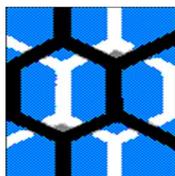


UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
Laboratório de Pesquisa em Química dos Produtos Naturais



Estudo Químico e Atividades Larvicida e Antioxidante de
Spermacoce verticillata G. Mey (Rubiaceae)

Jésu Costa Ferreira Júnior

Maceió/AL
2011

Jésu Costa Ferreira Júnior

***Estudo Químico e Atividades Larvicida e Antioxidante de
Spermacoce verticillata G. Mey (Rubiaceae)***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como exigência para obtenção do título de Mestre em Ciências/Química dos Produtos Naturais.

Maceió/AL
2011

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

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

F383e Ferreira Júnior, Jéssu Costa.
Estudo químico e atividades larvicida e antioxidante de *Spermacoce verticillata*
G. Mey (Rubiaceae) / Jéssu Costa Ferreira Júnior. – 2011.
129 f. : il. tabs., graf.

Orientadora: Lucia Maria Conserva.
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de
Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2011.

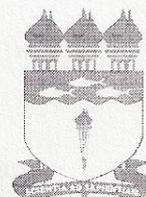
Bibliografia. f. 116-129

1. *Spermacoce verticillata* . 2. Larvicida. 3. Antioxidante . 4. Flavonoides .
5. Antraquinona. I. Título.

CDU: 547.99



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 **Jésu Costa Ferreira Júnior**, intitulada: "**Estudo Químico e Atividades Larvicida e Antioxidante de *Spermacoce verticillata* G. Mey (Rubiaceae)**", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 23 de fevereiro de 2011, às 8:30h, na Sala de aulas do PPGQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

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

Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior
ESENFAR/UFAL

Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto
ICBS/UFAL

*Dedico a realização deste trabalho inicialmente a **Deus**, pelo dom da vida, por sempre estar comigo e por guiar todos os meus caminhos;*

*Aos meus amados pais **Jésu Silva** e **M^a da Penha**, pelo amor e apoio que me dedicaram durante toda a vida, por terem lutado pela minha educação e por ser meu melhor exemplo de dignidade;*

*Aos meus **avos**, **tios** e **primos**, pelo amor, carinho e apoio essenciais na vida de um ser humano;*

*Ao meu avô **José Alves Costa** (in memoriam), por sempre acreditar em mim.*

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;

A ***Prof.^a Dr.^a Patrícia Emanuella Silva de Oliveira***, do Instituto Federal de Ciência e Tecnologia de Alagoas, pelo apoio e ensinamentos transmitidos nos ensaios larvicidas;

A ***Prof.^a Dr.^a Maria Lysete Bastos***, da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas, por todo o conhecimento transmitido, bem como pela colaboração dos ensaios de toxicidade;

Ao ***Prof. Dr. Edson de Souza Bento*** e o técnico ***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 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;

Aos colegas do LPqPN: ***Anderson Marques, Aslan Rossiel, Cinthia Lima, Fernando Maia, Sandovânio Ferreira, Patrícia Vasconcelos, Thaysa Alivia, Ewerton Henrique e Vívian Tenorio*** pela amizade, apoio e transmissão conhecimentos;

A minha namorada ***Larissa***, por todo apoio, carinho e compreensão;

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

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer!”

(Mahatma Gandhi)

Resumo

Este trabalho descreve o isolamento e a identificação estrutural de alguns constituintes químicos, bem como a avaliação do potencial larvicida (larvas do 4º estágio do *Aedes aegypti* L.), toxicidade frente à *Artemia salina*, conteúdo de fenóis totais (reagente de Folin-Ciocalteu) e atividade antioxidante (radical difenil-picrilhidrazil) de extratos e compostos isolados das partes aéreas, caule e raízes de *Spermacoce verticillata* G. Mey (Rubiaceae). Para tanto, os materiais vegetais obtidos após secagem a temperatura ambiente e trituração, foram extraídos através de maceração com EtOH 90% e/ou acetona. Após eliminação dos solventes sob vácuo, esses extratos foram suspensos em solução MeOH-H₂O e extraídos sucessivamente com solventes de diferentes polaridades (hexano, clorofórmio e acetato de etila). Os extratos brutos, bem como as frações oriundas de partição, foram avaliados frente às larvas do *Aedes aegypti* e quanto à capacidade sequestradora de radicais livres. As frações com os melhores resultados foram investigadas através de técnicas cromatográficas e conduziram ao isolamento de dois flavonoides (*Quercetina* e *3-O-α-L-Rhamnospiranosilquercetina*), uma antraquinona (*2-Hidroxi-3-metilantraquinona*), quatro triterpenos (*Ácidos Ursólico, Oleanólico e Morólico, e 3,15-Dioxofriedelano*), além de uma mistura composta por dois fitoesteroides (*Sitostenona e Stigmastenona*). Estes compostos foram identificados com base na análise dos dados de Ressonância Magnética Nuclear e pela comparação com dados da literatura. Dentre os compostos isolados, *3,15-Dioxofriedelano, 2-Hidroxi-3-metilantraquinona, e os ácidos Oleanólico e Morólico* estão sendo descritos pela primeira vez no gênero *Spermacoce*. Nos ensaios larvicidas, dentre os extratos testados, as frações em hexano do caule (CL₅₀ 115,87 ppm) e das raízes (CL₅₀ 83,79 ppm), hexano (CL₅₀ 209,01 ppm) e hexano-AcOEt 9:1 (CL₅₀ 91,82 ppm) das partes aéreas forneceram os melhores resultados. Os ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina*, apenas três frações apresentaram alta toxicidade, sendo que nenhuma foi ativa como larvicida. Por outro lado, nos ensaios antioxidante, quando comparados com os padrões utilizados, o extrato em EtOH das raízes e a fração em AcOEt das partes aéreas, bem como os compostos isolados *3-O-α-L-Rhamnospiranosil-quercetina* e *Quercetina* (IC₅₀ 169,05 ± 0,33; 80,74 ± 3,81; 22,89 ± 1,41; 94,32 ± 1,82 µg/mL, respectivamente) apresentaram os melhores resultados. Os resultados obtidos permitiram a ampliação do conhecimento quimiotaxonômico e das atividades biológicas, no qual alguns extratos e compostos isolados mostraram atividades larvicida e antioxidante. Entretanto, ensaios complementares e estudos posteriores ainda serão necessários.

Palavras-Chave: *Spermacoce verticillata*, larvicida, antioxidante, flavonoides, antraquinona.

Abstract

This work describes the isolation and structural identification of some chemical constituents, as well as assessing the potential larvicide (4th instar larvae of *Aedes aegypti* L.), toxicity on *Artemia salina*, total phenolic content (Folin-Ciocalteu) and antioxidant activity (Diphenyl-picrylhydrazyl radical) of the extracts and isolated compounds from the aerial parts, stem and roots of *Spermacoce verticillata* G. Mey (Rubiaceae). For this purpose, the materials obtained after drying at room temperature and powdered were extracted by maceration with EtOH 90% and/or acetone. After removal of solvents under vacuum, the crude extracts were suspended in MeOH-H₂O solution and extracted successively with solvents of different polarities (hexane, chloroform and ethyl acetate). The crude extracts and fractions from partition were tested 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 two flavonoids (*quercetin* and *3-O- α -L-rhamnopyranosylquercetin*), an anthraquinone (*2-hydroxy-3-methylanthraquinone*), four triterpenes (*ursolic*, *oleanolic* and *morolic acids*, and *3,15-dioxofriedelane*), and a mixture composed of two phytosteroids (*sitostenone* and *stigmastenone*). All isolated compounds had their structures identified on the basis of their NMR spectral data and by comparison with literature data. Among these compounds, *3,15-dioxofriedelane*, *2-hydroxy-3-methylanthraquinone*, and *oleanolic* and *morolic acids* are being described for the first time in the genus *Spermacoce*. For the tests larvicides, among the extracts tested, only the hexane fractions of the stem (LC₅₀ 115.87 ppm) and roots (LC₅₀ 83.79 ppm), hexane (LC₅₀ 209.01 ppm) and hexane-EtOAc 9:1 (LC₅₀ 91.82 ppm) of aerial parts yielded the best results. In tests of toxicity on *Artemia salina*, among the samples tested, only three showed high toxicity, but none was active as larvicide. On the other hand, antioxidant assays, when compared with the standards used, only the EtOH extract of the roots and the EtOAc fraction of the aerial parts, and compounds identified as *3-O- α -L-rhamnopyranosylquercetin* and *quercetin* (IC₅₀ 169,05 \pm 0,33; 80,74 \pm 3,81; 22,89 \pm 1,41; 94,32 \pm 1,82 μ g/mL, respectively) showed the best results. The results obtained permitted the expansion of knowledge chemotaxonomic and biological activities, in which some extracts, fractions and isolated compounds showed antioxidant and larvicidal activities. However, additional tests and further studies are still needed.

Key words: *Spermacoce verticillata*, larvicidal, antioxidant, flavonoids, anthraquinone

Lista de figuras

Figura 1.	Fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas.	15
Figura 2.	Casos de dengue por semana e regiões, Brasil, 2010.	19
Figura 3.	Distribuição espacial das epizootias de primatas e casos humanos, de acordo com o município de local provável de transmissão no Brasil.	21
Figura 4.	Estrutura dos alcaloides isolados das espécies do gênero <i>Borreria</i>	44
Figura 5.	Estrutura dos iridoides e flavonoides isolados das espécies de <i>Borreria</i> e <i>Spermacoce</i>	45
Figura 6.	Estrutura dos terpenoides isolados das espécies de <i>Borreria</i>	46
Figura 7.	Estrutura de outros compostos isolados de espécies de <i>Borreria</i> e <i>Spermacoce</i>	47
Figura 8.	Esquema geral do procedimento experimental efetuado com as partes aéreas de <i>S. verticillata</i> .	53
Figura 9.	Esquema geral do procedimento experimental efetuado com o caule (A) e raízes (B) de <i>S. verticillata</i> .	54
Figura 10.	Formas evolutivas do <i>A. aegypti</i> (A = Ovos, B = Larva, C = Pupa, D = Mosquito adulto e E = Gaiola com mosquitos)	56
Figura 11.	Ilustração dos bioensaios realizados.	57
Figura 12.	Ilustração dos Ensaios quantitativos. (A = Cubeta com DPPH, B = DPPH após reação com a amostra, C = Cubetas com DPPH e amostra em diferentes concentrações).	60
Figura 13.	Larvas de <i>A. salina</i> (10X) – (A): recipiente para eclosão de ovos, náuplios (B) e placas de Petri para cultivo dos metanáuplios (C).	62
Figura 14.	Gráficos ilustrando a concentração versus percentual de mortalidade dos extratos em hexano do caule (A), Hexano (hexano) (B) e Hexano-AcOEt 9:1 das partes aéreas (C) e hexano das raízes (D) de <i>S. verticillata</i> .	71
Figura 15.	Gráfico da cinética para os padrões (A) e substâncias isoladas (B).	72
Figura 16.	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD) da substância SvPC-4	82
Figura 17.	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃ / CD ₃ OD) da substância SvPC-3	83
Figura 18.	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da substância SvPC-1	84
Figura 19.	Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃ / CD ₃ OD) da substância SvPC-4	85
Figura 20.	Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃ / CD ₃ OD) da substância SvPC-3	86
Figura 21.	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135 (100 MHz, CDCl ₃ / CD ₃ OD) da substância SvPC-4	87
Figura 22.	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT (100 MHz, CDCl ₃ / CD ₃ OD) da substância SvPC-3	87
Figura 23.	Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃ / CD ₃ OD) da substância SvPC-1	88
Figura 24.	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135 (100 MHz, CDCl ₃ / CD ₃ OD) da substância SvPC-1	89
Figura 25.	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) da substância SvPA-3	93
Figura 26.	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) da substância SvPA-1	93
Figura 27.	Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) da substância SvPA-3	94
Figura 28.	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135(100 MHz, CD ₃ OD) da substância SvPA-3	94
Figura 29.	Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) da substância SvPA-1	95
Figura 30.	Espectro de HSQC (¹ H: 400; ¹³ C: 100 MHz, CD ₃ OD) da substância SvPA-1	95
Figura 31.	Espectro de HMBC (¹ H: 400; ¹³ C: 100 MHz, CD ₃ OD) da substância SvPA-1	96
Figura 32.	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da substância SvCH-1	99

Figura 33.	Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância SvCH-1	100
Figura 34.	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT (100 MHz, CDCl_3) da substância SvCH-1	101
Figura 35.	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância SvCC-2	104
Figura 36.	Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância SvCC-2	105
Figura 37.	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância SvCC-2	106
Figura 38.	Espectro de HSQC (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância SvCC-2	106
Figura 39.	Espectro de HMBC (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância SvCC-2	107
Figura 40.	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) das substâncias SvRH-1a e SvRH-1b	111
Figura 41.	Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) das substâncias SvRH-1a e SvRH-1b	111
Figura 42.	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (100 MHz, CDCl_3) das substâncias SvRH-1a e SvRH-1b .	112

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Substâncias isoladas das espécies do gênero <i>Borreria</i> e <i>Spermacoce</i>	38
Tabela 2.	Resultados dos ensaios de toxicidade (TAS) com os extratos e frações.	74
Tabela 3.	Dados de RMN (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, δ , Hz) da substância SvPC-4 e comparação com dados do <i>Ácido ursólico</i>	79
Tabela 4.	Dados de RMN (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, δ , Hz) da substância SvPC-3 e comparação com dados do <i>Ácido oleanólico</i>	80
Tabela 5.	Dados de RMN (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3 , δ , Hz) da substância SvPC-1 e comparação com dados do <i>Ácido morólico</i>	81
Tabela 6.	Dados de RMN (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, CD_3OD , δ , Hz) da substância SvPA-3 e comparação com dados da literatura.	91
Tabela 7.	Dados de RMN (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, CD_3OD , δ , Hz) da substância SvPA-1 e comparação com dados da <i>3-O-α-L-Rhamnopiranosilquercetina</i> (CD_3OD , Arot & Williams, 1997).	92
Tabela 8.	Dados de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ) da substância SvCH-1e dos Modelos <i>3,15-</i> , <i>3,7-</i> , <i>3,16-</i> e <i>3,22-Dioxo-friedelano</i> (Mahato & Kundu, 1994).	98
Tabela 9.	Dados de RMN (^1H 400; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, δ , Hz) da substância SvCC-2 e comparação com os da <i>2-Hidroxi-3-metilantraquionona</i> (CDCl_3 , Kitajima, 1998).	103
Tabela 10.	Dados de RMN (^1H : 400; ^{13}C 100 MHz, CDCl_3 , Hz) das substâncias SvRH-1 , SvRH-1b e comparação com dados da literatura da <i>Sitostenona</i> e da <i>Estigimastenona</i> (Della-Greca <i>et al.</i> , 1990).	110

Lista de Quadros

Quadro 1.	Extrato e frações submetidos à avaliação qualitativa frente ao DPPH	58
Quadro 2.	Fracionamento cromatográfico do extrato em AcOEt das partes aéreas.	64
Quadro 3.	Resultados preliminares obtidos nos ensaios larvicidas.	70

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

AcOEt	Acetato de Etila
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
AP-1	Activator protein 1
BHT	Ditercbutilidroxitolueno
CBM	Concentração bactericida mínima
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CFM	Concentração fungicida mínima
CG	Cromatografia gasosa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CI ₅₀	Concentração Inibitória capaz de inibir 50% de uma resposta
CI ₉₅	Intervalo de Confiança de 95%
CIM	Concentração inibitória mínima
CL ₅₀	Concentração Letal capaz de eliminar 50% da população
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DEPT	Distortioless Enhancement by Polarization Transfer
DH	Dengue Hemorrágico
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
DPPH	1,1- Difenil-2-picrilhidrazila
EBV	Epstein-Barr vírus
EBV-EA	Epstein-Barr vírus Early Antigen
EGV	Epdermal growth factor
EtOH	Etanol
FRAP	Ferric reducing / antioxidante power
GPx	Glutotiona peroxidase
GSH	Glutationa
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High Performacnce Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence

Hz	Hertz
IL-1 β	Interleucina-1 β
J	Constante de acoplamento
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
m	Multiplete
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
PGE2	Prostaglandina E2
PNH	Primatas não-humanos
PPAR-alfa	Peroxisome proliferator activated receptor
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
s	Simpleto
t	Triplete
TAS	Toxicidade <i>Artemia salina</i>
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substance assay
TNF	Fator de necrose tumoral
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization
δ	Deslocamento Químico

Sumário

1. Introdução	14
2. Revisão Bibliográfica: Considerações Sobre Dengue e Febre Amarela, Radicais Livres e Antioxidantes, Toxicidade Frente à <i>Artemia salina</i> Leach, Família e Gênero da Espécie Estudada	17
2.1. Dengue e Febre amarela	18
2.2. Radicais livres e antioxidantes	22
2.3. Toxicidade frente <i>Artemia salina</i> Leach	23
2.4. Família Rubiaceae	24
2.5. Os gêneros <i>Borreria</i> e <i>Spermacoce</i>	25
2.5.1. Uso Etnobotânico de Espécies <i>Borreria</i> e <i>Spermacoce</i>	26
2.5.2. Atividades Biológicas de Extratos de Espécies de <i>Borreria</i> e <i>Spermacoce</i>	29
2.5.3. Química e Atividades Biológicas dos Compostos Isolados	33
3. Objetivos	48
3.1. Objetivo geral	49
3.2. Objetivos específicos	49
4. Experimental	50
4.1. Solventes, Materiais e Equipamentos	51
4.2. Coleta e Identificação do Material Vegetal	52
4.3. Preparação dos Extratos	52
4.4. Prospecção fitoquímica para alcaloides com extratos e frações	52
4.4.1. Reagente de Bouchardat	53
4.4.2. Reagente de Dragendorff	53
4.4.3. Reagente de Mayer	55
4.5. Avaliação da Atividade Larvicida	55
4.5.1. Criação e Manutenção dos Mosquitos	55
4.5.2. Ensaio para Avaliação da Atividade Larvicida	56
4.6. Avaliação da Capacidade Sequestradora de Radicais Livres (DPPH)	57
4.6.1. Ensaio Qualitativo	57
4.6.2. Ensaio Quantitativo	58
4.7. Determinação do conteúdo de fenóis totais	60
4.8. Avaliação da toxicidade dos extratos com <i>Artemia salina</i> Leach (TAS)	61
4.9. Isolamento de Alguns dos Constituintes Químicos	63
4.9.1. Procedimento experimental efetuado com a fração em hexano das partes aéreas	63
4.9.2. Procedimento experimental efetuado com a fração em CHCl ₃ das partes aéreas	63
4.9.3. Procedimento experimental efetuado com a fração em AcOEt das partes aéreas	64
4.9.4. Procedimento experimental efetuado com a fração em MeOH-H ₂ O das partes aéreas	65

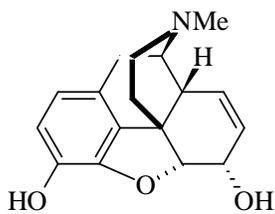
4.9.5. Procedimento experimental efetuado com a fração em hexano do caule	66
4.9.6. Procedimento experimental efetuado com a fração em CHCl ₃ do caule	66
4.9.7. Procedimento experimental efetuado com a fração em AcOEt do caule	66
4.9.8. Procedimento experimental efetuado com a fração em hexano das raízes	67
5. Resultados e Discussão	68
5.1. Resultados obtidos nos Ensaio Larvicidas	69
5.2. Resultados da Avaliação da Capacidade Sequestradora de Radicais Livres	71
5.2.1. Avaliação Qualitativa da Capacidade Sequestradora de Radicais Livres	71
5.2.2. Avaliação Quantitativa da Capacidade Sequestradora de Radicais Livres	72
5.3. Resultados Obtidos na determinação do teor de Fenóis Totais	73
5.4. Resultados dos Ensaio da Toxicidade Frente à <i>Artemia salina</i>	73
5.5. Resultados do Estudo Fitoquímico	75
5.5.1. Identificação Estrutural das Substâncias Codificadas de SvPC-1, SvPC-3 e SvPC-4	76
5.5.2. Identificação Estrutural das Substâncias Codificadas de SvPA-1 e SvPA-3	89
5.5.3. Identificação Estrutural da Substância Codificada de SvCH-1	97
5.5.4. Identificação Estrutural da Substância Codificada de SvCC-2	102
5.5.5. Identificação Estrutural das Substâncias Codificadas de SvRH-1a e SvRH-1b	108
6. Considerações Finais	113
7. Referências Bibliográficas	116

1. Introdução

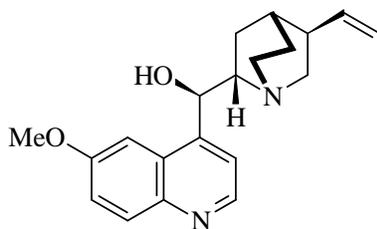
Os povos das civilizações antigas já usavam o conhecimento popular primitivo e não-científico, encontrando alívio para suas feridas com o uso de óleos e unguentos de plantas medicinais e de óleos naturais divulgados por “raizeiros” ou xamãs, o que é chamado hoje de fitoterapia (Nogueira *et al.*, 2009).

O uso de produtos de fonte natural como fármaco foi muito comum na antiguidade, período geralmente chamado de pré-científico, quando já se verificava a importância da utilização de substâncias de origem vegetal na forma de óleos, tais como os óleos de oliva, gergelim, rícino, entre outros. Um dos mais antigos tratados médicos conhecidos com cerca de 3500 anos é o papiro de Ebers, que prescreve o uso terapêutico de óleos como os de alho, girassol, açafrão e outros, e o uso de mel ou de cera de abelhas como veículo ou ligamento para os óleos usados visando-se a melhoria da absorção do medicamento (Nogueira *et al.*, 2009).

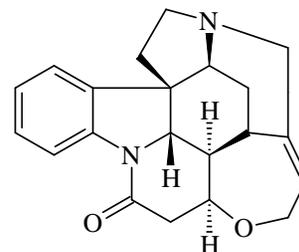
Durante o período anterior à era cristã, que ficou conhecido como civilização grega, vários filósofos podem ser destacados por suas obras sobre história natural. Dentre os quais, podemos citar Hipócrates, considerado o pai da medicina moderna, que se caracterizou por tomar a natureza como guia na escolha dos remédios (*Natura medicatrix*) e Teofrasto (372 aC), discípulo de Aristóteles, que escreveu vários livros sobre a história das plantas. É seu o registro da utilização da espécie botânica *Papaver somniferum*, planta cujo princípio ativo é a morfina, entretanto, seu isolamento aconteceu entre os séculos XVIII e XIX, juntamente com quinina e estriçnina (Pinto *et al.*, 2002).



Morfina



Quinina



Estriçnina

Muitas das propriedades terapêuticas das plantas são relatadas pela população, as quais são confirmadas em sua maioria nos estudos científicos, comprovando a importância da pesquisa etnofarmacológica. Tais propriedades propiciaram o desenvolvimento de vários

medicamentos, sejam estes obtidos por síntese a partir de molécula protótipo ou através de isolamento, algumas vezes, biomonitorado (Floriani *et al.*, 2006). Devido a todos estes aspectos, vê-se um interesse crescente na utilização e pesquisa de plantas medicinais, objetivando fins terapêuticos, aliadas à boa aceitabilidade destes produtos no mercado farmacêutico e as altas cifras que circundam a comercialização de fitomedicamentos observada na última década (Floriani *et al.*, 2006).

As plantas tem uma grande capacidade em sintetizar compostos orgânicos, enquanto que outros organismos como animais e microorganismos dependem destes, através da dieta, para obter estes compostos. A célula vegetal é capaz de produzir moléculas complexas, partido basicamente de moléculas simples como nitrogênio amínicos e dióxido de carbono através de rotas específicas, em que moléculas simples são transformadas em produtos primários e secundários variando com as necessidades do organismo (Dewick, 2002).

O metabolismo primário compreende o conjunto de processos metabólicos que desempenham uma síntese, degradação e interconversão de compostos comumente encontrados em todos os organismos (carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos). Já os metabólitos secundários são encontrados em organismos ou grupos de organismos específicos como uma expressão da individualidade das espécies (Dewick, 2002). Entretanto, alguns fatores (Figura 1. p. 15) podem influenciar na composição química dos vegetais (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

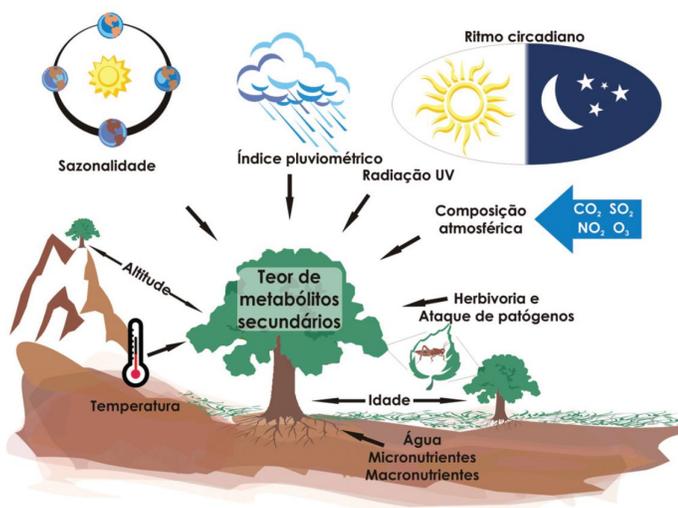


Figura 1. Fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

A origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, percussores da maioria dos metabólitos secundários (Alcaloides indólicos e quinolinicos, taninos hidrolisáveis, lignanas e cumarinas). O acetato origina alcaloides pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, e quinolizidínicos via ciclo do ácido cítrico e pela via mevalonato terpenoides e esteroides ou pela condensação do acetato dando origem a ácidos graxos. Alguns metabólitos secundários derivam não apenas de um desses intermediários, mas são resultado da combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato, como é o caso das antraquinonas, flavonoides e taninos condensados (Oliveira *et al.*, 2004).

O Brasil é o país com o maior potencial para pesquisas com espécies vegetais, pois detém a maior e mais rica biodiversidade do planeta, distribuída em seis biomas distintos. Devido a todos estes aspectos, vê-se um interesse crescente na utilização e pesquisa de plantas medicinais, objetivando fins terapêuticos, aliadas à boa aceitabilidade destes produtos no mercado farmacêutico e a comercialização de fitomedicamentos, observada na última década. (Pinto *et al.*, 2002; Floriani *et al.*, 2006).

Considerando que o interesse do presente trabalho incluíram o estudo químico de extratos vegetais monitorado pelas atividades larvicida, antioxidantes e de toxicidade frente à *Artemia salina* Leach, a seguir serão relatadas algumas considerações teóricas sobre esses temas, bem como sobre a família, o gênero e espécie selecionada para o estudo.

2. Revisão Bibliográfica: Considerações Sobre Dengue e Febre Amarela, Radicais Livres e Antioxidantes, Toxicidade Frente à Artemia salina Leach, Família e Gênero da Espécie Estudada

2. Revisão Bibliográfica: Considerações Sobre Dengue e Febre Amarela, Radicais Livres e Antioxidantes, Toxicidade Frente à *Artemia salina* Leach, Família e Gênero da Espécie Estudada

2.1. Dengue e Febre Amarela

As infecções com o vírus do dengue (família Flaviviridae, gênero Flavivirus), representam um significativo e crescente problema de saúde pública em muitos países tropicais e subtropicais (Wikan *et al.*, 2009). Esta doença pode se apresentar na forma simples (Dengue Clássico, DC), com quadro de mialgias intensas, cefaleia e febre que pode durar de três a sete dias ou na forma grave (Dengue Hemorrágica, DH), que geralmente advém após reinfecções com dengue, porém às vezes ocorre após infecções primárias, especialmente em lactantes. Esta poderá evoluir para Síndrome do Choque associada ao dengue (SDC) (Candeias *et al.*, 2002; Shinghi *et al.*, 2007). A cada ano são relatados cerca de 50 milhões de casos da dengue clássica, em regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo. Já as formas mais graves da doença (Dengue Hemorrágica e Síndrome do Choque associada ao dengue), incluindo mais de 500.000 casos relatados (Leparc-Gaffart *et al.*, 2009).

No Brasil a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) notificou cerca de, 942.153 casos suspeitos de dengue até a vigésima sexta semana de 2010. Desse total, 482.284 (51,2%) já foram confirmados, 153.098 (16,2%) foram descartados e 306.771 (32,6%) permanecem em investigação. A distribuição dos casos de dengue de acordo com as regiões do país levando em conta os casos confirmados e os ainda em investigação é a seguinte: Sudeste com 403.726 (51,2%), Centro-Oeste com 186.829 (23,7%), Norte com 67.366 casos (8,5%), Nordeste com 88.820 casos (11,3%) e Sul com 42.068 casos (5,3%) (Figura 2, p. 19). Os estados com maior incidência da doença durante o período foram o Acre (3.619,5 casos), Mato Grosso do Sul (2.521,1), Goiás (1.353,1), Rondônia (1.256,4), Roraima (1.146,9) e Mato Grosso (1.095,5) por cada 100 mil habitantes. Os Estados de São Paulo e Minas Gerais também se destacam pelo total de 187.460 e 182.789 casos, com incidência de 453 e 912,4 casos por 100 mil habitantes, respectivamente. Esses oito estados concentram 75% dos casos no Brasil. Foram notificados 9.688 casos graves de dengue, sendo 2.271 casos de FHD/SDC e 7.417 casos de dengue com complicações. Observa-se um aumento de 30,6% em relação ao mesmo período do ano anterior, quando foram confirmados 7.180 casos graves. Em relação aos óbitos, foram notificados 367 óbitos, o que representa um aumento de 67,6% em relação ao mesmo período de 2009 (219 óbitos) (SVS/MS, 2010).

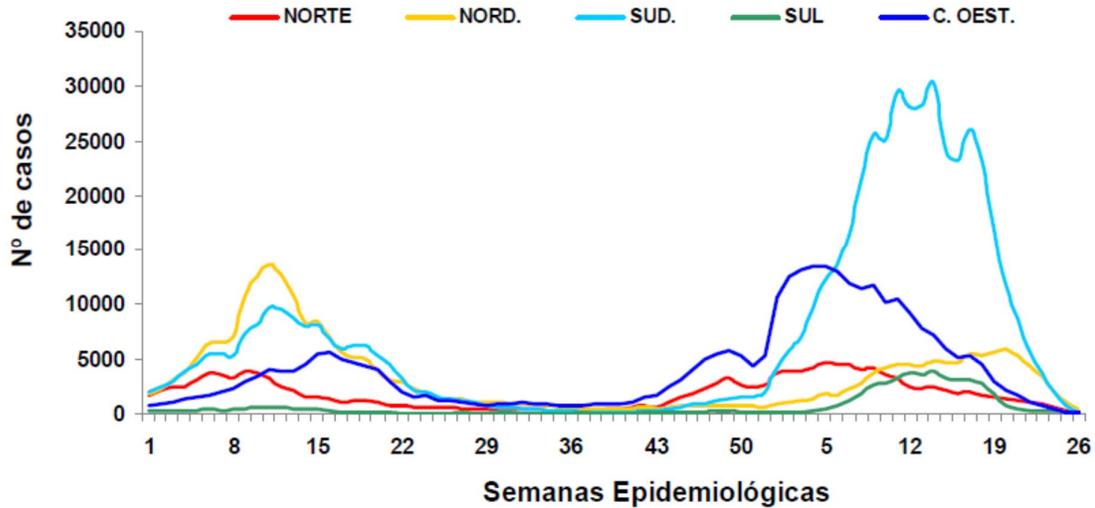


Figura 2. Casos de dengue por semana e regiões, Brasil, 2010. **Fonte:** SVS/MS, Informe Epidemiológico da Dengue Análise de Situação e Tendências – 2010.

O dengue é uma doença infecciosa, causada por um arbovírus que apresenta quatro sorotipos (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4), presentes em território brasileiro e tem como vetor fêmeas de mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* que também é suscetível e capaz de transmitir o vírus (Eiras *et al.*, 2003; Shinghi *et al.*, 2007). Em 1981 foi observado em Roraima, um surto da doença, pelos sorotipos DEN-1 e DEN-4. Apenas cinco anos depois (em 1986) ocorreu novo surto, com o sorotipo DEN-1, no estado do Rio de Janeiro e algumas capitais da região nordeste desde então a dengue passou a manifestar-se de forma epidêmica, em todo o país. Os primeiros casos registrados de dengue hemorrágico junto com o aumento dos números de casos em consequência da circulação do DEN-1 e da introdução do DEN-2 no Rio de Janeiro (Mendonça *et al.*, 2009).

Somente na segunda metade da década de 90 é que as regiões centro-oeste e norte do país registraram epidemias de dengue. A partir de 1999 a sazonalidade das infecções pelos vírus de dengue torna-se muito evidente na maioria dos estados. Este padrão sazonal, que nem sempre é observado em outros países, tem sido explicado pelo aumento na densidade das populações do *Aedes aegypti*, em virtude das condições de temperatura e umidade da estação, observadas em grandes extensões do território nacional (Mendonça *et al.*, 2009). Embora tenham se intensificado os programas de combate a dengue na última década, verificou-se também a expansão do *A. aegypti* na maioria dos estados brasileiros, além da variabilidade dos sorotipos

circulantes e das faixas etárias atingidas. Segundo a SVS, com a entrada do DEN-3 em 2000, detectado primeiramente no Rio de Janeiro, depois Roraima, alastrando para vários municípios brasileiros em função das condições propícias, a partir de 2002, constatou-se o aumento da letalidade e das hospitalizações no triênio subsequente (Mendonça *et al.*, 2009).

O mosquito *A. aegypti* é proveniente do Egito, de onde foi tirado o seu nome, se alimenta de seiva vegetal. Somente as fêmeas picam os seres humanos, porque precisam da ferroglobulina, presente no sangue, para que os ovos da espécie se desenvolvam. Seu tempo de vida atinge 30 dias. As fêmeas picam, do amanhecer até às 9 horas e depois das 16 horas até o escurecer. Geralmente, atuam dentro das casas, por preferirem habitar em ambientes fechados. Apresentam abdômen e patas rajadas com manchas brancas e corpo cinza escuro. Uma única fêmea pode picar várias pessoas e tem uma postura de 300 ovos. Destes, sobrevivem apenas 40%, que representarão 120, sendo 60 fêmeas e 60 machos, em cada postura. O seu ciclo de desenvolvimento (ovo-larvas-pupa-mosquito adulto) é de sete dias (Ester & Gomes, 2002). Ao nascer, o *A. aegypti* ainda não é um transmissor, entretanto, após picar uma pessoa infectada torna-se efetivamente um vetor. A infecção pode se efetuar mais de uma vez, em uma mesma pessoa, sempre através de diferentes picadas, tudo depende, no entanto, do nível de imunidade adquirida para o desenvolvimento de nova manifestação da doença (Ester & Gomes, 2002).

Em geral, as estratégias de combate à dengue estão baseadas no controle do vetor. O controle é tradicionalmente baseado no emprego de produtos químicos sintéticos e biológicos, integrados com programas de manejo ambiental. No Brasil, os programas que visam controlar esta espécie de mosquitos utilizam principalmente inseticidas químicos, onde se destacam os organofosforados e piretroides. Entretanto, o frequente emprego de inseticidas químicos no controle de vetores pode favorecer o desenvolvimento de resistência dos mesmos, contribuindo para o aumento das populações de mosquitos (Prophiro *et al.*, 2008)

Dentre os métodos alternativos ao uso de inseticidas químicos, incluem-se os extratos botânicos, que devido à evolução de plantas com insetos possibilitou que as plantas produzissem uma grande quantidade de substâncias com propriedades inseticidas (Gusmão *et al.*, 2002). O isolamento e identificação de compostos larvicidas obtidos de plantas podem ser somados aos métodos de controle de mosquitos (Mongelli *et al.*, 2002).

A febre amarela é uma doença infecciosa não contagiosa, transmitida ao homem mediante picada de insetos hematófagos após um período de incubação extrínseco, para que o vírus se reproduza em seus tecidos. A doença ocorre sob duas modalidades epidemiológicas: febre amarela silvestre (FAS) e febre amarela urbana (FAU). A diferença entre as mesmas está na natureza dos transmissores e dos hospedeiros vertebrados (Vasconcelos, 2002). Também é

causada por um arbovírus pertencente ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae* que possui dois ciclos básicos: um silvestre, onde os mosquitos responsáveis pela transmissão diferem na América [mosquitos dos gêneros *Haemagogus* (*H. janthinomys* e *H. albomaculatus*) e *Sabethes* (*S. chloropterus* e *S. soperi*)]. Na África, várias espécies de mosquitos do gênero *Aedes* (*A. africanus*, *A. furcifer* e *A. simpsoni*) têm sido associadas com a transmissão e um ciclo urbano, onde o *A. aegypti* é o responsável pela disseminação da doença nos dois continentes. Neste ciclo, a transmissão pelo *A. aegypti* é feita diretamente ao homem. Este, uma vez infectado, e se não for vacinado, pode desenvolver a doença e serve de fonte de infecção para novos mosquitos e assim o ciclo se perpetua (Vasconcelos, 2002).

No período de setembro de 2008 até setembro de 2009 (Figura 3, p. 21), foram notificados 274 casos humanos suspeitos de febre amarela silvestre, com 51 casos (18,6%) confirmados, destes, 21 evoluíram para o óbito e a taxa de letalidade foi de 41,2%. A média de idade foi de 31 anos, com intervalo entre 8 dias de vida para o caso mais jovem e de 73 anos para o caso com maior idade. O sexo masculino foi predominante com 37 casos (72%). Neste mesmo período foram notificadas 1.295 epizootias de primatas, envolvendo pelo menos 2.542 animais, distribuídos em 14 estados (SVS/MS, 2010).

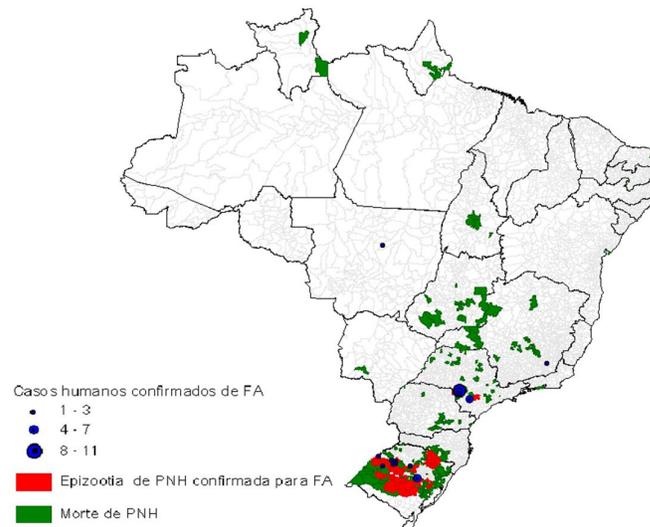


Figura 3. Distribuição espacial das epizootias de primatas e casos humanos, de acordo com o município de local provável de transmissão no Brasil. Outubro/2008 a setembro/2009. [Fonte: SVS/MS, Emergências em Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN) de Febre Amarela Silvestre em São Paulo e no Rio Grande do Sul e a Situação Epidemiológica Atual no Brasil (2008/2009)].

2.2. Radicais Livres e Antioxidantes

Os Radicais Livres, são átomos ou moléculas que, em virtude de seus elétrons desemparelhados, apresentam grande reatividade. Tais substâncias podem induzir danos oxidativos a biomoléculas, entre elas, proteínas e DNA, o que acelera o envelhecimento, favorece o aparecimento de câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Telesi & Machado, 2008). Essas moléculas instáveis também podem ser formadas pelos efeitos do sol, contaminação por tabaco e bebida alcoólica, podendo danificar as membranas das células, provocando efeitos negativos sobre a pele e acelerando o processo do envelhecimento, devido à morte ou ao mau funcionamento das mesmas (Póvoa, 1995; Póvoa Filho, 1995; Loray, 1999; Halliwell & Gutteridge, 2000).

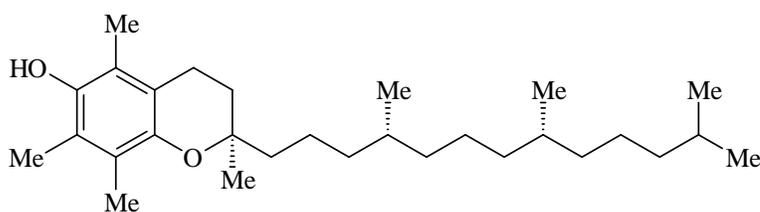
O metabolismo oxidativo é uma das vias principais dos radicais livres, devido a uma pequena porcentagem (2-5) de oxigênio que não recebe o número apropriado de elétrons na cadeia respiratória. A atual preocupação em relação os radicais livres é que, quando em excesso, podem levar o organismo a um estado de estresse oxidativo causando sérios danos aos tecidos (Telesi & Machado, 2008).

Os radicais livres desempenham papel importante no organismo, mas seus efeitos cumulativos estão implicados em doenças, entre outras, câncer, ateroscleroses, isquemia cerebral e envelhecimento. As espécies reativas de oxigênio, tais como radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e hidroperoxila (ROO^{\cdot}), causam danos ao DNA ou podem oxidar lipídios e proteínas. Eles atacam as cadeias de ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios e do colesterol, abstraindo um hidrogênio do grupo metileno, iniciando assim o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares (Antas *et al.*, 2006; Marcos *et al.*, 2007). A maioria age muito rapidamente, podendo ser produzidos com a mesma velocidade com que desaparecem, sendo que quando reagem podem transformar as moléculas em outros radicais livres, gerando em cadeia reações danosas (Youngson, 1995). Sua produção é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena (por exemplo, superóxido dismutase) ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes (Morais *et al.*, 2009).

