

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



PATRÍCIA VASCONCELOS DE OLIVEIRA

**Constituintes Químicos e Atividades Larvicida, Antioxidante e
Antimicrobiana de *Rourea doniana* Baker (Connaraceae)**

Maceió/AL
2011

PATRÍCIA VASCONCELOS DE OLIVEIRA

Constituintes Químicos e Atividades Larvicida, Antioxidante e Antimicrobiana de *Rourea doniana* Baker (Connaraceae)

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

Orientadora: *Profa. Dra. Lucia Maria Conserva.*

Maceió/AL
2011

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

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

O48c Oliveira, Patrícia Vasconcelos de.
Constituintes químicos e atividade larvicida, antioxidante e antimicrobiana de Rourea doniana Baker (Connaraceae). / Patrícia Vasconcelos de Oliveira. – 2011. 119 f.; il. tabs., graf.

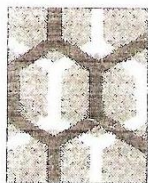
Orientadora: Lucia Maria Conserva.

Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Exatas. Instituto de Química. Maceió, 2011.

Bibliografia: f. 109-119.

1. Rourea doniana. 2. Connaraceae. 3. Larvicida. 4. Antioxidante. 5. Antimicrobiana. 6. Artemia salina. 8. Triterpenos. 9. Flavonóis. 10. Cumarina. I. Título.

CDU: 547.9



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



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (32) 3214-1384, Fax: (32) 3214-1384
email: ppgqb@qui.ufal.br

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de **Parícia Vasconcelos de Oliveira**, intitulada: "**Constituintes Químicos e Atividades Larvicida, Antioxidante e Antimicrobiana de *Rourea doniana* Baker (*Connaraceae*)**", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 18 de março de 2011, às 8:30h, na Sala de Reuniões do IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

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

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

Prof.^a Dr.^a Simoni Margareti Plentz Meneghetti
PPGQB/IQB/UFAL

*A **Deus**, pela vida e por todas as oportunidades encontradas, pela perseverança e coragem para enfrentar os desafios e por estar sempre comigo;*

*Aos meus amados pais, **Paulo e Siarinha**, pelo amor, dedicação, por terem lutado pela minha educação e por serem meu maior exemplo de dignidade;*

*As minhas irmãs, **Paola e Pollyanna**, pelo apoio, carinho e incentivo;*

*Ao meu companheiro, **Victor**, pelo amor, apoio, dedicação e paciência.*

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A *Prof. Dr.^a. Lucia Maria Conserva*, pela orientação, paciência e oportunidade de conhecer o seu trabalho e por ter transmitido um pouco de seu grande conhecimento;

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

A *Prof. Dr.^a. Maria Lysete de Assis Bastos* e a toda equipe do Laboratório de Tratamento de Feridas (*Lívia Santiago, Isabelle, Raíssa, Lidiane, Jefferson, Thiane, Tamires e Bruna*), pela atenção, amizade e colaboração na realização dos ensaios antimicrobianos e de toxicidade;

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

Aos *Funcionários da Secretaria de Pós-Graduação* e a *Aldy dos Santos*, pela presteza quando da solicitação de informes, documentos e pelo apoio na trituração do material vegetal;

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais: *Fernando Maia, Anderson Marques, Jésus Costa, Maria José, Vívian Tenório, Cíntia Lima, Ewerton Henrique, Jayran, Thaísa Alivia, Aslan Rossiel e Nayara Condja*, pela amizade, apoio, troca de experiências e pelos momentos de confraternização vivenciados;

As amigas: *Ana Soraya, Camila, Theolyta e Walleka*, pela amizade, companhia, incentivo e por todo carinho;

Ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq), a *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas* (FAPEAL), ao *Instituto do Milênio do Semi-Árido* (IMSEAR), ao *Banco do Nordeste-Rede Nordestina de Biotecnologia* (BNB-RENORBIO) e a *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES), pelos recursos financeiros e bolsa concedida;

A todos, que de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Este trabalho descreve o isolamento de constituintes químicos, toxicidade frente à *Artemia salina* Leach e avaliação das atividades larvicida (larvas do 4º estágio do *Aedes aegypti* L.), antioxidante (DPPH) e antimicrobiana (difusão em ágar e microdiluição em caldo) das folhas e do caule de *Rourea doniana* Baker (Connaraceae). O estudo fitoquímico efetuado com os extratos que forneceram resultados positivos nos ensaios conduziu ao isolamento de cinco triterpenos (*Lupeol*, *Taraxerol*, *Lupenona* e α - e β -*Amirenonas*), um flavonol (*3,5-Dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona*), uma cumarina (*Escopoletina*), além de quatro fitoesteróides (*Sitosterol*, *Estigmasterol*, *3-O- β -D-Glicopiranosil-sitosterol* e *3-O- β -D-glicopiranosil-estigmasterol*). Estes compostos tiveram suas estruturas identificadas com base na análise de dados de RMN e pela comparação com dados da literatura. Nos ensaios larvicidas, dentre as amostras testadas, somente as frações em hexano do caule [CL_{50} 12,15 $\mu\text{g/mL}$ ($CI_{95\%}$ 2,43-20,32 $\mu\text{g/mL}$)] e em clorofórmio das folhas [CL_{50} 170,83 $\mu\text{g/mL}$ ($CI_{95\%}$ 154,5-188,1 $\mu\text{g/mL}$)] foram promissoras. Estes resultados não mostraram correlação com os obtidos frente à *Artemia salina*, uma vez que a fração em hexano foi atóxica ($CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$) enquanto que a clorofórmica foi altamente tóxica ($CL_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$). Nos ensaios antioxidantes, quando comparados com os padrões positivos utilizados (ácido ascórbico, ácido gálico e BHT), alguns extratos forneceram resultados promissores ($CI_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$), sendo que os melhores foram obtidos com as frações em acetato de etila (CI_{50} $80,29 \pm 5,60 \mu\text{g/mL}$) e metanol (CI_{50} $85,19 \pm 7,28 \mu\text{g/mL}$) das folhas e caule, respectivamente. Nos ensaios antimicrobianos, somente o extrato bruto em etanol das folhas (37,7%) e a fração em clorofórmio do caule (21,3%) mostraram uma fraca inibição do crescimento de *Streptococcus pyogenes*. A literatura científica não relata qualquer estudo químico ou biológico para a espécie *R. doniana*. Portanto, os resultados obtidos no presente trabalho além de contribuir para ampliar a quimiotaxonomia do gênero *Rourea*, sugeriram também que esta espécie possui potencial larvicida e antioxidante.

Palavras-Chave: *Rourea doniana*. Connaraceae. Larvicida. Antioxidante. Antimicrobiano. *Artemia salina*. Triterpenos. Flavonol. Cumarina.

ABSTRACT

This work describes the isolation of chemical constituents, toxicity on *Artemia salina* Leach and evaluation of larvicidal (4th instar larvae of *Aedes aegypti* L.), antioxidant (DPPH) and antimicrobial (agar diffusion and microdilution methods) activities of leaves and stem of *Rourea doniana* Baker (Connaraceae). The phytochemical study performed with the extracts with positive results in trials led to the isolation of five triterpenes (*Lupeol*, *Taraxerol*, *Lupenone*, and α - and β -*Amirenones*), a flavonol (*3,5-Dihydroxy-7,4'-dimethoxyflavone*), a coumarin (*Scopoletin*), beside four phytosteroids (*Sitosterol*, *Stigmasterol*, *3-O- β -D-Glucopyranosyl-sitosterol*, and *3-O- β -D-Glucopyranosylstigmasterol*). All compounds had their structures identified on the basis of their NMR spectral data and by comparison with literature data. In larvicide assays, among the samples tested, only hexane fraction from stem [LC₅₀ 12.15 μ g/mL (CI_{95%} 2.43-20.32 μ g/mL)] and chloroform fraction from leaves [LC₅₀ 170.83 μ g/mL (CI_{95%} 154.5-188.1 μ g/mL)] were promising. These results not did showed correlation with those obtained on *Artemia salina*, since the hexane fraction was non-toxic (LC₅₀ > 1000 μ g/mL) while chloroform was highly toxic (LC₅₀ < 500 μ g/mL). In antioxidant assays, when compared with the positive standard used (ascorbic acid, gallic acid and BHT), some extracts showed promising results (IC₅₀ < 200 μ g/mL) and the best results were obtained for ethyl acetate (IC₅₀ 80.29 \pm 5.60 μ g/mL) and methanol (IC₅₀ 85.19 \pm 7.28 μ g/mL) fractions from leaves and stem, respectively. In antimicrobial assays, only crude ethanol extract from leaves (37.7%) and chloroform fraction from stem (21.3%) showed a weak growth inhibition of *Streptococcus pyogenes*. The scientific literature does not report any chemical or biological study for *Rourea doniana*. Therefore, the results obtained in this work contributed to extend the chemotaxonomy of the genus *Rourea* and also suggested that this species has potential as larvicidal and antioxidant.

