



**Universidade Federal de Alagoas**  
Instituto de Química e Biotecnologia  
**Programa de Pós-Graduação em Química e**  
**Biotecnologia**



**IQB**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
MOLUSCÍCIDA E LARVÍCIDA DE *Tocoyena selloana* K. Schum.  
(RUBIACEAE)**

Marcos Oliveira Rocha

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Margarida Maria dos Santos Humberto

Maceió - Alagoas  
Dezembro de 2009



ICB

Universidade Federal de Alagoas  
Instituto de Química e Biotecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Química e  
Biotecnologia

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
MOLUSCÍCIDA E LARVICÍDIA DE *Tocoyena selloana* K. Schum.  
(RUBIACEAE)

Catlogação na fonte  
Universidade Federal de Alagoas  
Biblioteca Central

Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

R672e

Rocha, Marcos Oliveira.

Estudo fitoquímico e avaliação das atividades moluscicida e larvicida de  
*Tocoyena selloana* K. Schum. (Rubiaceae) / Marcos Oliveira Rocha, 2009.  
xii, 82 f. : il. grafs. e tabs.

Orientadora: Margarida Maria dos Santos Humberto.  
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal  
de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia, 2009.

Bibliografia: f. 77-82.

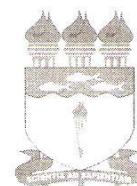
I. Fitoquímica. 2. *Tocoyena selloana*. 3. Rubiaceae. 4. D-Manitol. I. Título.

CDU: 544.9

Arquivo de 2009  
Macedo - Alagoas



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 Defesa de Dissertação de Mestrado de **Marcos Oliveira Rocha**, intitulada: “**Estudo Fitoquímico e Avaliação das Atividades Moluscicida e Larvicida de *Tocoyena selloana* K. Schum. (Rubiaceae)**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 03 de dezembro de 2009, às 13h30min, na Sala de Aulas do PPGQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Margarida dos Santos Humberto  
Orientadora - PPGQB/ IQB /UFAL

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lucia Maria Conserva  
PPBQB/IQB/UFAL

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia Emanuella Silva de Oliveira  
IFAL/Marechal Deodoro

## AGRADECIMENTOS

- À **Profa. Dra. Margarida Maria dos Santos Humberto**, pelos ensinamentos, paciência, estímulo e orientação;
- Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, em especial: **Lúcia Maria Conserva**, **Marília Oliveira Fonseca Goulart**, **Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana**, **Margarida Maria dos Santos Humberto** e **Marcia Pletsch**, pelos ensinamentos a mim repassados;
- Ao **Prof. Dr. Edson de Souza Bento** pela obtenção dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear;
- À botânica **Rosário de Fátima de Almeida Rocha** pela identificação do material vegetal;
- Aos técnicos **Aldy dos Santos** e **D. Margarida Tenório** pelo apoio e por tantas ajudas;
- Ao **Prof. Dr. Dennis de Oliveira Imbroisi**, por ter cedido o aparelho para determinação de ponto de fusão e a balança analítica;
- À **Profa. Dra. Simone Margaretti Plentz Meneguetti** pela obtenção dos espectros no Infravermelho;
- Ao **Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana**, pelo fornecimento dos solventes deuterados para a obtenção dos espectros de RMN;
- Ao **Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior** e a **Profa. Dra. Lucia Maria Conserva**, pela colaboração no Exame de Qualificação;
- Aos doutorandos **Cenira Monteiro** e **Karlos Lisboa** pela realização dos testes biológicos;
- Aos funcionários do Instituto de Química e Biotecnologia, em especial **Rejane Montenegro** por tantas ajudas;
- À **Danielle de Lima** do Laboratório de Pesquisa em Química dos Produtos Naturais pela amizade e inúmeros favores;
- Aos colegas e amigos do Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, em especial ao **Jataí Sobreira** e ao **Sivaldo Paulino** pelo apoio e amizade;
- À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL)** pelo apoio financeiro concedido através de bolsa de mestrado;
- A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Dedico este trabalho a Deus que está comigo em todos os momentos.

Aos meus pais Claudio e Mônica pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida, pela educação e bom exemplo que sempre me deram.

À minha amada esposa Magna pelo carinho, companheirismo e paciência.

“A grandeza não consiste em receber grandes honras, mas sim em merecê-las”

Aristóteles

## SUMÁRIO

Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	viii
Lista de Esquemas	ix
Lista de Quadros	ix
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos	x
Resumo	xi
Abstract	xii
<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Aspectos gerais dos produtos naturais	2
1.2 Considerações sobre a Família Rubiaceae	3
1.2.2 Estudos químicos sobre a família Rubiaceae	6
1.3 Considerações sobre o Gênero <i>Tocoyena</i>	11
1.4 Considerações sobre a Esquistossomose	14
1.5 Considerações sobre a Dengue	17
1.6 Caracterização do espécime	19
<b>2. Objetivos</b>	<b>20</b>
2.1. Objetivo Geral	21
2.2. Objetivos Específicos	21
<b>3. Parte Experimental</b>	<b>23</b>
3.1. Solventes, Reagentes e Equipamentos	23
3.2. Coleta e Identificação do Material Vegetal	24
3.3. Preparação dos Extratos das Folhas e do Caule	24
3.3.1. Preparação dos Extratos e Frações das Folhas	24
3.3.2. Preparação dos Extratos e Frações do Caule	25
3.4. Isolamento e Purificação das Substâncias	25
3.4.1. Fração em Hexano das Folhas de <i>Tocoyena selloana</i>	25
3.4.2. Fração em Clorofórmio das Folhas de <i>Tocoyena selloana</i>	27
3.4.3. Fração em Acetato de Etila das Folhas de <i>Tocoyena selloana</i>	29
3.4.4. Fração Aquosa Proveniente das Folhas de <i>Tocoyena selloana</i>	29
3.4.5. Fração em Acetato de Etila do Caule de <i>Tocoyena selloana</i>	29
3.4.6. Fração Aquosa do Caule de <i>Tocoyena selloana</i>	30
3.5. Ensaio Biológicos	33
3.5.1. Atividade Larvicida Frente às Larvas do Mosquito <i>Aedes Aegypti</i>	33
3.5.2. Atividade Moluscicida	34
3.6. Dados físicos e espectroscópicos das substâncias isoladas	35
3.6.1 Substância TsFA-1	35
3.6.2 Substância TsFH-1	35
3.6.3 Substância TsFC-2	35
3.6.4 Substância TsFC-1	36
<b>4. Resultados e Discussões</b>	<b>37</b>
4.1. Identificação Estrutural das Substâncias Isoladas	38
4.1.1 Identificação Estrutural da Substância TsFA-1	38
4.1.2 Identificação Estrutural da Substância TsFH-1	40
4.1.3 Identificação Estrutural da Substância TsFC-2	43
4.1.4 Identificação Estrutural da Substância TsFC-1	46
4.2. Resultados dos Testes de Atividade Biológica	49

4.2.1.	Atividade Larvicida	49
4.2.2.	Atividade Moluscicida	50
5.	<b>Considerações Finais</b>	51
6.	<b>Espectros das Substâncias Isoladas</b>	53
7.	<b>Referências Bibliográficas</b>	77



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Plantas ornamentais da família Rubiaceae	5
<b>Figura 2.</b>	Ciclo de vida do <i>schistosoma</i>	16
<b>Figura 3.</b>	Mosquito <i>Aedes aegypti</i>	18
<b>Figura 4.</b>	Fotos de <i>Tocoyena selloana</i> K. Schum.	19
<b>Figura 5.</b>	Espectro de IV da substância codificada de TsFA-1	54
<b>Figura 6.</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância codificada de TsFA-1	55
<b>Figura 7.</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C da substância codificada de TsFA-1	56
<b>Figura 8.</b>	Espectro de RMN DEPT da substância codificada de TsFA-1	56
<b>Figura 9.</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância codificada de TsFH-1	57
<b>Figura 10.</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de TsFH-1 (Ampliado)	58
<b>Figura 11.</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C da substância codificada de TsFH-1	59
<b>Figura 12.</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C de TsFH-1 (Ampliado)	60
<b>Figura 13.</b>	Espectro de RMN DEPT da substância codificada de TsFH-1	61
<b>Figura 14.</b>	Espectro de RMN DEPT de TsFH-1 (Ampliado)	62
<b>Figura 15.</b>	Espectro de IV da substância codificada de TsFC-2	63
<b>Figura 16.</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância codificada de TsFC-2	64
<b>Figura 17.</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de TsFC-2 (Ampliado)	65
<b>Figura 18.</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de TsFC-2 (Ampliado)	66
<b>Figura 19.</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C da substância codificada de TsFC-2	67
<b>Figura 20.</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C de TsFC-2 (Ampliado)	68
<b>Figura 21.</b>	Espectro de RMN DEPT da substância codificada de TsFC-2	69
<b>Figura 22.</b>	Espectro de RMN DEPT de TsFC-2 (Ampliado)	70
<b>Figura 23.</b>	Espectro de IV da substância codificada de TsFC-1	71
<b>Figura 24.</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância codificada de TsFC-1	72
<b>Figura 25.</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C da substância codificada de TsFC-1	73
<b>Figura 26.</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C de TsFC-1 (Ampliado)	74
<b>Figura 29.</b>	Espectro de RMN DEPT da substância codificada de TsFC-1	75
<b>Figura 30.</b>	Espectro de RMN DEPT de TsFC-1 (Ampliado)	76

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Dados de RMN <sup>1</sup> H de TsFA-1 e do D-Manitol	39
<b>Tabela 2.</b>	Dados de RMN <sup>13</sup> C de TsFA-1, do D-Manitol, do L-Initol e do D-Sorbitol	40
<b>Tabela 3.</b>	Dados de RMN <sup>13</sup> C de TsFH-1, dos ácidos ursólico e oleanólico	42
<b>Tabela 4.</b>	Dados de RMN <sup>13</sup> C de TsFC-2, dos ácidos quinóvico, 3-O-β-D-glicopiranosilquinóvico e 28-O-β-D-glicopiranosilquinóvico	45
<b>Tabela 5.</b>	Dados de RMN <sup>13</sup> C de TsFC-1	47
<b>Tabela 6.</b>	Dados de RMN <sup>13</sup> C de TsFC-1M e do ácido ursólico	48
<b>Tabela 7.</b>	Resultado dos bioensaios preliminares de atividade larvicida	49

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b>	Procedimento Realizado com a Fração Clorofórmica das Folhas de <i>Tocoyena selloana</i> K. Schum.	28
<b>Esquema 2.</b>	Procedimento efetuado com as folhas da espécie de <i>Tocoyena selloana</i> K.Schum.	31
<b>Esquema 3.</b>	Procedimento Realizado com o caule da espécie <i>Tocoyena selloana</i> K. Schum.	32

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b>	Cromatografia da fração hexânica resultante do extrato etanólico das folhas de <i>Tocoyena selloana</i> K.Schum.	26
<b>Quadro 2.</b>	Fracionamento cromatográfico da subfração 17-27 do extrato hexânico das folhas de <i>Tocoyena selloana</i> K.Schum	26
<b>Quadro 3.</b>	Extratos e Frações Submetidas a Ensaio Larvicida	33
<b>Quadro 4.</b>	Valores de Ponto de Fusão de TsFA-1, do D-Manitol, do L-Iditol e do D-Sorbitol	40

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

<b>AcOEt</b>	Acetato de Etila
<b>ATR</b>	Attenuated total reflectance
<b>BuOH</b>	Butanol
<b>°C</b>	Grau Ceusius
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Clorofórmio
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Clorofórmio deuterado
<b>C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N</b>	Piridina deuterada
<b>CL</b>	Concentração letal
<b>cm</b>	Centímetro
<b>d</b>	Dupleto
<b>dd</b>	Duplo dupleto
<b>ddd</b>	Duplo duplo dupleto
<b>DEPT</b>	Distortioless Enhancement by Polarization Transfer
<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	Dimetil sulfóxido deuterado
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>g</b>	Gramma
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IV</b>	Infravermelho
<b><i>J</i></b>	Constante de acoplamento em Hertz
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>CD<sub>3</sub>OD</b>	Metanol deuterado
<b>mg</b>	Miligramma
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>mL</b>	Mililitros
<b>OMS</b>	Organização mundial de Saúde
<b>p.</b>	Página
<b>p.f.</b>	Ponto de fusão
<b>ppm</b>	Partes por milhão
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Ressonância magnética nuclear de carbono

## RESUMO

O presente trabalho descreve o isolamento de alguns constituintes químicos, bem como a avaliação das atividades moluscicida e larvicida de extratos e frações das folhas e do caule da espécie *Tocoyena selloana* K. Schum. (Rubiaceae), conhecida como genipapo-bravo e coletada em Barra de São Miguel / Alagoas. O estudo fitoquímico conduziu ao isolamento de dois triterpenóides, o ácido 3 $\beta$ -hidróxi-urs-12-en-28-óico (ácido ursólico), o qual está sendo descrito pela primeira vez no gênero *Tocoyena* e o ácido 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosíloquinóico; o carboidrato (2R, 3R, 4R, 5R)-1,2,3,4,5,6-hexa-hidroxi-hexano (D-Manitol), também descrito pela primeira vez no gênero e uma quarta substância, possivelmente um triterpeno que não teve ainda sua estrutura caracterizada. Todas as substâncias isoladas tiveram suas estruturas identificadas com base na análise dos dados espectrais (IV, RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT) e comparação com dados descritos na literatura. Os extratos em etanol das folhas e do caule, bem como as frações em hexano, clorofórmio, acetato de etila, butanol e água foram considerados inativos frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata* e às larvas do mosquito *Aedes aegypti* na concentração de 500 ppm.

Palavras chave: *Tocoyena selloana*, Rubiaceae, D-manitol.

## ABSTRACT

This work describes the isolation and elucidation of some chemical constituents, as well as evaluation of the molluscicidal and larvicidal activities of the extracts and fractions from the leaves and stem of *Tocoyena selloana* K. Schum. (Rubiaceae), known popularly as genipapo-bravo, collected in Barra de São Miguel / Alagoas. From the phytochemical investigation, were isolated of the two triterpenoids, the 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosil quinovic acid and the ursolic acid, the last one, is being described for the first time in the genus *Tocoyena*. The carbohydrate D-Mannitol, was also isolated it is described for the first time in the genus too, a fourth substance, possible triterpen, is not fully characterized yet. All isolated substances were elucidated on the basis of their spectral data (IR, NMR  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and DEPT) and compared with data described in the literature. The ethanol extracts and fractions from the leaves and stem of *T. selloana* did not show activity against the *Biomphalaria glabrata* and *Aedes aegypti* in concentration of 500 ppm.

Key words: *Tocoyena selloana*, Rubiaceae, D-mannitol.

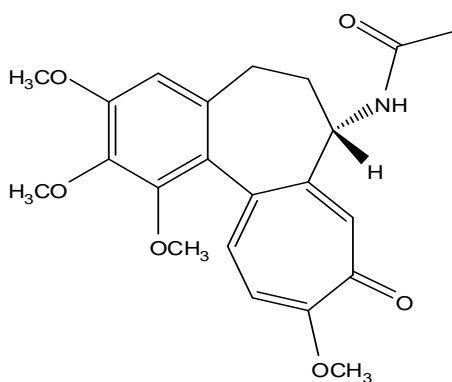
# **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1. Aspectos Gerais dos Produtos Naturais

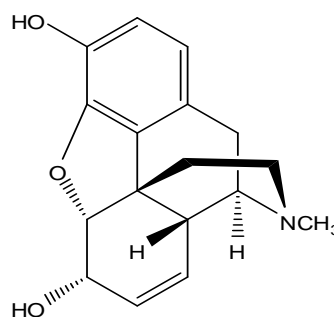
A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (Veiga Júnior *et al*, 2005). Na história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental encontram-se muitos exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa. A medicina tradicional chinesa, por exemplo, desenvolveu-se com tal eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e o isolamento dos princípios ativos (Viegas Júnior *et al*, 2006).

Acredita-se que cerca de 80% da população mundial use as plantas como primeiro recurso terapêutico (Silva & Filho, 2002) e a tendência desde a metade do século XIX, tem sido a utilização de substâncias isoladas em substituição aos extratos vegetais que apresentam alguma propriedade terapêutica comprovada e tenham seus constituintes ativos identificados (Schenkel *et al*, 2007).

As plantas, além de seu uso na medicina popular, têm contribuído, ao longo dos anos para a obtenção de vários fármacos, até hoje amplamente utilizados. Como exemplo, podemos citar a colchicina (1), encontrada na espécie *Colchicum autumnale* e utilizada como anti-inflamatório e a morfina (2), princípio ativo do ópio, preparado de *Papaver somniferum*, que é conhecida desde a época dos Sumérios (4000 a.C.) devido às suas propriedades soporíferas e analgésicas, havendo relatos na mitologia grega atribuindo à papoula do ópio o simbolismo de Morfeu, o deus do sono (Filho & Yunes, 1998; Viegas Júnior *et al*, 2006).



(1) Colchicina



(2) Morfina

Von Martius, botânico alemão criador da obra *Flora Brasiliensis*, definiu o poder das ervas brasileiras como: "As plantas medicinais brasileiras não apenas curam, fazem milagres", de fato, das 200.000 espécies vegetais que possam existir no Brasil, pelo menos a metade pode ter alguma propriedade terapêutica útil à população, mas nem 1% dessas espécies foram cientificamente estudadas (Barraca, 1999; Chiquieri *et al*, 2004).

As plantas medicinais da flora nativa são consumidas com poucas ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas. Comparadas com a de medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial. Isto, entretanto, não é verdade. A toxicidade de plantas é um problema sério de saúde pública. Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações e toxidez, bem como a ação sinérgica ocorrem comumente (Veiga Júnior *et al*, 2005). Com isso, é fundamental a realização de pesquisas para investigação dos constituintes químicos das plantas, visando à possibilidade de aplicação no tratamento das mais diversas patologias.

Serão abordados alguns aspectos relacionados à família Rubiaceae e ao gênero *Tocoyena*, assim como a esquistossomose e a dengue.

## **1.2 Considerações Sobre a Família Rubiaceae**

A família Rubiaceae Juss., descrita pela primeira vez por Antoine Laurent de Jussieu, em 1789, tem seu nome derivado do gênero *Rubia* L., do latim *rubium*, relativo à tinta vermelha produzida pelas raízes de plantas deste gênero, utilizadas para tingir tecidos (Pereira, 2007). Ela representa a quarta maior família do grupo das Angiospermae, com cerca de 650 gêneros e mais de 13.000 espécies, distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do globo, com poucos representantes nas áreas temperadas e frias. No Brasil, estão descritos próximo de 130 gêneros e 1500 espécies (Hottz *et al*, 2007).

A maioria das espécies de Rubiaceae são árvores de pequeno porte ou arbustos muito freqüentes em bosques e subosque. A família pode ser facilmente reconhecida pelas folhas geralmente opostas e pela presença de estípulas interpeciolares. A grande variação nas formas, tamanhos e cores das flores atrai um grande número de polinizadores para a família. Os frutos carnosos também variam

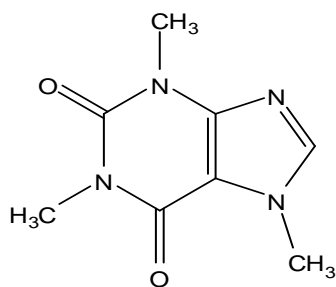


nas cores e tamanhos, sendo dispersos por pássaros, morcegos ou ainda por pequenos mamíferos (Taylor *et al*, 2007).

A família Rubiaceae tem sido dividida em quatro subfamílias: Ixoroideae, Cinchonoideae, Antirheoideae e Rubioideae. A avaliação de dados químicos revela que na subfamília Ixoroideae, os iridóides são considerados marcadores quimiotaxonômicos exclusivos, enquanto em Cinchonoideae os alcalóides indólicos predominam e, em Rubioideae, as antraquinonas estão presentes como a principal classe de metabólitos secundários. Já na subfamília Antirheoideae não há ocorrência de nenhum destes marcadores químicos (Gazda, 2004).

A família Rubiaceae possui espécies de grande importância econômica, que são exploradas das seguintes formas:

- Como alimentícias, tem-se como exemplo o café que é uma das bebidas mais consumidas no mundo e provém de uma árvore do gênero *Coffea* que dentre as várias espécies conhecidas se destaca a espécie *Coffea arabica* L. O componente mais conhecido obtido do café é a cafeína (**3**), devido às suas propriedades fisiológicas e farmacológicas. A cafeína é um alcalóide, pertencente ao grupo das xantinas, é uma substância inodora e possui sabor amargo bastante característico (Monteiro e Trugo, 2005).



(**3**) cafeína

- Ornamentais, como a *Ixora coccínea* Linn., conhecida como Ixora (Figura 1) (Dias-Arieira *et al*, 2007), e a *Galianthe brasiliensis* conhecida pelo nome de poaia-do-campo (Figura 1), que é utilizada inclusive na medicina popular por suas propriedades eméticas (Moura *et al*, 2006).



Ixora

<http://www.florabeiradamata.com.br> ,  
acessado em agosto de 2009.

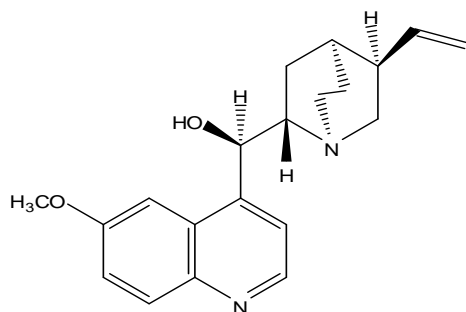


poaia-do-campo

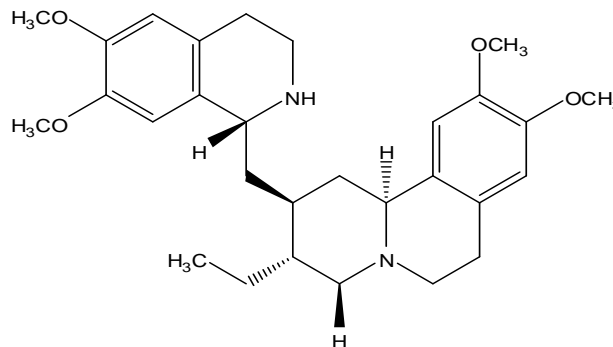
<http://exactas-unam.dyndns.org>,  
acessado em agosto de 2009.

**Figura 1.** Plantas ornamentais da família Rubiaceae.

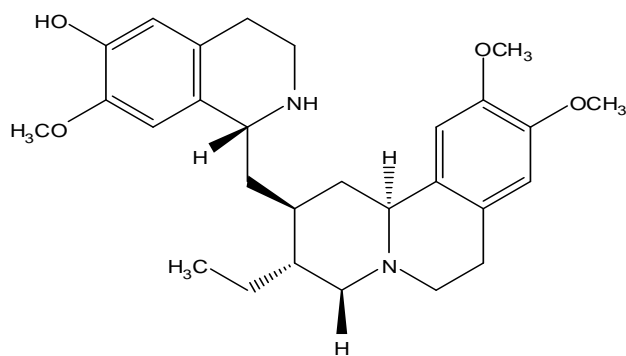
- Na indústria farmacêutica, a *Cinchona pubescens* Vahl, uma das espécies produtoras da quinina (4), que é empregada no tratamento da malária (Coelho *et al*, 2006); a *Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Richard, planta que produz os alcalóides isoquinolínicos emetina (5) e cefalina (6) que possuem propriedades amebicidas, expectorantes, diaforéticas e eméticas. Além disso, várias espécies são referidas popularmente como medicinais, dentre as quais destacam-se: *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum., diversas espécies dos gêneros *Borreria*, *Cinchona* e *Richardia* (Fabri, 2008; França, 2007) e plantas do gênero *Diodia* que são usadas como agentes anti-reumáticos, antidiarréicos, laxativos, eméticos e no tratamento de úlceras gástricas, urticárias e gastrites (Moura *et al*, 2006).



(4) quinina



(5) emetina

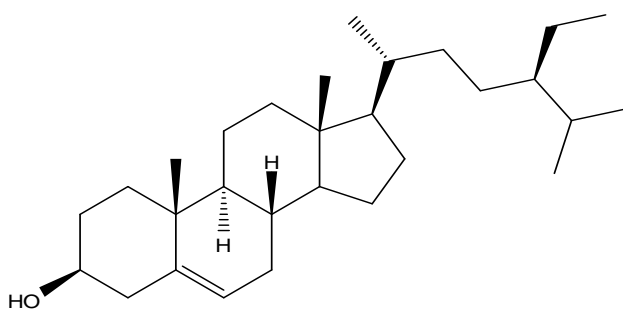


(6) cefalina

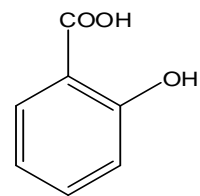
### 1.2.2 Estudos Químicos Sobre a Família Rubiaceae

Estudos químicos realizados com espécies da família Rubiaceae, indicam uma grande diversidade de metabólitos secundários como iridóides, alcalóides indólicos, antraquinonas, flavonóides e outros derivados fenólicos e terpenóides (triterpenos, diterpenos). Destes, iridóides, antraquinonas e alcalóides indólicos são considerados marcadores quimiotaxonômicos da família (Gazda, 2004). Dentre os diversos relatos na literatura de metabólitos secundários isolados de Rubiáceas, podemos mencionar:

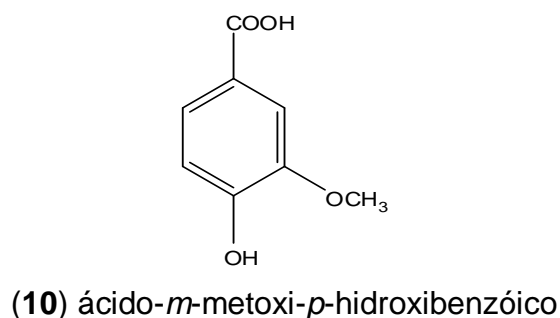
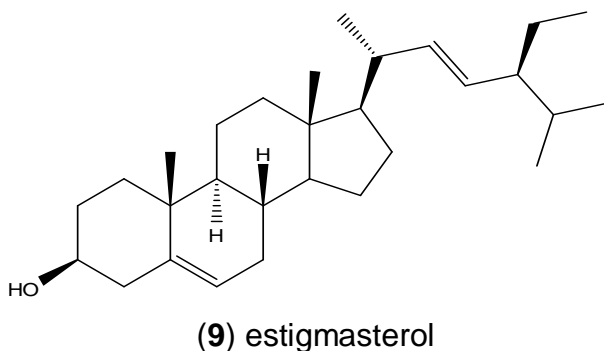
***Richardia grandiflora*** – Conhecida popularmente como ervaço, é utilizada na medicina popular como vermífugo. Estudos fitoquímicos conduziram ao isolamento de  $\beta$ -sitosterol (7), ácido salicílico (8), estigmasterol (9) e ácido-*m*-metoxi-*p*-hidroxibenzóico (10) (Tomaz *et al*, 2008).