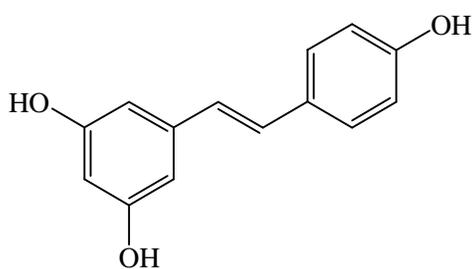
Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, podendo ser enzimáticos ou não, tais como o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos (Morais *et al.*, 2009).

Os compostos fenólicos das plantas se enquadram em diversas categorias, tais como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados dos ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas, e outros. Dentre os quais, os flavonoides são os mais estudados como antioxidantes e numerosos estudos *in vitro* indicam que estes polifenóis podem efetivamente participar de processos que possam ter implicações anticarcinogênicas e antiaterogênicas. O consumo de vinho tinto, por exemplo, que apresenta elevado conteúdo de flavonoides (resveratrol e quercetina), tem sido associado à proteção contra doenças relacionadas à idade (Cerqueira *et al.*, 2007; Sousa *et al.*, 2007).

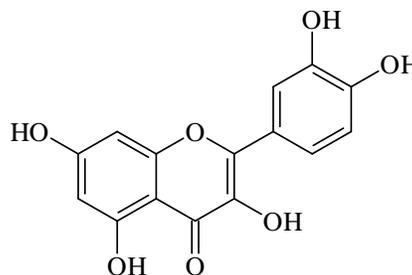
A atividade antioxidante (capacidade ou potencial antioxidante) é um parâmetro utilizado vastamente, em conjunto com outros, para caracterizar diferentes materiais biológicos por exemplo frutas, legumes, vinhos, chás e óleos. Esta atividade está relacionada com compostos capazes de proteger um sistema biológico contra os efeitos danosos de processos ou reações que causam oxidação excessiva, envolvendo espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (Arnão, 2000).



α -Tocoferol



Resveratrol



Quercetina

2.3. Toxicidade Frente à Artemia salina Leach

A avaliação da toxicidade é indispensável para considerar um tratamento seguro. O teste de letalidade com *A. salina* é um método simples na pesquisa de produtos naturais, que possui uma boa correlação com testes de toxicidade aguda oral *in vivo* (Silva *et al.*, 2010).

A. salina é um microcrustáceo de água salgada que é utilizado como alimento vivo para peixes, sendo seus ovos facilmente encontrados em lojas de aquaristas. A simplicidade do bioensaio favorece sua utilização rotineira, podendo ser desenvolvido no próprio laboratório de fitoquímica (Siqueira *et al.*, 1998). O ensaio com esse microcrustáceo está entre os bioensaios mais simples e rápidos para avaliar a toxicidade de produtos e extratos vegetais. É considerado um bioensaio preliminar em estudos de citotoxicidade e um teste indicativo para os mais específicos como o bioensaio com linhas de células de mamíferos (antitumoral). Os resultados obtidos por Harada (2010) confirmam o bioensaio com *A. salina* como um indicativo da atividade antitumoral, embora o autor não afirme que seja possível estabelecer uma correlação segura entre os ensaios quantitativos.

2.4. Família Rubiaceae

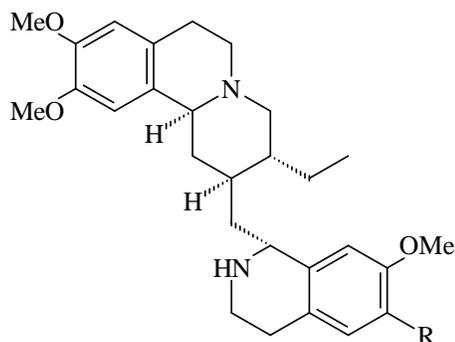
A família Rubiaceae representa a quarta maior família do grupo das Angiospermas, com cerca de 650 gêneros e 13.000 espécies, distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, com poucos representantes nas áreas temperadas e frias. De acordo com a classificação de Bremer (1996), está dividida em três subfamílias (Cinchonoideae, Ixoroideae e Rubioideae). No Brasil, ocorrem cerca de 130 gêneros e 1500 espécies correspondendo a uma das principais famílias da flora e ocorrendo como um importante elemento em quase todas as formações naturais (Hottz *et al.*, 2007).

Esta família está atualmente classificada em duas ou três subfamílias e mais de 40 tribos. A tribo Spermaceae, que pertence ao gênero *Borreria* GFW Mey. e *Spermace* L., é caracterizada por um habitat herbáceo, com mais de 1000 espécies que têm uma distribuição principalmente pantropical, mas alguns gêneros estendem-se para regiões de clima temperado, com exceção da Nova Zelândia (Chaw & Sivarajan, 1989; Kårehe *et al.*, 2008).

Diversos gêneros são endêmicos da região neotropical, que apresenta cerca de 4.555 espécies, sendo *Psychotria* L. o maior gênero da família, representado mundialmente por cerca de 1.650 espécies. No Brasil, essa família é representada por 18 tribos, 130 gêneros e 1.500 espécies, distribuídas em diferentes formações vegetais, com grande ocorrência na Mata Atlântica (Souza & Lorenzi, 2005; Pereira *et al.*, 2006; Margalho *et al.*, 2009).

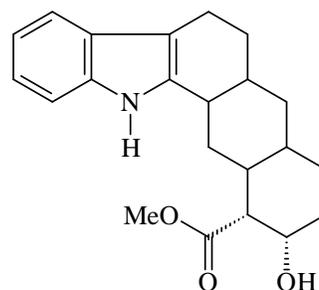
No que se refere às propriedades etnofarmacológicas, várias espécies são úteis e muitas produzem substâncias empregadas como fármacos. Dentre as quais estão *Cephaelis ipecacuanha*, planta originária do Brasil produtora dos alcaloides emetina e cefalina, ambos ativos como amebicida, expectorante e emético; *Pausiystalia yohimbe* cujas cascas do tronco

são usadas como afrodisíaco, tendo como princípios ativos alcaloides do tipo ioimbina, utilizado na impotência sexual e na hipotensão ortostática; *Cinchona officinalis* que fornece o alcaloide quinina, usado como febrífugo e também no tratamento da malária (Agarez, 1994; Suzele *et al.*, 2004).



Emetina R = OH

Cefalina R = OMe



Ioimbina

Do ponto de vista químico, a família Rubiaceae foi bastante investigada. Dentre os compostos isolados estão alcaloides, antraquinonas, cumarinas, lignanas, iridoides e secoiridoides livres ou glicosilados e triterpenos. Dentre essas classes de compostos, os alcalóides, os iridoides e os triterpenos são predominantes e têm despertado considerável interesse devido ao amplo aspecto de atividades biológicas que apresentam (Carbonezi *et al.*, 1999; Phuong *et al.*, 1999; Kohler *et al.*, 2001; Ling *et al.*, 2002).

2.5. Os Gêneros *Borreria* e *Spermacoce*

Os gêneros *Borreria* e *Spermacoce* são considerados por muitos autores gêneros distintos baseados na morfologia de seus frutos. No entanto, preferem combinar os dois sob o nome genérico *Spermacoce* (Chaw & Sivarajan, 1989; Dessein *et al.*, 2002a). A junção *Spermacoce-Borreria* é grande e complexa, localizada na subfamília Rubioideae, tribo Spermacoceae, com uma distribuição pantropical. Sua maior diversidade é encontrada na América tropical, com um número estimado de 125 espécies, já a África tropical e Austrália têm um menor número de espécies (cerca de 70), e na Ásia com aproximadamente 18 espécies. Para as espécies paleotropical, *Borreria* é relegado à sinonímia de *Spermacoce* (Dessein *et al.*, 2003). O gênero *Borreria* é caracterizado por uma cápsula tendo uma abertura septícida e ambas as válvulas de frutos deiscentes, entretanto, *Spermacoce* tem seus frutos divididos em duas válvulas, um deiscente e outros indeiscentes. As espécies *Spermacoce* são plantas herbáceas ou arbustos de

pequeno porte, com folhas sésseis entrecruzadas e interpeciolares, estípulas fímbrias que normalmente crescem em florestas e pradarias (Dessein *et al.*, 2002b; 2006). Apesar da discussão ainda é incerto, neste trabalho consideramos *Borreria* e *Spermacoce* como sinônimos.

O maior gênero da tribo Spermacoaceae é o *Borreria*, compreende cerca de 280 espécies distribuídas na América tropical e subtropical, África, Ásia e Europa (Dessein *et al.*, 2006). No Brasil, 36 espécies foram registradas, dos quais 22 são endêmicas (Chiquieri *et al.*, 2004; Barbosa *et al.*, 2006). Por outro lado, o gênero *Spermacoce* compreende cerca de 275 espécies encontradas na América tropical e subtropical da África, Australásia e Austrália (Dessein *et al.*, 2006).

2.5.1. Uso Etnobotânico de Espécies *Borreria* e *Spermacoce*

O uso de plantas medicinais como remédio é uma parte da herança tradicional em muitos países. O conhecimento indígena sobre a utilização de recursos vegetais para a cura de várias doenças, ainda é mantida em todo o mundo especialmente na Ásia, África e Américas. Países latino-americanos são ricos em plantas medicinais e apresentam uma grande biodiversidade vegetal. No entanto, a destruição acelerada dos ecossistemas, também contribuir para uma perda gradual de conhecimento sobre as plantas nativas utilizadas na medicina tradicional (Brandão *et al.*, 2009). Espécies de *Borreria* e *Spermacoce* são utilizadas medicinalmente de várias maneiras e são utilizadas na medicina popular da América Latina, Ásia, África e Antilhas. As espécies mais utilizadas são descritas a seguir:

***B. alata* (Aubl.) DC.** [Sin.: *S. alata* Aubl., *S. latifolia* Aubl. e *B. latifolia* (Aubl.) K. Schum.]

É uma espécie herbácea, com flores tubulares dispostas em inflorescências glomerulose, distribuída na Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Peru e Venezuela (Machado & Loiola, 2000; Funk *et al.*, 2007). No Nepal, o suco de raízes desta planta é usado para tratar a malária (Manadhar, 1995). A biologia floral desta espécie, junto a espécie *Cordia multispicata*, num fragmento de Mata Atlântica em Pernambuco no nordeste brasileiro, foram estudadas em relação aos nove espécies de moscas, principalmente do gênero *Palpada* (Syrphidae), e ambas as espécies apresentam morfologia floral, "habitat" e período de floração semelhantes, além de estabelecerem populações próximas umas das outras (Machado & Loiola, 2000).

B. articularis (L. f.) F. N. Williams [Sin.: *S. articularis* L.f., *S. scabra* Willd. e *B. hispida* (L.) K. Schum.)]

Comumente conhecida como "poaia", *B. articularis* é uma erva anual e procumbente com folhas opostas, flores pequenas e frutos deiscentes (Sultana *et al.*, 2008). É nativa das regiões temperadas e tropicais da Ásia e naturalizada na África e na Austrália (Vadivelan *et al.*, 2007). As folhas desta planta são utilizadas na oftalmia, inflamação dos olhos e gengivas, cegueira, febre, dor, conjuntivite, hemorragia, cálculos biliares, disenteria e diarreia (Vadivelan *et al.*, 2007; Sultana *et al.*, 2008) e o decocto das folhas, raízes e sementes, preparado em conjunto, é utilizado na Índia para hidropisia (Jain & Verma, 1981).

B. centranthoides Cham. & Schldl. (Sin.: *B. centranthoides* f. *glabrior* Chodat & Hassl.)

Conhecida como "sabugueirinho do campo", é uma erva originária dos campos do sul do Brasil e possivelmente no Uruguai e Argentina. Em algumas partes do Brasil, os extratos da planta têm sido utilizados para o tratamento de doenças do fígado (Lucas & Machado, 1944; Brandão *et al.*, 2009) e distúrbios renais (Steeffeld, 1968) e na Argentina como um abortivo (Bandoni *et al.*, 1976).

B. eupatoioides Cham. & Schldl. (Sin.: *B. polyana* DC.)

O decocto das folhas dessa planta é usada na Argentina associada com *Petroselinum crispum* (Mill.) Nyman ex AW Hill. ou *Gymnopteris tomentosa* (Lam.) como emenagogo e as raízes como um contraceptivo (Martinez-Crovetto, 1981), contra a diarreia e para tratar infecções urinárias e respiratórias (Perez & Anesini, 1994).

B. hispida (Linn.) K. Schum. (Sin.: *S. hispida* L.)

Esta planta é usada há vários anos como alternativa terapêutica para o diabetes (Vasanthi *et al.*, 2009). O decocto da planta é usada na Índia para dor de cabeça (Khan *et al.*, 1984) e as sementes como um estimulante (Purushothaman & Kalyani, 1979). O extrato das sementes tem sido usado para o tratamento do sistema nervo e rins (Kaviasaran *et al.*, 2008).

B. laevis (Lam.) Griseb. (Sin.: *S. laevis* Roxb. e *S. assurgens* Ruiz & Pavon)

B. laevis é uma pequena erva encontrada nas regiões tropicais da Ásia (Noiarsa *et al.*, 2007). O decocto das folhas é usado no México para tratar dor nos rins e prevenir menstruação

(Zamora-Martinez & Pola, 1992). A planta inteira é usada no oeste da Índia (Ayensu, 1978) e Jamaica (Asprey & Thornton, 1955) para a amenorréia em mistura com *Cuscuta* L. e *Pendula zebrina* Schum. Na Jamaica, o decocto da planta inteira (cozido com *Desmodium* Desv. e *Iresine paniculata* Kuntze) é usado como um diurético "para expulsar todo o veneno dos rins" (Asprey & Thornton, 1955).

B. latifolia (Aubl.) K. Schum. (Sin.: *S. latifolia* Aubl.)

Esta planta é uma erva anual ereta, 30-50 cm, que ocorre no México, Antilhas e América do Sul. No Brasil, é conhecido como "poaia-do-campo" e é distribuído desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul (Pereira *et al.*, 2006; 2007). Na Indonésia, as partes aéreas são utilizadas como alimento (Kamiya *et al.*, 2002).

B. ocymoides (Burm. f.) DC. (Sin.: *S. ocymoides* Burm. f.)

Esta espécie é comum em toda a América, ocorre também na África Oriental, nas ilhas Maurícias e nas Índias Orientais (Chiquieri *et al.*, 2004). Na Nigéria, o suco das folhas é aplicado em eczema e a seiva é espremida sobre o ferimento ou lesão (Ebana *et al.*, 1991).

B. princeae K. Schum. [Sin.: *S. princeae* (K. Schum.) Verdc.]

Conhecida como cifragem ou erva perene decumbentes, nativa da África, onde é usada para o tratamento de doenças de pele (Benjamin, 1979).

B. pusilla (Wall.) DC. [Sin.: *B. stricta* (Linn.f.) K.Schum. e *S. pusilla* Wall.]

Esta espécie, nativa da África tropical, Ásia tropical, Paquistão, Japão e as Filipinas, é uma planta anual, cresce até 60 cm de altura. Na Índia, os botões frescos associados com as flores são utilizadas para cortes e feridas (Shah & Gopal, 1985) e as folhas esmagadas são aplicadas às áreas afetadas para fratura óssea, sarna, picada de cobra e escorpião (Rahman *et al.*, 2007).

B. verticillata (L.) G. F. W. Mey. (Sin.: *S. verticillata* L.)

No Brasil esta planta é conhecida como "poaia, poaia-preta, poaia miúda, coroa-de-frade, e vassourinha". É uma erva ereta, perene e pequena, originária da América do Sul e Central e

distribuída por todo o Mundo (Burger & Taylor, 1993; Chiquieri *et al.*, 2004). Na Flórida, o néctar desta planta é uma importante fonte de alimento para o grilo mole ectoparasitos, *Larra bicolor* F. e *L. analis* F. (Hymenoptera: Sphecidae) (Röhrig *et al.*, 2008). No Brasil, ocorre em o todo o território (Pereira *et al.*, 2006) e a infusão das flores é usada como um antitérmico e analgésico (Vieira *et al.*, 1999; Moreira *et al.*, 2010), as raízes como emético e folhas como antidiarreicos, erisipelas e hemorroidas (Lorenzi & Matos, 2002). No Oeste da Índia, quando preparado com *Cuscuta* e *Zebrina* Schnizlein., o decocto da planta é usado para diabetes, dismenorreia e amenorreia (Ayensu, 1978) e no Senegal para tratar infecções bacterianas da pele e hanseníase (Maynart *et al.*, 1980). Na Nigéria, o suco fresco das partes aéreas é aplicado para eczema (Benjamin, 1979), enquanto na Jamaica, a decocção do endocarpo, preparado juntamente com *Iresine* P. Browne e *Desmodium*, é usada como diurético e como remédio para amenorreia misturado com *Cuscuta* e *Zebrina* (Asprey & Thornton, 1955).

Spermacoce exilis (L.O. Williams) C.D. Adams [Sin.: *B. exilis* L.O. Williams, *B. gracilis* L.O. Williams, *B. repens* DC., *S. repens* (DC.) Fosberg & J.M. Powell, e *S. mauritiana* Gideon]

Esta espécie é uma erva, decumbente ou procumbente anual, geralmente bem ramificada, com 3-40 cm. É distribuída na África e na América e é usada para dores de cabeça (Saha *et al.*, 2004).

2.5.2. Atividades Biológicas de Extratos de Espécies de Borreria e Spermacoce

Espécies de *Borreria* e *Spermacoce* possuem uma grande variedade de propriedades biológicas. Até o momento, poucas espécies têm sido selecionadas para confirmação dessas atividades. Os resultados experimentais têm mostrado que algumas espécies possuem atividades antimicrobiana, antioxidante, antitumoral, antiinflamatória, hepatoprotetora, etc, as mais importantes são citadas abaixo:

Atividade antimicrobiana

Os extratos em éter de petróleo, clorofórmio, acetato de etila e etanol das partes aéreas de *B. articulares* foram avaliados contra onze bactérias patogênicas humanas (*Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Shigella dysenteriae*, *S. sonnei*, *Salmonella typhi*, *S. paratyphi*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, e *V. cholerae*) e quatro fungos patogênicos humanos (*Aspergillus niger*, *A. ustus*, *A. ochraceus* e *C. albicans*). Os extratos em acetato de etila e em etanol

exibiram atividade antibacteriana e antifúngica contra todos os patógenos testados. A uma concentração de 2,0 mg/disco, o extrato bruto em etanol exibiu a maior zona de inibição contra *E. coli* (20 mm) e inibiu 53,5% do crescimento micelial radial fúngico (com 100 mg/mL de meio) contra *A. ustus* (Sultana *et al.*, 2008).

O extrato aquoso das raízes de *B. eupatorioides*, uma planta usada na Argentina contra a diarreia e para tratar infecções urinárias e respiratórias, inibiu *S. typhi* (IC₅₀ 10,1 µg/mL) e *E. coli* (62,5 mg/mL) (Pérez & Anesini, 1994a), enquanto que os extratos aquoso e alcaloídicos das folhas de *B. ocyroides* foram ativos contra *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus β-hemolíticos*, *E. coli* e *Neisseria gonorrhoeae*. Por outro lado, extrato em etanol e a fração de glicosídeos cardíacos foram eficientes contra *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Streptococcus β-hemolítico* e *E. coli* (Ebana *et al.*, 1991). Além destes, extratos de *B. verticillata* mostraram atividade antibiótica variável contra *S. aureus*, *E. coli* e *Monilia albicans* (Sousa *et al.*, 1969).

Em outro estudo, o extrato em metanol das raízes desta planta exibiu uma ampla atividade antibacteriana contra cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* (Peixoto Neto *et al.*, 2002). Por outro lado, pelo método de difusão em ágar, os extratos metanólicos de folhas e raízes foram inativos contra *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *S. sonnei*, *K. pneumoniae*, *E. coli* e *B. cereus* (valores de MICs > 2500 mg/mL) (Bouzada *et al.*, 2009). Através do método de difusão em disco, o extrato em etanol da planta inteira de *S. hispida*, espécie cujas sementes são usadas na região na Índia para reduzir o peso corporal, apresentou maior atividade contra *E. coli* (inibição de 20 mm) e foi inativo contra *S. aureus*, *Streptococcus sp.*, e *Proteus sp.* (Sripathi & Sankari, 2010).

Atividade antiinflamatória

A administração intraperitoneal dos extratos em éter de petróleo, clorofórmio, acetato de etila, benzeno e aquoso de *S. articularis*, a 150 mg/kg, inibiu 27,14; 55,26; 53,93; 53,5 e 74,5% respectivamente, o edema de pata em ratos induzido por carragenina. Este estudo sugere que esta atividade foi atribuída à presença de ácido ursólico (45) (Vadivelan *et al.*, 2007).

Atividade antioxidante

Extratos em metanol da planta inteira de *S. articularis* e *S. exilis* mostraram pelos métodos de FTC e TBA atividade antioxidante comparável ou superior ao do α-tocoferol, BHT,

e quercetina. Extratos de *S. articularis* também apresentaram atividade sequestradora de radicais livres utilizando o radical sintético DPPH (65 mg/mL) e inibiu a produção de NO (77,3%) em lipopolissacarídeos e interferon- γ induzida por células RAW 264,7. Por outro lado, o extrato de *S. exilis*, a 370 mg/mL, mostrou fraca atividade sequestradora de radicais livres, mas a 250 mg/mL inibiu a produção de NO (91,16%). Segundo os autores, este último efeito foi devido as suas atividades citotóxicas nas células durante a cultura (Saha *et al.*, 2004).

O extrato em metanol da planta inteira de *S. hispida* também foi avaliado pelos métodos ABTS, FRAP, ensaios com DPPH e fenóis totais utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Os resultados mostraram fraca ou moderada atividade [ABTS (3,91 mmol/100 g), DPPH (2,73 mmol/100 g), FRAP (0,92 mmol/g) e teor de fenóis totais (0,77 g/100)] (Surveswaran *et al.*, 2007). Em outro estudo, a atividade antioxidante de uma fração rica em flavonoides obtida das sementes de *S. hispida* foi avaliada *in vitro* e *in vivo*. Os resultados indicaram que esta fração sequestra radical livre e possui atividade antioxidante *in vitro* (DPPH e radicais ABTS) e *in vivo* (20, 40 e 80 mg/kg, para ratos alimentados com dieta rica em gordura) e diminuiu significativamente o TBARS e hidroperóxidos lipídicos em ratos tratados (Kaviarasan *et al.*, 2008). Shajiselvin e Kottai Muthu (2010) também avaliaram a capacidade antioxidante total (método do ácido fosfomolibdico, FRAP e conteúdo de fenóis totais) dos extratos em éter de petróleo, acetato de etila e metanol da planta inteira de *B. hispida*. Os resultados mostraram que o extrato em metanol foi o mais efetivo como antioxidante e que contém grande quantidade de flavonoides.

Efeito antihiperlipêmico

Kaviarasan e Pugalendi (2009) avaliaram a influência da fração rica em flavonoides (Frf) das sementes de *S. hispida* na expressão gênica PPAR-*alfa*, plasma e antioxidantes de eritrócitos no estado redox, o metabolismo de proteínas e enzimas marcadoras de DHR. Quando comparado com o DRH, TBARS no plasma e níveis LOOH diminuiu, as atividades de antioxidantes enzimáticas (SOD, CAT, GPx) e os níveis de GSH plasmáticos no grupo alimentado com Frf. As atividades de plasma aminotransferase hepática, marcadores séricos de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina e os níveis de uréia plasmática, ácido úrico, creatinina, e globulina diminuiu significativamente, enquanto o peso do fígado, proteínas totais e albumina aumentou. A administração oral da fração rica em flavonoides regulada pela expressão gênica PPAR-*alfa*, ativa o catabolismo de ácidos graxos e está envolvida no controle de lipoproteínas no fígado. Os resultados mostraram que esta fração

tem um efeito anti-hiperlipêmico, melhora a capacidade antioxidante e alivia danos no fígado e rins em ratos.

Atividade Antitumoral

O extrato hidroalcoólico (1:1 etanol-água) de *B. pusilla*, a 115 mg/kg, mostrou atividade antitumoral contra células Leuk P388 em ratos (Aswal *et al.*, 1984).

Efeitos cardiovasculares

B. hispida está sendo utilizada há muitos anos como alternativa terapêutica para o diabetes. Para avaliar o uso desta espécie como terapia e para reduzir o risco cardiovascular, os ratos foram tratados durante um período de 30 dias. Comparados com animais tratados com veículo, os animais tratados com *B. hispida* apresentaram melhora pós-isquêmica da função ventricular e reduziram o tamanho do infarto do miocárdio e apoptose dos cardiomiócitos. O nível de expressão do citocromo e ativação da caspase 3 também foi reduzida. Além disso, o tratamento com *B. hispida* aumentou a expressão de proteínas PPAR-gama, PPAR-delta e Glut-4. Os resultados indicaram que o tratamento com *B. hispida* melhorou a função cardíaca, bem como vários fatores de risco associados à doença cardíaca (Vasanthi *et al.*, 2009).

Atividades hepatoprotetoras, anti-úlcera e gastrointestinal

Os extratos aquoso e em metanol das folhas de *B. ocyroides*, na dose de 800 mg/kg por via oral, aumentou em ratos a motilidade gastrointestinal, 6,1% e 22,5%, respectivamente. No entanto, quando bisacodil (5 mg/kg) foi administrado concomitantemente com os extratos, a motilidade foi aumentada para 67,8% e 70,1%, respectivamente (Okwosa *et al.*, 2009).

Em outro estudo, o extrato aquoso de *B. articularis* causou em ratos proteção da ação hepatotóxica do paracetamol (Chitra *et al.*, 2007).

Atividade larvicida

Em condições de laboratório, os extratos em hexano das partes aéreas (DL₅₀ 83,8 mg/mL), raízes (DL₅₀ 91,8 mg/mL) e caule (DL₅₀ 115,8 mg/mL) de *S. verticillata* apresentaram atividade contra as larvas de quarto ínstar de *A. aegypti* (Oliveira *et al.*, 2010). Este trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Química dos produtos Naturais na Universidade Federal de Alagoas.

Atividade esquistossomicida

O óleo essencial das folhas de *B. verticillata* foi efetivo contra ovos (MIC 500 µg/mL), miracídios e cercárias (MIC 100 mg/mL) de *Schistosoma haematobium* (Adewunmi & Marquis, 1983).

Efeito abortivo

O extrato aquoso das raízes de *B. verticillata* foi ativo como estimulante uterino (Barros *et al.*, 1970).

Toxicidade

Extratos metanólicos das folhas e raízes de *B. verticillata* apresentaram moderada toxicidade contra *Artemia salina* (CL₅₀ > 250 mg/mL) (Bouzada *et al.*, 2009).

2.5.3. Química e Atividades Biológicas dos Compostos Isolados

Os gêneros *Borreria* e *Spermacoce* foram pouco investigados do ponto de vista químico. O primeiro relato foi publicado em 1961 e revelou a detecção de (-)-emetina (**7**) das raízes de *B. verticillata* (Willaman & Schubert, 1961). Atualmente, mais de 60 compostos distribuídos em diferentes classes, foram isolados de sete espécies de *Borreria* [*B. auricularis*, *B. capitata* (Ruiz et Pavón) DC., *B. hispida*, *B. Latifolia*, *B. stricta*, *B. spp.* e *B. verticillata*] e uma espécie *Spermacoce* (*S. leavis* Roxb.). As principais classes de compostos isolados foram alcaloides (11 compostos) dos tipos indólicos, bis-indólicos e tetrahydro-isoquinolínicos; iridoides (13 compostos), seguido de flavonoides (8), terpenoides (15), e outras classes (17), incluindo derivados benzílicos, (Z)-3-hexenil e derivados feniletanoides glicosilados, ácidos carboxílicos (4) e álcoois alifáticos (2) (Tabela 1, p. 38). Alguns destes compostos exibiram atividades biológicas *in vivo* ou *in vitro*. Além disso, também foi identificado um total de dezessete aminoácidos, incluindo uma proteína e três carboidratos.

Alcaloides

Até o momento, um total de onze alcaloides, contendo esqueleto indólico [Borrearpina (**1**), borrecoxina (**2**), borrelina (**3**), borrerina (**4**), deidroborrearpina (**6**), verticillatina A (**10**) e verticillatina B (**11**)], bis-indólicos [borreverina (**5**), isoborrevera (**8**) e spermacoceína (**9**)] e (-)-emetina (**7**) foram isolados em apenas três das sete espécies de *Borreria* até então estudadas

(Tabela 1, p. 38; Figura 4, p. 44). Entre estes, apenas borrelina (**3**) ocorre em duas espécies de plantas (*Borreria* spp. e *B. capitata*). Os alcalóides borrerina (**4**) e borreverina (**5**) foram encontrados em diferentes partes de *B. verticillata*. Entre os alcaloides isolados, apenas o tartarato de borreverina foi avaliado *in vitro* contra onze micro-organismos patogênicos e esse composto foi ativo contra *Sarcina lutea*, *Vibrio cholerae* e *S. aureus*, MICs 3,0; 12,5 e 100 mg/ml, respectivamente (Maynart *et al.*, 1980). Estudos fitoquímicos com as raízes de *B. verticillata* mostraram conter cerca de 0,10% do alcaloide emetina (**7**) (Orazi, 1946) e os testes preliminares indicaram sua presença em *B. poaya* DC., *B. suaveolens* var. *platyphylla* (K. Schum.) Standl., *B. verbenoides* Cham. & Schltdl., e *B. verticillata* (Moreira, 1964).

Iridoides

Foi isolado de espécies de *Borreria* e *Spermacoce* um total de treze iridóides (Tabela 1, p. 38; Figura 5, p.45). As espécies em que foram encontrados iridoides são: partes aéreas de *B. latifolia* (Kamiya *et al.*, 2002), cascas das raízes, raízes e flores de *B. verticillata* (Sainty *et al.*, 1981; Vieira *et al.*, 1999; Moreira *et al.*, 2010) e partes aéreas de *S. laevis* (Noiarsa *et al.*, 2007). Entre os iridoides isolados, apenas o ácido asperulosídico (**13**) ocorre nas três espécies; dafilosídeo (**16**) e ácido deacetilasperulosídico (**18**) foram encontrados em *B. latifolia* e *B. verticillata* enquanto asperulosídeo (**12**) foi encontrado em *B. verticillata* e *S. laevis*. Por outro lado, borrieriagenina (**15**) deacetilasperulosídeo (**17**), feretosídeo (**19**), éster metílico do 6'-O-(2-glicerol) escandosídeo (**20**) e deacetilasperulosidato de metila (**23**) ocorrem somente em *B. verticillata*; 6-O-acetilescandosídeo (**14**), 10-hidroxioganina (**22**) e escandosídeo (**24**) em *B. latifolia* e 6 α -hidroxiadoxosídeo (**21**) em *S. laevis*.

Dentre os iridóides isolados, o composto **12** inibiu a produção de TNF-*alfa* e diminuiu a produção de IL-1 β para a formação de PGE2 e promoveu a recuperação articular, artrite reumatóide em tratados em camundongos (Li, 2007). Foi indicado como esteróide anabolizante muscular e alimento, uma vez que este composto aumentou a taxa de metabolismo basal muscular e a força (Fujikawa & Kawamura, 2009). Os compostos **12**, **18** e **24** foram avaliadas *in vitro* contra o vírus Epstein-Barr. Os resultados indicaram que ele foi mais eficaz do que o **12** e o **18** (Kapadia *et al.*, 1996). Os iridoides **12**, **13**, **15**, **17** e **21** foram inativos como antioxidantes (Permana *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2005). Foi avaliado em camundongos o efeito purgativo de **12**, **18** e **23** e os resultados mostraram que **18** foi mais fraco como purgante do que **23** (Inouye *et al.*, 1974).

O ácido asperolosídico (**13**) mostrou fraca inibição ($DL_{50} > 1,0$ mg/orelha) contra a inflamação induzida pelo TPA (1 mg/orelha) em camundongos e apresentou efeito inibitório moderado contra a ativação de EBV-EA induzido por TPA (Akihisa *et al.*, 2007). Também foi avaliado os efeitos deste ácido em TPA e EGF-induzida AP-1 transativação e transformação de células epidérmicas em células JB6 de camundongo. Os resultados indicaram que este composto foi eficaz em suprimir a TPA ou EGF-induzida pela transformação celular e associados atividade AP-1. O TPA ou EGF-fosforilação de c-Jun, mas não as quinases extracelulares também foi bloqueada por este composto (Liu *et al.*, 2001).

Na concentração de 20 mg/mL os compostos **13**, **18**, **19** e **24** foram avaliados quanto à sua capacidade de inibir a oxidação do LDL. Nestes estudos, somente **18** ($63,8\% \pm 1,5$) e **24** ($62,2\% \pm 1,6$) foram efetivos (Kim *et al.*, 2005). Os iridoídes **13** e **18** também foram avaliados oralmente em ratos diabéticos em STZ-induzido e não apresentaram efeito hipoglicemiante (Kamiya *et al.*, 2008) e o composto **23**, em ratos normais, reduziu o nível de glicose no sangue (Miura *et al.*, 1996).

A atividade inseticida dos compostos **13**, **18**, **22** e **24** foi avaliada contra formigas e cupins (*Crematogaster scutellaris* e *Kaloterme flavicollis*). Nestes ensaios, níveis significativos de toxicidade foram observados somente para **22** (Tzakou *et al.*, 2007).

A germinação de capim-colchão (CC), alfafa (AL) e trevo branco (TB) foi inibida, a 400 ppm, pelos compostos **12** e **13**, com taxa de 52 e 56, 58 e 80, 30 e 40%, respectivamente, o crescimento radicular de CC e AL, o crescimento do hipocótilo de AL, enquanto o composto **18** apresentou fraca inibição do crescimento da radícula da CC e AL; os compostos **12**, **13** e **18** não mostraram efeito sobre o TB (Komai *et al.*, 1986). Os compostos **12** e **23** também foram avaliados quanto à atividade inibitória da germinação e crescimento de mudas de várias espécies vegetais. O composto **12** inibiu o crescimento do arroz e da alface, sendo mais forte no alongamento das raízes do que das partes aéreas; enquanto **23** não apresentaram atividade inibitória (Komai *et al.*, 1990).

O iridoíde **13** também foi avaliado *in vitro* sobre a atividade das enzimas lipoxigenase da soja e da hialuronidase testicular bovina e não mostrou qualquer efeito. No entanto, a modificação estrutural através da hidrólise enzimática de β -glicosídeo resultou em inibição da atividade da enzima e esta atividade foi reforçada pela presença de alguns aminoácidos (leucina, lisina e ácido glutâmico) ou acetato de amônio. Os resultados dessas reações biomiméticas sugeriram que as angliconas de iridoídes e os produtos intermediários formados por estas espécies reativas podem inibir a atividade enzimática (Ling *et al.*, 2003).

Flavonoides

Apenas oito flavonoides foram isolados em espécies de *Borreria* e *Spermacoce* (Tabela 1, p. 38; Figura 5, p. 45). Sua ocorrência se restringe apenas a três espécies: *B. stricta* [astragalina (25), quercetina (29) e rutina (32) (Bhadoria & Gupta, 1981; Sharma & Gupta, 1987)], *B. hispida* [isoramnetina (26) (Purushothaman & Kalyani, 1979)] e *S. laevis* [3-O-β-D-glicopiranosil-campferol (27), 3-O-rutinosilcampferol (28), 3-O-β-D-galactopiranosil-quercetina (30), 3-O-α-L-ramnopiranosil-(1→6)-β-D-galactopiranosil-quercetina (31), e rutina (32) (Noiarsa *et al.*, 2007)].

Terpenoides

O gênero *Borreria* também contém triterpenoides dos tipos oleanano e ursano (Tabela 1, p. 38; Figura 6, p. 46). Foram isolados a partir do extrato em clorofórmico das partes aéreas e raízes de *B. auricularis*, espécie utilizada em Taiwan para diversos fins (Jain & Verma, 1981; Sultana *et al.*, 2008), sete triterpenos [ácido 3α-acetoxi-urs-12-en-29-óico (33), β-amirina (34), ácido 3-ceto-urs-12-en-29-óico (41), ácido epicatônico (38), ácido ursólico (45), éster metílico do ácido ursólico (46) e uvaol (47) (Mukherjee *et al.*, 1993; 1994; 2004). Além disso, a partir do óleo essencial das partes aéreas de *B. verticillata* dois sesquiterpenos, cariofileno (39) e guiaeno (40) foram isolados, respectivamente. Das sementes de *B. stricta* (Sharma & Gupta, 1987) e *B. hispida* (Kapoor *et al.*, 1969) β-sitosterol (43) e ácido ursólico (45) foram obtidos e das partes aéreas de *B. latifolia* o diterpeno fitol (42) foi isolado (Kamiya *et al.*, 2002).

Outras classes de compostos

Além das classes acima citadas, dois compostos benzílicos (48-49), quatro (Z)-3-hexenil (50-53), três derivados feniletíl glicosilados (55-57) e um glicosídeo megastigmane (58) (Tabela 1, p. 38; Figura 7, p. 47) foram isolados das partes aéreas de *S. laevis* (Noiarsa *et al.*, 2007). Das partes aéreas de *B. articularis* foi isolado o 6-metil-5-ciclododecen-1-ol (54) (Sultana *et al.*, 2008). Este composto apresentou atividade antimicrobiana contra onze bactérias patogênicas humanas (*B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. dysenteriae*, *S. sonnei*, *S. typhi*, *S. paratyphi*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *V. cholerae*) e quatro fungos patogênicos humanos (*A. niger*, *A. ustus*, *A. ochraceus* e *C. albicans*). Entretanto a menor CIM e CBM foi 500 e 100 mg/mL contra *V. cholerae*, respectivamente. Já para os fungos, as menores CIM e CFM foram de 750 e 1.500 mg/mL contra *A. ochraceus*, respectivamente (Sultana *et al.*, 2008).

Foram isolados dois álcoois (**59-60**) e quatro ácidos carboxílicos (**61-64**) de *B. stricta* (Bhadoria & Gupta, 1981; Sharma & Gupta, 1987) e *B. articularis* (Mukherjee *et al.*, 1993). Um total de dezessete aminoácidos, incluindo uma proteína, e três carboidratos (galactose, manitol e glicose) foram identificados quando analisado o teor de aminoácidos e carboidratos de folhas e sementes de *B. stricta* (Bhadoria & Gupta, 1981; Sharma & Gupta, 1987). Além disso, recentemente um estudo sobre as raízes *B. verticillata* levou ao isolamento de uma mistura de ácidos alifáticos, uma mistura de tri-O-glicerídeos e sacarose, e uma mistura de glicose e sacarose (Moreira *et al.*, 2010).

Compostos voláteis

A partir do óleo essencial de *S. ocymoides* foram identificados, utilizando CG e CG-EM, um total de dezessete compostos. Oito ácidos graxos que representam 33,14% do total, entre eles o mais abundante foi o ácido hexadecanóico, seis monoterpenos, sendo o borneol o mais abundante, um composto aromático o eugenol e dois de álcoois [hexano-1-butanol e (Z)-3-hexen-1-butanol (Ekpendu *et al.*, 2002). Das partes aéreas de *B. verticillata*, uma planta utilizada na Nigéria no tratamento de infecções da pele, foi obtido um óleo o qual inibiu o crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas. O óleo foi separado das frações de hidrocarbonetos e terpenos oxigenados por cromatografia. Segundo o autor, cariofileno, cadineno e uma lactona sesquiterpênica também pode estar presente (Benjamin, 1979).

As partes aéreas de *S. verticillata* L., coletada na Nigéria, foram submetidas a hidrodestilação. O óleo obtido foi submetido à triagem de atividade antimicrobiana contra cinco bactérias (*B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*) e dois fungos (*Acrothecium floccosum* e *C. albicans*). O óleo inibiu o crescimento de quatro das bactérias, bem como alguns fungos. Os constituintes do óleo foram analisados por meio de procedimentos de CG, CG-EM. Foram identificados alguns monoterpenoides e componentes oxigenados como linalol, eugenol, β -bisaboleno, E- β -farneseno, fitol e terpineol, bem como alguns ácidos graxos (Ekpendu *et al.*, 2001).

Tabela 1. Substâncias isoladas das espécies do gênero *Borreria* e *Spermacoce*.