Keywords: *Rourea doniana*. Connaraceae. Larvicidal. Antioxidant. Antimicrobial. *Artemia salina*. Triterpenes. Flavonol. Coumarin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclos epidemiológicos (silvestre e urbano) da febre amarela.	19
Figura 2. Áreas de recomendação de vacina contra a febre amarela.	20
Figura 3. Ciclo evolutivo do <i>Aedes aegypti</i> .	23
Figura 4. Eclosão das larvas de <i>Artemia salina</i> .	24
Figura 5. Principais espécies reativas de oxigênio (EROs) formadas no decurso de numerosas vias metabólicas.	26
Figura 6. Distribuição geográfica da família Connaraceae	30
Figura 7. Fotos <i>Rourea doniana</i> Baker, Connaraceae	40
Figura 8. Procedimento experimental efetuado com as folhas de <i>R. doniana</i> .	35
Figura 9. Procedimento experimental efetuado com o caule de <i>R. doniana</i> .	36
Figura 10. Ilustração do ensaio para avaliação da atividade larvicida.	38
Figura 11. Deposição dos ovos de <i>A. salina</i> em recipiente contendo água do mar (A) e incubação dos ovos sob iluminação artificial (B)	39
Figura 12. Ilustração do ensaio para avaliação qualitativa da atividade antirradicalar	41
Figura 13. Representação esquemática da reação de redução do DPPH [•]	41
Figura 14. Escala de MacFarland. Destaque do tubo 5, equivalente a $1,5 \times 10^6$ UFC/mL	48
Figura 15. Distribuição do inóculo dos microrganismos na placa de Petri	49
Figura 16. Discos de antibiograma (A) e distribuição dos discos impregnados em placa de Petri (B)	50
Figura 17. Representação esquemática da reação de redução do TTC	52
Figura 18. Ilustração do resultado da microdiluição em caldo	53
Figura 19. Resultado do teste de difusão em ágar frente à cepa <i>S. pyogenes</i> da fração em CHCl ₃ do caule (A) e do extrato bruto em EtOH das folhas (B)	67
Figura 20. Determinação da CIM frente à cepa <i>S. pyogenes</i> da fração em CHCl ₃ do caule (A) e do extrato bruto em EtOH das folhas (B)	68
Figura 21. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD) das substâncias RdCC-1a e RdCC-1b	74

Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) das substâncias RdCC-1a e RdCC-1b	75
Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) das substâncias RdCC-1a e RdCC-1b	75
Figura 24. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) das substâncias RdCA-2a e RdCA-2b	76
Figura 25. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) das substâncias RdCA-2a e RdCA-2b	77
Figura 26. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) das substâncias RdCA-2a e RdCA-2b	78
Figura 27. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância RdCC-2	81
Figura 28. Espectro de RMN ^{12}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância RdCC-2	81
Figura 29. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância RdCC-2	82
Figura 30. Espectro de HSQC (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância RdCC-2	82
Figura 31. Espectro de HMBC (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância RdCC-2	83
Figura 32. Espectro de NOESY (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância RdCC-2	
Figura 33. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância RdFC-1	86
Figura 34. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância RdFC-1	87
Figura 35. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (100 MHz, CDCl_3) da substância RdFC-1	87
Figura 36. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) das substâncias RdFH-2a , RdFH-2b e RdFH-2c	91
Figura 37. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) das substâncias RdFH-2a , RdFH-2b e RdFH-2c	
Figura 38. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (100 MHz, CDCl_3) das substâncias RdFH-2a , RdFH-2b e RdFH-2c	
Figura 39. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) das substâncias RdFH-3a e RdFH-3b	

Figura 40. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) das substâncias **RdFH-3a** e **RdFH-3b**

Figura 41. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (100 MHz, CDCl_3) das substâncias **RdFH-3a** e **RdFH-3b**.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados avaliação da atividade larvicida com extratos e frações das folhas e do caule.	59
Tabela 2. Toxicidade frente à <i>A. Salina</i> de extratos e frações das folhas e do caule.	61
Tabela 3. Comparação os resultados obtidos nos ensaios larvicida e de toxicidade frente à <i>A. salina</i> dos extratos brutos e frações das folhas e do caule.	62
Tabela 4. Resultados da avaliação da atividade antioxidante (DPPH) e da determinação de fenóis totais (FT) de extratos e frações das folhas e do caule.	64
Tabela 5. Comparação dos resultados obtidos nos ensaios antimicrobianos com a toxicidade frente à <i>A. salina</i> .	68
Tabela 6. Dados de RMN das substâncias RdCC-1a e RdCC-1b (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, δ , <i>J</i> em Hz), do <i>Sitosterol</i> (MACARI <i>et al.</i> , 1990) e <i>Estigmasterol</i> (^{13}C : 50 MHz, CDCl_3 , δ) (MARQUES, 2001) e <i>Clionasterol</i> (WRIGHT <i>et al.</i> , 1978).	72
Tabela 7. Dados de RMN das substâncias RdCA-1a e RdCA-1b (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ , <i>J</i> em Hz), do 3-O-β-D-GlipiranosilSitosterol ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$; BAYOUMI <i>et al.</i> , 2010) e do <i>Estigmasterol</i> .	73
Tabela 8. Dados de RMN (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, δ , Hz) da substância codificada de RdCC-2 e comparação com dados da <i>Escopoletina</i> e da <i>Isoescopoletina</i> (BAYOUMI <i>et al.</i> , 2010).	80
Tabela 9. Dados de RMN (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3 , δ) da substância RdFC-1 e comparação com dados descritos na literatura (SILVA <i>et al.</i> , 2009).	85
Tabela 10. Dados de RMN (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3 , δ , Hz) da substância RdFH-2a comparação com dados da literatura da <i>Lupen-3-ona</i> (CURSINO <i>et al.</i> , 2009).	81

Tabela 11. Dados de RMN (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3 , δ , Hz) das substâncias **RdFH-2b** e **RdFH-2c** comparação com dados do α -*Amirinona* e β -*Amirinona* descritos na literatura (MAHAT & KUNDU, 1994). 90

Tabela 12. Dados de RMN (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3 , δ , Hz) das substâncias **RdFH-3a** e **RdFH-3b** comparação com dados do *Lupeol* e *Taraxerol* descritos na literatura (MAHATO & KUNDU, 1994). 94

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etila
ACRV	Área com recomendação da vacina
AG	Ácido Gálico
ASRV	Área sem recomendação da vacina
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CD_3OD	Metanol deuterado
CHCl_3	Clorofórmio
CI_{50}	Concentração capaz de diminuir em 50% determinada população em estudo
CHIKV	Febre do Chikungunya
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CL_{50}	Concentração Letal capaz de eliminar 50% de uma população
CC	Controle de crescimento
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
dd	Duplo duplete
DEPT	Distortioless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EAG	Equivalente de ácido gálico
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
Cols.	Colaboradores
EtOH	Etanol
Ext	Extrato
FAS	Febre amarela silvestre

FAU	Febre amarela urbana
FDA	Food and Drug Administration
FHD	Febre Hemorrágica da Dengue
Fr	Fração
FT	Fenóis Totais
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC₉₅	Intervalo de confiança (95%)
J	Constante de acoplamento
L1-4	Estádios larvais 1 a 4
MeOH	Metanol
m	Multiplete
MS	Ministério da Saúde
p.	Página
pp.	Páginas
ppm	Partes por milhão
R	Coeficiente de Correlação
Rf	Fator de retenção
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
RNA	Ácido ribonucléico
s	Simpleto
sl	Simpleto largo
SOD	Superóxido dismutase
SNC	Sistema Nervoso Central
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TTC	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
UFC	Unidade formadora de colônias
UV	Ultravioleta
VIS	Visível
WHO	World Health Organization
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

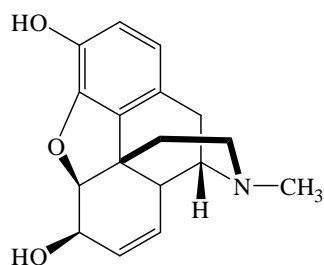
1	INTRODUÇÃO	15
2	CONSIDERAÇÕES SOBRE DENGUE, FEBRE AMARELA E FEBRE DO CHIKUNGUNYA, ARTEMIA SALINA LEACH, RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES, DOENÇAS INFECCIOSAS E ANTIMICROBIANOS, FAMÍLIA E GÊNERO DA ESPÉCIE ESTUDADA	16
2.1	Dengue, Febre Amarela e Febre do Chikungunya	16
2.1.1	Ciclo evolutivo do <i>Aedes aegypti</i>	22
2.2	<i>Artemia salina</i> Leach	23
2.3	Radicais livres e antioxidantes	25
2.4	Doenças infecciosas e antimicrobianos	28
2.5	A Família Connaraceae	29
2.5.1	Gênero <i>Agelaea</i>	31
2.5.2	Gênero <i>Burttia</i>	32
2.5.3	Gênero <i>Byrsocarpus</i>	32
2.5.4	Gênero <i>Cnestis</i>	34
2.5.5	Gênero <i>Connarus</i>	36
2.5.6	Gênero <i>Manotes</i>	38
2.5.7	Gênero <i>Roureopsis</i>	38
2.5.8	Gênero <i>Rourea</i>	38
3	OBJETIVOS	43
4	EXPERIMENTAL	44
4.1	Solventes, materiais e equipamentos	44
4.2	Coleta e identificação do material vegetal	46
4.3	Preparo dos extratos e frações das folhas e do caule	46
4.4	Avaliação do potencial biológico de extratos e frações	48
4.4.1	Avaliação da atividade larvicida	48
4.4.2	Toxicidade frente <i>Artemia salina</i> Leach (TAS)	50
4.4.3	Avaliação da capacidade sequestradora de radicais livres (DPPH')	52
4.4.4	Determinação do teor de fenóis totais (FT)	56

