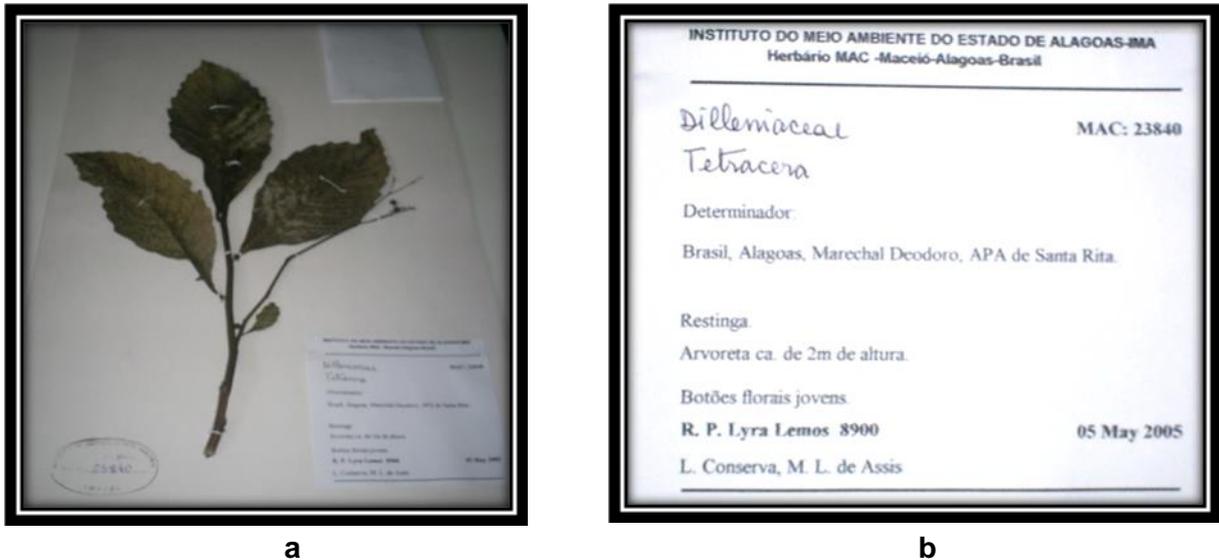
- Na preparação dos extratos brutos por maceração foram utilizados percoladores de aço inoxidável e etanol como solvente extrator;
- Nas partições e separações cromatográficas foram utilizados solventes destilados no próprio laboratório ou P.A. (Vetec[®] e Quimex[®]), sílica gel 60 (70-230 mesh, ASTM Merck[®] e THORIUM Alfa Aesar[®]) e Sephadex LH-20 (Pharmacia[®]);
- A concentração de grandes volumes de solventes foi efetuada em evaporadores rotatórios (BÜCHI[®] R-114, IKA WERKE[®] RV06-ML e IKA RV10), enquanto que soluções com pequenos volumes foram concentradas à temperatura ambiente em capela de exaustão analítica da Permutation[®];
- Nos experimentos cromatográficos em camada delgada (CCD) foram utilizadas placas analíticas de 0,50 mm de espessura preparadas com sílica gel 60 PF₂₅₄ da Merck[®]. Estas cromatoplasmas foram preparadas utilizando-se suspensões da sílica em água destilada, e em seguida distribuída por meio de um espalhador mecânico sobre as placas, onde posteriormente foram ativadas a 100°C, em estufa Biomatic[®];
- As pesagens foram efetuadas em balança eletrônica analítica AX 200 Shimadzu[®] e balança semi-analítica BEL[®];
- Nas solubilizações de amostras utilizou-se ultrassom da Brason[®] 1210, ... de potência;
- A secagem da vidraria foi realizada em estufa de esterilização universal (modelo 219);
- Na revelação de cromatogramas, utilizou-se lâmpada ultravioleta da Spectroline[®] (modelo ENF-260C/F) e da CAUTION[®], com comprimentos de onda de 254 e 366 nm e por imersão em cubas de vidro contendo vapores de iodo ou borrifadas com solução ácida de sulfato cérico;

- Os pontos de fusão (p.f.) foram obtidos em aparelho MQAPF-302 da microquímica, com capacidade máxima de aquecimento 340°C.
- Os experimentos de RMN (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz) foram efetuados em espectrômetro Brüker Avance 400 (usando como referência interna o tetrametilsilano - TMS) do Instituto de Química da Universidade Federal de Alagoas (IQB/UFAL). Solventes deuterados como metanol e clorofórmio (puros ou em mistura), foram utilizados para dissolução das amostras;
- Na avaliação de atividade larvicida, utilizou-se dimetilsulfóxido (DMSO) na solubilização das amostras, autoclave vertical modelo 415 Fanem para esterelização da ração animal, utilizada na alimentação das larvas, e glicose anidra P.A. (Amresco®), no preparo de soluções a 10% para a alimentação dos insetos adultos de *Aedes aegypti*.
- Na avaliação da capacidade seqüestradora de radicais livres utilizou-se cromatoplaças de gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck®), radical sintético 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH·), (+)-catequina (Sigma), MeOH grau espectroscópico (Vetec®), 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol (BHT) e ácido ascórbico (Sigma). As medidas de absorbância foram efetuadas em espectrofotômetro UV/VIS (modelo Mini-1240 da Shimadzu);

4.2 Coleta e Identificação do Material Vegetal

Folhas e caule da espécie vegetal *Tetracera breyniana* Schltld., foram coletadas em maio de 2005, na Área de Proteção Ambiental de Santa Rita localizada no município de Marechal Deodoro, Alagoas, e identificada pela botânica *Rosangela Pereira de Lyra Lemos*, do Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas (IMA/AL), onde um exemplar da referida espécie (Figura 12) encontra-se catalogado (MAC-23840).

Figura 12 – Foto da exsicata da espécie *T. breyniana*

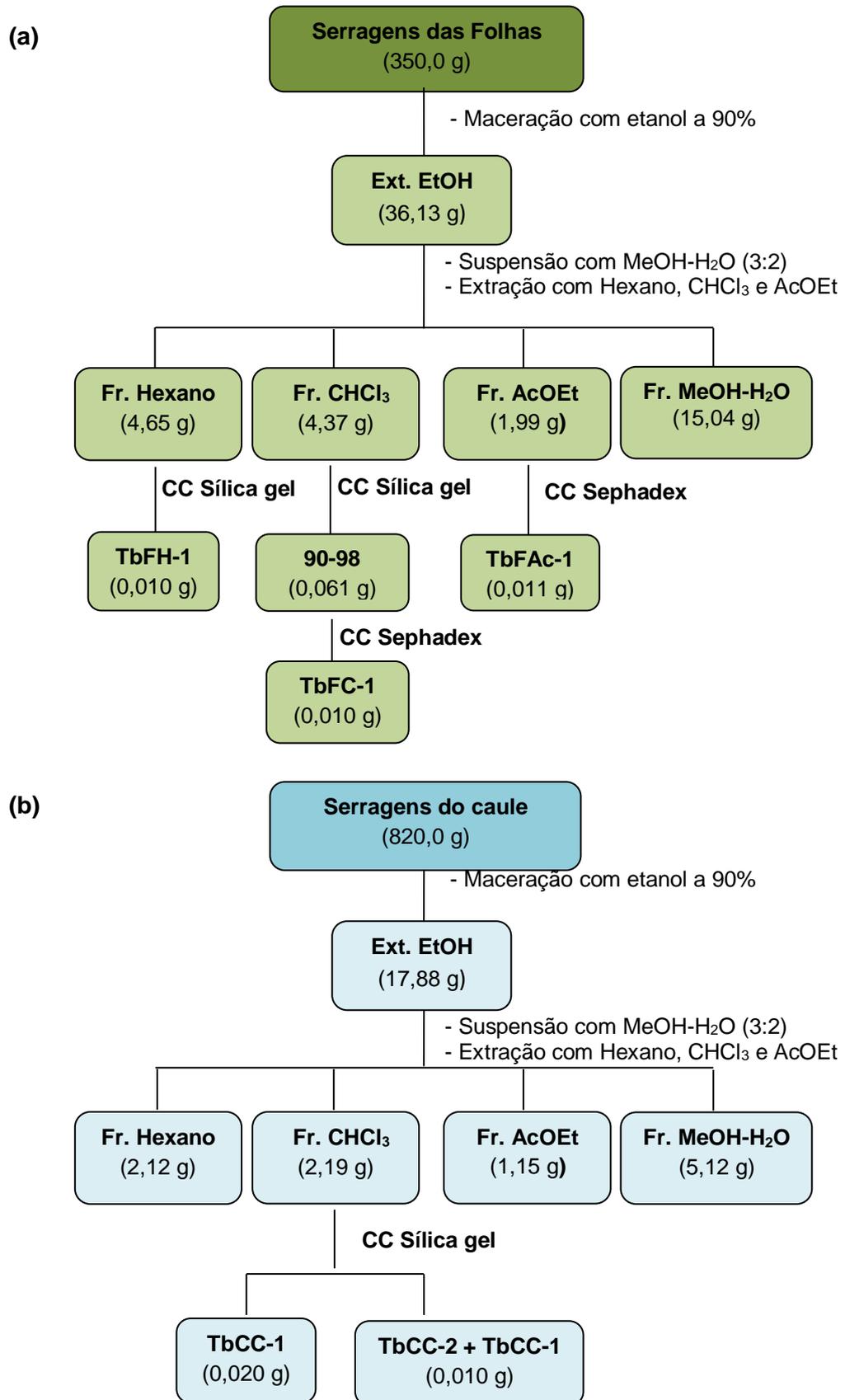


(Fonte: IMA-AL).

4.3 Preparação dos Extratos e Frações das Folhas e Caules

Após secagem à temperatura ambiente e trituração, os materiais das folhas (350 g) e caule (820 g) foram individualmente extraídos através de maceração com etanol a 90%. Após concentração das soluções em evaporadores rotativos e secagem a temperatura ambiente obteve-se os extratos brutos [folhas (36,13 g) e caule (17,88 g)]. Estes extratos foram suspensos em solução MeOH-H₂O (3:2) e submetidos sucessivas partições com hexano, clorofórmio e acetato de etila (Figura 11, p. 25). Após concentração das soluções em evaporador rotativo obteve-se as frações de partição das folhas [hexano (4,65 g), CHCl₃ (4,37 g), AcOEt (1,99 g) e MeOH-H₂O (15,04 g)] e de caule [hexano (2,12 g), CHCl₃ (2,19 g), AcOEt (1,15 g) e MeOH-H₂O (5,12 g)]. Posteriormente, tanto os extratos brutos quanto as suas respectivas frações foram avaliados frente larvas do 4^o estágio do mosquito *A. aegypti* e quanto a sua capacidade sequestradora de radicais livres (frente ao radical sintético DPPH•), direcionando-os desta forma à prospecção fitoquímica, que resultou no isolamento de alguns compostos (Figura 13).

Figura 13 – Procedimento experimental efetuado com as folhas (a) e caule (b).



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

4.4 Avaliação do Potencial Biológico de Extratos e Frações

4.4.1 Avaliação da Atividade Larvicida

Os extratos brutos, bem como as frações oriundas de partição das folhas e caule foram submetidos a ensaios frente larvas do quarto estágio (L₄) do mosquito *A. aegypti*, os quais foram realizados no insetário do Laboratório de Pesquisa em Química dos Produtos Naturais do IQB/UFAL, de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1981) com algumas modificações.

➤ Criação e Manutenção das Larvas e Insetos Adultos

Larvas do 4^o estágio de mosquitos *A. aegypti* foram obtidas a partir de ovos depositados em papéis de filtro por fêmeas adultas criadas e mantidas no insetário do LPqPN. Os insetos foram mantidos a uma temperatura média de $27,1 \pm 4,0$ °C, umidade relativa do ar de $69,9 \pm 7,8\%$ e com fotoperíodo de aproximadamente de 12 horas (Figura 14).

Os ovos de mosquitos, coletados três dias após o repasto sanguíneo, foram colocados em bacias plásticas contendo água destilada, onde ocorreu a eclosão das larvas e seu desenvolvimento nos diferentes estádios (L₁, L₂, L₃, L₄). As larvas foram alimentadas com ração autoclavada para gatos e mantidas em bacias até o desenvolvimento das pupas. Em seguida, com auxílio de pipetas plásticas, as pupas foram manualmente separadas das larvas, acondicionadas em copos descartáveis e colocadas em gaiolas teladas para posterior emergência dos insetos adultos. Os mosquitos foram alimentados com solução de glicose anidra a 10%, em chumaços de algodão trocados diariamente. A alimentação sanguínea (repasto sanguíneo) para as fêmeas, visando à maturação dos ovos, foi realizada utilizando pombos da espécie *Columbia lívia*.

Figura 14 – Instrumentação do insetário e fases evolutivas do mosquito (a = ovos, b = bacias com larvas, c = copos com pupas, d = foto ampliada de pupas e larvas, e = gaiola para criação, f = mosquito adulto).



a



b



c



d



e



f

FONTE: (b), (c) e (e) fotos do insetário; (a), (d) e (f) imagens adquiridas de <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/kidengue/epidemiologia/html>. (Acesso em 24/11/2011).

➤ Ensaio para Avaliação da Atividade Larvicida

Os ensaios preliminares foram realizados em triplicata na concentração de 250 µg/mL. Para tanto, 75 mg de cada amostra (extrato bruto das folhas e caule, bem como suas frações) foram dissolvidas em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), e em seguida diluída em água destilada para um volume de 300 mL. Para o controle negativo, utilizou-se uma solução aquosa de DMSO a 0,33 %, e para o controle positivo uma solução de temefós reformulado a 1% na concentração de 3 µg/mL. Todas as soluções foram distribuídas em copos descartáveis, onde foram adicionados grupos de quinze larvas jovens do 4º estágio (cabeça esbranquiçada) do *A. aegypti* em cada copo, separadas anteriormente e mantidas sob as mesmas condições do teste. A cada recipiente contendo as larvas adicionou-se 1/3 de um grão de ração, para eliminar qualquer dúvida quanto à eventual mortalidade de larvas por ausência de alimento. A exposição das larvas às soluções das amostras e dos controles positivo e negativo foi de 48 horas, sendo a leitura do ensaio realizada a cada 24 horas a partir do início do teste.

De acordo com o percentual observado de mortalidade das larvas, as amostras foram classificadas como (SANTOS et. al., 2008; OLIVEIRA et. al., 2010):

- Mortalidade superior a 75% → promissoras;
- Mortalidade entre 50 e 75% → parcialmente promissoras;
- Mortalidade entre 25 e 50% → fracamente promissoras;
- Mortalidade inferior a 25% → inativas.

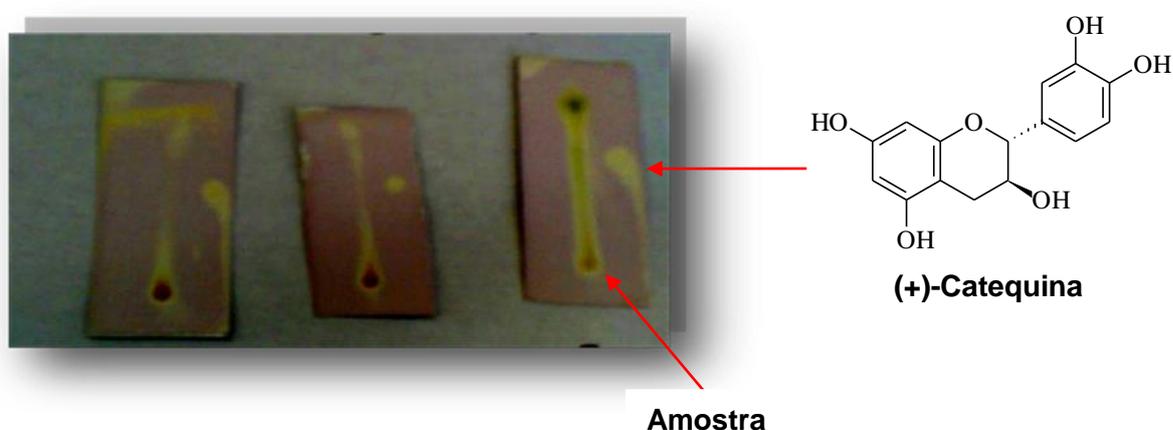
As amostras com resultados promissores nos ensaios preliminares (250 µg/mL) foram testadas em concentrações menores (200, 150, 100 e 50 µg/mL). Posteriormente, os resultados obtidos em cada concentração foram analisados pelo método de Próbity de análise (FINNEY, 1972) para determinação da CL₅₀ (concentração da amostra letal para 50% de uma população em estudo) juntamente com o intervalo de confiança de 95% (IC₉₅).

4.4.2 Avaliação da Capacidade Sequestradora de Radicais Livres

➤ Ensaios Qualitativos

A avaliação qualitativa da capacidade seqüestradora de radicais livres frente ao radical sintético DPPH[•] foi efetuada de acordo com a metodologia descrita por Soler-Rivas e cols. (2000). Os extratos brutos das folhas e caule, bem como suas frações de partição, foram dissolvidos em solventes adequados e em seguida aplicados em cromatoplasmas de gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck) e eluídos com sistemas eluentes previamente definidos. Após eluição, as placas foram secas à temperatura ambiente e, do lado direito da placa a uma altura equivalente a sua metade, aplicou-se a (+)-catequina (1 mg/mL em MeOH), como controle positivo e em seguida, as cromatoplasmas foram submersas, durante 10 segundos, em solução metanólica do radical DPPH (0,4 mM). Após secagem à temperatura ambiente, o aparecimento de manchas amareladas sob um fundo roxo nas posições dos fatores de retenção (Rf) das substâncias quando comparado com a (+)-catequina, sugeriu uma possível atividade (Figura 15).

Figura 15 – Cromatogramas do ensaio qualitativo, de três amostras, e estrutura da (+)-Catequina.



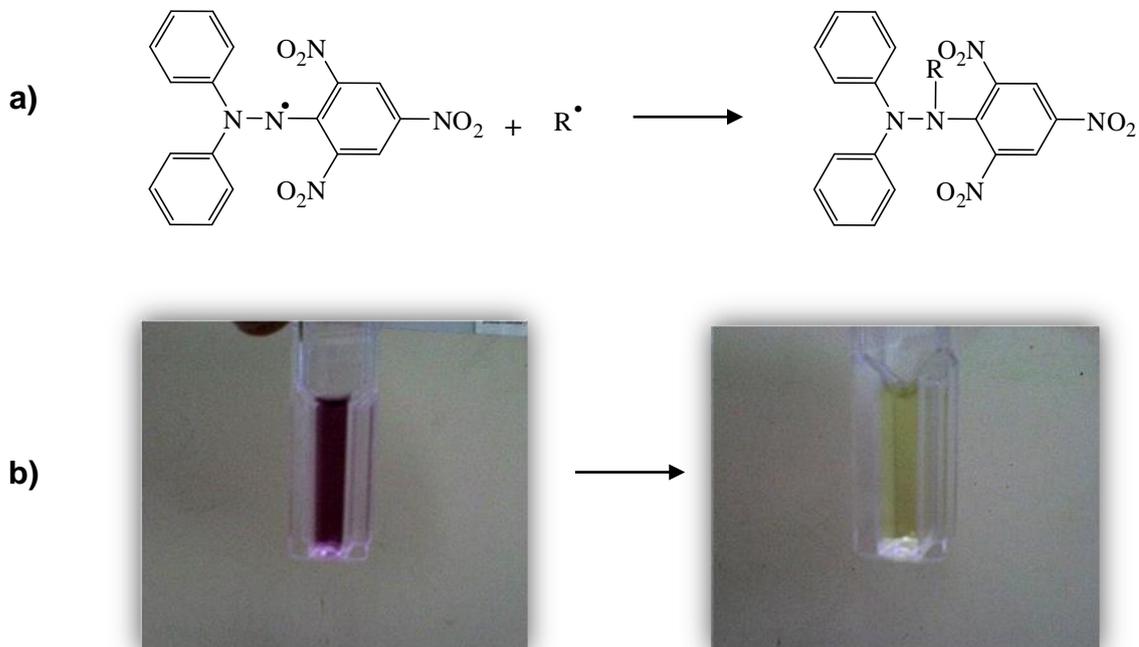
Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

➤ Ensaio Quantitativos

Os ensaios quantitativos foram realizados frente ao radical sintético DPPH[•] com as amostras que apresentaram resultados positivos nos ensaios qualitativos, utilizando a metodologia descrita por Brand-Williams e cols. (1995) e Sánchez-Moreno e cols. (1998).