Nome da Substância/Número	Espécies	Parte da Planta	Local de Coleta	Referências
<i>Alcaloides</i>				
Borrecarpina (1)	<i>B. capitata</i> (Ruíz et Pavón) DC.	Não citada Partes aéreas	Guiana Guiana Francesa	Jossang <i>et al.</i> , 1977 a,b Jossang <i>et al.</i> , 1981
Borrecoxina (2)	<i>B. capitata</i> (Ruíz et Pavón) DC.	Partes aéreas	Guiana Francesa	Jossang <i>et al.</i> , 1981
Borrelina (3)	<i>B. capitata</i> (Ruíz et Pavón) DC. <i>B. sp.</i> <i>B. sp.</i>	Partes aéreas Não citada Partes aéreas	Guiana Francesa Guiana Guiana Francesa	Jossang <i>et al.</i> , 1981 Damak & Riche, 1977 Jossang <i>et al.</i> , 1977 a
Borrerina (4)	<i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey	Folhas Planta inteira Partes aéreas	Brasil Senegal Bélgica	Ferreira <i>et al.</i> , 1978 Pousset <i>et al.</i> , 1973 Balde <i>et al.</i> , 1991
Borreverina (5)	<i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey	Planta inteira Partes aéreas, Planta inteira	Senegal Bélgica	Maynard <i>et al.</i> , 1980 Balde <i>et al.</i> , 1991 Pousset <i>et al.</i> , 1977
Desidroborrearpina (6)	<i>B. capitata</i> (Ruíz et Pavón) DC.	Partes aéreas	Guiana Francesa	Jossang <i>et al.</i> , 1981
(-)-Emetina (7)	<i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey	Raízes Flores, Folhas, Caule e Raízes	Não citado Brasil	Willaman & Schubert, 1961 Moreira, 1964
Isoborreverina (8)	<i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey	Partes aéreas	Bélgica	Balde <i>et al.</i> , 1991
Espermacoceína (9)	<i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey	Partes aéreas	Bélgica	Balde <i>et al.</i> , 1991
Verticillatina A (10)	<i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey	Raízes	Brasil	Moreira <i>et al.</i> , 2010
Verticillatina B (11)	<i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey	Raízes	Brasil	Moreira <i>et al.</i> , 2010

Tabela 1 (Continua)

Tabela 1 (Continuação)

<i>Iridoïdes</i>				
Asperulosídeo (12)	<i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey	Flores, Raízes	Brasil Brasil Madagascar	Vieira <i>et al.</i> , 1999 Moreira <i>et al.</i> , 2010 Sainty <i>et al.</i> , 1981
	<i>S. levis</i> Roxb.	Partes aéreas	Thailandia	Nioarsa <i>et al.</i> , 2007
Ácido asperulosídico (13)	<i>B. latifolia</i> (Aubl.) K. Schum. <i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey	Partes aéreas Raízes	Indonésia Madagascar	Kamiya <i>et al.</i> , 2002 Sainty <i>et al.</i> , 1981
6-O-Acetilascandosídeo (14)	<i>B. latifolia</i> (Aubl.) K. Schum.	Partes aéreas	Indonésia	Kamiya <i>et al.</i> , 2002
Borreriagenina (15)	<i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey	Flores	Brasil	Vieira <i>et al.</i> , 1999
Dafilosídeo (16)	<i>B. latifolia</i> (Aubl.) K. Schum. <i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey	Partes aéreas Flores Raízes	Indonésia Brasil Madagascar	Kamiya <i>et al.</i> , 2002 Vieira <i>et al.</i> , 1999 Sainty <i>et al.</i> , 1981
Deacetilasperulosídeo (17)	<i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey	Raízes	Madagascar	Sainty <i>et al.</i> , 1981
Ácido deacetilasperulosídico (18)	<i>B. latifolia</i> (Aubl.) K. Schum. <i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey	Partes aéreas Raízes	Indonésia Madagascar	Kamiya <i>et al.</i> , 2002 Sainty <i>et al.</i> , 1981
Feretosídeo (19)	<i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey	Raízes Raízes	Madagascar Brasil	Sainty <i>et al.</i> , 1981 Moreira <i>et al.</i> , 2010
6'-O-(2-gliceril) éster metílico escandosídeo (20)	<i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey	Raízes	Brasil	Moreira <i>et al.</i> , 2010
6 α -hidroxiodoxosídeo (21)	<i>S. laevis</i> Roxb	Partes aéreas	Thailandia	Nioarsa <i>et al.</i> , 2007
10-Hidroxiloganina (22)	<i>B. latifolia</i> (Aubl.) K. Schum.	Partes aéreas	Indonésia	Kamiya <i>et al.</i> , 2002
Éster metílico do ácido deacetilasperulosídico (23)	<i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey	Raízes	Madagascar	Sainty <i>et al.</i> , 1981

Tabela 1 (Continua)

Tabela 1 (Continuação)

Escandosídeo (24)	<i>B. latifolia</i> (Aubl.) K. Schum. <i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey	Partes aéreas Raízes	Indonésia Brasil	Kamiya <i>et al.</i> , 2002 Moreira <i>et al.</i> , 2010
Flavonoides				
Astragalina (25)	<i>B. stricta</i>	Folhas	Índia	Bhadoria, & Gupta, 1981
Isorhamnetina (26)	<i>B. hispida</i> (Linn.) K. Schum.	Sementes	Índia	Purushothaman & Kalyani, 1979
3-O-β-D-glucopiranosídeo Kampferol (27)	<i>S. laevis</i> Roxb	Partes aéreas	Thailândia	Nioarsa <i>et al.</i> , 2007
3-O-rutinosídeo kampferol (28)	<i>S. laevis</i> Roxb	Partes aéreas	Thailândia	Nioarsa <i>et al.</i> , 2007
Quercetina (29)	<i>B. stricta</i>	Sementes, Folhas	Índia	Sharma & Gupta, 1987; Bhadoria, & Gupta, 1981
3-O-β-D-galactopiranosídeo Quercetina (30)	<i>S. laevis</i> Roxb	Partes aéreas	Thailândia	Nioarsa <i>et al.</i> , 2007
3-O-α-L-rhamnopiranosil-(1→6)-β-D-galactopiranosídeo Quercetina (31)	<i>S. laevis</i> Roxb	Partes aéreas	Thailândia	Nioarsa <i>et al.</i> , 2007
Rutina (32)	<i>B. stricta</i> Linn <i>S. laevis</i> Roxb	Sementes, Folhas Partes aéreas	Índia Thailândia	Sharma & Gupta, 1987; Bhadoria, & Gupta, 1981 Nioarsa <i>et al.</i> , 2007
Terpenoides				
Ácido 3α-acetoxi-olean-12-en-29-óico (33)	<i>B. articularis</i> (L.f.) F.N. Williams	Raízes	Taiwan	Mukherjee <i>et al.</i> , 2004
β-Amirina (34)	<i>B. articularis</i> (L. f.) F. N. Williams	Raízes	Taiwan	Mukherjee <i>et al.</i> , 2004
Campesterol (35)	<i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey	Caule	Madagascar	Andre <i>et al.</i> , 1976

Tabela 1 (Continua)

Tabela 1 (Continuação)

Cariofileno (36)	<i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey	Óleo essencial	Nigéria	Benjamin, 1979
Daucosterol (37)	<i>B. stricta</i>	Folhas	Índia	Bhadoria, & Gupta, 1981
Ácido epikatônico (38)	<i>B. articularis</i> (L. f.) F. N. Williams	Planta inteira	Índia	Mukherjee <i>et al.</i> , 1993
Eritrodiol (39)	<i>B. articularis</i> (L. f.) F. N. Williams	Planta inteira	Índia	Mukherjee <i>et al.</i> , 1993
Guaiaeno (40)	<i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey	Partes aéreas	Nigéria	Benjamin, 1980
Ácido 3-ceto-olean-12-en-29-óico (41)	<i>B. articularis</i> (L.f.) F.N. Williams	Planta inteira	Índia	Mukherjee <i>et al.</i> , 1993
Fitol (42)	<i>B. latifolia</i> (Aubl.) K. Schum.	Partes aéreas	Indonésia	Kamiya <i>et al.</i> , 2002
β-Sitosterol (43)	<i>B. articularis</i> (L.f.) F.N. Williams	Planta inteira	Índia	Mukherjee <i>et al.</i> , 1993
	<i>B. hispida</i>	Planta inteira	-	Kapoor <i>et al.</i> , 1969
	<i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey	Caule	Madagascar	Andre <i>et al.</i> , 1976
	<i>B. stricta</i> Linn	Sementes, Folhas	Índia	Sharma & Gupta, 1987; Bhadoria, & Gupta, 1981
Stigmasterol (44)	<i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey	Caule	Madagascar	Andre <i>et al.</i> , 1976
Ácido ursólico (45)	<i>B. articularis</i> (L.f.) F.N. Williams	Planta inteira	Índia	Mukherjee <i>et al.</i> , 1994
	<i>B. pusilla</i> (Wall.) DC.	Sementes, Folhas	Índia	Sharma & Gupta, 1987; 1981
Éster metílico do ácido ursólico (46)	<i>B. articularis</i> (L.f.) F.N. Williams	Planta inteira	Índia	Mukherjee <i>et al.</i> , 1994
Uvaol (47)	<i>B. articularis</i> (L. f.) F. N. Williams	Planta inteira	Índia	Mukherjee <i>et al.</i> , 1994
Outras classes de compostos				
Benzil O-α-L-arabinopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosídeo (48)	<i>S. laevis</i> Roxb.	Partes aéreas	Thailândia	Noiarsa <i>et al.</i> , 2007
Benzil O-β-D-xilopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosídeo (49)	<i>S. laevis</i> Roxb.	Partes aéreas	Thailândia	Noiarsa <i>et al.</i> , 2007

Tabela 1 (Continua)

Tabela 3 (Continuação)

(Z)-3-Hexenil O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosídeo (50)	<i>S. laevis</i> Roxb.	Partes aéreas	Thailândia	Noiarsa et al., 2007
(Z)-3-Hexenil diglicosídeo (51)	<i>S. laevis</i> Roxb.	Partes aéreas	Thailândia	Noiarsa et al., 2007
(Z)-3-Hexenil) O- β -D-glucopiranosídeo (52)	<i>S. laevis</i> Roxb.	Partes aéreas	Thailândia	Noiarsa et al., 2007
(Z)-3-Hexenil O- α -L-rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosídeo (53)	<i>S. laevis</i> Roxb.	Partes aéreas	Thailândia	Noiarsa et al., 2007
6-Metil-5-ciclododecen-1-ol (54)	<i>S. laevis</i> Roxb.	Partes aéreas	Thailândia	Noiarsa et al., 2007
Feniletil O- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosídeo (55)	<i>S. laevis</i> Roxb.	Partes aéreas	Thailândia	Noiarsa et al., 2007
Feniletil O- β -D-glucopiranosídeo (56)	<i>S. laevis</i> Roxb.	Partes aéreas	Thailândia	Noiarsa et al., 2007
Feniletil O- α -L-rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosídeo (57)	<i>S. laevis</i> Roxb.	Partes aéreas	Thailândia	Noiarsa et al., 2007
(6s,9R)-Roseosídeo (58)	<i>S. laevis</i> Roxb.	Partes aéreas	Thailândia	Noiarsa et al., 2007
<i>Álcoois e ácidos carboxílicos</i>				
Hexacosan-1-ol (59)	<i>B. stricta</i> Linn	Folhas	Índia	Bhadoria, & Gupta, 1981
Hentriacontan-1-ol (60)	<i>B. articularis</i> (L.f.) F.N. Williams	Planta inteira	Índia	Mukherjee <i>et al.</i> , 1993
Ácido linoléico (61)	<i>B. stricta</i> Linn	Sementes	Índia	Sharma & Gupta, 1987
Ácido oléico (62)	<i>B. stricta</i> Linn	Sementes	Índia	Sharma & Gupta, 1987
Ácido palmítico (63)	<i>B. stricta</i> Linn	Sementes, Folhas	Índia	Sharma & Gupta, 1987 Bhadoria, & Gupta, 1981
Ácido esteárico (64)	<i>B. pusilla</i> (Wall.) DC.	Sementes	Índia	Sharma & Gupta, 1987

Tabela 1 (Continua)

Tabela 1 (Continuação)

<i>Aminoácidos e Carboidratos</i>				
Alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina, valina	<i>B. stricta</i> Linn	Sementes	Índia	Sharma & Gupta, 1987
Galactose, glucose, manitol	<i>B. pusilla</i> (Wall.) DC.	Folhas	Índia	Bhadoria, & Gupta, 1981

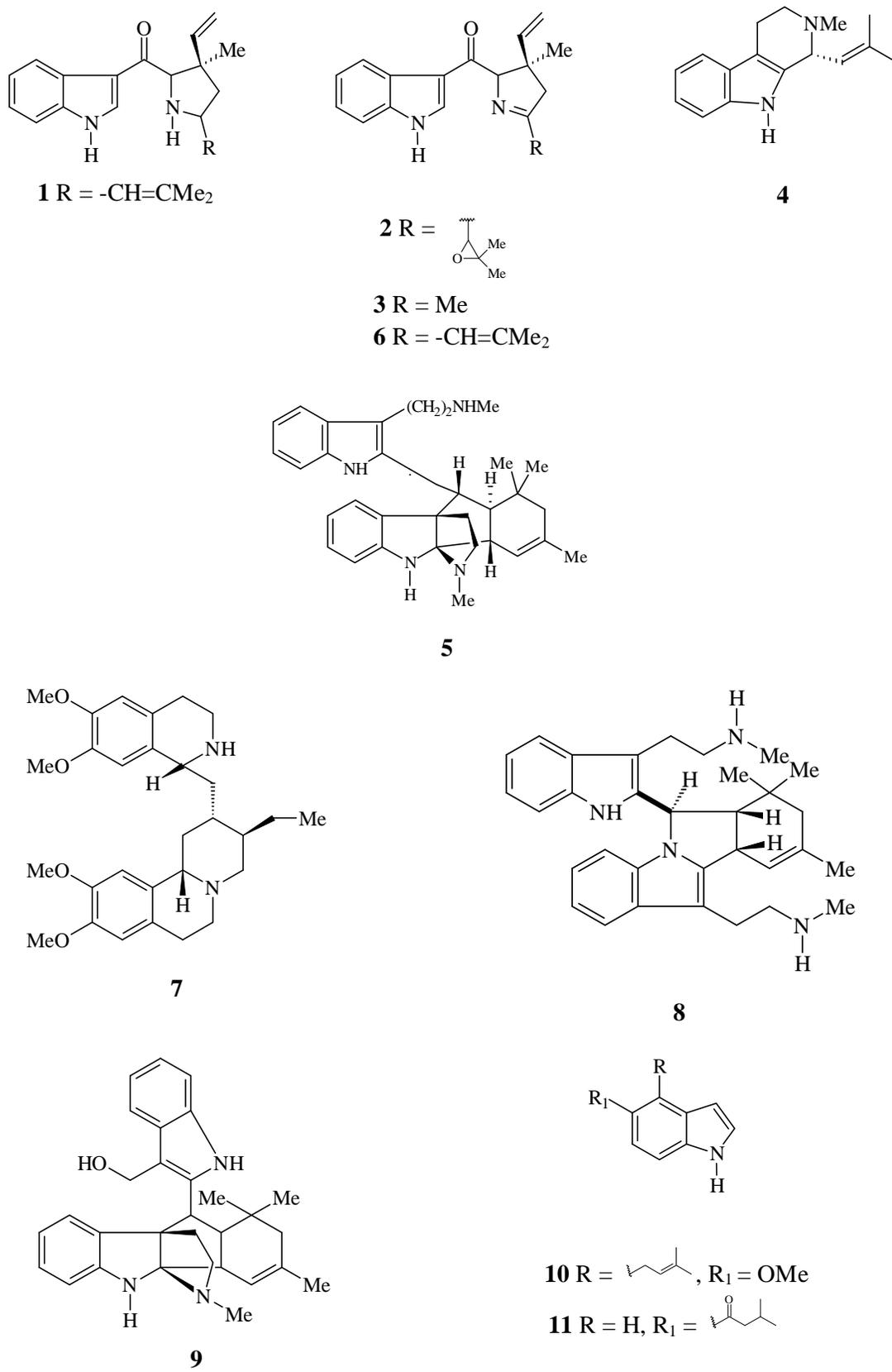


Figura 4. Estrutura dos alcaloides isolados das espécies do gênero *Borreria*

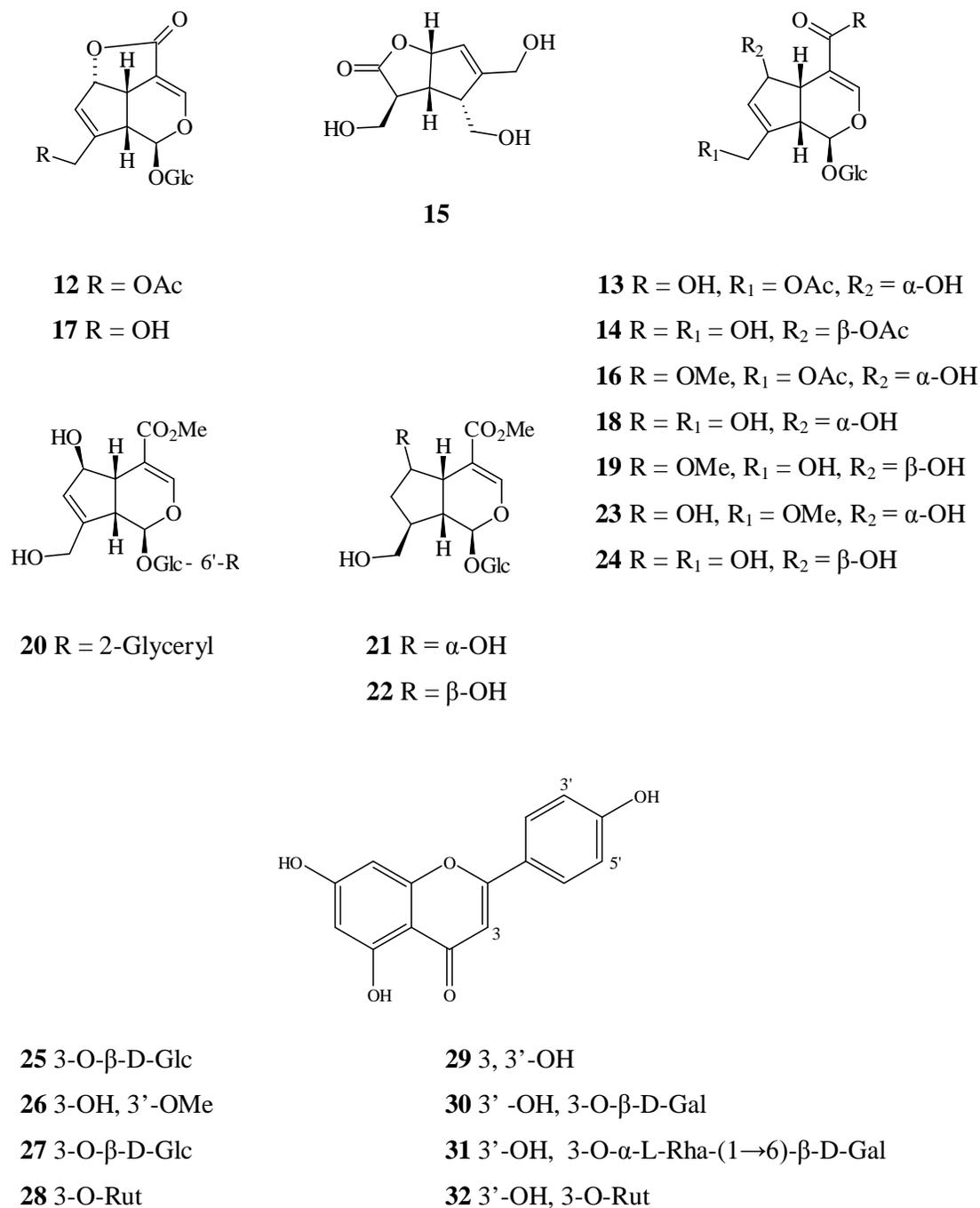
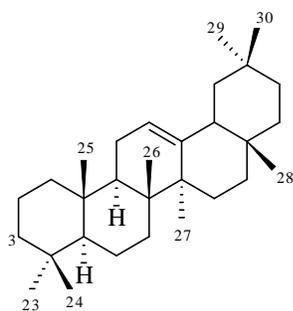


Figura 5: Estrutura dos iridoides e flavonoides isolados das espécies de *Borreria* e *Spermacoce*



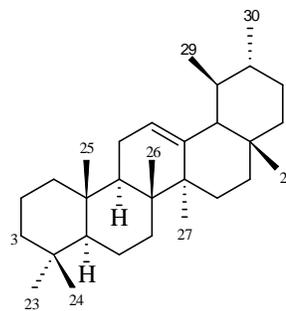
33 3 α -OAc, 29-CO₂H

34 3 β -OH

38 3 β -OH, 29-CO₂H

39 3 β -OH, 28-OH

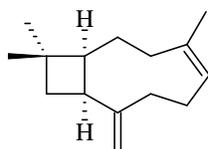
41 3-Oxo, 29-CO₂H



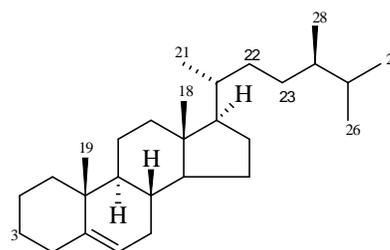
45 3 β -OH, 28-CO₂H

46 3 β -OH, 28-CO₂Me

47 3 β ,28-OH



36

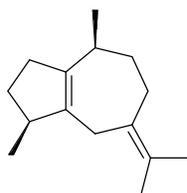


35 3 β -OH, R = Me

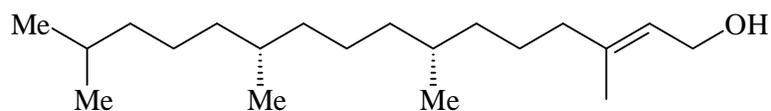
37 3 β -O-Glc, R = Et

43 3 β -OH, R = Et

44 3 β -OH, R = Et, Δ^{22}



40



42

Figura 6: Estrutura dos terpenoides isolados das espécies de *Borreria*

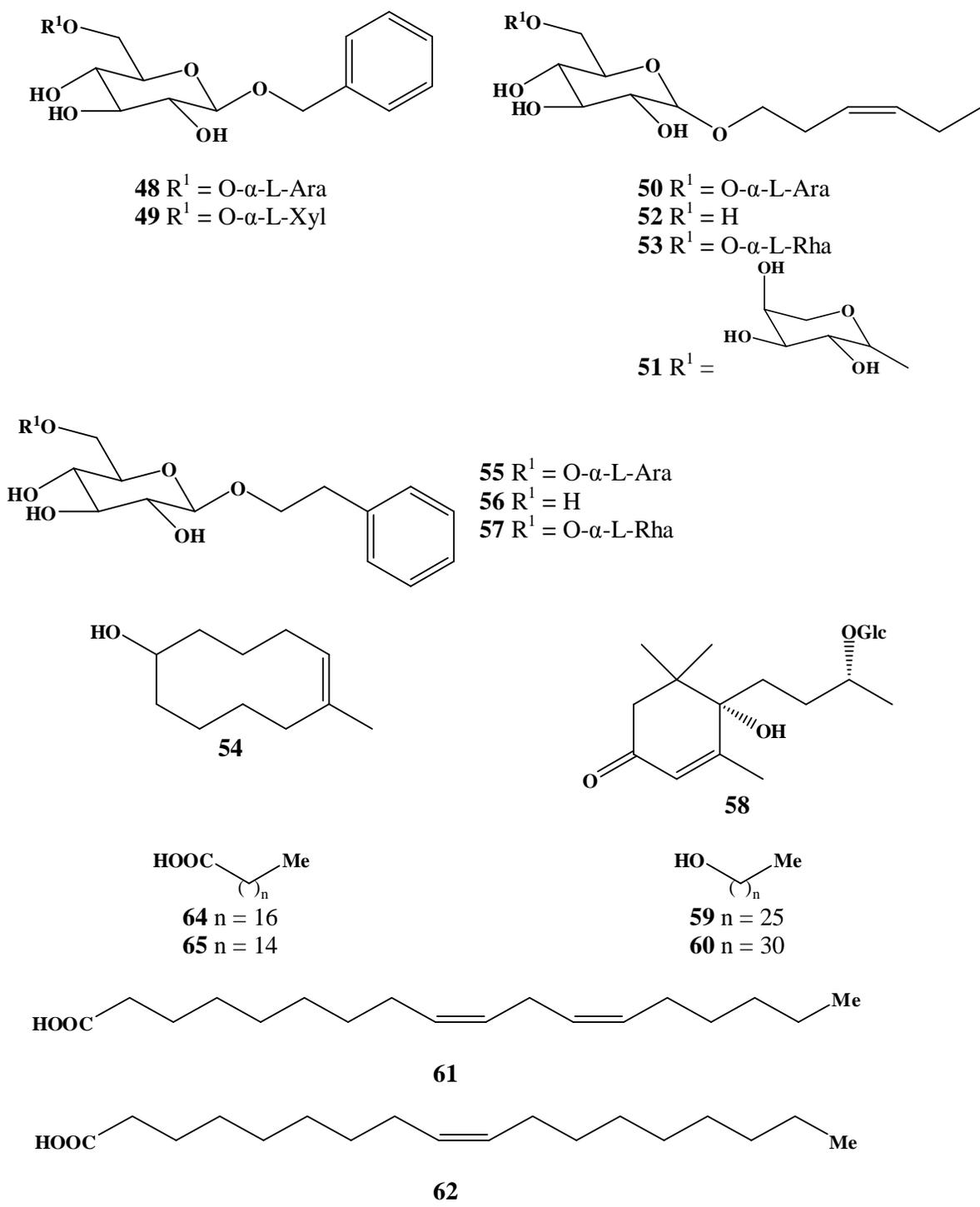


Figura 7. Estrutura de outros compostos isolados de espécies de *Borreria* e *Spermacoce*

3. Objetivos

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo ampliar o conhecimento químico e das atividades biológicas da espécie *Spermacoce verticillata* G. Mey (Rubiaceae), através da avaliação das atividades larvicida, antioxidante e de toxicidade frente à *Artemia salina*, das partes aéreas, caule e raízes.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar, frente larvas do 4º estágio do mosquito *A. aegypti*, a atividade larvicida de extratos e frações oriundas das partições das partes aéreas, caule e das raízes de *S. verticillata*;
- Avaliar o potencial anti-radicalar, através de ensaios qualitativo e quantitativo, frente ao DPPH e fenóis totais (Folin-Ciocalteu), de extratos, frações e substâncias isoladas oriundas das partições das partes aéreas, caule e raízes *S. verticillata*;
- Isolar constituintes químicos presentes nos extratos e frações com resultados promissores nos ensaios efetuados.

4. Experimental

4. Experimental

4.1. Solventes, Materiais e Equipamentos

- Na preparação dos extratos por maceração utilizou-se extrator de aço inox;
- Nas separações cromatográficas utilizou-se sílica gel 60 (70-230 e 230-400 mesh, Merck) e Sephadex LH-20 (Pharmacia), bem como solventes (acetato de etila, clorofórmio, hexano e metanol) P.A. ou destilados no próprio laboratório;
- A concentração das soluções com grande volume foi efetuada em evaporador rotatório (Büchi e IKA Were modelo RE-114V e RV06-ML, respectivamente) enquanto que as de pequeno volume foi a temperatura ambiente, em capela de exaustão analítica (Permutation);
- Nas cromatografias em camada delgada (CCD) analítica (0,50 mm) e preparativa (0,75 mm) utilizaram-se sílica gel 60 PF₂₅₄ da Merck ou MN sílica gel P/UV₂₅₄ com CaSO₄. As cromatoplasmas foram preparadas utilizando-se suspensão de gel de sílica em água destilada, espalhada sobre placas de vidro através de um espalhador mecânico, sendo estas ativadas em estufa (Biomatic) a 100 °C;
- Os cromatogramas foram revelados através de irradiação com luz ultravioleta em comprimento de onda 254 e 366 nm, imersão em cubas contendo vapores de iodo, ou borrifadas com solução ácida de sulfato cérico ou com reagente de Dragendorf;
- Nas solubilizações utilizou-se ultrassom da Branson (mod. 1210);
- Na secagem da vidraria utilizou-se estufa de esterilização universal, modelo 219;
- As pesagens foram efetuadas em balança eletrônica analítica (Shimadzu Mod. AX200) e semi-analítica (BEL);
- Os experimentos de RMN foram executados em espectrômetro Bruker Avance 400, operando na frequência de 400 MHz para hidrogênio – ¹H e 100 MHz para carbono – ¹³C (TMS referência interna) do Instituto de Química da Universidade Federal de Alagoas e as amostras foram dissolvidas em solventes deuterados (clorofórmio, metanol ou piridina puros ou em mistura);
- Nos ensaios larvicidas, para esterilização da ração animal, utilizou-se autoclave vertical modelo 415. A alimentação dos insetos adultos de *Aedes aegypti* foi feita com sacarose a 10% anidra PA (Vetec) ou glicose anidra (Amresco);

- Nos ensaios antioxidantes utilizou-se metanol grau HPLC da Vetec, radical sintético 1,1-difenil-2-picrilidrazila (DPPH•) e (+)-catequina, ácido gálico, BHT e reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma), bicarbonato de sódio (Vetec) e Espectrofotômetro UV-VIS (Mod. SP 220 da Biospectro ou Shimadzu Mod. AX200).

4.2. Coleta e Identificação do Material Vegetal

As partes aéreas, caule e raízes da espécie *Spermacoce verticillata* (sinonímia: *Borreria verticillata*) foram coletados na Área de Proteção Ambiental de Santa Rita (Mucuri), município de Marechal Deodoro/AL e identificada pela botânica Rosangela P. de Lyra Lemos do Instituto do Meio Ambiente de Alagoas (IMA-AL), onde um exemplar do referido material se encontra catalogado (MAC-22.949).

4.3. Preparação dos Extratos

Os materiais vegetais provenientes das partes aéreas (226,48 g), caule (7,70 Kg) e raízes (485,32 g) da espécie *S. verticillata*, após secagem a temperatura ambiente e moagem, foram individualmente extraídos através de maceração com EtOH 90%. Após concentração das soluções em evaporador rotativo, os extratos brutos foram obtidos [partes aéreas (28,79 g); caule (21,25 g); raízes (7,60 g)] foram suspensos em solução MeOH-H₂O (3:2) e extraídos sucessivamente com hexano, CHCl₃ e AcOEt (Figura 8-9, pp. 53-54). Posteriormente, os extratos brutos, bem como as frações resultantes deste processo, foram submetidos a ensaios para avaliar as atividades larvicida (larvas do 4º estágio do *A. aegypti*) e capacidade de sequestrar radicais livres (DPPH), bem como a toxicidade frente à *Artemia salina*.

4.4. Prospecção fitoquímica para alcaloides com extratos e frações

A prospecção fitoquímica permite fazer uma abordagem dos componentes químicos presentes nos extratos. Esta ferramenta é muito valiosa para seleção de plantas para estudos monitorados (Matos, 1997). A literatura científica relata para o gênero *Borreria* a presença de alcaloides. Por esta razão, triagens fitoquímicas com os extratos oriundos das partições utilizando os reagentes de Bouchardat, Dragendorff e Mayer foram efetuadas.

4.4.1. Reagente de Bouchardat

Foram dissolvidos 4 g de iodeto de potássio (KI) e 2 g de iodo (I₂) em 100 mL de água destilada, até completa dissolução.

4.4.2. Reagente de Dragendorff

Foram dissolvidos 0,85 g de Subnitrato de Bismuto em 50 mL de uma solução a 20% de ácido acético (Solução A). E para a solução B, foram dissolvidos 8 g de Iodeto de potássio em 20 mL de água destilada. Em seguida a solução A foi misturada lentamente com a solução B e protegida da luz.

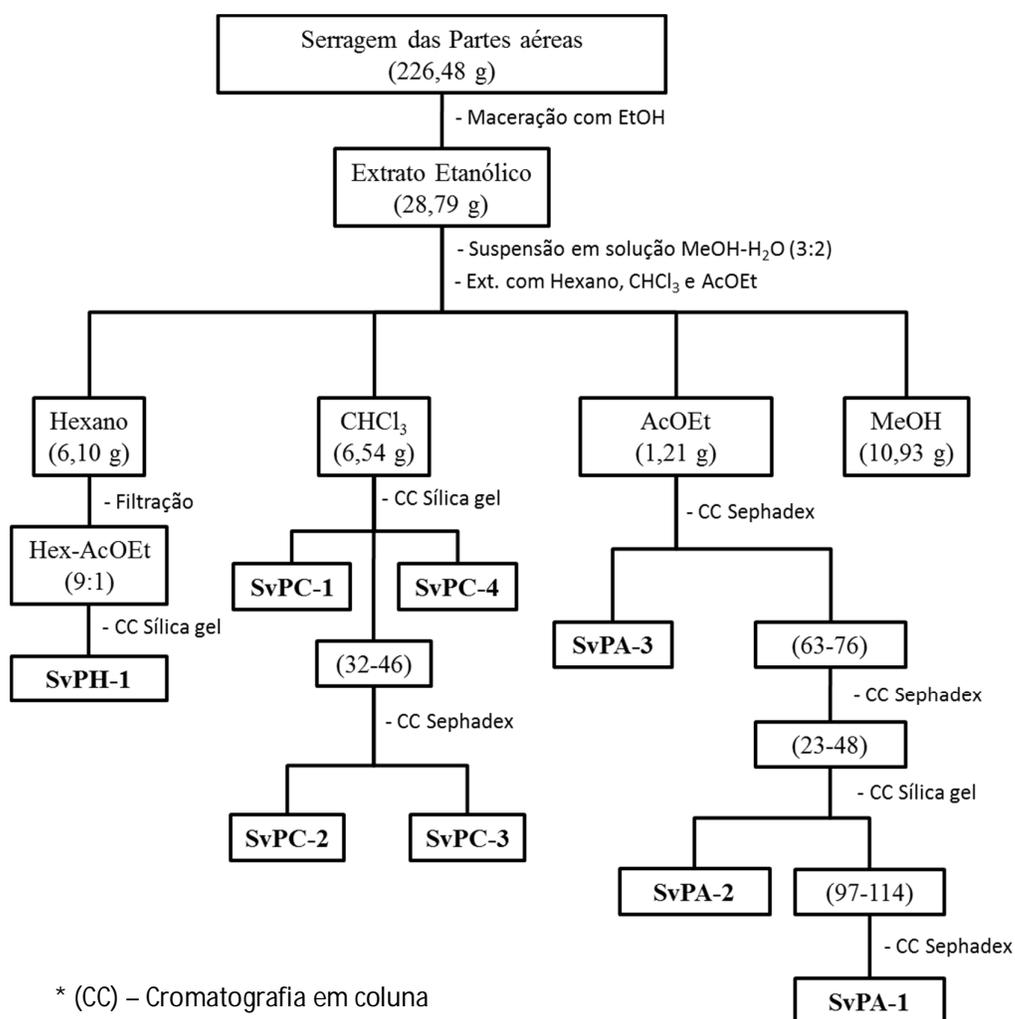
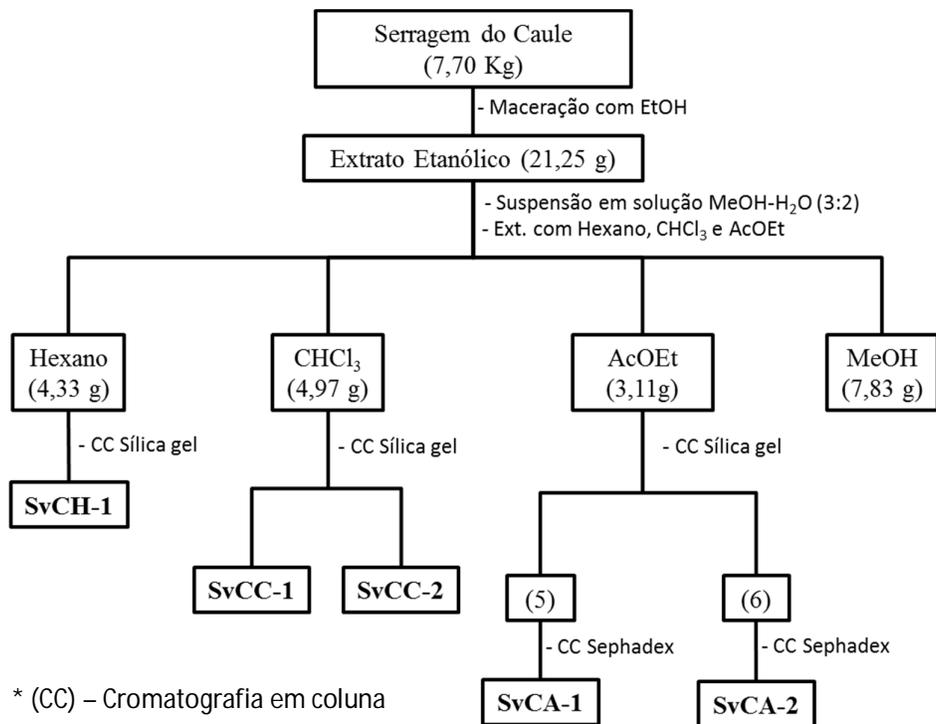
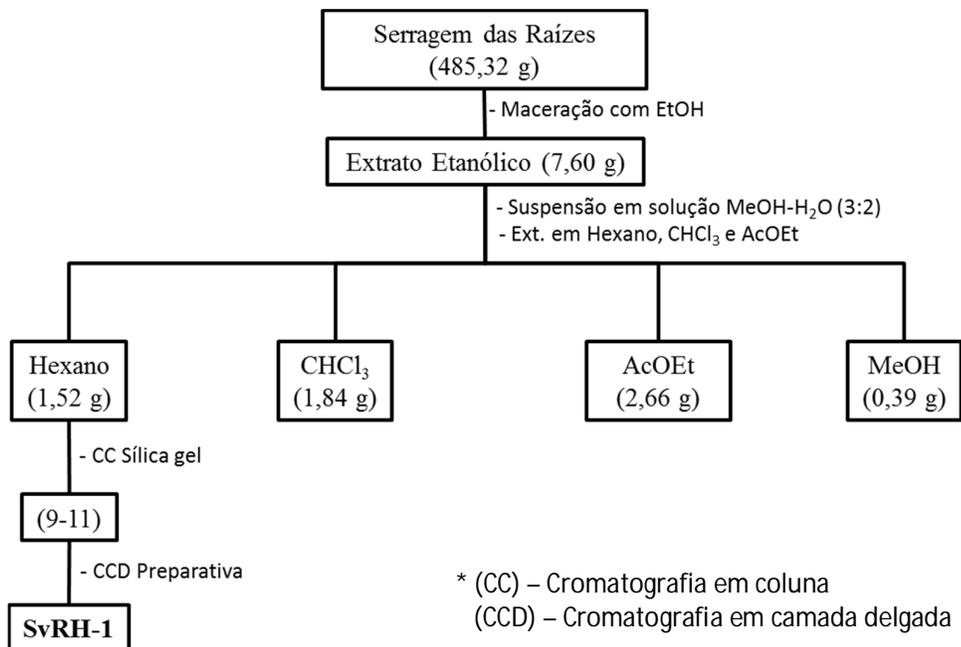


Figura 8. Esquema geral do procedimento experimental efetuado com as partes aéreas de *S. verticillata*.



A



B

Figura 9. Esquema geral do procedimento experimental efetuado com o caule (A) e raízes (B) de *S. verticillata*.

4.4.3. Reagente de Mayer

Foram dissolvidos 1,36 g de Bicloreto de mercúrio em 60 mL de água destilada (Solução A). Para a solução B foram dissolvidos 5 g de Iodeto de potássio em 10 mL de água destilada. Em seguida as soluções foram misturadas e diluídas para 100 mL com água destilada.

Os ensaios foram realizados em tubos de ensaios, com alíquotas de 5 mg de amostra que foram dissolvidos em 4 mL de uma solução de HCl à 5%, em seguida filtradas e divididas em três tubos de ensaios. Após este processo foram gotejadas as soluções dos reagentes preparados.

4.5. Avaliação da Atividade Larvicida

Os extratos brutos, bem como as frações oriundas das partições, foram submetidos a ensaios frente a larvas do quarto estágio (**L4**) do mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* L., 1762 (Diptera: Culicidae). Os experimentos foram realizados no Insetário do Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL (LPqPN-IQB/UFAL), seguindo recomendações da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1981) com algumas modificações.

4.5.1. Criação e Manutenção dos Mosquitos

Larvas de *A. aegypti* foram obtidas a partir de ovos depositados em papéis de filtro e adicionados às bacias com água destilada, por um período de 48 h, para eclosão das larvas. Seu desenvolvimento em diferentes estágios (**L1**, **L2**, **L3** e **L4**), que posteriormente evoluiu para pupas e por fim até a forma adulta (Figura 10, p. 56), foi mantido a uma temperatura média de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de $80 \pm 4\%$, com fotoperíodo de aproximadamente 12 horas. Durante este período, as larvas foram alimentadas com ração (autoclavada) para gatos. Os insetos adultos foram mantidos em gaiolas teladas com nylon (15 x 25 cm), alimentados com uma solução de glicose a 10% em chumaços de algodão, trocados diariamente. Para maturação dos ovos, o repasto sanguíneo das fêmeas do mosquito foi feito, por 1h, com pombos da espécie *Columbia livia*.

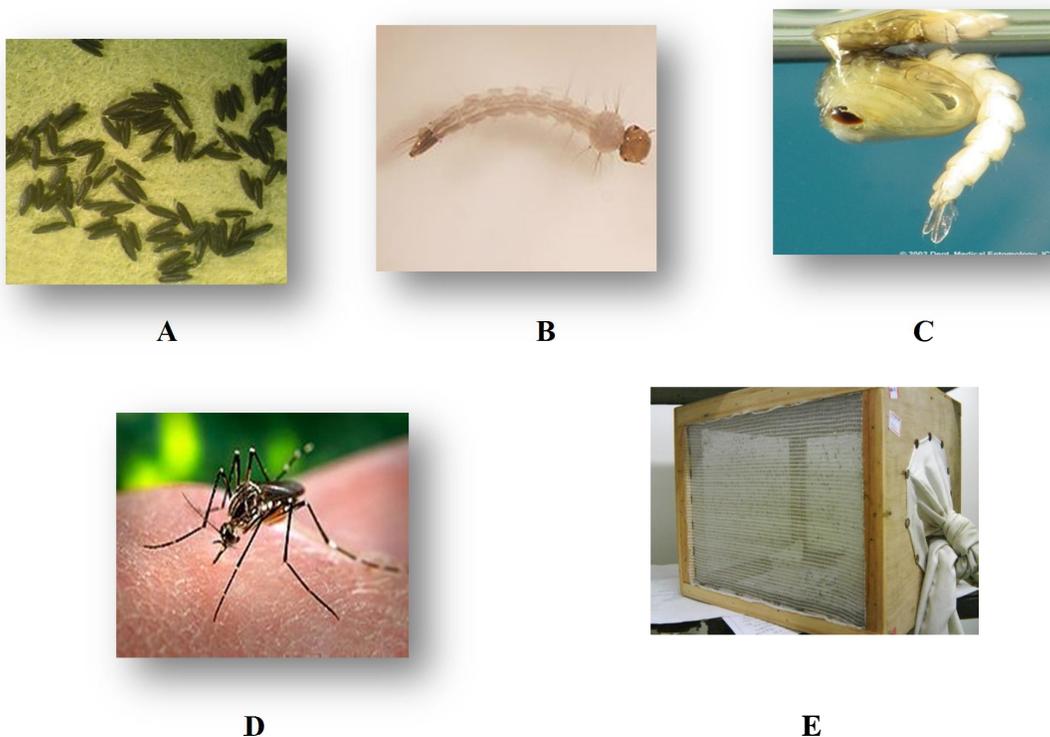


Figura 10. Formas evolutivas do *A. aegypti* (**A** = Ovos, **B** = Larva, **C** = Pupa, **D** = Mosquito adulto e **E** = Gaiola com mosquitos) (Fonte: www.fiocruz.br/ioc/media/larvas e www.hudsonregional.org; http://pt.wikipedia.org/wiki/Aedes_aegypti). Acessado em 30/09/2010.