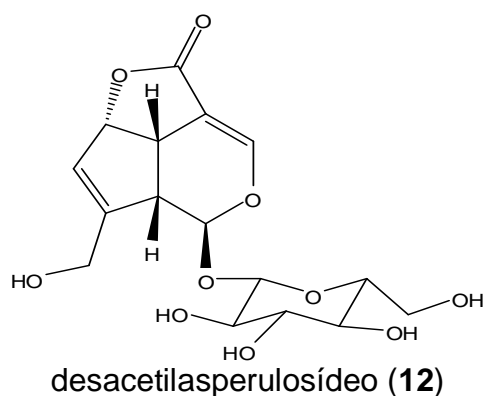
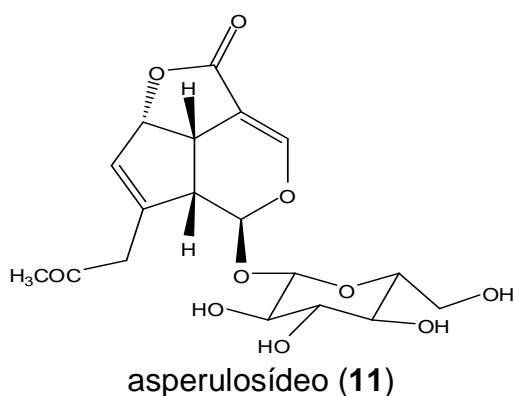
(7)  $\beta$ -sitosterol



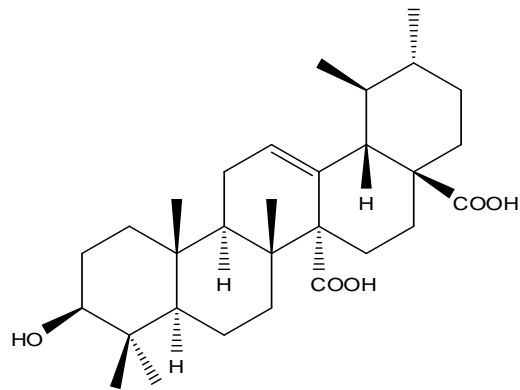
(8) ácido salicílico



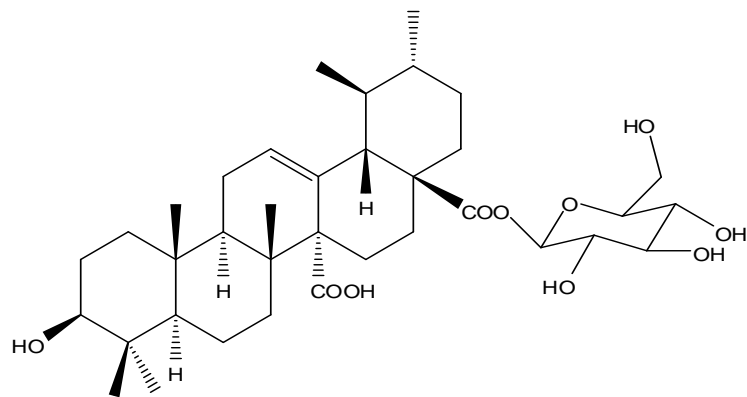
***Galianthe brasiliensis*** - É uma planta ornamental usada como emético na medicina popular. Desta planta foram isolados os iridóides glicosilados asperulosídeo (11) e desacetilasperulosídeo (12) e o  $\beta$ -sitosterol (7) (Moura *et al*, 2006).



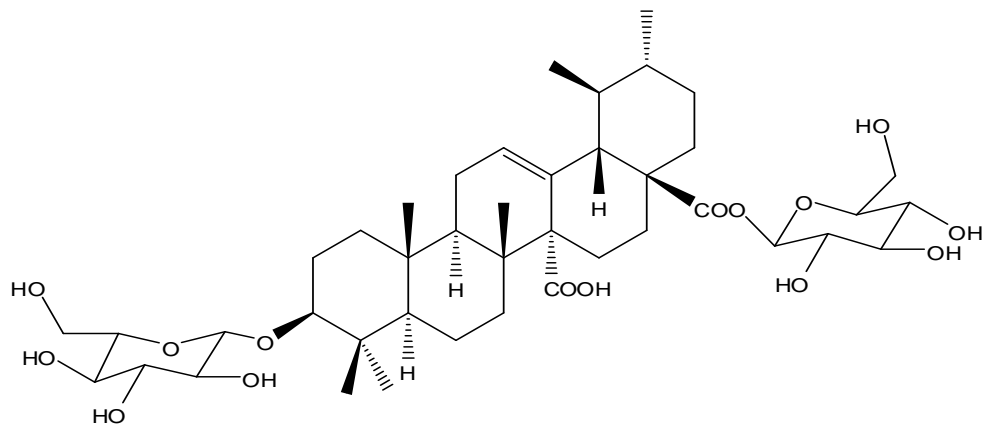
***Guettarda pohliana*** – Conhecida popularmente como angélica-do-mato, é utilizada no tratamento de ferimentos e inflamações. Estudo químico realizado com esta espécie conduziu ao isolamento do ácido quinóico (13), das saponinas triterpênicas: os ácidos 28-O- $\beta$ -glicopiranosilquinóico (14), 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-28-O- $\beta$ -glicopiranosilquinóico (15), 3-O- $\beta$ -D-quinovopiranosil-28-O- $\beta$ -glicopiranosil-quinóico (16) e 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-28-O- $\beta$ -D-glicopiranosilcinchólico (17) e ainda o ácido 4,5-O-dicafeoilquinóico (18) (Oliveira *et al*, 2008).



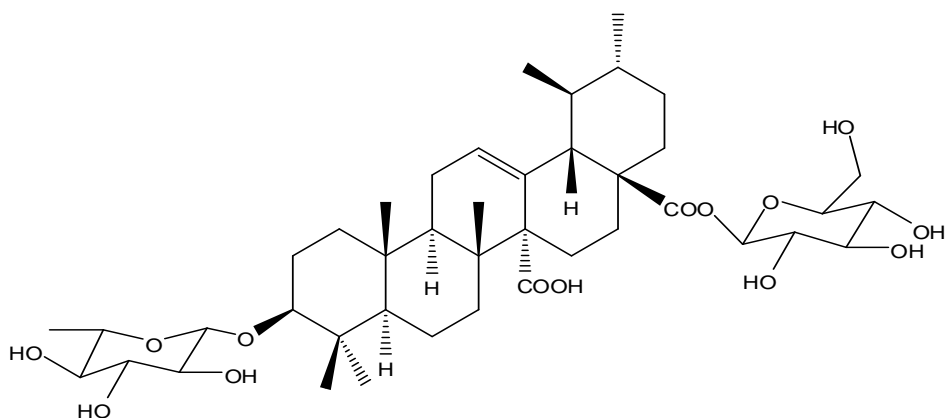
(13) ácido quinóvico



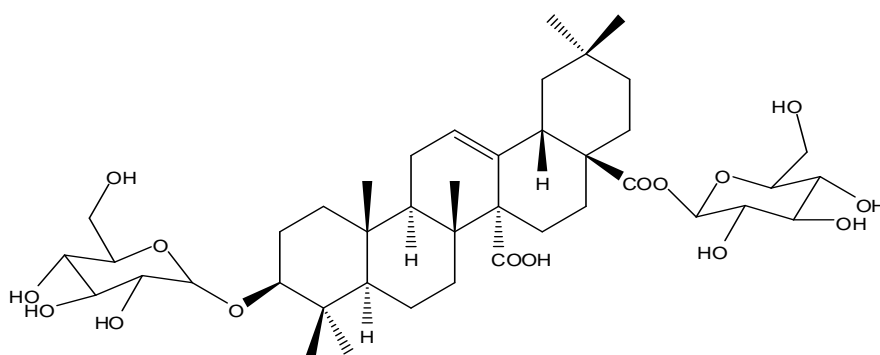
(14) ácido 28-O-β-glicopiranosilquinóvico



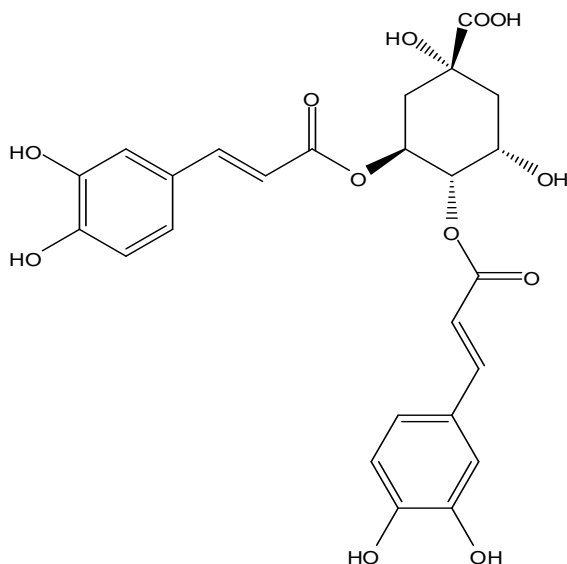
(15) ácido 3-O-β-D-glicopiranosil-28-O-β-glicopiranosilquinóvico



(16) ácido 3-O- $\beta$ -D-quinovopiranosil-28-O- $\beta$ -glicopiranosilquinóico



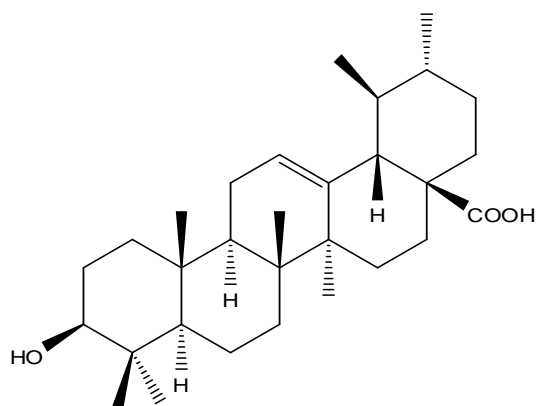
(17) ácido 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-28-O- $\beta$ -D-glicopiranosilcinchólico



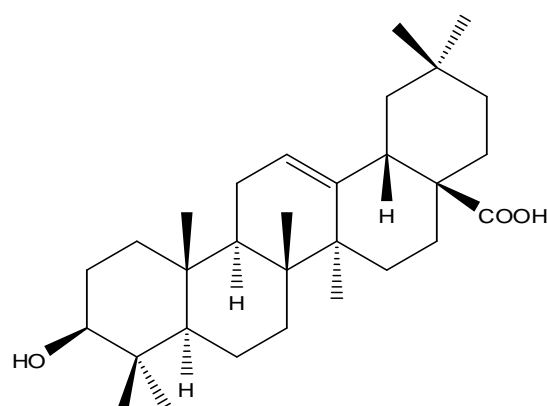
(18) ácido 4,5-O-dicafeoilquínico

***Chomelia obtusa*** – Esta espécie é um arbusto típico do Cerrado, conhecida popularmente como viuvinha. Em análise fitoquímica realizada, foram isoladas as

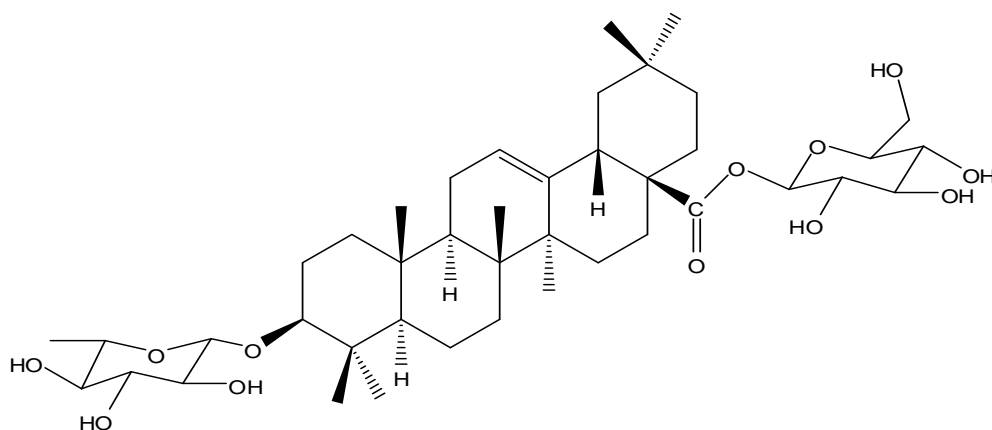
substâncias: ácido 3-O-β-D-quinovopiranosil-28-O-β-D-glicopiranosil quinóvico (16) ácido ursólico (19), ácido oleanólico (20), ácido 3-O-β-D-quinovopiranosil-28-O-β-D-glicopiranosil cinchólico (21), e o flavonóide 3-O-β-D-glicopiranosil quercetina (22) (Barros *et al*, 2008).



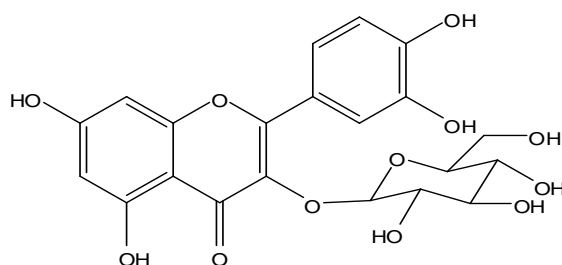
(19) ácido ursólico



(20) ácido oleanólico



(21) ácido 3-O-β-D-quinovopiranosil-28-O-β-D-glicopiranosil cinchólico



(22) 3-O-β-D-glicopiranosil quercetina

### 1.3 Considerações Sobre o Gênero *Tocoyena*

O gênero *Tocoyena*, para o qual são descritas cerca de 30 espécies com distribuição neotropical, ocorrendo na América Central e América do Sul, até o sul do Brasil. São espécies típicas do Cerrado, sendo encontradas preferencialmente no Cerrado *stricto sensu*, mas também ocorrem em florestas com clima quente e úmido, como a Floresta Amazônica. Todos os representantes do gênero são árvores de pequeno porte ou arbustos (Coelho *et al*, 2006).

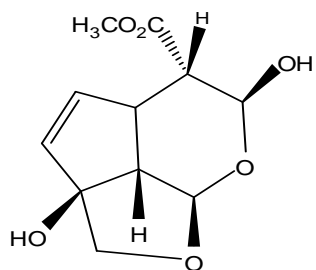
O gênero *Tocoyena* pertence à subfamília Ixoroideae, sendo os iridóides considerados seus principais marcadores quimiotaxonômicos. Além de iridóides, a subfamília é conhecida por metabolizar flavonóides, triterpenos, derivados fenólicos e alcalóides do tipo emetínicos, quinolínicos e poliindolenínicos (Hamerski *et al*, 2005).

Foram encontrados na literatura apenas quatro relatos sobre avaliações fitoquímicas de quatro espécies no gênero *Tocoyena*, mencionadas a seguir:

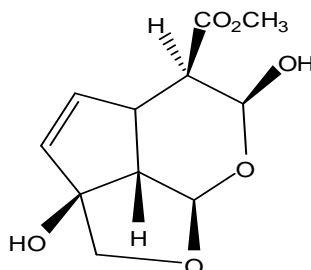
***Tocoyena formosa* K. Schum.** é uma espécie lenhosa de porte arbustivo-arbóreo, de ampla distribuição geográfica no bioma Cerrado e conhecida popularmente como olho-de-boi (Carvalho *et al*, 2007). É uma espécie da América do Sul, encontrada no Paraguai, Bolívia e Brasil (Coelho *et al*, 2006). Essa planta é muito usada, pela população em geral, no tratamento de inflamações ósseas e musculares, entorses e inchaços, e também como calmante cardíaco. Da casca do caule é preparado um cataplasma, que é aplicado diretamente sobre a área lesionada, deixando o local enegrecido e acelerando o processo de reparo (Azevedo *et al*, 2006).

Estudos fitoquímicos realizados com *T. formosa* revelaram a presença de iridóides, entre eles o  $\alpha$ -gardiol (**23**) e  $\beta$ -gardiol (**24**), os quais apresentaram atividade antifúngica (Bolzani *et al*, 1997). Foram também isolados os iridóides galiosídeo (**25**) e o apodantosídeo (**26**) (Bolzani *et al*, 1996).

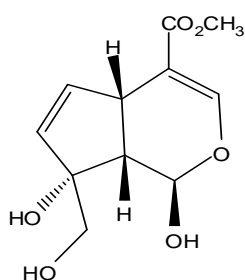




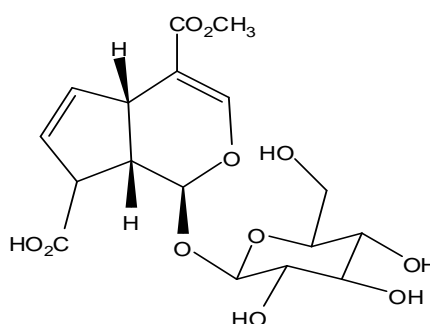
(23)  $\alpha$ -gardiol



(24)  $\beta$ -gardiol

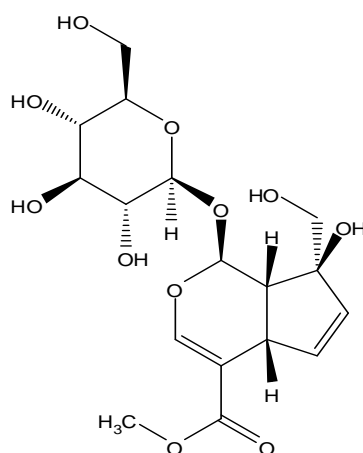


(25) Galiosídeo



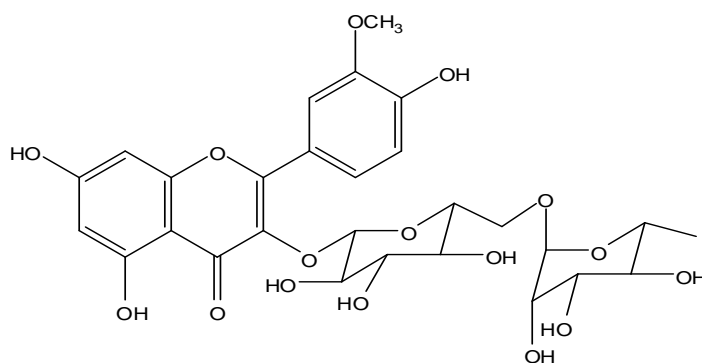
(26) apodantosídeo

***Tocoyena bullata* Schum.** é uma árvore pequena encontrada principalmente na Zona Litorânea e na Restinga. É uma espécie atraente pela coloração de suas folhas verde-brilhantes e pela disposição congesta das mesmas, associadas às flores brancas, que a tornam possuidora de grande potencial ornamental. A avaliação fitoquímica conduziu ao isolamento do iridóide gardenosídeo (27) (Poser, 1998).

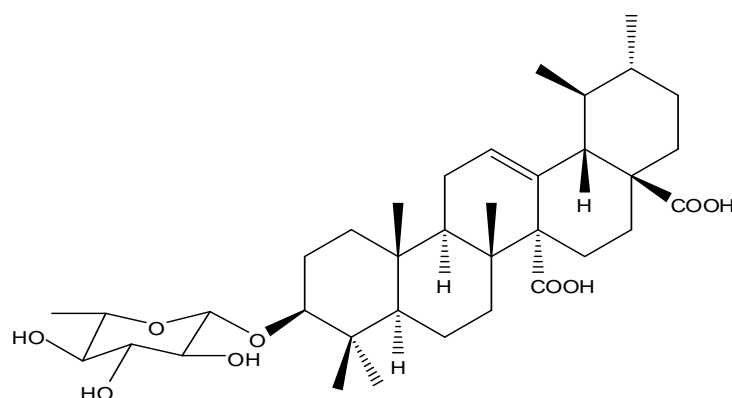


(27) gardenosídeo

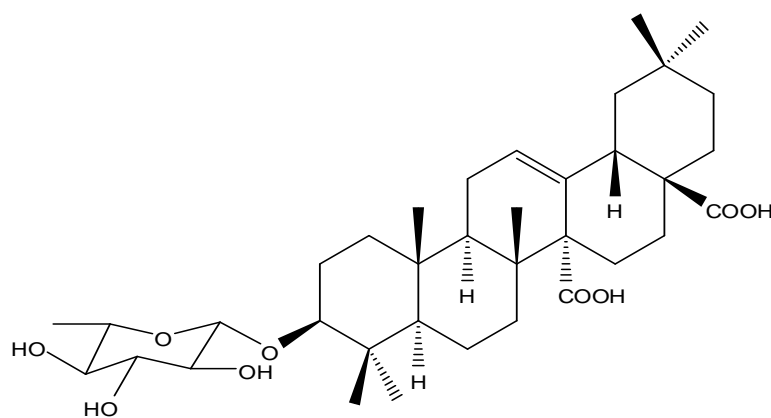
***Tocoyena brasiliensis* Mart.**, conhecida popularmente como genipapinho, é facilmente encontrada no Brasil, exceto na região sul (Delprete, 2008). No trabalho desenvolvido por Hamerski e colaboradores (2005), foram isolados um flavonóide glicosilado, identificado como sendo o ramanzina-3-O-rutinosídeo (**28**) e duas misturas binárias de saponinas triterpênicas, a primeira contendo o ácido 3-O-β-D-quinovopiranosíl quinóvico (**29**) e o ácido 3-O-β-D-quinovopiranosíl cinchólico (**30**) e a segunda, o ácido 3-O-β-D-glicopiranosíl quinóvico (**31**) e o ácido 28-O-β-D-glicopiranosílquinóvico (**14**).



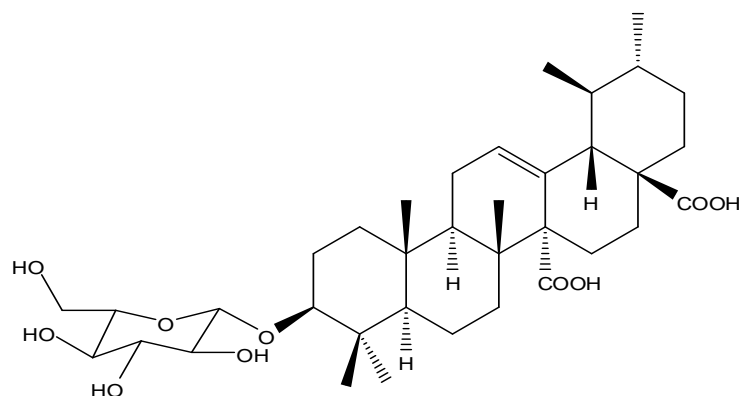
(**28**) ramanzina-3-O-rutinosídeo



(**29**) ácido 3-O-β-D-quinovopiranosíl quinóvico

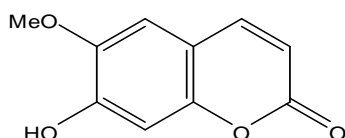


(**30**) ácido-3-O-β-D-quinovopiranosíl cinchólico

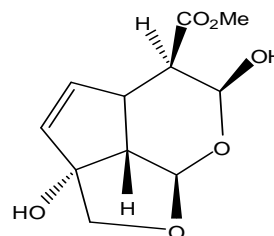


(31) ácido 3-O-β-D-glicopiranosíl quinóvico

***Tocoyena selloana* K. Schum.**, conhecida como genipapo bravo, é uma árvore pequena. A casca do caule é utilizada na medicina popular como antiinflamatório sob forma de compressas em áreas afetadas por contusões. De um espécime desta planta, foram isolados uma cumarina, a escopoletina (32), e uma saponina triterpênica, o ácido 3-β-O-β-D-glicopiranosilquinóvico (31), além de dois iridóides, o β-gardiol (24) e seu epímero (33) (Jane *et al*, 1997).



(32) escopoletina



(33) epímero do β-gardiol

#### 1.4 Considerações Sobre a Esquistossomose

As esquistossomoses são doenças transmitidas por trematódeos do gênero *Schistosoma* que, para o homem, têm como principais agentes etiológicos as espécies *S. mansoni*, *S. heamatobium* e *S. japonicum* (Pordeus *et al*, 2008).

O controle da esquistossomose é uma das tarefas mais difíceis dos serviços de Saúde Pública. A importância da doença não se restringe à persistência da prevalência e larga distribuição geográfica no mundo. Ela diz respeito, também, ao mecanismo de escape do molusco frente ao moluscicida, precárias condições de moradia e saneamento básico, atividades econômicas ligadas ao uso da água –

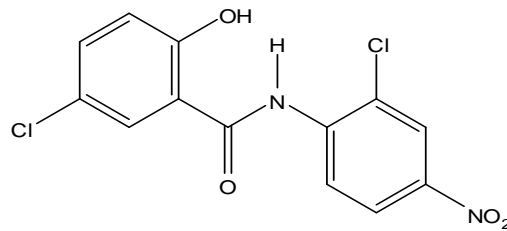
principalmente em zonas rurais –, longo tempo para educação sanitária e adesão aos programas de controle. Além disso, há de se considerar a inexistência de mecanismos naturais de defesa imunológica, bem como de uma vacina efetiva (Pordeus *et al*, 2008).

A esquistossomose mansônica é uma endemia mundial, ocorrendo em 52 países e territórios, principalmente na América do Sul, Caribe, África e Leste do Mediterrâneo, onde atinge as regiões do Delta do Nilo, além de países como Egito e Sudão. No Brasil, a transmissão ocorre em 19 estados, numa faixa contínua ao longo do litoral, desde o Rio Grande do Norte até o interior do Espírito Santo e Minas Gerais. Atualmente, as prevalências mais elevadas são encontradas nos estados de Alagoas, Pernambuco, Sergipe, Minas Gerais, Bahia, Paraíba e Espírito Santo (Ministério da Saúde, 2005). Em Alagoas, 60% do território é área endêmica e mais de dois milhões de indivíduos estariam expostos à infecção (Couto, 2005).

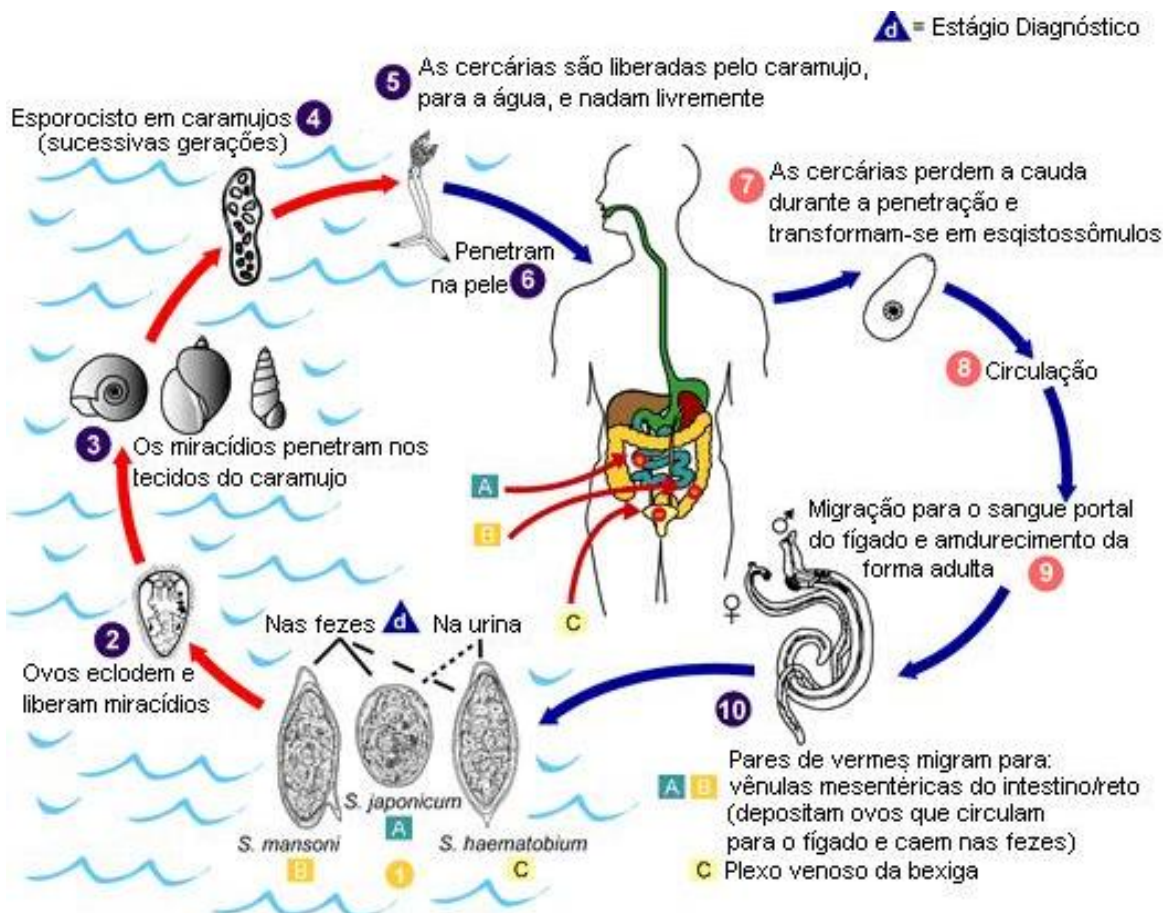
O ciclo biológico de transmissão da esquistossomose é descrito da seguinte forma. Os ovos do *S. mansoni* são eliminados pelas fezes do hospedeiro humano infectado e, se as fezes são lançadas nas coleções de água doce, eles eclodem liberando uma larva ciliada, denominada miracídio, responsável por infectar o hospedeiro intermediário. Após quatro a seis semanas, as larvas abandonam o caramujo e ficam livres na água, na forma de cercária. Se o homem tiver contato com águas infectadas pelas cercárias, estas penetram ativamente, pela pele e mucosa, fazendo com que o indivíduo adquira a infecção. O verme se desenvolve no organismo humano durante duas a seis semanas após a penetração das cercarias (Figura 2, p. 16). Passado esse período, o homem infectado pode transmitir a doença eliminando ovos de *S. mansoni* nas fezes, por muitos anos. O verme, por si só, não é capaz de induzir uma significativa patologia no homem. A deposição de ovos no fígado e outros órgãos, entretanto, é o responsável pela vigorosa resposta inflamatória. Assim, no combate a esquistossomose há dois caminhos a seguir: o tratamento de indivíduos infectados e a profilaxia mediante a destruição dos caramujos que são hospedeiros intermediários, com o uso de substâncias moluscidas (Pordeus *et al*, 2008; Ministério da Saúde, 2005).