O radical livre DPPH[•] em solução metanólica tem coloração púrpura absorvendo no comprimento de onda de 515 nm. No entanto, ao reagir com uma espécie radicalar (R[•]) ou sofrendo redução por um agente oxidante forma o difenilpicril-hidrazina de coloração amarela (Figura 16). Desta forma, o decréscimo da absorbância, monitorado em espectrofotômetro UV/VIS (Mini-1240, Shimadzu) num comprimento de onda de 515 nm, representa o consumo deste radical pela amostra, indicando a sua capacidade seqüestradora de radical livre.

Figura 16 – (a) Representação esquemática da reação de redução do DPPH[•]; (b) Fotos reais da solução de DPPH numa cubeta, antes e depois da redução.



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

➤ Preparo das Soluções e Construção da Curva de Calibração do DPPH

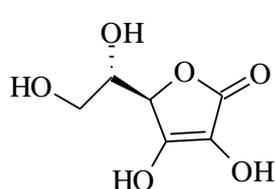
Inicialmente, preparou-se 50 mL de uma solução estoque de DPPH em MeOH grau espectroscópico (40 µg/mL ~ 100 µ.mol/L), a qual foi protegida com papel alumínio para evitar a ação direta da luz e mantida sob refrigeração até o momento do uso. A partir desta solução, foram feitas diluições (35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 1 µg/mL) para a curva de calibração e submetidas a análise UV/VIS a 515 nm. As medidas foram feitas em triplicata, utilizando-se cubetas de poliestireno com percurso óptico de 1 cm, contendo 1 mL de cada solução. Como branco utilizou-se MeOH grau espectroscópico.

A curva de calibração foi construída a partir dos valores médios de absorvância de cada solução do DPPH *versus* as concentrações usadas (1 a 40 µg/mL), através da análise de regressão linear utilizando o programa Microcal OriginPro 7.0. Esta análise forneceu a equação matemática da curva de calibração: $Y = a + b.x$, onde: **a** = coeficiente linear; **b** = coeficiente angular ou inclinação da reta; com seu desvio padrão (DP) e coeficiente de correlação (R).

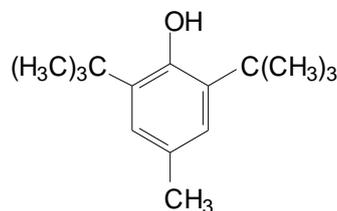
➤ Preparo das Amostras para Avaliação da Capacidade Seqüestradora de Radical Livre

Para avaliar a capacidade seqüestradora de radicais livres dos extratos e frações frente ao radical DPPH foram preparadas soluções estoques na concentração de 200 µg/mL (dissolução de 2 mg de cada amostra em 10 mL de metanol grau espectroscópico). A partir das soluções estoques foram obtidas por diluição soluções nas concentrações de 150, 100, 50 e 25 µg/mL. A preparação da solução estoque de DPPH bem como sua curva de calibração, foram construídas para cada solução estoque, obtendo-se diferentes medidas de dispersão: os desvios padrão (DP) variaram de 0,00506 a 0,00955 e os coeficientes de correlação (R) variaram entre 0,99992 e 0,99977 (Figura 18). Da mesma maneira as soluções estoques dos padrões: ácido ascórbico e BHT (2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol) (Figura 17) foram inicialmente preparadas a 200 µg/mL e depois diluídas em cinco diferentes concentrações que variaram de 100 a 5 µg/mL para estes controles positivos.

Figura 17 – Estruturas dos padrões antioxidantes utilizados.



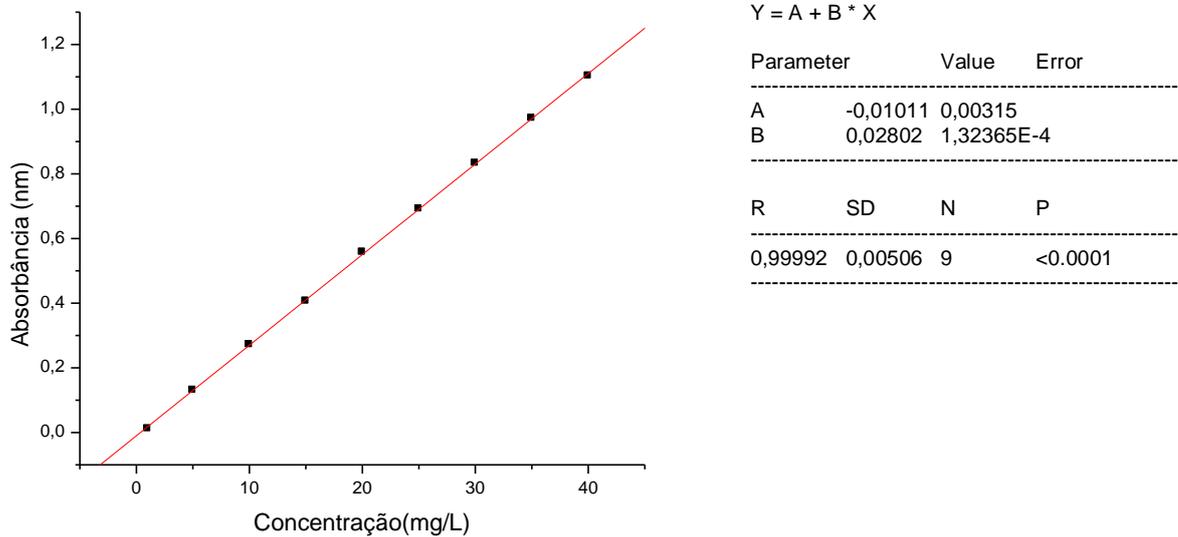
Ácido ascórbico



BHT

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Figura 18 – Curva de calibração de uma das soluções de DPPH, obtida do programa Microcal OriginPro 7.0 .



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

➤ **Determinação da CI_{50}**

Após obtenção da curva de calibração do DPPH, experimentos individuais foram efetuados com cada uma das soluções (25 a 200 $\mu\text{g/mL}$) das amostras e dos controles (150 a 5 $\mu\text{g/mL}$). Onde, em cubetas de poliestireno, foram preparadas misturas reacionais constituídas por 0,1 mL da solução teste e 0,9 mL da solução estoque de DPPH (40 $\mu\text{g/mL}$). Estas soluções foram homogêneas e protegidas da luz durante todo o experimento. As medidas de absorbância foram feitas a 515 nm, em triplicata e a cada 15 minutos (tempos 0, 15, 30, 45 e 60 minutos), totalizando 1 hora, as absorbâncias das soluções foram registradas contra um branco (MeOH grau espectroscópico).

A partir da equação matemática $Y = a + b \cdot x$, e dos valores de absorbâncias obtidos pela média no tempo de 60 minutos, juntamente com os coeficientes angulares e lineares obtidos da curva de calibração, foi possível determinar x , que correspondente à concentração de DPPH que permanece no meio após reação com as amostras. A percentagem de DPPH remanescente (% DPPH_{REM}) no meio

reacional foi obtida de acordo com a equação descrita por Sánchez-Moreno e cols. (1998):

$$Y = a + b.x$$

Onde:

Y = média da absorbância em **t₆₀**;

a = coeficiente linear obtido da curva de calibração;

b = coeficiente angular obtido da curva de calibração;

x = [DPPH]₆₀ = concentração de DPPH aos 60 minutos (**t₆₀**).

$$\%[\text{DPPH}]_{\text{Rem}} = \frac{[\text{DPPH}]_{T=t}}{[\text{DPPH}]_{T=0}} * 100$$

Onde:

%[DPPH]_{Rem}= percentagem da concentração de DPPH que sobrou;

[DPPH]_{T=t} = concentração de DPPH aos 60 minutos (**t₆₀**);

[DPPH]_{T=0} = concentração de DPPH inicial no meio (40 mg/L).

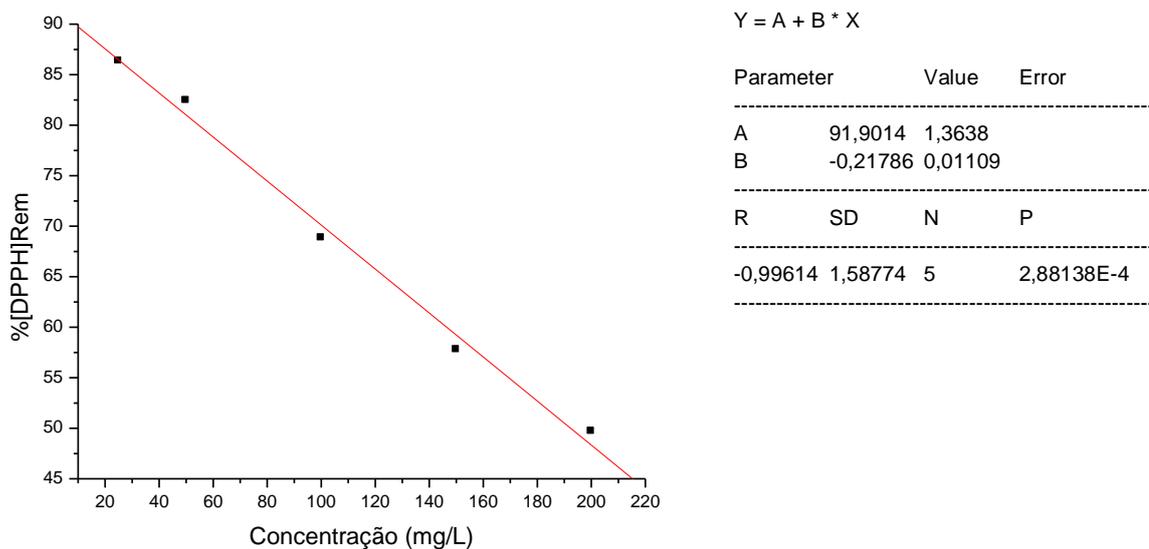
Para determinar a CI_{50} de cada amostra, foi plotada por regressão linear, no programa Microcal OriginPro 7.0, uma curva a partir da $\% DPPH_{\text{REM}}$ versus as concentrações das amostras avaliadas (25 a 200 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 19), e para os controles (100 a 5 $\mu\text{g/mL}$). Após a obtenção da curva e a partir da equação matemática $Y = a + b.x$, substituindo nesta os valores obtidos de seus coeficientes lineares e angulares (**a** e **b**) e Y por 50 obteve-se x que é a CI_{50} (quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CI_{50} e maior a sua capacidade de seqüestrar radicais livres).

➤ Análise Estatística da Avaliação Quantitativa

Para cada conjunto de dados foram obtidas as médias (DP) e o coeficiente de variação (CV) como medidas para expressar a variabilidade dos resultados, além do coeficiente de correlação (R) entre as duas variáveis (as concentrações testadas, como variável independente; e os percentuais de DPPH remanescente para cada concentração, como variável dependente). Para averiguar se as diferenças entre as médias obtidas foram casuais ou significativas utilizou-se o teste Tukey aplicando-se

análise de variância (ANOVA), assumindo a probabilidade de erro ao nível de 5% ($P < 0,05$).

Figura 19 – Curva da %DPPH_{REM} versus as concentrações da fração TbCC, obtida do programa Microcal OriginPro 7.0



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

4.5 Isolamento de Alguns Constituintes Químicos

4.5.1 Procedimento Experimental Efetuado com as Frações Oriundas da Partição do Extrato em EtOH das Folhas

➤ Fração em Hexano

A fração em hexano das folhas (4,65 g) foi fracionada em coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh), utilizando-se misturas de solventes em proporções crescentes de polaridade (hexano, Hex-AcOEt (9,5:0,5 a 6:4), AcOEt e MeOH). As subfrações resultantes foram submetidas à análise através de CCD, utilizando-se diferentes sistemas eluentes e revelações com luz ultravioleta (254 e 366 nm) e por vapores de iodo. Após análise comparativa, as frações que apresentaram Rfs semelhantes foram agrupadas.

O material da sub-fração reunida 37-38 (0,010 g) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração esbranquiçada recoberto por impurezas de coloração rósea. Este material, após sucessivas lavagens a frio com MeOH forneceu um sólido amorfo de coloração branca, p.f. 136,0-138,9 °C, que foi codificado de **TbFH-1** (0,010 g).

As demais subfrações, após inúmeras tentativas de purificação, não conduziram ao isolamento de substâncias com grau de pureza adequado para obtenção dos dados espectrais.

➤ Fração em CHCl_3

A fração em CHCl_3 (4,37 g) das folhas foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh), utilizando-se solventes e misturas de solventes em proporções crescentes de polaridade. Um total de 126 subfrações com volume médio de 10 mL cada foi coletado. Essas frações foram analisadas através de CCD, utilizando-se diferentes sistemas de eluentes, e aquelas que apresentaram Rfs semelhantes foram agrupadas.

O material da sub-fração reunida 88-89 (0,002 g), procedente da eluição em hexano-AcOEt (6:4), constituído por um sólido de coloração amarelada, apresentou-se como uma única mancha em CCD após revelação com luz UV e vapores de iodo. No entanto, em virtude da pouca quantidade não foi possível obter espectros de RMN.

O material da sub-fração 90-98 (0,061 g), procedente da eluição em hexano-AcOEt 1:1, foi submetido a permeação em gel (Sephadex LH-20 com MeOH), e conduziu ao isolamento de uma substância codificada como **TbFC-1** (0,010g).

As demais subfrações, após inúmeras tentativas de purificação, não conduziram ao isolamento de substâncias com quantidade e grau de pureza satisfatória para obtenção de dados espectrais.

➤ Fração em AcOEt

O material da fração em AcOEt (1,99 g) das folhas foi permeada em coluna Sephadex LH-20 com MeOH. Coletou-se um total de 99 subfrações, com um volume médio de 10 mL cada. Após análise comparativa através de CCD, utilizando-se diferentes sistemas eluentes, foram agrupadas. O material da subfração reunida 24-26 (0,011 g), apresentou-se como sólido de coloração amarelada, p.f. 286,2- 289,7 °C, absorvendo como uma única mancha na presença de luz UV e em vapores de iodo. Este material foi codificado de **TbFAc-1** (0,011 g).

As demais subfrações não apresentaram grau de pureza satisfatório para obtenção dos dados espectrais.

4.5.2 Procedimento Experimental Efetuado com as Frações Oriundas do Extrato em EtOH do Caule

➤ Fração em Hexano

A fração em hexano (2,12 g), por ter apresentado resultado promissor nos ensaios larvicidas, foi submetida a cromatografia em coluna de gel de sílica 60 (70-230 mesh), utilizando solventes e misturas de solventes em proporções crescentes de polaridade. Foi coletado um total de 145 subfrações com volume médio de 10 mL cada. Essas subfrações, após análise comparativa através de CCD, em diferentes sistemas eluentes, foram agrupadas. Após inúmeras tentativas de purificação essas frações não forneceram substâncias com quantidade e grau de pureza para obtenção de dados espectrais.

➤ Fração em CHCl₃

A fração em CHCl₃ (2,19 g) do caule foi submetida a cromatografia em coluna de gel de sílica 60 (70-230 mesh), utilizando-se solventes e misturas de solventes em proporções crescentes de polaridade. Foi coletado um total de 136 subfrações que foram analisadas através de CCD em diferentes sistemas de eluentes. Aquelas que apresentaram R_fs semelhantes foram agrupadas.

Os materiais das subfrações reunidas 28-46 (0,020 g), proveniente da eluição com hexano-AcOEt (8:2), e 53-59 (0,010 g) e da eluição em hexano-AcOEt (7:3), apresentaram-se como uma mancha após revelação em vapores de iodo e luz UV.

Estes materiais foram codificados, respectivamente, de **TbCC-1** (p.f 285,3-287,2°C) e **TbCC-2**.

As inúmeras tentativas de purificação das demais subfrações não resultaram no isolamento de substâncias com quantidade e grau de pureza satisfatório para obtenção dos dados espectrais.

➤ Fração em AcOEt

A fração em AcOEt (1,15 g) do caule, com resultado promissor nos ensaios antioxidantes, foi fracionada em coluna Sephadex LH-20 com MeOH. Coletou-se um total de 132 subfrações com um volume médio de aproximadamente 10 mL cada. Estas frações foram analisadas através de CCD, utilizando-se diferentes sistemas eluentes, e aquelas com Rfs semelhantes foram agrupadas. Algumas das subfrações agrupadas estão ainda em processo de investigação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados dos Ensaios Larvicidas

A literatura relata vários trabalhos envolvendo a atividade de extratos vegetais contra larvas do *A. aegypti*. No entanto, no que diz respeito ao gênero *Tetracera*, não foi encontrado nenhum estudo sobre esta atividade em espécies deste gênero. Assim, na busca por um controle químico alternativo contra este vetor, avaliou-se a atividade larvicida dos extratos e frações das folhas e caule de *T. breyniana*.

Os extratos brutos em EtOH das folhas e do caule, bem como suas frações oriundas de partição, foram submetidos à ensaios preliminares, na concentração de 250 µg/mL, para avaliação da atividade larvicida frente larvas do 4º estágio de *A. aegypti*. Neste experimento, somente a fração em hexano do caule apresentou resultados considerados promissores (mortalidade larval superior a 75%) e a fração em hexano das folhas, considerada fracamente promissora por apresentar percentual de mortalidade no intervalo entre 25 e 50 % (Tabela 3). Os extratos brutos em etanol dos caules e folhas, bem como as demais frações oriundas da partição destes extratos foram considerados inativos (mortalidade inferior a 25%). Por outro lado, não foi observada mortalidade larval no controle negativo (solução de DMSO a 0,33%) e no controle positivo (solução de Temefós reformulado na concentração de 3 µg/mL) o índice de mortalidade foi de 100%.

A fração em hexano do caule, considerada promissora, foi testada em cinco diferentes concentrações (250, 200, 150, 100 e 50 µg/mL), também promissoras, com exceção da concentração 50 µg/mL, e com os resultados obtidos permitiu-se determinar a CL₅₀, com o seu respectivo intervalo de confiança a 95%: CL₅₀ 72,08 µg/mL (IC_{95%} 60,92-82,47 µg/mL) (Tabela 3). Segundo dados da literatura, valores de CL₅₀ < 100 µg/mL são considerados bons agentes larvicidas (SANTOS et. al., 2008; OLIVEIRA et. al., 2010).

Tabela 3 – Resultados preliminares da atividade larvicida (250 µg/mL) com extratos e frações das folhas e do caule.

Amostras	Mortalidade (%)	Resultados	CL ₅₀ (µg/mL)	IC _{95%} (µg/mL)
Folhas				
Extr. Bruto (EtOH)	13,33	Inativo		
Fr. Hexano	28,9	Fraco		
Fr. CHCl ₃	4,44	Inativo		
Fr. AcOEt	4,44	Inativo		
Fr. MeOH-H ₂ O	4,44	Inativo		
Caule				
Extr. Bruto (EtOH)	0,00	Inativo		
Fr. hexano	100,00	Promissor	72,08	60,92 - 82,47
Fr. CHCl ₃	22,22	Inativo		
Fr. AcOEt	4,44	Inativo		
Fr. MeOH	0,00	Inativo		
Temefós reformulado	100,00	Ativo		

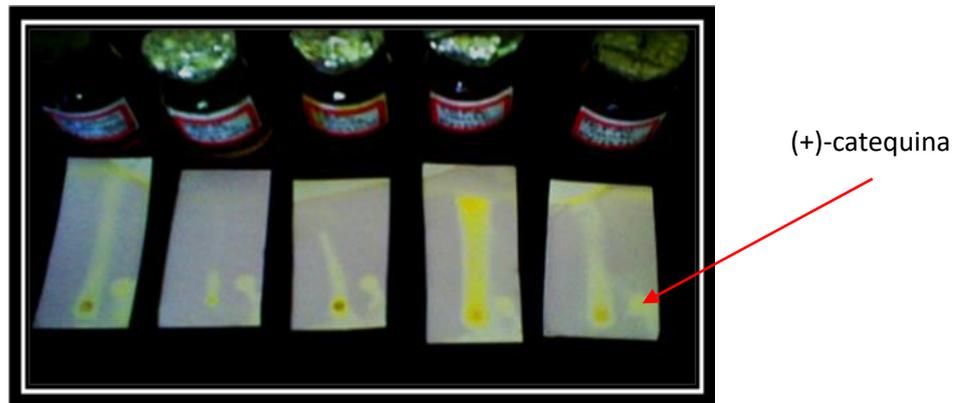
Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

5.2 Resultados da Avaliação da Capacidade Sequestradora de Radicais Livres (DPPH)

5.2.1 Avaliação qualitativa

Um dos métodos mais utilizado para avaliar a capacidade seqüestradora de radicais livres de extratos vegetais e substâncias isoladas é o uso do radical sintético DPPH. É um método fácil e rápido, no qual os compostos que apresentam potencial para seqüestrar radicais reduzem o DPPH, doando elétrons ou átomos de hidrogênio para o radical livre. Neste trabalho, dentre as amostras de folhas e caule de *T. breyniana* (extratos brutos em EtOH e suas respectivas frações provenientes da partição em hexano, CHCl₃, AcOEt e MeOH-H₂O) avaliadas qualitativamente frente a este radical, com exceção da fração em hexano das folhas, todas as outras sugeriram uma possível atividade antirradicalar (manchas amareladas sob um fundo roxo), quando comparado com o controle positivo [(+)-catequina], conforme mostra a (Figura 20).