4.5.2. Ensaios para Avaliação da Atividade Larvicida

Os ensaios com extratos e frações foram realizados em triplicata utilizando-se larvas jovens do 4º estágio (cabeça branca, sob alimentação). Após a triagem de acordo com o estágio, as larvas foram colocadas em copos plásticos descartáveis de 200 mL (Figura 11, p. 57). Foram utilizadas por teste 15 larvas, com três réplicas para cada amostra analisada. Após pesagem, os extratos foram dissolvidos em solução aquosa de DMSO a 1%. Para avaliação preliminar da mortalidade, cada grupo foi exposto, na concentração de 250 ppm, à solução teste durante 48 horas. Para o controle negativo utilizou-se solução aquosa de DMSO a 1%, o qual foi mantido nas mesmas condições do teste. A mortalidade das larvas foi computada em 24 e 48 horas após o início do teste.

De acordo com o percentual de mortalidade após 48 horas, obteve-se o grau de atividade dos extratos e frações testados de acordo com os seguintes critérios:

- a) Mortalidade superior a 75% → considerado **promissor**;
- b) Mortalidade entre 50% e 75% → considerado **parcialmente promissor**;

- c) Mortalidade entre 25% e inferior a 50% → considerado **fracamente promissor**;
- d) Mortalidade inferior a 25% → considerado **inativo**.

Os testes considerados promissores serão novamente testados em concentrações menores, que permita observar do máximo ao mínimo de mortalidade, com base nesses resultados é calculada a CL₅₀ utilizando o programa POLO pelo método PROBIT de análise.

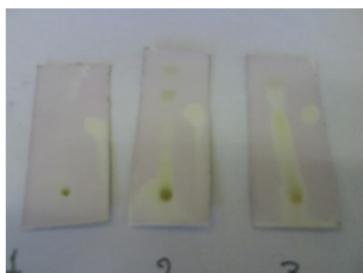


Figura 11. Ilustração dos bioensaios realizados.

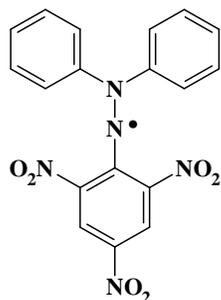
4.6. Avaliação da Capacidade Sequestradora de Radicais Livres (DPPH)

4.6.1. Ensaios Qualitativos

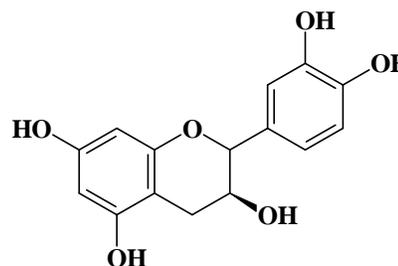
O Quadro 1 (p. 58) relaciona os extratos e frações oriundas da partição que foram submetidos a ensaios para avaliação qualitativa da capacidade sequestradora de radicais livres frente ao radical sintético DPPH. Estes ensaios foram realizados, de acordo com a metodologia descrita por Soler-Rivas e cols. (2000). Após dissolução das amostras (CH₂Cl₂, CHCl₃ ou MeOH), alíquotas (cerca de 2 µL) de cada amostra foram aplicadas com auxílio de capilares de vidro em cromatoplasas (sílica gel 60 F₂₅₄, Merck) e eluídas em sistemas de solventes adequados. Após eliminação dos solventes a temperatura ambiente foi aplicado o controle positivo [(+)-catequina (2 µL, 1 mg/mL em clorofórmio)], as cromatoplasas foram imersas, durante 10 segundos, em solução metanólica do radical sintético DPPH a 0,4 mM e em seguida secas a temperatura ambiente. O surgimento de manchas amareladas sob um fundo roxo nos R_f das substâncias sugeriu uma possível atividade.



Cromatograma após imersão na solução de DPPH



DPPH



(+)-Catequina

Quadro 1. Extrato e frações submetidos à avaliação qualitativa frente ao DPPH.

Parte da Planta	Extrato	Frações de Partição	Subfrações e Substâncias isoladas
<i>Partes aéreas</i>	EtOH	Hexano, CHCl ₃ , AcOEt e MeOH-H ₂ O	Hexano, Hex/AcOEt (9:1), (7:3), (1:1), AcOEt, MeOH, SvPA-1 e SvPA-3
<i>Caule</i>	EtOH	Hexano, CHCl ₃ , AcOEt e MeOH-H ₂ O	
<i>Raízes</i>	EtOH	Hexano e AcOEt	

4.6.2. Ensaios Quantitativos

Para a realização dos ensaios quantitativos frente ao radical sintético DPPH, somente com as amostras que forneceram resultados positivos (manchas amareladas) nos ensaios qualitativos, foi utilizada a metodologia descrita por Brand-Williams e cols. (1995).

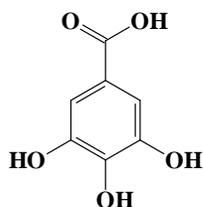
❖ Obtenção da curva de calibração

Nove concentrações (40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, e 1 µg/mL) foram preparadas a partir da solução estoque de DPPH em MeOH (40 mg/L ou 100 µmol/L). A absorbância de cada solução a 515 nm foi determinada utilizando cubetas de poliestireno com percurso óptico de 1 cm, contendo 1 mL da solução, em espectrofotômetro UV/VIS, modelos (SP-220 da Biospectro e UV mini-1240 Shimadzu). Como branco utilizou-se MeOH grau HPLC.

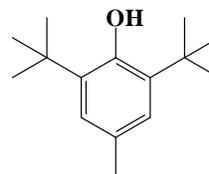
A curva de calibração foi construída, utilizando os valores médios de absorbância obtidos versus as concentrações usadas (40 a 1 µg/mL), através de análise de regressão linear utilizando o software Microcal OriginPro 7.0. As soluções estoque de DPPH foram preparadas diariamente e de cada conjunto de dados foram obtidos desvios padrão (DP) e coeficiente de correlação (R), cujas medidas de dispersão variaram entre 0,997 e 0,999.

❖ *Preparo das Soluções das Amostras*

As soluções estoques das amostras testes (extratos brutos, frações e substâncias isoladas), bem como os padrões (ácido gálico e BHT) utilizados foram preparadas na concentração de 40 µg/mL em MeOH (grau HPLC). De cada amostra, foram testadas no mínimo cinco concentrações que variaram entre 200 a 3,125 µg/mL.



Ácido gálico



BHT

❖ *Avaliação Quantitativa da Atividade Sequestradora de Radicais Livres*

Estes ensaios foram realizados de acordo com a técnica descrita por Soler-Rivas e cols. (2000). Os extratos com resultados positivos tiveram a CI_{50} determinadas de acordo com a técnica descrita por Brand-Williams e cols. (1995). Neste experimento, foram submetidas à avaliação quantitativa da capacidade de seqüestrar o radical sintético DPPH somente o extrato em EtOH e a fração em AcOEt das partes aéreas, bem como as substâncias isoladas **SvPA-1** e **SvPA-3**. Após obtenção da curva de calibração, alíquotas de 0,1 mL de cada concentração das amostras foram individualmente colocadas em cubetas e adicionadas a cada uma delas 0,9 mL da solução do radical DPPH (100 µmol/L). As soluções foram protegidas da presença de luz, homogêneas e as leituras de no mínimo cinco diferentes concentrações (200 a 3,125 µg/mL) foram feitas nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 minutos. As absorvâncias das soluções foram registradas contra um branco (MeOH, grau HPLC) (Figura 12, p. 60).

A percentagem de DPPH remanescente ($DPPH_{REM}$) no meio reacional foi obtida a partir da equação matemática da curva de calibração e dos valores de absorvâncias obtidos após 60 minutos de análise para cada concentração testada, conforme fórmula descrita por Sánchez-Moreno e cols. (1998):

$$\% DPPH_{REM} = \frac{[DPPH]_{T=t}}{[DPPH]_{T=0}} \times 100$$

onde:

$[DPPH]_{T=t}$ = Concentração de radical DPPH no meio após a reação com o extrato.

$[DPPH]_{T=0}$ = Concentração inicial de radical DPPH no meio (40 µg/L ou 100 µmol/L)

Os dados de percentagens de radical DPPH remanescente versus as concentrações testadas (200 a 3,125 $\mu\text{g/mL}$) foram plotados, através do programa Microcal OriginPro 6.0. A quantidade de antirradical necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50% (CI_{50}) foi obtida usando o modelo matemático $Y = a + b.x$.

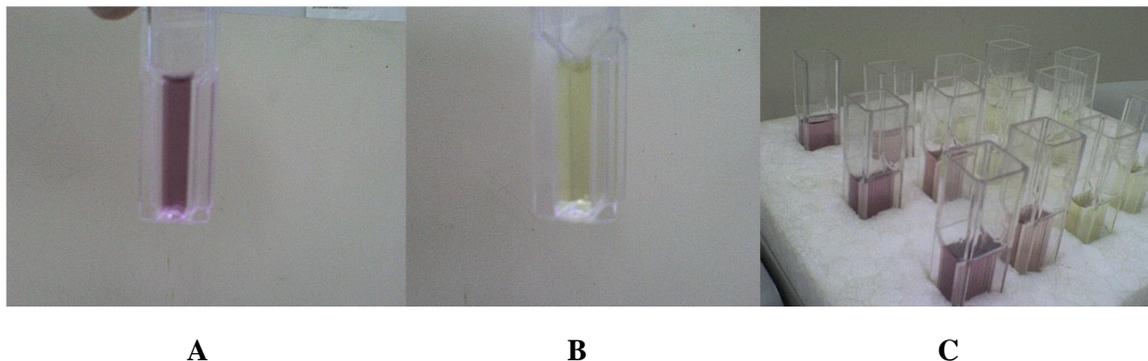


Figura 12. Ilustração dos Ensaio quantitativos. (**A** = Cubeta com DPPH, **B** = DPPH após reação com a amostra, **C** = Cubetas com DPPH e amostra em diferentes concentrações).

❖ *Análise cinética da reação*

A cinética da reação foi analisada utilizando a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ para extratos, padrões e substâncias isoladas como valor de referência para obtenção dos gráficos (DPPH_{REM} x tempo). A duração total de análise foi de 60 minutos com intervalos de 15 min. Os resultados foram comparados com os padrões e classificados em cinética lenta ou rápida (Brand-Williams *et al.*, 1995).

4.7. Determinação do Conteúdo de Fenóis Totais

O conteúdo de fenóis totais nos extratos e frações foi determinado utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu conforme a metodologia descrita por Sousa *et al.*, (2007). Este reagente consiste de uma mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstístico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6^+ porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio

azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras (Sousa *et al.*, 2007).

❖ *Preparação da curva de calibração do ácido gálico (AG)*

Foram utilizados 100 mL de uma solução estoque de ácido gálico, mediante a dissolução de 0,5 g do ácido em 10 mL de MeOH (espectroscópico) e posterior diluição com H₂O destilada. Esta solução foi armazenada sob refrigeração e protegida da luz com papel alumínio. A partir desta solução, foram preparadas em triplicata soluções com concentrações que variam de 0-1000 µg/mL, as quais foram usadas para construção da curva de calibração (Soong & Barlow, 2004). Esta foi construída a partir dos valores médios das adsorbâncias no UV a 765 nm através de regressão linear no programa Microcal OringinPro 6.0.

❖ *Metodologia para determinação do conteúdo de fenóis totais*

Inicialmente, 50 mg de cada amostra (extrato ou fração) foi dissolvido em 5 mL de uma solução MeOH-H₂O 1:1. Em seguida 1 mL desta solução foi diluída em 5 mL da solução MeOH-H₂O 1:1, obtendo-se um concentração de 2 mg/mL. A determinação do teor de fenóis totais presentes nas amostras foram feitas por meio de espectroscopia na região do visível de acordo com o método de Folin-Ciocalteu com algumas modificações (Sousa *et al.*, 2007). De cada amostra foi retirado 35 µL e misturada com 2,76 mL de H₂O destilada e 175 µL do reagente Folin-Ciocalteu 1M. Esta mistura foi agitada e em seguida deixada em repouso por 5 minutos. Após este período, adicionou-se a mistura reacional 525 µL de uma solução aquosa de carbonato de sódio Na₂CO₃ a 15%, a qual foi centrifugada a 10.000 rpm durante 10 minutos e em seguida deixadas sob refrigeração durante 1 hora, posteriormente foi feita, em triplicata a medida da absorbância a 765 nm.

4.8. Avaliação da toxicidade dos extratos com *Artemia salina* (TAS)

Todos os ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais do IQB/UFAL. Para tanto, foram colocados 50 mg dos cistos (ovos) no compartimento fechado do recipiente plástico de 400 mL (15 x 9 x 5 cm) contendo água do mar *in natura* filtrada e mantida sob iluminação artificial (lâmpadas de

9W) por 24 horas e temperatura ambiente para eclosão das larvas. Após esse período, as larvas de primeiro ínstar (náuplios), migram para o outro compartimento aberto devido ao fototropismo positivo, sendo, portanto separadas dos ovos. Estas foram transferidas para placas de Petri (6 cm de diâmetro) contendo água do mar, por mais um dia para alcançar o segundo estágio (metanáuplio), utilizados nos experimentos (Figura 13, p. 62).



A

B

C

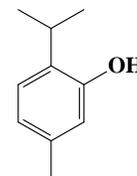
Figura 13. Larvas de *A. salina* (10X) – (A)*: recipiente para eclosão de ovos, náuplios (B) e placas de Petri para cultivo dos metanáuplios (C).

*Fonte: URL: <http://www.acuariolasmercedes.com/artemia-salina>.

Inicialmente, para solução estoque de 5000 $\mu\text{g/mL}$, 10 mg de cada extrato foi dissolvido em 2 mL de solvente adequado ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$), posteriormente, alíquotas de 500, 50, 5 e 1 μL da solução estoque são aplicadas no fundo do tubo de ensaio, em seguida secas em capelas de exaustão. Depois de secos, adiciona-se aos tubos de ensaio 1 mL de água do mar com *A. salina* (10 larvas) e mais 1,5 mL de água do mar, totalizando um volume de 2,5 mL, formando as concentrações de 1000, 100, 10 e 1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Largato *et al.*, 2001). Entretanto, quando necessário foram utilizadas outras concentrações em intervalos menores. Após 24 horas de exposição das larvas, o conteúdo dos tubos foi transferido para uma placa de Petri, para contagem das larvas (vivas e mortas) com auxílio de um microscópio estereoscópico (aumento de 10x). Todas as amostras foram realizadas em triplicata e como controle negativo foi utilizado os próprios solventes utilizados para diluir as amostras (MeOH e CHCl_3) e como controle positivo Timol 0,01% (Cantrell *et al.*, 2003).

Os valores da concentração letal de 50% (CL_{50}) e os intervalos de confiança (IC_{95}) foram calculados usando o método PROBIT analyses (Finney, 1972). O grau de toxicidade das amostras foi determinado tomando como referência os critérios estabelecidos por Déciga-Campos *et al.*, (2007):

- $CL_{50} \geq 1000 \mu\text{g/mL}$ → atóxico
- $CL_{50} \geq 500$ e $< 1000 \mu\text{g/mL}$ → baixa toxicidade
- $CL_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$ → altamente tóxico



Timol

4.9. Isolamento de Alguns dos Constituintes Químicos

Dentre os extratos que foram submetidos à triagem fitoquímica visando a detecção de alcaloides, somente a fração em MeOH-H₂O das partes aéreas forneceu resultados positivo.

4.9.1. Procedimento experimental efetuado com a fração em hexano das partes aéreas

A fração em hexano (6,105 g), oriunda da partição do extrato em EtOH das partes aéreas, em virtude dos resultados apresentados nos ensaios larvicidas, foi fracionada em gel de sílica com misturas de solventes (hexano; Hex-AcOEt 9:1; 7:3; 1:1; AcOEt e MeOH). A fração Hex-AcOEt 9:1 (1,868 g) foi permeada em gel de sílica (230-400 mesh), utilizando-se como eluentes misturas de hexano-AcOEt em proporções crescentes de polaridade, após monitoramento em CCD em diferentes sistemas de eluentes foram agrupadas, resultando na subfração 37-40 (0,146 g) que foi novamente fracionada em gel de sílica (230-400 mesh), o que resultou fração 26 (0,016 g) que apresentou um aspecto oleoso amarelado, que através de análise em CCD foi observado uma única mancha após revelação em luz UV, vapores de iodo e sulfato cérico com coloração rosa claro indicando a possível presença de terpenos sendo esta codificada de **SvPH-1**.

4.9.2. Procedimento experimental efetuado com a fração em CHCl₃ das partes aéreas

O extrato em CHCl₃ (6,54 g), oriundo da partição do extrato em etanol, foi submetido a fracionamento cromatográfico em gel de sílica 60 (230-400 mesh), utilizando-se como eluentes misturas de CHCl₃-MeOH em proporções crescentes de polaridade. As subfrações resultantes (137 coletadas com aproximadamente 10 mL cada) foram agrupadas de acordo com a semelhança de seus R_f após análise através de CCD.

O material das subfrações reunidas 19-31 (0,16 g) foi submetido a sucessivas lavagens a frio com acetona e acetato de etila fornecendo um sólido amorfo branco. A revelação com vapores de iodo e sulfato cérico mostrou apenas uma mancha, o qual foi codificado de **SvPC-1** (0,024 g). Já as subfrações 32-46 (0,300 g) foram submetidas a permeação em gel de Sephadex

LH-20 resultou em dois sólidos amorfos esbranquiçados 22-23 (0,034 g) e 30-32 (0,021 g) que através de análise em CCD foi observado uma única mancha após revelação em luz UV, vapores de iodo, codificados de **SvPC-2** e **SvPC-3**, respectivamente.

O material das subfrações reunidas (54-93 → 0,32 g) mostrou-se constituído por um material esbranquiçado encoberto por impurezas de coloração verde escuro. Este material após sucessivas lavagens a frio com acetona forneceu um sólido amorfo branco (0,190 g), que através de análise em CCD foi observado uma única mancha após revelação em luz UV, vapores de iodo e sulfato cérico com coloração rosa claro indicando a possível presença de terpenos sendo esta codificada de **SvPC-4**. Os sobrenadantes oriundos deste procedimento foram novamente comparados através de CCD, utilizando-se diferentes sistemas de eluição e àqueles com Rf semelhantes foram reagrupados.

4.9.3. Procedimento experimental efetuado com a fração em AcOEt das partes aéreas

A fração em AcOEt (1,61 g), oriunda da partição do extrato em EtOH das partes aéreas de *S. verticillata*, em virtude dos resultados apresentados nos ensaios antirradicais, foi fracionada em Sephadex LH-20 com MeOH. As subfrações resultantes (121 coletadas com aproximadamente 10 mL cada), após monitoramento em CCD em diferentes sistemas de eluentes foram agrupadas (Quadro 2, p. 64).

Quadro 2. Fracionamento cromatográfico do extrato em AcOEt das partes aéreas.

Grupos	Frações Reunidas	Massa (g)	Substâncias isoladas
I	1-40	0,707	-
II	41-50	0,307	-
III	51-62	0,029	-
IV	63-76	0,134	SvPA-1 (0,014 g) SvPA-2 (0,010 g)
V	77-80	0,007	-
VI	81-88	0,008	-
VII	89-97	0,007	-
VIII	98-100	0,013	SvPA-3 (0,013 g)
IX	101-121	0,145	-

❖ *Grupo IV*

Os materiais provenientes das subfrações reunidas do grupo IV (63-76 → 0,134 g) foram submetidos a permeação em gel em Sephadex LH-20 eluída com MeOH e em seguida a cromatografia em coluna de gel de sílica 60 (230-400 mesh, com misturas de CHCl₃-MeOH em proporções crescentes de polaridade). Após análise comparativa através de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando diferentes sistemas de eluentes, as subfrações foram agrupadas de acordo com a semelhança de seus fatores de retenção (R_fs). O material das subfrações 97-114 (0,078 g), foi novamente permeado em Sephadex LH-20 (MeOH), resultando em um sólido amorfo amarelado (0,014 g), o qual através de análise em CCD apresentou uma única mancha após revelação com vapores de iodo e foi codificado de **SvPA-1**. O material das subfrações reunidas 123-128 (0,010 g) apresentou através de análise em CCD uma única mancha após revelação com vapores de iodo e foi codificado de **SvPA-2**.

❖ *Grupo VIII*

O material das subfrações reunidas do grupo VIII (98-100 → 0,013 g), resultou em um sólido amorfo amarelado, que após análise comparativa através de CCD em diferentes sistemas de eluentes foi observado uma única mancha após revelação em luz ultravioleta e vapores de iodo, o qual foi codificado de **SvPA-3** (0,013 g).

4.9.4 Procedimento experimental efetuado com a fração em MeOH-H₂O das partes aéreas

A fração em MeOH-H₂O das partes aéreas (10,587 g), oriunda do extrato em etanol, devido aos resultados obtidos na triagem fitoquímica efetuada para detecção de alcalóides, foi submetida a marcha química visando a extração de alcalóides totais, segundo a metodologia descrita por Baldé e cols. (1991). Para tanto, esta fração foi agitada em 100 mL de uma solução aquosa de ácido tartárico a 2% e extraída com AcOEt e *n*-butanol. A solução aquosa foi alcalinizada com solução de Na₂CO₃ a 20% até pH 9 e em seguida extraída novamente com AcOEt e *n*-butanol. As frações orgânicas foram concentradas e submetidas a ensaios com os reagentes de Bouchardat, Dragendorff e Mayer. Ao final do procedimento, os reagentes não revelaram reação positiva para alcalóides em nenhuma das frações obtidas. Por este motivo, esses extratos não foram fracionados.

4.9.5 Procedimento experimental efetuado com a fração em hexano do caule

A fração em hexano (4,33 g), oriunda da partição do extrato em EtOH do caule, em virtude dos resultados apresentados nos ensaios larvicidas, foi submetida a fracionamento cromatográfico em gel de sílica 60 (230-400 mesh), utilizando-se como eluentes misturas de hexano-AcOEt em proporções crescentes de polaridade. As subfrações resultantes (540 coletadas com aproximadamente 5 mL cada, secas em capela de exaustão) foram agrupadas de acordo com a semelhança de seus Rf após análise através de CCD. O material das subfrações reunidas 233-237 (0,032 g) mostrou-se constituído por um material esbranquiçado encoberto por um outro de coloração verde escuro. Este material após sucessivas lavagens a frio com acetona forneceu um sólido amorfo laranja, codificada de **SvCH-1** (0,190 g), que através de análise em CCD foi observado uma única mancha após revelação em luz UV, vapores de iodo e sulfato cérico com coloração rosa claro sugerindo a presença de terpenos.

4.9.6 Procedimento experimental efetuado com a fração em CHCl₃ do caule

A fração em CHCl₃ (4,014 g), oriunda da partição do extrato em EtOH do caule foi fracionado em gel de sílica 60 (230-400 mesh), utilizando-se como eluentes misturas de CHCl₃-AcOEt em proporções crescentes de polaridade. As subfrações resultantes (159 coletadas com aproximadamente 125 mL cada) foram agrupadas de acordo com a semelhança de seus Rf após análise através de CCD. O material da subfração reunida 34-36 (0,011 g) apresentou através de análise em CCD uma única mancha após revelação com vapores de iodo e/ou UV, esta foi codificada de **SvCC-1**. Entretanto o material da subfração, 58-62 (0,032 g) foi submetido a permeação em gel com Sephadex LH-20 eluída com MeOH. As subfrações resultantes (14 coletadas) foram agrupadas de acordo com a semelhança de seus Rf em análise através de CCD. O material da subfração 10 (0,025 g) mostrou-se constituído por um material avermelhado e apresentou através de análise em CCD uma única mancha após revelação com vapores de iodo e/ou UV, esta foi codificada de **SvCC-2**.

4.9.7 Procedimento experimental efetuado com a fração em AcOEt do caule

A fração em AcOEt (3,11 g), oriunda da partição do extrato em EtOH do caule, foi submetido a fracionamento cromatográfico em gel de sílica com misturas de solventes com gradiente de polaridade entre AcOEt-MeOH, resultando em 137 frações, com um volume

médio de aproximadamente 125 mL cada. Após análise comparativa através de CCD foram agrupadas de acordo com a semelhança de seus Rfs. As subfrações 5 (0,046 g) e 6 (0,059 g) foram separadamente permeadas em Sephadex LH-20 utilizando-se como eluente MeOH, após monitoramento em CCD foram agrupadas de acordo com os Rf, resultando nas subfrações reunidas 3-4 (0,008 g), de aspecto oleoso amarelado, e 8-10 (0,011 g) um sólido marrom, que através de análise em CCD foram observados como únicas manchas após revelação em luz UV, vapores de iodo. Estas foram codificadas de **SvCA-1** e **SvCA-2** respectivamente.

4.9.8 Procedimento experimental efetuado com a fração em hexano das raízes

Tendo em vista o resultado obtido no ensaio larvicida, a fração em hexano (1,517 g), oriunda da partição do extrato em EtOH das raízes, foi cromatografada em gel de sílica 60 (230-400 mesh), utilizando-se misturas de hexano-AcOEt como eluentes em proporções crescentes de polaridade. As subfrações resultantes (63 coletadas com aproximadamente 75 mL cada) foram agrupadas de acordo com a semelhança de seus Rf, após análise através de CCD. O material da subfração reunida 9-11 (0,069 g) foi submetido a cromatografia em camada delgada preparativa (gel de sílica P/UV₂₅₄ com CaSO₄), usando como eluente uma mistura de hexano-AcOEt (9:1). Após análise em CCD foi observado uma única mancha quando revelado em luz UV e vapores de iodo, sendo esta codificada de **SvRH-1** (0,030 g).

5. Resultados e Discussão

5. Resultados e Discussão

5.1. Resultados Obtidos nos Ensaio Larvicidas

Os resultados obtidos nos ensaios preliminares, na concentração de 250 ppm, frente larvas do 4º estágio do *A. aegypti*, durante 24 e 48 horas de experimento estão apresentados no Quadro 3 (p. 70). Dentre os extratos que foram avaliados, após 48 horas de exposição das larvas, resultados mais promissores foram obtidos com as frações em **hexano** do caule (CL₅₀ 115,87 ppm; IC₉₅ 93,81-136,97 ppm) e das raízes (CL₅₀ 91,82 ppm; IC₉₅ 72,80-108,85 ppm)] e **hexano** (CL₅₀ 83,789 ppm; IC₉₅ 67,77-98,14 ppm) e **hexano-AcOEt 9:1** (CL₅₀ 209,01 ppm; IC₉₅ 194,75-226,16 ppm) das partes aéreas, cuja CL₅₀ foi determinada utilizando o programa POLO como mostrado nos gráficos da Figura 14, p. 71. Por outro lado, somente a fração em **hexano** proveniente das partes aéreas foi considerada fracamente promissora (33,33%, mortalidade entre 25 e 50%). As demais frações foram consideradas inativas (mortalidade inferior a 25 %). A inexistência de mortalidade em todos os grupos controle indica que o DMSO utilizado para diluir o extrato, não afetou o desenvolvimento larval.

Segundo Pohlit e cols. (2004), estes resultados podem ser considerados promissores uma vez que durante um período de 24 horas de exposição, na concentração de 500 µg/mL, frente larvas do 3º estágio do *A. aegypti*, extratos que exibiram 100% de mortalidade foram considerados ativos. Entretanto Rodrigues *et al.*, (2005), considerou bastante ativo o lapachol isolado de *Cybistax antisiphilitica* que apresentou CL₅₀ 26,3 µg/mL para larvas do 3º estágio.

Deste modo, considerando que larvas no 4º estágio são mais resistentes do que as utilizadas neste ensaio e que o lapachol é um composto puro e que os extratos testados possuem uma mistura de compostos em pequena quantidade, os resultados aqui obtidos podem ser considerados ativos como larvicidas.

Quadro 3. Resultados preliminares obtidos nos ensaios larvicidas.

Partes da planta	Frações de partição	Subfrações	(%) de mortalidade (48 h)
Caule	CHCl ₃	-	17,77
	Hexano	-	100
	MeOH-H ₂ O	-	0,0
	AcOEt	-	0,0
	CHCl ₃	-	0,0
	AcOEt	-	2,22
	MeOH-H ₂ O	-	0,0
Partes aéreas		-	33,33
		Hexano	88,88
		Hexano-AcOEt (9:1)	91,11
	Hexano	Hexano-AcOEt (7:3)	0,0
		Hexano-AcOEt (1:1)	2,22
		AcOEt	0,0
		MeOH	0,0
Raízes	EtOH	Hexano	91,11

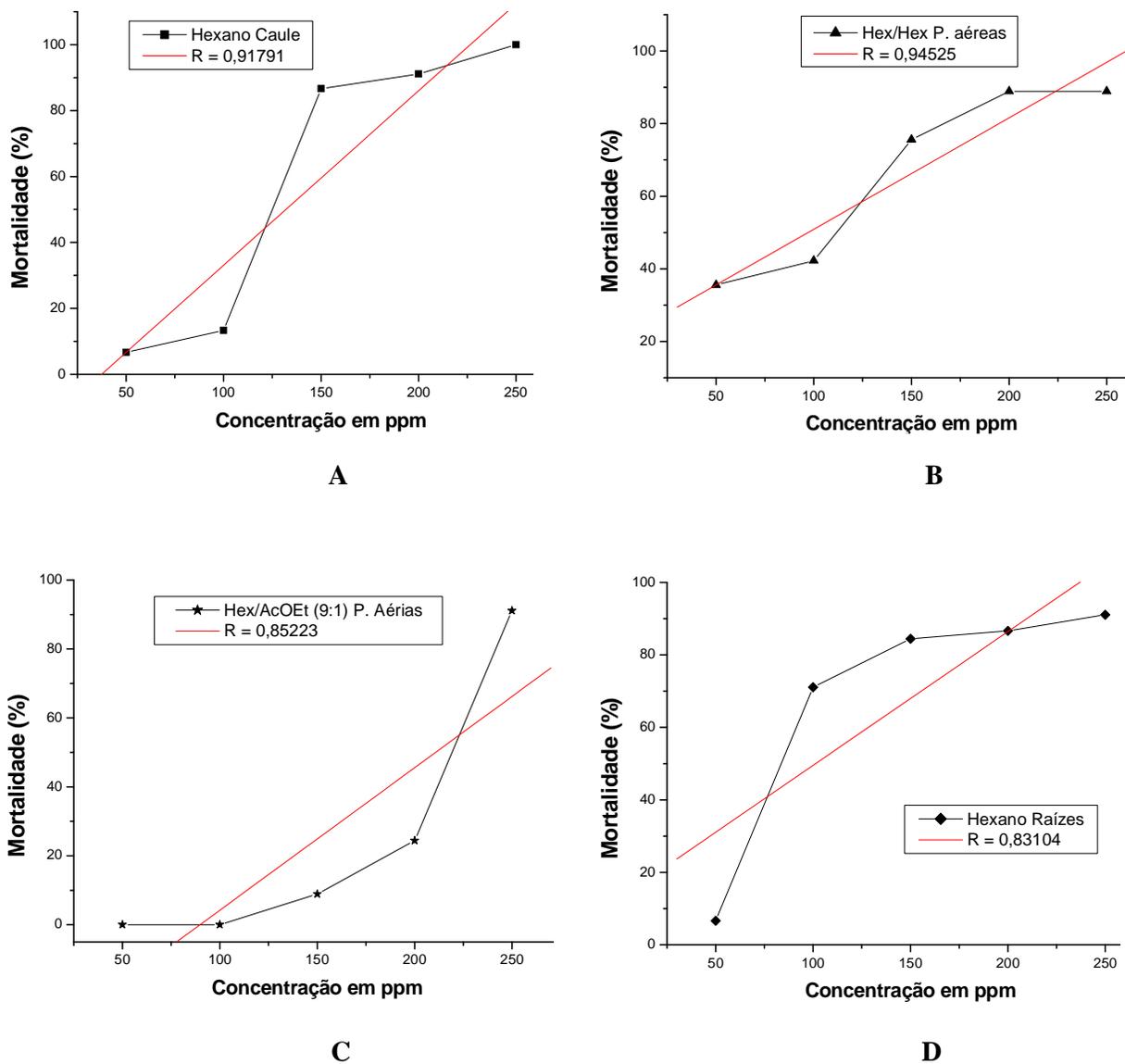


Figura 14. Gráficos ilustrando a concentração *versus* percentual de mortalidade dos extratos em hexano do caule (A), Hexano (hexano) (B) e Hexano-AcOEt 9:1 das partes aéreas (C) e hexano das raízes (D) de *S. verticillata*.

5.2. Resultados da Avaliação da Capacidade Sequestradora de Radicais Livres

5.2.1. Avaliação Qualitativa da Capacidade Sequestradora de Radicais Livres

Dentre os extratos que foram submetidos a ensaios qualitativos frente ao radical sintético DPPH (Quadro 1, p. 58), uma possível atividade foi sugerida somente para os extratos brutos

em EtOH das partes aéreas e das raízes e frações em hexano (hexano) e AcOEt das partes aéreas e AcOEt das raízes e para as substâncias codificadas de **SvPA-1** e **SvPA-3**. Deste modo, somente estes extratos e compostos isolados foram submetidos à quantificação visando à confirmação da atividade.

5.2.2. Avaliação Quantitativa da Capacidade Sequestradora de Radicais Livres

O radical sintético DPPH é muito utilizado para investigar atividade sequestradora de radicais livres de muitos compostos fenólicos presentes em extratos vegetais. Nestes ensaios, os valores da CI_{50} são inversamente relacionados à atividade e esta aumenta com a diminuição do DPPH remanescente no meio reacional. Dentre as amostras que forneceram resultados positivos frente ao DPPH nos ensaios qualitativos, o extrato bruto em **EtOH** (CI_{50} $169,05 \pm 0,33 \mu\text{g/mL}$) das raízes, fração em **AcOEt** (CI_{50} $80,74 \pm 3,81 \mu\text{g/mL}$) das partes aéreas e as substâncias codificadas de **SvPA-3** (CI_{50} $94,325 \pm 1,82 \mu\text{g/mL}$) e **SvPA-1** (CI_{50} $22,89 \pm 1,41 \mu\text{g/mL}$), quando comparados com os padrões utilizados [ácido gálico (CI_{50} $20,53 \pm 1,34 \mu\text{g/mL}$) e BHT (CI_{50} $97,86 \pm 2,52 \mu\text{g/mL}$)], foram consideradas promissoras e de cinética lenta (Figura 15, p. 72). Por outro lado, os extratos em EtOH e as frações em hexano (hexano) das partes aéreas e AcOEt das raízes forneceram valores de CI_{50} superior a $200 \mu\text{g/mL}$, sendo, portanto, considerado fracamente ativo ou inativo.

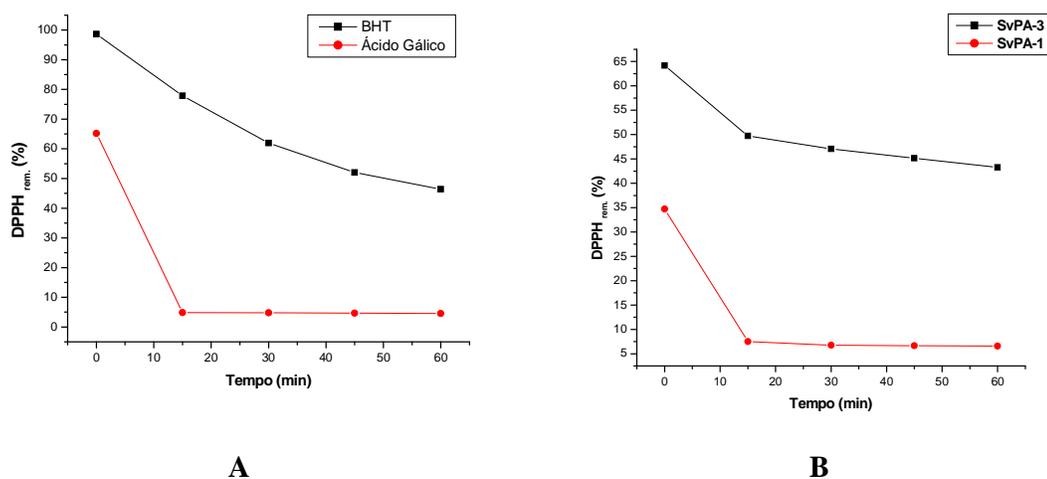


Figura 15. Gráfico da cinética para os padrões (A) e substâncias isoladas (B).

5.3. Resultados Obtidos na determinação do teor de Fenóis Totais

Em relação à determinação do teor de fenóis totais (FT), os dados de absorvância das soluções de ácido gálico (0 a 1000 µg/mL) foram plotados no programa Microcal OringinPro 6.0, originando a curva de calibração, $Y = 0,06295 + 0,0019x$, com coeficiente de correlação ($R = 0,998$) e desvio padrão ($DP = 0,02$) através da análise de regressão linear. A partir desta equação foi possível determinar as concentrações do teor de fenóis totais em cada amostra testada. Os resultados obtidos neste ensaio foram expressos como equivalente em mg de ácido gálico (EAG) por grama de amostra. Os melhores resultados foram obtidos com as frações em $CHCl_3$ ($218,39 \pm 0,008$ mg/g) e AcOEt ($258,76 \pm 0,017$ mg/g) do caule e em AcOEt ($315,64 \pm 0,015$ mg/g) das partes aéreas. Este último foi o único que mostrou correlação com a atividade antioxidante com DPPH.

5.4. Resultados dos Ensaio da Toxicidade Frente à *Artemia salina*

O teste de toxicidade frente à *Artemia salina* (TAS) é considerado simples, eficiente, de baixo custo, além de ser empregado como método de triagem para identificação de produtos bioativos. Este também pode ser considerado como um indicador para a condução de experimentos clínicos (Parra *et al.*, 2001). Os resultados dos ensaios para determinação da toxicidade são mostrados na Tabela 2 (p. 74). Dentre as 20 amostras testadas, 17 delas (85%) foram consideradas atóxicas ($CL_{50} > 1000$ µg/mL) e três (15%) foram tóxicas, com CL_{50} entre 199,81 a 486,68 µg/mL.

Os resultados para as frações em hexano do caule, hexano (hexano) e hexano-AcOEt 9:1 (Partes Aéreas) e em hexano das raízes eram esperados alto grau de toxicidade devido aos bons resultados nos ensaios frente ao *A. aegypti*. Entretanto, estas frações não apresentaram toxicidade, que é indispensável para uso seguro de compostos bioativos, livres de efeitos adversos, o que favorece o seu uso como inseticida, mostrando seletividade ao mosquito.

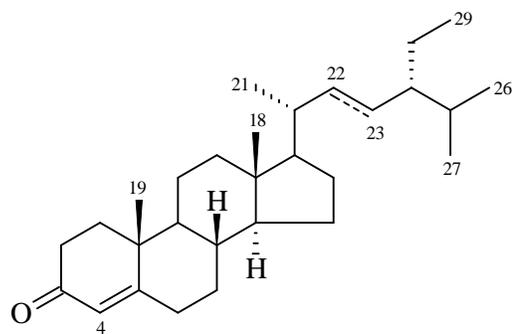
Tabela 2. Resultados dos ensaios de toxicidade (TAS) com os extratos e frações.

Partes da planta	Frações	Mortalidade (%)^a	CL₅₀ (µg/mL)	IC₉₅ (µg/mL)	Grau de toxicidade
Partes aéreas (EtOH)					
	-	20,0	>1000	0,0	Atóxico
	Hexano	26,6	>1000	0,0	Atóxico
	CHCl ₃	33,3	>1000	0,0	Atóxico
	AcOEt	43,3	>1000	0,0	Atóxico
	MeOH	10,0	>1000	0,0	Atóxico
	Hexano (Hexano)	0,0	0,0	0,0	Atóxico
	Hexano-AcOEt (9:1)	0,0	0,0	0,0	Atóxico
	Hexano-AcOEt (7:3)	75,0	286,2	229-350	Alto
	Hexano-AcOEt (1:1)	56,6	486,6	141-683	Alto
	AcOEt (Hexano)	76,6	199,8	97-278	Alto
	MeOH (Hexano)	16,6	>1000	0,0	Atóxico
Caule (EtOH)					
	-	30,0	>1000	0,0	Atóxico
	Hexano	10,0	>1000	0,0	Atóxico
	CHCl ₃	20,0	>1000	0,0	Atóxico
	AcOEt	40,0	>1000	0,0	Atóxico
	MeOH	16,6	>1000	0,0	Atóxico
Raízes (EtOH)					
	AcOEt	13,3	>1000	0,0	Atóxico
	Hexano	13,3	>1000	0,0	Atóxico
Folhas (EtOH)					
(Acetona)	AcOEt-MeOH (1:1)	10,0	>1000	0,0	Atóxico
MeOH	Controle negativo	0,0	0,0	0,0	Atóxico
CHCl ₃	Controle negativo	0,0	0,0	0,0	Atóxico
Timol 1%	Controle positivo	100	-	-	Alto

^a Os valores correspondem às médias em triplicata da concentração de 1000 µg/mL.