4.4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	58
4.5 Investigação fitoquímica das frações	66
4.5.1 Frações resultantes de partição do extrato em EtOH das folhas	66
4.5.2 Frações resultantes de filtração do extrato em EtOH do caule	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 Resultados dos ensaios larvicidas	58
5.2 Resultados da toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> Leach	60
5.3 Resultados da avaliação da capacidade sequestradora de radicais livres (DPPH) e da determinação de fenóis totais	63
5.4 Resultados da avaliação da atividade antimicrobiana	66
5.5 Resultados da investigação fitoquímica	69
5.5.1 Identificação estrutural das substâncias codificadas de RdCC-1a, RdCC-1b, RdCA-2a e RdCA-2b	70
5.5.2 Identificação estrutural da substância codificada de RdCC-2	78
5.5.3 Identificação estrutural da substância codificada de RdFC-1	83
5.5.4 Identificação estrutural das substâncias codificadas de RdFH-2a, RdFH-2b e RdFH-2c	88
5.5.5 Identificação estrutural das substâncias codificadas de RdFH-3a e RdFH-3b	93
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
REFERÊNCIAS	99

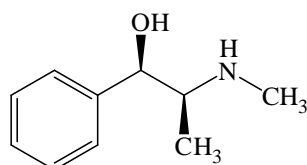
1 INTRODUÇÃO

Durante toda a sua história, o homem vem utilizando os recursos da flora no tratamento de diversas patologias. Foi através da observação e da experimentação pelos povos primitivos que as propriedades terapêuticas de determinadas plantas foram descobertas e propagadas de geração a geração, fazendo parte da cultura popular (TUROLLA & NASCIMENTO, 2006). Até o século XIX, os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente por plantas e extratos vegetais. No início do século XX, esses recursos começaram a ser estudados e se estabeleceu a tendência de utilização das substâncias ativas isoladas. Nesta época, juntamente com o desenvolvimento da Química de Produtos Naturais e início da síntese orgânica, as descobertas de substâncias ativas em plantas medicinais ganharam impulso e provocaram uma revolução científica e tecnológica, alterando rapidamente o arsenal terapêutico (SCHENKEL *et al.*, 2007).

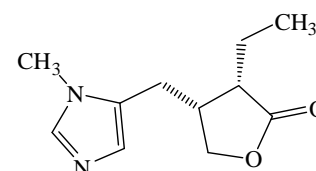
Ao longo dos anos, a procura por agentes farmacologicamente ativos em extratos vegetais contribuiu para obtenção de fármacos clinicamente úteis. A morfina, analgésico opióide, descoberto a partir da espécie *Papaver somniferum*; a efedrina, um broncodilatador isolado de *Ephedra sinica*; a pilocarpina, extraída da espécie *Pilocarpus jaborandi*, utilizada no tratamento do glaucoma; a quinina, obtida da espécie *Cichona pubescens*, que exerce potente atividade antimalárica (SILVA, 1998); a vincristina e a vimblastina, alcalóides isolados de *Vinca rosea*, amplamente empregados no tratamento de leucemias (BARREIRO & FRAGA, 2001); são alguns dos muitos exemplos de fármacos provenientes de fontes naturais.



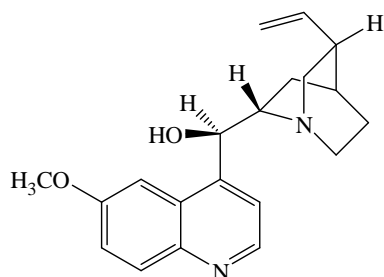
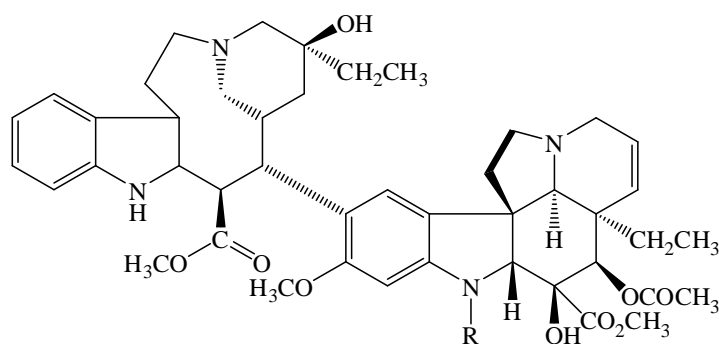
Morfina



Efedrina



Pilocarpina

**Quinina****Vincristina (R = CHO)****Vimblastina (R = CH₃)**

Os compostos de origem natural desempenham papéis importantes na medicina moderna: fornecem fármacos extremamente úteis, que dificilmente seriam obtidos via síntese orgânica; fornecem compostos básicos que podem ser ligeiramente modificados para tornarem-se mais eficazes ou menos tóxicos; e, ainda, podem ser utilizados como protótipos ou modelos para a síntese de novos fármacos com atividades fisiológicas semelhantes às dos compostos originais. Neste sentido, as plantas superiores constituem uma das fontes mais importantes de novas substâncias (ROBBERS *et al.*, 1997; BRAZ FILHO, 2010).

Observa-se um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais, visando à obtenção de novos compostos com propriedades terapêuticas. No entanto, das 250 mil espécies de plantas superiores estimadas no mundo, apenas uma pequena percentagem (5-15%) foi investigada quanto à química e aspectos biológicos (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998; BRAZ FILHO, 2010). Considerando as atividades biológicas observadas em algumas espécies da família Connaraceae e a falta de estudos sobre a espécie *Rourea doniana* Baker, buscou-se com este trabalho avaliar a composição química e as atividades larvicida, antioxidante e antimicrobiana *in vitro*, bem como a toxicidade frente à *Artemia salina* Leach da referida espécie.

2 CONSIDERAÇÕES SOBRE DENGUE, FEBRE AMARELA E FEBRE DO CHIKUNGUNYA, *ARTEMIA SALINA* LEACH, RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES, DOENÇAS INFECCIOSAS E ANTIMICROBIANOS, FAMÍLIA E GÊNERO DA ESPÉCIE ESTUDADA

2.1 Dengue, Febre Amarela e Febre do Chikungunya

A dengue é uma doença febril aguda, cujo agente etiológico é um vírus pertencente ao gênero *Flavivirus*, família Flaviviridae, do qual são conhecidos quatro sorotipos, antigenicamente distintos: DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4. Clinicamente, as manifestações variam de uma síndrome viral, inespecífica e benigna (Dengue Clássico), até um quadro grave e fatal de doença hemorrágica com choque hipovolêmico. É transmitida ao homem pela picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes* (Culicidae), sendo o *Aedes aegypti* L. o principal vetor e o *Aedes albopictus* o vetor secundário (TAUIL, 2001).

O dengue é um grave problema de saúde pública que preocupa as autoridades sanitárias de todo o mundo em virtude de sua circulação nos cinco continentes e grande potencial para assumir formas graves e letais (SIMAS *et al.*, 2004). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 2,5 bilhões de pessoas estão sob risco de contrair dengue, particularmente em países tropicais onde a temperatura e a umidade favorecem a proliferação do mosquito vetor; e que ocorram anualmente cerca de 50 milhões de casos. Desse total, cerca de 550 mil necessitam de hospitalização e pelo menos 20 mil morrem (BRASIL, 2009a; TAUIL, 2002).

Severamente combatido durante as décadas de 40 e 50, em 1955, o *A. aegypti* foi considerado sob controle em quase todos os países da América do Sul (EIRAS, 2005). Porém, o mosquito encontrou no mundo moderno condições 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 (MS/FUNASA, 2002). O *A. aegypti* é um mosquito doméstico, antropofílico, com atividade hematofágica diurna e utiliza-se preferencialmente de depósitos artificiais de água limpa para colocar os seus ovos (TAUIL, 2002).

Nas últimas duas décadas, a incidência de dengue nas Américas tem apresentado uma tendência ascendente, com mais de 30 países informando casos da doença, a despeito dos numerosos programas de erradicação ou controle que foram implementados. Entre 2001 e 2005, foram notificados 2.879.926 casos de dengue na região, sendo 65.235 de dengue

hemorrágica, com 789 óbitos. As maiores incidências nesse período foram reportadas pelo Brasil, Colômbia, Venezuela, Costa Rica e Honduras (82% do total) (BRASIL, 2009a).