Figura 20 - Cromatogramas de algumas das amostras após reação com DPPH.



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

5.2.2 Avaliação quantitativa

As amostras com resultados positivos nos ensaios qualitativos foram submetidas à avaliação quantitativa. Neste ensaio, determinou-se a concentração da amostra necessária para diminuir a concentração inicial do DPPH em 50% (CI_{50}), que é a medida de eficiência das amostras analisadas. Os valores de CI_{50} são inversamente proporcionais a atividade, ou seja, quanto menor o valor, maior será a capacidade antioxidante. Foram utilizados como padrões positivos o ácido ascórbico (CI_{50} $37,37 \pm 3,18 \mu\text{g/mL}$, cinética rápida) e o BHT (CI_{50} $97,86 \pm 2,52 \mu\text{g/mL}$, cinética lenta). Os valores de CI_{50} encontrados para as amostras testadas variaram de $39,87 \pm 13,46$ a $2.911,31 \pm 1,20 \mu\text{g/mL}$. As amostras que apresentaram $CI_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$ foram consideradas inativas. Dentre as amostras avaliadas, com exceção do extrato bruto em EtOH e a fração em hexano do caule que apresentaram valores de CI_{50} superiores a $200 \mu\text{g/mL}$, as demais, tais como o extrato bruto em EtOH das folhas e as frações em CHCl_3 , AcOEt e em MeOH- H_2O das folhas e caule, foram consideradas promissoras (valores de $CI_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$) (PARK et. al., 2010). No entanto, os melhores resultados como seqüestradores de radicais livres, comparáveis aos padrões utilizados (vitamina C e BHT), foram obtidos com as frações em AcOEt das folhas (CI_{50} $74,15 \pm 14,73 \mu\text{g/mL}$) e do caule (CI_{50} $39,87 \pm 13,46 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 4).

Tabela 4 – Resultados da avaliação da atividade dos extratos e frações das folhas e do caule frente ao radical DPPH.

Parte da Planta/ Amostra	DPPH (Qualitativo)	DPPH CI ₅₀ ± DP (µg/mL)
<i>Folhas</i>		
Extr. Bruto (EtOH)	+	195,23 ± 1,30
Fr. Hexano	-	NT
Fr. CHCl ₃	+	155,93 ± 3,87
Fr. AcOEt	+	74,15 ± 4,73
Fr. MeOH-H ₂ O	+	123,45 ± 2,22
<i>Caule</i>		
Extr. EtOH	+	350,78 ± 2,71
Fr. hexano	+	2911,31 ± 1,20
Fr. CHCl ₃	+	192,33 ± 1,58
Fr. AcOEt	+	39,87 ± 3,46
Fr. MeOH	+	106,77 ± 4,38
<i>Padrões positivos</i>		
Ácido ascórbico	+	37,37 ± 3,18
BHT	+	97,86 ± 2,52

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Nota: (-) = negativo; (+) = positivo; NT = não testado

Da fração em AcOEt, com forte potencial antioxidante, das folhas foi isolada a substância codificada de **TbFAc-1** (Figura 20), identificada como sendo um flavonóide, possivelmente um dos componentes responsável pela atividade seqüestradora de radicais livres desta fração.

Já as frações em CHCl₃ das folhas e do caule, apresentaram fraca capacidade de seqüestrar radicais livres. O que pode ser justificado pela presença de flavonóides contendo um número menor de grupos hidroxilas em suas estruturas, tais como **TbFC-1** e **TbCC-2** (Figura 20), isolados, respectivamente nestas frações.

Os flavonoides são pigmentos naturais presentes em plantas capazes de proteger o corpo contra danos por agentes oxidantes, tais como os raios ultravioletas, poluição ambiental, produtos químicos nos alimentos, etc. O corpo

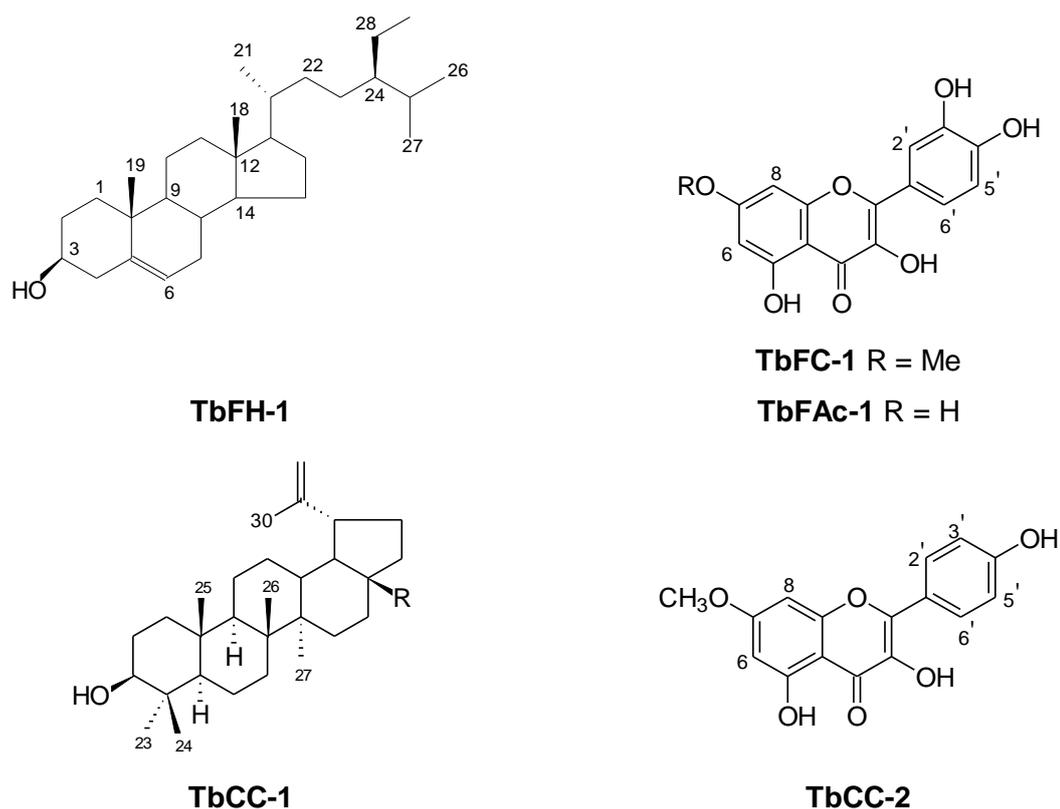
humano não pode produzir essas substâncias, portanto, deve ser obtida através da dieta ou suplementos (HALLIWELL et al., 1992). Sob o ponto de vista nutricional, as propriedades antioxidantes dos flavonoides são muitas vezes capazes de inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), além de reduzirem significativamente as tendências a doenças tromboticas. Também tem poder de induzir enzimas do sistema desintoxicante como a glutadiona transferase. Quando em alimentos, os flavonoides agem de forma a poupar o consumo de vitamina C, evitando a formação de radicais livres (RAUHA et al., 2000). Os efeitos farmacológicos dos flavonoides são muito vastos, dentre estes se destacam as ações antioxidante, antiinflamatória e antiplaquetária, além de efeitos antialergênicos. Eles podem inibir enzimas destacando-se como a prostaglandina sintetase, a lipoxigenase e a ciclo-oxigenase, todas relacionadas diretamente com a tumorigênese (KURO; SUHAILA, 2001).

A atividade antioxidante dos flavonóides e de outros compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química, características que desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOUSA et al., 2007). De um modo geral, os compostos fenólicos são responsáveis pela prevenção de doenças degenerativas, neste sentido, as frutas, principalmente as que apresentam a coloração vermelha/azul, são as mais importantes fontes de compostos fenólicos em dietas alimentares. Especialmente os derivados do ácido hidroxibenzóico e do ácido hidroxicinâmico dentre estes se cita as antocianinas, os flavonóis, as catequinas e os taninos (hidrolisados ou condensados) nas quais estão frequentemente presentes. Muitos destes compostos apresentam uma grande gama de efeitos biológicos, incluindo ações antioxidantes, antimicrobiana, antiinflamatória e vasodilatadora (MELO; GUERRA, 2002).

5.3 Resultados do Estudo Fitoquímico

O estudo fitoquímico efetuado com alguns dos extratos que apresentaram resultados promissores nos ensaios efetuados resultou no isolamento de cinco substâncias (Figura 21), que foram codificadas de acordo com o nome da espécie [*T. breyniana* (Tb)], parte da planta (**F** = folhas e **C** = caule) e fração da qual foi isolada (**Ac** = AcOEt, **C** = clorofórmio, **H** = hexano). Esses compostos tiveram suas estruturas identificadas com base na análise dos dados obtidos dos espectros de RMN ^1H e de ^{13}C , incluindo experimento DEPT 135 e técnicas bidimensionais, tais como HSQC, HMBC e DOSY, bem como comparação com dados de modelos e de compostos correspondentes descritos na literatura.

Figura 21 – Estrutura Química dos Compostos Isolados da espécie *T. breyniana*.



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

5.3.1 Identificação Estrutural da Substância Codificada de **TbFH-1**

A partir da análise dos dados espectrais de RMN obtidos, bem como pela comparação com dados descritos na literatura, a substância codificada como **TbFH-1**, isolada da fração em hexano das folhas, foi identificada como sendo um fitoesteróide (Figura 21).

Os dados do espectro de RMN ^1H em CDCl_3 de **TbFH-1** (Figura 23, Tabela 5) permitiu reconhecer valores de deslocamentos químicos compatíveis com a presença de hidrogênios carbinólicos [δ 3,46 (m, H-3)], hidrogênios olefínicos [δ 5,26 (dl, H-6)] e para vários grupos metilas (δ 0,61 a δ 1,18).

A análise conjunta dos espectros de RMN ^{13}C (Figura 24) e DEPT 135 (Figura 25), revelou a presença de um carbono carbinólico [δ 71,80 (CH)], para uma ligação dupla do tipo trissubstituída [δ 140,75 (C, C-5) e δ 121,74 (CH, C-6)], compatíveis com ligações duplas entre C-5 e C-6 de fitoesteróides, além de sinais para vários grupos metilas.

A análise conjunta dos dados espectrais obtidos permitiu identificar a substância **TbFH-1** como sendo o β -sitosterol (*estimasta-5-en-3 β -ol*). Esta proposta estrutural foi confirmada pela comparação dos dados de RMN ^{13}C obtidos com os do composto correspondente (Tabela 5) descritos na literatura (MACARI et. al., 1990).

Figura 22 – Estrutura Química de TbFH-1.

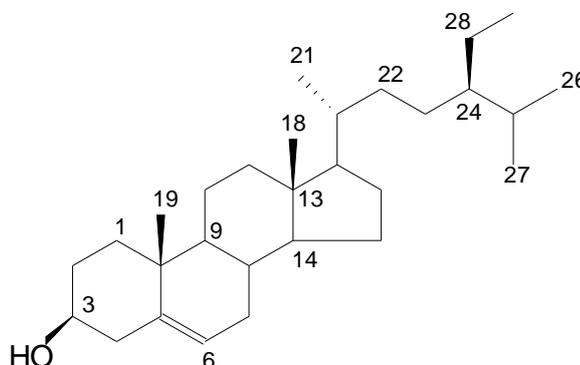


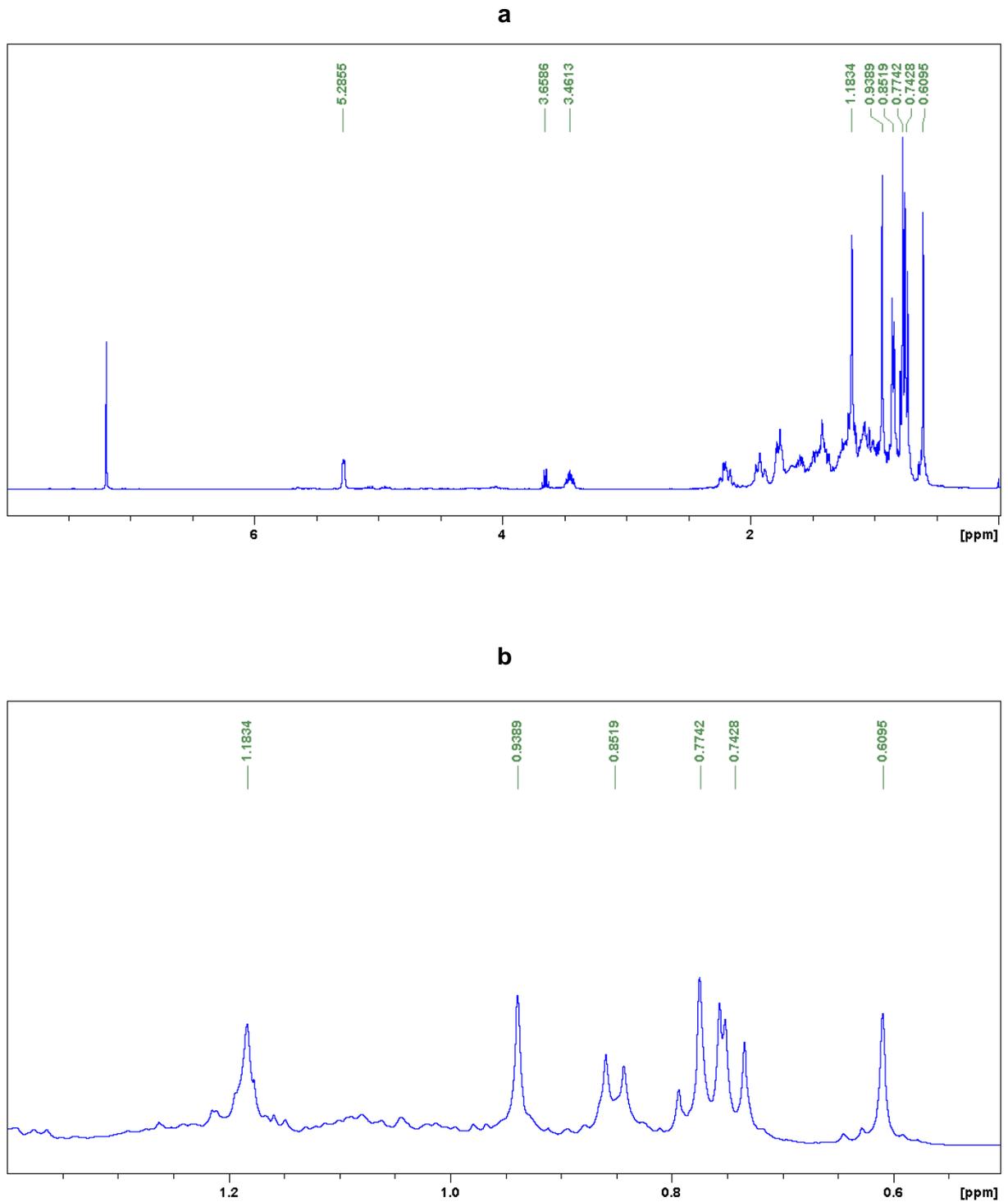
Tabela 5 – Dados de RMN (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3 , δ , J em Hz) da substância TbFH-1 e comparação com o β -Sitosterol.

Posição	TbFH-1		β -Sitosterol	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C				
5	140,75		140,7	
10	36,50		36,4	
13	42,28		42,3	
CH				
3	71,82	3,46 (m)	71,7	3,50 (m)
6	121,74	5,26 (dl)	121,6	5,20 (m)
8	31,89		31,8	
9	50,11		50,1	
14	56,76		56,7	
17	56,04		56,1	
20	36,15		36,0	
24	45,82		45,8	
25	29,12		29,1	
CH₂				
1	37,25		37,2	
2	31,64		31,6	
4	42,32		42,3	
7	31,91		31,8	
11	21,08		21,1	
12	39,79		39,7	
15	24,30		24,2	
16	28,26		28,1	
22	33,93		33,9	
23	26,03		26,1	
28	23,05		23,0	
CH₃				
18	11,86	0,61 (s)	11,9	0,68(s)
19	19,40	1,18 (s)	19,3	0,99(s)
21	18,78	0,94 (d, J= 6,9)	18,7	0,95(s)
26	19,84	0,85 (d, J = 6,6)	19,6	0,95(s)
27	19,02	0,74 (d, J = 6,6)	18,9	0,78(s)
29	11,99	0,77 (t)	11,9	0,80 (s)

Fonte: MACARI et al., 1990; Autora desta dissertação, 2012.

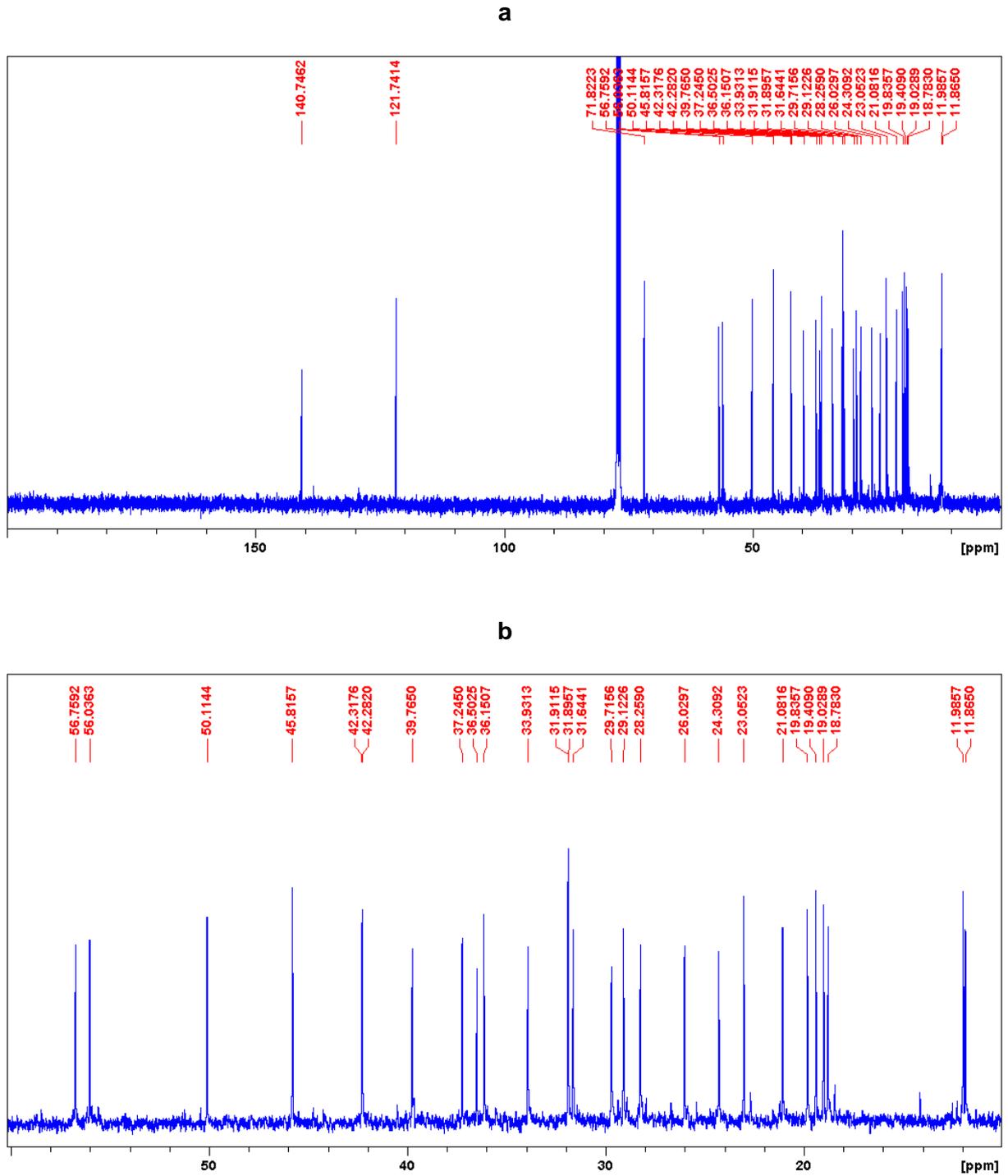
Nota: m = multipletto; dl = dupletto largo; s = simpleto.

Figura 23 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância codificada TbFH-1 (a) e expansão da região entre δ 0,50 a δ 1,40 (b).