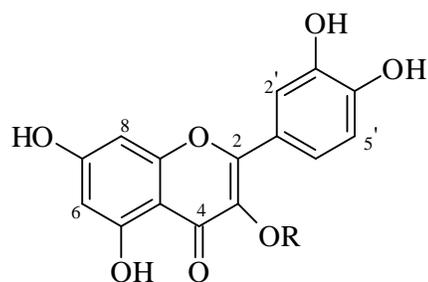
5.5. Resultados do Estudo Fitoquímico

O estudo fitoquímico efetuado com alguns dos extratos que apresentaram resultados promissores nos ensaios efetuados resultou no isolamento de nove substâncias. Essas substâncias foram codificadas de acordo com o nome da espécie [*S. verticillata* (**Sv**)], parte da planta (**P** = partes aéreas, **R** = raízes e **C** = caule) e dos extratos dos quais foram isoladas (**A** = AcOEt, **C** = clorofórmio, **H** = hexano). Todos os compostos isolados tiveram suas estruturas identificadas com base na análise dos espectros de RMN ^1H e de ^{13}C , incluindo DEPT 135 e técnicas bidimensionais, tais como HSQC ou HMQC e HMBC, bem como comparação com dados dos compostos correspondentes descritos na literatura.



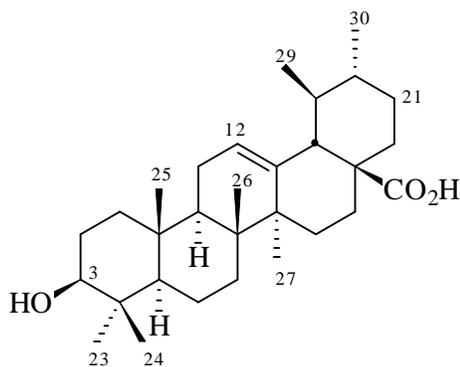
SvRH-1a Δ^{22} diidro

SvRH-1b Δ^{22}

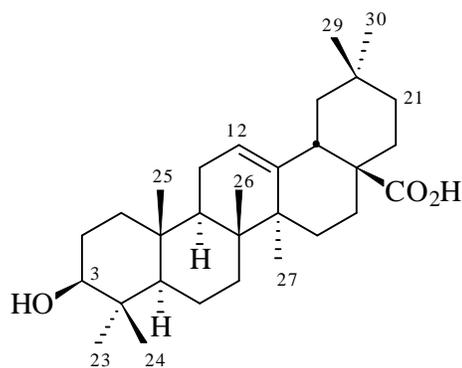


SvPA-3 R = H

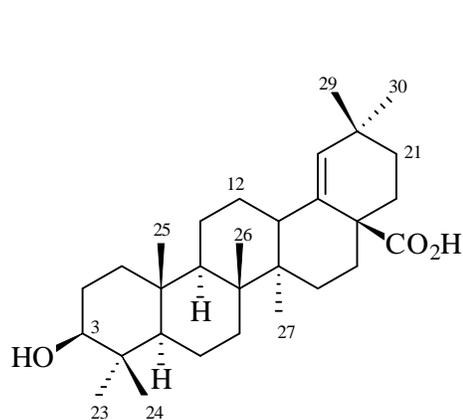
SvPA-1 R = α -L-Rha



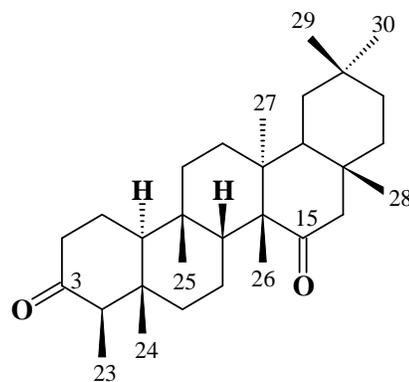
SvPC-4



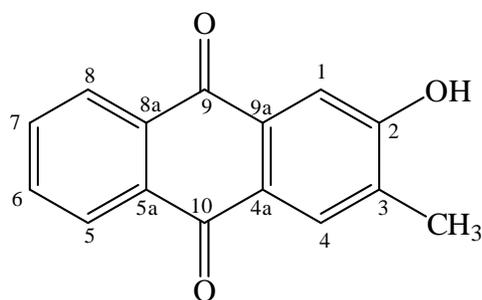
SvPC-3



SvPC-1



SvCH-1



SvCC-2

5.5.1. Identificação Estrutural das Substâncias Codificadas de SvPC-1, SvPC-3 e SvPC-4

As substâncias codificadas de **SvPC-4**, **SvPC-3** e **SvPC-1** foram identificadas como sendo, respectivamente, triterpenos pentacíclicos das séries urs-12-eno, olean-12-eno e olean-18-eno com base na análise dos dados obtidos dos respectivos espectros de RMN¹H (Figuras 16-18, pp. 82-84), RMN-¹³C, incluindo DEPT 135 (Figuras 19-24, pp. 85-89), bem como pela comparação com dados descritos na literatura.

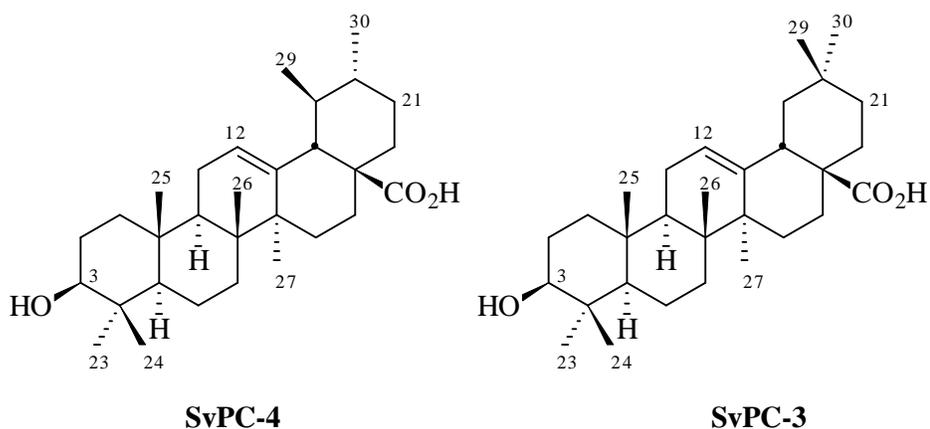
Os dados obtidos dos espectros de RMN-¹H a 400 MHz (Tabelas 3-5, pp. 79-81) permitiram identificar sinais, cujos valores de deslocamentos químicos estão condizentes com a presença de hidrogênios de ligação dupla [**SvPC-4**: δ 5,24 (m); **SvPC-3**: δ 5,27 (sl) e **SvPC-1**: δ 5,12 (sl)], hidrogênio carbinólico [**SvPC-4**: δ 3,38 (*dd*, $J = 10$ e 6 Hz); **SvPC-3**: δ 3,20 (*dd*, $J = 8,4$ e 7,6 Hz) e **SvPC-1**: δ 3,37 (m)] e vários sinais simples para hidrogênios de grupos metílicos (**SvPC-4**: δ 0,77 a 1,22; **SvPC-3**: δ 0,97 a δ 1,21 e **SvPC-1**: δ 0,75 a δ 0,99).

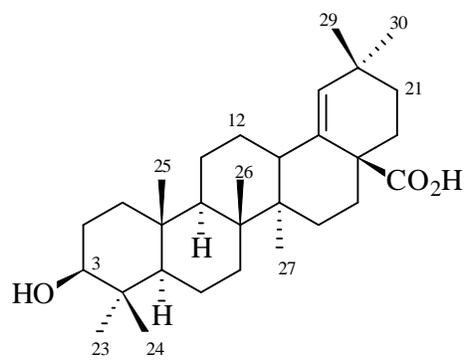
A análise conjunta dos dados obtidos dos espectros de RMN¹³C e DEPT 135 permitiu reconhecer para cada um dos três compostos, a natureza de sinais correspondentes a trinta átomos de carbonos (Tabelas 3-5, pp. 79-81). Dentre esses sinais, sete são não hidrogenados,

sete são monoidrogenados, nove são diidrogenados e sete são triidrogenados. Dentre esses carbonos atenção especial foi dada aos sinais cujos valores de deslocamento químico são característicos de duplas ligações [**SvPC-4**: δ 125,84 (CH) e δ 138,53 (C); **SvPC-3**: δ 122,38 (CH) e 143,97 (C) e **SvPC-1**: δ 137,48 (C) e 132,60 (CH)], uma vez que a natureza e os valores de deslocamento químico destes carbonos definem o tipo estrutural do esqueleto em triterpenos pentacíclicos (Mahatu & Kundu, 1994). Adicionalmente, foram observados sinais para um carbono carbinólico [**SvPC-4**: δ 78,99 (CH); **SvPC-3**: δ 78,93 (CH) e **SvPC-1**: δ 77,48 (CH)] e para um carbono carboxílico [**SvPC-4**: δ 180,97 (C); **SvPC-3**: δ 181,13 (C) e **SvPC-1**: δ 179,72 (C)].

A análise conjunta dos dados espectrais obtidos e comparação com os valores de deslocamentos químicos descritos na literatura (Connolly & Hill, 1991; Mahatu & Kundu, 1994; Jungues *et al.*, 2000; Pu Zhang *et al.*, 2009) permitiram propor para **SvPC-4**, **SvPC-3** e **SvPC-1** estruturas dos triterpenos pentacíclicos conhecidos como Ácidos ursólico, oleanólico e morólico, respectivamente.

O ácido ursólico foi descrito anteriormente em outras espécies do gênero *Borreria* [*B. stricta* (Sharma & Gupta, 1987), *B. articularis* (Mukherjee *et al.*, 1994) e *B. hispida* (Kapoor *et al.*, 1969)]. Este ácido é descrito na literatura como anti-inflamatório, hepatoprotetor, antihiperlipidêmico, antitumoral e bactericida (Harbone & Baxter, 1993). Por outro lado, os ácidos oleanólico e morólico estão sendo relatados pela primeira vez neste gênero. O ácido oleanólico é descrito como inseticida, diurético e anti-HIV (Kowalski, 2007), enquanto que o ácido morólico como citotóxico, anti-HIV, anti-HSV e anti-inflamatório (Pu Zhang *et al.*, 2009).





SvPC-1

Tabela 3. Dados de RMN (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, δ , Hz) da substância **SvPC-4** e comparação com dados do *Ácido ursólico* (Connolly & Hill, 1991; Mahato&Kundu, 1994).

Posição	SvPC-4		<i>Ácido ursólico</i>	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C				
4	39,01		39,8	
8	39,06		40,3	
10	37,22		37,7	
13	138,53		139,7	
14	42,37		42,9	
17	46,49		48,4	
28	180,97		180,3	
CH				
3	78,99	3,20 (<i>dd</i> , $J = 10; 6$)	78,5	3,21 <i>dd</i>
5	55,62		56,2	
9	48,12		48,4	
12	125,84	5,24 m	126,0	5,24 m
18	53,20		53,9	
19	39,42		39,9	
20	39,29		39,8	
CH₂				
1	39,04		39,4	
2	26,99		28,5	
6	18,61		19,2	
7	33,37		33,9	
11	23,55		24,0	
15	28,31		29,1	
16	24,51		25,3	
21	30,96		31,1	
22	37,15		37,8	
CH₃				
23	28,22	0,96 s	29,2	0,92 s
24	15,59	0,77 s	16,0	0,75 s
25	15,84	0,82 s	16,9	0,78 s
26	17,24	1,10 s	17,9	0,99 s
27	23,77	1,25	24,3	1,08 s
29	17,11	0,87 (<i>d</i> , $J = 6,4$)	17,8	0,86 d
30	21,27	0,95 (<i>d</i> , $J = 7,8$)	21,8	0,94 d

Tabela 4. Dados de RMN (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, δ , Hz) da substância **SvPC-3** e comparação com dados do *Ácido oleanólico* (Mahato & Kundu, 1994; Jungues *et al.*, 2000).

Posição	SvPC-3		<i>Ácido oleanólico</i>	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C				
4	38,78		38,7	
8	39,10		39,3	
10	37,07		37,0	
13	143,97		143,4	
14	41,80		41,6	
17	46,49		46,6	
20	30,76		30,6	
28	181,13		181,0	
CH				
3	78,93	3,20 (<i>dd</i> , $J = 8,4$ e $7,6$)	78,7	3,45 (<i>dd</i> , $J = 5,5$ e $10,0$)
5	55,32		55,2	
9	47,70		47,6	
12	122,38	5,27 <i>sl</i>	122,1	5,48 <i>sl</i>
18	41,29		41,3	
CH₂				
1	38,55		38,5	
2	26,85		27,4	
6	18,41		18,3	
7	32,63		32,6	
11	23,10		23,1	
15	27,74		27,7	
16	23,47		23,4	
19	46,05		45,8	
21	33,14		33,8	
22	32,62		32,3	
CH₃				
23	28,07	0,92	28,1	0,95 <i>s</i>
24	15,63	0,88	15,6	0,87 <i>s</i>
25	15,34	0,97	15,3	1,01 <i>s</i>
26	16,88	1,08	16,8	1,04 <i>s</i>
27	25,94	1,25	26,0	1,21 <i>s</i>
29	32,80	0,97	33,1	1,01 <i>s</i>
30	23,60	1,08	23,6	1,04 <i>s</i>

Tabela 5. Dados de RMN (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3 , δ , Hz) da substância **SvPC-1** e comparação com dados do *Ácido morólico* (Pu Zhang et al., 2009; Mahato & Kundu, 1994).

<i>Posição</i>	SvPC-1		<i>Ácido morólico</i>	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C				
4	38,92		38,8	
8	40,73		40,6	
10	37,27		37,1	
14	42,66		42,5	
17	48,05		48,1	
18	137,48		136,9	
20	32,13		32,0	
28	179,72		181,0	
CH				
3	78,90	3,37 t	78,3	3,20 (<i>dd</i> , $J = 5,4; 10,9$)
5	55,62		55,4	
9	51,28		51,11	
13	41,39		41,2	
19	132,60	5,12 s	132,3	5,16 s
CH₂				
1	39,06		38,8	
2	27,09		27,3	
6	18,31		18,2	
7	34,65		34,5	
11	21,04		20,9	
12	26,09		25,9	
15	29,53		29,3	
16	34,65		33,5	
21	33,60		33,5	
22	33,71		33,5	
CH₃				
23	27,93	0,96 s	27,9	0,86 s
24	16,60	0,77 s	16,6	0,78 s
25	15,46	0,82 s	15,4	0,76 s
26	15,99	0,98 s	15,9	0,98 s
27	15,01	0,99 s	14,9	1,00 s
29	30,37	0,95 s	30,3	0,97 s
30	29,18	0,96 s	29,1	0,97 s

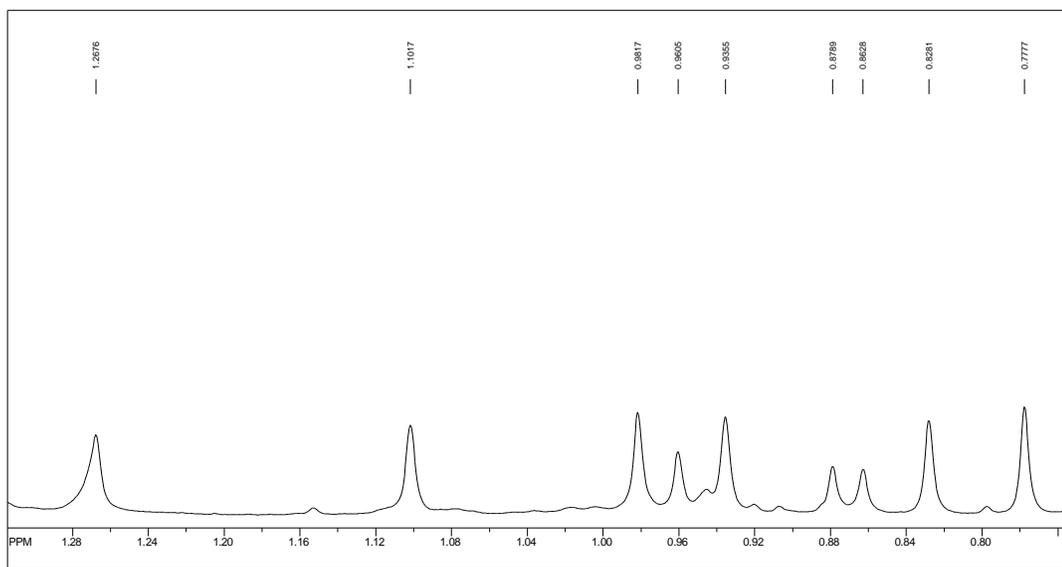
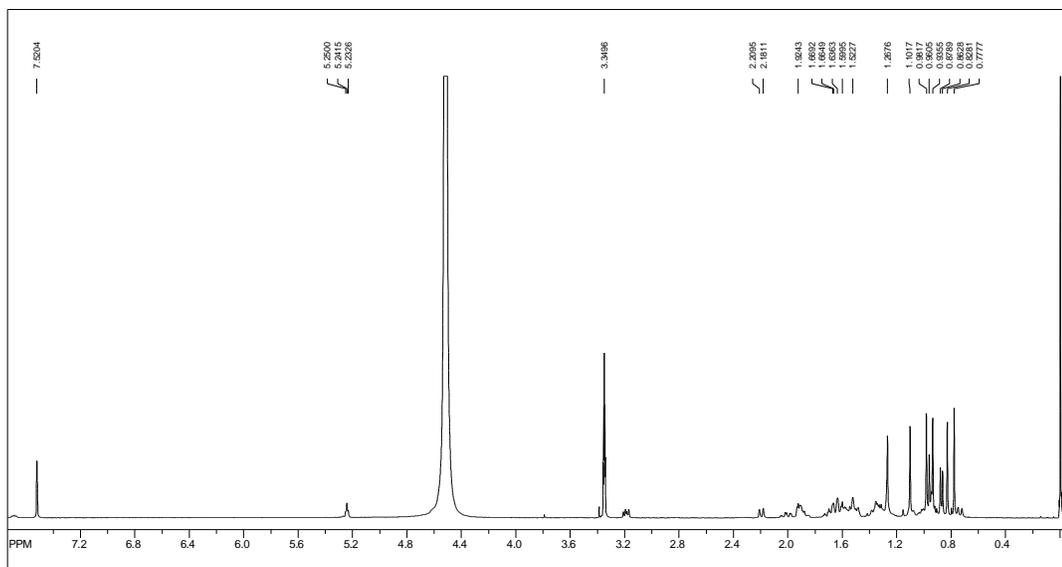


Figura 16. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃/CD₃OD) da substância SvPC-4.

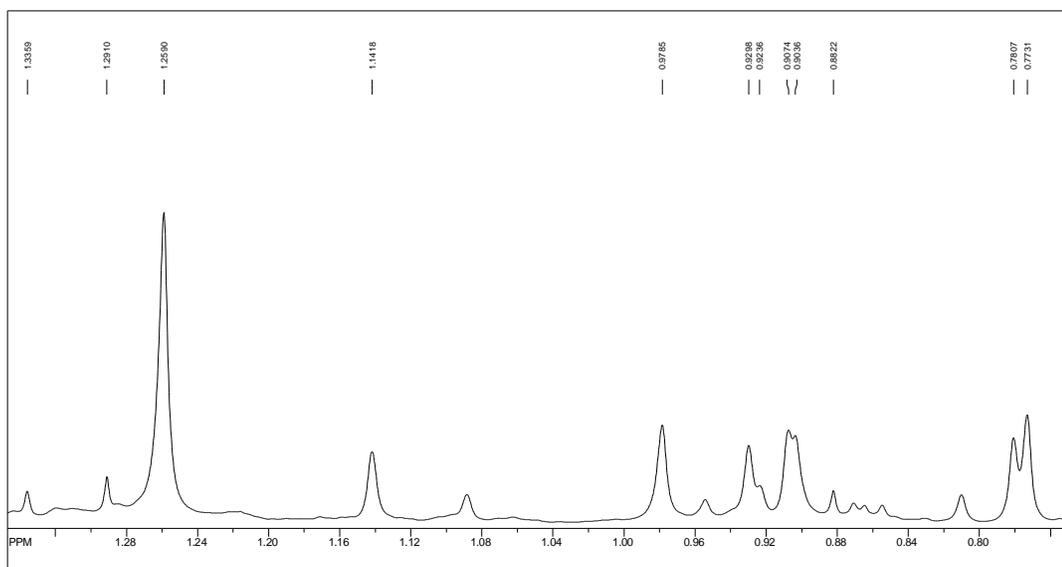
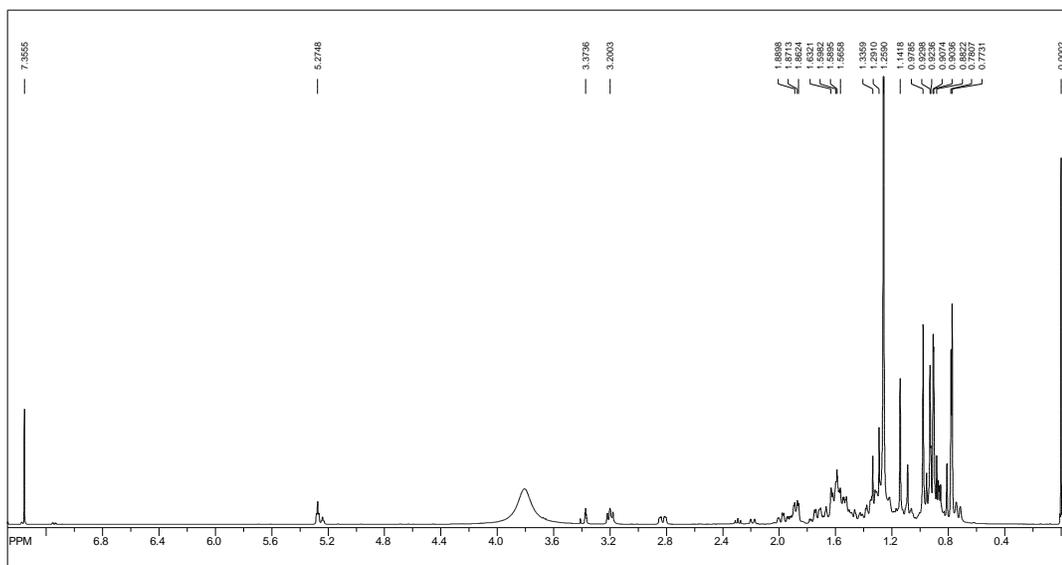


Figura 17. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância SvPC-3.

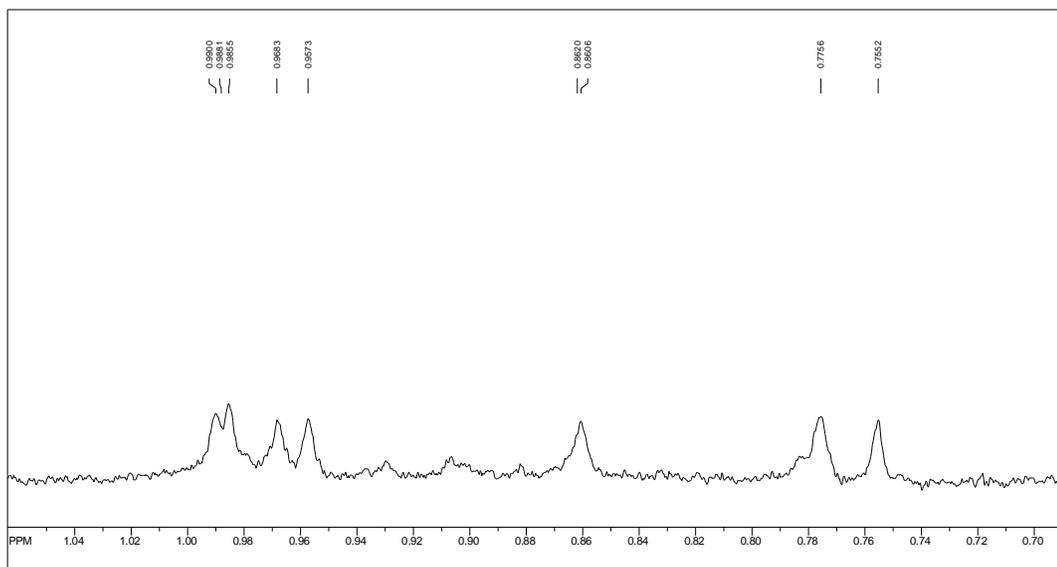
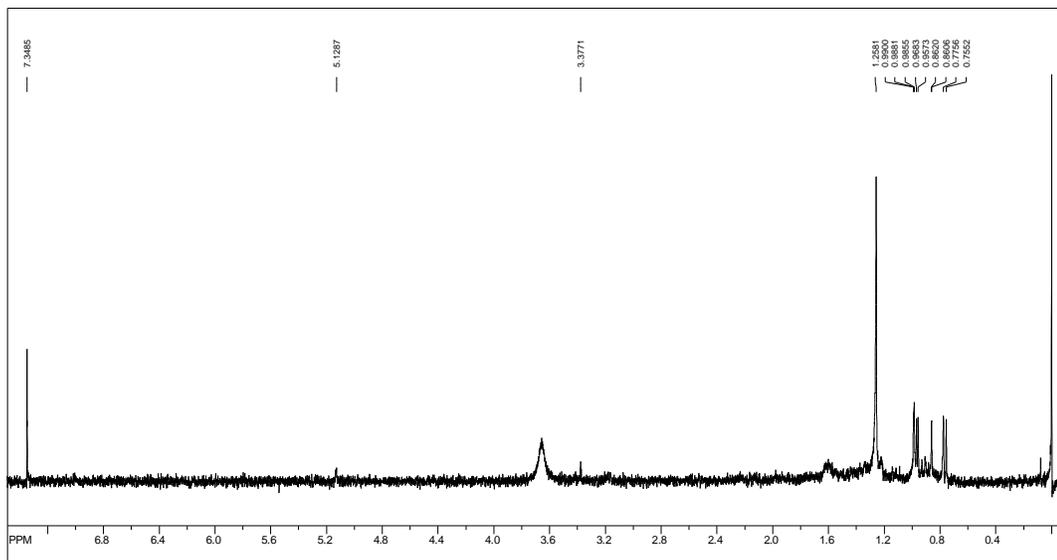


Figura 18. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) da substância SvPC-1.

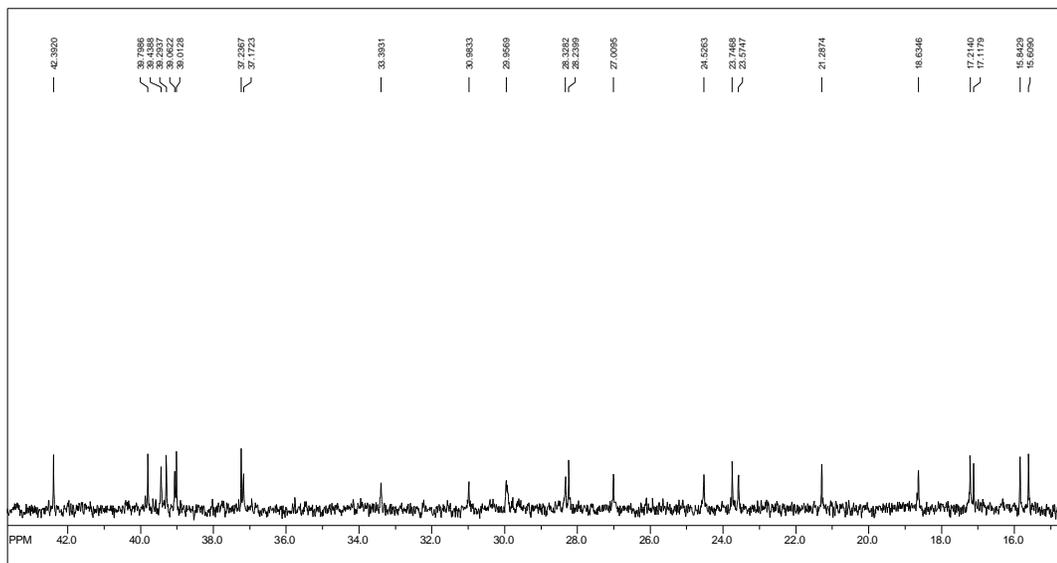
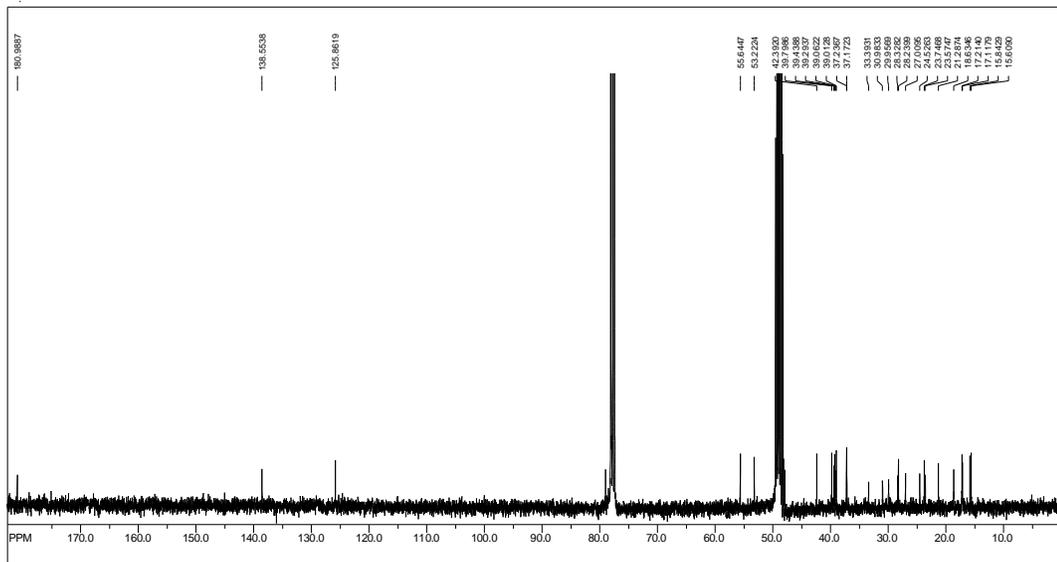


Figura 19. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância SvPC-4.

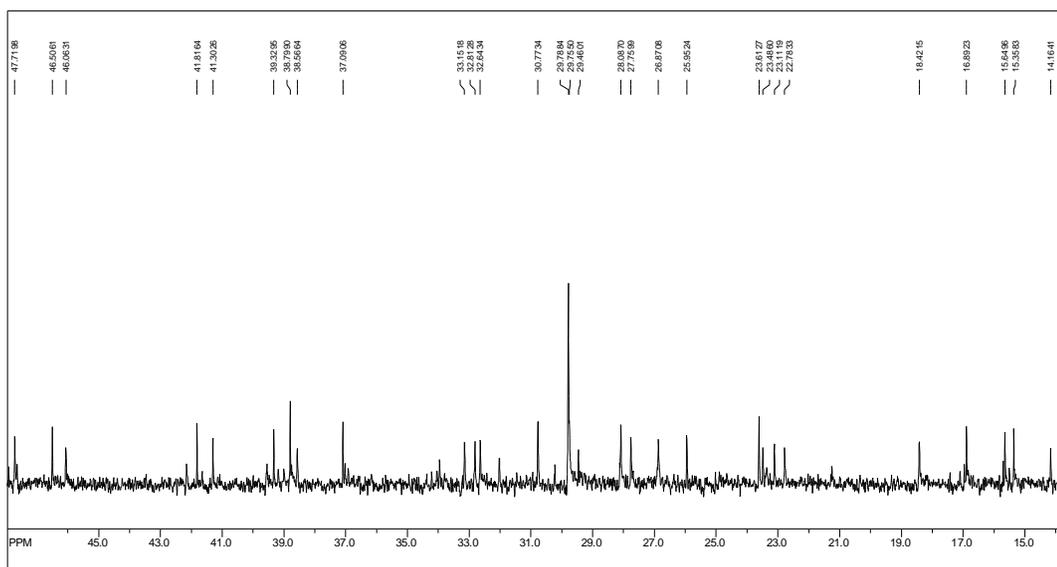
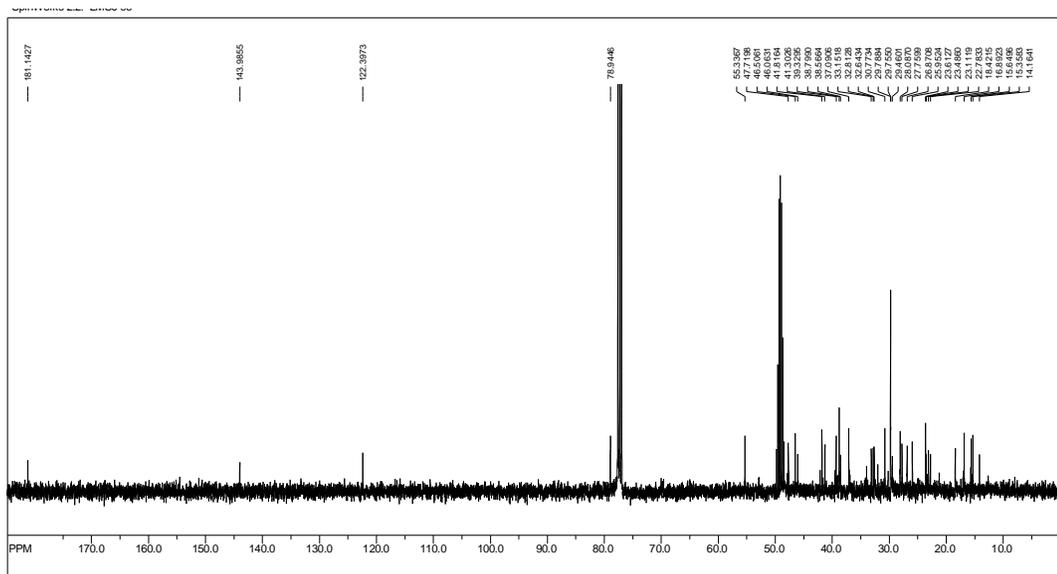


Figura 20. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância SvpC-3.

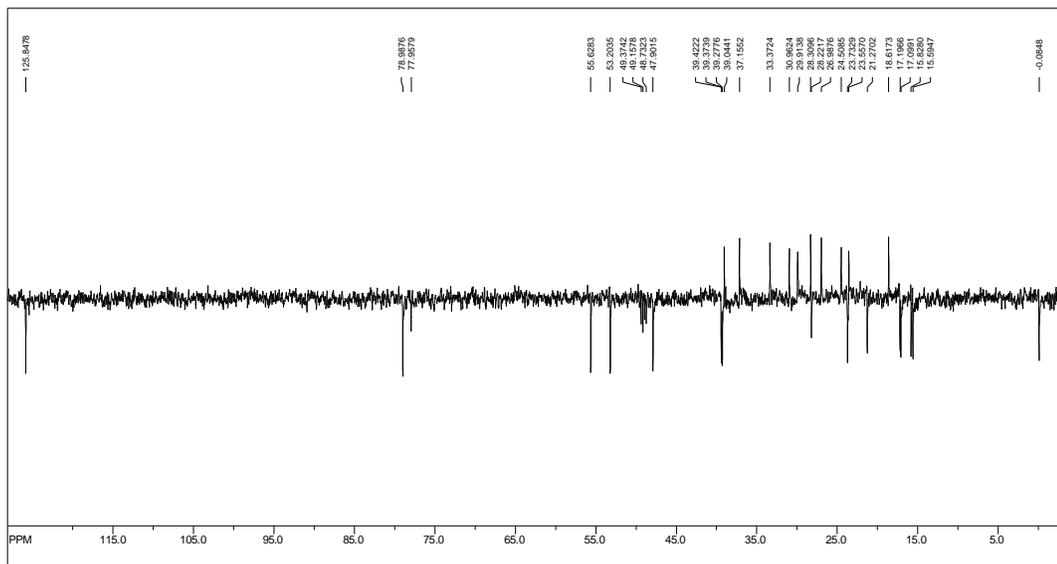


Figura 21. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância SvPC-4.

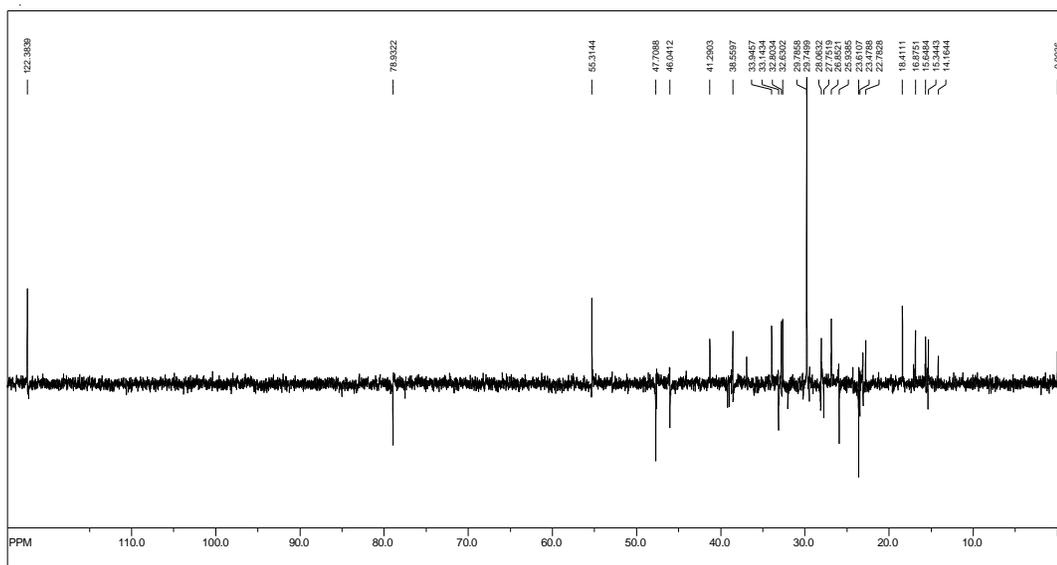


Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância SvPC-3.

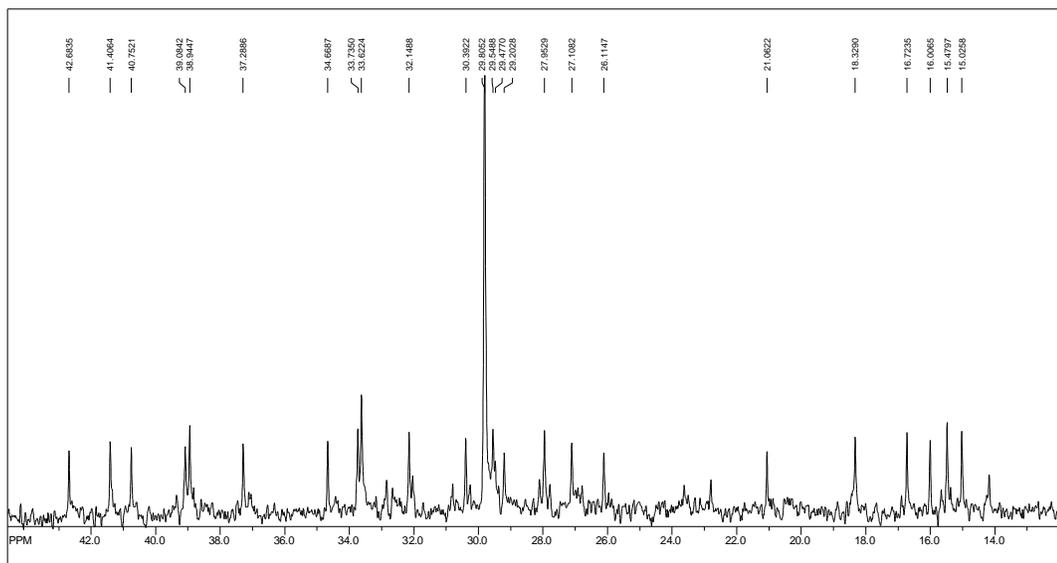
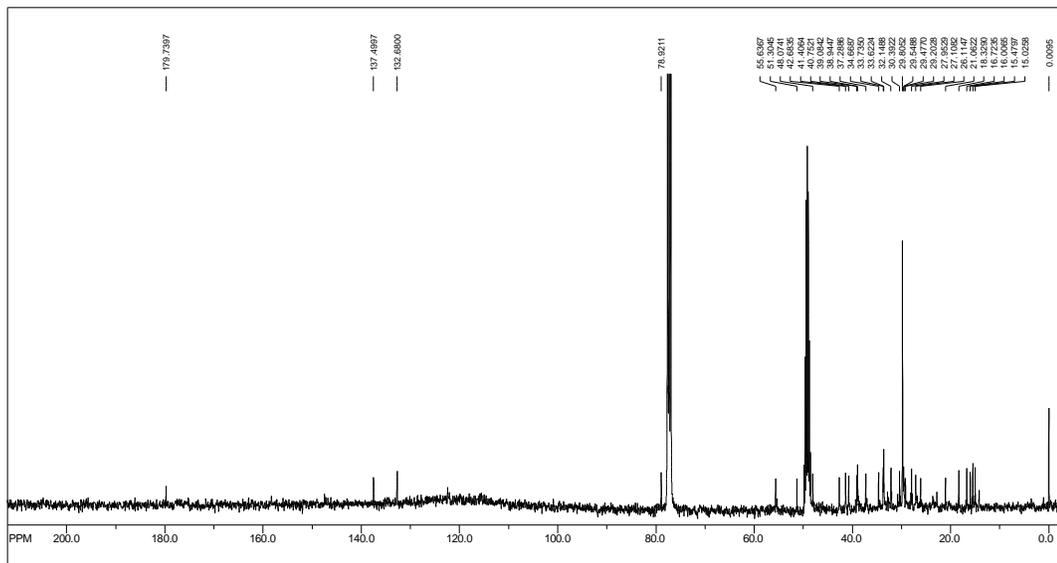


Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância SvPC-1.