As substâncias moluscidas são um fator crucial para o controle da esquistossomose. Apenas uma substância sintética, a niclosamida (**34**), é recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como moluscida. Em

países do Terceiro Mundo o uso de moluscidas sintéticos tem causado problemas de toxicidade, contaminação do meio ambiente e a resistência dos caramujos (*Biomphalaria glabrata*) transmissores da esquistossomose. Em contraste, o uso de plantas com atividade moluscicida pode representar uma alternativa barata, além de não poluir o meio ambiente (Pinheiro *et al*, 2003).



(34) niclosamida



([http://www.cve.saude.sp.gov.br/hm/hidrica/IFN\\_Esquito.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/hm/hidrica/IFN_Esquito.htm) acessado em abril de 2008).

**Figura 2.** Ciclo de vida do *Schistosoma*.

## 1.5 Considerações Sobre a Dengue

A dengue tem se destacado entre as enfermidades reemergentes e é considerada a mais importante das doenças virais transmitidas por artrópodos. A incidência de dengue tem aumentado nas últimas décadas. A doença ocorre em mais de 100 países e expõe mais de 2,5 bilhões de pessoas ao risco de contraí-la nas áreas urbanas, periurbanas e rurais dos trópicos e subtropicais. A dengue é endêmica na África, nas Américas, no Leste do Mediterrâneo, no Sudeste Asiático e no Oeste do Pacífico (Braga & Valle, 2007).

A dengue ocorre e dissemina-se especialmente nos países tropicais, onde as condições do meio ambiente favorecem o desenvolvimento e a proliferação do *Aedes aegypti*, principal mosquito vetor. O *A. aegypti*, encontrou no mundo moderno condições muito favoráveis para uma rápida expansão, pela urbanização acelerada que criou cidades com deficiências de abastecimento de água e de limpeza urbana; pela intensa utilização de materiais não-biodegradáveis, como recipientes descartáveis de plástico e vidro; e pelas mudanças climáticas (FUNASA, 2002; Ministério da Saúde, 2005).

O combate ao mosquito *A. aegypti* (Figura 3, p. 18) deve ser feito de duas maneiras: eliminando os mosquitos adultos e, principalmente, acabando com os criadouros de larvas. O inseticida aplicado em regiões epidêmicas, elimina apenas a forma adulta do mosquito, mas não tem nenhuma eficácia para acabar com as larvas desse inseto. Para controlar os criadouros, foram utilizadas alternativas tais como: controle biológico através de peixes, moluscos, bactérias etc; uso de larvicidas químicos, como o temefós e o metoprene (Cavalcanti *et al*, 2004).

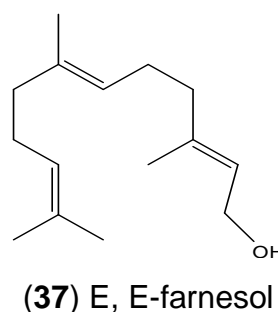
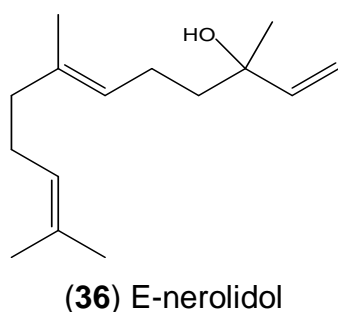
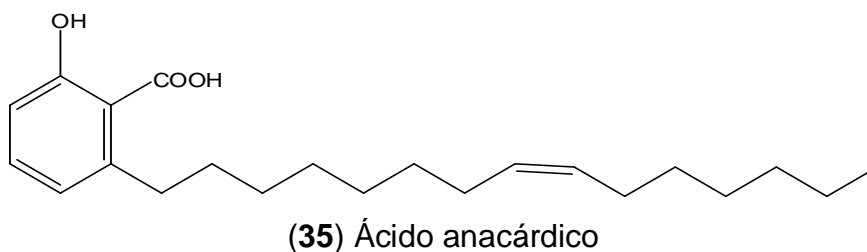


<http://www.rc.unesp.br/ib/zoologia/%20.htm>, acessado em setembro de 2009.

**Figura 3.** Mosquito *Aedes aegypti*

Com o surgimento de formas resistentes do mosquito aos inseticidas convencionais utilizados, tem crescido a procura por extratos vegetais e substâncias naturais que sejam efetivas no combate ao mosquito adulto e/ou à larva de *A. aegypti* e que sejam isentas de toxicidade para o meio ambiente. Plantas, como organismos que co-evoluem com insetos e outros microorganismos, são fontes naturais de substâncias inseticidas e antimicrobianas (Simas *et al*, 2004).

Dentre as substâncias extraídas de plantas com propriedades larvicidas cientificamente comprovadas, destacam-se o ácido anacárdico (35), e os sesquiterpenos: E-nerolidol (36) e E, E-farnesol (37) (Cavalcanti *et al*, 2004).



## 1.6 Caracterização da Espécie

A espécie *Tocoyena selloana* (Cham. & Schldl.) K. Schum. (Figura 4), pertencente à família Rubiaceae, com distribuição neotropical, tem como sinônimos: *Gardenia sellowiana* Cham. & Schldl., *T. sellowiana*, *T. brasiliensis* e *T. lichmophora*. No Brasil, ocorre nos Estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Pará, Paraná, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte e Santa Catarina. É geralmente encontrada na mata úmida e em outros ambientes litorâneos.

São plantas lenhosas com altura variando de 2 - 4m de altura, caule glabro e entrenós 0,7- 4,2 cm de comprimento. Estípulas 0,5-0,9 x 0,4-0,5 cm, inteiras, triangulares e glabras. Folhas obovada a lanceoladas, limbo com 8,3-16,5 x 5,2-10,5 cm, pecíolo 0,9-1,6 cm, opostas, membranáceas a cartáceas, glabras em ambas as faces, cor castanha quando seca, margem inteira, ápice obtuso a agudo, base atenuada a aguda, nervura peninérvea, 7-10 pares de nervuras. Inflorescência em dicásio compostos terminais, flores diclamídeas, andrógenas. Cálice campanulado esverdeado, persistente, 1,1-1,5cm de comprimento. Corola amarela, pentâmera, tubo 11,1-13,2 de comprimento. Ovário bilocular, pluriovular. Estilete terminal, bífido, 10,6 – 10,9cm de comprimento. Estames 5 livres, sésseis; anteras 0,8-1,0cm de comprimento, dorsifixas, amarelas. Frutos carnosos tipo baga, subglobosa, glabra. Sementes lisas (Rocha, 2007).



**Figura 4.** Fotos de *Tocoyena selloana* (Rocha, 2007)



## **2. OBJETIVOS**

## **2.1 Objetivo Geral**

Realizar análise fitoquímica dos extratos das folhas e do caule da espécie *Tocoyena selloana* (genipapo bravo) e avaliar as atividades moluscicida e larvicida.

## **2.2 Objetivos Específicos**

Avaliar a atividade moluscicida e larvicida dos extratos etanólicos e frações, provenientes dos extratos etanólicos das folhas e caule de um espécime de *Tocoyena selloana* (genipapo bravo) coletada em Barra de São Miguel/Alagoas.

Conhecer a composição química das folhas e caule de *Tocoyena selloana* (genipapo bravo).

Contribuir para o conhecimento de alguns constituintes químicos e atividade biológica das plantas do estado de Alagoas.

## **3. PARTE EXPERIMENTAL**

### 3.1 Solventes, Reagentes e Equipamentos

- Na preparação dos extratos utilizou-se percolador de aço inoxidável;
- Nas separações cromatográficas utilizou-se gel de sílica 60 (70-230 e 230-400 mesh da Merck) e Sephadex LH-20, bem como solventes (hexano, clorofórmio, acetato de etila, e metanol) pró-análise (P.A.)(Dinâmica);
- A concentração das soluções com grande volume foi efetuada em evaporador rotatório (Büchi, modelo RE-111), e as com volume pequeno a temperatura ambiente e em capela de exaustão (Permuton);
- Nas separações cromatográficas em coluna, utilizou-se como adsorvente sílica (70-230 mesh). O tamanho e o diâmetro da coluna variaram de acordo com a quantidade da amostra e da sílica a serem empregadas;
- Nas permeações em gel foi utilizada Sephadex LH-20 (Pharmacia);
- Nas cromatografias em camada delgada foram utilizadas cromatoplasmas pré-fabricadas (Merck), bem como confeccionadas no próprio laboratório (0,75 mm de espessura) utilizando-se sílica gel 60 da Merck. Sendo estas preparadas utilizando-se suspensão de sílica gel em água destilada, espalhada sobre placas de vidro através de um espalhador mecânico e ativadas em estufa (Biopar) a 100°C;
- Os cromatogramas foram revelados através de irradiação com luz ultravioleta em comprimento de onda 245 e 365 nm, imersão em cubas contendo vapores de iodo, borrifação com reagente de Lieberman-Burchard e borrifação com solução ácida de sulfato cérico;
- Os pontos de fusão foram determinados usando um aparelho da Macro Química, modelo MQAPF-302;
- Na secagem da vidraria utilizou-se estufa de esterilização universal Biopar, modelo S225T;
- As pesagens dos extratos e frações foram efetuados em balança eletrônica analítica (Shimadzu, modelo AX200) ou semi analítica (OHAUS);
- Nas dissoluções dos extratos utilizou-se ultra-som Branson (mod. 1210);
- Os espectros de RMN ( $^1\text{H}$ : 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz) foram registrados em espectrômetro da Brüker Avance 400 do Instituto de Química e Biotecnologia

da Universidade Federal de Alagoas e as amostras foram dissolvidas em solventes deuterados (metanol, clorofórmio, piridina e água);

- Os espectros no Infravermelho foram obtidos em equipamento Varian 660-IR, utilizando acessório ATR;
- A solução ácida de sulfato cérico utilizada como revelador foi preparada com 0,30g de sulfato cérico e 7 mL de ácido sulfúrico 100 mL de solução aquosa (Matos, 1997).
- O reagente de Liebermann-Burchard foi preparado com 50 mL de anidrido acético e 1mL de ácido sulfúrico concentrado. Este reagente é utilizado para diferenciar triterpenóides de esteróides, através da mudança de coloração. Para triterpenóides a coloração varia de rósea a vermelho, já para esteróides apresenta coloração azul esverdeado (Matos, 1997).
- Os solventes utilizados (Hexano, clorofórmio, acetato de etila, butanol, metanol e etanol) foram P. A. da marca Dinâmica Química.

### **3.2 Coleta e identificação do Material Vegetal**

O caule e as folhas da espécie vegetal *Tocoyena selloana* foram coletados em março de 2007, no município de Barra de São Miguel – Alagoas. A identificação botânica foi realizada pela botânica Ms. Rosário de Fátima de Almeida Rocha do Instituto de Desenvolvimento Científico e Tecnológico de Xingó (Instituto Xingó), onde exsicata da planta foi catalogada no Herbário Xingó - HXG, da Unidade de Projetos Biodiversidade da Caatinga do referido instituto, sob o número HXG nº 05217.

### **3.3 Preparação dos Extratos das Folhas e do Caule**

#### **3.3.1 Preparação dos Extratos e Frações das folhas de *T. selloana***

As folhas, após secagem à temperatura ambiente e trituração por turbopercolação, foram extraídas através de maceração com etanol. Após concentração das soluções, sob pressão reduzida em evaporador rotativo, o extrato

bruto resultante (222,0 g) foi suspenso em uma solução de metanol e água (4:1) e extraído exaustivamente e sucessivamente com hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol. Após concentração das soluções, sob pressão reduzida em evaporador rotativo, foram obtidas as frações em hexano (19,9 g), clorofórmio (68,6 g), acetato de etila (27,7 g), n-butanol (26,7 g) e em água (43,0 g) (Esquema 2, p. 31).

### **3.3.2 Preparação dos Extratos e Frações do caule de *T. selloana***

O caule, após secagem à temperatura ambiente e trituração, foi extraído através de maceração com etanol. Após concentração das soluções, sob pressão reduzida em evaporador rotativo, resultaram 155,5 g de extrato. O extrato bruto foi suspenso em uma solução de metanol e água (3:2) e extraído exaustivamente e sucessivamente com hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol. Após concentração das soluções, sob pressão reduzida em evaporador rotativo, foram obtidas as frações em hexano (26,0 g), clorofórmio (25,3 g), acetato de etila (12,3 g), n-butanol (16,8 g) e em água (25,1 g) (Esquema 3, p. 32).

## **3.4 Isolamento e Purificação das Substâncias**

### **3.4.1 Fração em Hexano das folhas de *T. selloana***

A fração em hexano (17,5g), proveniente da partição do extrato etanólico das folhas, foi submetida à fracionamento cromatográfico, utilizando-se gel de sílica (230-400 mesh) como fase estacionária e como eluentes: hexano, n-hexano/CHCl<sub>3</sub> 33%, n-hexano/CHCl<sub>3</sub> 50%, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt, AcOEt/MeOH 2%, AcOEt/MeOH 5% e MeOH (Quadro 1). Este procedimento forneceu 56 subfrações de 125mL, as quais foram reunidas em cinco grupos (1-13, 14-16, 17-26, 27-38 e 39-56), após eliminação dos solventes sob pressão reduzida e análise comparativa por cromatografia em camada delgada (CCD).

**Quadro 1.** Cromatografia da fração hexânica resultante do extrato etanólico das folhas de *T. selloana*

Eluentes	Subfrações (125mL)
n-hexano	1-10
n-hexano / CHCl <sub>3</sub> 33%	11-26
n-hexano / CHCl <sub>3</sub> 50%	27-34
CHCl <sub>3</sub>	35-40
AcOEt	41-44
AcOEt / MeOH 2%	45-46
AcOEt / MeOH 5%	47-48
MeOH	49-56

O grupo de subfrações 17-26 (1,0 g), eluídas em n-hexano/CHCl<sub>3</sub> 33%, foi submetido à cromatografia utilizando coluna de sílica. Este procedimento forneceu 220 frações com volume médio de 5 mL cada, as quais, após análise comparativa através de cromatografia em camada delgada de sílica, foram reunidas em 7 grupos (Quadro 2).

**Quadro 2.** Fracionamento cromatográfico da subfração 17-26 da fração hexânica das folhas de *T. selloana*

Grupos	Frações reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
I	1-26	40	
II	27-52	60	
III	53-76	90	
IV	77-91	200	TsFH-1
V	92-125	410	TsFH-1
VI	126-164	130	
VII	165-220	60	

O grupo IV (frações 77-91), após ser submetido a novo procedimento cromatográfico utilizando coluna de sílica forneceu um sólido branco cristalino, de ponto de fusão 232-234°C, codificado de **TsFH-1** (13 mg).

O grupo V (frações 92-125) foi submetido a novo procedimento cromatográfico, utilizando coluna de sílica, obtendo-se 24 mg de um sólido branco cristalino, de ponto de fusão 232-234 °C, o qual após análise, observou-se que também se tratava da substância codificada de **TsFH-1**.

Os demais grupos de frações não conduziram ao isolamento de substâncias.

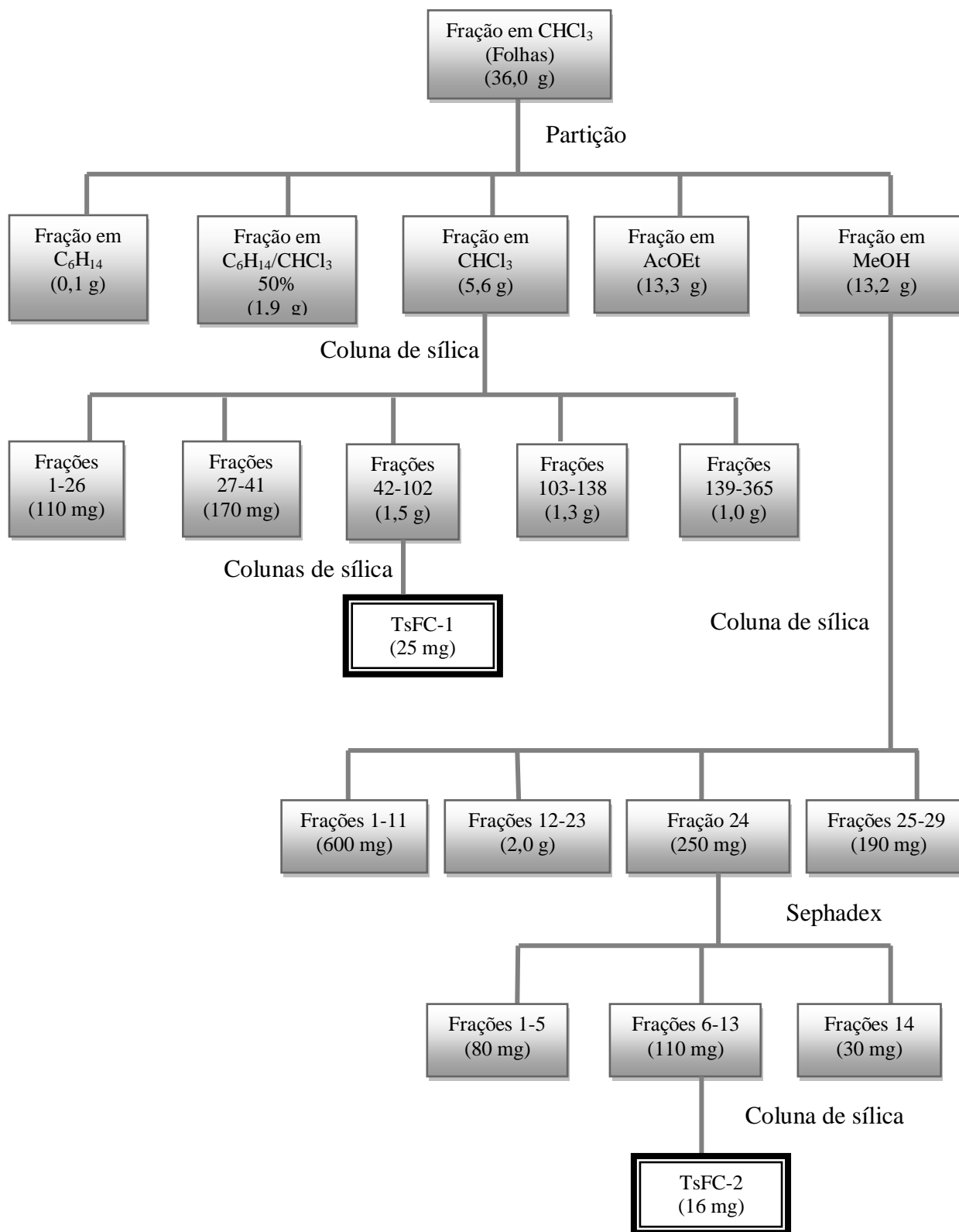
#### **3.4.2 Fração em Clorofórmio das folhas de *T. selloana***

Parte da fração clorofórmica das folhas (36,0 g) foi submetida à filtração em sílica. Desta filtração resultaram as subfrações em n-hexano (0,1 g), n-hexano/CHCl<sub>3</sub> 50% (1,9 g), CHCl<sub>3</sub> (5,6 g), AcOEt (13,3 g) e MeOH (13,2 g) (Esquema 1, p. 28).

A subfração em clorofórmio (5,6 g) foi submetida à fracionamento cromatográfico utilizando coluna de sílica. Esta forneceu 365 frações, que após análise comparativa através de cromatografia em camada delgada de sílica, foram reunidas em 5 grupos. O grupo de frações 42-102, eluído em hexano/acetato de etila 50%, após sucessivos procedimentos cromatográficos utilizando coluna de sílica forneceu um sólido branco cristalino, de ponto de fusão 218-221°C, codificado de **TsFC-1** (25 mg).

A subfração em metanol (13,2 g) oriunda da fração clorofórmica das folhas foi realizado procedimento cromatográfico utilizando coluna de sílica. A fração 24, eluída em acetato de etila/metanol 5%, após concentração do solvente em capela de exaustão, mostrou-se como um sólido amorfo de coloração amarela, esta fração foi então submetida à permeação em Sephadex, a qual originou 14 frações que foram reunidas através de análise comparativa por CCD. As frações reunidas 6-13 foram recromatografadas utilizando coluna de sílica, este procedimento forneceu um sólido branco cristalino, de ponto de fusão 245-248 °C, codificado de **TsFC-2** (16 mg).





**ESQUEMA 1:** Procedimento realizado com a fração clorofórmica das folhas.

### **3.4.3 Fração em acetato de etila das folhas de *T. selloana***

A fração em acetato de etila (27,7g), apesar das tentativas de purificação utilizando coluna cromatográfica de sílica, permeação em Sephadex e lavagens com diversos solventes, não conduziu ao isolamento de substância com grau de pureza apropriado para determinação estrutural.

### **3.4.4 Fração aquosa das folhas de *T. selloana***

A fração aquosa (43,0 g), oriunda do extrato etanólico das folhas, foi submetida à lavagem com metanol à temperatura ambiente, seguida de filtração, resultando cristais de coloração verde-claro (230 mg). A água-mãe resultante da filtração, foi submetida à permeação em Sephadex, utilizando metanol/água 30% (frações 1 e 2 com 125 mL cada) e metanol (frações 3 e 4 com 125 mL cada). A fração 1, foi tratada com etanol dando origem a um material branco amorfo. Utilizando-se metanol/água 10%, o material branco amorfo foi submetido à cristalização. Observou-se a formação de cristais finos, de ponto de fusão 163-165°C, que foram codificados de **TsFA-1** (530 mg). O mesmo procedimento foi adotado para a fração 2, fornecendo cristais finos, de ponto de fusão 164-167°C, o qual observou-se também se tratar da substância codificada de **TsFA-1** (95 mg).

O material cristalino de coloração verde-claro, oriundo da fração aquosa das folhas (Esquema 2, p. 32), foi dissolvido em metanol/água 30% e submetido à permeação em Sephadex, originando 8 frações. As frações 2-6 foram reunidas e após tratamento com etanol formou-se um material branco. Utilizando-se metanol/água 10%, o material foi submetido a recristalização a qual deu origem a uma solução contendo cristais finos em forma de agulhas, de ponto de fusão 162-165°C, que foi submetida a filtração a vácuo e posteriormente com os dados de RMN verificou-se que também era a substância codificada de **TsFA-1** (50 mg).

### **3.4.5 Fração em Acetato de Etila do Caule de *Tocoyena selloana***

A fração em acetato de etila (12,3 g), proveniente da partição do extrato etanólico do caule (Esquema 3, p. 32), foi submetida à cromatografia em coluna de

sílica, obtendo-se 10 frações com volume médio de 125 mL cada, após concentração das soluções em evaporador rotativo, foi observado que a fração 9, eluída em acetato de etila/metanol 50%, apresentava sólido de coloração escura.

Esta fração foi submetida à recristalização usando metanol/água 10%, originando cristais finos, de ponto de fusão 154-156 °C, que apesar da diferença de pontos de fusão também se tratava de **TsFA-1** (114 mg).

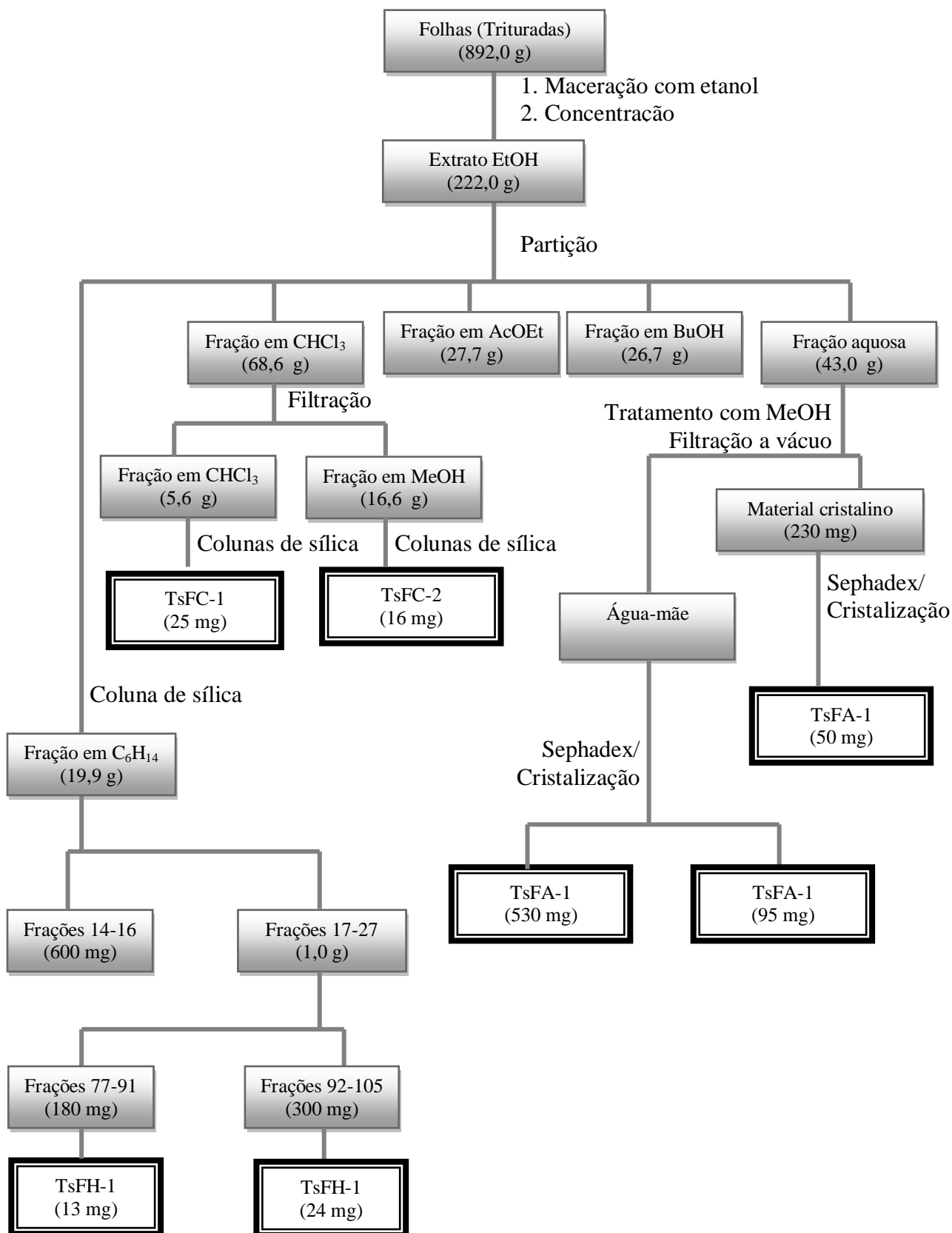
#### **3.4.6 Fração Aquosa do Caule de *Tocoyena selloana***

A fração aquosa do caule (25,1 g) foi submetida à filtração em sílica gel, utilizando funil de separação sob vácuo. Foram obtidas as frações em hexano (0,4g), clorofórmio (2,2g), acetato de etila (3,8g), metanol (1,7g) e aquosa (4,7g) (Esquema 3, p. 32).