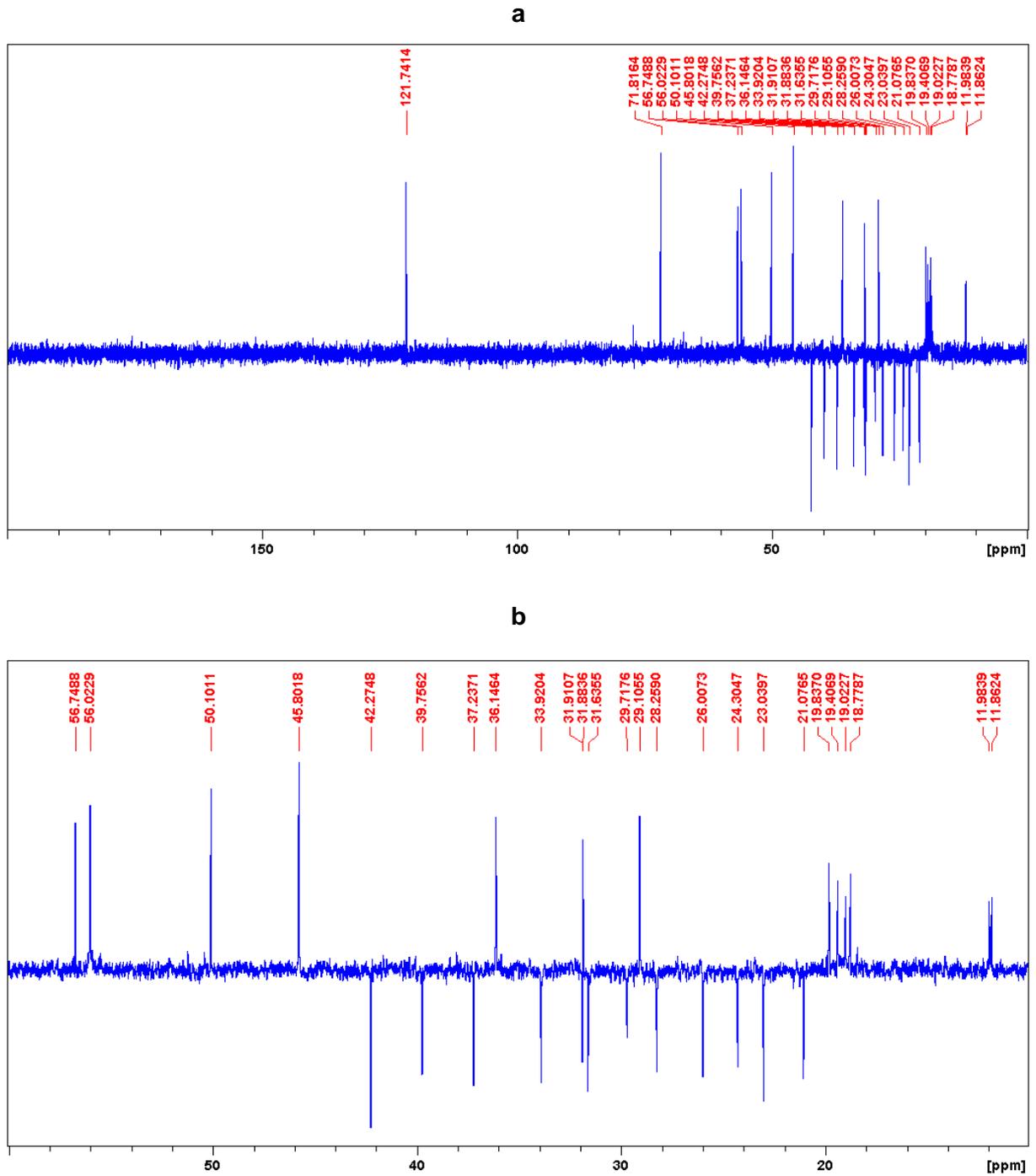
Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Figura 24 – Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância codificada TbFH-1 (a) e expansão da região entre δ 10,0 a δ 60,0 (b).



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Figura 25 – Espectro DEPT (100 MHz, CDCl_3) da substância codificada TbFH-1 (a) e expansão da região entre δ 10,0 a δ 60,0 (b).



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

5.3.2 Identificação Estrutural das Substâncias Codificadas de **TbFC-1** e **TbFAc-1**

As substâncias codificadas de **TbFC-1** e **TbFAc-1** (Figura 26) foram identificadas como sendo derivados flavonoídicos com base na análise dos dados obtidos dos respectivos espectros de RMN, bem como pela comparação com os dados descritos na literatura.

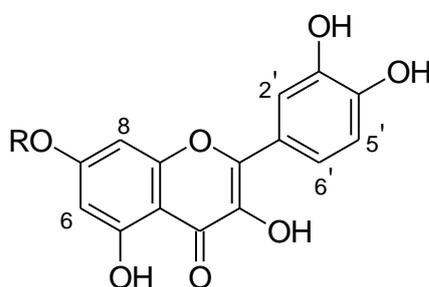
Os dados obtidos dos respectivos espectros de RMN ^1H a 400 MHz (Figura 27; Tabelas 6 e 7) das duas substâncias, mostraram sinais cujos valores de deslocamento químico, multiplicidades e constantes de acoplamento estão compatíveis com a presença de anéis aromáticos dos tipos tetrassubstituído [**TbFC-1**: δ 6,19 e δ 6,39 (*d*, $J = 2,1$ Hz cada); **TbFAc-1**: δ 6,19 e δ 6,39 (*d*, $J = 2,0$ Hz cada)] e trissubstituído [**TbFC-1**: δ 7,74 (*d*, $J = 2,1$ Hz); δ 7,63 (*dd*, $J = 2,1$ e 8,4 Hz) e δ 6,89 (*d*, $J = 8,55$ Hz); **TbFAc-1**: δ 7,74 (*d*, $J = 2,1$ Hz); δ 7,62 (*dd*, $J = 2,1$ e 8,4 Hz) e δ 6,88 (*d*, $J = 8,4$ Hz)].

A análise conjunta dos dados obtidos dos espectros de RMN ^{13}C (Figura 28; Tabelas 6 e 7) e DEPT 135 (Figura 29) permitiu identificar para **TbFC-1** e **TbFAc-1** um total de 16 e 15 átomos de carbono, respectivamente, sendo dez não hidrogenados (**TbFC-1** e **TbFAc-1**) e cinco monohidrogenados (**TbFC-1** e **TbFAc-1**) e um trihidrogenado (**TbFC-1**). Dentre os carbonos não hidrogenados foram observados que em sete deles os valores de deslocamentos químicos sugeriram a presença de carbonos sp^2 oxigenados, um carbonílico e dois carbonos hibridizados em sp^2 não oxigenados (Tabelas 6 e 7). Esta análise permitiu sugerir, respectivamente, fórmulas moleculares $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$ e $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a onze e sugerir esqueletos estruturais de flavonoides ($\text{C}_6\text{C}_3.\text{C}_6$) para ambos compostos. Estas informações, associada à ausência nos espectros de RMN ^1H de sinal simples entre δ 6,0-6,60, típico de H-3 de flavonas (MARKHAM, 1989), permitiu sugerir para ambos os esqueletos de flavonol.

Nos espectros de RMN da substância **TbFC-1** foi observado a presença de um grupo metoxila pelos sinais em δ 3,88 e em δ 56,46. No espectro HMBC este sinal mostrou correlação com o C-7 (δ 165,50) e no espectro HSQC com o sinal em δ 56,46 (Figura 30).

A análise conjunta dos dados espectrais obtidos permitiu propor para **TbFC-1** a estrutura do flavonol conhecido como **7-O-metilquercetina** (*3,5,3',4'-Tetrahidroxiflavona*) e para **TbFAc-1** a estrutura do flavonol conhecido como *Quercetina* (*3,5,7,3',4'-Pentaidroxiflavona*). Estas propostas estruturais foram confirmadas pela comparação com dados de RMN da *Quercetina* descritos na literatura (Tabelas 6 e 7).

Figura 26 – Estrutura Química de TbFC-1 (a) e TbFAc-1 (b).



a R = Me

b R = H

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Tabela 6 – Dados de RMN (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, CD_3OD , δ , J em Hz, da substância TbFC-1 e comparação com a *Quercetina*.

Posição	TbFC-1		Quercetina	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C				
2	148,70		147,63	
3	137,17		135,64	
4	177,26		175,76	
5	162,44		160,64	
7	165,50	3,88 (HMBC)	163,85	
9	158,15		156,07	
10	104,44		102,92	
1'	124,07		121,88	
3'	146,15		144,99	
4'	147,91		146,73	
CH				
6	99,16	6,19 (d, J = 2,1)	98,12	6,19 (s)
8	94,33	6,39 (d, J = 2,1)	93,28	6,41 (s)
2'	116,04	7,74 (d, J = 2,1)	115,00	7,67 (d, J = 1,8)
5'	116,15	6,89 (d, J = 8,5)	115,54	6,89 (d, J = 8,4)
6'	121,66	7,63 (dd, J = 2,1 e 8,5)	119,90	7,54 (dd, J = 1,8 e 8,4)
CH₃O				
7	56,46	3,88 (HSQC)		

Fonte: KIM, 2005; Autora desta dissertação, 2012.

Nota: s = simpleto; d = duplete; dd = duplo duplete.

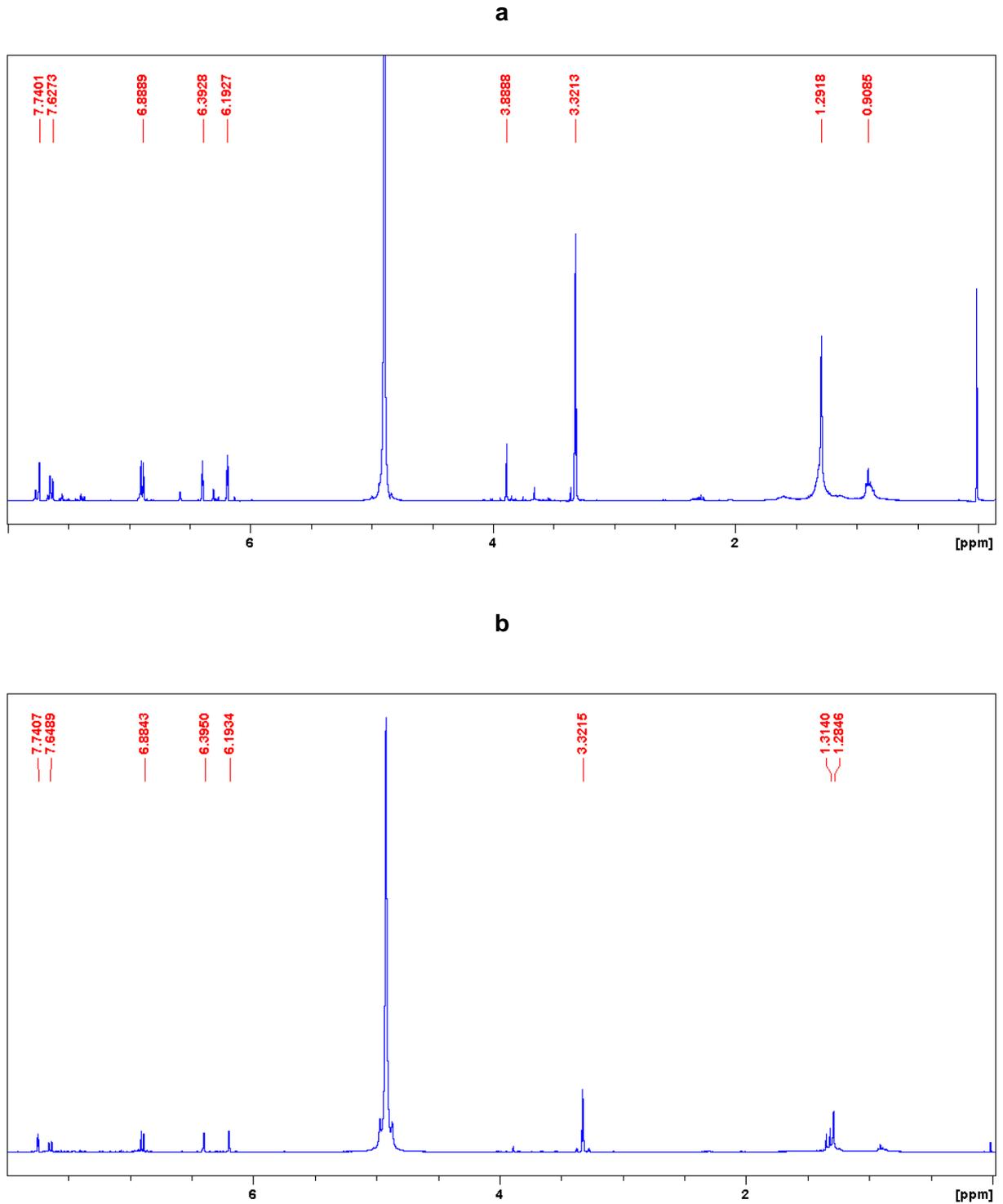
Tabela 7 – Dados de RMN (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, CD_3OD , δ , J em Hz, da substância TbFAc-1 e comparação com a *Quercetina*.

Posição	TbFAc-1		<i>Quercetina</i>	
	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H
C				
2	147,35		147,63	
3	135,81		135,64	
4	175,90		175,76	
5	161,06		160,64	
7	164,13		163,85	
9	156,79		156,07	
10	103,10		102,92	
1'	122,71		121,88	
3'	144,79		144,99	
4'	146,58		146,73	
CH				
6	97,82	6,19 (d, J = 2,0)	98,12	6,19 (s)
8	93,00	6,39 (d, J = 2,0)	93,28	6,41 (s)
2'	114,57	7,74 (d, J = 2,1)	115,00	7,67 (d, J = 1,8)
5'	114,81	6,88 (d, J = 8,4)	115,54	6,89 (d, J = 8,4)
6'	120,27	7,62 (dd, J = 2,1 e 8,4)	119,90	7,54 (dd, J = 1,8 e 8,4)

Fonte: KIM, 2005; Autora desta dissertação, 2012.

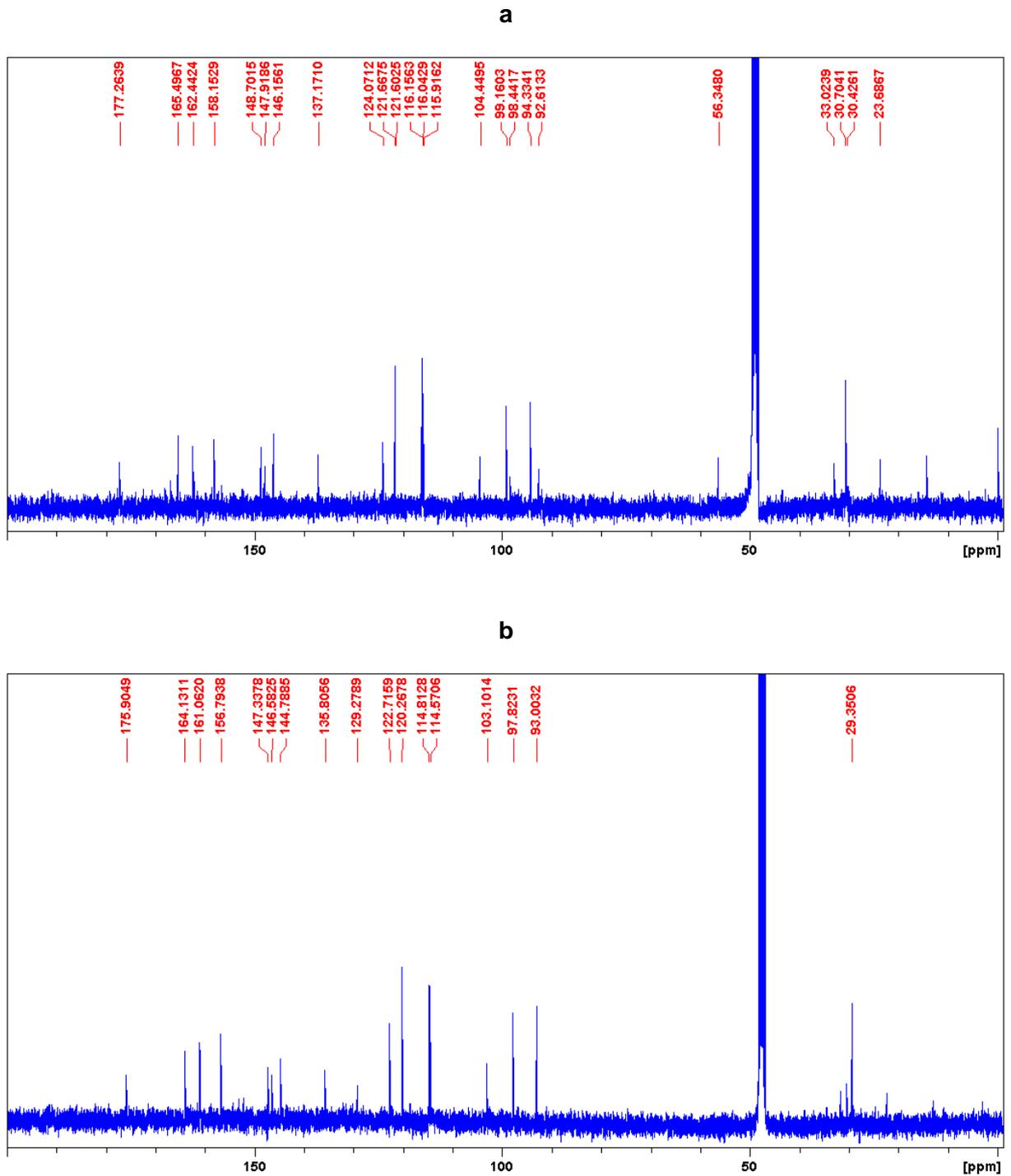
Nota: s=simpleto; d =dupleto; dd =duplo dupleto.

Figura 27 – Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) das substâncias codificadas de TbFC-1 (a) e TbFAC-1 (b).



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

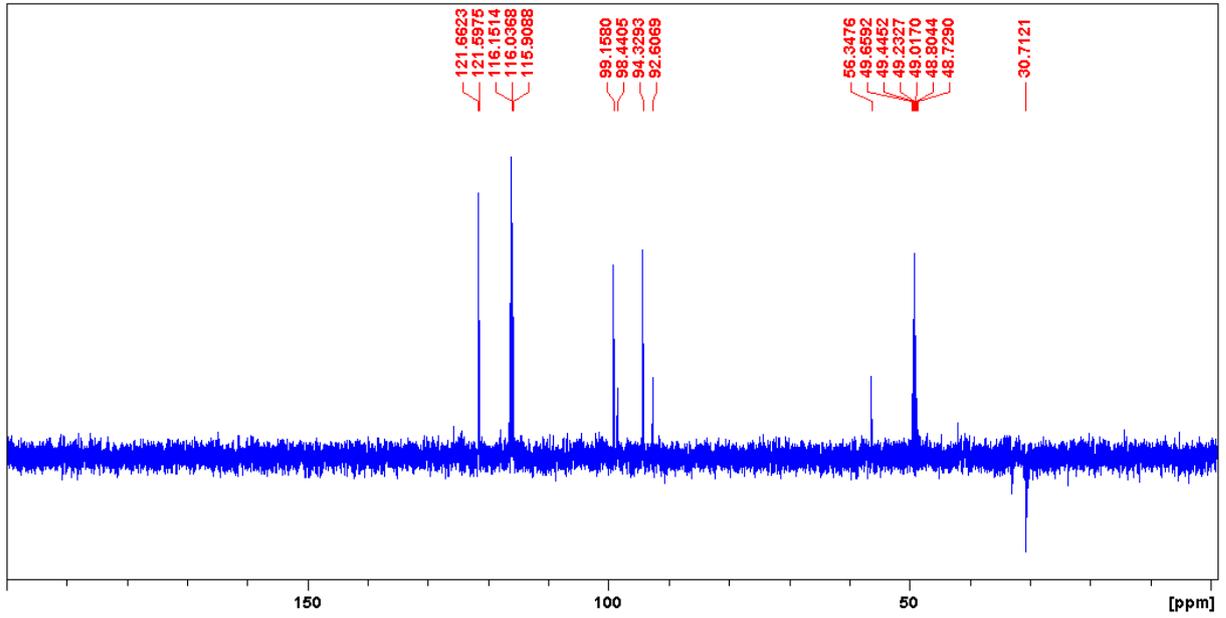
Figura 28 – Espectros de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) das substâncias codificadas de TbFC-1 (a) e TbFAC-1 (b).