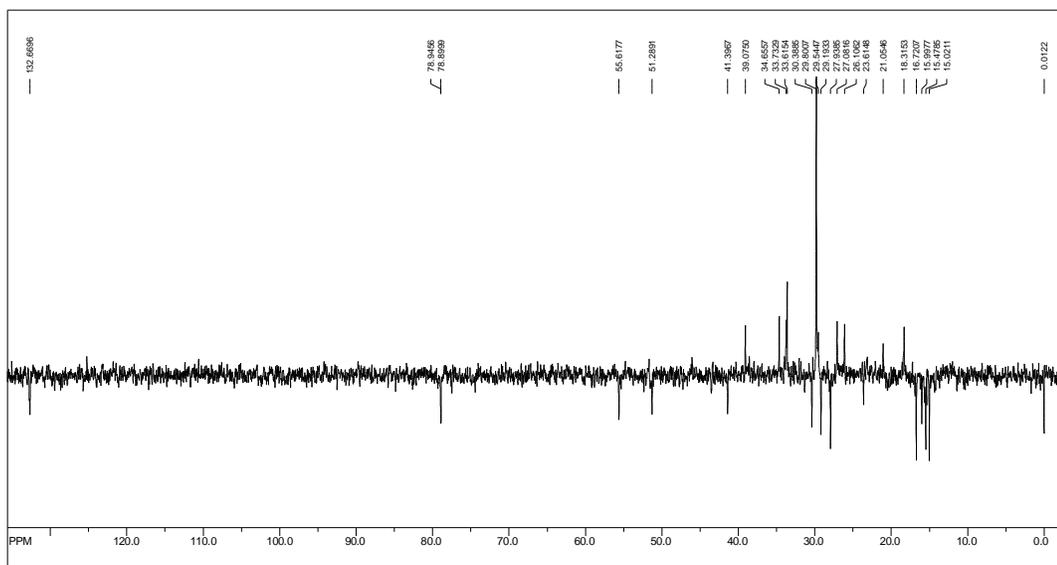


Figura 24. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância **SvPC-1**.

5.5.2. Identificação Estrutural das Substâncias Codificadas de **SvPA-1** e **SvPA-3**

As substâncias codificadas de **SvPA-1** e **SvPA-3** foram identificadas como sendo dois derivados flavonoídicos com base na análise dos dados obtidos dos 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 (Figuras 25 e 26, p. 93; Tabelas 6 e 7, pp. 91 e 92), 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 [**SvPA-3**: δ 6,21 e δ 6,42 (*d*, $J = 1,8$ Hz cada); **SvPA-1**: δ 6,21 e δ 6,38 (*d*, $J = 1,8$ Hz cada)] e trissubstituído [**SvPA-3**: δ 7,76 (*d*, $J = 1,9$ Hz); δ 7,64 (*dd*, $J = 1,9$ e 8,5 Hz) e δ 6,92 (*d*, $J = 8,5$ Hz); **SvPA-1**: δ 7,34 (*d*, $J = 1,9$ Hz), δ 7,36 (*dd*, $J = 1,9$ e 8,5 Hz) e δ 6,92 (*d*, $J = 8,5$ Hz)] e para uma unidade α -L-rhamnopiranosídica na molécula de **SvPA-1** [δ 5,34 (*d*, $J = 1,6$ Hz, H-1'' anomérico), δ 4,22 (*dd*, $J = 1,7$; 3,3 Hz, H-2''), δ 3,77 (*dd*, $J = 3,1$; 9,4 Hz, H-3''), δ 3,34 (m, H-4''), δ 3,73 m (H-5'') e δ 0,95 (*d*, $J = 6,1$ Hz, H-6'')]. O valor da constante de acoplamento do hidrogênio anomérico ($J = 1,6$ Hz) permitiu definir esta unidade como sendo do tipo α -L-rhamnopiranosídica. A análise destes dados permitiu sugerir para ambos compostos o esqueleto estrutural de um flavonoide.

A análise dos dados obtidos dos respectivos espectros de RMN ^{13}C (Figura 27 e 29, pp.94 e 95), incluindo DEPT (Figura 28, p. 94; Tabela 6 e 7, pp. 91 e 92), registrados a 100 MHz, permitiu identificar um total de 15 átomos de carbono para **SvPA-3** (dez não hidrogenados e

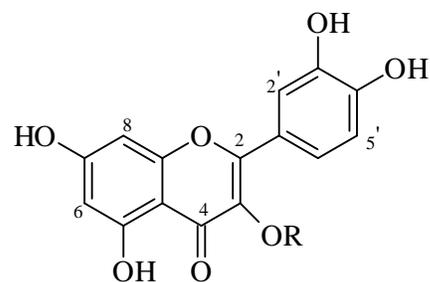
cinco monohidrogenados) e um total de 21 átomos para **SvPA-1** (dez não hidrogenados, dez monoidrogenados e um triidrogenado). Dentre os carbonos não hidrogenados de ambos, foram observados que em sete deles os valores de deslocamentos químicos sugeriram presença de carbonos sp^2 oxigenados (**SvPA-3**: δ 137,10; 146,17; 148,00; 148,70; 158,18; 162,39 e δ 165,50; **SvPA-1**: 136,24; 146,44; 149,83; 158,55; 159,32; 163,23 e 166,02), um carbonílico (**SvPA-3**: δ 177,20; **SvPA-1**: δ 179,66), dois carbonos sp^2 não oxigenados (**SvPA-3**: δ 104,90 e δ 124,11; **SvPA-1**: δ 105,88 e δ 122,98), além de uma unidade α -L-rhamnopiranosídica em **SvPA-1** (Tabela 7, p. 92). Esta análise permitiu deduzir fórmulas moleculares de $C_{15}H_{10}O_7$ para **SvPA-3** e de $C_{21}H_{20}O_{11}$ para **SvPA-1**, com índices de deficiência de hidrogênios iguais a onze e doze, respectivamente. A análise conjunta destas informações permitiram confirmar para ambos os compostos o esqueleto estrutural de um flavonoide ($C_6C_3.C_6$). Contudo, a ausência nos espectros de RMN 1H de um sinal simples entre δ 6,0-6,90, típico do H-3 de flavonas (Markham, 1989), sugeriu para ambos esqueletos de flavonóis.

A análise conjunta dos dados espectrais obtidos permitiu propor para **SvPA-3** a estrutura do flavonol *3,5,7,3',4'-Pentaidroxiflavona*, conhecido como *Quercetina*.

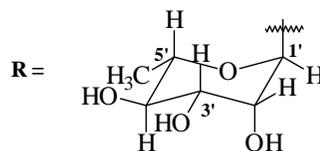
A correlação observada no espectro bidimensional HMBC de **SvPA-1** (Figura 31, p. 96), especialmente do hidrogênio anomérico da unidade α -L-rhamnopiranosídica [δ 5,34 (*d*, $J = 1,6$ Hz, H-1'')] com o sinal do carbono que absorve em δ 136,24 (C-3) permitiram definir a posição da unidade α -L-rhamnopiranosídica. As demais correlações observadas nos espectros bidimensionais HSQC (Figura 30, p. 95) e HMBC (Figura 31, p. 96) e a análise comparativa dos dados de RMN obtidos com os do composto correspondente descrito na literatura (Tabela 7, p. 92) permitiram propor para **SvPA-1** a estrutura do flavonol *3-O- α -L-rhamnopiranosil-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona*.

Estas propostas estruturais foram confirmadas pela comparação com dados de RMN dos compostos correspondentes descritos na literatura (Tabelas 6 e 7, pp. 91 e 92).

No gênero *Borreria* ou *Spermacoce* a *Quercetina* e a *3-O- α -L-rhamnopiranosil-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona* foram isoladas somente das sementes e folhas de *B. Stricta* (Bhadoria & Gupta, 1981; Sharma & Gupta, 1987) e também a *3-O- α -L-rhamnopiranosil-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona* nas partes aéreas de *S. laevis* (Noiarsa et al., 2007).



SvPA-3 R = H



SvPA-1 R = α -L-Rha

Tabela 6. Dados de RMN (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, CD_3OD , δ , Hz) da substância **SvPA-3** e comparação com dados da literatura (DMSO-d_6 ; Kim, 2005).

Posição	SvPA-3		Quercetina		
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	
C	2	148,70	147,63		
	3	137,10	135,64		
	4	177,20	175,76		
	5	162,39	160,64		
	7	165,50	163,85		
	9	158,18	156,07		
	10	104,90	102,92		
	1'	124,11	121,88		
	3'	146,17	144,99		
	4'	148,00	146,73		
CH	6	99,60	6,21 (<i>d</i> , $J = 1,8$)	98,12	6,19 s
	8	94,45	6,42 (<i>d</i> , $J = 1,8$)	93,28	6,41 s
	2'	116,00	7,76 (<i>d</i> , $J = 1,9$)	115,00	7,67 (<i>d</i> , $J = 1,8$)
	5'	116,20	6,92 (<i>d</i> , $J = 8,5$)	115,54	6,89 (<i>d</i> , $J = 8,4$)
	6'	121,70	7,64 (<i>dd</i> , $J = 1,9; 8,5$)	119,90	7,54 (<i>dd</i> , $J = 1,8; 8,4$)

Tabela 7. Dados de RMN (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, CD_3OD , δ , Hz) da substância **SvPA-1** e comparação com dados da **3-O- α -L-Rhamnopyranosilquercetina** (CD_3OD , Arot & Williams, 1997).

<i>Posição</i>	SvPA-1			3-O-α-L-Rha- Quercetina
	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}/\text{HSQC}$	HMBC	δ_{C}
C				
2	159,32			158,80
3	136,24			134,20
4	179,66			179,70
5	163,23			163,30
7	166,02			166,30
9	158,55			158,40
10	105,88			104,70
1'	122,98			121,30
3'	146,44			144,90
4'	149,83			148,60
CH				
6	99,86	6,21 (<i>d</i> , $J = 2,0$)	C-5; C-7; C-8; C-10	98,80
8	94,75	6,38 (<i>d</i> , $J = 2,0$)	C-6; C-7; C-9; C-10	94,00
2'	116,94	7,34 (<i>d</i> , $J = 2,1$)	C-2; C-1'; C-6'; C-3'; C-4'	115,60
5'	116,38	6,92 (<i>d</i> , $J = 8,4$)	C-3'; C-4'; C-6'	115,40
6'	122,87	7,32 (<i>dd</i> , $J = 7,8; 2,1$)	C-2'; C-4'; C-5'	122,00
1''	103,56	5,34 (<i>d</i> , $J = 1,6$)	C-3; C-2''	102,00
2''	71,92	4,22 (<i>dd</i> , $J = 1,7; 3,3$)		70,10
3''	72,04	3,77 (<i>dd</i> , $J = 3,1; 9,4$)		70,30
4''	73,27	3,34 m		74,70
5''	72,13	3,73 m		71,00
CH₃				
6''	17,65	0,95 (<i>d</i> , $J = 6,1$)		17,60

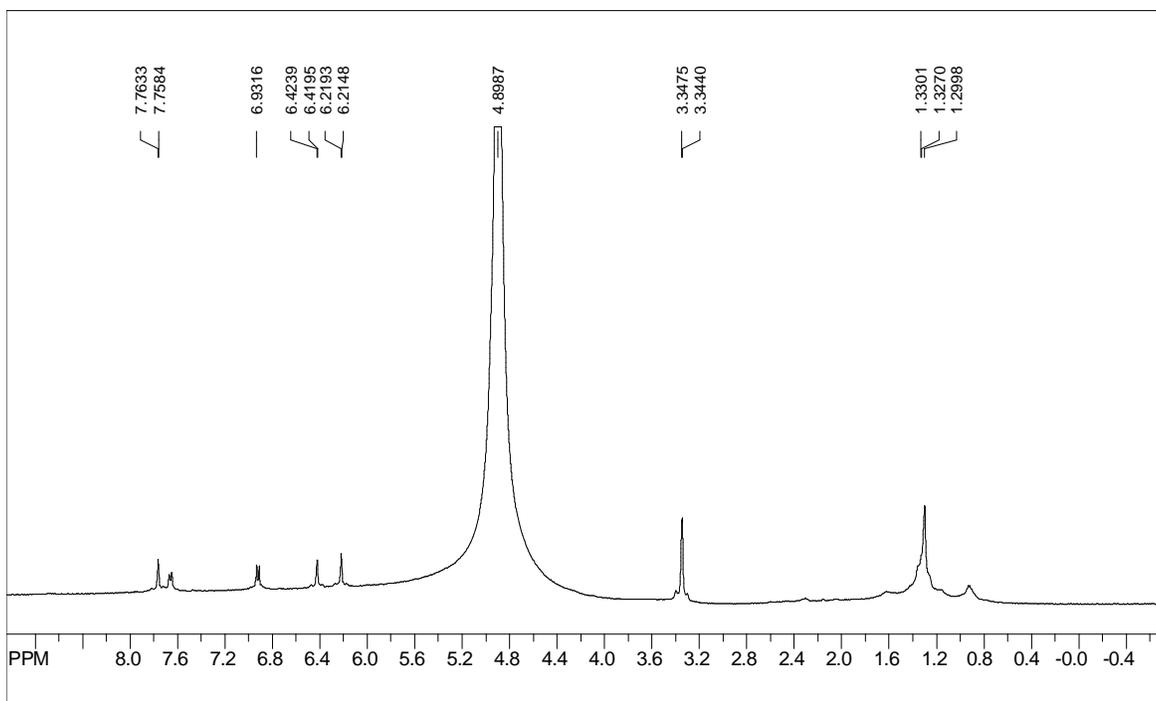


Figura 25. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da substância SvPA-3.

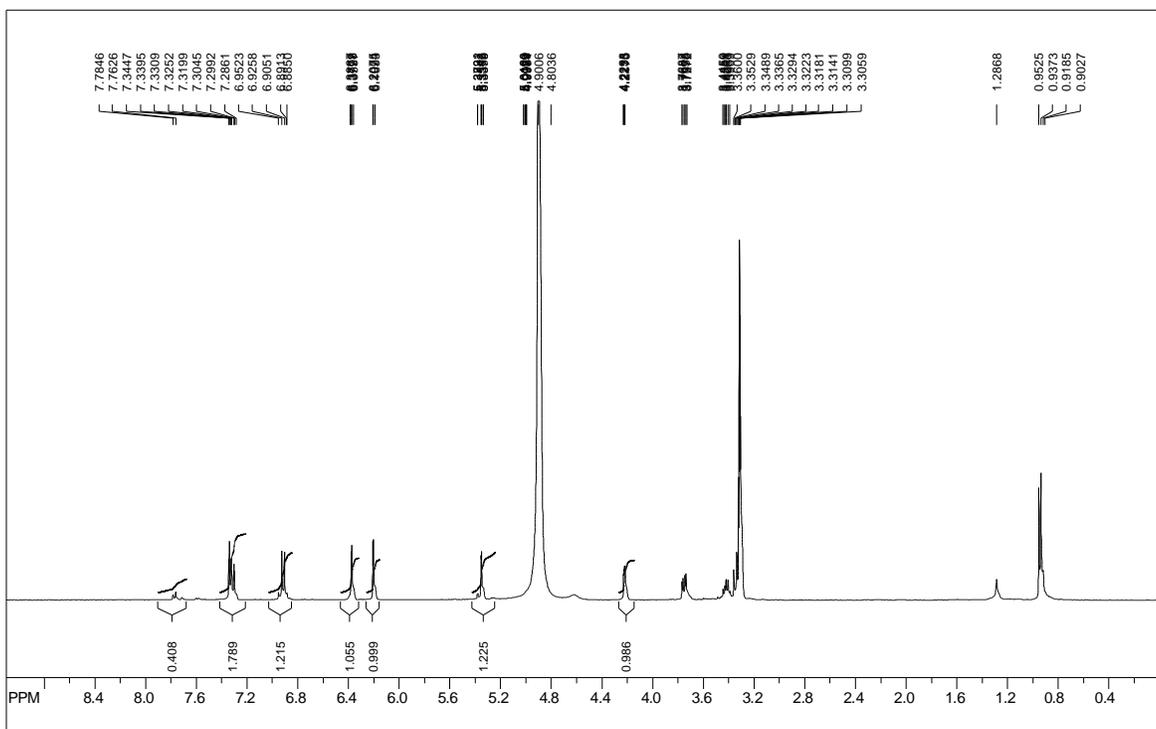


Figura 26. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da substância SvPA-1.

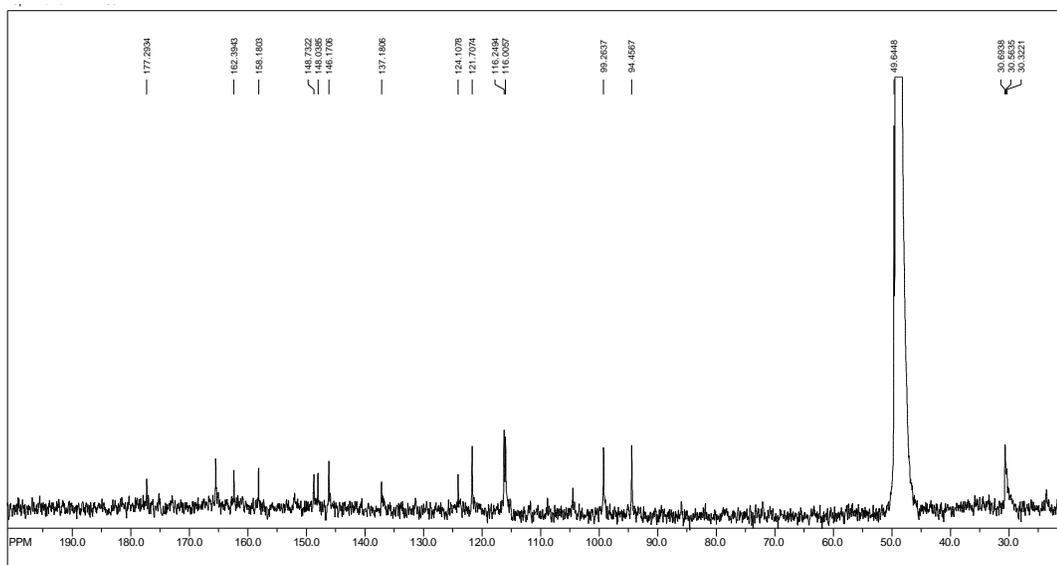


Figura 27. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) da substância SvPA-3.

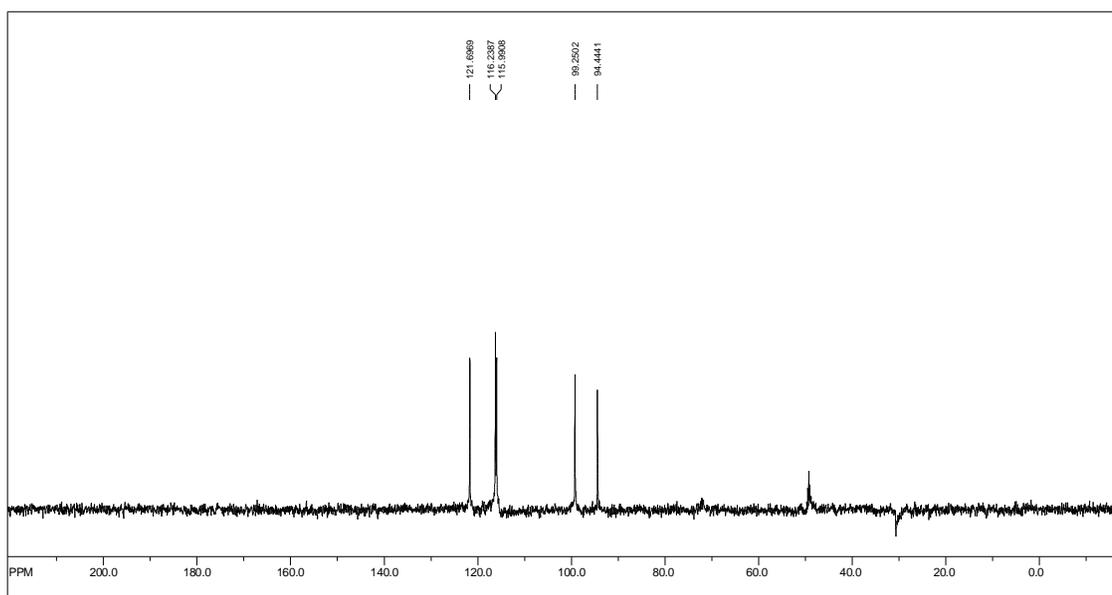


Figura 28. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (100 MHz, CD_3OD) da substância SvPA-3.

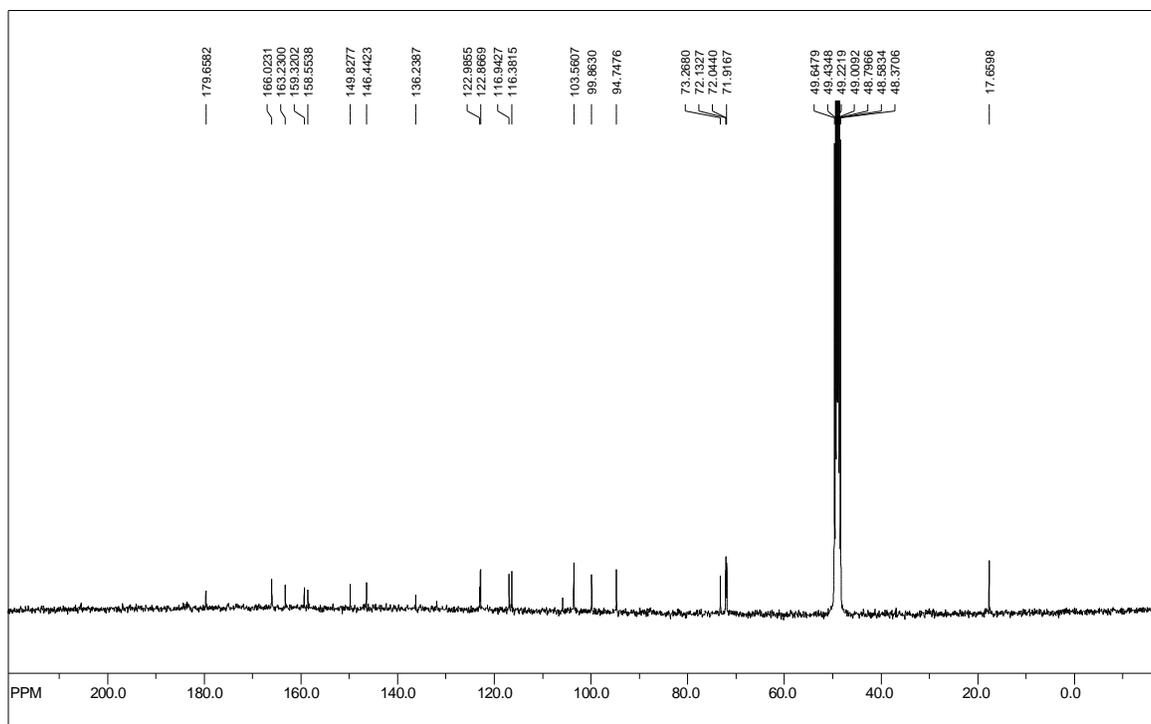


Figura 29. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) da substância **SvPA-1**.

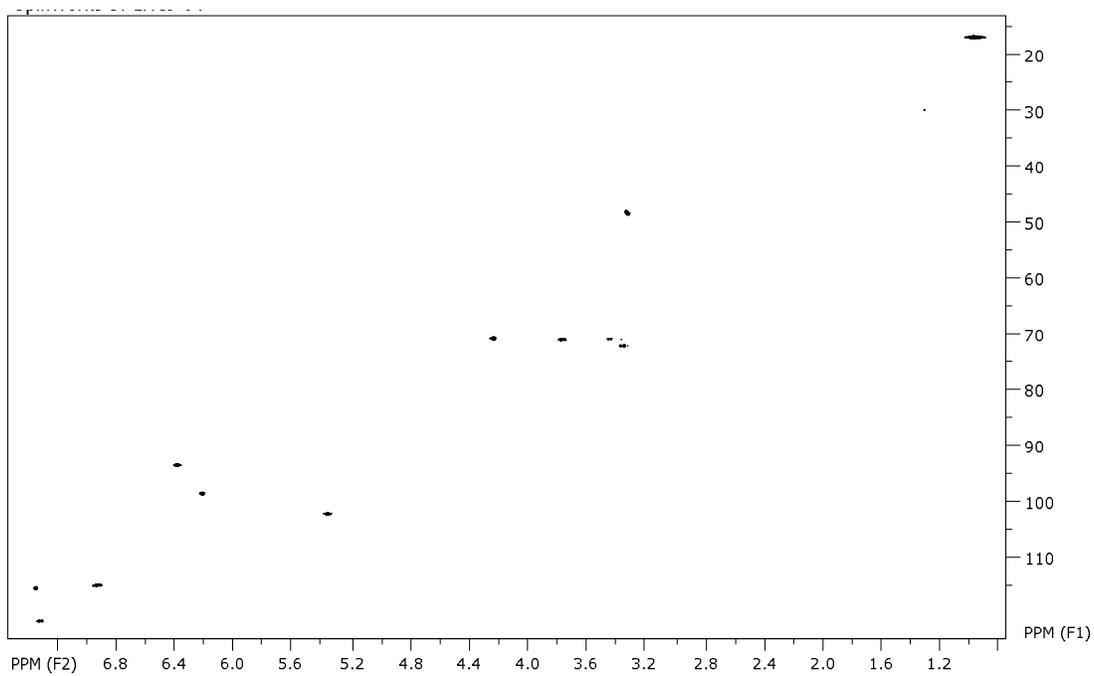


Figura 30. Espectro de HSQC (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, CD_3OD) da substância **SvPA-1**.

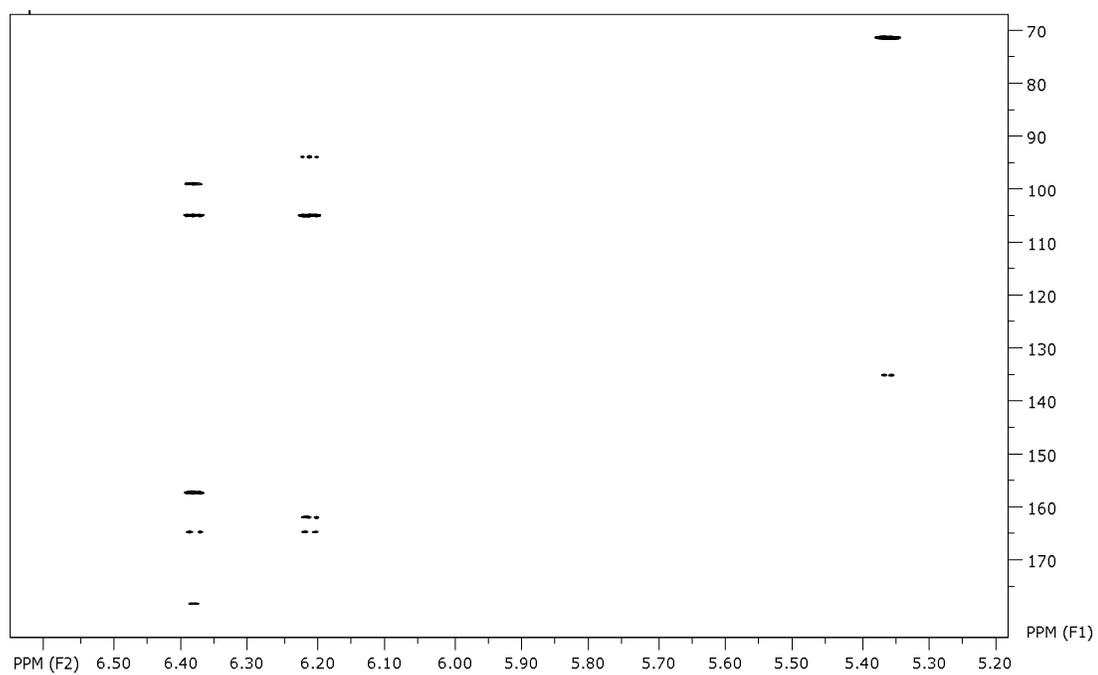
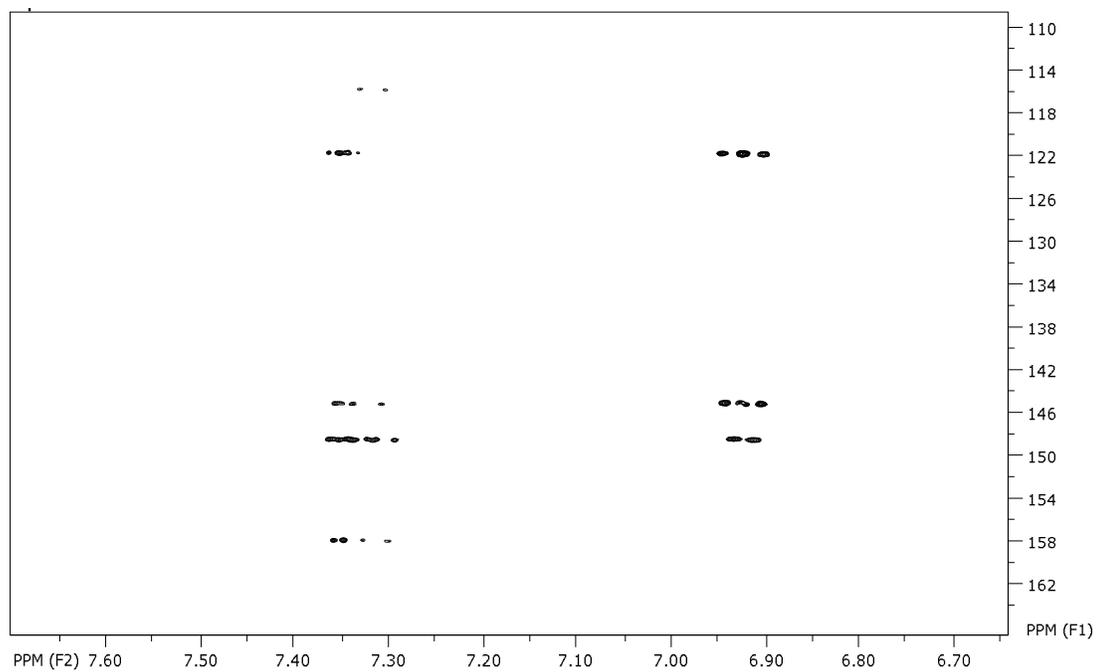


Figura 31. Espectro de HMBC (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, CD_3OD) da substância **SvPA-1**.

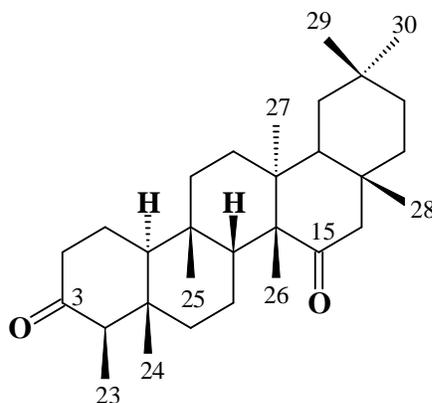
5.5.3 Identificação Estrutural da Substância Codificada de SvCH-1

A substância codificada de SvCH-1 foi identificada como sendo um triterpeno pentacíclico da série friedelano com base na análise dos dados obtidos dos espectros de RMN ^1H (Figura 32, p. 99), RMN ^{13}C e DEPT 135 (Figuras 33 e 34, pp. 100 e 101), bem como pela comparação com dados de modelos descritos na literatura.

Os dados obtidos do espectro de RMN ^1H (Tabela 8, p. 98), bem com sua feição espectral, nos permitiram deduzir que SvCH-1 pertence à classe dos triterpenoides. Essa dedução foi fundamentada pela observação no referido espectro da presença de sinais simples atribuídos a grupos metílicos, um sinal duplo [δ 0,82 (*d*, $J = 7,2$ Hz)] referente a um grupo metílico, um quarteto (δ 2,14 (*dd*, $J = 5,7$ Hz), além de um multipeto em δ 2,33-2,35.

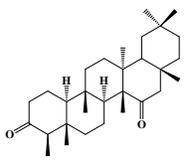
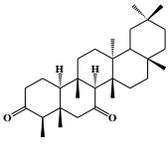
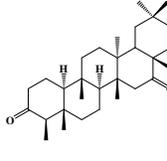
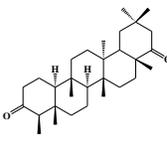
A análise dos dados do espectro de RMN ^{13}C em conjunto com o DEPT 135° (Figura 34, p. 101) permitiu identificar um total de trinta átomos de carbono, dos quais quatro são metínicos, dez são metilênicos, oito são metílicos e oito são não hidrogenados. Destes, os valores de deslocamentos químicos atribuídos principalmente para o C-2 (δ 41,09 CH_2), C-3 (δ 212,33 C), C-4 (δ 58,04 CH) e principalmente a metila 23 (δ 6,86 CH_3), bem como as demais inferições, permitiram propor para SvCH-1 a estrutura de um triterpeno pentacíclico da série friedelano.

A análise conjunta dos dados espectrais obtidos e comparação com dados de modelos descritos na literatura (Mahato & Kundu, 1994), contendo grupos carbonílicos em diferentes posições do esqueleto friedelano (Tabela 8, p. 98), permitiram propor para SvCH-1 a estrutura de um triterpeno *3,15-Dioxo-friedelano*. Esta substância está sendo descrita pela primeira vez no gênero *Borreria* ou *Spermacoce*.



SvCH-1

Tabela 8. Dados de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ) da substância SvCH-1e dos Modelos **3,15-**, **3,7-**, **3,16-** e **3,22-Dioxo-friedelano** (Mahato & Kundu, 1994).

Carbono	SvCH-1	 <i>3,15-Dioxo</i>	 <i>3,7-Dioxo</i>	 <i>3,16-Dioxo</i>	 <i>3,22-Dioxo</i>
1	22,33 CH ₂	22,3	21,3	22,2	22,3
2	41,09 CH ₂	41,4	40,8	41,4	41,4
3	212,33 C	213,1	210,6	212,5	212,6
4	58,04 CH	58,2	57,8	58,2	58,3
5	42,22 C	42,0	47,0	42,1	42,1
6	40,92 CH ₂	40,5	56,9	41,0	41,3
7	22,33 CH ₂	21,3	210,2	18,6	18,1
8	45,33 CH	45,3	63,4	52,4	51,8
9	37,20 C	37,2	42,4	37,7	37,6
10	59,23 CH	59,3	59,0	59,4	59,7
11	33,07 CH ₂	34,4	35,5	35,4	35,7
12	29,34 CH ₂	29,4	29,8	29,1	30,2
13	42,22 C	42,4	39,4	39,2	38,6
14	55,50 C	54,2	37,5	40,5	39,7
15	214,35 C	214,1	31,6	50,2	30,4
16	51,32 CH ₂	54,0	36,3	218,8	27,1
17	33,50 C	33,5	30,1	45,3	45,0
18	44,00 CH	44,0	41,8	44,0	48,1
19	35,52 CH ₂	34,9	34,9	35,5	34,8
20	28,34 C	27,9	28,0	27,6	31,5
21	33,80 CH ₂	33,8	32,8	31,7	49,5
22	39,07 CH ₂	38,6	38,6	30,8	217,3
23	6,86 CH ₃	6,8	6,8	6,8	6,8
24	15,00 CH ₃	15,0	15,1	14,7	14,7
25	18,13 CH ₃	17,4	18,2	17,3	18,1
26	14,10 CH ₃	14,7	19,2	20,3	18,3
27	19,11 CH ₃	18,9	19,4	16,2	18,5
28	31,40 CH ₃	32,2	32,1	27,4	34,0
29	31,90 CH ₃	33,3	31,8	31,1	31,1
30	34,26 CH ₃	33,4	34,6	35,2	35,1

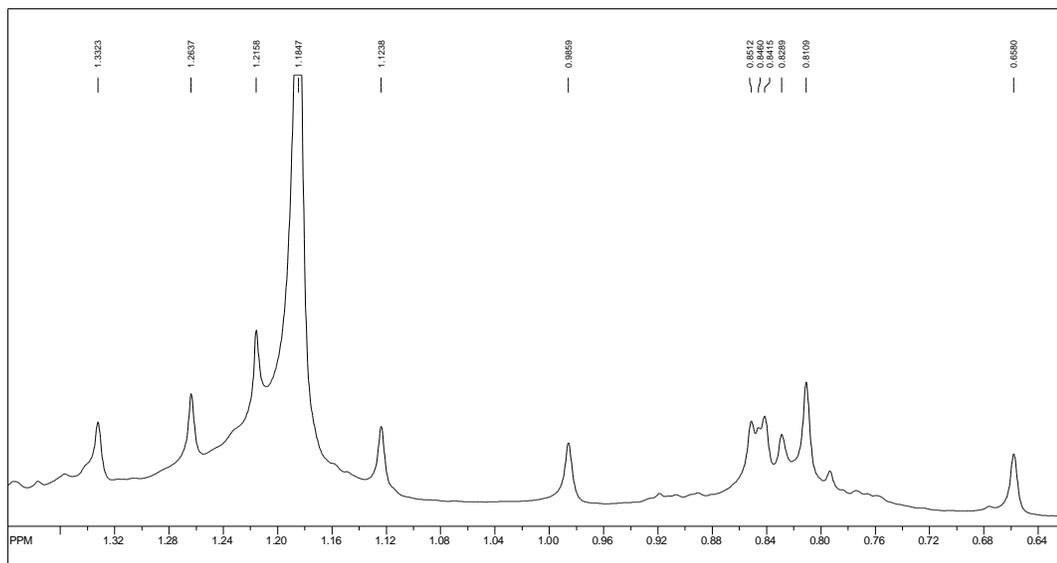
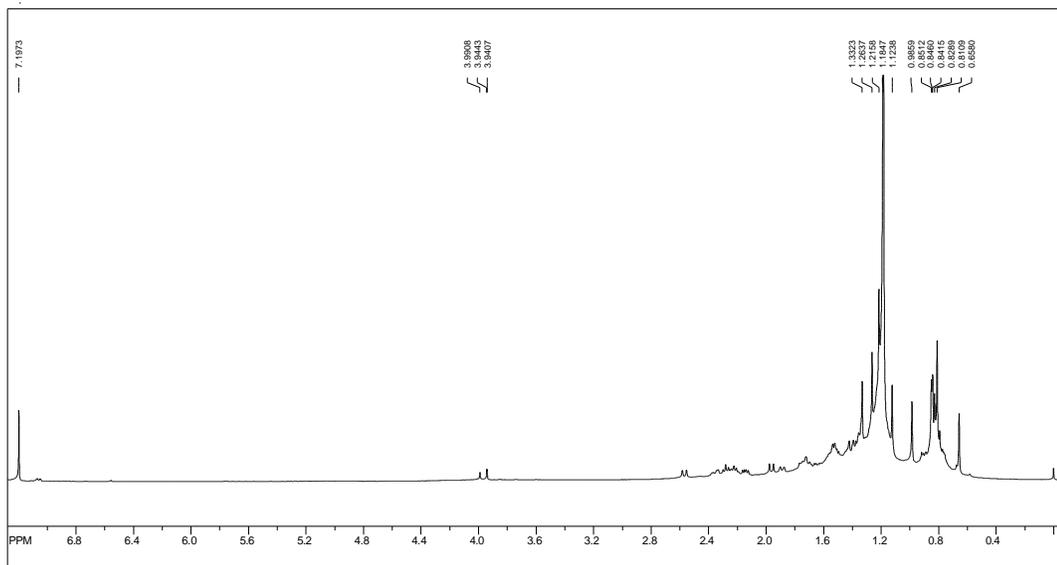


Figura 32. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **SvCH-1**.