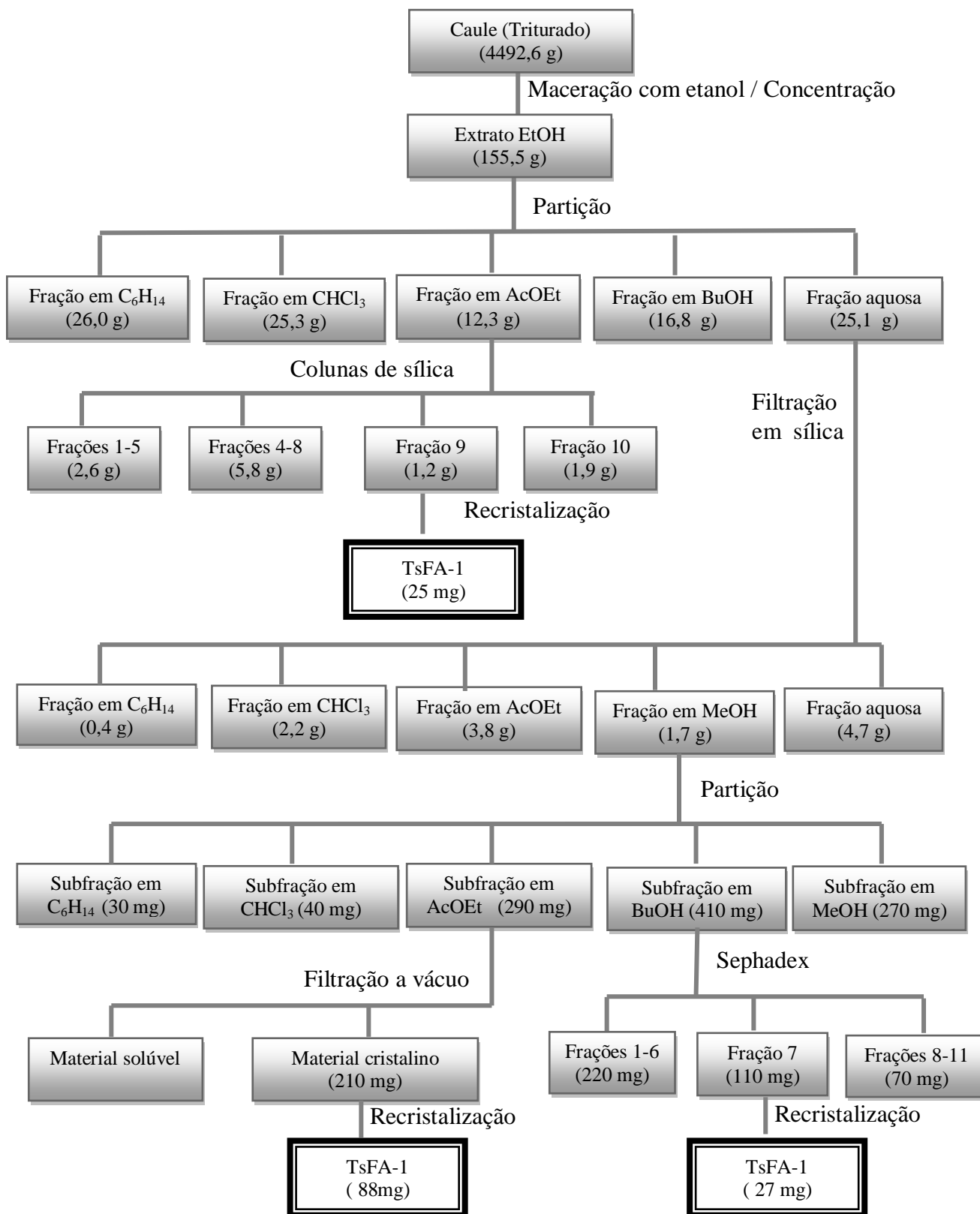
A fração metanólica (1,7 g) proveniente da filtração em sílica da fração aquosa do caule (Esquema 3, pág. 32), apresentou material branco com aspecto de farinha. Este foi suspenso em uma solução de metanol e água (4:1), e extraído sucessivamente com hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol. Após concentração das soluções, sob pressão reduzida em evaporador rotativo, foram obtidas as subfrações em hexano (30 mg), clorofórmio (40 mg), acetato de etila (290 mg), butanol (410 mg) e metanol (270 mg).

A subfração em acetato de etila, após eliminação do solvente apresentou material cristalino de coloração amarronzada. Depois de ser solubilizado em metanol/água 30% foi filtrado a vácuo, obtendo-se o material cristalino ainda com uma coloração marrom. Este foi submetido à recristalização usando metanol/água 10% e forneceu cristais finos, de ponto de fusão 164-166 °C, que também foi confirmado como **TsFA-1** (88 mg).

A subfração butanólica foi submetida à permeação em Sephadex, fornecendo um material branco que foi cristalizado, levando a quantidade adicional de **TsFA-1** (27 mg).



**ESQUEMA 2:** Procedimento efetuado com as Folhas de *T. selloana*



**ESQUEMA 3:** Procedimento realizado com o Caule de *T. selloana*

### 3.5 Ensaios Biológicos

#### 3.5.1 Atividade Larvicida Frente às Larvas do Mosquito *Aedes aegypti*

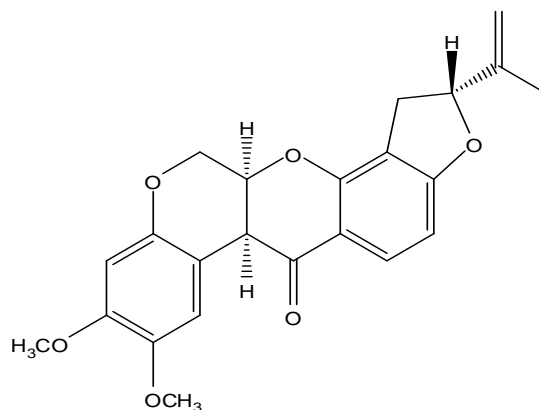
Os ensaios biológicos com as larvas de *A. aegypti* foram realizados no laboratório de bioensaios do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (IQB / UFAL), sob a orientação do Professor Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana e supervisão do doutorando Karlos Lisboa, utilizando-se de larvas no quarto estágio, segundo metodologia preconizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS 1970). O quadro 3 relaciona os extratos que foram avaliados.

**Quadro 3. Extratos e Frações submetidos aos ensaios larvicida**

Partes da Planta	Extratos
Folhas	<ul style="list-style-type: none"><li>• Extrato bruto e frações em C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt, BuOH e aquosa</li></ul>
Caule	<ul style="list-style-type: none"><li>• Extrato bruto e frações em C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt, BuOH e aquosa</li></ul>

Após a pesagem dos extratos, estes foram dissolvidos em solução aquosa de dimetilsulfóxido (DMSO) a 1% até a concentração de 500 ppm. Quando foi considerado promissor (causou mortalidade superior a 75%), foi analisado em menores concentrações visando à obtenção das concentrações letais (CL<sub>50</sub>).

Os testes preliminares foram feitos em duplicatas com 10 larvas em copos descartáveis de 200 mL contendo 25 mL de solução. As larvas foram consideradas mortas quando não conseguiam atingir a superfície da solução quando o recipiente era agitado. A contagem das larvas foi realizada a hora 0 (início do experimento), 24h e 48h, como controle negativo foi utilizada uma solução a 1% de DMSO e como controle positivo foi usada a rotenona (**38**) que é o larvicida sintético comercialmente disponível.



(38) rotenona

Dos extratos testados, foram considerados promissores e submetidos a testes quantitativos, aqueles que obtiveram percentual de mortalidade larval superior a 75%. Os dados concentração x mortalidade dos ensaios apurados foram submetidos a tratamento estatístico utilizando o programa Probit, para a determinação dos valores de concentração letal (CL<sub>50</sub>).

### 3.5.2 Atividade Moluscicida

Nos ensaios biológicos de atividade moluscicida, foram utilizados caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* Say criados em laboratório e descendentes de exemplares, não infectados por trematódeos, originários da região do Barreiro de Cima, zona periférica de Belo Horizonte, Minas Gerais. Essa população caracteriza-se por possuir 5% de exemplares albinos (Santos, 2005). Os testes com os extratos foram realizados no laboratório de bioensaios do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL, sob orientação do Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana e supervisão da doutoranda Cenira Monteiro. Utilizando-se do caramujo *B. glabrata* na fase adulta, de acordo com o protocolo da Organização Mundial de Saúde (OMS, 1994).

Os ensaios biológicos consistiram na imersão dos caramujos em uma solução aquosa a 100 ppm (100 µg mL<sup>-1</sup>) dos extratos etanólicos brutos e também das frações oriundas da partição. Foram utilizados 5 caramujos por concentração e os testes realizados em duplicata. Dois conjuntos de controle foram usados visando verificar a suscetibilidade dos caramujos, um positivo com niclosamida (34) a 3 ppm e um negativo - somente com água desclorada.

O tempo de exposição destes organismos foi de 24 horas e o de observação 72 horas, com leitura e troca de água a cada 24 horas, além da remoção dos exemplares mortos. Durante o período de observação foram alimentados com alface.

A morte dos caramujos foi indicada pela descoloração, ausência de contrações musculares, hemorragia e deterioração dos tecidos do corpo.

### **3.6 Dados Físicos e Espectroscópicos das Substâncias Isoladas**

#### **3.6.1 Substância TsFA-1**

Sólido branco cristalino, isolado da fração aquosa das folhas e das frações metanólica e em acetato de etila do caule.

**P.f.** = 164-166 °C; p.f. 165-168 °C (Oliveira *et al*, 2009).

**IV** (cm<sup>-1</sup>) (ATR) 3400, 3300, 2900, 1100, 1050 (Figura 5, p. 54)

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, D<sub>2</sub>O, δ) (Figura 6, p. 55)

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, D<sub>2</sub>O, δ) (Figura 7, p. 56)

**RMN DEPT 135°** (100 MHz, D<sub>2</sub>O, δ) (Figura 8, p. 56)

#### **3.6.2 Substância TsFH-1**

Sólido branco cristalino, isolado da fração hexânica das folhas.

**P.f.** = 232-234 °C; p.f. 232-235 °C (Costa *et al*, 2008).

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/DMSO-d<sub>6</sub>, δ) (Figuras 9 e 10, p. 57 e 58)

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>/DMSO-d<sub>6</sub>, δ) (Figuras 11 e 12, p. 59 e 60)

**RMN DEPT 135°** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>/DMSO-d<sub>6</sub>, δ) (Figuras 13 e 14, p. 61 e 62)

#### **3.6.3 Substância TsFC-2**

Sólido branco cristalino, isolado da fração clorofórmica das folhas.

**P.f.** = 246-248 °C; p.f. 252-254 °C (Jane *et al*, 1997)

**IV** (cm<sup>-1</sup>) (ATR) 3600-3200, 3000-2500, 1650, 1000 (Figura 15, p. 63)

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD, δ) (Figuras 16-18, p. 64-66)



**RMN  $^{13}\text{C}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ) (Figuras 19 e 20, p. 67 e 68)

**RMN DEPT 135 $^\circ$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ) (Figuras 21 e 22, p. 69 e 70)

#### **3.6.4 Substância TsFC-1**

Sólido branco cristalino, isolado da fração clorofórmica das folhas.

**P.f.** = 218-221  $^\circ\text{C}$

**IV** ( $\text{cm}^{-1}$ ) (ATR) 2900, 2850, 1700 (Figura 23, p. 71)

**RMN  $^1\text{H}$**  (400 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ,  $\delta$ ) (Figura 24, p. 72)

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ,  $\delta$ ) (Figuras 25 e 26, p. 73 e 74)

**RMN DEPT 135 $^\circ$**  (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ,  $\delta$ ) (Figuras 27 e 28, p. 75 e 76)

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 4.1 Identificação Estrutural das Substâncias Isoladas

### 4.1.1 Identificação Estrutural da Substância TsFA-1

A substância codificada de **TsFA-1**, de ponto de fusão 164-166°C, isolada como um sólido branco cristalino, foi obtida a partir da fração aquosa das folhas e das frações em acetato de etila e aquosa do caule.

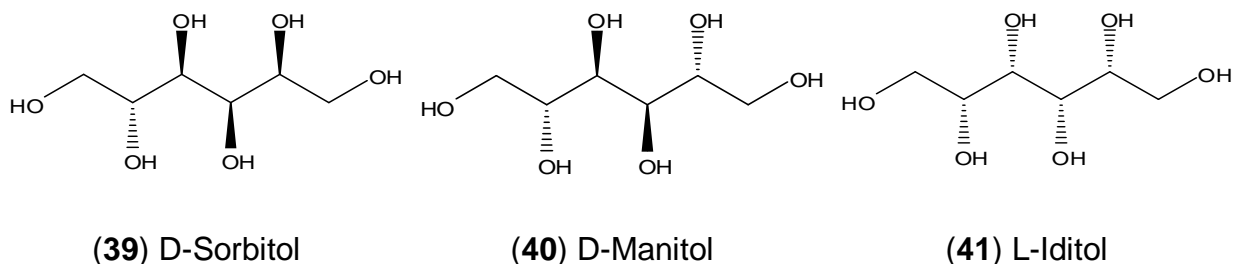
A cromatografia em camada delgada do constituinte **TsFA-1** não apresentou fluorescência quando irradiada com ultravioleta, também não apresentou revelação utilizando o reagente de Liebermann-Burchard e solução ácida de sulfato cérico.

O espectro no infravermelho (IV) (Figura 5, p. 54) de **TsFA-1** apresentou bandas de absorção intensas em 3400 e 3300  $\text{cm}^{-1}$ , em 2900  $\text{cm}^{-1}$  e 1100 e 1050  $\text{cm}^{-1}$ , sugestivas de um composto alifático poli-hidroxiado (Barbosa, 2007).

O espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) (Figura 6, p. 55; Tabela 1, p. 39) apresentou quatro sinais referentes a 8 hidrogênios carbinólicos, sendo dois duplo dupletos em  $\delta$  3,54 ( $J=11,0$  e 5,8Hz) e 3,74 ( $J=11,0$  e 2,5Hz), um duplo duplo duplete em  $\delta$  3,62 ( $J=8,6$ , 5,8 e 2,5Hz) e um duplete em  $\delta$  3,67. Esses dados aliados as informações obtidas no espectro de infravermelho sugeriram que **TsFA-1** se tratava de um poliálcool (Paula *et al*, 1998).

A análise do espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ) (Figura 7, p. 56; Tabela 2, p. 40) revelou a presença de apenas três sinais ( $\delta$  63,1, 69,1, 70,7) e o experimento DEPT permitiu atribuir o sinal de carbono em  $\delta$  63,1 a um  $\text{CH}_2$  e os sinais em  $\delta$  69,1 e  $\delta$  70,7 a dois CH, o que levou a propor que a substância em questão se tratava de um alditol com seis átomos de carbono e simétrica, descartando assim a estrutura do D-Sorbitol (**39**), o qual é assimétrico, e sugerindo um poliálcool simétrico, como o D-Manitol (**40**) ou o L-iditol (**41**).

A análise em conjunto dos dados dos espectros de infravermelho, RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT, em adição ao ponto de fusão (Quadro 4, p. 40), e comparação com dados descritos na literatura para polióis, permitiram sugerir para a substância **TsFA-1**, a estrutura do carboidrato (2R, 3R, 4R, 5R)-1,2,3,4,5,6-hexa-hidroxi-hexano, conhecido como *D-manitol*, o qual apresenta um eixo de simetria  $\text{C}_2$  e quatro centros estereogênicos (Oliveira *et al*, 2009; Ferreira *et al*, 2009).



O D-Manitol é um carboidrato natural encontrado em diversos vegetais como beterraba, cebola, figo e azeitonas e também está presente em alguns exsudados de árvores e algas marinhas (Ferreira *et al*, 2009). É um poliálcool muito utilizado para os mais variados fins, como na indústria farmacêutica onde é usado como excipiente do tipo diluente, em comprimidos que devem dissolver na boca, devido à agradável sensação de doçura e frescor. Por não ser higroscópico é usado também como estabilizante em comprimidos que contenham compostos sensíveis a umidade, como a vitamina C e o ácido acetilsalicílico (Oliveira *et al*, 2008). É também utilizado como diurético osmótico para neuroanestesia e neuroremediação devido não ser absorvido no trato gastrointestinal (Oliveira *et al*, 2009).

Há alguns relatos na literatura de isolamento do D-Manitol na família Rubiaceae (Silva *et al*, 2007; Lapikanon *et al*, 1983; Luciano *et al*, 2004). Já no gênero *Tocoyena* não foi encontrado registro de isolamento, sendo portanto, descrito pela primeira vez neste gênero.

**Tabela 1.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) de **TsFA-1** e do **D-manitol** (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) (Guimarães, 2006).

H	TsFA-1	D-Manitol
1a	3,54 dd ( $J = 11,0$ e $5,8\text{Hz}$ )	3,58 dd ( $J = 11,6$ e $5,8\text{Hz}$ )
1b	3,74 dd ( $J = 11,0$ e $2,5\text{Hz}$ )	3,78 dd ( $J = 11,6$ e $2,5\text{Hz}$ )
2	3,62 ddd ( $J = 8,6$ , $5,8$ e $2,5\text{Hz}$ )	3,68 ddd ( $J = 8,5$ , $5,8$ e $2,5\text{Hz}$ )
3	3,67 d	3,71 d

**Tabela 2.** Dados de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, D<sub>2</sub>O) de **TsFA-1**, do **D-manitol** (100 MHz, D<sub>2</sub>O) (Paula *et al*, 1998), do **L-Iditol** (100 MHz, D<sub>2</sub>O) (Liu & Liu, 2008) e do **D-Sorbitol** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) (Margulies *et al*, 2000).

<b>C</b>	<b>TsFA-1</b>	<b>D-Manitol</b>	<b>L-Iditol</b>	<b>D-Sorbitol</b>
1	63,1	63,7	66,0	63,7
2	69,1	69,6	73,5	73,4
3	70,7	71,2	72,0	70,7
4	70,7	71,2	72,0	72,6
5	69,1	69,6	73,5	72,5
6	63,1	63,7	66,0	63,8

**Quadro 4.** Valores de pontos de fusão de **TsFA-1**, do **D-manitol** (Oliveira *et al*, 2009), do **D-Sorbitol** (Willians *et al*, 2006) e do **L-Iditol** (Liu & Liu, 2008).

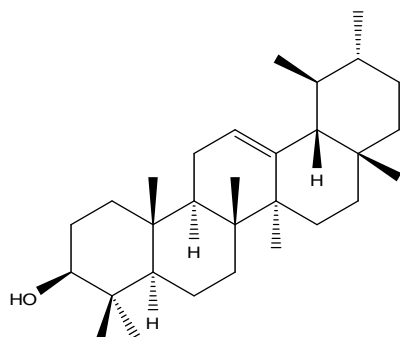
<b>Substância</b>	<b>Ponto de fusão (°C)</b>
<b>TsFA-1</b>	<b>164-166</b>
<b>D-manitol</b>	<b>165-168</b>
<b>D-Sorbitol</b>	<b>95-99</b>
<b>L-Iditol</b>	<b>73-75</b>

#### 4.1.2 Identificação Estrutural da Substância TsFH-1

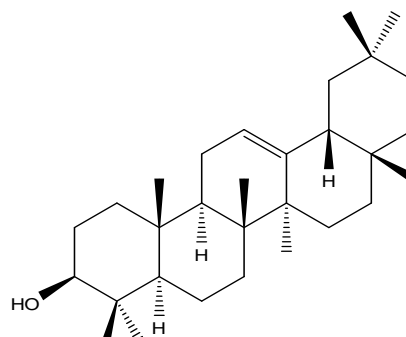
A substância codificada de **TsFH-1**, isolada como um sólido branco cristalino, de ponto de fusão 232-234°C, teve sua natureza triterpenoídica sugerida por apresentar coloração rosa com o reagente de Liebermann-Burchard (Jain & Yadaya, 1994).

A análise dos dados do espectro de RMN <sup>1</sup>H de TsFH-1 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-DMSO-d<sub>6</sub>) (Figuras 9 e 10, p. 57 e 58) permitiu identificar um sinal de hidrogênio olefínico [ $\delta$  5,03 (sl)], sugerindo a presença de hidrogênio H-12 de triterpeno pentacíclico com esqueleto ursano ou oleanano, tais como a  $\alpha$ -amirina (**42**) e  $\beta$ -amirina (**43**), respectivamente (Mahato & Kandu, 1994). Apresentou também sinal de hidrogênio de carbono carbinólico [ $\delta$  3,44 (d,  $J = 7$  Hz)] e vários sinais compatíveis

com deslocamentos químicos de hidrogênios metílicos ( $\delta$  0,48-1,23) e metilênicos ( $\delta$  1,34-2,89).



(42)  $\alpha$ -amirina



(43)  $\beta$ -amirina

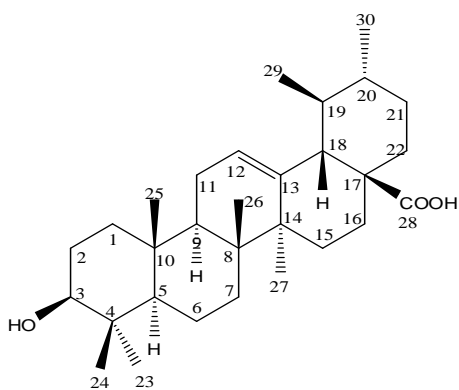
Os dados obtidos dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ -DMSO- $d_6$ ) (Figuras 11 e 12, p. 59 e 60; Tabela 3, p. 41) permitiram reconhecer a presença de 30 sinais de átomos de carbono, sendo sete carbonos não hidrogenados, sete monoidrogenados, nove diidrogenados e sete triidrogenados. Dentre esses, foram observados sinais com deslocamentos químicos compatíveis com carbonos olefínicos [ $\delta$  137,8 (C, C-13) e  $\delta$  124,7 (CH, C-12)], característicos de triterpenos com esqueleto urs-12-eno (Mahato & Kandu, 1994). Observaram-se ainda, sinais para carbono carbonílico [ $\delta$  179,5] de ácido carboxílico e para carbono carbinólico [ $\delta$  77,9]. A análise comparativa destas informações com os dados obtidos na literatura (Junges *et al*, 2000) permitiram sugerir que **TsFH-1** se tratava do ácido 3 $\beta$ -hidróxi-urs-12-en-28-óico, conhecido como *ácido ursólico* (**19**). A tabela 3 mostra os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de TsFH-1, do ácido ursólico e da substância com esqueleto oleanano, o ácido oleanólico (**20**).

Na família Rubiaceae existem vários relatos na literatura de isolamento do ácido ursólico (Barros *et al*, 2008; Lima *et al*, 2009; Moura *et al*, 2006). Entretanto, no gênero *Tocoyena* não foi encontrado registro de isolamento, sendo portando descrito pela primeira vez neste gênero.

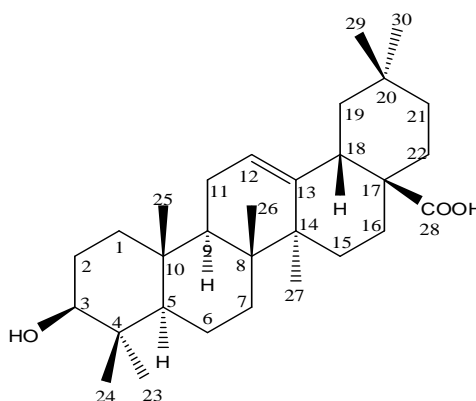
Várias atividades biológicas têm sido atribuídas ao ácido ursólico, tais como: antiinflamatória, hepatoprotetora, antitumoral e antimicrobiana (Leite *et al*, 2001).

**Tabela 3.** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de **TsFH-1** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-DMSO-d}_6$ ), dos **ácidos ursólico** (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Junges *et al*, 2000) e **oleanólico** ( $\text{CDCl}_3$ ) (Mahato & Kandou, 1994).

Posição	TsFH-1	Ácido ursólico	Ácido oleanólico
1	38,2	38,9	38,5
2	23,0	23,5	27,4
3	77,9	78,3	78,7
4	38,3	37,3	38,7
5	54,7	55,7	55,2
6	17,8	18,7	18,3
7	32,5	33,3	32,6
8	38,5	39,3	39,3
9	47,0	46,7	47,6
10	36,3	37,2	37,0
11	23,7	23,8	23,1
12	124,7	125,5	122,1
13	137,8	139,2	143,4
14	41,5	42,0	41,6
15	28,8	28,4	27,7
16	22,1	22,7	23,4
17	47,0	47,9	46,6
18	52,2	53,4	41,3
19	39,1	39,3	45,8
20	38,1	39,8	30,6
21	30,9	30,9	33,8
22	36,4	37,3	32,3
23	27,7	28,6	28,1
24	15,0	16,5	15,6
25	15,3	15,6	15,3
26	17,8	16,5	16,8
27	22,7	23,5	26,0
28	179,5	179,8	181,0
29	16,6	17,3	33,1
30	20,8	21,3	23,6



**(19)** ácido ursólico



**(20)** ácido oleanólico

#### 4.1.3 Identificação Estrutural da Substância TsFC-2

A substância codificada de **TsFC-2**, isolada como um sólido branco cristalino, de ponto de fusão 245-248°C, teve sua natureza triterpenoídica sugerida por apresentar coloração rosa com o reagente de Liebermann-Burchard e coloração violeta com solução ácida de sulfato cérico (Jain & Yadaya, 1994).

O espectro na região do infravermelho, obtido com a utilização de acessório ATR, no qual a amostra é colocada diretamente no equipamento (Figura 15, p. 63), apresentou bandas intensas na região de 3600 a 3200  $\text{cm}^{-1}$  e em 1000  $\text{cm}^{-1}$ , sugestivas de estiramentos de grupos hidroxila e C-O de álcool, respectivamente (Barbosa, 2007). Apresentou também bandas na região de 3000-2500  $\text{cm}^{-1}$  e em 1650  $\text{cm}^{-1}$ , que sugerem a presença de grupo carboxila (Barbosa, 2007).

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$ ) (Figuras 16-18, p. 64-66) mostrou, a presença de um sinal em  $\delta$  5,30, compatível com o deslocamento químico de hidrogênio olefínico, um sinal para hidrogênio carbinólico ( $\delta$  3,16) e sinais para hidrogênios de seis grupos metila em ( $\delta$  0,69;  $\delta$  0,63;  $\delta$  0,58;  $\delta$  0,56;  $\delta$  0,50;  $\delta$  0,42). Observaram-se também sinais sugestivos da presença de uma unidade  $\beta$ -D-glicopiranosídica:  $\delta$  4,01 [(d);  $J = 7,7$ , H-1' carbono anomérico], em  $\delta$  3,75-3,91 (m; H-3', H-4' e H-5') 3,52 (dd;  $J = 2,7$  e 11,8, H-6'a), e  $\delta$  3,41 (dd;  $J = 4,8$  e 11,8, H-6'b). Adicionalmente foi observado um duplete em  $\delta$  1,95, compatível com deslocamento químico de hidrogênio em C-18 de um triterpeno pentacíclico (Hameski *et al*, 2005).

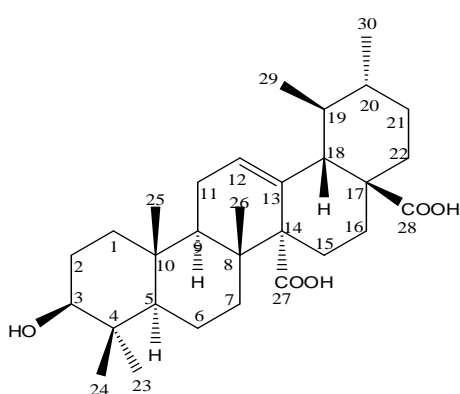
Os dados fornecidos pela análise dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (Figuras 19-22, p. 67-70; tabela 4, p. 45), permitiram reconhecer a presença de um total de 36 átomos de carbono (oito não hidrogenados, doze monoidrogenados, dez diidrogenados e seis triidrogenados). Dentre esses átomos de carbonos, seis apresentam deslocamentos químicos compatíveis com a presença de uma unidade  $\beta$ -D-glicopiranosila [ $\delta$  104,5 (CH, C-1'),  $\delta$  75,1 (CH, C-2'),  $\delta$  77,3 (CH, C-3'),  $\delta$  69,4 (CH, C-4'),  $\delta$  75,9 (CH, C-5') e  $\delta$  60,9 ( $\text{CH}_2$ , C-6')] (Hameski *et al*, 2005), confirmado, portanto, as evidências fornecidas pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$ . Os Trinta átomos de carbono restantes correspondem à uma unidade aglicônica triterpenoídica. Assim, a região de absorção de carbonos olefínicos revelou dois sinais com deslocamentos químicos condizentes com a presença de uma ligação dupla trissubstituída [ $\delta$  131,6



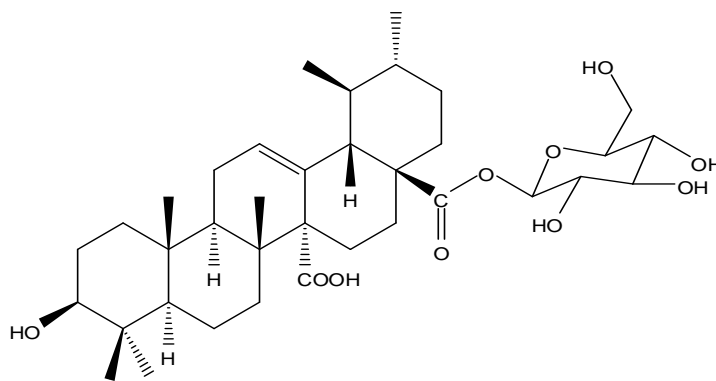
(C, C-13) e  $\delta$  128,4 (CH, C-12)] que são característicos de triterpenos da série ursano (Mahato & Kandou, 1994). Estão presentes, também, dois sinais em  $\delta$  179,9 e  $\delta$  177,2, compatíveis com carbonilas de grupo carboxílico. A análise comparativa destas informações com os dados obtidos da literatura permitiram sugerir que **TsFC-2** se tratava do ácido quinóvico (**13**) glicosilado. Quanto à posição da unidade de açúcar, a presença de um sinal com deslocamento químico em  $\delta$  89,9 permitiu a sua localização na posição C-3, descartando, assim, a possibilidade de tratar-se do ácido 28-O- $\beta$ -D-glicopiranosilquinóvico (**14**), cuja unidade de açúcar localiza-se no carbono C-28 (Mahato & Kandou, 1994; Oliveira *et al*, 2008).