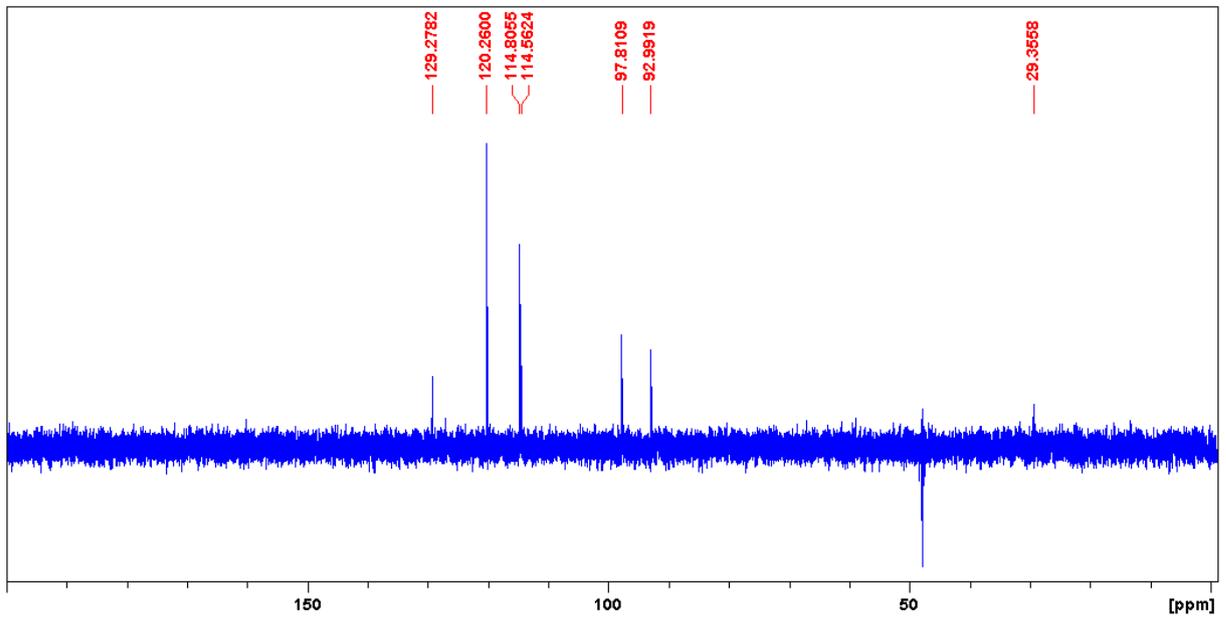
Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Figura 29 – Espectros DEPT (100 MHz, CD₃OD) das substâncias codificadas de TbFC-1 (a) e de TbFAc-1 (b).

a

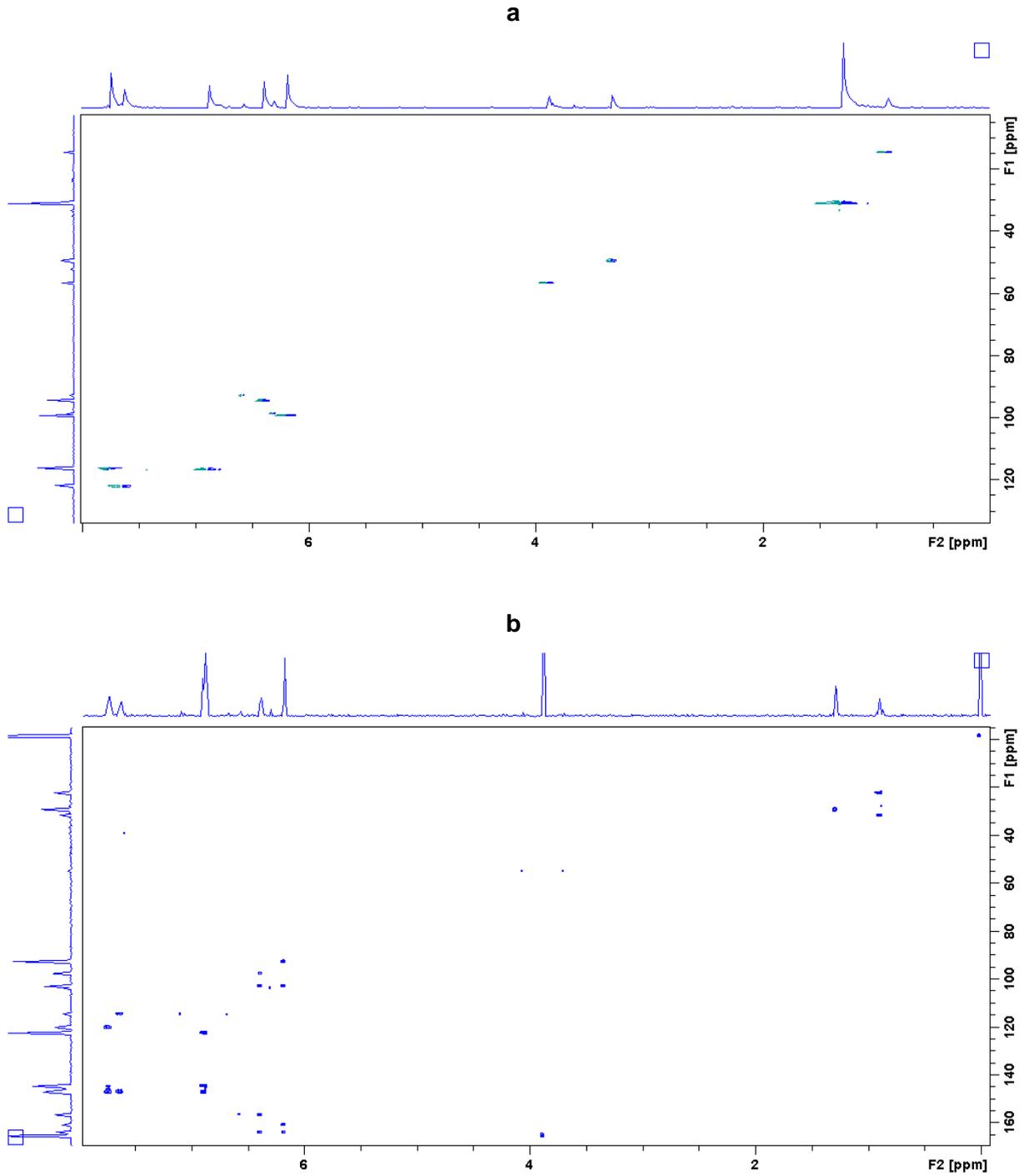


b



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Figura 30 – Espectros HSQC (a) e HBMB (b) (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância codificada de TbFC-1.



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

5.3.3 Identificação Estrutural da Substância Codificada de **TbCC-1**

A substância codificada de **TbCC-1** (Figura 31) foi identificada como sendo um triterpeno pentacíclico da série lupano com base na análise dos dados obtidos dos espectros de RMN, bem como pela comparação com os dados descritos na literatura.

O espectro de RMN ^1H obtido a 400 MHz (Figura 32; Tabela 8), permitiu reconhecer a presença de vários sinais simples na faixa de δ 0,75 a 0,99, atribuídos a grupos metílicos angulares e um sinal simples em δ 1,69 atribuído a hidrogênio de grupo metila ligado a carbono sp^2 . Adicionalmente, foi observado um sinal múltiplo em δ 3,15, atribuído ao hidrogênio oximetínico, e sinais alargados atribuídos a hidrogênios olefínicos [δ 4,71 e 4,60 (sl)]. Essa feição espectral associada aos demais valores de deslocamentos químicos permitiu sugerir para a substância o esqueleto de triterpeno pentacíclico da série lupano.

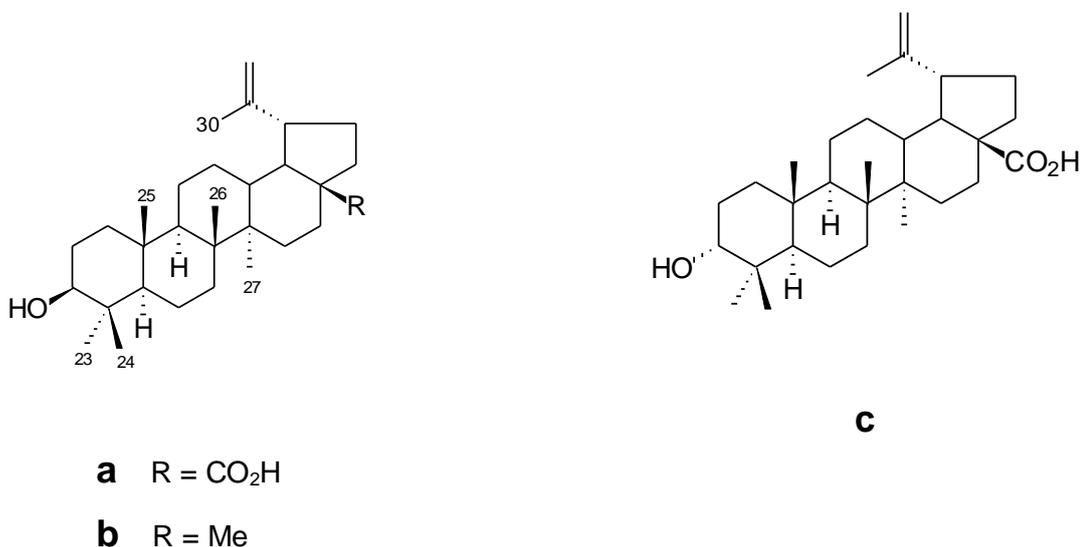
A análise dos dados obtidos dos respectivos espectros de RMN ^{13}C (Figura 33; Tabela 8,) e DEPT 135 (Figura 34), permitiu reconhecer um total de trinta sinais de átomos de carbono. Destes, sete são não hidrogenados, seis são monohidrogenados, onze são dihidrogenados e seis são trihidrogenados. Dentre esses carbonos foi possível reconhecer a presença de ligação dupla do tipo metileno terminal [δ 151,15 (C) e 109,80 (CH_2)], além de sinais para carbono oximetínico [δ 79,06 (CH)] e para um grupo carboxila [δ 179,57 (C)]. Estes dados permitiram reforçar a possibilidade de **TbCC-1** ser um triterpeno pentacíclico da série lupano.

Os valores de deslocamentos químicos atribuídos ao C-3 [δ 79,06 (CH)] e ao C-5 [δ 55,92 (CH)], bem como a proteção observada para o grupo metila em C-24 (δ 15,68) permitiram sugerir para o grupo hidroxila em C-3 uma configuração *beta*-equatorial, pois se fosse o contrário (*alfa*-axial) o C-3 (em torno de δ 75,0) e o C-5 (em torno de δ 49,0) seriam mais protegidos, enquanto que o C-24 seria desprotegido, como no ácido 3α -betulínico (δ 22,5) (Tabela 8) (MAHATO; KUNDU, 1994). Além disso, a análise comparativa dos valores de deslocamentos químicos atribuídos ao C-17 (δ 56,70) quando comparados com o correspondente do **Lupeol** (δ 43,0) permitiram sugerir a presença de um grupo carboxílico em C-28 (δ 179,57).

O espectro HSQC (Figura 34) mostra correlação do carbono que absorve em δ 109,80 com os sinais dos hidrogênios olefínicos que absorvem em δ 4,71 e δ 4,60.

Estas observações, associada aos valores de deslocamentos químicos dos demais carbonos e comparação com dados dos compostos **Ácido 3 β -betulínico**, **Ácido 3 α -betulínico** e **Lupeol** descritos na literatura (Tabela 8) permitiram propor a estrutura do triterpeno pentacíclico da série lupano conhecido como **Ácido 3 β -betulínico** para **TbCC-1**.

Figura 31 – Estrutura Química de TbCC-1 (a), Lupeol (b) e Ácido 3 β - betulínico (c).



Fonte: MAHATO & KUNDU, 1994; ANDRADE, 199; Autora desta dissertação, 2012.

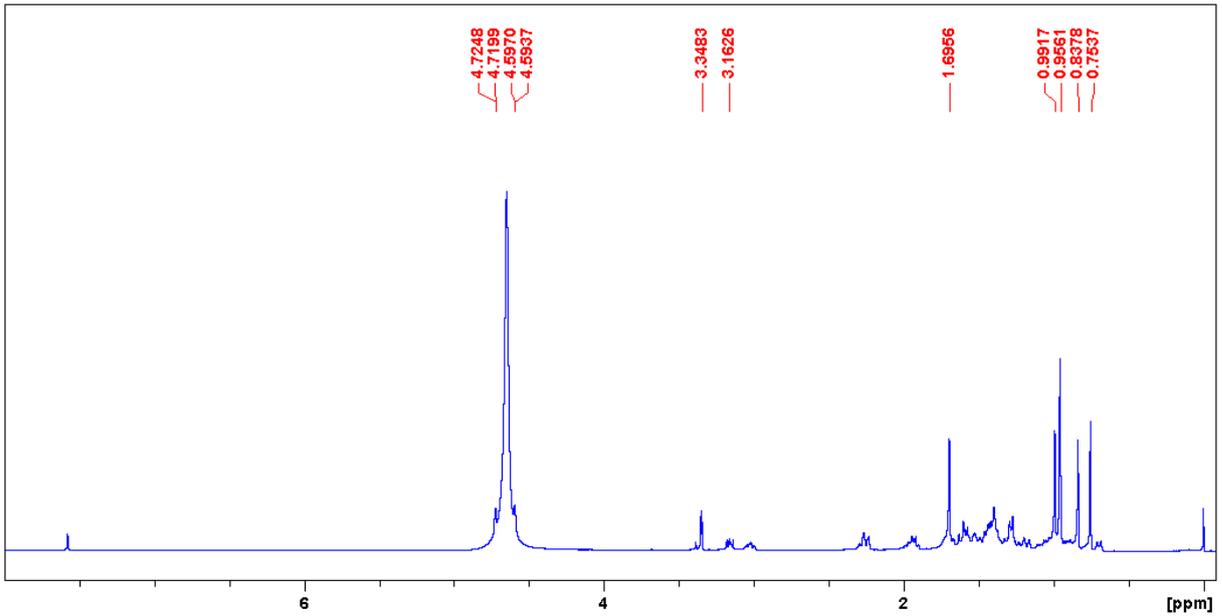
Tabela 8 – Dados de RMN (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, δ) da substância TbFCC-1 e comparação com dados dos Ácidos 3β -betulínico e 3α -betulínico e Lupeol.

Posição	TbFCC-1		Ácido 3β -betulínico		Ácido 3α -betulínico	Lupeol
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
C						
4	39,25			38,8	39,0	38,8
8	40,13			40,7	41,2	40,08
10	37,59			37,2	37,7	37,1
14	42,87			42,4	42,9	42,8
17	56,70			56,3	56,6	47,9
20	151,15			150,3	151,2	150,9
28	179,57			180,5	178,7	-----
CH						
3	79,06	3,15 (m)	3,13 (m)	78,9	75,5	78,9
5	55,92			55,3	49,3	55,3
9	50,06			50,5	50,7	50,4
13	38,79			38,4	38,5	38,0
18	47,51			46,8	47,7	48,3
19	49,66			49,2	49,7	47,9
CH₂						
1	39,31			38,7	34,0	38,7
2	27,27			27,4	23,2	27,4
6	18,73			18,3	18,6	18,3
7	34,80			34,3	34,8	34,2
11	21,33			20,8	21,0	20,9
12	26,01			25,5	26,1	25,1
15	31,00			30,5	31,2	27,4
16	32,71			32,1	32,8	35,5
21	30,11			29,7	29,9	29,8
22	37,55			37,0	37,5	40,0
29	109,80	4,71 e 4,60 (sl)		109,6	109,8	109,3
CH₃						
23	28,17	0,95 (s)	0,88 (s)	27,9	29,2	28,0
24	15,68	0,75 (s)	0,75 (s)	15,3	22,5	15,4
25	16,19	0,83 (s)	0,77 (s)	16,0	16,4	16,1
26	16,38	0,95 (s)	0,89 (s)	16,1	16,4	15,9
27	14,94	0,99 (s)	0,95 (s)	14,7	14,9	14,5
30	19,46	1,69 (s)	1,59 (s)	19,4	19,4	19,3
28	---	---	---	---	---	18,0

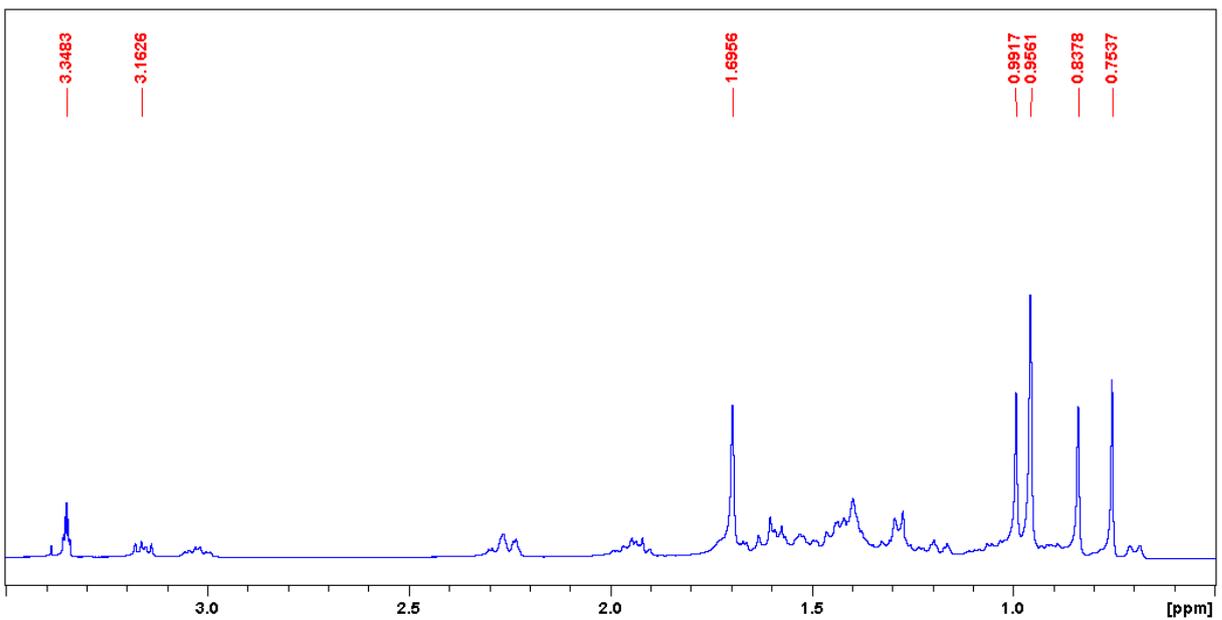
Fonte: MAHATO & KUNDU, 1994; ANDRADE, 1997; Autora desta dissertação, 2012.