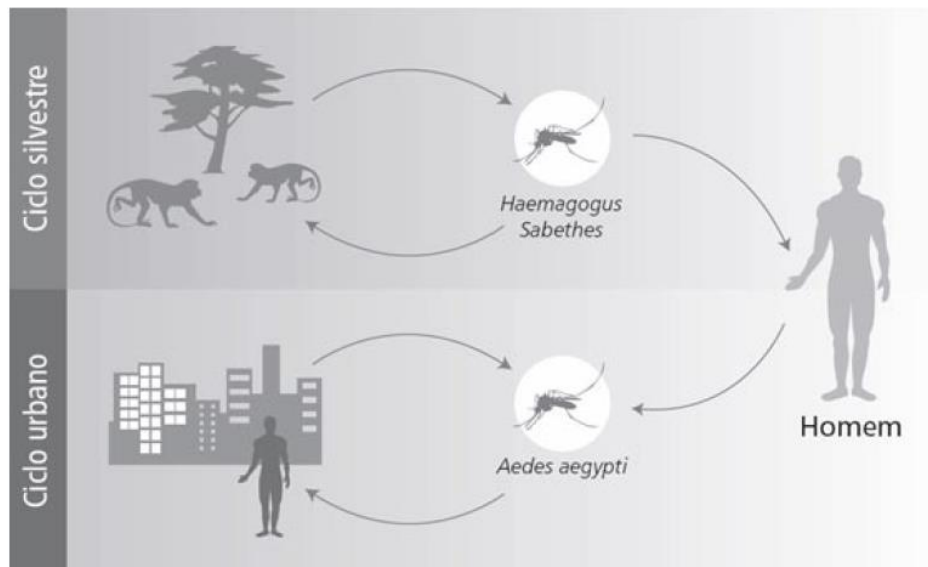
No Brasil, há referências de epidemias de dengue desde 1916, no entanto, sem diagnóstico laboratorial. A primeira epidemia documentada clínica e laboratorialmente ocorreu em 1981-1982, em Roraima, causada pelos sorotipos DENV1 e DENV4. Em 1986, ocorreram epidemias atingindo o Rio de Janeiro e algumas capitais da região Nordeste. Desde então, a dengue vem ocorrendo no Brasil de forma continuada, intercalando-se com a ocorrência de epidemias, geralmente associadas com a introdução de novos sorotipos em áreas anteriormente indenes e/ou alteração do sorotipo predominante (BRASIL, 2009a; MS, 2009).

O quadro epidemiológico atual da dengue no país caracteriza-se pela ampla distribuição do *A. aegypti* em todas as regiões, com uma complexa dinâmica de dispersão do seu vírus, circulação simultânea de três sorotipos virais (DENV1, DENV2 e DENV3) e recente isolamento do sorotipo DENV4, no estado de Roraima, que há 28 anos não circulava no Brasil (BRASIL, 2009a; MS/SVS, 2010a). Até a semana epidemiológica 26, correspondente ao período de 27/06 a 03/07/2010, foram notificados no Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) 942.153 casos suspeitos de dengue. Desse total, 482.284 (51,2%) foram confirmados, 153.098 (16,2%) foram descartados e 306.771 (32,6%) permanecem em investigação. Os estados com maior incidência foram o Acre, Mato Grosso do Sul, Goiás, Rondônia, Roraima, Mato Grosso, São Paulo e Minas Gerais, concentrando 75% dos casos. Observou-se que 20 das 27 unidades federadas apresentaram aumento no total de casos quando comparados ao mesmo período de 2009. O Estado de Alagoas apresentou um aumento de 739,15 % no total de casos (2.437 casos em 2009 e 20.450 em 2010). Nessa comparação, a variação total para o Brasil foi a 158,7% (MS/SVS, 2010b).

A febre amarela, por sua vez, é uma doença infecciosa aguda, de curta duração, que se reveste de importância epidemiológica por sua gravidade clínica e elevado potencial de disseminação em áreas urbanas (BRASIL, 2009b). Também causada por um vírus do gênero *Flavivirus*, a febre amarela apresenta dois ciclos epidemiologicamente distintos: febre amarela silvestre (FAS) e febre amarela urbana (FAU) (Figura 1, p. 19). A forma silvestre é endêmica nas regiões tropicais da África e das Américas, sendo transmitida de macacos infectados para humanos por mosquitos *Aedes*, *Haemagogus* e *Sabethes*, que habitam as florestas úmidas; enquanto a forma urbana é epidêmica e transmitida de humano para humano através do mosquito *A. aegypti* (BRASIL, 2009b; VASCONCELOS, 2003; RÁCZ, 2005).

A FAU foi erradicada nas Américas em 1942, porém casos da forma silvestre da doença, de difícil controle, continuam sendo notificados em países como Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Paraguai, Peru e Venezuela. Assim, a ampla distribuição geográfica do *A. aegypti*, no Brasil e em outros países da América Latina, constitui uma ameaça constante à reurbanização da febre amarela (RÁCZ, 2005; BRASIL, 2009b).

Figura 1. Ciclos epidemiológicos (silvestre e urbano) da febre amarela.



Fonte: BRASIL, 2009b.

No Brasil, até 1999, os focos endêmicos de FAS estavam situados nos estados das regiões Norte, Centro-oeste e área pré-amazônica do Maranhão, além de registros esporádicos na parte oeste de Minas Gerais. Os surtos ocorridos no período de 2000 a 2008 demonstraram uma expansão da circulação viral no sentido leste e sul do país, detectando-se sua presença em áreas silenciosas há várias décadas. Em outubro de 2008, foram, então, redefinidas duas áreas no país: a) área com recomendação de vacina (ACRV), correspondendo àquelas anteriormente denominadas endêmica e de transição, com a inclusão do sul de Minas Gerais, até então considerado “área indene de risco potencial”; b) área sem recomendação de vacina (ASRV), correspondendo, basicamente, às “áreas indenenes”, incluindo também o sul da Bahia e norte do Espírito Santo, que antes eram consideradas “áreas indenenes de risco potencial” (Figura 2, p. 20) (BRASIL, 2009b).

O número anual de notificações de FAS é muito variável. No período entre 1980 e 2008, foram confirmados 726 casos, dos quais 383 evoluíram para óbito, o que corresponde a

uma letalidade média de 52,8%, com uma variação de 23 a 100%. Todas as unidades federadas da região Norte registraram casos no período, ainda que esporádicos, sendo responsáveis por 35,8% das notificações do país, nas duas últimas décadas. A região Centro-oeste notificou 30,2% dos casos do período e a região Sudeste, 18%. O Nordeste (Maranhão e Bahia) foi responsável por 15% dos casos e a região Sul (Paraná e Rio Grande do Sul) por 1% (BRASIL, 2009b).

Figura 2. Áreas de recomendação de vacina contra a febre amarela.



Fonte: BRASIL, 2009b.

No período de setembro de 2008 a setembro de 2009 foram notificados 274 casos humanos suspeitos de FAS, com 51 casos (18,6%) confirmados e destes, 21 evoluíram para o óbito (taxa de letalidade foi de 41,2%). A média de idade foi de 31 anos, com intervalo entre 8 dias de vida e 73 anos. O sexo masculino foi predominante com 37 casos (72%) (MS/SVS, 2009). A FAS acomete com maior frequência o sexo masculino e a faixa etária acima dos 15 anos, em função da maior exposição profissional, relacionada à penetração em zonas silvestres da área endêmica. Outro grupo de risco são pessoas não vacinadas que residem próximas aos ambientes silvestres, além de turistas e migrantes que adentram esses ambientes. A maior frequência da doença ocorre nos meses de janeiro a abril, período com maior índice

pluviométrico, quando a densidade vetorial é elevada, coincidindo com a época de maior atividade agrícola (BRASIL, 2009b).

A principal medida de controle da FAU é a vacina com o vírus atenuado, que confere imunidade em mais de 95% dos vacinados. A vacinação para os residentes e viajantes à área endêmica deve ser realizada a partir dos seis meses de idade, sendo necessária uma dose de reforço a cada dez anos (RÁCZ, 2005).

Para a dengue, ainda não se dispõe de uma vacina preventiva eficaz e a única medida de controle é o combate ao mosquito vetor. Sua eliminação dos locais de criação e aplicação de inseticida em locais com transmissão ativa da doença, bem como a informação e educação sobre a doença e seus meios de prevenção constituem medidas antivetoriais (TAUIL, 2001).

A utilização de inseticidas é a principal medida adotada pelos Programas de Saúde Pública no combate aos mosquitos de importância para a saúde. Entretanto, o surgimento de formas resistentes desses mosquitos aos inseticidas utilizados e os danos causados por estes produtos ao meio ambiente têm resultado na busca de novas alternativas de controle. Com este objetivo, muitas pesquisas são desenvolvidas e estimuladas a fim de se descobrirem extratos vegetais e substâncias naturais, isentos de toxicidade para o meio ambiente e, simultaneamente, seletivos para serem usados em futuras formulações de um produto comercial (FURTADO *et al.*, 2005).