A análise conjunta dos dados espectroscópicos discutidos e comparação com dados da literatura permitiram sugerir para a substância **TsFC-2**, a estrutura da saponina triterpênica conhecida como ácido 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosilquinóvico (**31**) (Hamerski *et al*, 2005).

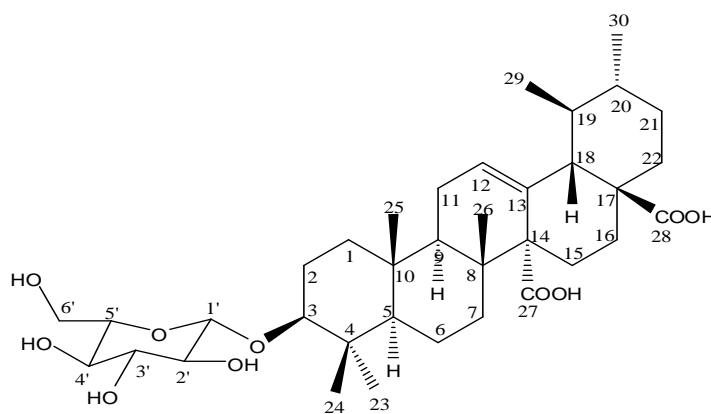
O ácido 3- $\beta$ -O-D-glicopiranosilquinóvico já havia sido isolado anteriormente de espécies do gênero *Tocoyena*, bem como de um espécime de *T. selloana* estudado por um grupo da Universidade Federal do Ceará (Jane *et al*, 1997).



(13) ácido quinóvico



(14) ácido 28-O- $\beta$ -D-glicopiranosilquinóvico



(31) ácido 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosilquinóvico

**Tabela 4.** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$ ) de **TsFC-2**, dos **ácidos 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosilquinóvico (31)** (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Hamerski *et al*, 2005), **quinóvico (13)** (75 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) (Oliveira *et al*, 2008) e **28-O- $\beta$ -D-glicopiranosil quinóvico (33)** (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) (Hameski *et al*, 2005).

Carbonos	<b>TsFC-2</b>	<b>(31)</b>	<b>(13)</b>	<b>(33)</b>
1	37,8	38,6	39,5	39,0
2	23,8	24,1	26,7	24,4
3	89,0	88,0	78,3	77,6
4	38,1	39,0	39,6	38,7
5	54,7	55,3	56,1	54,8
6	17,3	17,8	19,2	17,1
7	35,9	36,3	37,9	36,1
8	38,0	38,9	40,4	38,9
9	45,9	46,2	47,6	46,8
10	35,8	38,7	37,7	38,7
11	21,8	22,4	23,7	23,5
12	128,4	128,0	129,3	128,0
13	131,6	132,5	134,5	132,6
14	55,2	55,3	57,1	56,2
15	29,2	29,8	28,5	29,1
16	24,4	25,0	25,9	25,7
17	47,9	47,3	49,1	47,8
18	53,2	53,7	55,3	53,8
19	38,2	38,5	39,7	38,6
20	36,2	36,6	38,0	36,4
21	25,1	25,6	30,9	30,2
22	35,9	35,9	37,4	37,0
23	26,8	27,8	19,3	28,2
24	16,4	16,5	28,9	16,5
25	15,3	16,1	17,0	16,1
26	18,0	18,2	17,0	17,9
27	177,2	176,3	178,4	175,3
28	179,9	178,6	180,5	176,9
29	15,4	17,5	18,5	18,6
30	20,0	21,1	21,7	21,2
1'	104,5	105,6	-	94,0
2'	75,1	74,0	-	72,4
3'	77,3	76,9	-	76,6
4'	69,4	70,3	-	69,6
5'	75,9	76,6	-	76,6
6'	60,9	61,3	-	60,8

#### 4.1.4 Identificação Estrutural de TsFC-1

A substância codificada de **TsFC-1**, obtida em mistura a partir da fração clorofórmica das folhas, foi isolada como um sólido branco cristalino, de ponto de fusão 218-221°C. A análise da mistura por cromatografia em camada delgada de sílica, utilizando-se vários eluentes e, como reveladores, o reagente de Liebermann-Burchard e solução ácida de sulfato cérico, mostrou uma única mancha de coloração rosa e violeta, respectivamente, sugestiva de substâncias de natureza triterpênica (Jain & Yadaya, 1994).

O espectro na região do infravermelho da mistura (Figura 23, p. 71), obtido utilizando acessório ATR, revelou a natureza alifática dos constituintes e, dentre outras bandas, a presença de duas bandas de absorção de grupos carbonila, uma de baixa intensidade em 1715 cm<sup>-1</sup> e a outra mais intensa em 1700 cm<sup>-1</sup>.

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 24, p. 72) da mistura foi pouco informativo devido à baixa resolução do mesmo. No entanto, revelou na região de absorção de hidrogênios olefínicos, um sinal com deslocamento químico em  $\delta$  5,03, sugestivo de hidrogênio em C-12 de triterpeno pentacíclico com esqueleto urs-12-eno e/ou olean-12-eno (Connolly & Hill, 1991). Mostrou também vários sinais na região de absorção de grupos metila ( $\delta$  0,60-1,26).

A análise conjunta dos dados obtidos dos espectros de RMN <sup>13</sup>C (Figuras 25 e 26, p. 73 e 74; Tabela 6, p. 48;) e DEPT 135° (Figuras 27 e 28, p. 75 e 76), apesar do grande número de sinais presentes, permitiu reconhecer na região de absorção de átomos de carbono olefínicos, dois carbonos cujos valores de deslocamentos químicos [  $\delta$  139,1 (C, C-13) e  $\delta$  125,5 (CH, C-12)], estão condizentes com a presença de triterpeno de esqueleto urs-12-eno (Mahato & Kandu, 1994)

A análise comparativa das informações fornecidas pelos espectros da mistura com os dados obtidos da literatura permitiu sugerir a presença de ácido ursólico (**TsFC-1M**) (**19**), como um dos constituintes da mistura, já isolado da fração hexânica das folhas (p. 41) (Junges *et al*, 2000).

Retornando ao espectro de RMN <sup>13</sup>C da mistura, foi possível ainda reconhecer sinais de alta intensidade ( $\delta$  30,6, 31,2, 30,4, 30,0 e 14,4) sugestivos da presença de hidrocarboneto saturado de cadeia longa.

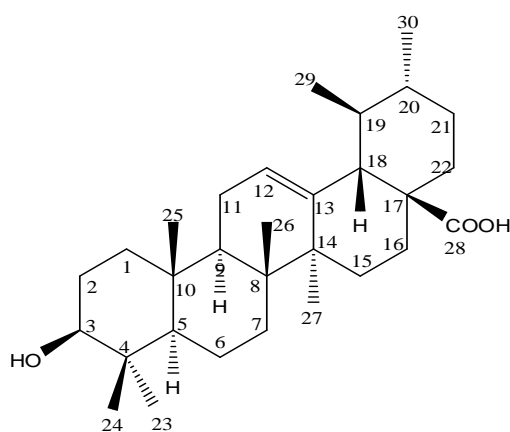
Quanto à substância **TsFC-1**, exceto os sinais atribuídos aos átomos de carbono do ácido ursólico (TsFC-1M; Tabela 6) e aos da graxa, observam-se, no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , um sinal com deslocamento químico em  $\delta$  206,1, indicativo de grupo carbonila de cetona, vários sinais na região de ligação dupla ( $\delta$  139,6-114,7), além de outros sinais compatíveis com carbono saturado, conforme mostrado na tabela 5 (p. 47). Apesar das tentativas, com os dados fornecidos, não foi possível propor estrutura para o componente da mistura **TsFC-1**.

**Tabela 5.** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de **TsFC-1**.

Sinal	Carbono
206,1	C
139,6	CH
139,4	CH
125,2	CH
124,8	CH
119,8	CH
114,7	C
34,2	C
33,7	C
30,1	$\text{CH}_3$
29,7	$\text{CH}_2$
29,5	$\text{CH}_3$
29,3	C
28,8	C
25,0	C

**Tabela 6.** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de **TsFC-1M** (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ), e do **ácido ursólico** (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Junges *et al*, 2000)

Posição	TsFC-1M	Ácido ursólico
1	37,6	38,9
2	23,7	23,5
3	78,2	78,3
4	37,4	37,3
5	55,9	55,7
6	18,9	18,7
7	32,2	33,3
8	40,0	39,3
9	48,2	46,7
10	35,3	37,2
11	25,0	23,8
12	125,8	125,5
13	139,1	139,2
14	42,6	42,0
15	28,2	28,4
16	23,0	22,7
17	48,1	47,9
18	53,6	53,4
19	39,6	39,3
20	39,5	39,8
21	31,5	30,9
22	39,5	37,3
23	28,9	28,6
24	16,7	16,5
25	15,8	15,6
26	17,6	16,5
27	24,0	23,5
28	180,1	179,8
29	17,7	17,3
30	21,5	21,3



(19) ácido ursólico

## 4.2 Resultados dos Testes de Atividade Biológica

### 4.2.1 Atividade Larvicida

Dentre os extratos das folhas e do caule que foram submetidos aos ensaios preliminares, na concentração de 500 ppm, foram considerados promissores somente o extrato bruto do caule (90% de letalidade) e a fração clorofórmica do caule (80% de letalidade) (Tabela 7).

Para a fração em  $\text{CHCl}_3$  do caule, a concentração que causa 50% da mortalidade da população de larvas ( $\text{CL}_{50}$ ) foi determinada em  $\text{CL}_{50}$  260,755 ppm, com intervalo de confiança entre 213,374 a 319,310. Para o extrato bruto do caule, a concentração letal foi determinada em  $\text{CL}_{50}$  298,808 ppm com intervalo de confiança entre 252,672 a 355,508. De acordo com dados da literatura (Cheng *et al*, 2003) é considerado um bom agente larvicida substâncias com valores de  $\text{CL}_{50}$  menores que 100 ppm, portanto, na concentração testada a espécie foi considerada inativa.

**Tabela 7: Resultado dos bioensaios preliminares de atividade larvicida, realizados na concentração de 500 ppm.**

Fração	% de Letalidade	$\text{CL}_{50}$
Hexânica (Folhas)	0	
Clorofórmica (Folhas)	0	
Acetato (Folhas)	20	
Butanólica (Folhas)	0	
Aquosa (Folhas)	0	
Extrato bruto (Folhas)	20	
Hexânica (Caule)	0	
<b>Clorofórmica (Caule)</b>	<b>90</b>	<b>260,755</b>
Acetato (Caule)	0	
Butanólica (Caule)	0	
Aquosa (Caule)	20	
<b>Extrato bruto (Caule)</b>	<b>80</b>	<b>298,808</b>

#### 4.2.2 Atividade Moluscicida

Na avaliação da atividade moluscicida, os extratos brutos e as frações das folhas e do caule de *T. selloana*, na concentração de 100 ppm, não causaram a mortalidade dos caramujos, sendo portanto, considerados inativos frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*.

## **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS**



O estudo fitoquímico dos extratos etanólicos do caule e das folhas de *Tocoyena selloana* (Rubiaceae) conduziu ao isolamento de quatro substâncias, das quais três tiveram suas estruturas identificadas.

A substância **TSFA-1**, isolada da fração aquosa das folhas e também das frações em acetato de etila e aquosa do caule foi identificada como sendo o carboidrato **(2R, 3R, 4R, 5R)-1,2,3,4,5,6-hexa-hidroxi-hexano** (D-Manitol), isolado pela primeira vez no gênero *Tocoyena*.

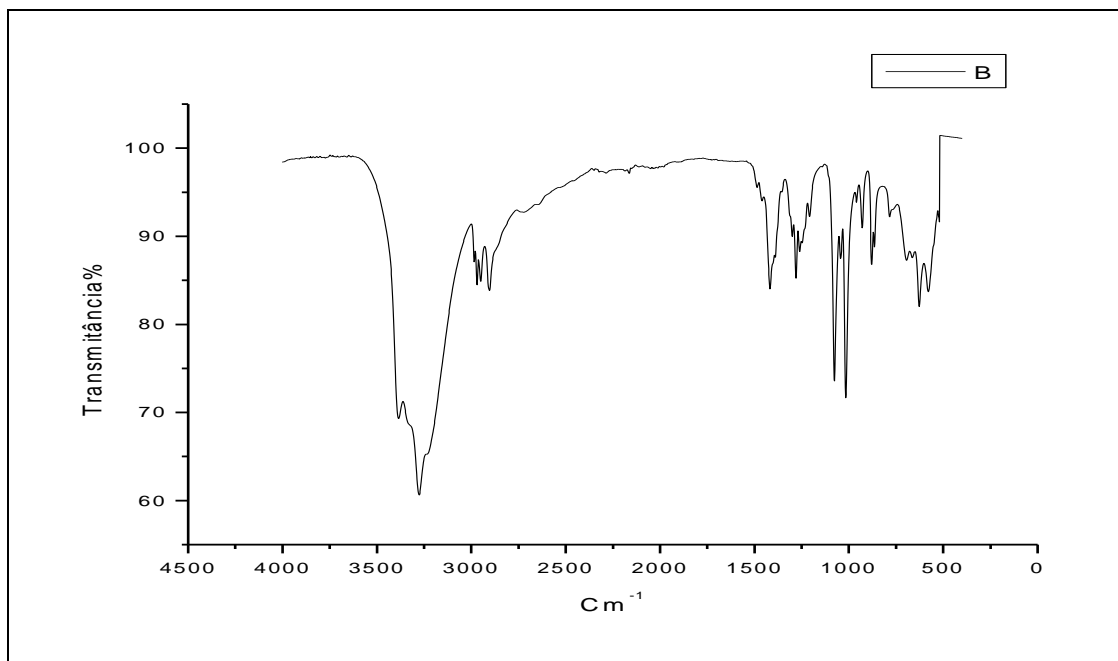
A substância codificada como **TsFH-1** isolada da fração hexânica das folhas foi identificada como o triterpeno da série ursano, conhecido como **ácido ursólico**, para o qual não foi encontrado registro na literatura em espécies do gênero *Tocoyena*.

A substância **TsFC-2**, isolada da fração clorofórmica das folhas foi identificada como sendo uma saponina triterpênica derivada do ácido quinóvico, conhecida como ácido **3-O-β-D-glicopiranosílquinóvico**, previamente isolado de um espécime de *T. selloana* estudado na Universidade Federal do Ceará.

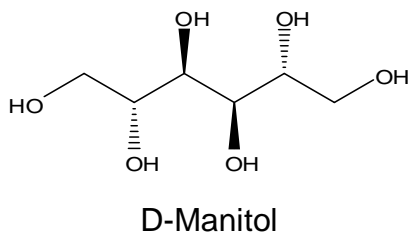
Os extratos e frações obtidos de *Tocoyena selloana* apresentaram fraca atividade larvicida frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

Os testes biológicos realizados com os extratos e frações obtidos de *Tocoyena selloana*, foram biologicamente inativos frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*, na concentração de 100 ppm.

# **6. ESPECTROS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS**



**Figura 5.** Espectro de IV (ATR) de TsFA-1.



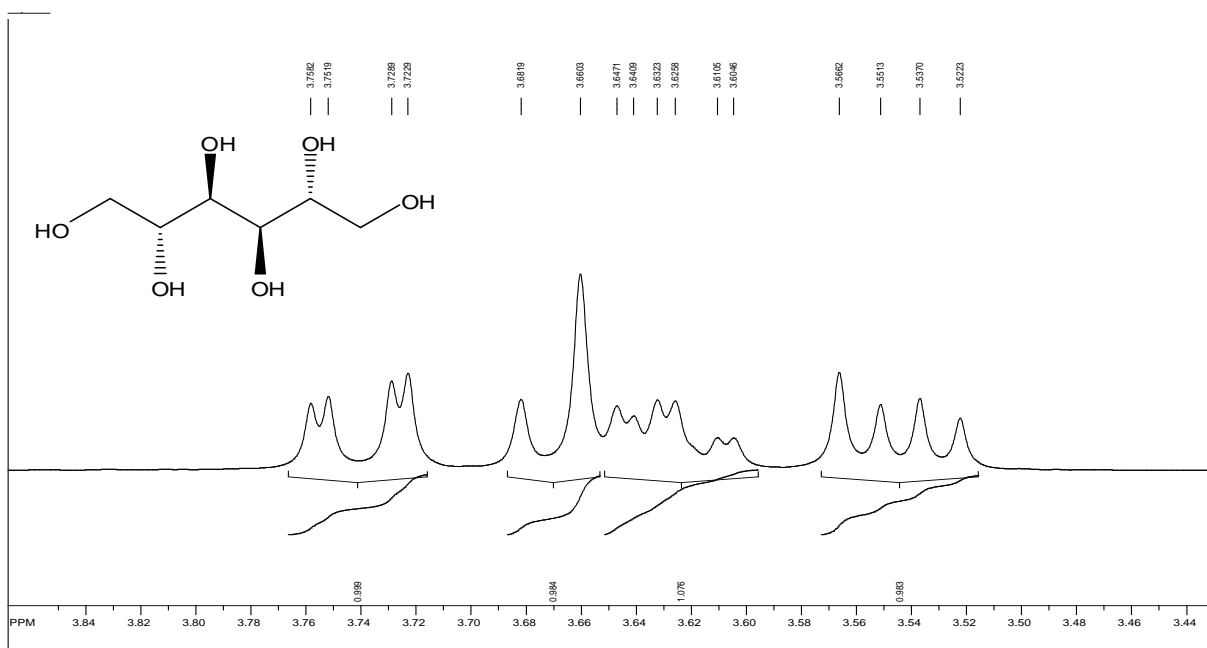
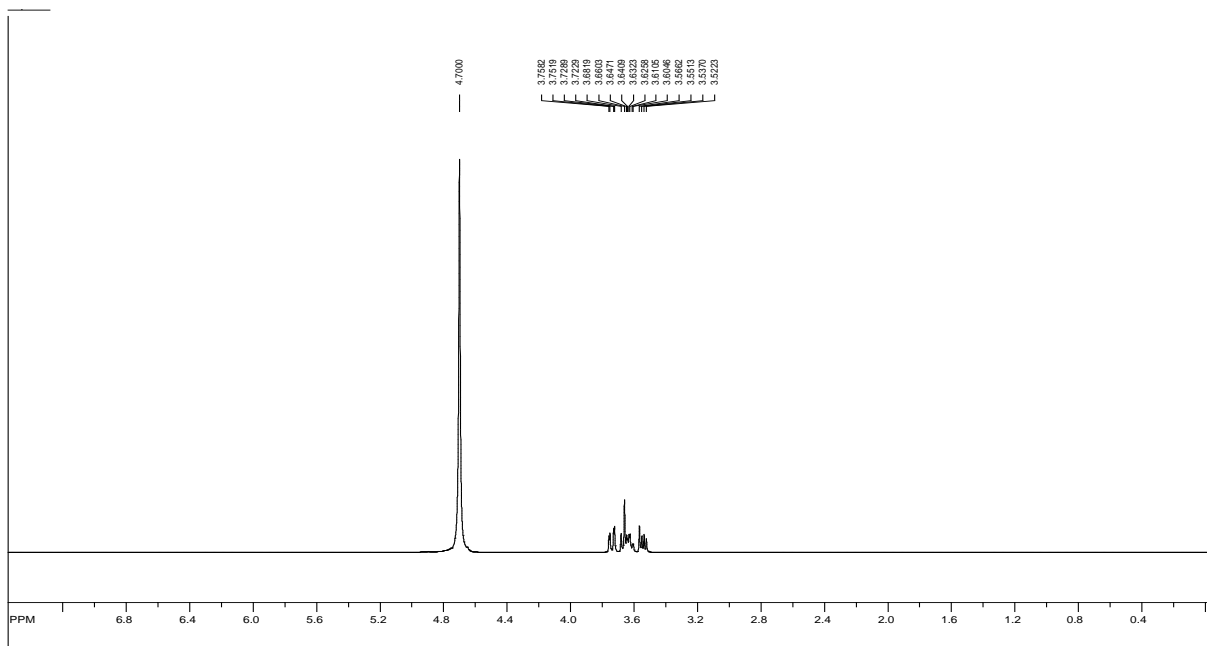
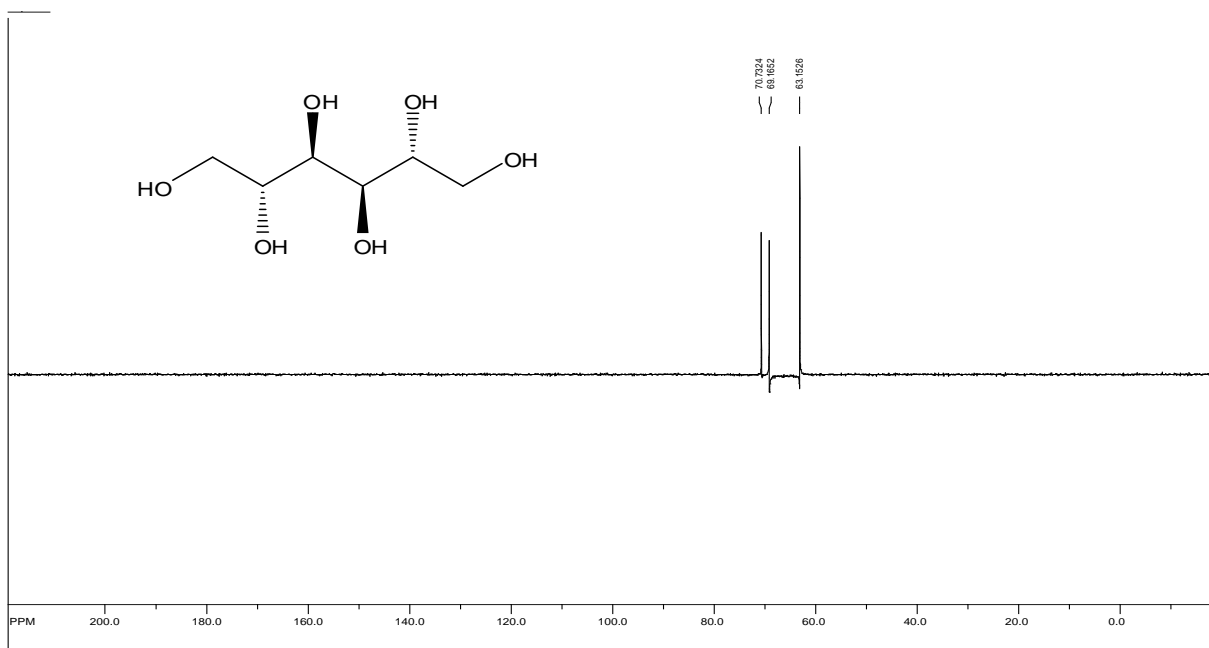
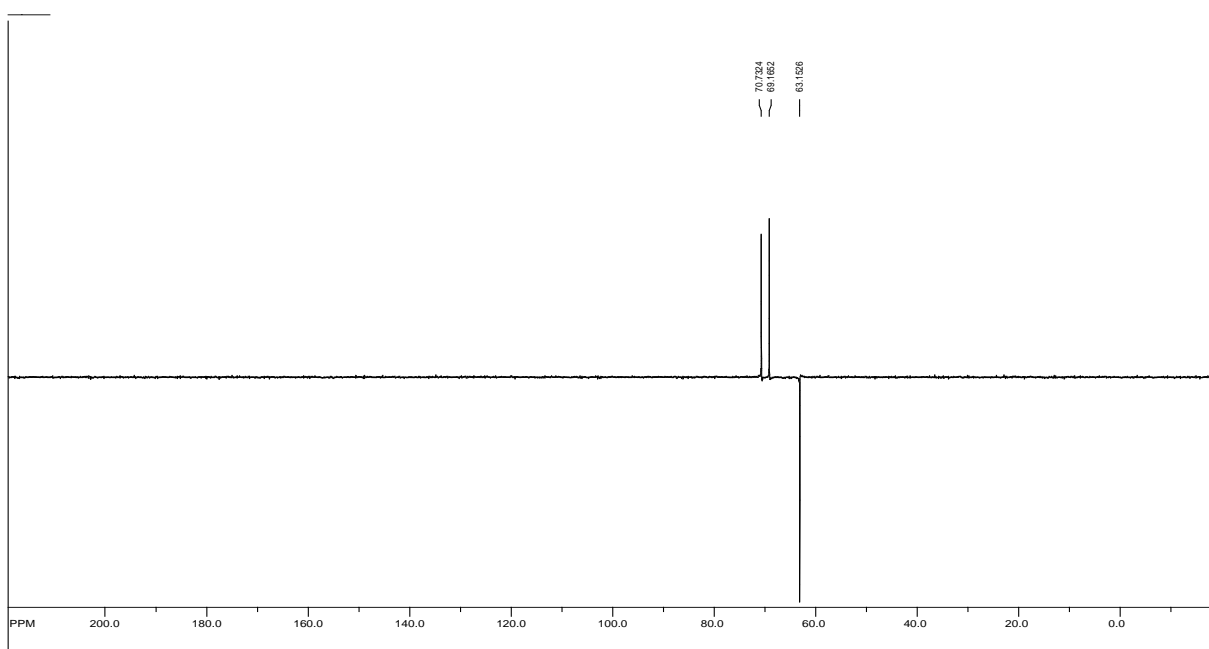


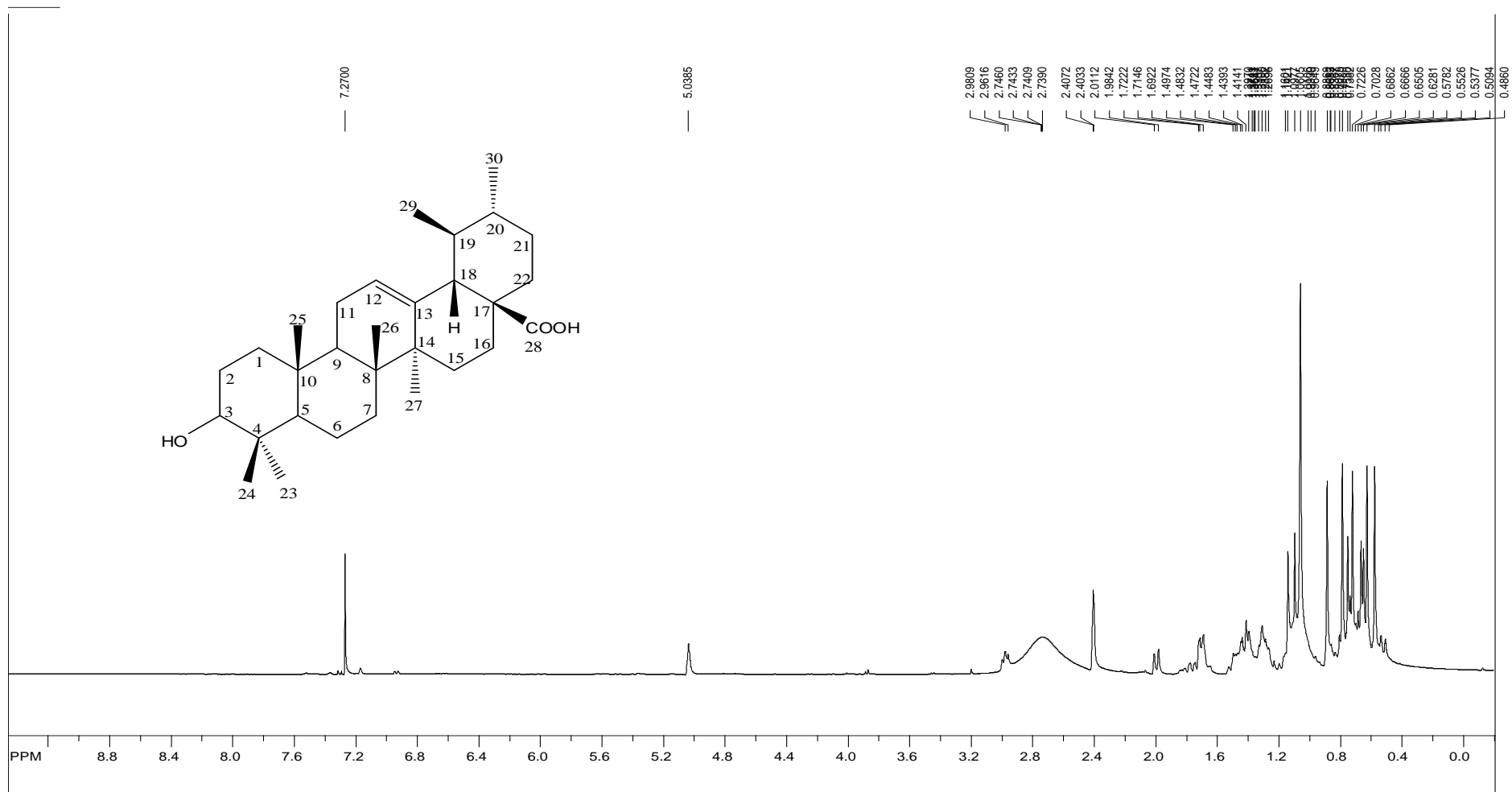
Figura 6. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) da substância codificada de TsFA-1.