Figura 32 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância codificada de TbCC-1 (a) e expansão da região δ 0,5 a δ 3,5 (b).

a



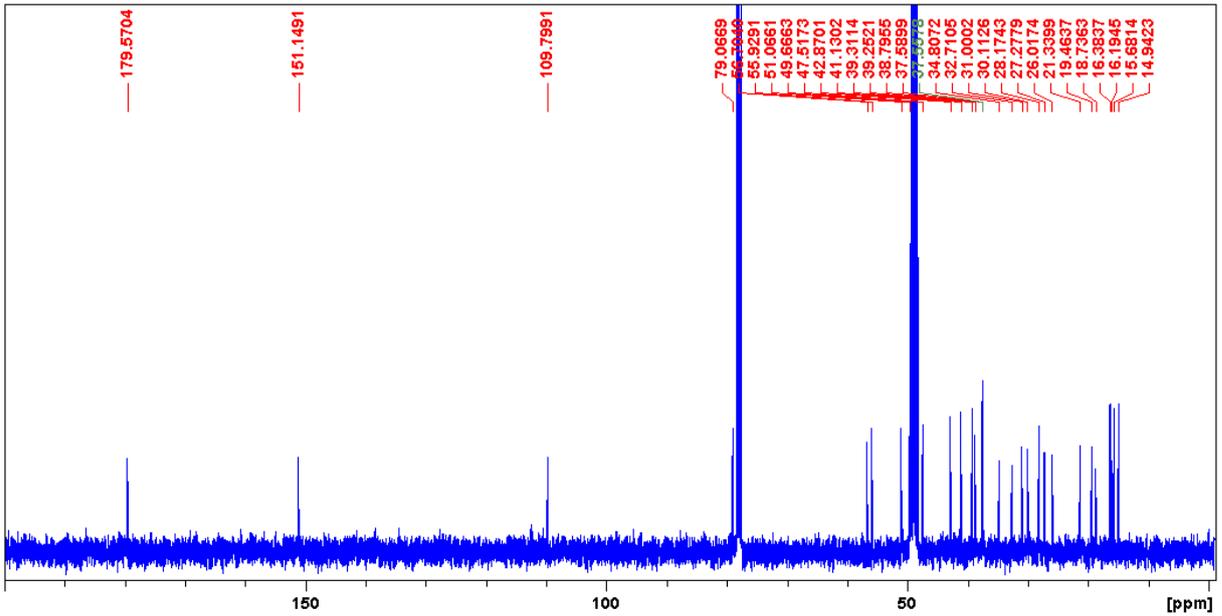
b



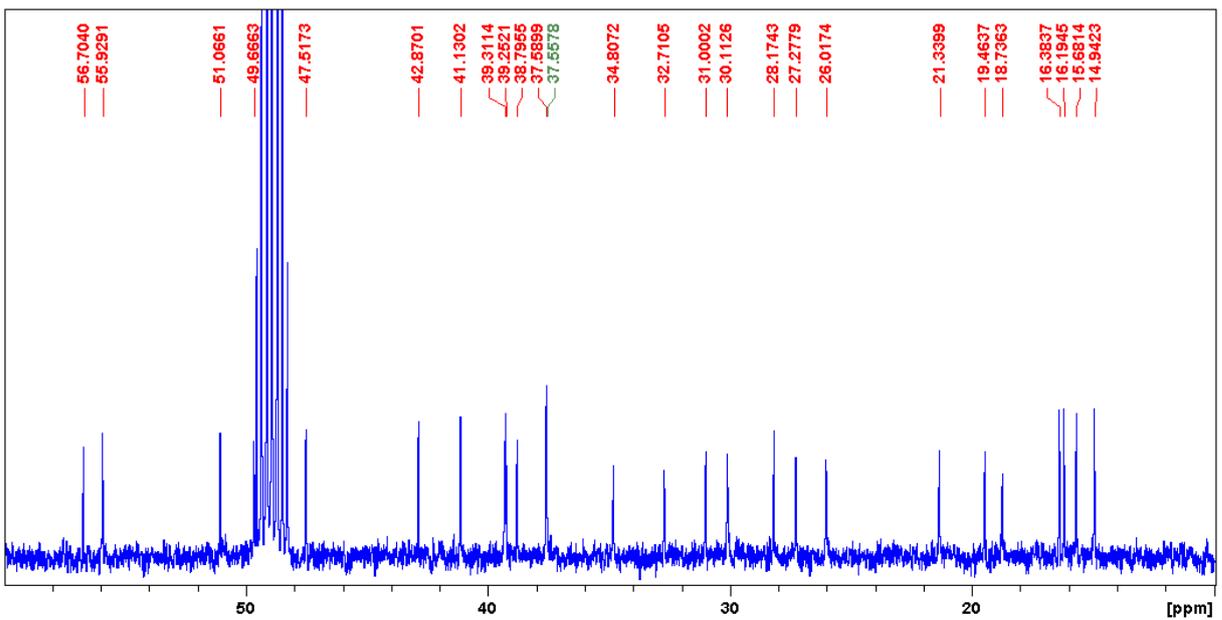
Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Figura 33 – Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância codificada de TbCC-1 (a) e expansão da região δ 10,0 a δ 60,0 (b).

a

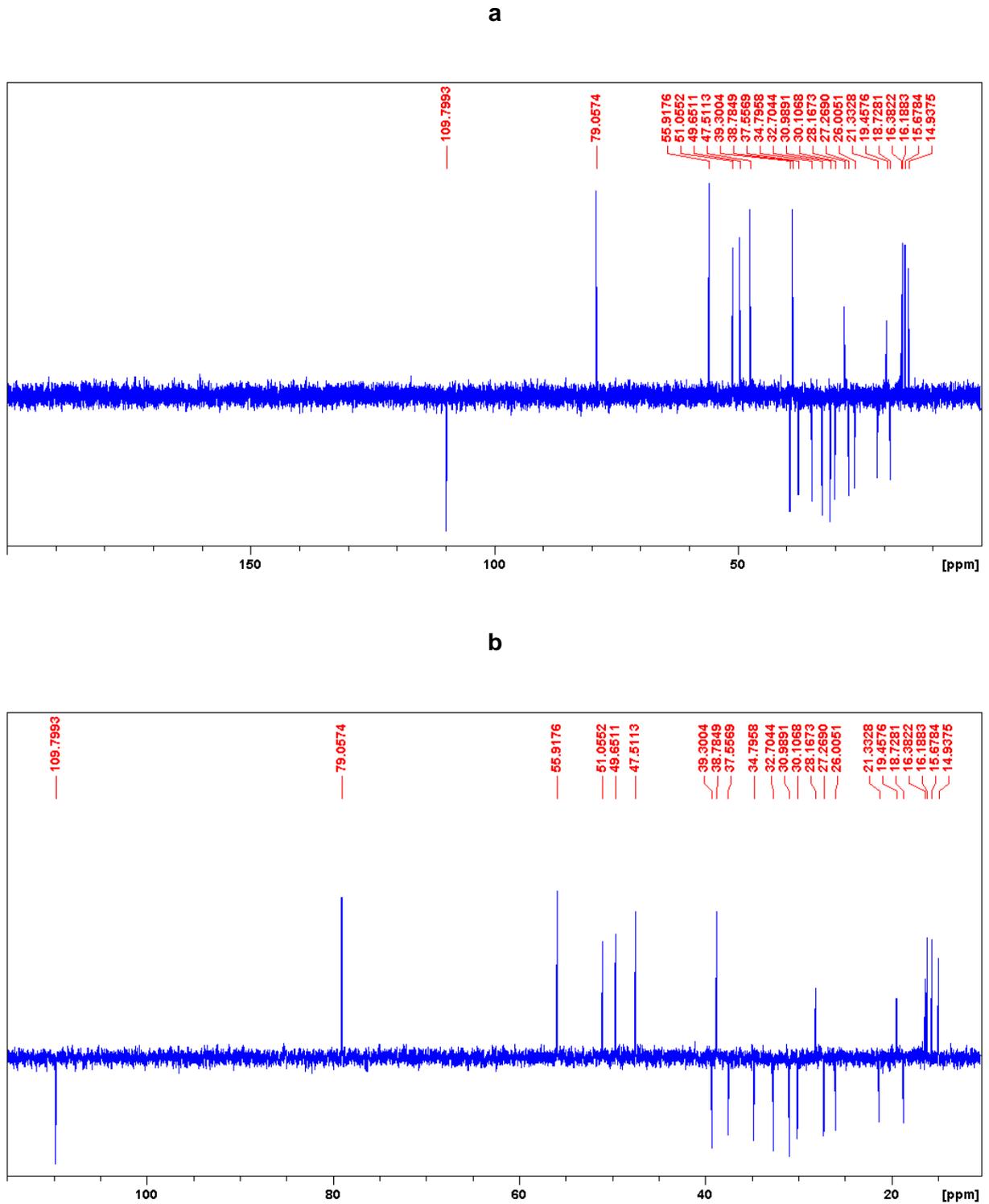


b



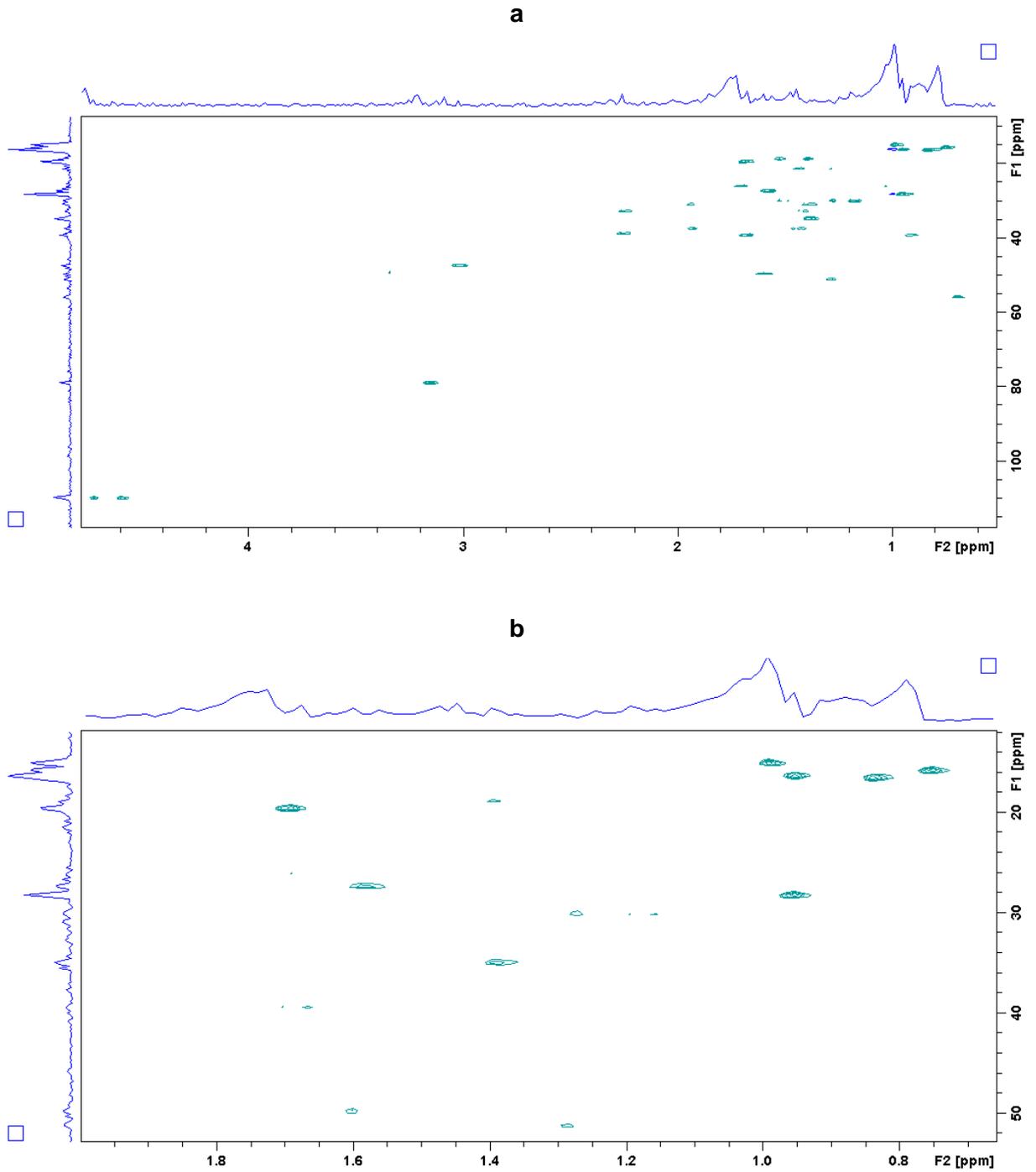
Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Figura 34 – Espectro DEPT 135 (100 MHz, CDCl₃/CD₃OD) da substância codificada de TbCC-1 (a) e expansão da região δ 10,0 a δ 115,0 (b).



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Figura 35 – Espectros HSQC (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância codificada de TbCC-1 (a) e expansão da região δ 0,60 a δ 2,00 (b).



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

5.3.4 Identificação Estrutural da Substância Codificada de **TbCC-2**

A substância codificada de **TbCC-2** (Figura 36) apresentou uma única mancha em CCD após revelação com luz UV e vapores de iodo. Após análise dos dados espectrais observou-se que a mesma era constituída por uma mistura de **TbCC-2** (componente minoritário) e **TbCC-1** (componente majoritário) descrita previamente no item 5.3.3 A substância **TbCC-2** foi identificada como sendo um flavonóide com base na análise dos dados obtidos dos espectros de RMN e pela comparação com dados da literatura.

Os dados obtidos do espectro de RMN ^1H a 400 MHz (Figura 37; Tabela 9), revelaram a presença de sinais duplos, cujos valores de deslocamentos químicos e constantes de acoplamento estão condizentes com a presença de anéis aromáticos dos tipos tetrassubstituído [δ 6,30 e δ 6,60 (d , $J = 1,5$ Hz cada)] e 1,4-dissubstituído [δ 6,90 e δ 8,12 (d , $J = 8,7$ Hz cada)].

A análise dos dados obtidos dos respectivos espectros de RMN ^{13}C (Figura 38; Tabela 9) e DEPT (Figura 39) permitiu reconhecer para **TbCC-2** a presença de 16 átomos de carbono, sendo nove não hidrogenados e seis monohidrogenados e um trihidrogenado. Dentre os carbonos não hidrogenados foram observados que em seis deles os valores de deslocamentos químicos sugerem a presença de carbonos sp^2 oxigenados (δ 137,47; 148,50; 158,18; 162,22; 167,06 e 160,69), de um carbonílico (δ 177,42) e de dois carbonos hibridizados em sp^2 não oxigenados (δ 105,43 e 123,66). Esta análise permitiu deduzir uma fórmula molecular de $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a dez, e sugerir um esqueleto estrutural de um flavonoide ($\text{C}_6\text{C}_3\text{C}_6$) para **TbCC-2**.

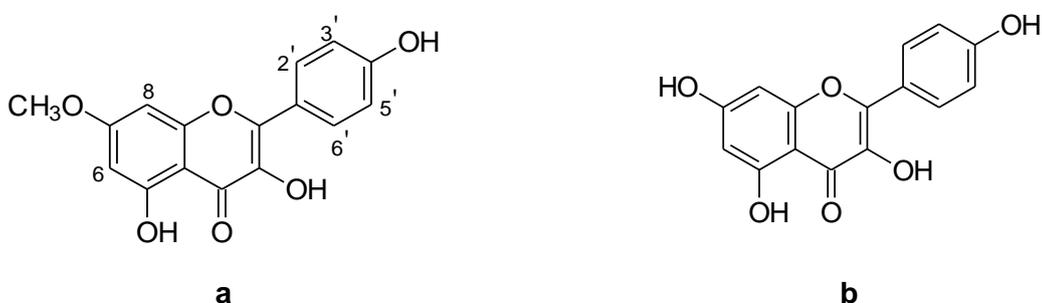
Nos espectros de RMN de **TbCC-2** foi observado a presença de um grupo metoxila em δ 3,80 (RMN ^1H) e em δ 56,48 (RMN ^{13}C). As correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC (Figuras 40 e 41) sugeriram sua posição na estrutura molecular.

O espectro ^1H -DOSY, forneceu diferentes coeficientes de difusão para os componentes da amostra: $\log D = -9,27$ ou $D = 5,37 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (**TbCC-1**) e $\log D$

= -9,16 ou $D = 6,92 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (**TbCC-2**), confirmando dessa forma a presença das duas substâncias (Figura 42).

A análise conjunta com dados espectrais discutidos permitiu propor a estrutura do flavonol **7-O-Metilcanferol**, conhecido como *Raminocitrina*. Esta proposta estrutural foi confirmada pela comparação com os dados de RMN obtidos com os do **canferol** e do composto correspondente descritos na literatura (PIZOLATTI *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2009) (Tabela 9).

Figura 36 – Estrutura Química de TbCC-2 (a) e do *Canferol* (b).



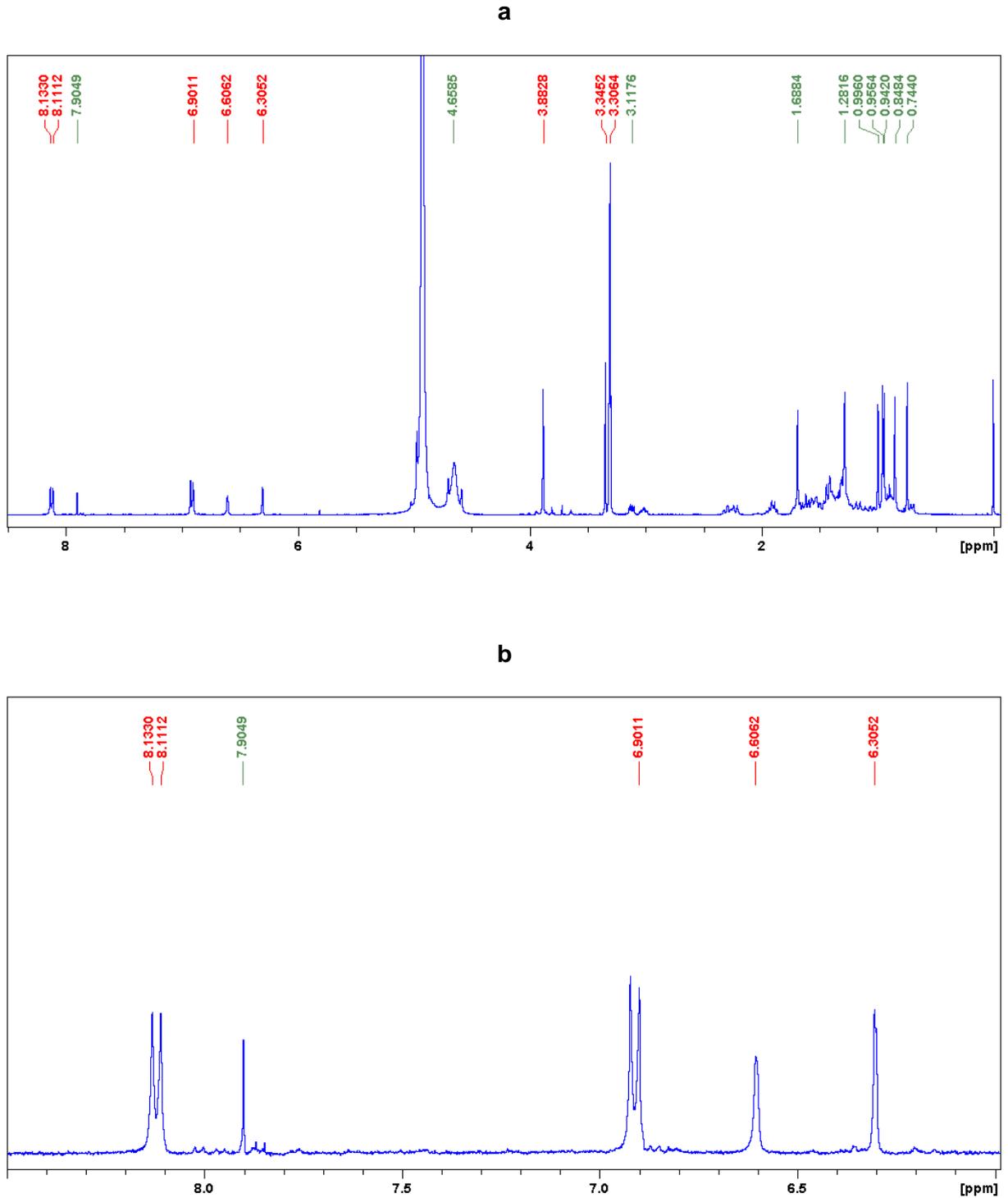
Fonte: SILVA *et al.*, 2009; Autora desta dissertação, 2012

Tabela 9 – Dados de RMN (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, δ , J em Hz) da substância TbCC-2 e comparação com dados do *Canferol* e de *7-O-Metilcanferol*.