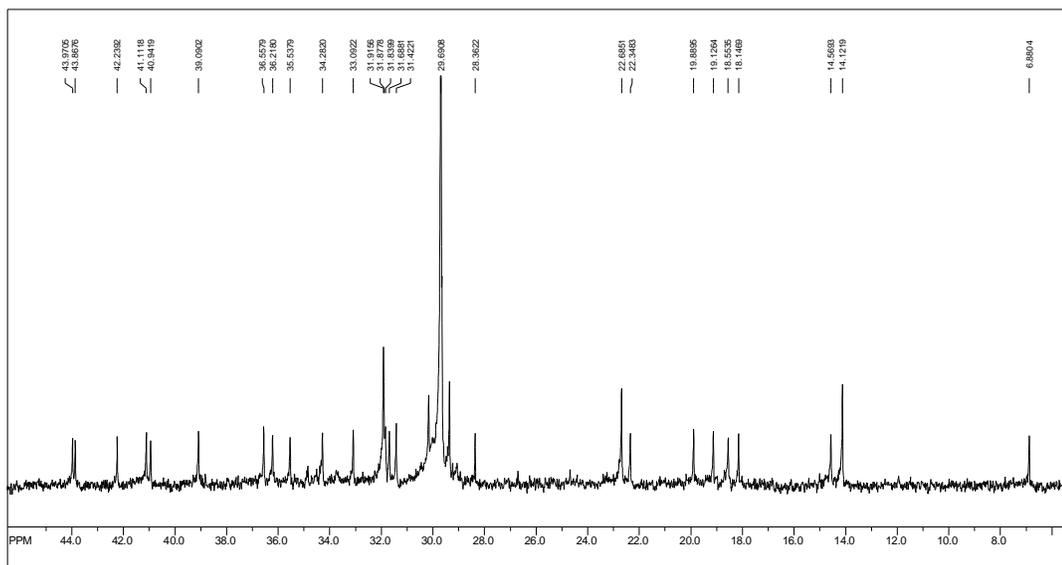
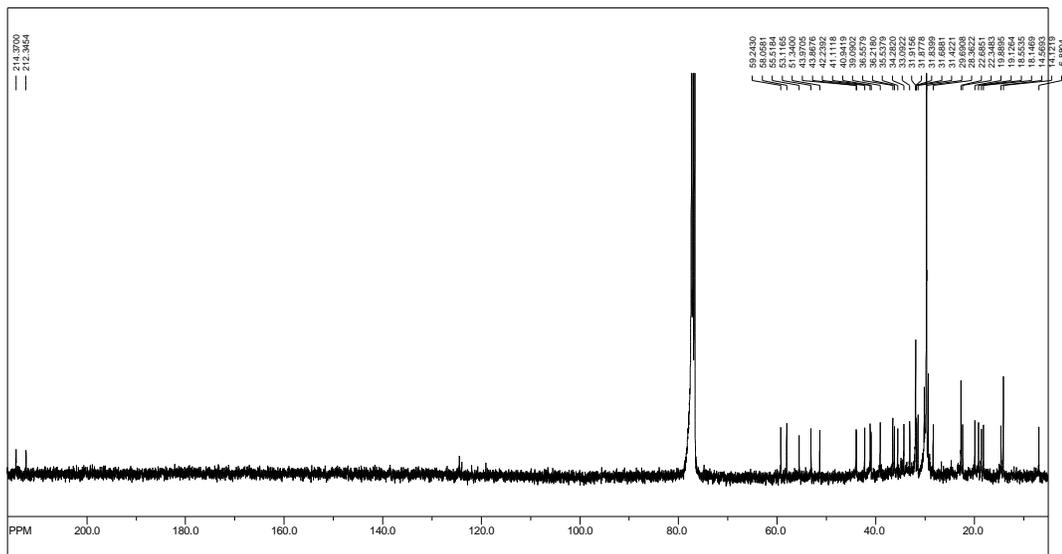


Figura 33. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância SvCH-1.

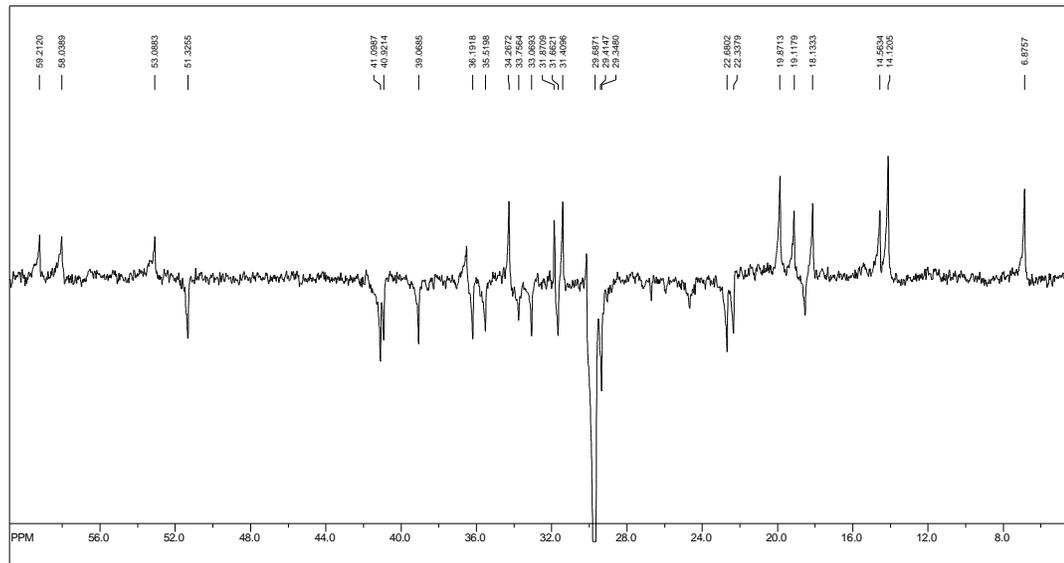
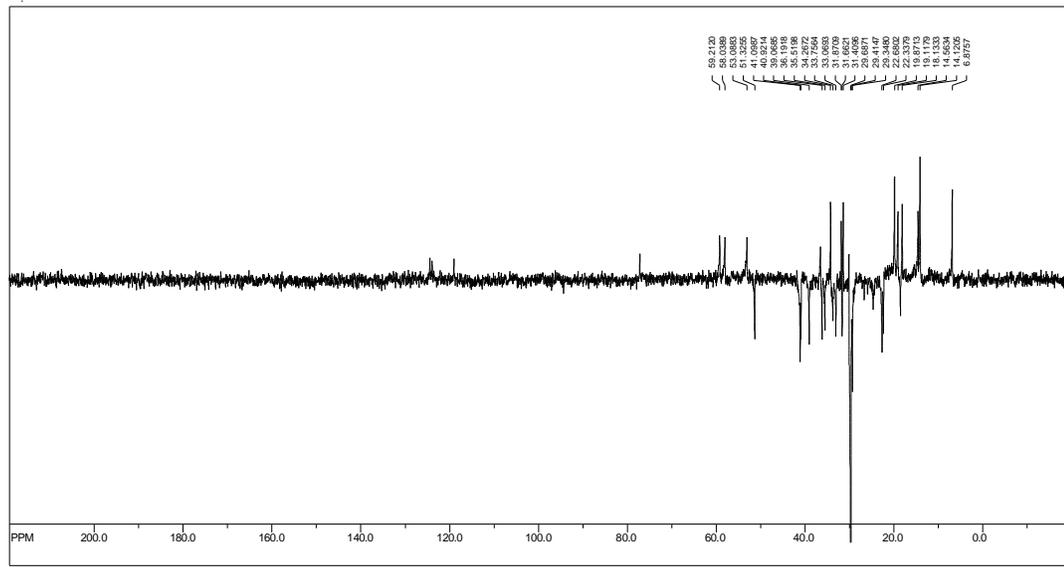


Figura 34. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (100 MHz, CDCl_3) da substância SvCH-1.

5.5.4. Identificação Estrutural da Substância Codificada de SvCC-2

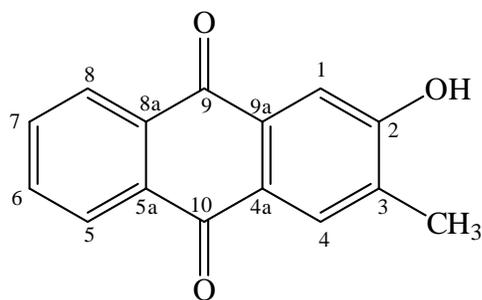
A substância codificada de SvCC-2 foi identificada como sendo uma antraquinona com base na análise conjunta dos dados obtidos dos espectros de RMN de ^1H (Figura 35, p. 104) e de ^{13}C , incluindo DEPT (Figuras 36 e 37, pp. 105 e 106) e técnicas bidimensionais (HSQC e HMBC) (Figuras 38 e 39, pp. 106 e 107), bem como pela comparação de dados descritos na literatura (Kitajima, 1998).

Os dados obtidos do espectro de RMN ^1H (Tabela 9, p. 103) evidenciaram sinais simples em δ 7,65 e δ 8,15 condizentes com a presença de um anel aromático do tipo 1,2,4,5-tetrasubstituído; em δ 2,48 para um grupo metílico, cujo valor de deslocamento químico sugere que este grupo se encontra ligado a anel aromático, além de multipletos para hidrogênios aromáticos em δ 7,87; δ 7,89 e δ 8,34.

A análise conjunta dos dados obtidos dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135 (Tabela 9, p. 103) permitiu reconhecer para SvCC-2 um total de quinze sinais de átomos de carbono (oito não hidrogenados, seis monoidrogenados e um triidrogenado). Dentre esses carbonos ressaltam-se valores de deslocamentos químicos condizentes com a presença de dois grupos carbonílicos [δ 183,06 (C) e δ 184,32 (C)], um carbono sp^2 sustentando oxigênio [δ 161,76 (C)] e um grupo metila [δ 16,50 (CH_3)]. Adicionalmente, foram observados sinais para seis carbonos sp^2 não hidrogenados (Tabela 9, p. 103). Estas informações permitiram sugerir para SvCC-2 a estrutura de uma antraquinona.

As correlações observadas no mapa de contorno do espectro de RMN bidimensional HMBC (Tabela 9, p. 103), além de atribuir inequivocamente à maioria dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos da molécula, permitiram também definir as posições dos grupos substituintes no núcleo antraquinônico, especialmente pelas correlações dos sinais de H-1 (δ 7,65) com C-3 (δ 128,19), C-9 (δ 183,06) e C-9a (δ 133,10) e de H-4 (δ 8,15) com C-2 (δ 161,76), C-10 (δ 184,32), C-4a (δ 126,11) e Me (δ 16,50). Também foram observadas correlações entre os hidrogênios da metila (δ 2,48) com C-2, C-3 e C-4.

A análise dos dados espectrais discutidos, bem como a comparação com dados da 2-Hidroxi-3-metilantraquinona (Kitajima, 1998), permitiu a identificação de SvCC-2 com este composto. Este é o primeiro relato da ocorrência de antraquinona em espécie dos gêneros *Borreria* ou *Spermacoce*.



SvCC-2

Tabela 9. Dados de RMN (^1H 400; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, δ , Hz) da substância **SvCC-2** e comparação com os da **2-Hidroxi-3-metil-antraquionona** (CDCl_3 , Kitajima, 1998).

Carbono	SvCC-2				
	$\delta_{\text{H-HMQC}}$		HMBC	<i>2-Hidroxi-3-metil-antraquionona</i>	
	δ_{C}	δ_{H}		δ_{C}	δ_{H}
1	111,95	7,65 s	C-3; C-9; C-9a	114,60	7,63 s
2	161,76			159,14	
3	128,19			128,19	
4	130,85	8,15 s	C-2; C-10; C-4a; Me	128,16	8,03 s
4a	126,11			127,34	
5	127,24	8,34 m	C-4a; C-7	127,91	8,29 (<i>dd</i> , $J = 7,3; 1,9$)
5a	133,88			132,19	
6	134,38	7,89 m		134,20	7,86 (<i>td</i> , $J = 7,3; 1,6$)
7	134,11	7,87 m		134,04	7,88 (<i>td</i> , $J = 7,1; 1,6$)
8	126,96	8,34 m		127,33	8,22 (<i>dd</i> , $J = 7,3; 1,9$)
8a	133,03			133,37	
9	183,06			182,58	
9a	133,10			130,78	
10	184,32			182,85	
CH_3	16,50	2,48 s	C-2; C-3; C-4	16,05	2,45

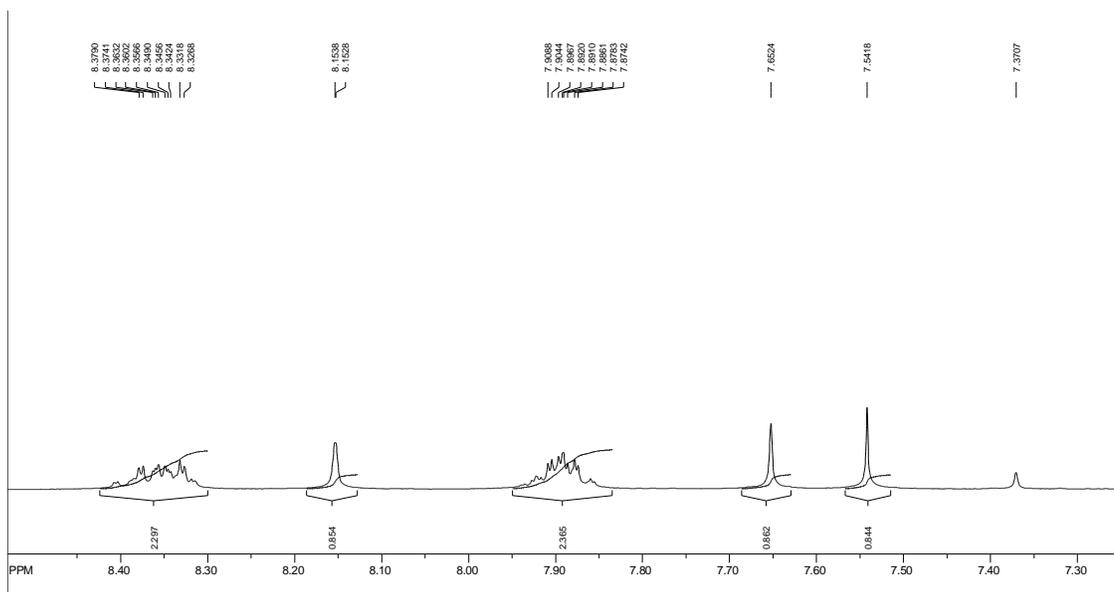
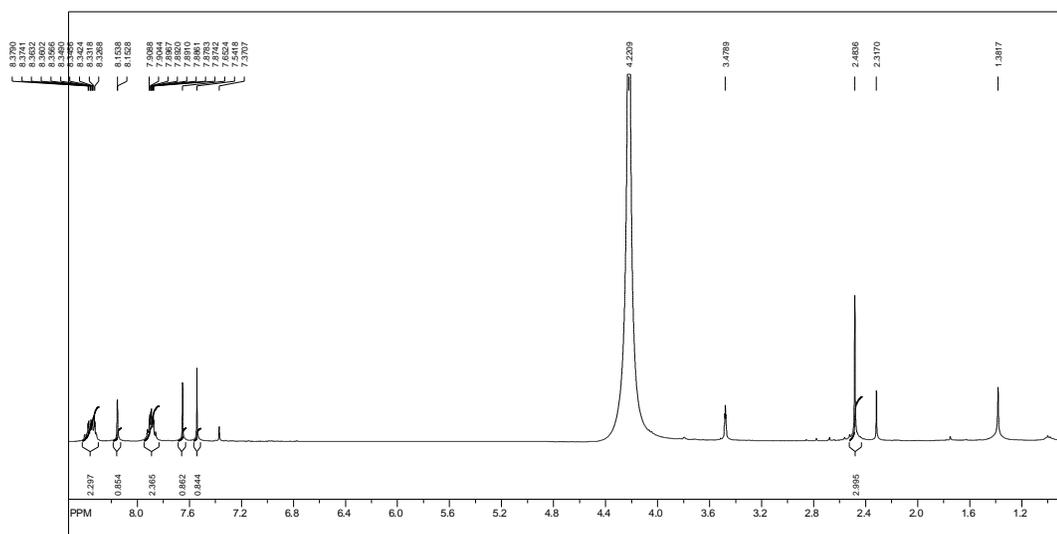


Figura 35. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância SvCC-2

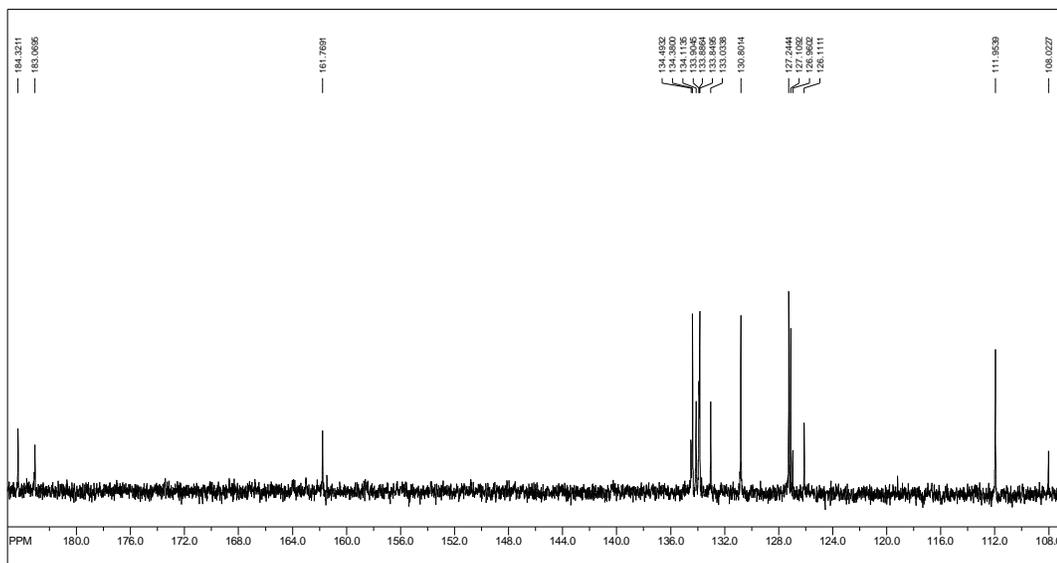
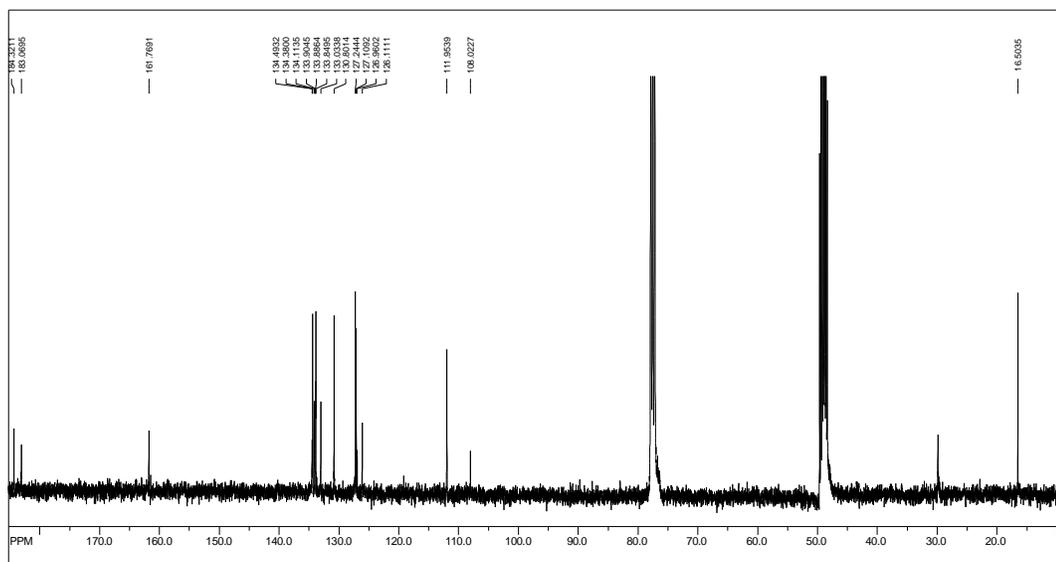


Figura 36. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância SvCC-2.

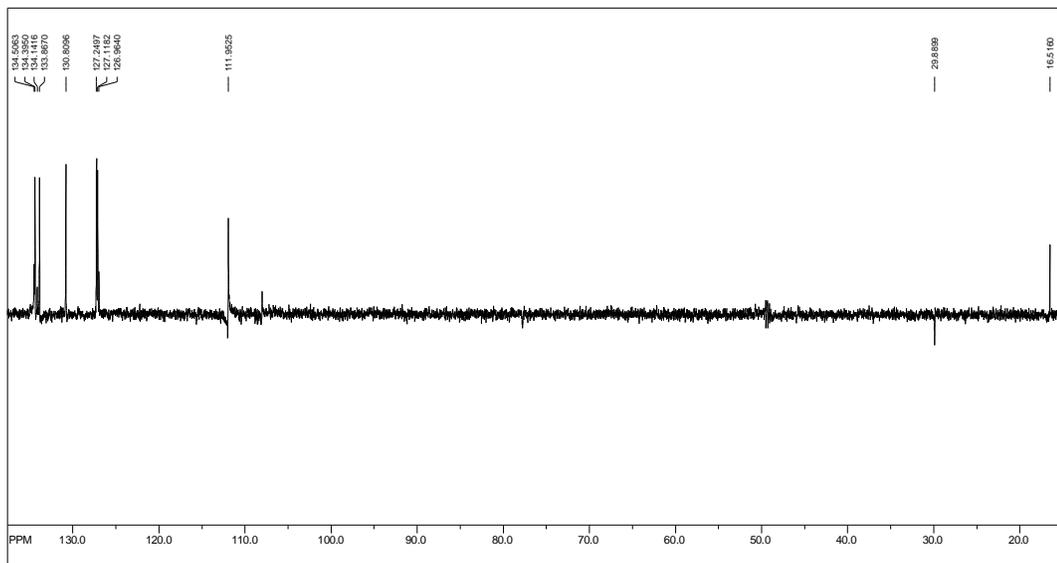


Figura 37. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância **SvCC-2**

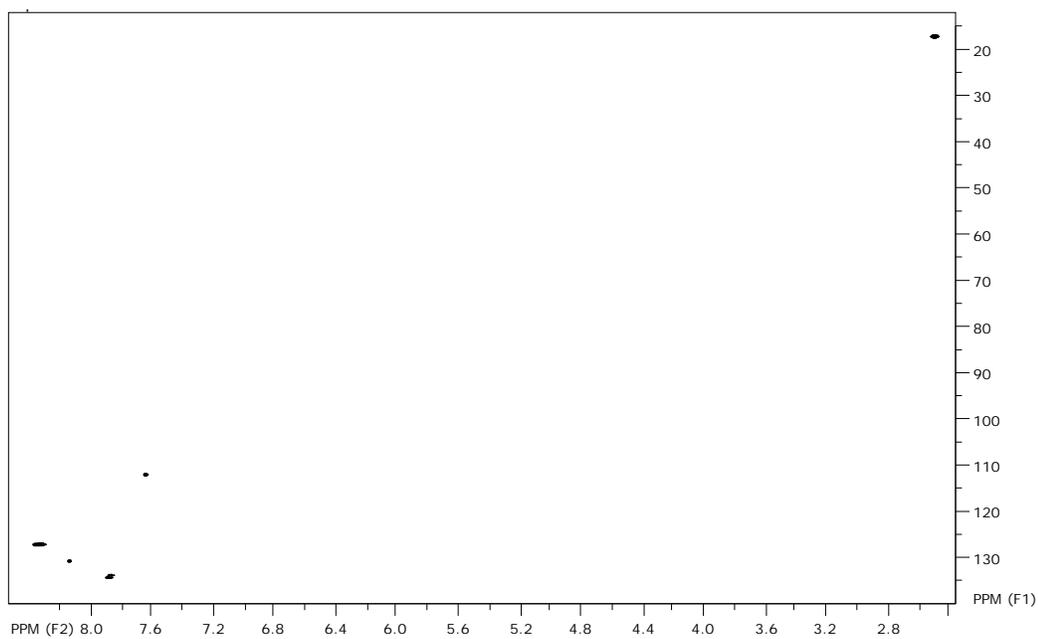


Figura 38. Espectro de HSQC (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância **SvCC-2**

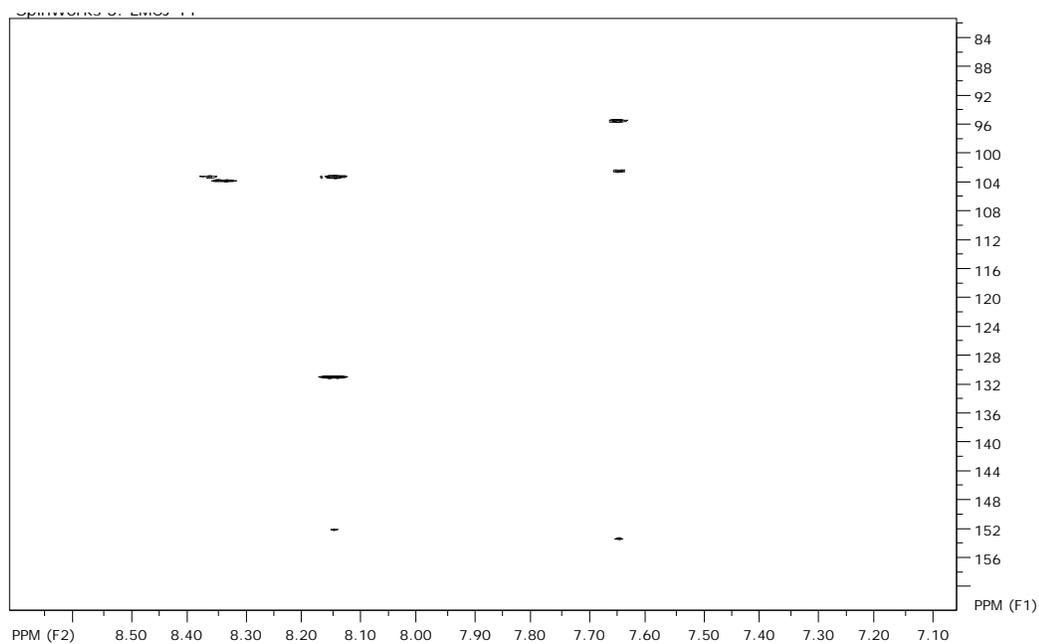
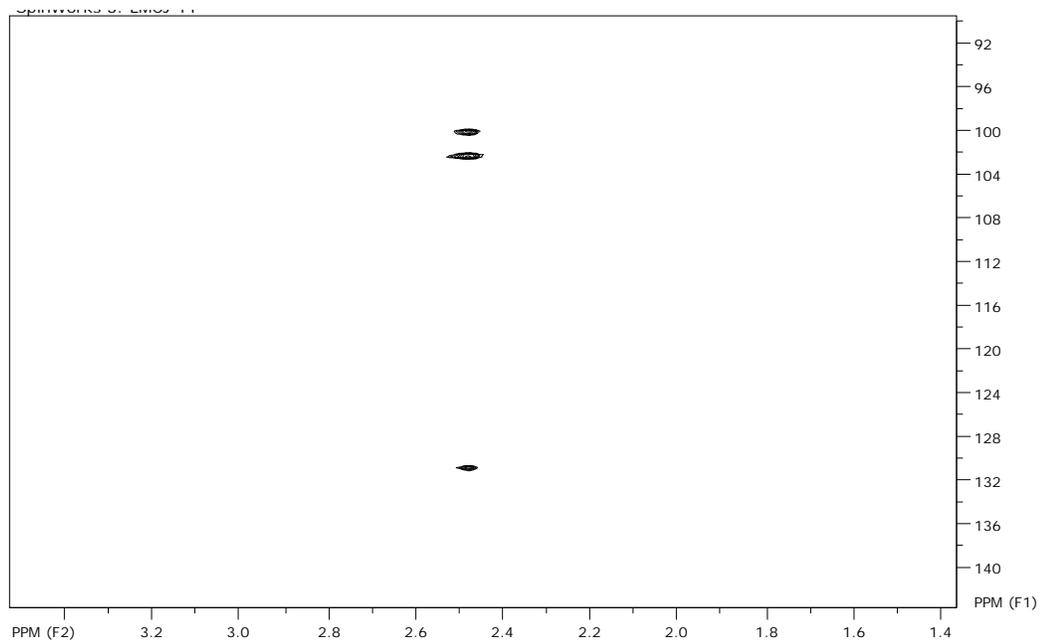


Figura 39. Espectro de HMBC (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância SvCC-2

5.5.5 . Identificação Estrutural das Substâncias Codificadas de SvRH-1a e SvRH-1b

As substâncias codificadas de **SvRH-1a** (componente majoritário) e **SvRH-1b** (componente minoritário) foram isoladas em mistura e identificadas como sendo dois fitoesteroides com base na análise dos dados obtidos dos espectros de RMN ^1H (Figura 40, p. 111) e RMN ^{13}C , incluindo experimento DEPT 135 (Figuras 41 e 42, pp. 11 e 112), bem como pela comparação dos dados espectrais obtidos com os dos compostos análogos descritos na literatura (Della-Greca *et al.*, 1990).

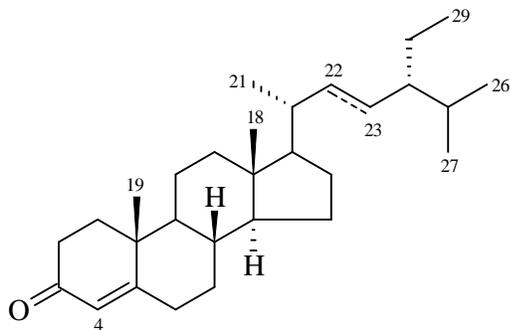
O espectro de RMN ^1H da mistura (Tabela 10, p. 110) permitiu reconhecer para ambos componentes sinais para uma ligação dupla do tipo trissubstituída [δ 5,68 (sl)], vários sinais simples, duplos e múltiplos entre δ 0,68 e δ 1,16 atribuídos a grupos metílicos, metilênicos e metínicos saturados, além de sinais múltiplos entre δ 2,23 e δ 2,40 atribuídos a hidrogênios em posição *alfa* a grupo carbonílico. Observou-se ainda no referido espectro duplo dupletos, cuja feição espectral e valores de deslocamentos químicos [δ 5,18 (*dd*, $J = 15,2$ e $8,6$ Hz) e δ 5,05 (*dd*, $J = 8,6$ e $15,2$ Hz)] sugeriram presença de uma ligação dupla do tipo *trans*-dissubstituída (Δ^{22}) para o componente minoritário.

A análise conjunta dos dados obtidos dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135 (Tabela 10, p. 110), permitiu reconhecer para o componente majoritário (**SvRH-1a**) um total de vinte e nove sinais de átomos de carbono, dos quais quatro são não hidrogenados, oito são monoidrogenados, onze são diidrogenados e seis são triidrogenados. Estas informações permitiram sugerir o esqueleto de um fitoesteroide.

Os valores de deslocamentos químicos observados para os carbonos sp^2 , bem como a natureza dos mesmos no espectro DEPT (Figura 42, p. 112), permitiram reconhecer nas estruturas de ambos a presença de um grupo carbonílico conjugado [δ 200,93 (C)] bem como para uma ligação dupla conjugada do tipo trissubstituída [**SvRH-1a**: δ 173,63 (C) e δ 122,46 (CH); **SvRH-1b**: δ 173,67 (C) e δ 122,96 (CH)]. Estas observações, associada aos valores de deslocamentos químicos dos demais carbonos (Tabela 10, p. 110) e comparação com dados descritos na literatura (Della-Greca *et al.*, 1990) permitiram sugerir para **SvRH-1a** a estrutura do fitoesteroide conhecido como *sitostenona*.

A análise comparativa entre os dados de RMN ^{13}C obtidos para **SvRH-1a** com os dados do componente minoritário permitiu sugerir para **SvRH-1b** a estrutura do fitoesteroide conhecido como *estigmastenona*. Esta dedução foi apoiada pela presença dos sinais de

carbonos sp^2 [δ 137,96 (CH) e δ 129,10 (CH)] e pela ausência de sinal referente a carbono sp^3 sustentando oxigênio (em torno de δ 72) no espectro de RMN ^{13}C (Tabela 10, p. 110).



SvRH-1a Δ^{22} diidro

SvRH-1b Δ^{22}

Tabela 10. Dados de RMN (^1H : 400; ^{13}C 100 MHz, CDCl_3 , Hz) das substâncias **SvRH-1**, **SvRH-1b** e comparação com dados da literatura da *Sitostenona* e da *Estigmastenona* (Della-Greca *et al.*, 1990).

Posição	SvRH-1a		SvRH-1b		<i>Sitostenona</i>	<i>Estigmastenona</i>
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
1	35,17		35,62		35,68	35,68
2	33,42	2,23-2,40 (m)	33,52	2,23-2,40 (m)	33,89	33,89
3	200,93		200,93		198,92	198,92
4	122,46	5,68 (sl)	122,96	5,68 (sl)	123,64	123,64
5	173,63		173,67		171,01	171,1
6	32,73		32,73		32,86	32,86
7	31,70		32,07		32,07	32,07
8	35,24		35,24		35,73	35,73
9	53,33		53,33		53,04	53,84
10	38,41		38,41		38,58	38,58
11	20,64		20,67		21,03	21,03
12	39,27		39,27		39,48	39,48
13	42,91		42,91		42,35	42,35
14	55,55		55,55		55,94	55,94
15	23,82		24,88		24,12	24,12
16	29,04		28,56		28,10	28,10
17	55,65		55,65		56,08	56,08
18	11,79	0,68 (s)	11,74	0,68 (s)	11,98	11,98
19	16,89	1,16 (s)	16,89	1,16 (s)	17,38	17,38
20	35,82		40,20		36,10	40,96
21	18,54	0,98 (d, J = 6,6)	20,76	0,98 (d, J = 6,6)	18,72	21,20
22	33,52		137,96	5,18 (dd, J 15,2; 8,6)	34,01	138,29
23	25,08		129,10	5,05 (dd, J 15,2; 8,6)	25,99	129,28
24	45,49		50,96		45,80	51,22
25	28,77		32,07		29,11	31,90
26	20,65		20,08		19,81	21,20
27	19,35		19,76		19,18	19,18
28	22,69		25,65		33,10	25,39
29	11,52		11,55		11,14	11,14

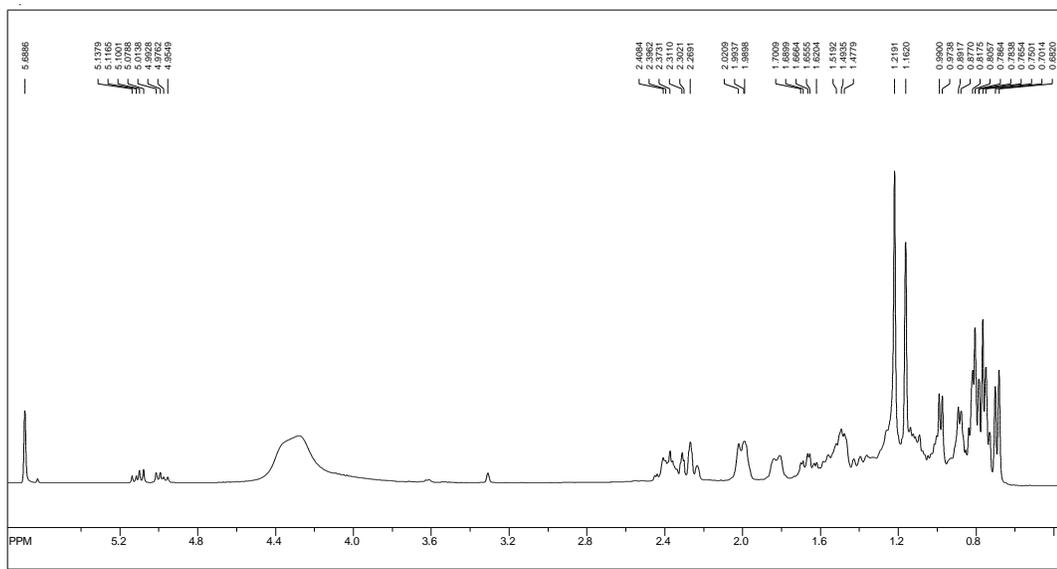


Figura 40. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) das substâncias SvRH-1a e SvRH-1b

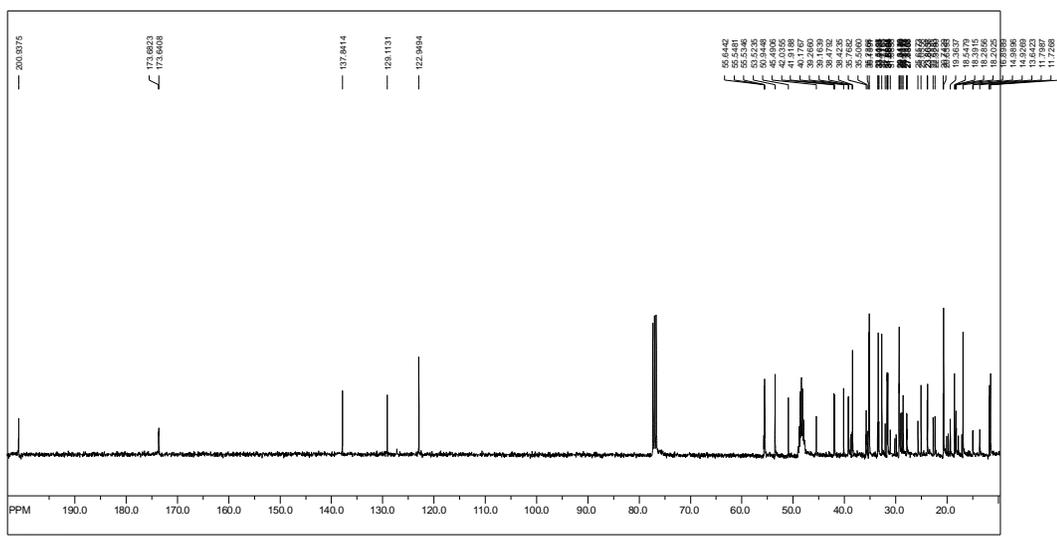


Figura 41. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) das substâncias SvRH-1a e SvRH-1b

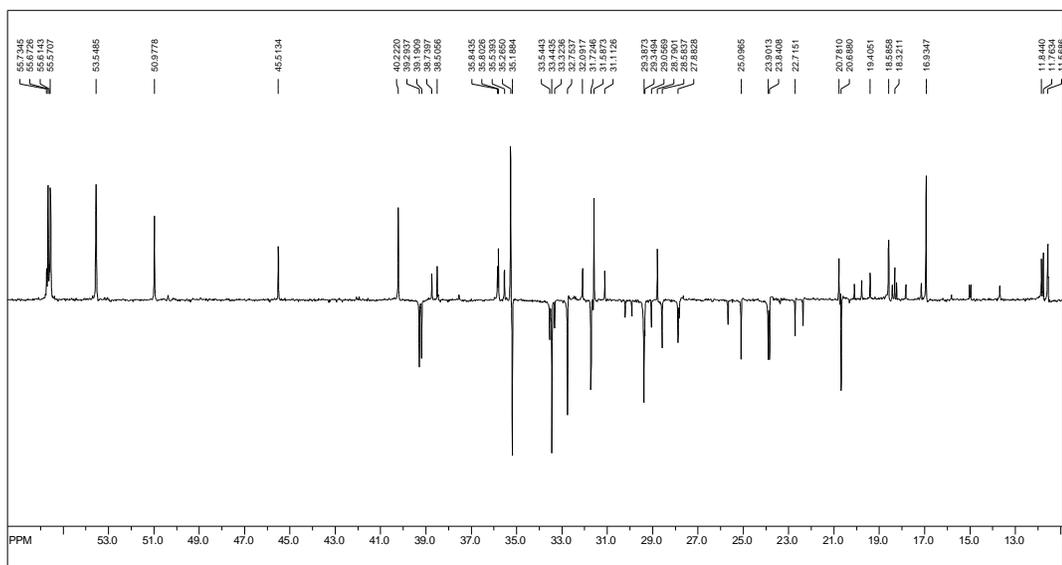
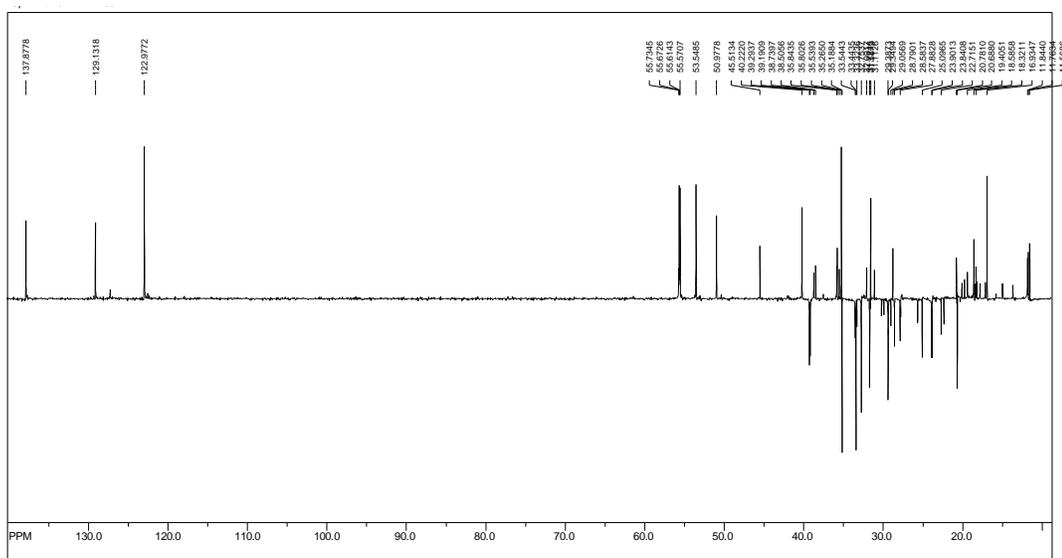


Figura 42. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (100 MHz, CDCl_3) das substâncias **SvRH-1a** e **SvRH-1b**.