Diversos estudos comprovam a atividade inseticida de extratos vegetais. Como exemplo, os óleos essenciais de *Syzygium aromaticum*, *Lippia sidoides* e *Hyptis martiusii*, testados contra larvas de terceiro estágio de *A. aegypti* e de *Culex quinquefasciatus*, em diferentes concentrações, apresentaram resultados promissores, sendo que *S. aromaticum* e *L. sidoides* mostraram-se potencialmente mais ativos, registrando mortalidade de 100% das larvas num período de 10 minutos de tratamento (COSTA *et al.*, 2005).

A febre do Chikungunya (CHIKV) é uma doença causada por um vírus RNA (gênero *Alphavirus*), que também é transmitida ao homem por mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o *A. aegypti* o vetor principal e o *A. albopictus* o vetor secundário. A CHIKV pode manifestar-se em três formas clínicas: aguda, subaguda e crônica. A doença aguda, com duração de 3 a 10 dias, é caracterizada pelo início súbito da febre e dores articulares intensas, podendo aparecer dores de cabeça, mialgia, náuseas, poliartrite, exantema e conjuntivite. A fase subaguda tem duração de 2 a 3 meses após o início dos sintomas. Na doença crônica, período afebril, os sintomas persistem por mais de três meses. Alguns pacientes podem desenvolver artrites e artropatia semelhantes a uma artrite reumatóide. O vírus, endêmico na Ásia, África e ilhas do

Oceano Índico, tem cruzado fronteiras internacionais com a notificação de casos em áreas indenes, em viajantes que visitaram áreas afetadas. No Brasil, por exemplo, em 2010 foram confirmados três casos da doença. O risco de introdução do vírus nas Américas é alto, devido o intenso fluxo de viagens internacionais, a competência e distribuição vetorial e a suscetibilidade da população. Assim, a CHIKV consiste em mais um motivo para a busca de novas alternativas de controle do *A. aegypti* (MS/SVS, 2010c).

2.1.1 Ciclo evolutivo do *Aedes aegypti*

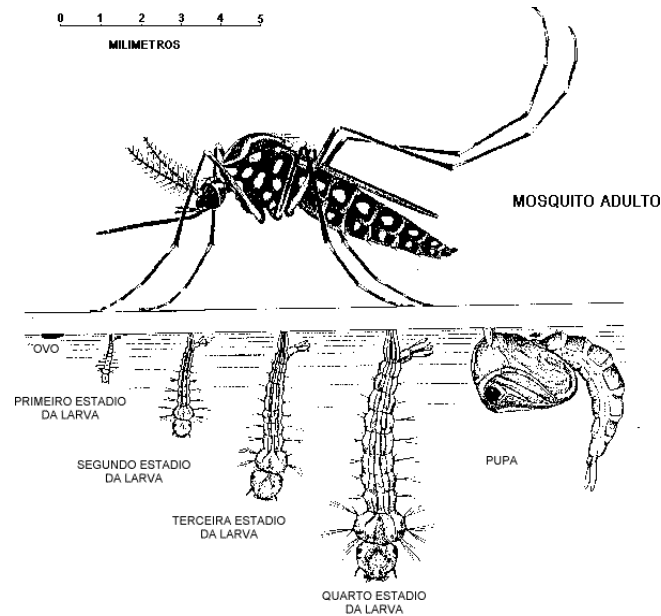
Os mosquitos são animais holometábolos, ou seja, têm metamorfose completa durante o seu desenvolvimento, passando pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto (Figura 3, p. 23).

O *A. aegypti* tem como criadouros preferenciais os mais variados recipientes de água domiciliar e peridomiciliares (pneus sem uso, latas, garrafas, pratos com vasos de plantas, caixas d'água descobertas, piscinas sem uso), onde as fêmeas ovipõem de 10 a 30 ovos por criadouro. A fecundação ocorre durante a postura e o desenvolvimento do embrião se completa em 48 horas, em condições favoráveis de umidade e temperatura. Os ovos de *A. aegypti* são muito resistentes à dessecação, podendo permanecer viáveis por mais de um ano, o que constitui um sério obstáculo para sua erradicação. Esta condição permite que os ovos sejam transportados a grandes distâncias, em recipientes secos, tornando-se assim o principal meio de dispersão passiva do inseto. Após o contato dos ovos com a água, as larvas podem eclodir nos primeiros 15 minutos. Daí o motivo da alta população de *A. aegypti* durante o período das chuvas. Após um período médio de dois a quatro dias, em temperatura média de 26°C, os ovos dão origem às larvas, que se movimentam ativamente e se alimentam constantemente de material orgânico acumulado nas paredes e fundo dos criadouros. A fase larval é o período de alimentação e crescimento, na qual as larvas passam por quatro estádios (L₁, L₂, L₃ e L₄) e cuja duração depende da temperatura, disponibilidade de alimento e densidade de larvas no criadouro (EIRAS, 2005).

A larva de quarto estágio (L₄) transforma-se em pupa, que não se alimenta, mas respira e movimenta-se ativamente. A pupa permanece nesta fase por um período de um a três dias, dando liberdade ao mosquito adulto, que vive cerca de 15 a 20 dias. O mosquito recém-emergido voa até um abrigo com pouca luz, ausência de ventos e umidade relativa do ar elevada, e depois se dispersam a fim de se alimentar e copular. A primeira alimentação dos adultos é de açúcar ou néctar de plantas. Após a cópula, as fêmeas se alimentam de sangue,

que fornece proteínas necessárias para o desenvolvimento dos ovos, e fazem a postura no mesmo tipo de criadouro em que nasceram (EIRAS, 2005).

Figura 3. Ciclo evolutivo do *Aedes aegypti*.



Fonte: <<http://www.prdu.unicamp.br/dengue/dengue.html>>

2.2 *Artemia salina* Leach

A *Artemia salina* Leach é um crustáceo da classe Anostracea, que vive em águas salinas e salobras de todo o mundo, com grande adaptabilidade para sobrevivência em águas que sofrem grandes variações sazonais, podendo tolerar salinidades que flutuam de 3,5 a 70%. Possuem quatro estágios de desenvolvimento (ovo, náuplio, metanáuplio e adulto) e alguns mecanismos de adaptação que as tornam cosmopolitas, como a osmorregulação, a presença de pigmentos respiratórios como a hemoglobina e a disponibilidade de alternativas reprodutivas que facilitam a dispersão e a perpetuação dessa espécie. Essas “alternativas” ou modos de reprodução se referem à oviparidade, viviparidade, partenogênese e encistamento, quando as condições ambientais são impróprias. Por ser amplamente utilizada como alimento vivo para peixes e outros crustáceos, seus ovos podem ser encontrados com facilidade em lojas de aquaristas (LOPES *et al.*, 2010; ANDRIOLLI *et al.*, 2007).

Com a crescente utilização de produtos naturais pela população como alternativa no tratamento de diversas enfermidades, o estudo das possíveis propriedades farmacológicas e de

efeitos tóxicos correspondentes é imprescindível (LOPES *et al.*, 2010). O ensaio utilizando as larvas de *A. salina* (Figura 4), permite a avaliação da toxicidade e é considerado um bioensaio preliminar no estudo de extratos e produtos de origem natural com potencial biológico, de acordo com as literaturas e códigos de vigilância em vários países. Esse teste é viável devido à semelhança dos limites dos efeitos tóxicos em *A. salina* com aqueles produzidos no homem (AMARAL & SILVA, 2008).

Figura 4. Eclosão das larvas de *Artemia salina*.



Fonte: <<http://www.microbiotests.be/toxkits/artokit.pdf>>

O primeiro trabalho referente ao uso de *A. salina* em bioensaios foi publicado em 1956 (MICHAEL *et al.*, 1956) e, a partir de então, inúmeros artigos têm sido reportados determinando-se a toxicidade de extratos vegetais ou de substâncias com diferentes atividades biológicas com *A. salina* (MEYER *et al.*, 1982; MCLAUGHLIN, 1991; SOLIS *et al.*, 1992). O ensaio de toxicidade frente à *A. salina* (TAS) é atraente por uma variedade de razões: disponibilidade comercial dos cistos; as artêmias podem ser mantidas indefinidamente em laboratório, na sua forma cisto e são facilmente induzidas a eclosão; o teste é rápido; realizado a baixo custo; não exige técnicas assépticas; utiliza pequena quantidade de amostra; e cumpre diretrizes de ética animal em muitos países, por exemplo, Código Brasileiro de Boas Práticas para o Cuidado e Uso de Animais para fins científicos. A simplicidade do bioensaio favorece sua utilização rotineira (RUEBHART *et al.*, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 1998).

O procedimento determina a concentração letal média (CL₅₀) como parâmetro de avaliação da atividade biológica. Diversos trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *A. salina* com as atividades antifúngica, viruscida e antimicrobiana, parasiticida, tripanossomicida, entre outras. McLaughlin e cols. (1991) têm utilizado sistematicamente este bioensaio na avaliação prévia de extratos de plantas conhecidas como antitumorais. As frações ou substâncias ativas são posteriormente testadas em diferentes culturas de células tumorais, obtendo-se uma boa correlação (MEYER *et al.*, 1982; SIQUEIRA *et al.*, 1998).