Posição	TbCC-2		<i>Canferol</i>	<i>7-O-Metilcanferol</i>
	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}/\text{HSQC}$	δ_{C}	δ_{C}
C				
2	148,50		147,05	147,25
3	137,47		136,68	135,99
4	177,49		176,62	176,00
5	162,22		162,31	160,39
7	167,06	3,80 (HMBC)	165,08	164,91
9	158,18		157,83	156,12
10	105,43		104,16	104,16
1'	123,66		123,36	121,05
4'	160,69		160,02	159,33
CH				
6	98,61	6,30 (d, J = 1,5)	99,19	99,19
8	92,75	6,60 (d, J = 1,5)	94,54	92,02
2' e 6'	130,81	8,12 (d, J = 8,7)	130,49	129,61
3' e 5'	116,36	6,90 (d, J = 8,7)	116,35	115,47
OCH₃				
7	56,48	3,80 (s)	----	56,03

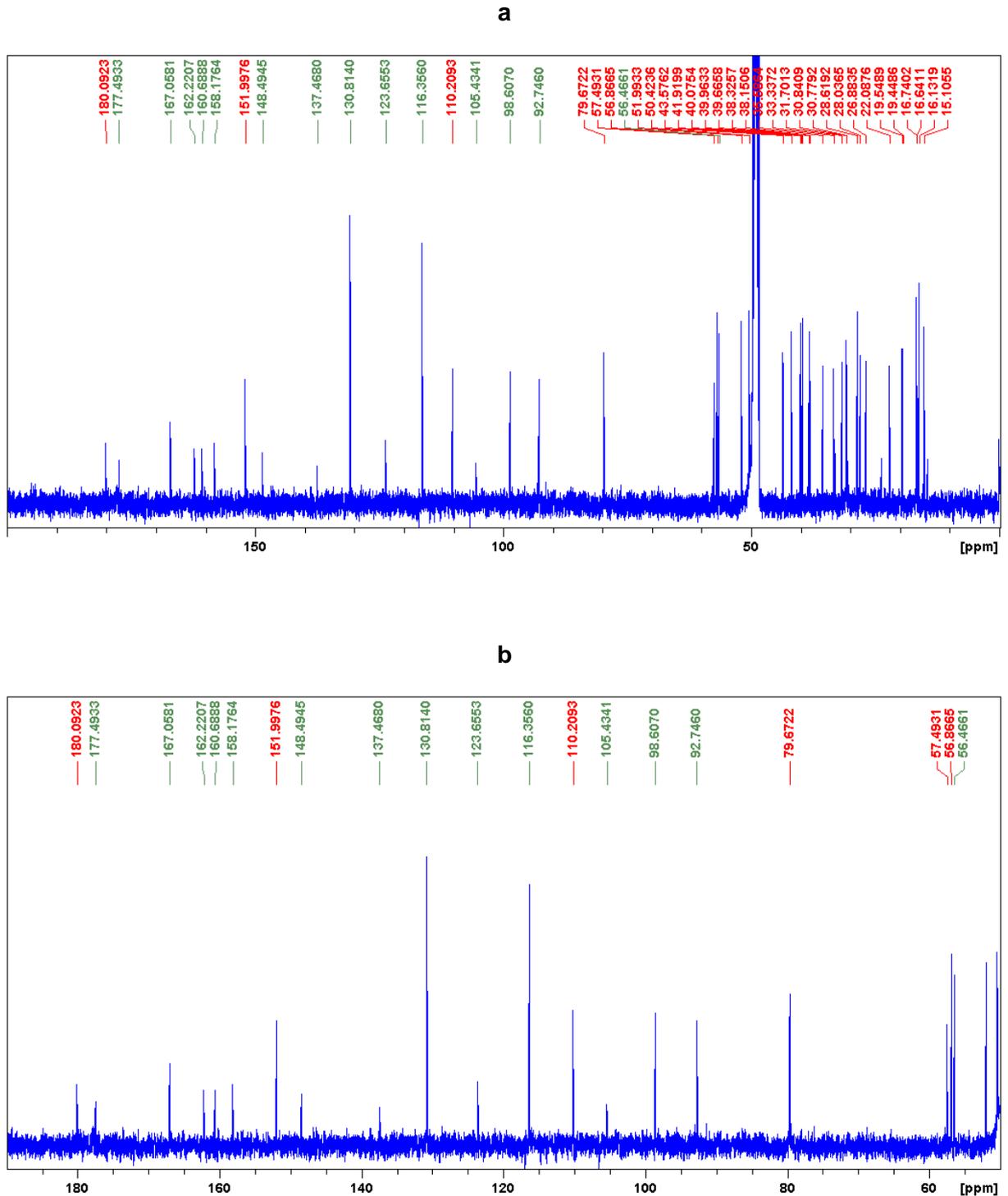
Fonte: PIZOLATTI et al., 2003; SILVA et al., 2009; Autora desta dissertação, 2012.

Figura 37 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da mistura das substâncias codificadas de TbCC-1 e TbCC-2 (a) e expansão da região entre δ 6,0 a δ 8,2 (b).



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

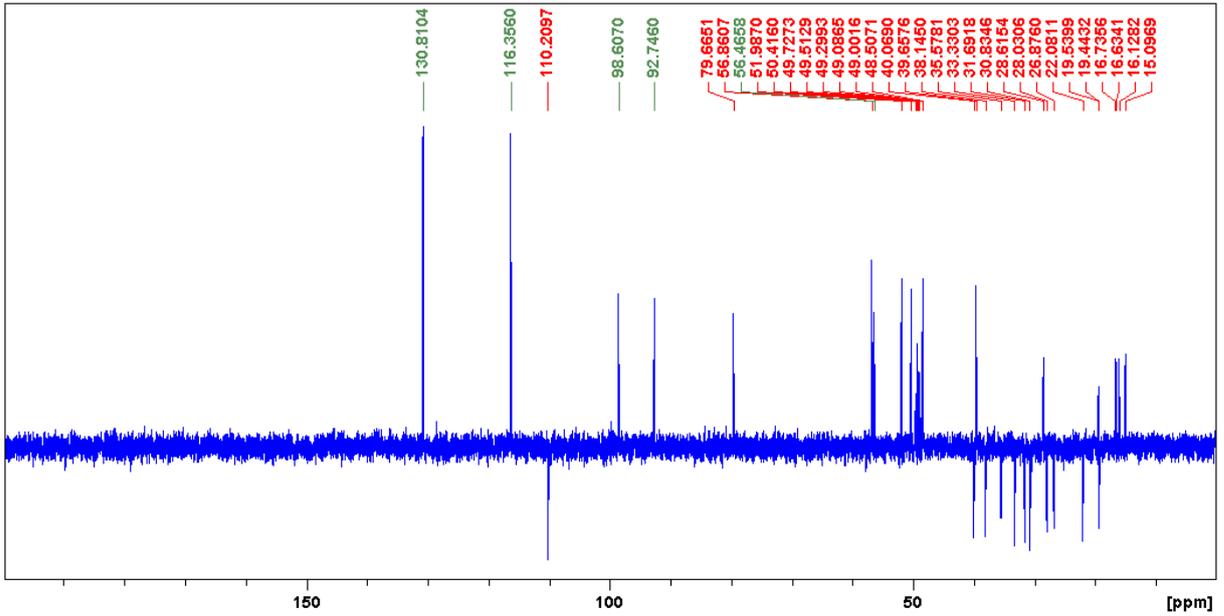
Figura 38 – Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) da mistura das substâncias codificadas TbCC-1 e TbCC-2 (a) e expansão da região de δ 50,0 a δ 190,00 (b).



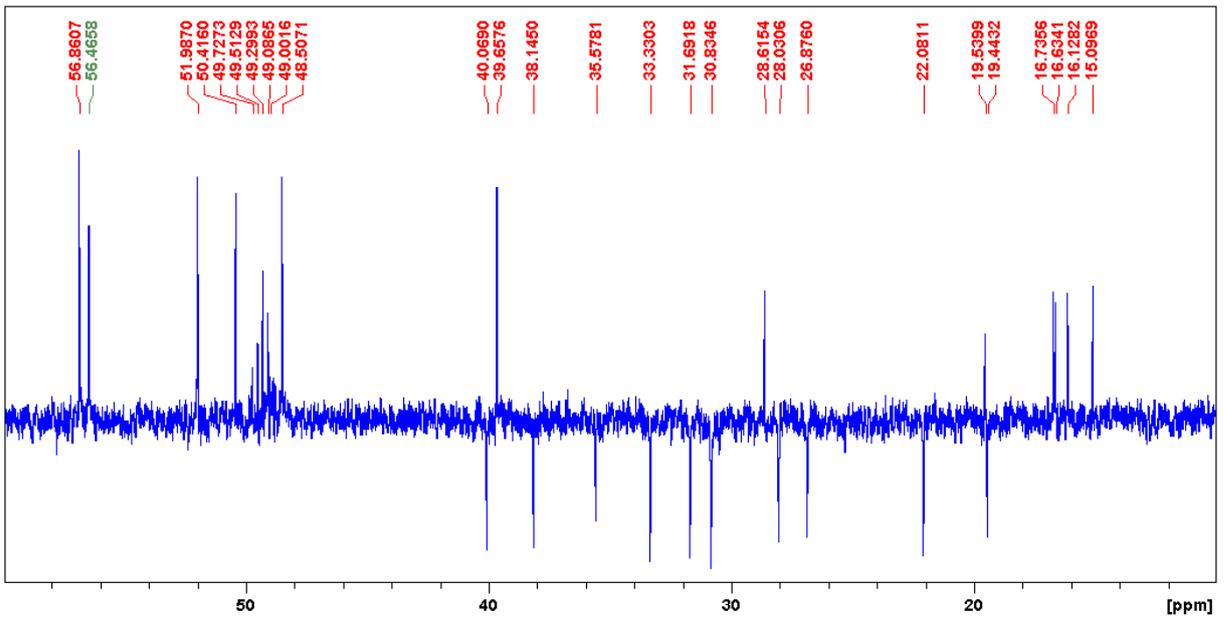
Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Figura 39 – Espectro DEPT 135 (100 MHz, CD₃OD) da mistura das substâncias codificadas de TbCC-1 e TbCC-2 (a) e expansão da região de δ 14,0 a δ 60,00 (b).

a

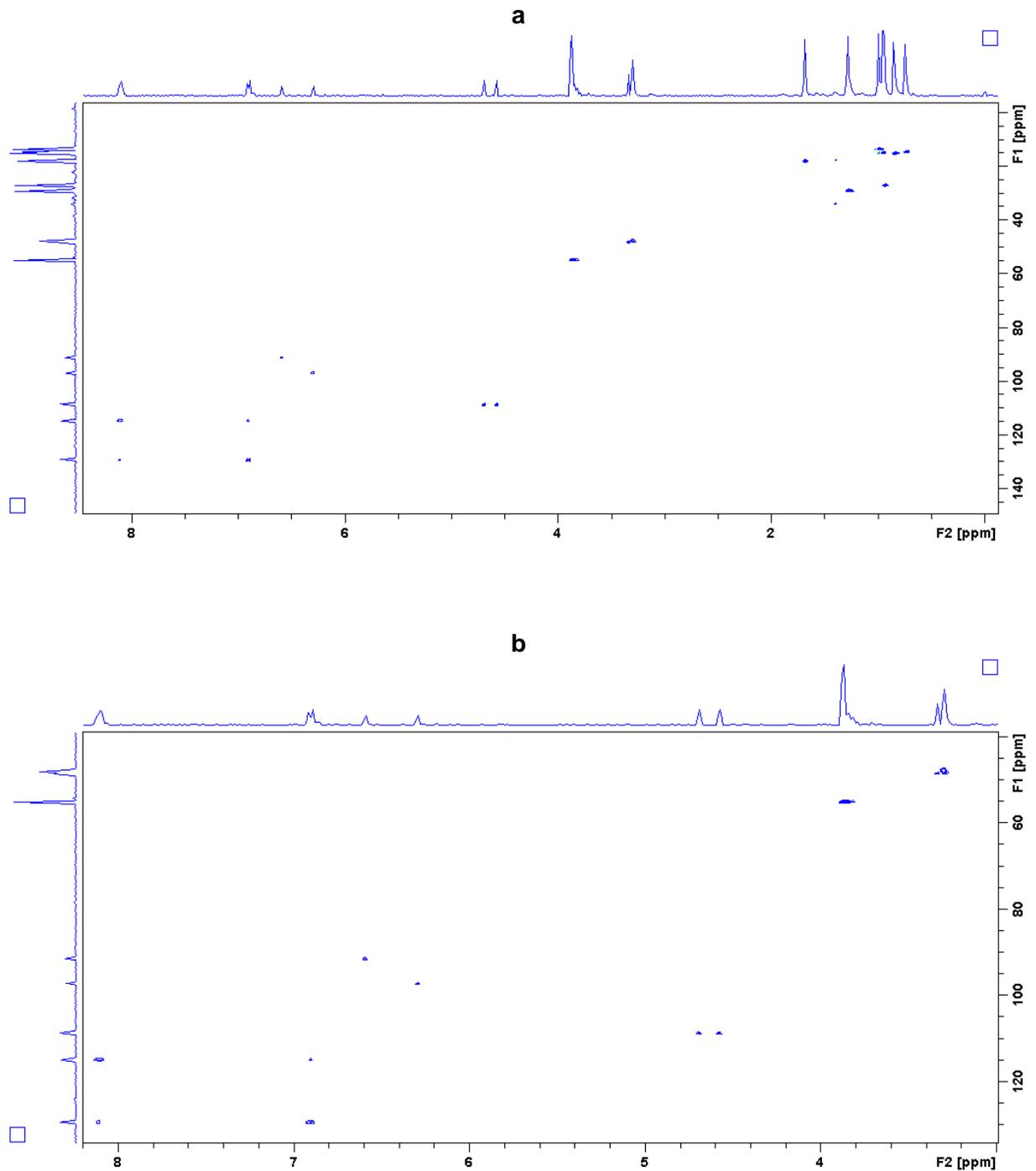


b



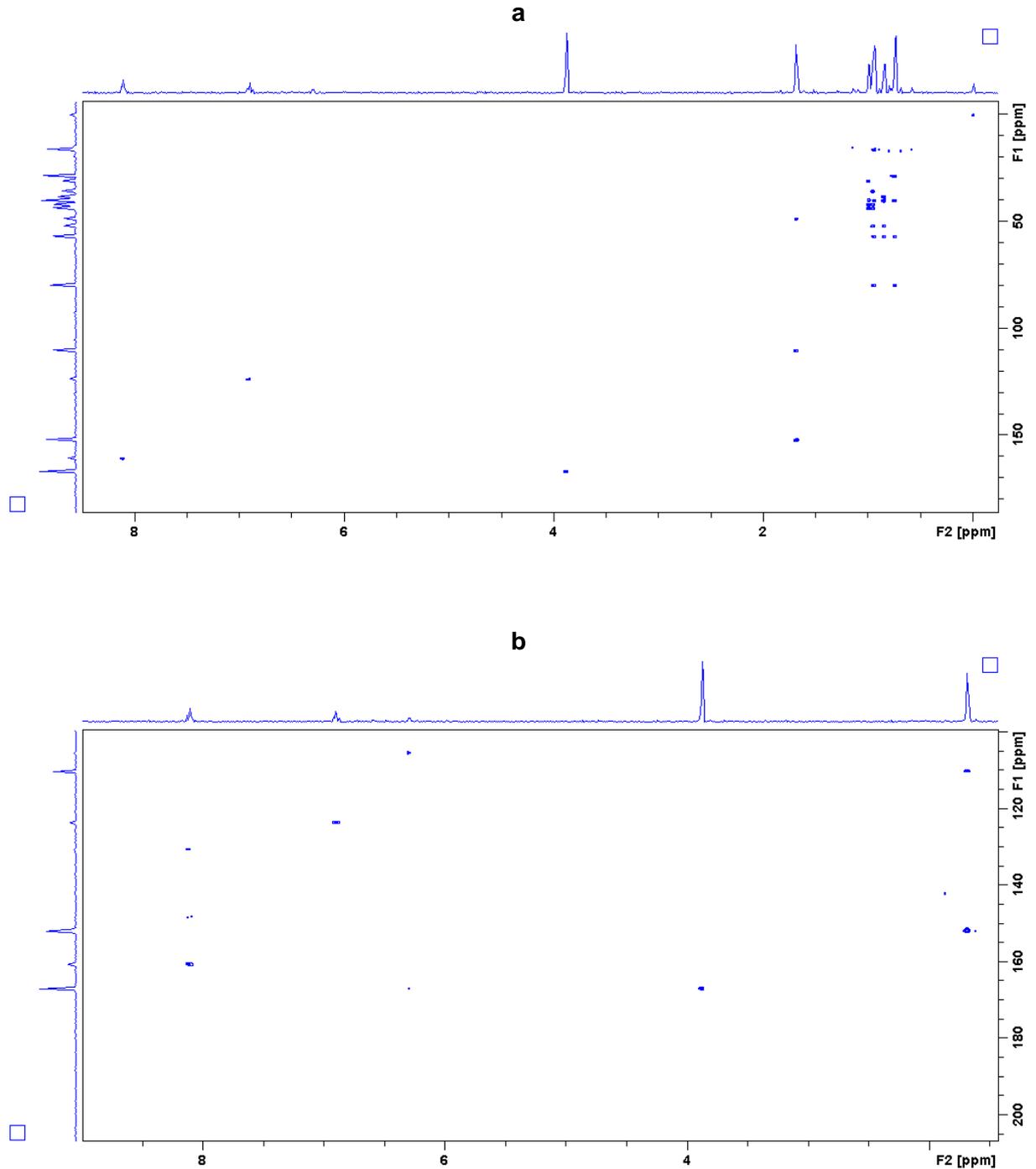
Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Figura 40 – Espectros HSQC (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, CD_3OD) da mistura das substâncias codificadas de TbCC-1 e TbCC-2 (a) e expansão da região δ 3,00 a δ 8,20 (b).



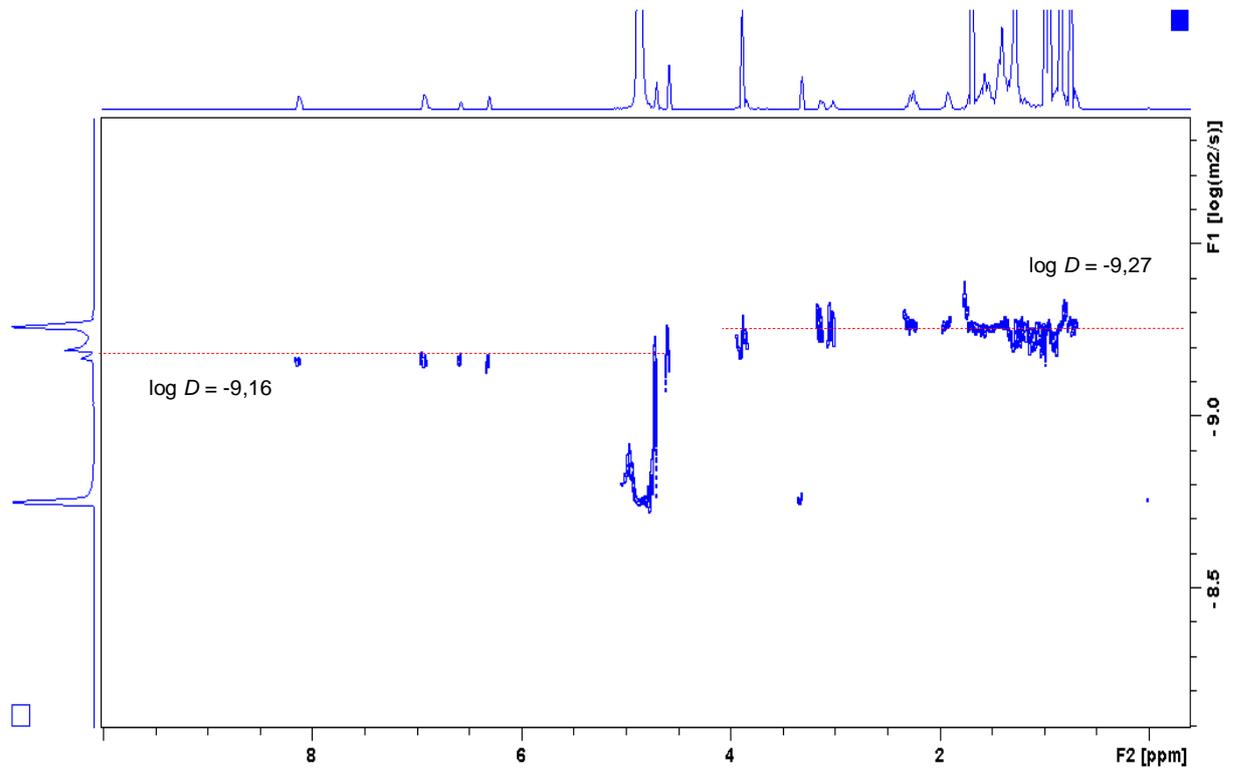
Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Figura 41 – Espectros HMBC (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, CD_3OD) da mistura das substâncias codificadas de TbCC-1 e TbCC-2 (a) e expansão da região δ 3,40 a δ 8,80 (b).



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Figura 42 – Espectro ^1H -DOSY (400 MHz, CD_3OD) da mistura das substâncias codificadas de TbCC-1 e TbCC-2.



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao se avaliar a atividade larvicida e antioxidante de extratos brutos e frações das folhas e caule da espécie *T. breyniana*, bem como ao se investigar sua constituição química, espera-se que esse estudo possa contribuir para a descoberta de novas substâncias eficazes para o controle larvicida do mosquito vetor do dengue, bem como descobrir novas substâncias inibidoras de radicais livres. Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, envolvendo a avaliação das atividades larvicida (larvas do 4º estágio do *Aedes aegypti*) e antioxidantes (DPPH), bem como a investigação fitoquímica com extratos da espécie *Tetracera breyniana* (Dilleniaceae), foi permitido relacionar as seguintes considerações:

- Nos ensaios frente larvas do 4º estágio do *A. aegypti*, dentre as amostras testadas, apenas a fração em hexano do caule apresentou resultado considerado bom agente larvicida ($CL_{50} < 100,0 \mu\text{g/mL}$), segundo comparação com dados descritos na literatura (OLIVEIRA *et. al.*, 2010; SANTOS *et. al.*, 2008);
- Nos ensaios frente ao radical DPPH, dentre as frações que forneceram resultados positivos nos ensaios qualitativos, oito delas foram consideradas promissoras nos ensaios quantitativos ($CI_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$) (PARK, *et al.*, 2010), sendo que resultados comparáveis aos padrões utilizados [BHT ($IC_{50} 97,86 \pm 2,52 \mu\text{g/mL}$) e ácido ascórbico ($CI_{50} 7,37 \pm 3,18 \mu\text{g/mL}$)] foram observados para as frações em AcOEt das folhas ($CI_{50} 74,15 \pm 14,73 \mu\text{g/mL}$) e caule ($CI_{50} 39,87 \pm 13,46 \mu\text{g/mL}$);
- O estudo fitoquímico efetuado com as frações das folhas e do caule conduziu ao isolamento de um fitoesteróide (*β -sitosterol*), um triterpeno pentacíclico (*Ácido betulínico*) e três flavonóides (*Quercetina*, *7-O-Metilquercetina* e *7-O-Metilcanferol*), descritos pela primeira vez na espécie em estudo.
- Os resultados obtidos neste trabalho com a espécie *T. breyniana* permitiram ampliar o conhecimento químico e o potencial biológico do gênero *Tetracera*, uma vez que existem poucos estudos sobre o mesmo.