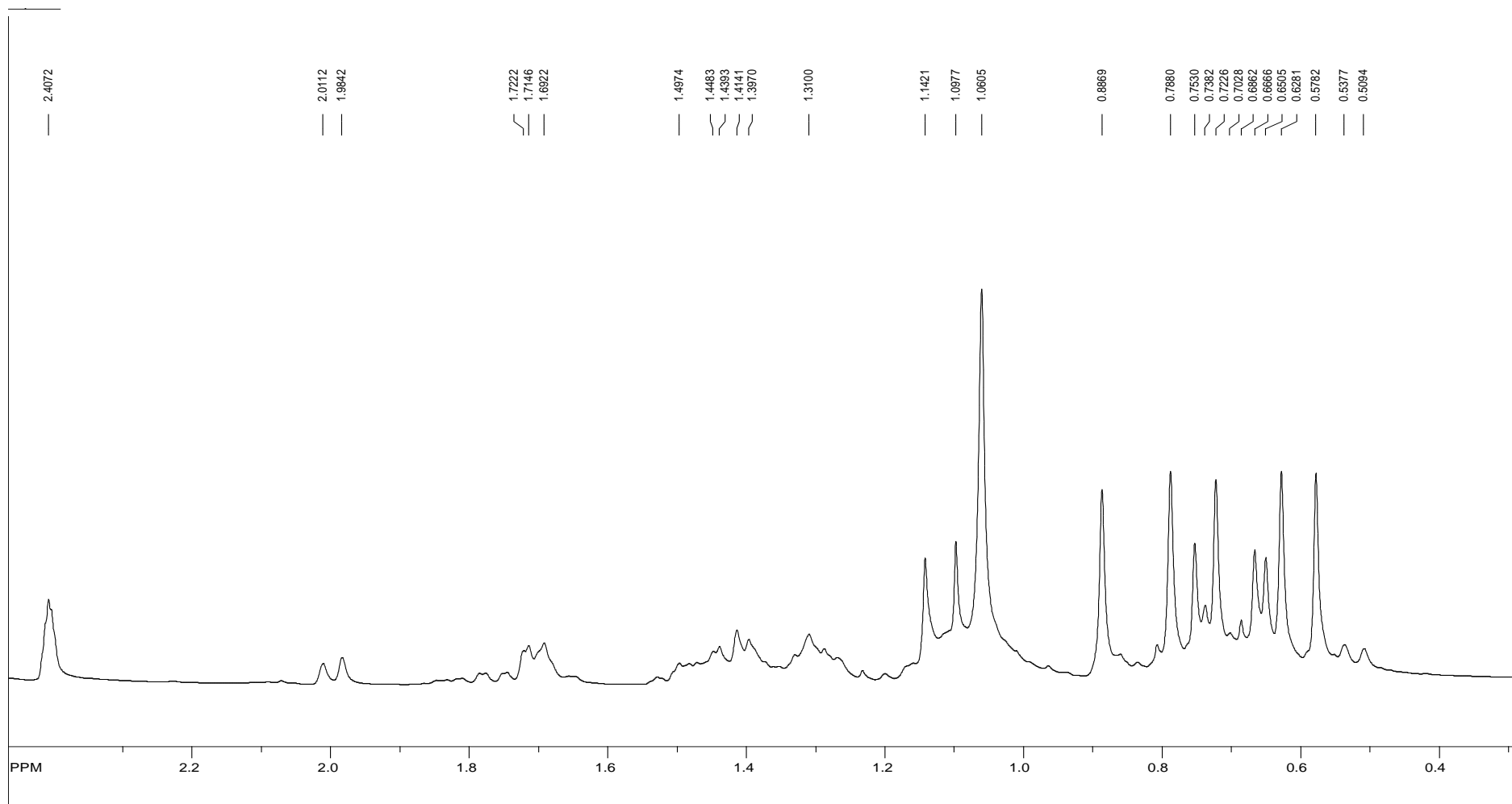
**Figura 7.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) da substância **TsFA-1**.



**Figura 8.** Espectro de RMN DEPT  $135^\circ$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) de **TsFA-1**.



**Figura 9.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-DMSO-d}_6$ ) de **TsFH-1**.



**Figura 10.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-DMSO-d}_6$ ) de **TsFH-1** (Ampliado na região  $\delta$  0,0 – 2,6).

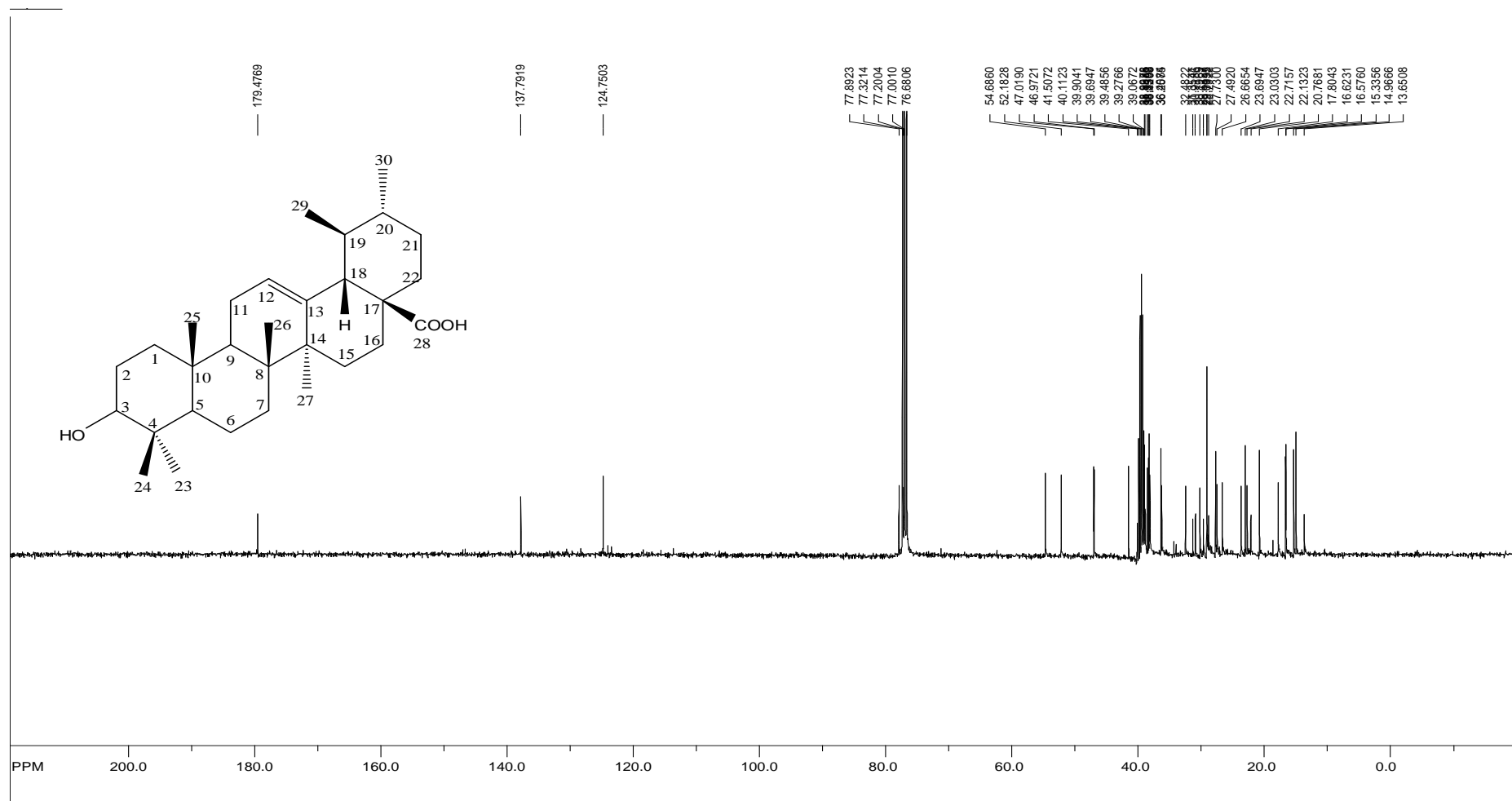
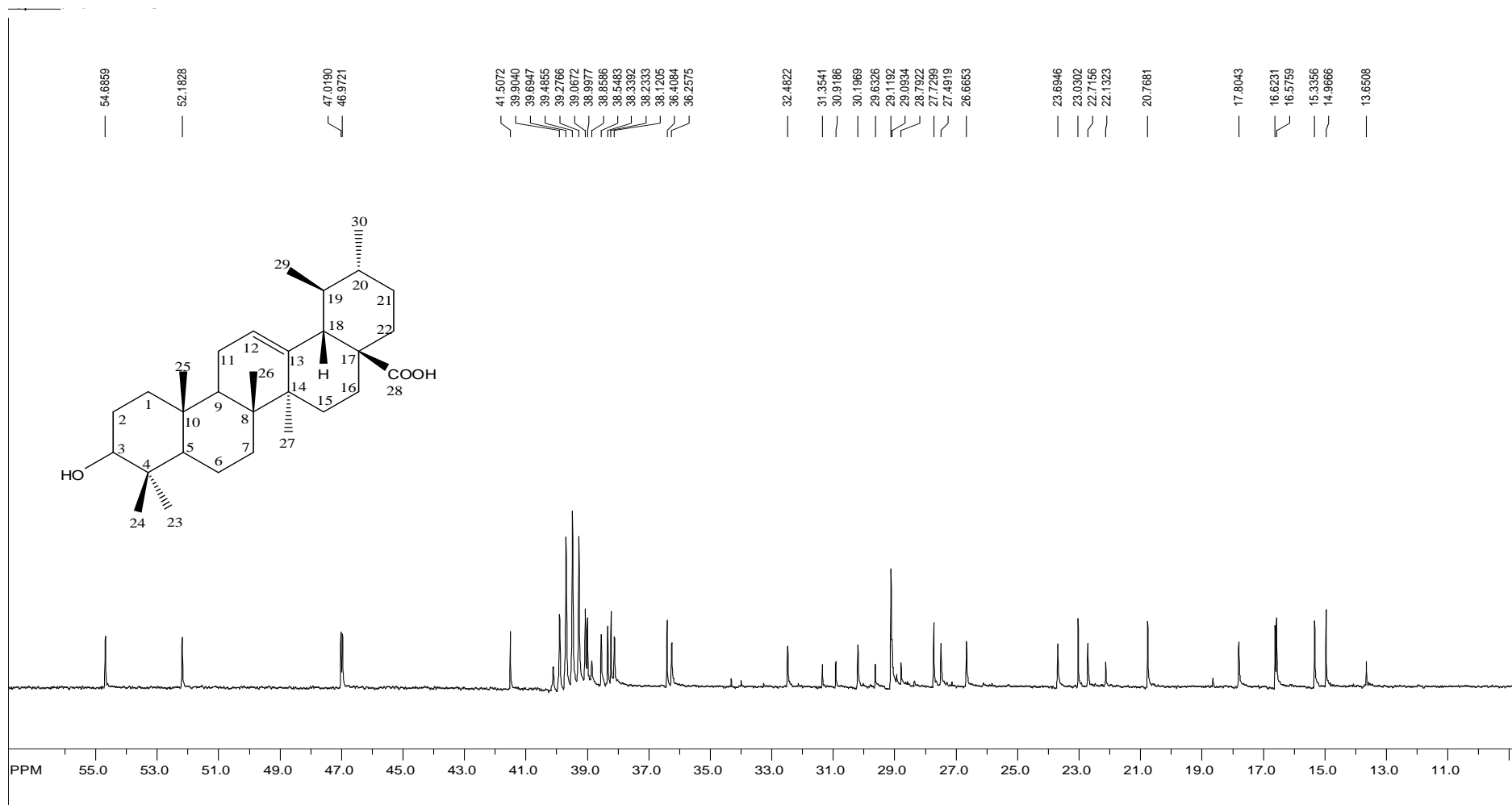


Figura 11. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>-DMSO-d<sub>6</sub>) de TsFH-1.





**Figura 12.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>-DMSO-d<sub>6</sub>) de **TsFH-1** (Ampliado na região δ 10,0 – 60,0).

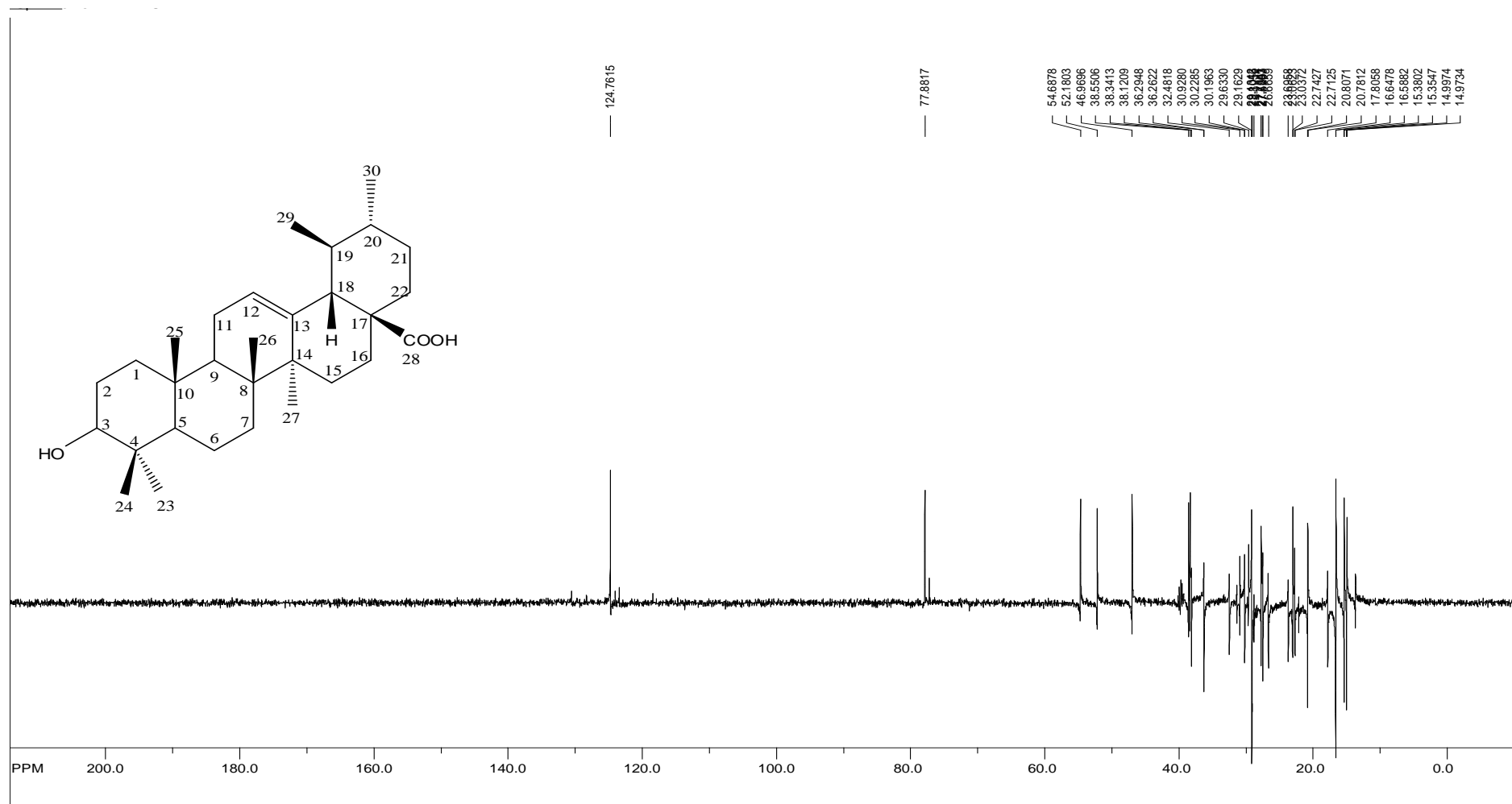
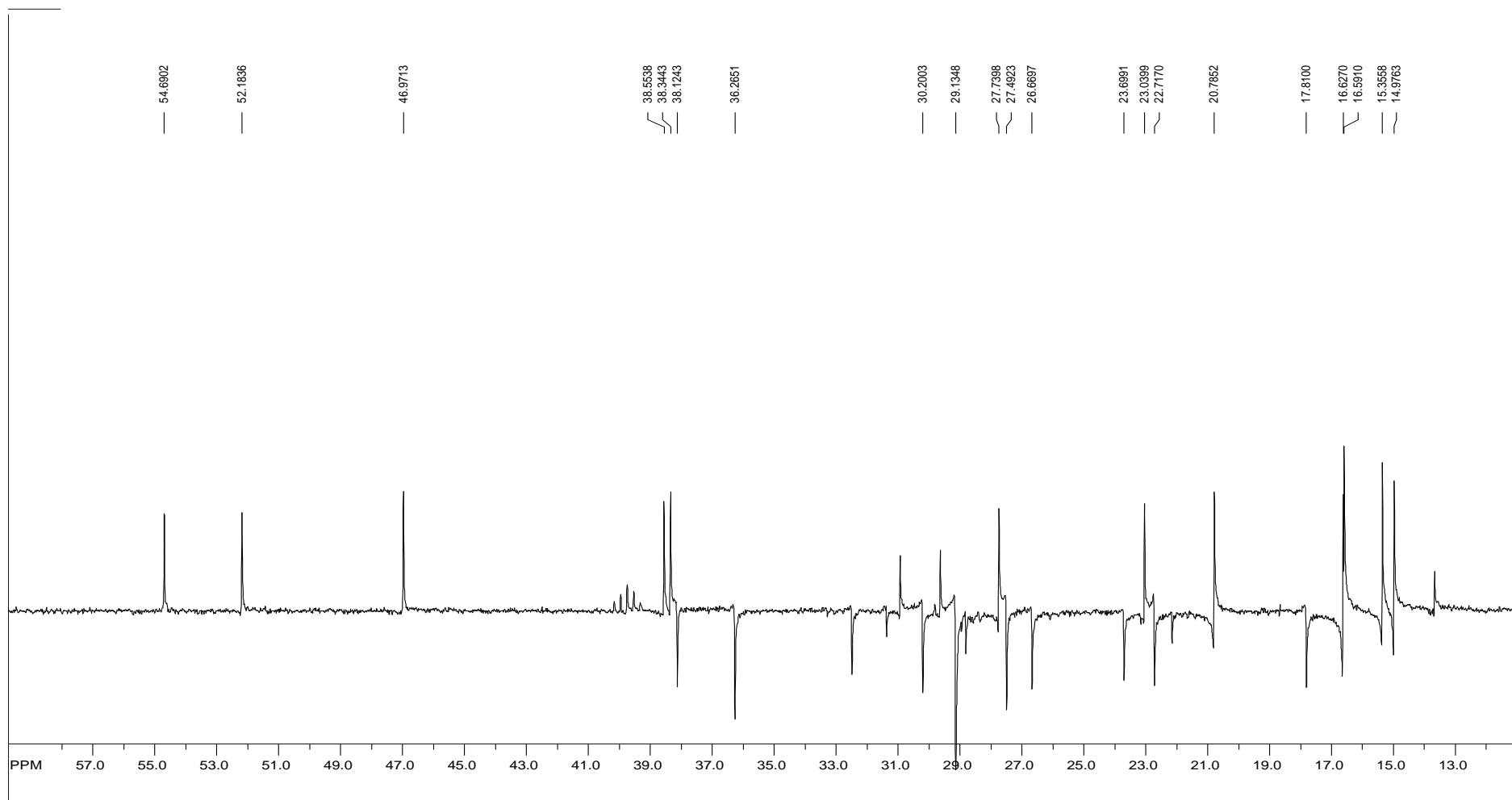


Figura 13. Espectro de RMN DEPT 135° (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>-DMSO-d<sub>6</sub>) de TsFH-1.



**Figura 14.** Espectro de RMN DEPT 135° (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>-DMSO-d<sub>6</sub>) de **TsFH-1** (Ampliado na região δ 10,0 – 60,0).

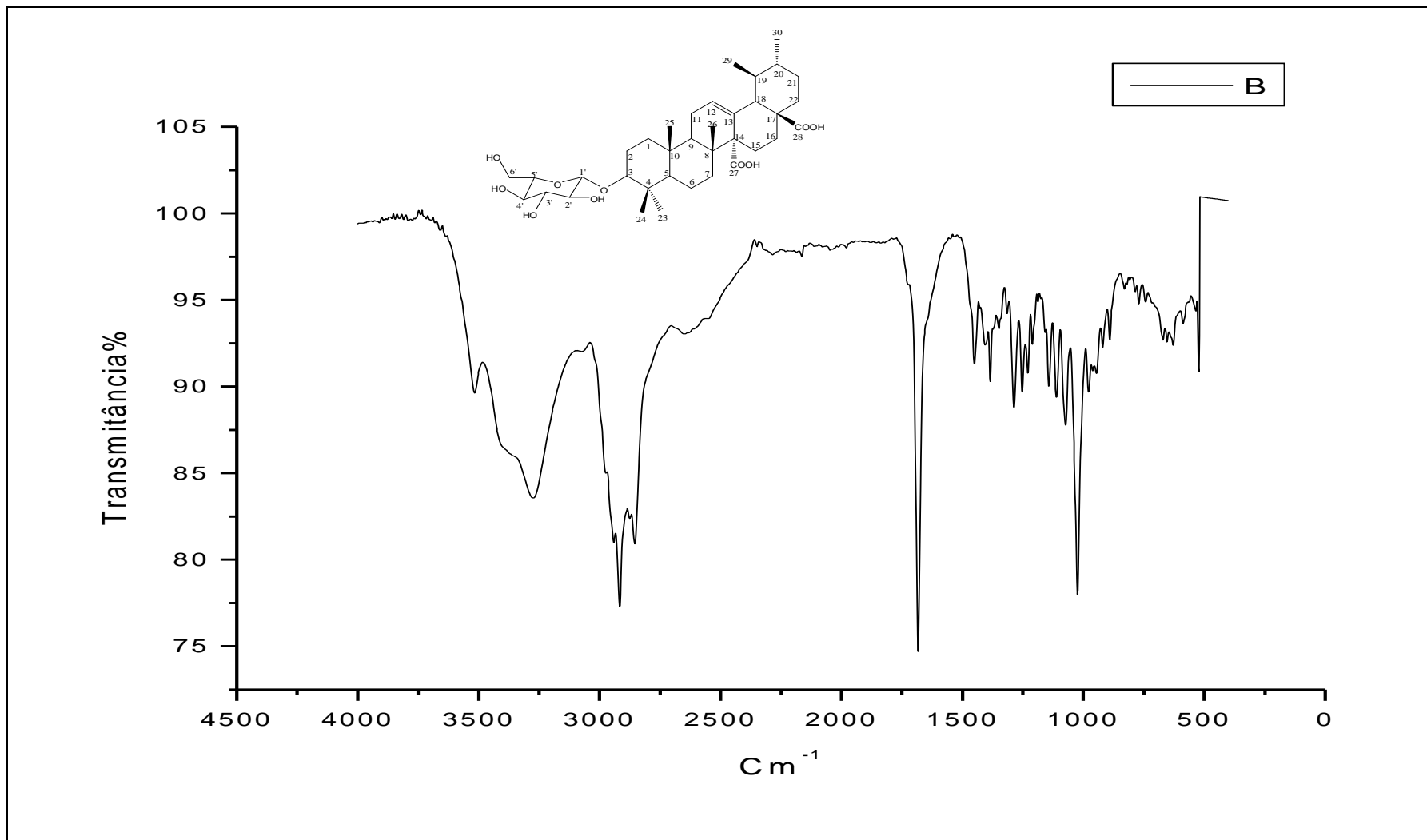
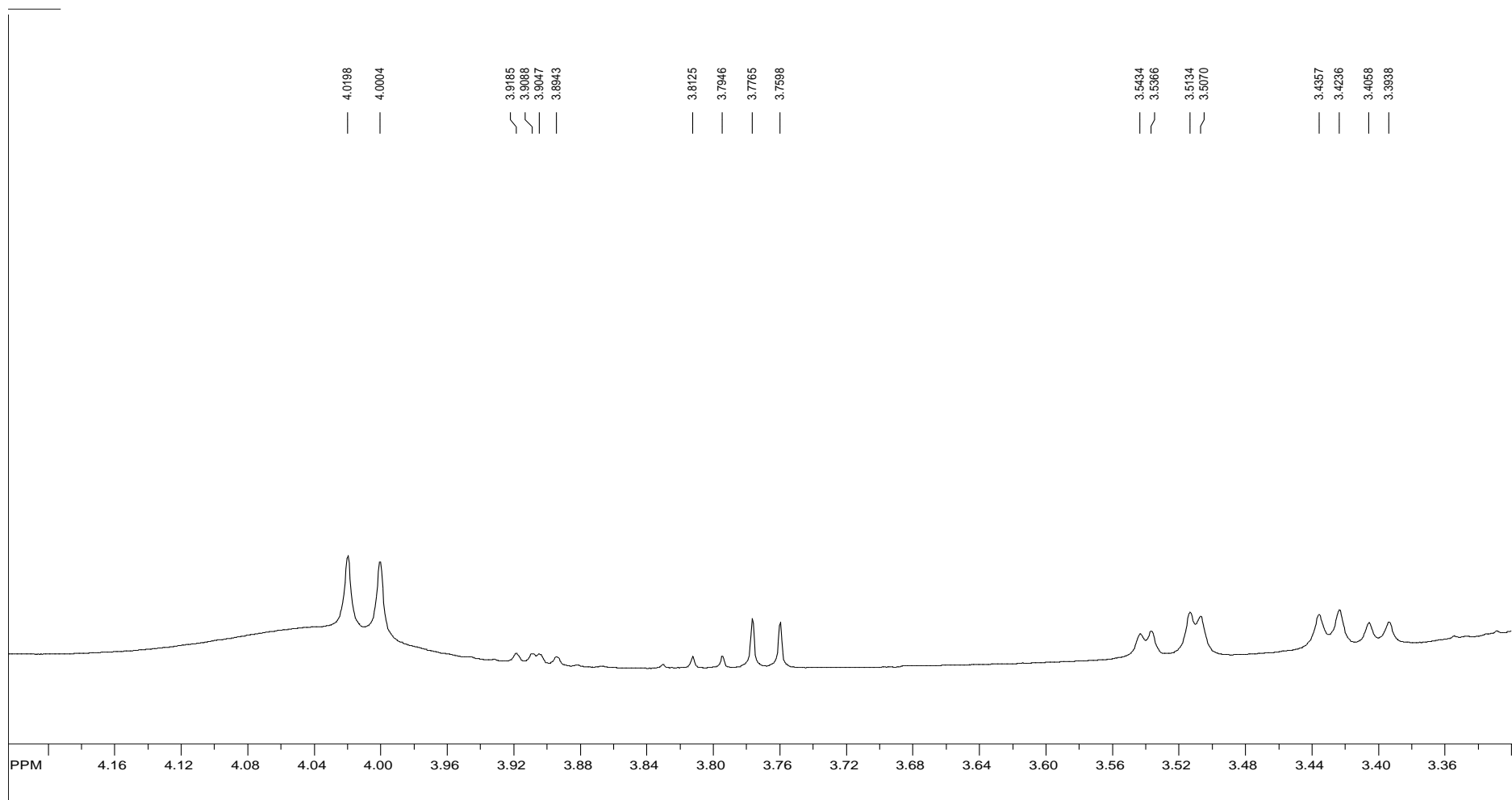
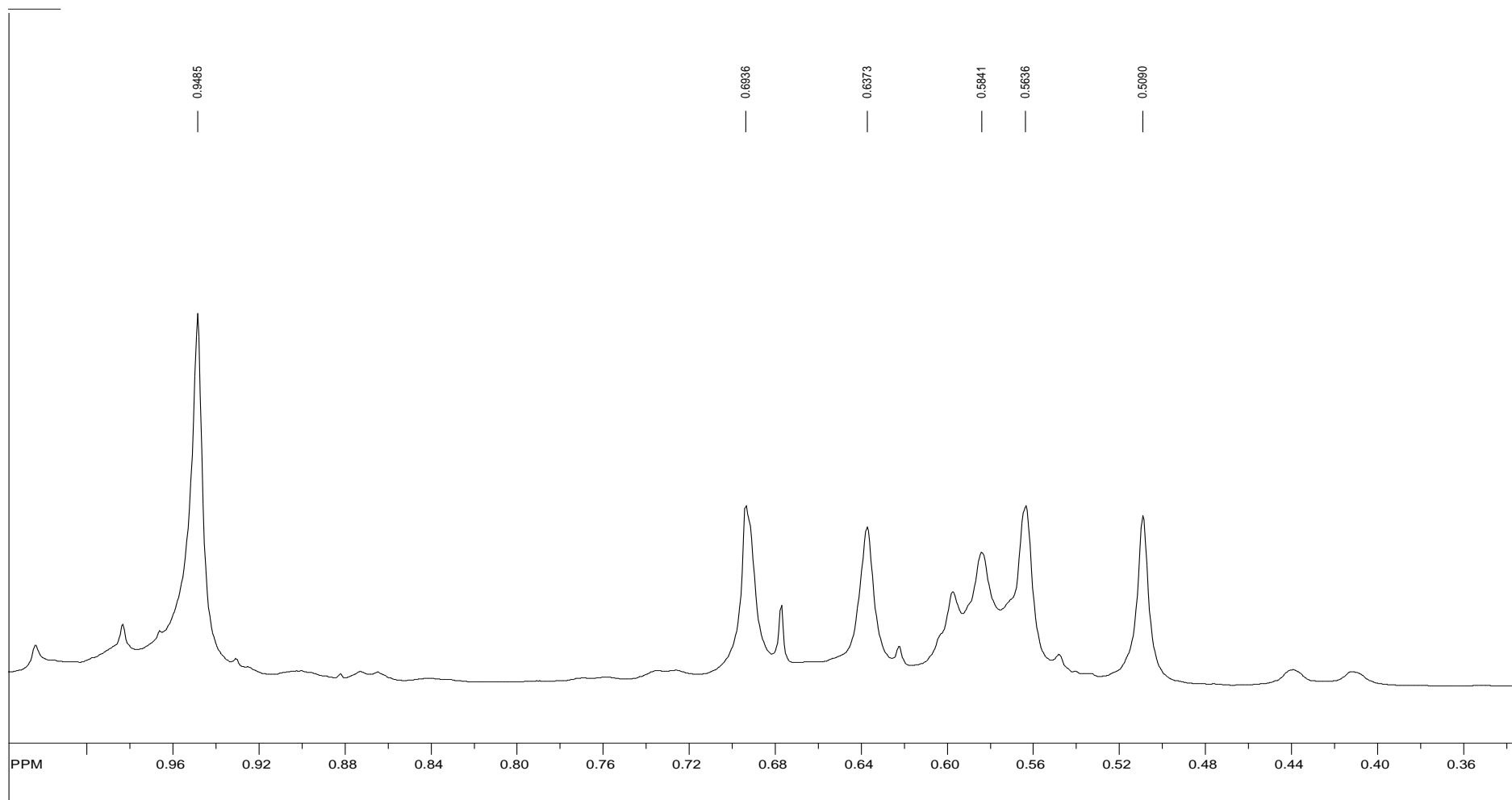