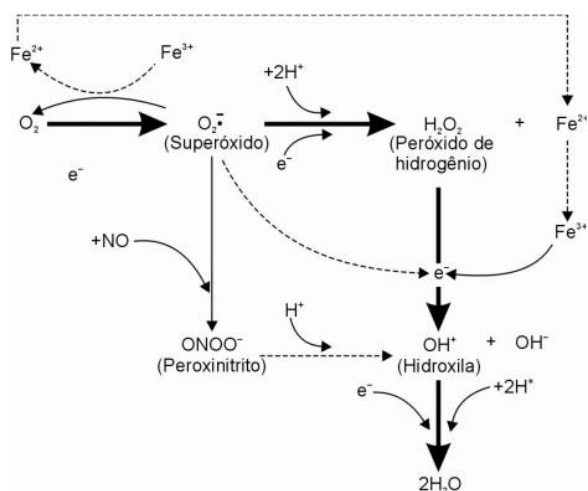
2.3 Radicais livres e antioxidantes

Os radicais livres são espécies químicas capazes de existência independente, que possuem um ou mais elétrons não pareados na camada de valência. Essa configuração faz dos radicais livres, moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas; podem doar elétrons (atividade redutora) ou retirar elétrons de outra substância para se estabilizar (atividade oxidante) (BIANCHI & ANTUNES, 1999; OGA, 2003). A formação de radicais livres *in vivo* ocorre por atividade enzimática, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular (respiração aeróbica, inflamações, peroxissomos, enzimas do citocromo P450) e pela exposição a fatores exógenos (ozônio, radiação gama e ultravioleta, medicamentos, dieta e cigarro) (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

O oxigênio é um forte oxidante, sendo impossível impedir oxidações secundárias promovidas por esta molécula, não envolvidas no metabolismo. A redução completa do oxigênio molecular envolve quatro elétrons, resultando em água no produto final da cadeia respiratória. Porém, podem ocorrer situações em que o oxigênio é parcialmente reduzido, onde são formados produtos intermediários, as chamadas espécies reativas de oxigênio (ERO). Estas espécies apresentam alto poder oxidante, podendo conduzir oxidações secundárias (SILVA, 2008). A Figura 5 (p. 26) mostra as principais ERO, formadas no decurso de numerosas vias metabólicas. Além do oxigênio, outros elementos podem dar origem a radicais livres de importância biológica. O nitrogênio, por exemplo, dá origem ao óxido nítrico e seus derivados; o carbono a radicais metil; e o enxofre a radicais tioil (DALUZ & LAURINDO, 2004).

Os radicais livres gerados *in vivo* reagem com o DNA, RNA, proteínas e outras substâncias oxidáveis, promovendo danos que podem contribuir para o envelhecimento e a instalação de doenças crônicas, inflamatórias e degenerativas (câncer, aterosclerose, artrite reumática, entre outras) (CERQUEIRA *et al.*, 2007). A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares de radicais livres e impedir a indução de danos. Os antioxidantes são substâncias que em baixas concentrações, comparada à do substrato oxidável, diminuem ou inibem significativamente a oxidação destes (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

Figura 5. Principais espécies reativas de oxigênio (ERO).



Fonte: DA LUZ & LAURINDO, 2004.

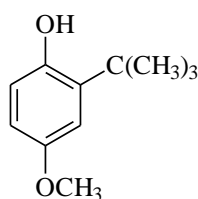
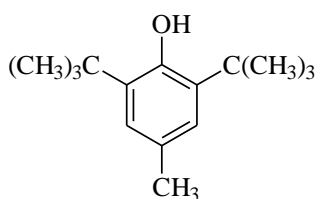
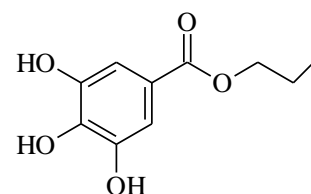
O organismo dispõe de um sistema celular de defesa contra ERO que são produzidas na cadeia respiratória. O sistema de defesa primário é formado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase. A superóxido dismutase catalisa a reação de radicais superóxidos com formação de peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser eliminado por ação de outras enzimas como a catalase e a glutathiona peroxidase. A glutathiona peroxidase tem ação não específica sobre peróxido de hidrogênio e pode eliminar também peróxidos orgânicos através de uma reação que necessita de glutathiona (GSH) como fonte de equivalentes redutores. A catalase, por sua vez, inativa o peróxido de hidrogênio, formando hidrogênio molecular e água (OGA, 2003).

O sistema de defesa antioxidante secundário bloqueia a etapa de propagação da cadeia radicalar, seqüestrando radicais intermediários. Os tocoferóis, compostos fenólicos como flavonóides e vários antioxidantes sintéticos encontram-se nesta classe. Existe ainda um sistema de reparo do DNA, formado por proteases e fosfolipases, que removem as lesões oxidativas do DNA, proteínas e lipídeos (OGA, 2003). Em adição aos efeitos protetores dos antioxidantes endógenos, a inclusão de antioxidantes na dieta é de grande importância e o consumo de frutas e vegetais está relacionado com a diminuição do risco do desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de radicais livres (POMPELLA, 1997).

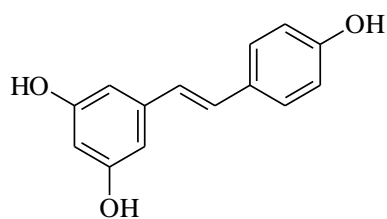
Quando ocorre um desequilíbrio entre os níveis de antioxidantes e de radicais livres, com predomínio destes últimos, acontece o que se chama de *estresse oxidativo*, que pode estar associado à diminuição dos antioxidantes (por menor ingestão destes ou de constituintes essenciais para sua formação e atuação) ou ao aumento na produção de espécies oxidantes.

Esse desequilíbrio pode resultar em lesões oxidativas em macromoléculas e em diversas estruturas celulares que se não forem reparadas, alterarão a funcionalidade de células, tecidos e órgãos (OGA, 2003).

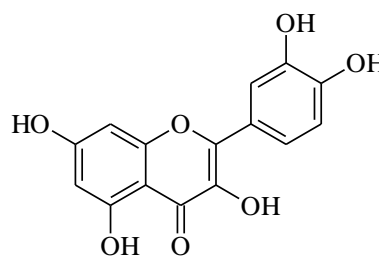
Atualmente, a utilização dos antioxidantes estende-se aos mais variados produtos, como cosméticos, medicamentos e alimentos. Nos cosméticos, os antioxidantes aumentam a duração do produto, auxiliam na proteção contra os danos causados pela radiação ultravioleta e combatem os danos causados pelos radicais livres evitando ou diminuindo a destruição tissular (ZULLI *et al.*, 2000). A indústria alimentícia, por sua vez, utiliza antioxidantes sintéticos como butil-hidroxi-anisol (**BHA**), butil-hidroxi-tolueno (**BHT**) e galato de propila para inibir a oxidação lipídica. No entanto, estudos têm demonstrado a possibilidade destes antioxidantes apresentarem efeitos tóxicos e em função disto, pesquisas vêm sendo feitas no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante. Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (SOUSA *et al.*, 2007).

**BHA****BHT****Galato de propila**

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



Resveratrol



Quercetina

2.4 Doenças Infecciosas e Antimicrobianos

As doenças infecciosas são tão importantes para a história da humanidade quanto às guerras e os desastres naturais. Nos últimos anos, o conhecimento disponível para controle das diferentes síndromes infecciosas tem aumentado como resultado da melhor caracterização clínica e epidemiológica dessas doenças, e principalmente, dos avanços registrados nas áreas de microbiologia e imunologia. Assim, o aumento da expectativa de vida pode ser atribuído, em muito, ao controle da morbimortalidade causada pelas doenças infecciosas e à melhoria das condições sanitárias com o emprego massivo de vacinas e ao desenvolvimento da terapia antimicrobiana eficaz (KUMAR *et al.*, 2008; COLOMBO, 2006; PASQUALOTTO & SCHWARZBOLD, 2006).

No entanto, as doenças infecciosas permanecem como um dos principais problemas de saúde pública, sendo a principal causa de óbito no mundo. Segundo a OMS, uma em cada três mortes é causada por doenças infectoparasitárias. Nessa categoria, as principais causas são as doenças do trato respiratório inferior, a tuberculose, as doenças diarréicas, a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e a malária. Muitas dessas condições altamente letais afetam populações jovens em países pobres, acarretando um grande impacto socioeconômico (PASQUALOTTO & SCHWARZBOLD, 2006).

Os antimicrobianos são substâncias que provocam morte ou inibição do crescimento de microrganismos, cujo principal objetivo do uso é o de prevenir ou tratar uma infecção, diminuindo ou eliminando os microrganismos patogênicos e, se possível, preservando os germes da microbiota normal. O tratamento com esta classe de substâncias deve ser reservado para situações em que o uso seja comprovadamente benéfico, minimizando o emprego em casos de benefício duvidoso, pois, além de apresentar efeitos adversos e gerar custos para o indivíduo e para a sociedade, o uso indiscriminado desses fármacos tem levado o

desenvolvimento de patógenos com virulência crescente, resistentes a múltiplas drogas (MACHADO, 2008; MACHADO & BARROS, 2008; KUMAR *et al.*, 2008).