- Da fração em AcOEt das folhas, com forte potencial antioxidante, foi isolada a substância codificada de **TbFAc-1**, identificada como sendo um flavonóide (*Quercetina*), possivelmente um dos componentes responsável pela atividade seqüestradora de radicais livres desta fração.
- Das frações em CHCl₃ das folhas e do caule apresentaram fraca capacidade de seqüestrar radicais livres. Este fato pode ser justificado pela presença de flavonóides contendo um número menor de grupos hidroxilas em suas estruturas, tais como **TbFC-1** (*7-O-Metilquercetina*) e **TbCC-2** (*7-O-Metilcanferol*), isolados, respectivamente nestas frações.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E. B.; OLIVO, M. A.; ARAÚJO, E. L.; ZICKEL, C. S. Caracterização da vegetação de restinga da RPPN de Maracaípe, PE, Brasil, com base na fisionomia, flora, nutrientes do solo e lençol freático. **Acta Bot. Bras.**, v. 23, n. 1, p. 40, 2009.
- ANDRADE, M. R. **Constituintes químicos das cascas, folhas e frutos de *Clusia nemorosa* Mey. (Guttiferae)**. Maceió-AL, 1997, 125p. Dissertação. Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia.
- BASTOS, D. Z. L.; PIMENTEL, I. C.; JESUS, D. A.; OLIVEIRA, B. H. Biotransformation of betulinic and betulonic acids by fungi. **Phytochemistry**, v. 68, p. 834–839, 2007.
- BANDYOPADHYAY, M.; CHAKRABORTY, R.; RAYCHAUDHURI, U. A process for preparing a natural antioxidant enriched dairy product (Sandesh). **LWT- Food Sci. Technol.**, v. 40, p. 842–851, 2007.
- BARREIRO, E. J. Produtos naturais bioativos: de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. **Quim. Nova**, v. 13, n. 1, p. 29-32, 1990.
- BARREIRO, E. J. Sobre a química dos remédios, dos fármacos e dos medicamentos. **Cad. Temáticos de Química Nova na Escola.**, v. 3, p. 4-6, 2001.
- BISO, F. I.; RODRIGUES, C. M.; RINALDO, R.; REIS, M. B.; BERNARDI, C. C.; MATOS, J. C. P.; ARAÚJO, A. C.; VILEGAS, W.; CÔLUS, I. M. S.; VARANDA, E. A. Assessment of DNA damage induced by extracts, fractions and isolated compounds of *Davilla nitida* and *Davilla elliptica* (Dilleniaceae). **Mutation Research**, v. 702, p. 92-99, 2010.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes Aegypti*: Insecticides, Mechanisms of Action and Resistance. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 16, n.4, p. 279-293, 2007.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT- Food Sci. Technol.**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BRUNIERA, S. P.; GROppo, M. Flora da serra do cipó, Minas gerais: Dilleniaceae. **Bol. Bot. Univ. São Paulo**, v. 28, n. 1, p. 59-67, 2010.
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciênc. Cult.**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.
- CARVALHO, J. E. Atividade Antiulcerogênica e Anticâncer de Produtos Naturais e de Síntese. **MultiCiência**, v. 7, p. 2., 2007.
- CLARO, L. B. L.; KAWA, H.; CAVALINI, L. T; ROSA, M. L. G. Community Participation in Dengue Control in Brazil. **Dengue Bulletin**, v.30, 2006.
- COSTA, L. C. B.; ROCHA, E. A.; SILVA, L. A. M.; JARDIM, J. G.; SILVA, D. C.; GAIÃO, L. O.; MOREIRA, R. C. T. Levantamento Preliminar das Espécies Vegetais

com Potencial Econômico no Parque Municipal da Boa Esperança, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 25, n. 2, p. 184-91, 2006.

COSTA, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Rev. Virtual Quim.** v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010. Disponível em <http://www.uff.br/rvq>. Acesso: 15 out. 2011.

DAVID, J. M.; SOUZA, J. C.; GUEDES, M. L. S.; DAVID, J. P. Estudo fitoquímico de *Davilla rugosa*: flavonóides e terpenóides. **Rev. Bras. farmacogn.**, v.16, n. 1, p.105-108, 2006.

DE OLIVEIRA, S. **Determinação da Capacidade Antirradicalar de Produtos Naturais Utilizando-se a Quimiluminescência do Luminol e Ensaios Fotométricos com Radicais Estáveis**. São Paulo, 2011, 94p. Dissertação. Universidade de São Paulo, Instituto de Química da USP.

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 42, n. 3, p. 378, 2006.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Bras.**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FINNEY, D. J. Probit analyses. Cambridge: **University Press**, 1972.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

FRAGA, C. N.; AYMARD, G. A. *Tetracera forzzae* (Dilleniaceae), uma Nova Espécie para a Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil. **Novon: A Journal for Botanical Nomenclature**, v. 17, n. 4, p. 433-436, 2007.

FRAGA, C. N.; STEHMANN, J. R.; Novidades taxonômicas para Dilleniaceae brasileiras. **Rodriguésia**. supl. 61, s. 06-06, 2010.

FRAGA, C. N. **Dilleniaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB007368>. Acesso: 02 ago. 2011.

FOGLIO, M.A.; QUEIROGA, C.L.; SOUZA, I.M.O. RODRIGUES, R.A.F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **MultiCiência**, v. 7, 2006.

GACHET, M. S.; LEARO, J. S.; KAISER, M.; BRUN, R.; NAVARRETE, H; RICARDO, A. M.; BAUER, R.; SCUHLY, W. Assessment of anti-protozoal activity of plants

traditionally used in Ecuador in the treatment of leishmaniasis. **J. Ethnopharmacol.**, v. 128, p.184–197, 2010.

GUARALDO, L.; CHAGAS, D. A.; KONNO, A. C.; KORN, G. P.; PFIFFER, T.; NASELLO, A. G. Hydroalcoholic extract and fractions of *Davilla rugosa* Poiret: effects on spontaneous motor activity and elevated plus-maze behavior. **J. Ethnopharmacol.**, v. 72, p. 61–67, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed.; Oxford University Press; **Oxford**, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E. Free Radicals, antioxidants, and Human Disease: Where are we now? **J. Lab. Clin. Med.**, v. 119, p. 598-620, 1992.

HARRISON, L. J.; SIA, G. L.; SIM, K. Y. 5,7-Dihydroxy-8-methoxyflavone from *Tetracera indica*. **Planta Médica**, v. 60, n. 5, p. 493-4, 1994.

HORN, J. W. Phylogenetic of Dilleniaceae using sequence data from four plastid loci (rbcL, infa, rps4, rpl16 INTRON). **Int. J. Plant. Sci.**, v. 170, n. 6, 2009.

HUBER, K.; LOAN, L. L.; CHANTHA, N.; FAILLOUX, A. B. Human transportation influences *Aedes aegypti* gene flow in Southeast Asia. **Acta Tropica**, v. 90, p. 23–29, 2004.

JACOMÉ, R. L. R. P.; OLIVEIRA, V. D. C.; OLIVEIRA, M. A. T.; Mariano, M. C. F.; OLIVEIRA, A. B. Estudo farmacognóstico comparativo das folhas de *Davilla elliptica* A. St.-Hil. e *D. rugosa* Poir., Dilleniaceae. **Rev. Bras. de farmacogn.**, v. 20, n. 3, p. 390-396, 2010.

JANSEN, C. C.; BEEBE, N. W. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. **Microbes and Infection**. v. 12, p. 272 e 279, 2010.

JÚNIOR, E. B. A.; ZICKEL, C. S. Fisionomia psamófila-reptante: riqueza e composição de espécies na praia da pipa, RN-Brasil. Instituto Anchieta de Pesquisas, **Botânica**, v. 60, p. 289-299, 2009.

KIM, J. Radical scavenging capacity and antioxidant activity of the e vitamers fraction in Rice bran. *Food Chem.* **Toxicology**, v. 70, p. 208-213, 2005.

KOO, H. M.; SUHAILA, M. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 3106-3112, 2001.

KUKONGVIRIYAPAN, V.; JANYACHAROEN, T.; KUKONGVIRIYAPAN, U.; LAUPATTARAKASAEM, P.; KANOKMEDHAKUL, S.; CHANTARANOTHAI, P. Hepatoprotective and Antioxidant Activities of *Tetracera loureiri*. **Phytotherapy research**, v. 17, p. 717–721, 2003.

LEE, M. S.; KIM, C. H.; HOANG, D. M.; KIM, B. O.; SOHN, C. B.; KIM, M. R.; AHN, J. S. Genistein-Derivatives from *Tetracera scandens* Stimulate Glucose-Uptake in L6 Myotubes. **Biol. Pharm. Bull.** v.32, n. 3, p. 504-508, 2009.

LIMA, C. A. H.; RODRIGUES, C. M.; KUSHIMA, H.; MORAES, T. M.; LOLIS, S. F.; FEITOSA, S. B.; MAGRI, L. P.; SOARES, F. R.; COLA, M. M.; ANDRADE, F. D. P.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. M. S. The anti-ulcerogenic effects of *Curatella americana* L. **J. Ethnopharmacol.**, v. 121, p. 425–432, 2009.

LOCK, O.; CASTILLO, P.; DOROTEO, V.; ROJAS, R. Antioxidant activity in vitro of selected Peruvian medicinal plants. ISHS. Acta Hort. 675: III WOCMAP Congress on Medicinal and Aromatic Plants. (1): **Bioprospecting and Ethnopharmacology**, 2005.

LUMJUANA, N.; RANSONA, H.; HEMINGWAYA, J.; PRAPANTHADARAB, L.; McCAROLLA, L. Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 35, p. 861-871, 2005.

MA, J.; STARCK, S. R.; HECHT, S. M. DNA Polymerase α Inhibitors from *Tetracera Boiviniana*. **J. Nat. Prod.**, v. 6, n. 12, p. 1660-1663, 1999.

MACARI, P. A. T.; EMERECIANO, V. P.; FERREIRA, Z. G. M. S. Identificação dos triterpenos de *Miconia albicans* Triana, através de análise por microcomputador. **Quim. Nova**, v. 13, p. 260-262, 1990.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ^{13}C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids – A compilation some salient features. **Phytochemistry**, v. 47, p. 1517-1575, 1994.

MARKAN, K. Flavones flavonols and their glycosides, methods in plant biochemistry. **J. harbone**. v. 1, p. 197-232, 1989

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Bol. SBCTA.**; v. 36, p. 1-11, 2002.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quim. Nova**, v. 24, n.1, p. 105-111, 2001.

MOREIRA, M. S. A.; PIUVEZAM, M. R.; ARAÚJO, C. C.; THOMAS, G. Studies on the anti-inflammatory and analgesic activity of *Curatella americana* L. **J. Ethnopharmacol.**, 67, 171-177, 1999.

MOURA, A. C. S.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* LINN. (FABACEAE) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar. **Quim. Nova**, v. XY, n.0, p. 1-5, 2011.

MURUGAN, K.; MURUGAN, P.; NOORTHEEN, A. Larvicidal and repellent potential of *Albizzia amara* Boivin and *Ocimum basilicum* Linn against dengue vector, *Aedes aegypti* (Insecta:Diptera:Culicidae). **Bioresour. Technol.**, v. 98, p.198–201, 2007.

NICOLLETTI, M. A.; CARVALHO, K. C.; OLIVEIRA, J. M. A.; BERTASSO, C. C.; CAPOROSSI, P. Y.; TAVARES, A. P. L. Uso popular de medicamentos Contendo drogas de origem vegetal e /ou plantas medicinais: principais interações decorrentes. **Rev. Saúde - UNG**, v. 4, n. 1, p.p. 25 e 35, 2010.

OLIVEIRA, P. V.; JÚNIOR, J. C. F.; MOURA, F. S.; LIMA, G. S.; OLIVEIRA, F. M.; OLIVEIRA, P. E. S.; CONSERVA, L. M.; GIULIETTI, A. M.; LEMOS, R. P. L. Larvicidal activity of 94 extracts from ten plant species of northeastern of Brazil against *aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Parasitol. Res.**, 2010.

OLUWOLE, F. S.; AYO, J. A., OMOLAS, B. O.; EMIKPE, B. O.; ADESANWO, J. K. Methanolic Extract Of *Tetracera potatoria*, An Antiulcer Agent Increases Gastric Mucus Secretion And Endogenous Antioxidants. **Nig. J. Physiol. Sci.**, v. 23, n. (1-2), p. 79-83, 2008.

OPAS - Organização Pan Americana de Saúde no Brasil, **Informe de dados da dengue no Brasil** - primeiro semestre, 2011.

OTERO, M.; SOLARI, H. G. Stochastic eco-epidemiological model of dengue disease transmission by *Aedes aegypti* mosquito. **Mathematical Bioscience.**, v. 223, p. 32–46, 2010.

PAPROCKI, J. A doença e os primeiros medicamentos e remédios. **O Risco (AMP)** - B.Horizonte, MG, v. 17, 2003.

PARK, J. H.; LI, C.; HU, W.; WANG, M. H. Antioxidant and free radical scavenging activity of different fractions from hawthorn fruit. **J. Food Sci. Nutr.**, v. 15, p.44-50, 2010.

PEREIRA, M. S.; ALVES, R. R. N. Composição Florística de um remanescente de Mata Atlântica na Área de Proteção Ambiental Barra do Rio Mamanguape, Paraíba, Brasil. **Revista de Biologia e Ciências da Terra-UFPB**. v. 7, p. 7, 2007.

PEREIRA, I. M.; KLEIN, V. L. G. Taxonomia e Ecologia da Família Dilleniaceae nos Estados de Goiás e Tocantins. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 5, n. 2, p. 975-977, 2007.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFÂNIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PITARO, S. P.; JORGE, N.; FIORANI, L. V. **Antioxidant effect of basil extract in oil under conditions of oxidation**. Campus São José do Rio Preto – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Engenharia de Alimentos, 2005.

PIZZOLATTI, M. G.; JÚNIOR, A. C.; SZPOGANICZ, B.; SOUZA, E. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae), **Quim. Nova**, v. 26, n. 4, p. 466-469, 2003.

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

RATNAM, D. V.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D. K.; KUMAR M. N. V. R. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **J. Control. Release**, v. 113, p. 189–207, 2006.

RAUHA, J. P.; REMES, S.; HEINONEM, M.; HOPIA, A.; KAHKONEM, M; KUJALA, T; PIHLAJA, K; VUORELA, H; VUORELA, P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **Int. J. Food Microbiol.** v. 56, p. 3-12, 2000.

RIBEIRO, K. A. L.; CARVALHO, C. M.; MOLINA, M. T.; LIMA, E. P.; MONTERO, E. L.; REYS, J. R. M.; PINTO, A. V.; SANTANA, A. E. G.; GOULART, M. O. F. Activities of naphthoquinones against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera:Culicidae), vector of dengue and *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**. v.111, p. 44–50, 2009.

ROCHA, L. G.; ALMEIDA, J.R.G.S.; MACÊDO, R. O.; BARBOSA-FILHO, J. M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v.12, p. 514–535, 2005.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas**, v. 27, n.1, p. 53-60, 2007.

SALES, L. O.; TOLEDO, P. M; TAVARES, M. Memória naturalis: cidadania, ciência e cultura. **Ciênc. Cult.**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRARI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **J. Sci. Food. Agr.**, v. 76, p. 270-276, 1998.

SANCHEZ, R. M.; HAYDEN, M.; JANES, C.; ANDERSON, G. A web-based multimedia spatial information system to document *Aedes aegypti* breeding sites and dengue fever risk along the US–Mexico border. **Health & Place**, v.12, p.715–727, 2006.

SANTOS, R. B.; COLE, E. R.; LACERDA, V. J.; REZENDE, H. R. Atividade larvicida, inseticida e repelente do óleo essencial dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi **31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2008.

SESAU - Secretaria de estado da saúde. Situação atual da dengue em Alagoas **Nota técnica semanal**, n. 41, 2011.

SESAU - Secretaria de estado da saúde. Situação atual da dengue em Alagoas **Nota técnica semanal**, n. 3, 2012.

SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. Estudo espectroscópico em elucidação estrutural de flavonóides de *Solanum jabrense* AGRA & NEE E S. paludosum MORIC. **Quim. Nova**, v. 32, n. 5, p. 1119-1128, 2009.

SIPRA, D.; DAN, S. S. Triterpenoids of Indian dilleniaceae. **J. Indian Chem. Soc.**, v. 57, n. 7, p. 760, 1980.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. nutr. Campinas**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOARES, M. L.; REZENDE, H. D.; FERREIRA, A. D. L.; BUSTAMANTE, K. G. L.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. Caracterização farmacognóstica de folhas de *Davilla elliptica* St.-Hil.(Dilleniaceae). **Braz. Jour. Pharmacogn.**, v. 15, n. 4, p. 352-360, 2005.

SOARES, M. L.; BUSTAMANTE, K. G. L.; FIGUEIREDO, A. D. L.; PIMENTA, F. C.; FIUZA, T. S.; BARA, M. T. F.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R. Análise da atividade antimicrobiana das folhas de *Davilla elliptica* St.-Hil. (Dilleniaceae). **Rev. de Ciênc. Farm. Básica Aplic.** v. 30, p. 183-186, 2009.

SOLER-RIVAS, C.; ESPÍN, J. C.; WICHERS, H. J. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. **Phytochem. Anal.**, v. 11, p. 1-9, 2000.

SOUZA, T. J. T.; APEL, M. A.; BORDIGNON, S.; MATZENBACHER, N. I.; ZUANAZZI, J. A. S.; HENRIQUES, A. T. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n. 3, p. 368-372, Jul./Set. 2007.

STRODE, C.; WONDJI, C. S.; DAVID, J. P.; HAWKES, N. J.; LUMJUAN, N.; NELSON, D. R.; DRANE, D. R.; PARAKRAMA, K.; HEMINGWAY, J.; BLACK, W. C.; RANSON, H. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 38, p.113–123, 2008.

SUBRAMANYAM, R.; GOUD, M.; SUDHAMALLA, B.; REDDEEM, E.; GOLLAPUDI, A.; NELLAEPALLI, S.; YADAVALLI, V.; CHINNABOINA, M.; AMOORU, D. G. Novel binding studies of human serum albumin with trans-feruloyl maslinic acid. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v. 95, p. 81–88, 2009.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. **Informe Epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 4, p. 5-33, 1999.

TONA, L.; CIMANGA, R. K.; MESIA, K.; MUSUAMBA, C. T.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; HERNANS, N.; VAN MIERT, S.; PIETERS, L.; TOTTÉ, J.; VLIETINCK, A. J. In vitro antiplasmodial activity of extracts and fractions from seven medicinal plants used in the Democratic Republic of Congo. **J. Ethnopharmacol.**, v. 93, p. 27–32, 2004.

UMAR, A.; AHMED, Q. U.; MUHAMMAD, B. Y.; DOGARAI, B. B.; SOAD, S. Z. B. M. Anti-hyperglycemic activity of the leaves of *Tetracera scandens* Linn.

Merr.(Dilleniaceae) in alloxan induced diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 131, p. 140–145, 2010.

VALKO, M.; LEIBFRTZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZURA, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VANCINI, R. L.; LIRA, S. A. B.; ABOULAFIA, J.; NOUAILHETAS, V. L. A. **Radical livre, estresse oxidativo e exercício**. Centro de estudos de fisiologia do exercício. Universidade Federal de São Paulo. p. 1-5, 2005.

WHO-World Health Organization - Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticide. **WHO/VBC**, v. 81, n. 807, p. 1-6, 1981.

WIKAN, N.; KUADKITKAN, A.; SMITH, D. R. The *Aedes aegypti* cell line CCL-125 is dengue virus permissive. **J. Virol. Meth.**, v. 157, p. 227-230, 2009.

ZHAO, G.; YAN, W.; CAO, D. Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using RP-HPLC. **J. Pharmaceut. Biomed. Anal.**, v. 43, p. 959-962, 200