Figura 15. Espectro de IV (ATR) de TsFC-2.





**Figura 17.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$ ) de **TsFC-2** (Ampliado na região  $\delta$  3,36 - 4,16).



**Figura 18.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$ ) de **TsFC-2** (Ampliado na região  $\delta$  0,30 – 1,00).

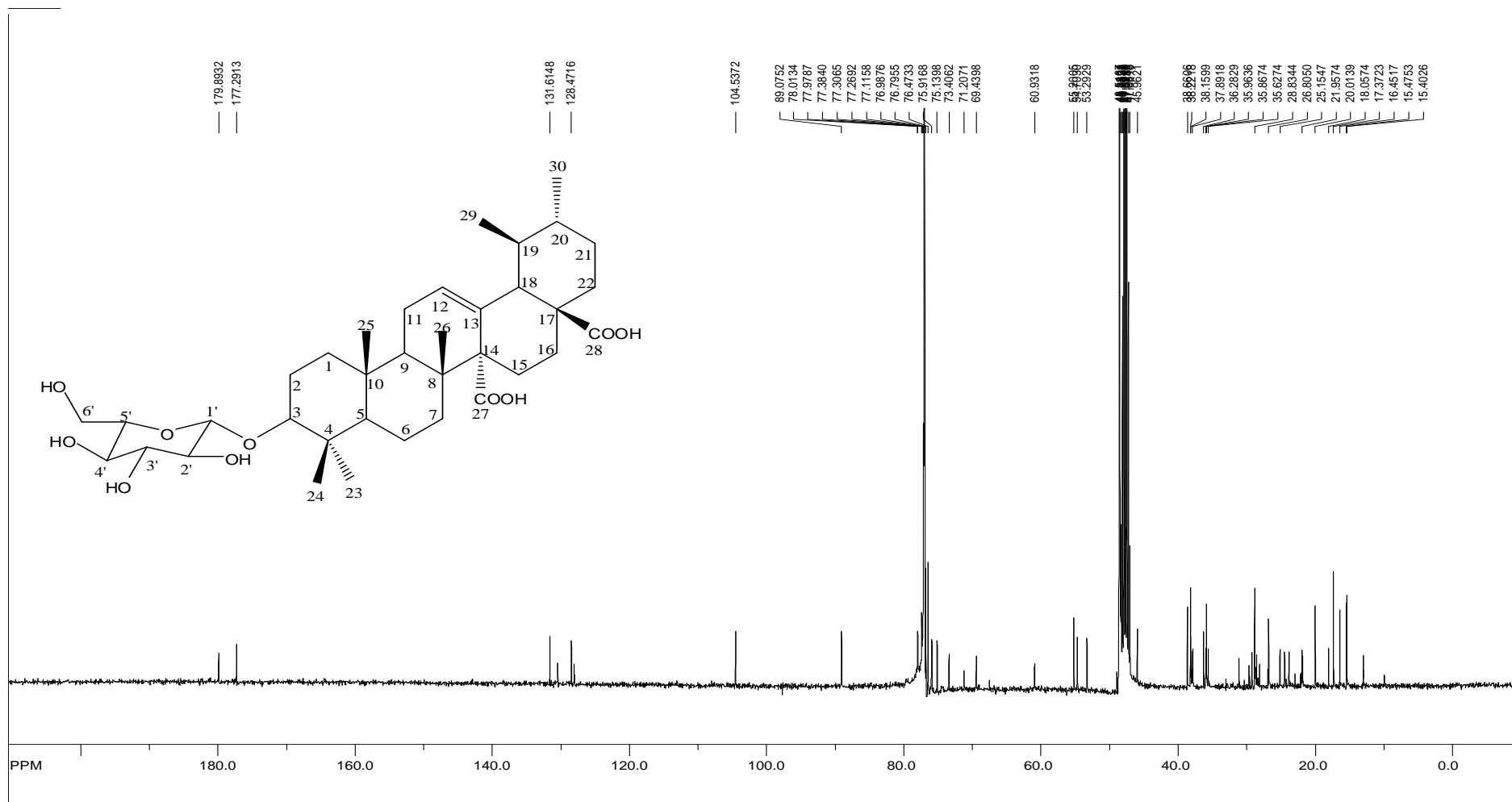
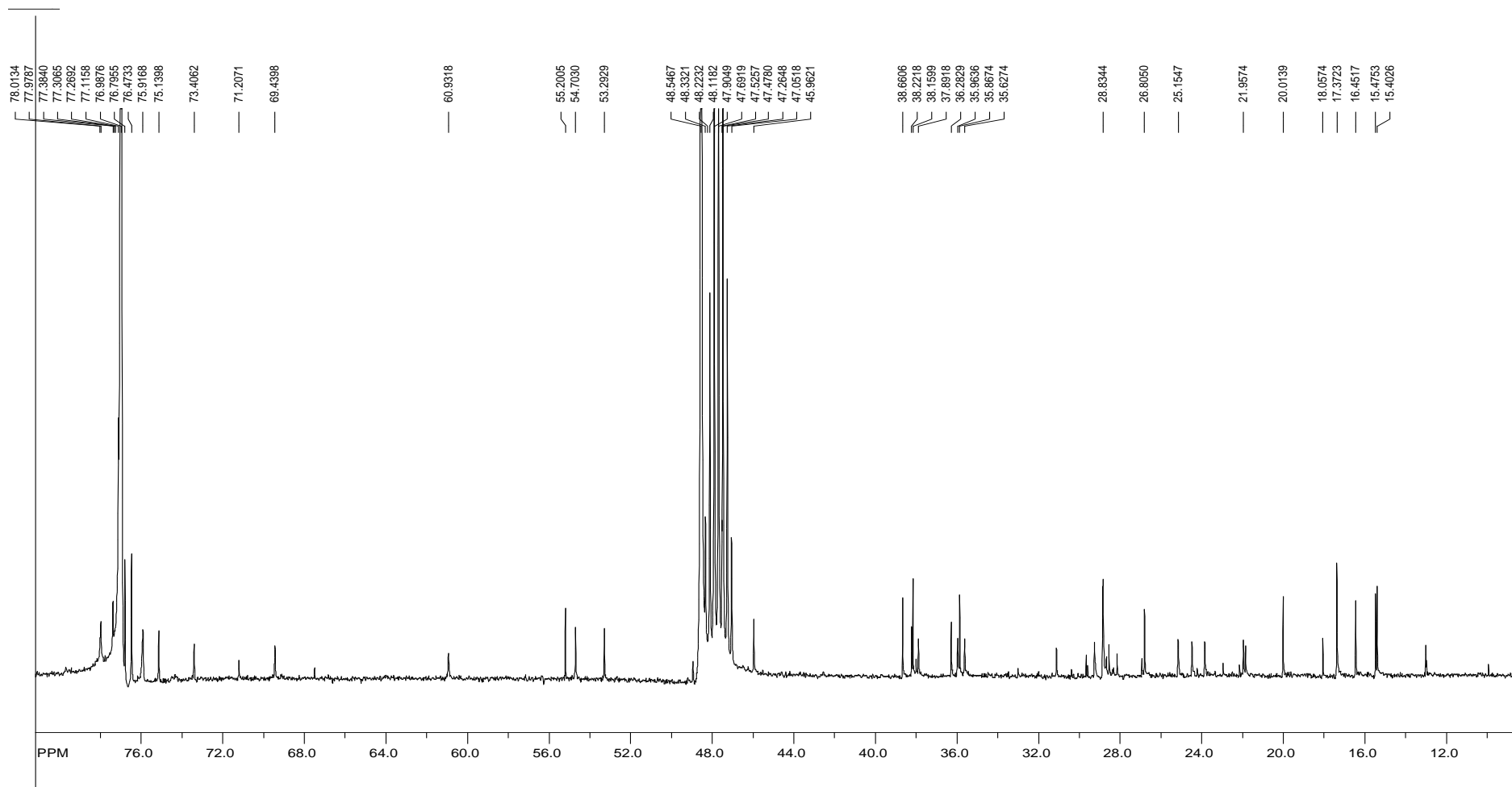


Figura 19. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD) de TsFC-2.





**Figura 20.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$ ) de **TsFC-2** (Ampliado na região  $\delta$  10,0 – 80,0).

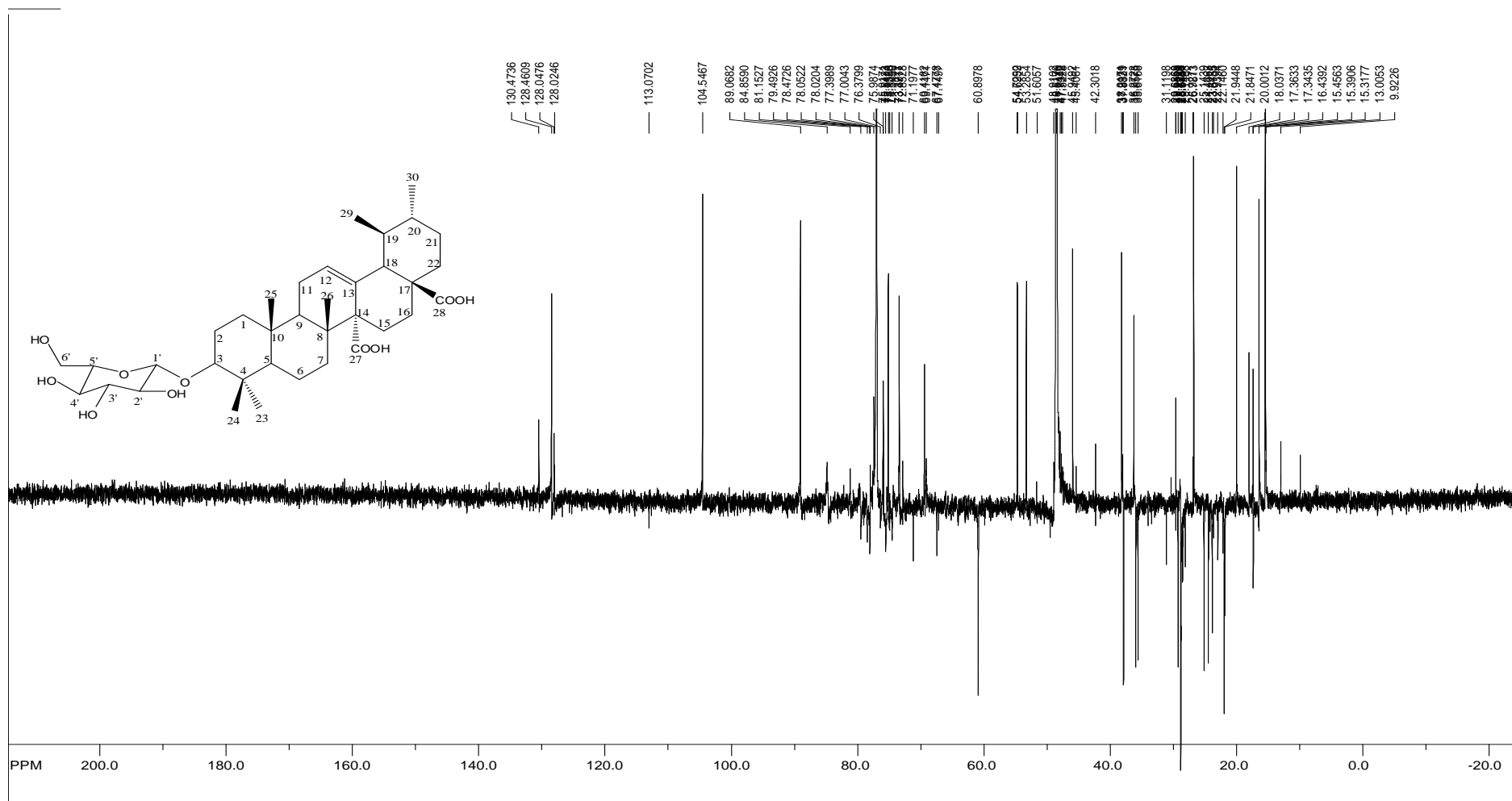
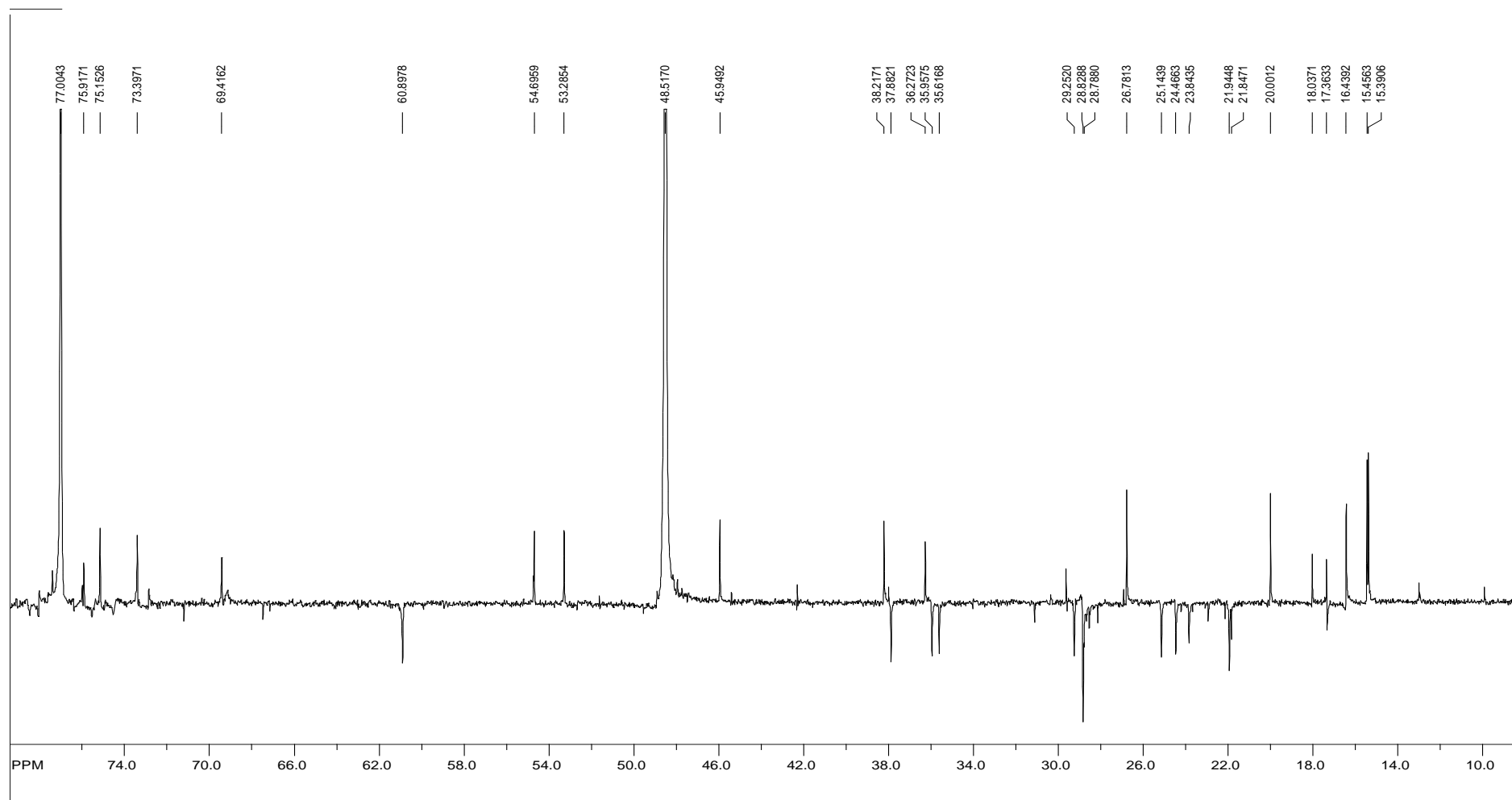
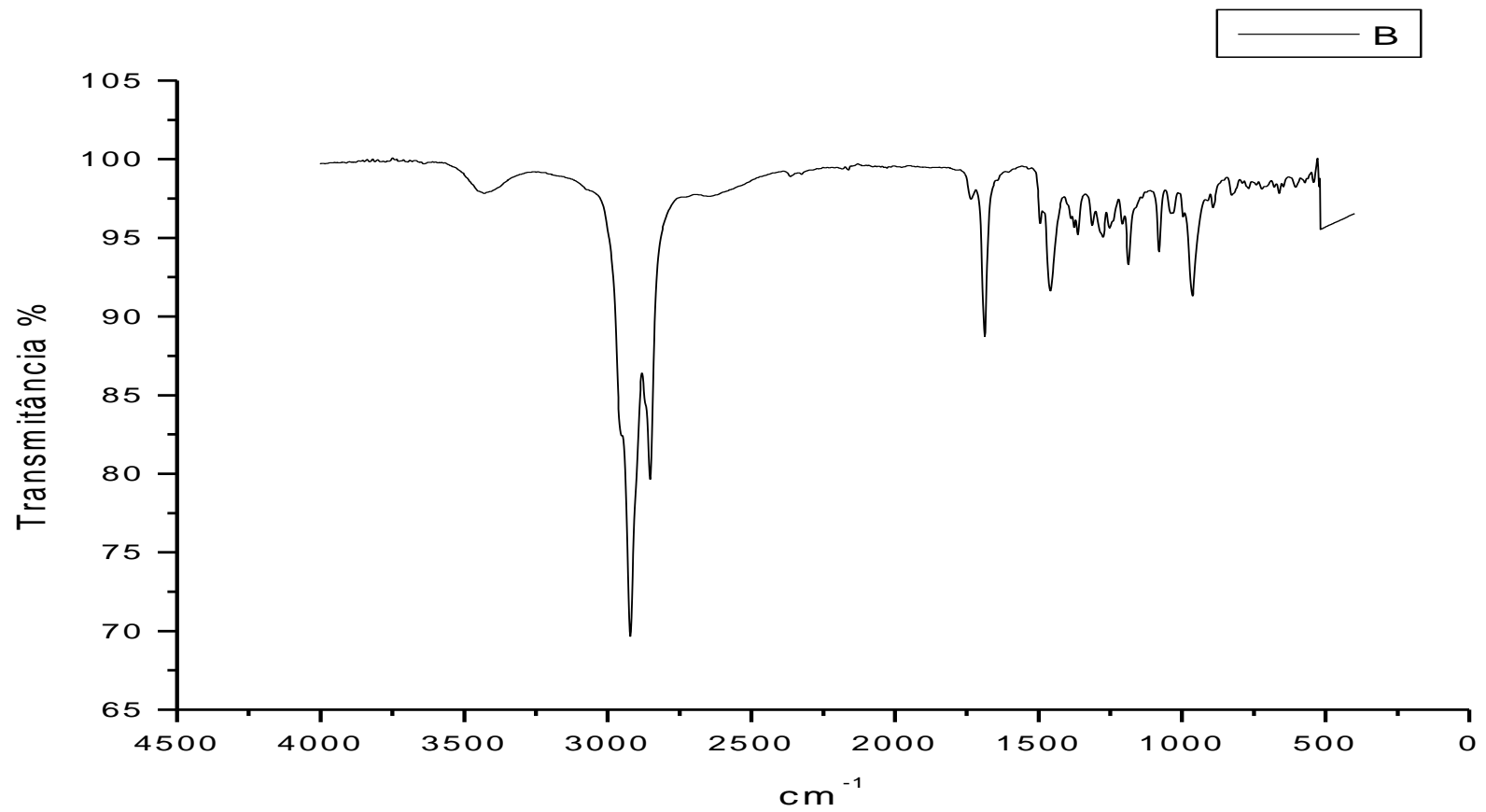


Figura 21. Espectro de RMN DEPT 135° (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD) de TsFC-2.



**Figura 22.** Espectro de RMN DEPT 135° (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD) de **TsFC-2** (Ampliado na região  $\delta$  10,0 – 80,0).



**Figura 23.** Espectro de IV (ATR) de TsFC-1.

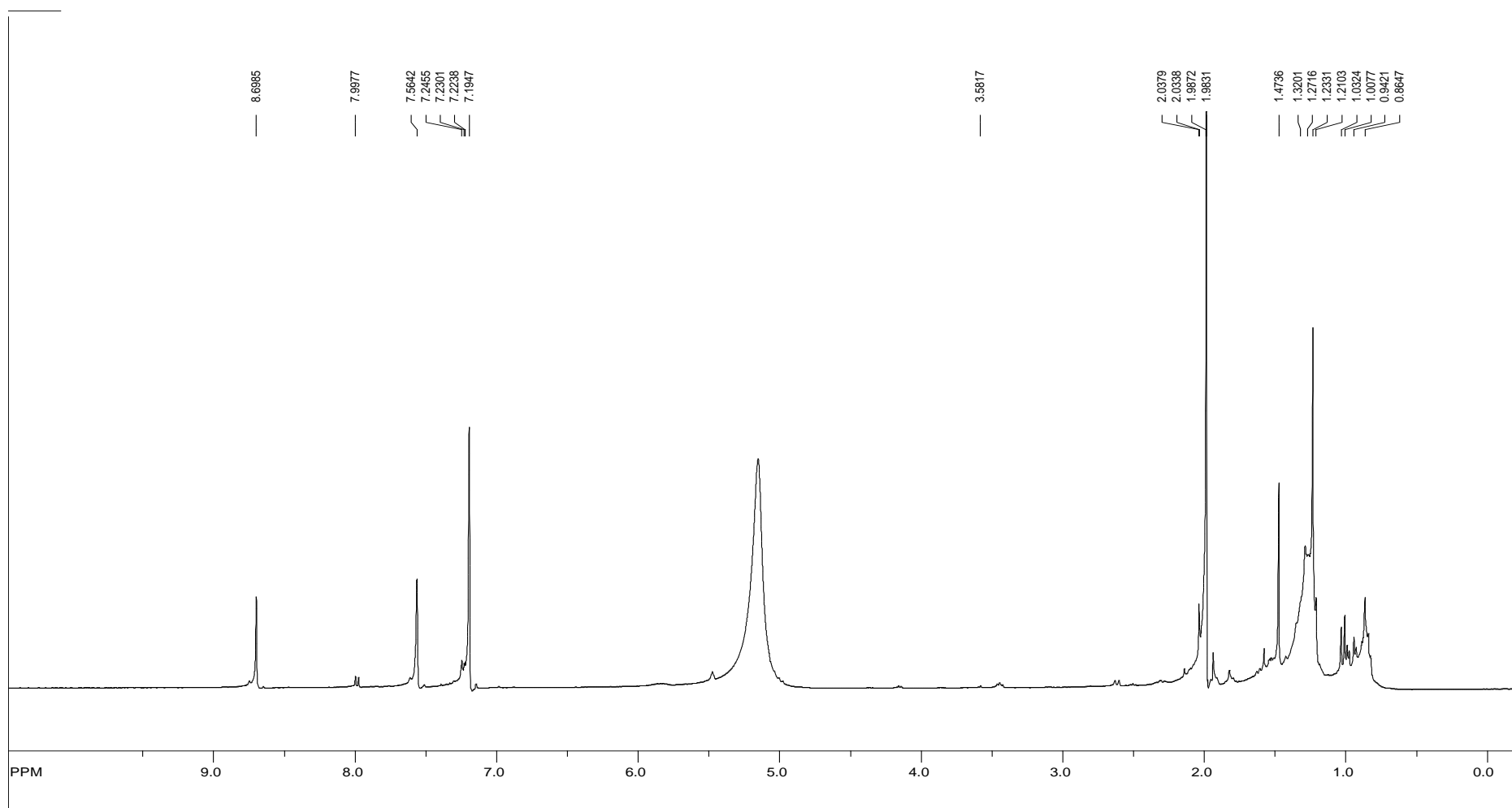


Figura 24. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de **TsFC-1**.