A resistência microbiana refere-se à ausência de resposta de um microrganismo a determinado antimicrobiano, podendo ser natural, quando o microrganismo naturalmente não é afetado pelo antimicrobiano; ou adquirida, refere-se ao desenvolvimento de resistência pelo microrganismo, por mutação genética ou por transferência gênica de um microrganismo para outro, devido ao uso de um antimicrobiano. Este último tipo de resistência representa um problema clínico sério, pois limita as alternativas terapêuticas no tratamento de muitas doenças infecciosas (TRIPATHI, 2006).

A capacidade que os microrganismos possuem de adquirir resistência aos antimicrobianos, impõe à necessidade permanente de pesquisas e desenvolvimento de novas drogas para seu combate e/ou controle. Nos últimos anos, tem aumentado a atenção aos produtos de origem natural, especialmente, aos derivados das plantas superiores, na busca de novas substâncias com atividades antimicrobianas (AYRES *et al.*, 2008).

Muitas plantas são tradicionalmente utilizadas no tratamento de várias doenças infecciosas. No entanto, o número de pesquisas científicas que comprovem tais propriedades ainda é muito pequeno. Considerando a grande diversidade da flora brasileira, a pequena comprovação científica de suas atividades, bem como o alto poder mutagênico de algumas cepas de microrganismos, ressalta-se a importância das pesquisas a fim de validar a utilização popular das plantas, determinando seus efeitos biológicos.

2.5 Família Connaraceae

A família Connaraceae inclui aproximadamente 20 gêneros (*Agelaea*, *Bernardinia*, *Burttia*, *Byrsocarpus*, *Cnestidium*, *Cnestis*, *Connarus*, *Ellipanthus*, *Hemandradenia*, *Jaundea*, *Jollydora*, *Manotes*, *Pseudellipanthus*, *Pseudoconnarus*, *Rourea*, *Roureopsis*, *Schellenbergia*, *Spiropetalum* e *Vismianthus*) e cerca 350 espécies de árvores, arbustos ou lianas, distribuídas em todas as regiões tropicais do mundo (WIART, 2006). Na América tropical, esta família está representada por cinco gêneros (*Bernardinia*, *Cnestidium*, *Connarus*, *Pseudoconnarus* e *Rourea*). Em 1983, quando da última publicação sobre as Connaráceas Neotropicais, eram conhecidas 101 espécies. Novos táxons foram descritos e o número de espécies aumentou para 110 (FORERO, 2007).

No Brasil, ocorrem quatro gêneros com 64 espécies (*Bernardinia*, *Connarus*, *Pseudoconnarus* e *Rourea*), distribuídas em várias fitofisionomias, com predominância na região Amazônica, centro de diversidade da família no neotrópico. Na Mata Atlântica são encontradas 27 espécies (23 endêmicas), pertencentes a três gêneros: *Bernardinia* (*B. fluminensis*), *Connarus* (12 espécies) e *Rourea* (14 espécies). Apenas os gêneros *Connarus* e *Rourea* são representados por espécies endêmicas, encontradas mais comumente no sul da Bahia e Espírito Santo; um centro secundário de endemismo se encontra no Rio de Janeiro, no Corredor de diversidade da Serra do Mar (FORERO; 1976; 1983). No Cerrado, a família Connaraceae está representada por sete espécies arbustivo-arbóreas distribuídas nos gêneros *Rourea* e *Connarus* (LENZA *et al.*, 2008). Taxonomicamente, muitas espécies se assemelham às leguminosas, das quais se diferenciam pela ausência de estípulas, sendo, portanto, consideradas intermediárias entre Leguminosae e Averrhoaceae (FORERO, 1976; 1983). A Figura 6 mostra a distribuição geográfica desta família no mundo, podendo-se observar que ela está muito presente na América do Sul e na África.

Os gêneros mais representativos da família são o *Connarus* (130 espécies), *Rourea* (80 a 90 espécies), *Agelaea* (50 espécies), *Cnestis* (40 espécies) e *Byrsocarpus* (20 espécies). O gênero *Jollydora*, com seis espécies distribuídas na África Ocidental, produz flores e frutos diretamente na madeira do tronco e dos galhos maiores, uma condição chamada caulifloros (BRITANNICA, 2010).

Figura 6. Distribuição Geográfica da Família Connaraceae.



Fonte: Missouri Botanical Garden, 2010.

A família Connaraceae é constituída por plantas angiospérmicas (com flores), dicotiledôneas da ordem Oxalidales. Exceto para algumas espécies, que têm flores masculinas e femininas separadas, as flores são bissexuais e possuem: 5 pétalas e sépalas; 5 ou 10 estames, estruturas produtoras de pólen; e 1, 4 ou 5 carpelos distintos, que fecham-se sobre os óvulos formando o ovário das flores, posicionados acima do ponto de fixação das outras estruturas florais. Apenas um carpelo se desenvolve em um fruto. Cada carpelo tem dois óvulos e apenas um óvulo torna-se semente, que muitas vezes tem um apêndice carnoso ligado (arilo). O fruto é um folículo, um tipo de fruto seco, que se abrem quando maduro (deiscente), apenas em um lado. As folhas são compostas, imparipinadas, alternas e sem estípulas (BRITANNICA, 2010; FORERO, 2010).

O levantamento bibliográfico efetuado sobre a família revelou que somente algumas espécies pertencentes ao gênero *Agelaea*, *Burttia*, *Byrsocarpus*, *Cnestis*, *Connarus*, *Manotes*, *Roureopsis* e *Rourea* foram, até então, investigadas quanto à composição química e/ou atividade biológica. Economicamente, há algumas espécies de importância na família Connaraceae. Da espécie *Connarus guianensis*, encontrada na Guiana, por exemplo, aproveita-se a madeira. Os frutos, sementes ou folhas de muitas espécies são venenosos e usados, entre outras coisas, contra cães selvagens e coiotes em iscas envenenadas (por exemplo, *Rourea volubilis*, *R. glabra* e *Cnestis polyphylla*) (BRITANNICA, 2010).

2.5.1 Gênero *Agelaea*

Este gênero compreende cerca de 50 espécies, algumas das quais possuem propriedades que possibilitam seu uso na medicina popular: em Madagascar, as folhas de *A. emetica* são usadas para induzir o vômito, enquanto as folhas de *A. lamarckii* são usadas no tratamento da gonorréia; na África Ocidental, as folhas de *A. villosa* são utilizadas no tratamento de disenterias (BRITANNICA, 2010).

Em um estudo sobre a perspectiva da utilização de metabólitos secundários de plantas para inibir a produção de metano no rúmen de gados, as folhas de espécie *A. obliqua* são citadas, como uma alternativa natural ao uso de aditivos químicos na alimentação animal. No entanto, sua utilização não é recomendada por apresentar compostos tóxicos. Altos teores de fenóis totais (10,2%), taninos hidrolisáveis (8,8%) e taninos condensados (8,0%) são observados nesta espécie (HAYLER *et al.*, 1998; ASCHFALK *et al.*, 2000). Por sua vez, a espécie *A. pentagyna* (Lam.) Baill., encontrada em Madagascar e alguns países do Leste Africano, é citada como planta medicinal, mas também é considerada um veneno. O chá da

madeira é usado como tônico, no tratamento de problemas na coluna vertebral e de retenção urinária (NOVY, 1997; KUWABARA *et al.*, 2003). O extrato em MeOH das folhas desta espécie apresentou forte atividade anti-histamínica, e seu fracionamento resultou no isolamento do flavonoide tricina (**1**), com potente atividade anti-histamínica (KUWABARA *et al.*, 2003).

2.5.2 Gênero *Burttia*

Para este gênero há apenas dois trabalhos, que relatam a toxicidade das folhas e sementes da espécie *B. prunoides* para alguns animais (Singida, distrito da Tanzânia, África). Em ratos que receberam o decocto das sementes trituradas observou-se uma severa desordem do Sistema Nervoso Central (SNC) e morte. Achados *post-mortem* incluíram hemorragia e inflamação no estômago, edema e congestão dos pulmões, cérebro e mucosa do trato gastrointestinal. Os rins estavam congestionados e mostrou nefrose completa do epitélio tubular proximal. O fígado também estava congestionado e apresentava áreas focais de necrose. Em caprinos, as sementes também induziram uma severa desordem do SNC, mas os animais se recuperaram. As folhas não apresentaram toxicidade (MSENGI *et al.*, 1987). Estes resultados foram semelhantes aos encontrados em um estudo anterior com bezerros e ovelhas (MUGERA & JIWA, 1970).