6. Considerações Finais

6. Considerações Finais

Os resultados obtidos no presente trabalho, envolvendo a avaliação das atividades larvicida (larvas do 4º estágio do *Aedes aegypti*), antioxidantes (DPPH), teor de fenóis totais e toxicidade frente à *Artemia salina*, bem como a investigação fitoquímica com extratos da espécie *Spermacoce verticillata* G. Mey (Rubiaceae), permitiram relacionar as seguintes considerações:

- ❖ Nos ensaios frente larvas do 4º estágio do *A. aegypti*, dentre os extratos testados, os melhores resultados foram obtidos com as frações em hexano do caule e das raízes, hexano (hexano) e hexano-AcOEt 9:1 das partes aéreas forneceram resultados promissores nos ensaios preliminares, estas foram consideradas ativas em comparação com dados da literatura. Nos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina*, dentre as amostras que avaliadas, apenas três [Hexano- AcOEt (7:3), (1:1) e AcOEt do extrato hexano das partes aéreas] mostraram alta toxicidade. No entanto, nenhuma delas foi ativa como larvicida;
- ❖ Dentre os extratos e substâncias isoladas em ensaios qualitativos frente ao radical DPPH, os resultados revelaram uma possível atividade antioxidante somente para o extrato bruto em EtOH, fração em AcOEt e em hexano (hexano) das partes aéreas, extrato bruto em EtOH e fração em AcOEt das raízes bem como para as substâncias codificadas de **SvPA-1** e **SvPA-3**. Destes, somente o extrato bruto em **EtOH** das raízes, fração em **AcOEt** das partes aéreas e as substâncias codificadas de **SvPA-3** e **SvPA-1**, atividade comparável aos controles positivos utilizados. Por outro lado, os extratos em EtOH e e as frações em hexano (hexano) das partes aéreas e AcOEt das raízes forneceram valores de CI_{50} superior a 200 $\mu\text{g/mL}$, sendo, portanto, considerado fracamente ativo ou inativo. Entretanto, somente a fração em AcOEt das partes aéreas mostrou correlação com o teor de fenóis totais;
- ❖ A investigação fitoquímica efetuada com os extratos de *S. verticillata*, conduziu ao isolamento de dois flavonoides (*Quercetina* e a *3-O- α -L-Rhamnopyranosilquercetina*), uma antraquinona (*2-Hidroxi-3-metilantraquinona*), quatro triterpenos (*Ácidos Ursólico, Oleanólico e Morólico*, e *3,15-Dioxofriedelano*), além de uma mistura composta por dois fitoesteroides (*Sitostenona* e *Estigmastenona*). Estas substâncias

tiveram suas estruturas identificadas com bases na análise dos dados de RMN em uma e duas dimensões e comparação com os dados da literatura. Dentre as substâncias isoladas os compostos *3,15-Dioxofriedelano*, *2-Hidroxi-3-metilantraquinona*, os ácidos *Oleanólico* e *Morólico* estão sendo descritos pela primeira vez no gênero.

É de grande importância o estudo de plantas com propriedades terapêuticas, permitindo a confirmação e até ampliando desse potencial. Os resultados obtidos permitiram a ampliação do conhecimento quimiotaxonômico, com o isolamento de nove substâncias desta quatro estão sendo descritas pela primeira vez nos gêneros *Borreria* e *Spermacoce*, bem como a ampliação das atividades biológicas, em que alguns extratos, frações e das substâncias isoladas mostraram grande potencial larvicida e antioxidante.

7. Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

- Adewunmi, C.O., (1984) Natural products as agents of schistosomiasis control in Nigeria: a review of progress, *Int. J. Crude Drug Res.*, **22**, 161-166.
- Adewunmi, C.O.; Marquis V.O. (1983) A rapid *in vitro* screening method for detecting schistosomicidal activity of some Nigerian medicinal plants. *Int. J. Crude Drug Res.*, **21**, 157-159.
- Agarez, F.V. (1994) Sinopses das principais famílias In: Botânica: *Taxonomia, morfologia e reprodução dos Angiospermae*: Chaves para determinação das famílias. 2. ed., Rio de Janeiro: Âmbito Cultural. 93-236.
- Andre, R.; Delaveau, P.; Jacquemin, H. (1976) Phytochemical research on several Madagascan Rubiaceae, *Plant Med. Phytother.*, **10**, 233-242.
- Anesin, C.; Perez, C. (1993) Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.*, **39**, 119-128,.
- Antas D.S.; Maria T.S. da S.; Cláudio A. da S. L.; Albuquerque D. da C. *et al* (2006) Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Sida galheirensis* ULBR. (Malvaceae), *Quim. Nova*, **29**, 1250-1254.
- Akihisa, T.; Matsumoto, K.; Tokuda, H.; Yasukawa, K.; Seino, K.; Nakamoto, K.; Kuninaga, H.; Suzuki, T.; Kimura, Y. (2007) Anti-inflammatory and potential cancer chemopreventive constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni). *J. Nat. Prod.* **70**, 754-757.
- Arnão, M.B. (2000) Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radical: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, **11**, 419-421.
- Arot, L. O. M.; Williams, L.A.D. (1997) A flavonol glycoside from *Embelia schimperi* leaves. *Phytochemistry*, **44**, 1397-1398.
- Asprey, G.F.; Thornton, P. (1955) Medicinal plants of Jamaica, folklore, ethnomedical. *West Indian Med Journal*, **4**, 145-165.
- Aswal, B.S.; Bhakuni, D.S.; Goel, A.K.; Kar, K.; Mehrotra, B.N.; Mukherjee, K.C. (1984) Screening of Indian plants for biological activity. *Indian J. Exp. Biol.*, **22**, 312-332.
- Ayensu, E.S. (1978) Medicinal plants of the West Indies, folklore, ethnomedical. *Unpublished Manuscript*, **3**, 110.
- Bandoni, A.L.; Mendiondo, M.E.; Rondina, R.V.D.; Coussio, J.D. (1976) Survey of Argentine medicinal plants. folklore and phytochemical screening, folklore, ethnomedical. *Econ. Bot.*, **30**, 161-185.

- Baldé, A.M.; Pieters, L.A.; Gergely, A.; Wray, V.; Claeys, M.; Vlietinck, A.J. (1991) Spermacocaine, a bis-indole alkaloid from *Borreria verticillata*. *Phytochemistry*, **30**, 997-1000.
- Barbosa, M.R.V.; Sothers, C.; Mayo, S.; Gamarra-Rojas, C.F.L.; Mesquita, C.A. (2006) *Checklist das Plantas do Nordeste Brasileiro: Angiospermas e Gymnospermas*. Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasília: 135 – 140.
- Barros, G.S.G.; Matos, F.J.A.; Vieira, J.E.V.; Sousa, M.P.; Medeiros, M.C. (1970) Pharmacological screening of some Brazilian plants, *J. Pharm. Pharmacol.*, **22**, p. 116.
- Barroso, G.M.; Guimarães, E.F.; Ichaso, C.L.F.; Costa, C.G.; Peixoto, A.L.; Lima, H.C., (1986) Rubiaceae. In: *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. Viçosa. Editora Universidade Federal de Viçosa, **3**, 3 ed. 189-229p.
- Benjamin, T.V. (1979) Investigation of *Borreria verticillata*, an antieczematic plant of Nigeria, *J. Crude Drug. Res.*, **17**, 135-136.
- Benjamin, T.V. (1980) Analysis of the volatile constituents of local plants used for skin disease. *J. Afr. Med. Pl.*, **3**, 135-139.
- Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. (1999) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: the FRAP assay. *Analytical Biochem.*, **239**, 70-76.
- Bhadoria, B.K.; Gupta, R.K. (1981) Chemical constituents of *Borreria stricta* Linn. *J. Indian Chem. Soc.*, **58**, 202-203.
- Bouzada, M.L.M.; Fabri, R.L.; Nogueira, M.; Konno, T.U.P.; Duarte, G.G.; Scio E. (2009) Antibacterial, cytotoxic and phytochemical screening of some traditional medicinal plants in Brazil. *Pharm. Biol.*, **47**, 44-52.
- Brandão, M.G.L.; Cosenza, G.P.; Graef, C.F.; Netto Junior, N.L.; Monte-Mór, R.L.M. (2009) Traditional uses of American plant species from the 1st edition of Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev. Bras. Farmacognosia*, **19**, 478-487.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. (1995) Use of a radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, **28**, 25-30.
- Bremer, B. (1996) Phylogenetic studies within Rubiaceae and relationships to other families based on molecular data. *Oper Bot.*, **7**, 33-50.
- Burger, W.; Taylor, C.M. (1993) Flora Costaricensis. *Fieldiana*, **33**, 1-333.
- Butler, M.S.; (2004) The role of natural product chemistry in drug discovery. *J. of Natural Products*, **67**, 2141-2153.
- Candeias, J.A.N.L.; Alterthum, F.; Gompertz, O.F. (2002) Febre hemorrágica In: *Trabalhos de Microbiologia*. 3. ed., São Paulo: Atheneu, 539-542.

- Cantrell, C.L., Berhow, M.A., Phillips, B.S., Durval, S.M. Weisleder, D. Vaughn, S.F. (2003) Bioactive crude plant seed extracts from the NCAUR oilseed repository. *Phytomedicine* **10**, 325-333.
- Carbonezi, C.A.; Martins, D.; Young, M.C.; Lopes, M.N.; Furlan, M.; Rodriguez, F.E.; Bolzani, V.S., (1999) Iridoid and seco-iridoid glucosides from *Chiococca alba* (Rubiaceae) *Phytochemistry*, **51**, p. 781.
- Cerqueira, F.M.; De Medeiros, M.H.G.; Augusto, O. (2007) Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quím. Nova*, **30**, 441-449.
- Chaw, S.M.; Sivarajan, V.V. (1989) Seed coat micromorphology of some Asiatic Spermaceae (Rubiaceae). *Bot Bull Acad Sin*, **30**, 15-24.
- Chiquieri, A.; Di Maio, F.R.; Peixoto, A.L. (2004) A distribuição geográfica da família Rubiaceae Juss. na Flora Brasiliensis de Martius. *Rodriguésia*, **55**, 47-57.
- Chitra, M.; Farook, N.A.M.; Nalini, R.; Mozhiarasi, P.P.G. (2007) Hepatoprotective activity of *Borreria articularis* (Linn.) against paracetamol induced liver damage in rats. *Asian J. Chem.*, **19**, 2923-2927.
- Chorilli M.; Ricci G.L.; Regina H.N S. (2007) Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. *Rev. Bras. Farmacol.*, **3**, p. 88.
- Connolly, J.; Hill, R.A. (1991) Triterpenoids. *J. Methods in plant biochemistry*. London: Ed B. V. Charlwood and D. V. Banthorpe. V., **7**, 332-343.
- Conti R., (2007) Diversidade e atividade antimicrobiana de microrganismos endofíticos da planta medicinal *Borreria verticillata* (L.) G.F.W. Meyer, Dissertação mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, 8-10.
- Damak, M.; Riche, C. (1977) Structure and stereochemistry of indolic alkaloids III. Crystal and molecular structure of Borrelina. *Acta Crystallogr B; Struct Crystallogr Cryst Chem B*, **33**, 3415-3418.
- Dewick, P. M., (2002) Medicinal natural products: a biosynthetic approach, *Jhon wiley & Sons Ltd* 2 ed.
- Déciga-Campos, M.; Rivero-Cruz, I.; Arriaga-Alba, M.; Castaneda-Corral, Angeles-López, G.G.E.; Navarrete, A.; Mata, R. (2007) Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, **110**, 334-342.
- Della-Greca, M.; Monaco, P.; Previtiera, L. Studies on aquatic plants. (1990) Part XVI. Stigmasterols from *Typha latifolia*. *Journal of Natural Products*, **53**, 1430-1435.
- Dessein, S.; Huysmans, S.; Robrecht, E.; Smets, E. (2002a) Pollen of African *Spermaceae* species (Rubiaceae). Morphology and evolutionary aspects. *Grana*, **41**, 69-89.

- Dessein, S.; Jansen, S.; Robbrecht, E.; Smets, E. (2002b) A new species of *Spermacoce* (Rubiaceae) from the Manika high plateau (Katanga; R D. Congo). *Nord. J. Bot.*, **22**, 513-523.
- Dessein, S.; Ntore, S.; Robrecht, E.; Smets, E. (2003) Pollen and seeds reveal that *Spermacoce thymoidea* s.l. (African Rubiaceae, Spermacoceae) represents three endemic or disjunct species from the Zambezi High Plateaus. *Syst. Bot.*, **28**, 130-144.
- Dessein, S.; Robbrecht, E.; Smets, E. (2006) A new heterophyllous *Spermacoce* species (Rubiaceae) from the Marungu highlands (D. R. Congo). *Novon.*, **16**, 231-234.
- Ebana, R.; Madunagu, B.; Ekpe, D.; Otung, I.N. (1991) Microbiological exploitation of cardiac glycosides and alkaloids from *Garcinia kola*, *Borreria ocymoides*, *Kola nitida* and *Citrus aurantifolia*. *J. Appl. Bacteriol.*, **71**, 398-401.
- Eiras, A.E.; Culicida In: neves, D.P.; Melo, A.L.; Genaro, O.; Linari, P.M. (2003) *Parasitologia Humana*. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 320-333.
- Ekpendu, T.O.E.; Ekundayo, O.; Laakso, I. (2001) Constituents and antimicrobial activity of the volatile oil of *Spermacoce verticillata* Linn - a Nigerian medicinal rubiaceous weed. *J. Chem. Soc. Nigeria*, **26**, 194-198.
- Ekpendu, T.O.E.; Ekundayo, O.; Laakso, I. (2002) Constituents of the volatile oil of *Spermacoce ocymoides* (Syn. *Borreria scrabra*) (Rubiaceae). *J. Chem. Soc. Nigeria*, **27**, 147-149.
- Ester A.A.C.; Gomes L. F. (2002) Considerações sobre dengue clássico e o hemorrágico; *Pharmacia Brasileira*, **30**, 49-54.
- Ferreira, M.A.; Branco, C.S.L.; Sliwoski, J.K. (1978) Chemical study of alkaloids in *Borreria verticillata* (L.) G.F.W. Meyer. *Lloydia*, **41**, p. 655
- Finney, D.J. (1972) *Probit Analyses*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Floriani, V.N.; Buffon D.I.; Cechinel V.F. (2006) Gênero *Calophyllum*: Importância química e farmacológica, *Quím. Nova*, **29**, 549-554.
- Fujikawa, T.; Kawamura, N. (2009) Asperuloside and its analogs from *Eucommia ulmoides* extracts as muscle anabolic steroids. Patent Jpn., JP009209088-A; JP 20090917.
- Funk, V.; Hollowell, T.; Berry, P.; Kelloff, C.; Alexander, S.N. (2007) Checklist of the plants of the Guiana Shield (Venezuela: Amazonas, Bolívar, Delta Amacuro; Guyana, Surinam, French Guiana). *Contributions from the United States National Herbarium*, 551-584.
- Furtado, R.F., Lima, M.G.A., Neto, M.A., Bezerra, J.N.S., Silva, M.G.V. (2005) Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Neotrop. Entomol.* **34**, 843-847.

Gobbo-Neto L., Lopes N. P. (2007) Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários, *Quim. Nova*, **30**, 374-381.

Gusmão, D.S.; Pascoa, V.; Mathias, L.; Vieira, I.J.C.; Braz-filho, R.; Lemos, F.J.A. (2002) Derris (*Lonchocarpus*) urucu (*Leguminosae*) extract modifies the peritrophic matrix structure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **97**, 371-375.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (2000) *Free radicals in biology and medicine*. 3. ed. New York: Oxford Science Publications, p. 936.

Harbone, J. B.; Baxter, H. (1993) *Phytochemistry Dictionary – A handbook of bioactive compounds from plants*. London: ed. Taylor and Francis

Harada, T.N.; (2010) Correlação entre os ensaios de citotoxicidade em *artemia salina* Leach e atividade antineoplásica sobre linhagens de células tumorais para algumas classes de produtos naturais. Dissertação de mestrado-Programa de Pós-graduação/Saúde e desenvolvimento na região centro-oeste – UFMS

Hottz, D.; Pereira M.V.L.M.; Gomes M. (2007) Rubiaceae Juss. Da Marambaia, Rio de Janeiro: IX oróideae. *Revista Brasileira de Biociências*, **5**, 642-644

Inouye, H.; Takeda, Y.; Uobe, K.; Yamauchi, K.; Yabuuchi, N.; Kuwano, S. (1974) Purgative activities of iridoid glucosides. *Planta Med.*, **25**, 285-288.

Jain, S.P.; Verma, D.M. (1981) Medicinal plants in the folk-lore of North-East Haryana, folklore, ethnomedical. *Natl. Acad. Science. Lett.*, **4**, 269-271.

Jossang, A., Jacquemin, H.; Pousset, J.L.; Cave, A. (1981) Alkaloids of *Borreria capitata*, *Planta Med.*, **43**, 301-304.

Jossang, A.; Jacquemin, H.; Pousset, J.L.; Cave, A.; Damak M.; Riche C. (1977a) Structure of borrelina a new indolic alkaloid. *Tetrahedron Lett.*, **14**, 1219-1220.

Jossang, A., Pousset, J.L.; Jacquemin, H.; Cave, E. (1977b) Structure of Borrecapine, a new indole alkaloid. *Tetrahedron Lett.*, **49**, 4317-4318.

Jungues, M.J.; Fernandes, J.B.; Vieira, P.C.; Fernandes, M.F.G.S.; Filho, E.R.; Fruhauf, M.; Baranano, A. G. (2000) Triterpenos ursânicos e oleanânicos isolados do caule de *Eugenia florida* DC. *Revista de pesquisa e pós-graduação*, **1**, 13-30.

Kamiya, K.; Hamabe, W.; Harada, S.; Murakami, R.; Tokuyama, S.; Satake, T. (2008) Chemical constituents of *Morinda citrifolia* roots exhibit hypoglycemic effects in streptozotocin-induced diabetic mice. *Biol Pharm Bull* **31**:935-938

Kamiya, K.; Fujita, Y.; Saiki, Y.; Hanani, E.; Mansur, U.; Satake, T. (2002) Studies on the constituents of Indonesian *Borreria latifolia*. *Heterocycles*, **56**, 537-544.

Kamiya, K.; Hamabe, W.; Harada, S.; Murakami, R.; Tokuyama, S.; Satake, T. (2008) Chemical constituents of *Morinda citrifolia* roots exhibit hypoglycemic effects in streptozotocin-induced diabetic mice. *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 935-938.

Kapadia, G.J.; Sharma, S.C.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Ueda, S. (1996) Inhibitory effect of iridoids on Epstein-Barr virus activation by a short-term *in vitro* assay for anti-tumor promoters. *Cancer Lett*, **102**, 223-226.

Kapoor, S.K.; Prakash, L.; Zaman, A. (1969) Chemical constituents of *Borreria hispida*. *Indian J. Appl. Chem.*, **32**, 402-403.

Karen L.G. T., Jorge E.A. M., (2004) Desenvolvimento do rudimento seminal em *Borreria verticillata* (L.) G. Mey., *Revista Brasil. Bot.*, **27**, p.185-192.

Kaviarasan, K.; Kalaiarasi, P.; Pugalendi, V. (2008) Antioxidant efficacy of flavonoid-rich fraction from *Spermacoce hispida* in hyperlipidemic rats. *J. Appl. Biomed.*, **6**, 165-176.

Kaviarasan, K.; Pugalendi, K.V. (2009) Influence of flavonoid-rich fraction from *Spermacoce hispida* seed on PPAR- α gene expression, antioxidant redox status, protein metabolism and marker enzymes in high-fat-diet fed STZ diabetic rats. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, **20**, 141-158.

Keiser, I.; Harris, E.J.; Miyashita, D.H.; Jacobson, M.; Perdue, R.E., (1975) Attraction of ethyl ether extracts of 232 botanicals to oriental fruit flies, melon flies, and mediterranean fruit flies. *Lloydia*, **38**, 141-152.

Kårehe, J.; Groeninckx, I.; Dessein, S.; Motley, T.J.; Bremer, B. (2008) The phylogenetic utility of chloroplast and nuclear DNA markers and the phylogeny of the Rubiaceae tribe Spermacoceae. *Molec Phylog Evol*, **49**, 843-866.

Khan, S.S.; Chaghtai, S.A.; Oommachan, M., (1984) Medicinal plants of Rubiaceae of bhopal-an ethnobotanical study. *J. Science. Res.*, **6**, 37-39.

Kim, D.H.; Lee, H.J.; Oh, Y.J.; Kim, M.J.; Kim S.H.; Jeong, T.S.; Baek, N.I. (2005) Iridoid glycosides isolated from *Oldenlandia diffusa* inhibit LDL-oxidation. *Arch. Pharm. Res.*, **28**, 1156-1160.

Kim, J., (2005) Radical scavenging capacity and antioxidant activity of the e vitamers fraction in rice bran. *Food Chem. Toxicology*, **70**, 208-213.

Kitajima, M.; Fischer, V.; Nakamura, M.; Ohsawa, M.; Ueno, M.; Takayama, H.; Unger, M.; Stockgt, J.; Aimi, N. (1998) Anthraquinones from *Ophiorrhiza pumila* tissue and cell culture. *Phytochemistry*, **48**, 107-111.

Kohler, L.; Jenett-Siems, K.; Mockenhaupt, F.P.; Siems, K.; Jakupovic, J.; Gonzalez, J.C.; Hernandez, M.A.; Ibarra, R. A.; Berendsohn, W.G.; Bienzle, U.; Eich, E. (2001) *In vitro* antiplasmodial activity of 4-phenylcoumarins from *Exostema mexicanum*. *Planta Med.*, **67**, 89-91.

Komai, K.; Iwamura, J.; Hamada, M.; Ueki, K. (1986) Plant growth inhibitors in catchweed seeds and their allelopathy. *Zasso Kenkyu*, **31**, 280-286.

- Komai, K.; Nakasugi, T.; Tujii, I.; Miura, M.; Hamada, M. (1990) Plant growth inhibitory activities of iridoid glucosides. *Zasso Kenkyu*, **35**, 44-52.
- Largato, A. P.; Silva, R. V.; Iglesias, L. B. (2001) Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ Vaule en mice, to determine oral ocuta toxyty of plant extracts. *Phytomedicine*, **8**, 395-400.
- Leparc-Gaffart, I.; Baradatti, M.; Tuiskunen A.; Moureau G.; Charrel R.; Lambollerie X. (2009) Developenet and validation of real-time one-step reverse transcription-PCR for the detection and typing of dengue viruses. *Journal of Clinical virology*, **45**, 61-66.
- Li, B. (2007) Application of asperuloside for preparing drugs for treating rheumatoid arthritis. Patent Peop. Rep. China. CN1915236-A; CN100425243-C, 21 Feb 2007.
- Ling, S.K.; Komorita, A.; Tanaka, T.; Fujioka, T.; Mihashi, K.; Kouno, I. (2002) Iridoids and anthraquinones from the Malaysian medicinal plant, *Saprosma acortechinii* (Rubiaceae), *Chem. & Pharm. Bull.*, **50**, 1053-1040.
- Ling, S.K.; Tanaka, T.; Kouno, I. (2003) Effects of iridoids on lipoxygenase and hyaluronidase activities and their activation by β -glucosidase in the presence of amino acids. *Biol. Pharm. Bull*, **26**, 352-356.
- Liu, G.; Bode, A.; Ma, W-Y.; Sang, S.; Ho, C-T.; Dong, Z. (2001) Two novel glycosides from the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) inhibit AP-1 transactivation and cell transformation in the mouse epidermal JB6 cell line. *Cancer Res.*, **61**, 5749-5756.
- Loray, Z. Vitamina C: (1999) Antioxidante e protetor de colágeno. *Rev. Cosmiatria & Estética*, **7**, 15-17.
- Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. (2002) Plantas medicinais do Brasil. Nova Odessa, São Paulo.
- Lucas, V.; Machado, O. (1944) Medical Rubiaceae of Brazil. *Rev. Flora Med.*, **11**, 3-36.
- Mabberley, D.J. (1987) *The plant book: a portable dictionary of the higher plants*. Cambridge: Cambridge University Press. 699 p.
- Machado, I.C.; Loiola, M.I. (2000) Fly pollination and pollinator sharing in two synchronopatric species: *Cordia multispicata* (Boraginaceae) and *Borreria alata* (Rubiaceae). *Rev. Bras. Botânica*, **23**, 305-311.
- Mahato, S.B. Kundu, A.P. (1994) ¹³C NMR Spectra of pentaciclic triterpenoids – A compilation some salient features. *Phytochemistry* **47**, 1517-1575.
- Manandhar, N.P. (1995) An Inventory of some vegetable drug resources of Makawanpur District Nepal, fitoterapia folklore, ethnomedical. *Fitoterapia*, **66**, 231-238.
- Marcos C. de M. S.; Rocha H. S.; Majela G.V.Jr.; Cruz M.C.; Luis C.L.S.C.; Sérvulo D.A.; Carlos L.D.C.; Daniel E.S.B.; Breitner P. M. (2007) Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quimica Nova*, **30**, 351-355.

- Margalho, L.F.; Sousa da Rocha A.E.; Secco, R.S. (2009) Rubiaceae Juss. da restinga da APA de Algodoal/Maiandeuá, Maracanã, Pará, Brasil. *Bol Mus Para Emílio Goeldi. Cienc. Nat.*, **4**, 303-339.
- Markham K. (1989) Flavones, flavonols and their glycosides, *Methods in plant biochemistry. J. Harborne.* **1**, 197-232.
- Martinez-Croveto, R. (1981) Fertility-regulating Plants used in popular medicine in Northeastern Argentina, folklore, ethnomedical. *Parodiana*, **1**, 97-117.
- Matos, F. J. A., (1997). Introdução à Fitoquímica Experimental. 2 ed., Fortaleza, Edições UFC.
- Maynard, G.; Pousset, J.L.; Mboup, S.; Denis, F. (1980) Antibacterial activity of Borreverine, an alkaloid isolated from *Borreria verticillata* (Rubiaceae). *Soc. Biol.*, **174**, 925-928.
- Médus, J. & Sanakho, A. (1974). Description palynologique de quelques espèces des genres *Borreria* G.F.W. Mey (Rubiaceae) et *Hygrophila* R. Br. (Acanthaceae). *Bulletin de l'Institut Fondamental d'Afrique Noire.* **36**, 379-391.
- Mendonça, F.A.; Veiga A.S.; Almeida D.D. (2009) Saúde pública, urbanização e dengue no Brasil. *Sociedade & Natureza* **21**, 257-269.
- Miura, T.; Nishiyama, Y.; Ichimaru, M.; Moriyasu, M.; Kato, A. (1996) Hypoglycemic activity and structure-activity relationship of iridoidal glycosides. *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 160-161.
- Mongelli, E.; Coussio, J.; Cidia, G. (2002) Investigation of the larvicidal activity of *Pothomorphe peltata* an isolation of the active constituents. *Phytotherapy research*, **16**, 571-572.
- Morais, S.M.; Covalanti E.S.B.; Costa, S.M.O.; Aguiar L.A. (2009) Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Rev. Bras. de Farmacognosia*, **19**, 315-320.
- Moreno, A.R. (1975) Two hundred sixty-eight medicinal plants used to regulate fertility in some countries of South America, folklore ethnomedical.
- Moreira, E.A. (1964) Identification of Emetine in some *Borreria Species*. *Trib. Farm.*, **32**, 9-30.
- Moreira, V.F.; Oliveira, R.R.; Mathias, L.; Braz-Filho, R.; Vieira, I.J.C. (2010) New chemical constituents from *Borreria verticillata* (Rubiaceae). *Helv. Chim. Acta*, **93**, 1751-1757
- Mukherjee, K.S.; Manna, T.K.; Laha, S.; Chakravorty, C.K., (1993) Phytochemical investigation of *Borreria articularis* Linn, *J. Indian Chem. Soc.*, **70**, 609-610.

- Mukherjee, K.S.; Manna, T.K.; Laha, S.; Brahmachari, G. (1994) Chemical investigation of *Limnophila heterophylla* and *Borreria articularis*. *J. Indian Chem. Soc.*, **71**, 655-656.
- Mukherjee, K.S.; Mukhopadhyay, B.; Mondal, S.; Gorai, D.; Brahmachari, G. (2004) Triterpenoid constituents of *Borreria articularis*, *J. Chin. Chem. Soc.*, **51**, 229-231.
- Neto, P.A.D.S.P.; Silva, M.V.; Campos, N.V.C.; Portifiro, Z.; Caetano, L.C. (2002) Antibacterial activity of *Borreria verticillata* Roots, *Fitoterapia*, **73**, 529-531.
- Noiarsa, P.; Yu, Q.; Matsunami, K.; Otsuka, H.; Ruchirawat, S.; Kanchanapoom, T. (2007) (Z)-3-hexenyl diglycosides from *Spermacoce laevis* Roxb. *J. Nat. Med.*, **61**, 406-409.
- Nogueira, L.J.; Motanari, C.A.; Donnici, C.L., (2009) Histórico da evolução da química medicinal e a importância da lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansch. *Rev. Virtual Quim.*, **3**, 227-240.
- Okwuosa, C.N.; Nwachukwu, D.C.; Achukwu, P.U.O.; Ezeorah, C.G.; Eze, A.A. (2009) Anti-ulcer activity of the leaf extracts of *Borreria ocymoides* in rats. *Bio-Research* **7**: Abstract
- Oliveira, C. M.; Schenkel E.P.; Gosmann G.; Mello J.C.P.; Mentz L.A.; Petrovick P.R. (2004) *Farmacognosia: da planta ao medicamento* Editora UFRGS, 5 ed.
- Oliveira, P.V.; Ferreira Júnior, J.C.; Moura, F.S.; Lima, G.S.; de Oliveira F.M.; Oliveira P.E.S.; Conserva, L.M.; Giuliatti, A.M.; Lemos, R.P.L. (2010) Larvicidal activity of 94 extracts from ten plant species of northeastern of Brazil against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res.* **107**, 403-407.
- Orazi O.O. (1946) The phytochemical study of *B. verticillata*. *Rev Fac Cienc Quim, Universidad Nacional de La Plata*, **19**, 17-28.
- Parra, A.L.; Yhebra, R.S.; Sardinas, I.G.; Buela, L.I. (2001) Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the Medium Letal Dose (LD₅₀ vaule) in mice, to determine oral acute toxicity of plants extracts. *Phytomedicine*, **8**, 395-400.
- Peixoto Neto, P.A.S.; Silva, M.V.; Campos, N.V.C.; Porfirio, Z.; Caetano, L.C. (2002) Antibacterial activity of *Borreria verticillata* roots. *Fitoterapia*, **73**, 529-531.
- Pereira, Z.V.; Carvalho-Okano, R.M.; Garcia, F.C.P. (2006) Rubiaceae Juss. da Reserva Florestal Mata do Paraíso, Viçosa, MG, Brasil. *Acta Bot Bras*, **20**, 207-224.
- Pereira, Z.V.; Gomes, C.F.; Lobtchenko, G.; Gomes, M.E.S.; Simões, P.D.A.; Saruwatari, R.P.S.; Rigo, V.F.; Cordeiro, W.P. (2007) Levantamento das Plantas Medicinais do Cerrado *Sensu Stricto* da Fazenda Paraíso – Dourados, MS. *Rev. Bras. Biociência*, **5**, 249-251.
- Perez, C; Anesini, C, (1994a) Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by Argentinean medicinal plants, *Fitoterapia*, **65**, 169-172.
- Perez, C; Anesini, C, (1994b) *In Vitro* antibacterial activity of Argentine folk medicinal plants against *Salmonella typhi*, *J. Ethnopharmacol.*, **44**, 41-46.

- Permana, D.; Lajis, N.H.; Abas, F.; Othman, A.G.; Ahmad, R.; Kitajima, M.; Takayama, H.; Aimi, N. (2003) Antioxidative constituents of *Hedyotis diffusa* Willd. *Nat. Prod. Sci.*, **9**, 7-9.
- Phuong, N. M.; Van Sung, T.; Porzel, A.; Schmidt,.; Merzweiler, K.; Adam, G. (1999) β -Carboniline alkaloids from *Hedyotis captellata*. *Phytochemistry*, **52**, 1725-1729.
- Pinto A.C.; Helena D.S.S.; Peporine L.N.; Silva V.B.; Almeida R.E. (2002) Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quim. Nova*, **25**, 45-61.
- Pohlit, A.M.; Quignard, E.L.J.; Nunomura, S.M.; Tadei, P.W.; *et al.* (2004) Screening of plants found in the state of Amazonas, Brazil for larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae. *Acta Amazonica*, **34**, 97-105.
- Prophiro J.P.; Chedid, J.C.R.; Alberto K.L.; Gonçalves T.S.; Santos O. S. (2008) Estudo Comparativo do efeito larvicida de extratos de frutas verdes e maduros de *Melia azedorach* L. (*Sapindales: Meliaceae*) em *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae), *Bioassay* 3:2, 1-5.
- Pousset, J.L.; Kerharo J.; Maynard, G.; Monseur, X.; Cave, A.; Goutarel, R. (1973) Borrerine new alkaloid isolated from *Borreria verticillata*. *Phytochemistry*, **12**, 2308-2310.
- Pousset, J.L.; Cave, A.; Chiaroni, A.; Riche, C. (1977) A novel bis-indole alkaloid. X-ray crystal structure determination of Borreverine and its rearrangement product on diacetylation, *Chem. Commun*, **8**, 261-262.
- Póvoa Filho, H. (1995) Antioxidantes. In: *Patologics Human*, Rio de Janeiro: *Imago*, 247-266.
- Póvoa, H. (1995). Radicais Livres: em Patologia Humana. Rio de Janeiro: *Imago*, 211-246.
- Purushothaman, K.K.; Kalyani, K. (1979) Isolation of Isorhamnetin from *Borreria hispida* Linn, *J. Res. Indian Med. Yoga Homeopathy*, **14**, 131-132.
- Pu Zhang, Hao J., Liu J., Zhang L., Sun H. (2009) Efficient synthesis of morolic acid and related triterpenes starting from botulin, *Tetrahedron*, **65**, 4304-4309.
- Rates, S.M.K. (2001) Plants as source of drugs. *Toxicon*, **39**, 603-613.
- Rahman, M.A.; Uddin, S.B.; Wilcock, C.C. (2007) Medicinal plants used by *Chakma* tribe in Hill districts of Bangladesh. *Indian J Trad Knowl*, **6**, 508-517.
- Rodrigues A.M.S.; Paula J.E.; Roblot F.; Fournet A. Espíndola L.S. (2005) Larvicidal activity of *Cybistax antisyphilitica* against *Aedes aegypti* larve. *Fitoterapia*, **76**, 755-757.
- Rohrig, E.; Sivinski, J.; Teal, P.; Stuhl, C.; Aluja, M. (2008) A Floral-derived compound attractive to the tephritid fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). *J. Chem. Ecol.*, **34**, 549-557.
- Sainty, D.; Bailleul, F.; Delaveau, P.; Jacouemin,H.; (1981) Iridoids of *Borreria verticilata*, *Planta Med.*, **42**, 260-264.

Sánchez-Moreno, C.; Larrauri, J.A.; Saura-Calixto, F. (1998) A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Science Food and Agriculture*, **76**, 270-276.

Secretaria de Vigilância Sanitária. (2008a) Ministério da Saúde: situação da febre amarela silvestre no Brasil. Brasília: Boletim SVS, 5p.

Secretaria de Vigilância Sanitária. (2001) Ministério da Saúde: Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor. Manual de normas técnicas. 3. ed, Brasília: Boletim SVS, 84p.

Secretaria de Vigilância Sanitária. (2008) Ministério da Saúde: Informe epidemiológico da dengue, Janeiro a Abril de 2008. Brasília: Boletim SVS, 83p.

Saha, K.; Lajis, N.H.; Israf, D.A.; Hamzah, A.S.; Khozirah, S.; Khamis, S.; Syahida, A. (2004) Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malaysian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol*, **92**, 263-267.

Shah, G.L.; Gopal, G.V. (1985) Ethnomedical notes from the tribal inhabitants of the North Gujarat, Folklore, Ethnomedical. *J. Econ. Taxon Botany*, **6**, 193-201.

Shajiselvin, C.D.; Kottai Muthu A. (2010) *In-vitro* antioxidant studies of various extracts of whole plant of *Borreria hispida* (Linn) Res. *J. Pharm. Biol. Chem. Sci.*, **1**, 14-20.

Sharma, K.M.N.; Gupta, R.K. (1987) Chemical constituents of *Borreria Stricta* seeds, *Fitoterapia*, **58**, 135-136.

Shinghi, S; Kisson, N.; Bansal, A. (2007) Dengue and Hemorrhagic Fever: Management Issues in an Intensive Care Unit. *J. Pediatrics*, **83**, 22-35.

Silva, L.L.; Heldwein C.G.; Reetz L. G.B.; Horner R.; Mallmann C. A.; Heinzmann B.M. (2010) Composição química, atividade antibacteriana *in vitro* e toxicidade em *Artemia salina* do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L. Lamiaceae, doi: 10.1590/S0102-695X2010005000010

Siqueira. J.M.; Bomm M.D.; Pereira N.F.G.; Garcez W.S.; Boaventura M.A.D. (1998) Estudo fitoquímico de *Unonopsis Lindmonie*-Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach, **21**, 557-559.

Socorro M.P.; Regina M.V.B. (2004) A família Rubiaceae na reserva biológica guaribas, Paraíba, Brasil. Subfamílias Antirheoideae, Cinchonoideae e Ixoroideae. *Acta Bot. Bras.*, **18**, 305-318.

Soler-Rivas C.; Espín J.C.; Wichers H. J. (2000) An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis*, **11**, 330-338

Soong, Y.Y., Barlow, P. J., (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, **88**, 411-417.

Souza, V.C.; Lorenzi, H.(2005) Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. *Nova Odessa*, São Paulo.

Sousa, M.P.; Matos, F.J.A.; Tavares, T. (1969) Systematic analysis in phytochemistry. *Rev. Bras. Farm.* **50**, 65-72.

Sousa, C.M.M.; Silva, H.R.; Vieira-Jr, G.M.; Ayres, M.C.C.; Barros E.D.S.; Araujo, P.M.; Brandão, M.S.; Chaves, M.H., (2007) Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quím. Nova*, **30**, 351-355.

Sripathi, S.K.; Sankari, U. (2010) Ethnobotanical documentation of a few medicinal plants in the Agasthiyamalai region of Tirunelveli District, India. *Ethnobot. Leaf.*, **14**, 173-181.

Steeffeld, C. (1968) What the Herbalists of Pelotas (Brazil) Sell. *Pharm. Biol.* **8**, 1300-1303.

Sultana, R.; Rahman, M.S.; Bhuiyan, M.N.I.; Begum, J.; Anwar, M.N. (2008) *In vitro* antibacterial and antifungal activity of *Borreria articularis*. *Bangladesh J. Microbiol.* **25**, 95-98.

Su, B-N.; Pawlus, A.D.; Jung, H-A., Keller W.J.; McLaughlin, J.L.; Kinghorn, A.D. (2005) Chemical constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) and their antioxidant activity. *J. Nat. Prod.*, **68**, 592-595.

Sultana, R.; Rahman, M.S.; Bhuiyan, M.N.I.; Begum, J.; Anwar, M.N. (2008) *In vitro* antibacterial and antifungal activity of *Borreria articularis*. *Bangladesh J Microbiol*, **25**, 95-98.

Surveswaran, S.; Cai, Y.Z.; Corke, H.; Sun, M. (2007) Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chem.*, **102**, 938-953.

Suzele, C.F.; Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, *et al.* (2004) Abordagens Biotecnológicas para Obtenção de Substâncias Ativas. In: Simões, C.M.O. Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A., Petrovick P R.. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Ed. Universidade/UFRGS, Porto Alegre, 5ed, p. 821.

SVS/MS (2008/2009) Secretaria de vigilância em saúde / Ministério da saúde, Boletim de atualização 2009, Emergências em saúde pública de importância nacional (ESPIN) de febre amarela silvestre em São Paulo e no Rio grande do Sul e a situação epidemiológica atual do Brasil.

SVS/MS (2010) Secretaria de vigilância em saúde / Ministério da saúde, Informe epidemiológico da dengue, análise de situação e tendências.

Telesi, M.; Machado F.A.; (2008) A influencia do exercício físico e dos sistemas antioxidantes na formação de radicais livres no organismo humano. *SaBios: Ver, Saúde E Biol.*, **3**, 40-49.

Tzakou, O.; Mylonas, P.; Vagias, C.; Petrakis, P.V. (2007) Iridoid glucosides with insecticidal activity from *Galium melanantherum*. *Z Naturforsch, C. J. Biosci.*, **62**, 597-602.

Vadivelan, S.; Sinha, B.N.; Betanabhatla, K.S.; Christina, A.J.M.; Pillai, R.N.; (2007) Anti-inflammatory activity of *Spermacoce articularis* Linn on carrageenan induced paw edema in wistar male rats. *Pharmacologyonline*, **3**, 478-484.

- Vasanthi, H.R.; Mukherjee, S.; Lekli, I.; Ray, D.; Veeraraghavan, G.; Das, D.K. (2009) Potential role of *Borreria hispida* in ameliorating cardiovascular risk factors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **53**, 499-506.
- Vasconcelos, P.F.C. (2002) Febre amarela: reflexões sobre a doença. *Ver. Bras. Epidemiologia*, **5**, 245-248.
- Vieira, I.J.C.; Mathias, L.; Braz Filho, R.; Schripsema, J. (1999) Iridoids from *Borreria verticillata*. *Org. Lett.*, **1**, 1169-1171.
- Youngson, R. (1995) *Como combater os radicais livres: o programa de saúde dos antioxidantes*. Rio de Janeiro: Campus, p. 151.
- Wichtl, M. (2004) Herbal drugs and phytopharmaceuticals: A handbook for practice on a scientific basis. *Medpharm scientific publishers*, 3.ed. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, 59-65.
- Wikan N.; Kuadkithan A.; Smith D.R. (2009) The *Aedes aegypti* cell line CCL-125 is dengue virus permissive. *Journal of virological methods*, **155**, 34-35.
- Willaman, J.J.; Schubert, B.G. (1961) Alkaloid bearing plants and their contained alkaloids, *Govt Print Off*, **22**, 1234.
- WHO-World Health Organization (1981) Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticide. *WHO/VBC*, **81.807**, 1-6.
- Zamora-Martinez, M.C.; Pola, C.N.P. (1992) Medicinal plants used in some rural populations of Oaxaca, Puebla and Veracruz, Mexico. *J. Ethnopharmacol.*, **35**, 229-257.