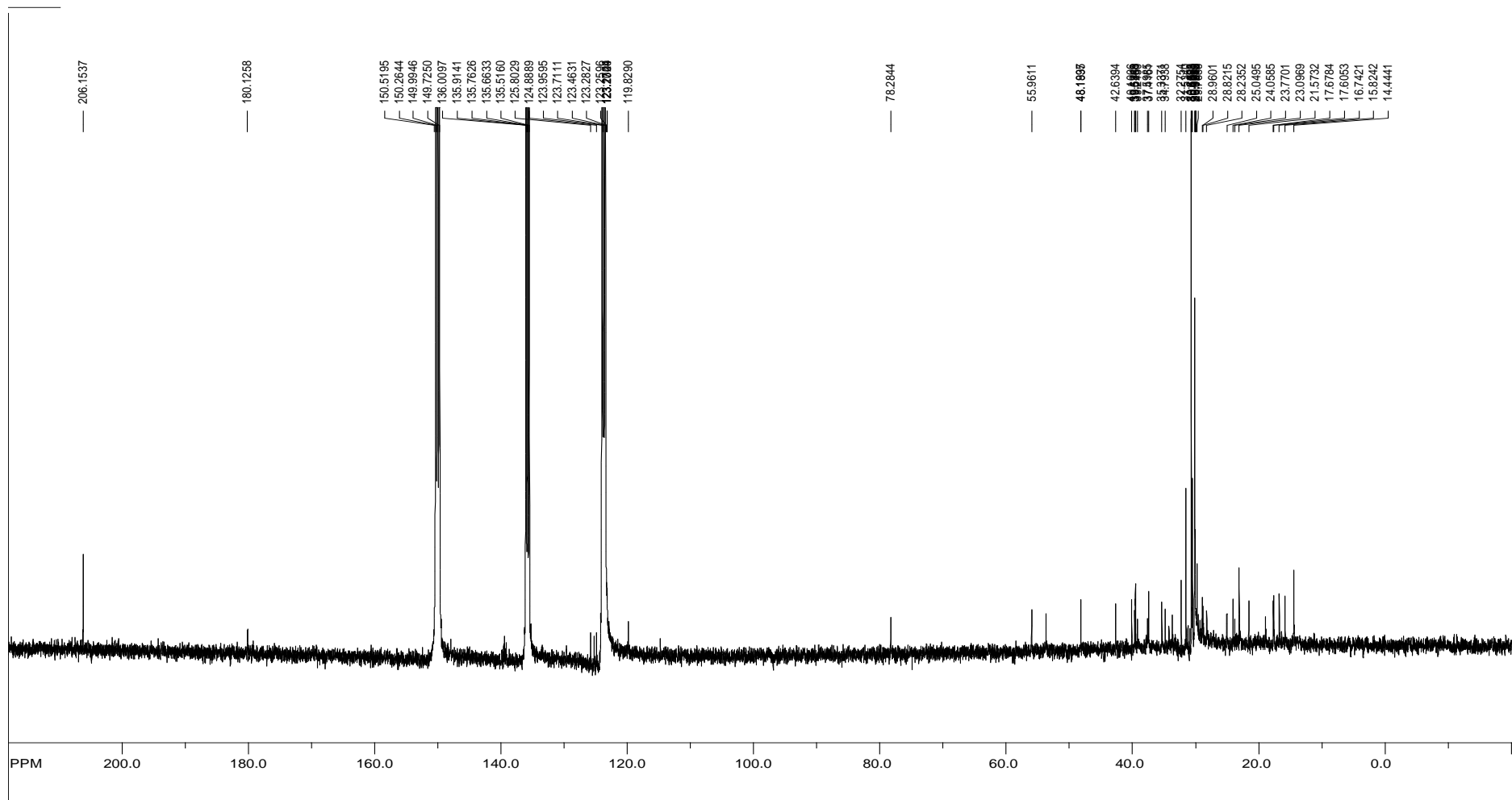
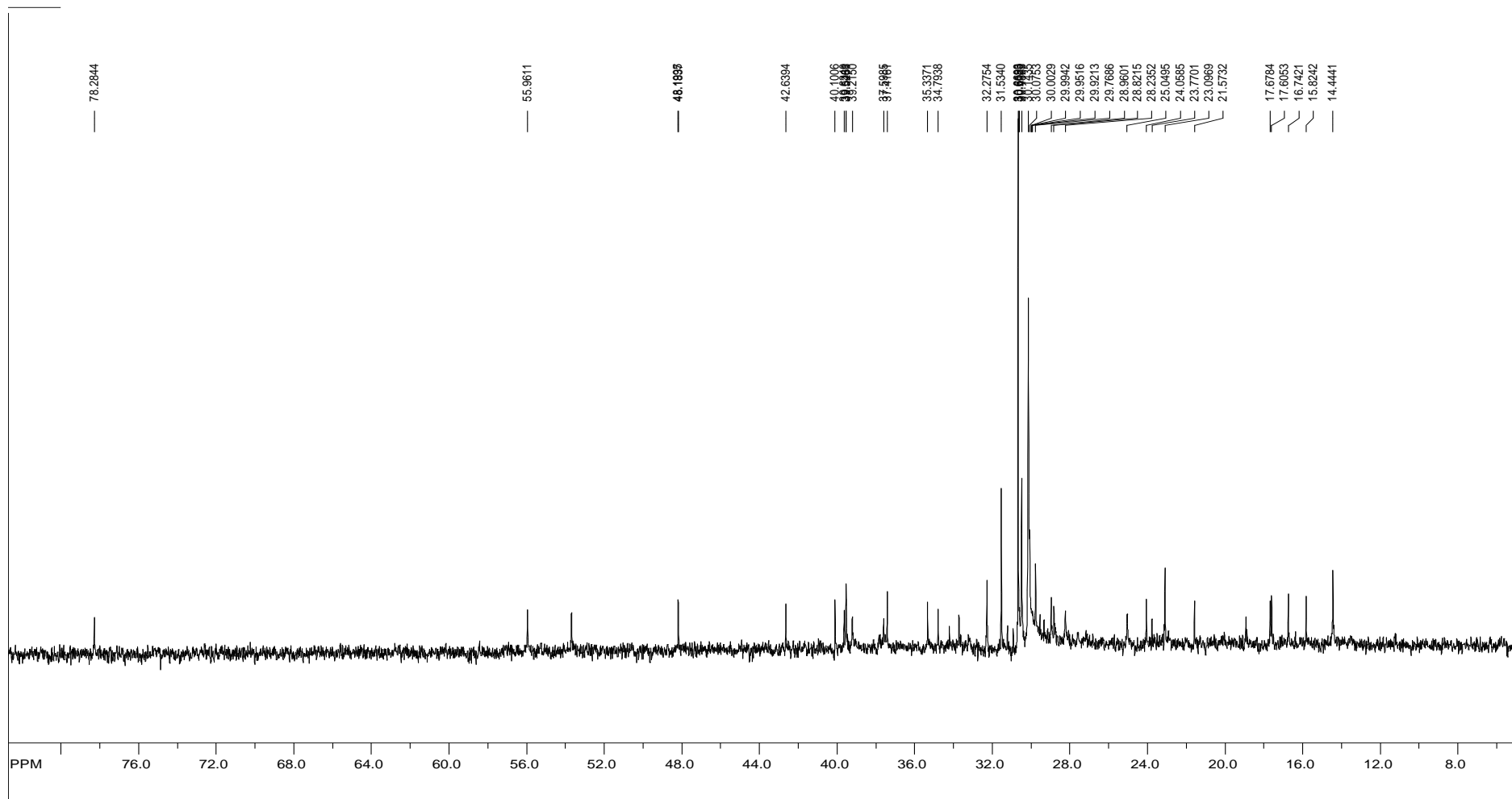
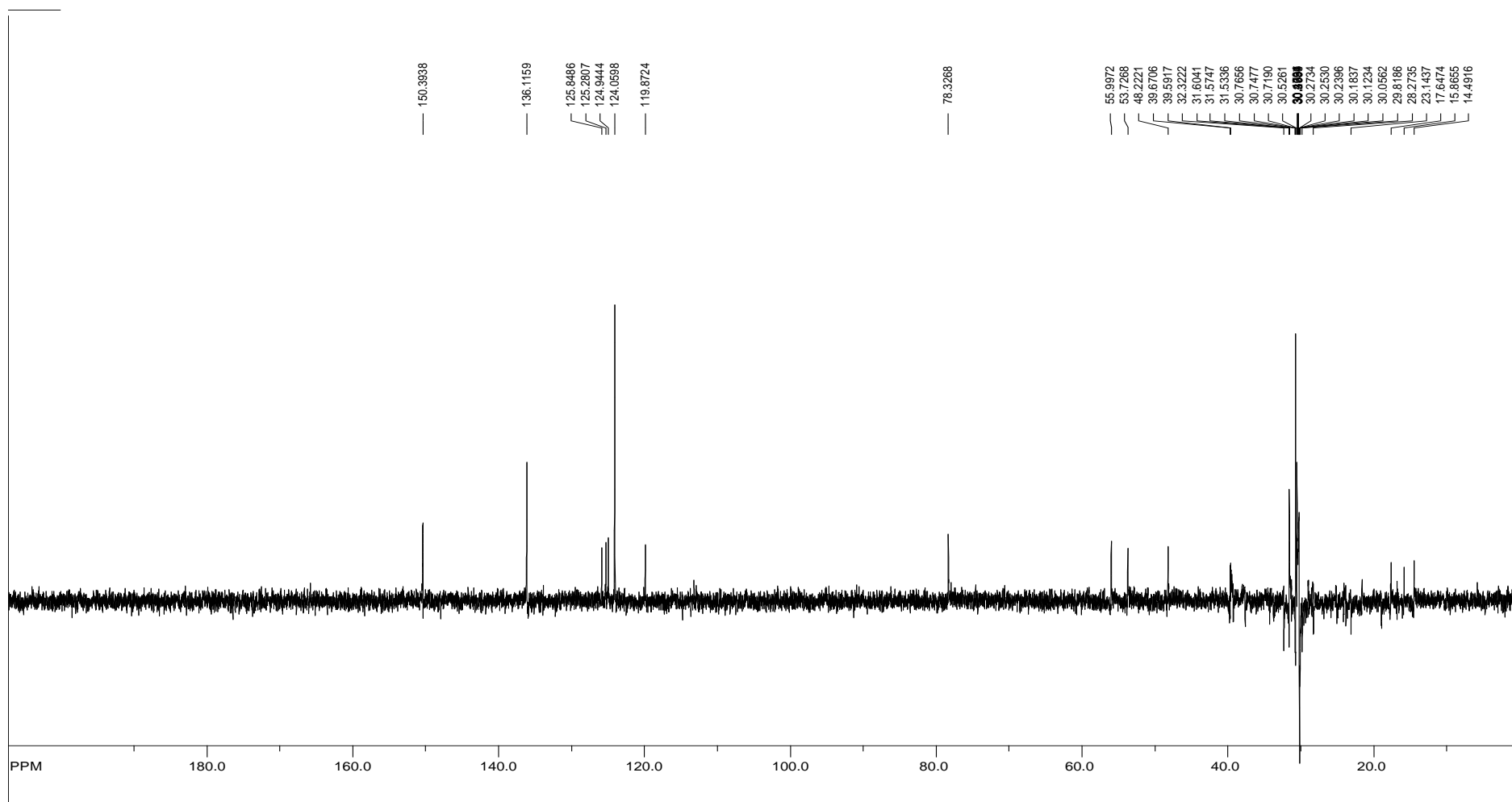


Figura 25. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de TsFC-1.

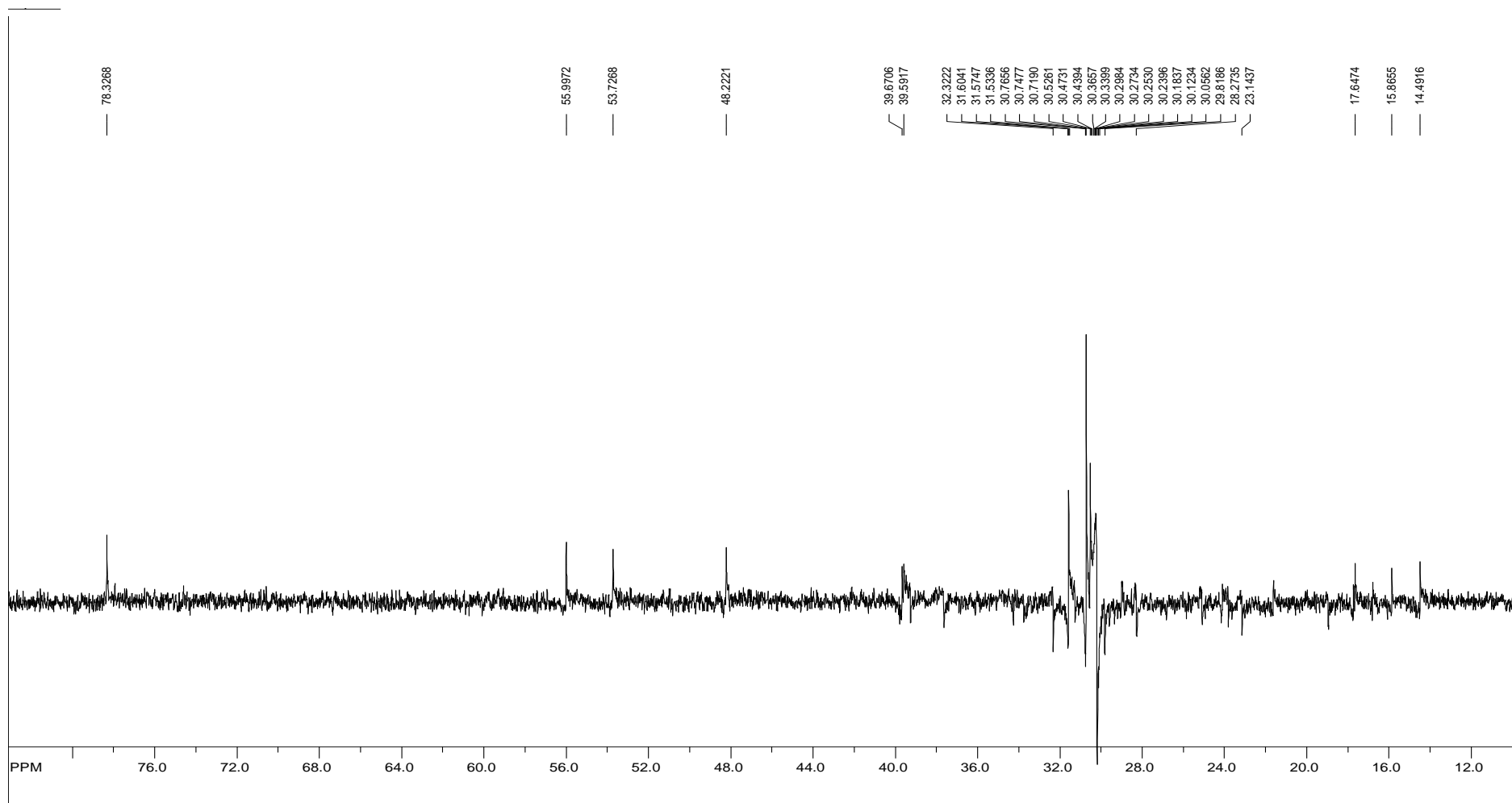


**Figura 26.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de **TsFC-1** (Ampliado na região  $\delta$  10,0 – 80,0).



**Figura 27.** Espectro de RMN DEPT 135° (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de **TsFC-1**.





**Figura 28.** Espectro de RMN DEPT 135° (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de **TsFC-1** (Ampliado na região δ 10,0 – 80,0).

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Azevedo, C. F.; Neto, B. M. C.; Dantas, I. C. (2006) **Estudo farmacobotânico de *Tocoyena formosa* (Jenipapo-Bravo)**. *Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC*.

Barbosa, L. C. A. (2007) **Espectroscopia no infravermelho**. Ed. UFV. Lavras-MG.

Barraca, S. A. (1999). **Manejo e produção de plantas medicinais e aromáticas**. Piracicaba, USP.

Barros, M. P.; Santin, A. M. O.; Costa, W. F.; Vidotti, G. J.; Sarragioto, M. H.; Souza, M. C.; Amado, C. A. B. (2008) **Constituintes químicos e avaliação do potencial antiinflamatório e antioxidante de extratos das folhas de *Chomelia obtusa* Cham. & Schltdl. (Rubiaceae)**. *Química Nova* 31 (8): 1987-1989.

Bolzani, V. S.; Izumisawa, C. M.; Young, C. M.; Trevisan, L. M. V.; Kingston, D. G.; Gunatilaka, A. L. (1997) **Iridoids from *Tocoyena formosa***. *Phytochemistry* 46: 305-308.

Bolzani, V. S.; Trevisan, L. M. V.; Izumisawa, C. M.; Young, M. C. M. (1996) **Antifungal Iridoids from the stems of *Tocoyena formosa***. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 7(3): 157-160.

Braga, I.A.; Valle, D. (2007) ***Aedes aegypti*: Histórico do Controle no Brasil**. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 16: 113-118.

Carvalho, F. A.; Costa, A. N.; Garcia, P. T.; Reis, R. A.; Mata, R. F. F.; Ramos, V. N.; Morais, H. C. (2007) **Frequência de danos por pilhadores de néctar em *Tocoyena formosa* (Cham. e Schltdl.) K. Schum. (Rubiaceae)**. *Revista Brasileira de Biociências*, 5(1): 519-521.

Cavalcanti, E. S. B.; Morais, S. M.; Lima, M. A.; Santana, E. W. P. (2004) **Larvicidal Activity of Essential Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(5): 541-544.

Cheng, S. S.; Chang, H. T.; Chang, S. T.; Tsai, K. H.; Chen, W. J. (2003) **Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae**. *Bioresource technology*, 89 (1): 99-102.

Chiquieri, A.; Di Maio, F. G.; Peixoto, A. L. (2004) **A distribuição geográfica da família Rubiaceae Juss. na *Flora Brasiliensis* de Martius**. *Rodriguésia* 55 (84): 47-57.

Coelho, V. P. M.; Agra, M. F.; Barbosa, M. R. V. (2006). **Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. e Schltdl.) K. Schum. (Rubiaceae)**. *Revista Brasileira de farmacognosia*, 16: 170-177.

Connolly, J.; Hill, R. A. (1991) **Triterpenoids**. In: Dey, P.; Harbone, J. *Methods in plant biochemistry*. Cap. 7. v7. Ed. B. V. Charlwood and D. V. Banthorpe, London.

Costa, H. N. R.; Santos, M. C.; Alcântara, A. F. C.; Silva, M. C.; França, R. C.; Veloso, D. P. (2008) **Constituintes químicos e atividade antiedematogênica de *Peltodon radicans* (Lamiaceae)**. *Química Nova* 31 (4): 744-750.

Couto, J. L. A. (2005) **Esquistossomose mansoni em duas mesorregiões do Estado de Alagoas**. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 8(4): 301-304.

Delprete, P. G. (2008) **Revision of *Tocoyena* (Rubiaceae: Gardenieae) from the states of Goiás and Tocantins and a new species endemic to white-sand areas in the Brazilian cerrado**. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas* 2(2): 983-993.

Dias-Arieira, C. R.; Morita, D. A. S.; Machado, M. H. (2007) **Nematóides Associados a Plantas Ornamentais em Viveiros do Paraná**. *Nematologia Brasileira* 31 (1): 46-53.

Fabri, R. L. (2008). **Estudo fitoquímico de *Mitracarpus frigidus* (Willd. Ex Reem Schult.) K. Schum. Biomonitorado pela atividade antimicrobiana e a avaliação das atividades citotóxica, antioxidante e leishmanicida**. *Dissertação de Mestrado*. UFJF, 36.

Ferreira, V. F.; Rocha, D. R.; Silva, F. C. (2009) **Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares**. *Química Nova*, 32(3): 623-638.

Filho, V. C.; Yunes, R. A. (1998) **Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade**. *Química Nova*, 21(1): 99-105.

França, S. C. in Simões, C. M. O.; Mentz, L. A.; Schenkel, E. P.; Irgang, B. E.; Stehmann, J. R. (2007) **Farmacognosia da *Planta ao medicamento***, 6ª ed. Porto Alegre/ Florianópolis, UFRGS/UFSC.

FUNASA (2002). **Programa nacional de controle da dengue**.

Gazda, V. E. (2004). **Abordagem química e estudo da atividade biológica das raízes de *Chiococca alba* (L.) Hitchc. (Rubiaceae)**. *Dissertação de Mestrado*. UFRJ, 27-30.

Guimarães, D. O. (2006) **Prospecção química e biológica em fungos endofíticos associados a *Viguiera arenaria* (Asteraceae)**. *Dissertação de mestrado*. Universidade de São Paulo.

Hamerski, L.; Carbonezi, C. A.; Cavalheiro, A. J.; Bolzani, V. S. (2005). **Saponinas triterpênicas de *Tocoyena brasiliensis* Mart. (Rubiaceae)**. *Química Nova*, 28: 601-604.

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

Jane, M.R., Morais, S.M., Machado, M.I.L., Matos F.J.A., Braz-Filho, R. (1997) **Estudo Químico de plantas utilizadas popularmente como medicinais – *Tocoyena sellowiana* Schum. (jenipapo bravo).** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 78(4): 90-92.

Jain, N.; Yadava, R. (1994) **Perigrinol, a lupane type triterpene from the fruits of *Diospyros peregrina*.** *Phytochemistry*, 35: 1070-1072.

Junges, M. J.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; Fernandes, M. F. G. S.; Filho, E. R. Fruhauf, M.; Barañano (2000) **Triterpenos ursânicos e oleanânicos isolados do caule de *Eugenia florida* DC.** *Revista de Pesquisa e Pós-graduação*, 01: 13-30.

Lapikanon, P.; Tovivick, P.; Woo, W. S.; Choi, J. S. (1983) **Phytochemical Study on *Randia siamensis*.** *Archives of Pharmacal Research*, 6(1) 29-33.

Leite, J. P. V.; Lombardi, J. A.; Chiari, E.; Oliveira, A. B. (2001) **Isolamento biomonitorado de uma substância tripanossomicida de *Arrabidaea triplinervia* (Bignoniaceae), o ácido ursólico.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 11(2): 77-87.

Lima, G. S.; Moura, F. S.; Lemos, R. P. L.; Conserva, M. C. (2009) **Triterpenos de *Guettarda grazielae* M.R.V. Barbosa (Rubiaceae).** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(1B): 284-289.

Liu, X. K.; Liu, J. J. (2008) **New source for L-iditol and taxanes.** *Letters to Nature* 1:1-6.

Luciano, J. H. S.; Lima, M. A. S.; Sousa, E. B.; Silveira, E. R. (2004) **Chemical constituents of *Alibertia myrciifolia* Spruce ex K. Schum.** *Biochemical Systematics and ecology*, 32: 1227-1229.

Mahato, S. B.; Kandu, A. P. (1994) **<sup>13</sup>C NMR Spectra of pentaciclic triterpenoids – A compilation and some salient features.** *Phytochemistry* 47: 1517-1575.

Margulies, M. M.; Sixou, B.; David, L.; Vigier, G.; Dolmazon, R.; Albrand, M. (2000) **Molecular mobility of sorbitol and maltitol: A <sup>13</sup>C NMR and molecular dynamics approach.** *The European Physical Journal E*, 3: 55-62.

Matos, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental:** UFC. 2ª Ed., 1997.

Ministério da Saúde. (2005) **Guia de Vigilância Epidemiológica.** 6º Ed.

Monteiro, M. C.; Trugo, L. C. (2005). **Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado**. *Química Nova*, 28 (4): 637-641.

Moura, V. M.; Santos, D. P.; Santin, S. M. O.; Carvalho, J. E.; Foglio, M. A. (2006) **Constituintes químicos de *Galianthe brasiliensis* (Rubiaceae)**. *Química Nova* 29: 452-455.

Oliveira, P. R. N.; Testa, G.; Sena, S. B.; Costa, W. F.; Sarragioto, M. H.; Santin, S. M. O.; Souza, M. C. (2008) **Saponinas triterpênicas das raízes de *Guettarda pohliana* Müll. Arg. (Rubiaceae)**. *Química Nova* 31 (4): 755-758.

Oliveira, P. S. M.; Ferreira, V. F.; Souza, M. V. (2009) **Utilização do D-Manitol em síntese orgânica**. *Química Nova* 32 (2): 441-452.

OMS (1994), **Segundo relatório do comitê de especialistas. O controle da esquistossomose**, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro.

Paula, V. F.; Barbosa, L. C. A.; Piló-Veloso, D.; Demuner, A. J. Howarth, O. (1998) **Constituintes químicos da casca de *Ochroma lagopus* (Bombaceae)**. *Eclética Química*, 23: 45-57.

Pereira, G. F. (2007) **A família Rubiaceae Juss. Na vegetação ripária de um trecho do alto rio Paraná, Brasil, com ênfase na tribo spermacoaceae**. *Dissertação de mestrado*. Universidade Estadual de Maringá.

Pinheiro, L.; Cortez, D. A. G.; Vidotti, G. J.; Young, M. C. M.; Ferreira, A. G. (2003) **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida da *Kielmeyera variabilis* Mart (Clusiaceae)**. *Química nova*, 26: 157-160.

Pordeus, L. C.; Aguiar, L. R.; Quinino, L.R.M.; Barbosa, C.S. (2008) **A Ocorrência das Formas Aguda e Crônica da Esquistossomose Mansônica no Brasil no Período de 1997 a 2006: uma Revisão de Literatura**. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 17: 163-175.

Poser, G. L.; Seibt, L. T. (1998) **Gardenoside from *Tocoyena bullata***. *Biochemical Systematics and Ecology*: 26: 669-670.

Prado, A. L. (1987) **Revisão taxonômica do gênero *Tocoyena* Aubl. (Rubiaceae) no Brasil**. *Dissertação de mestrado*. Universidade Estadual de Campinas.

Rocha, R. F. A. (2007) **Comunicação pessoal da botânica Rosário de Fátima de Almeida Rocha**, do Instituto de Desenvolvimento Científico e Tecnológico de Xingó (Instituto Xingó).

Santos, A.F. (2005). **Determinação da Atividade Anti-Esquistossomótica de Extratos e Substâncias Puras Obtidas de Plantas**. Tese de Doutorado do IQB-UFAL.

Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Petrovick, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O *et al.* (org) (2007). **Farmacognosia da Planta ao medicamento**, 6ª ed. Porto Alegre/ Florianópolis, UFRGS/UFSC.

Silva, K. L.; Filho, V.C. (2002) **Plantas do Gênero Bauhinia: Composição Química e Potencial farmacológico**. *Química Nova* 25: 449-454.

Silva, V. C.; Bolzani, V. S.; Young, M. C. M.; Lopes, M. N. (2007) **A New Antifungal Phenolic Glycoside Derivative, Iridoids and Lignans from *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum. (Rubiaceae)** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18(7): 1405-1409.

Simas, N. K.; Lima, E. C.; Conceição, S. R.; Kurster, R. M.; Oliveira Filho, A. M. (2004) **Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue—atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides**. *Química Nova* 27: 46-49.

Simões, C. M. O.; Mentz, L. A.; Schenkel, E. P.; Irgang, B. E.; Stehmann, J. R. (2007) **Farmacognosia da Planta ao medicamento**, 6ª ed. Porto Alegre/ Florianópolis, UFRGS/UFSC.

Taylor, C. M.; Campos, M. T. V. A.; Zappi, D. (2007) **Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rubiaceae**. *Rodriguesia*, 58 (3): 549-616.

Tomaz, A. C. A.; Nogueira, R. B. S. S.; Pinto, D. S.; Agra, M. F.; Souza, M. F. V.; Cunha, E. V. L. (2008) **Constituintes químicos de *Richardia grandiflora* (Cham. & Schlttdl.) Steud. (Rubiaceae)**. *Revista Brasileira de farmacognosia*, 18(1): 47-52.

Veiga Junior, V. F.; Pinto, A. C.; Maciel, M. A. M. (2005). **Plantas Medicinais: Cura Segura?**. *Química Nova* 28: 519-528.

Viegas Junior, C.; Bolzani, V. S.; Barreiro, E. J. (2006) **Os produtos naturais e a química medicinal moderna**. *Química Nova* 29 (2): 326-337.

Willians, P. A. M.; Barrio, D. A.; Baran, E. J. (2006) **Synthesis, characterization, and biological activity of oxovanadium(IV) complexes with polyalcohols**. *Carbohydrate Research* 341: 717-724.