2.5.3 Gênero *Byrsocarpus*

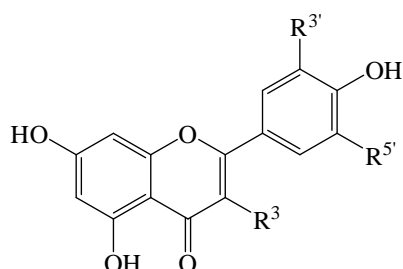
Este gênero compreende cerca de 20 espécies (BRITANNICA, 2010), entre as quais, a espécie *B. coccineus* é a mais investigada quanto à composição química e atividade biológica, em virtude de sua grande utilização na medicina popular.

A espécie *B. coccineus* Schum e Thonn. (sin. *Rourea coccinea*) é um arbusto ou cipó escandente presente em matas de cerrado e floresta secundária, encontrado principalmente na África Ocidental e Central, em países como Nigéria, Gana, Togo, Costa do Marfim, Camarões, República Central Africano e no Congo. Além de seu uso medicinal, suas folhas e raízes apresentam valor ornamental. Esta espécie é usada no tratamento de úlceras (boca e pele), edema, tumores, dor de ouvido, dores musculares e reumáticas, doenças venéreas (gonorréia), icterícia, diarreia, sintomas da malária, infertilidade masculina e feminina, astenia sexual, picadas de cobra, furúnculos, distúrbios mentais e distúrbios do SNC (ansiedade,

convulsões, epilepsia, histeria, pesadelos) e como tônico (AKINDELE & ADEYEMI, 2006 a,b; 2007 a,b; 2010; OLOWOKUDEJO *et al.*, 2008; BERO *et al.*, 2009).

Vários estudos vêm sendo realizados, principalmente com o extrato aquoso de folhas de *B. coccineus* a fim de comprovarem seu uso popular. Foram observadas satisfatórias atividades: uterotônica (AMOS *et al.*, 2002); antioxidante (OKE & HAMBURGER, 2002); antimicrobiana (KAMANZI *et al.*, 2002; AHMADU *et al.*, 2006); analgésica; antidiarréica; anti-inflamatória; antipirética; ansiolítica e sedativa (AKINDELE & ADEYEMI, 2006a,b; 2007a,b; 2010); hepatoprotetora e antioxidantes *in vivo* (AKINDELE *et al.*, 2010).

Quanto à composição química das folhas de *B. coccineus*, os estudos revelam a presença de alcalóides, taninos, saponinas, açúcares redutores, glicosídeos e antraquinonas (AKINDELE e ADEYEMI, 2006a); flavonóides e flavonas (OKE & HAMBURGER, 2002), como a quercetina (**2**), 3-O- α -arabinosilquercetina (**3**) e 3-O- β -D-glicopiranosilquercetina (**4**) (AHMADU *et al.*, 2007); cumarinas, dicumarol (**5**) e 4-hidroxicumarina (**6**) (VICKERY & VICKERY, 1980). No óleo das sementes de *B. coccineus* foi encontrado o ácido *cis*-11,12-metilenoctadecanóico (**7**), juntamente com uma grande proporção de seu precursor biossintético, o ácido *cis*-11-octadecenóico (**8**) (BADAMI & PATIL, 1981; SPENCER *et al.*, 1979).

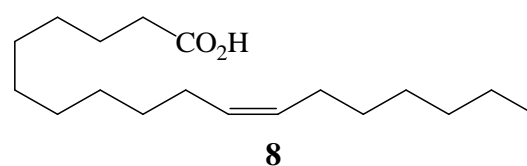
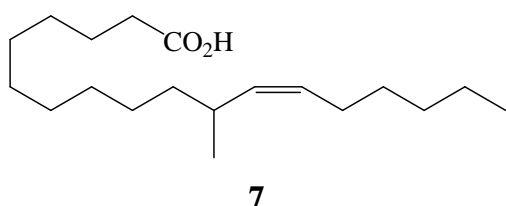
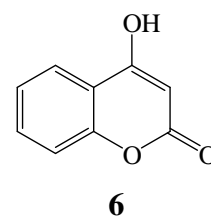
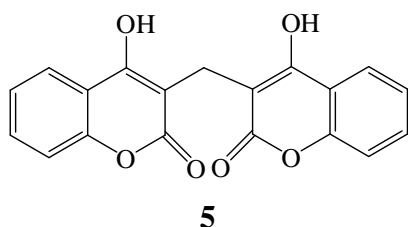


1 $R^3 = H, R^{3'} = R^{5'} = OCH_3$

2 $R^3 = R^{3'} = OH, R^{5'} = H$

3 $R^3 = O-\alpha\text{-arabinose}, R^{3'} = OH, R^{5'} = H$

4 $R^3 = O-\beta\text{-D-Glucose}, R^{3'} = OH, R^{5'} = H$

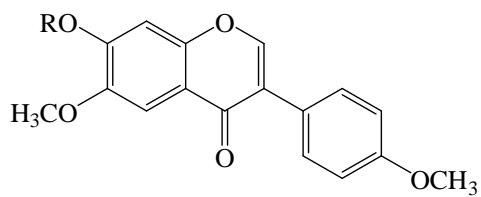
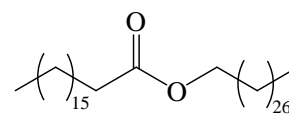
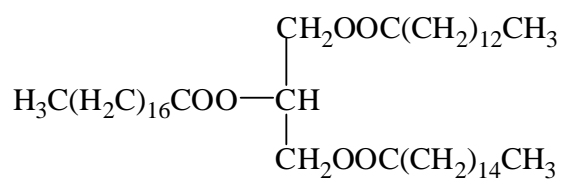
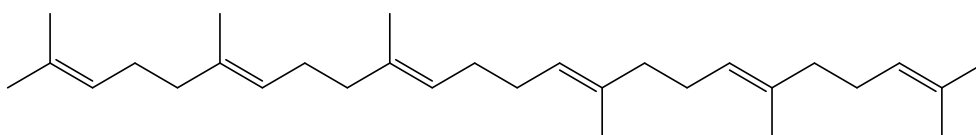
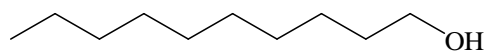
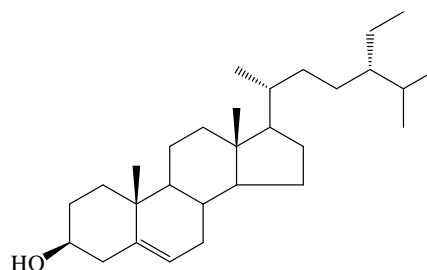
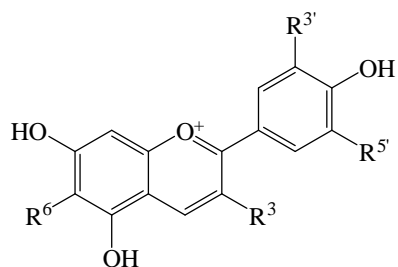
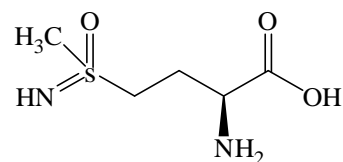


2.5.4 Gênero *Cnestis*

Este gênero compreende 40 espécies (BRITANNICA, 2010), dentre as quais, a *C. ferruginia* DC. é a mais relatada na literatura. Esta espécie recebeu esse nome devido à cor vermelha de seus frutos. É muito utilizada na África Ocidental, particularmente na Gâmbia, Gana, Guiné-Bissau, Costa do Marfim, Libéria, Nigéria, Serra Leoa, sul de Benin, sudeste de Níger e Gabão. Os curandeiros usam esta planta para tratamento de várias doenças infantis. Entre outros usos, destaca-se: o uso das folhas como um laxativo e contra a febre; raízes, caule e frutos são utilizados na limpeza dos dentes; raízes e frutos foram considerados como um remédio para picada de cobra; os frutos também são utilizados no tratamento de patologias oculares, como conjuntivite e contra várias outras doenças como bronquite e tuberculose; as raízes também são usadas no tratamento de feridas, dor de garganta e infecções na gengiva (ADDAE-KYEREME *et al.*, 2001).

O extrato aquoso dos frutos de *C. ferruginea* apresentou significativa atividade antibacteriana (*Staphylococcus aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*), validando o seu uso na higiene oral (CHIOMA, 2005). Também foi relatada forte atividade de *C. ferruginea* contra *Aspergillus niger* (LE GRAND *et al.*, 1988). Quanto à composição química, alcalóides, flavonóides, saponinas e glicosídeos foram relatados como constituintes majoritários do extrato das raízes de *C. ferruginea* (ISHOLA & ASHORABI, 2007). O estudo fitoquímico dos frutos resultou no isolamento do flavonóide, 7-O- β -D-galactopiranosilafroformosina (**9**), com atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* (PARVEZ & RAHMAN, 1992). O extrato em éter de petróleo dos frutos contém, entre outros componentes, estearato octacosanil (**10**), 1-miristo-2-estearo-3-palmitina (**11**), esqualeno (**12**), álcool miricil (**13**), β -sitosterol (**14**). Observou-se também a presença de flavonóides, antraquinonas, saponinas, taninos, glicosídeos e esteróides (OGBECHIE *et al.*, 1987; OLUGBADE *et al.*, 1982). Das pétalas foram isoladas as antocianinas, delfinidina (**15**) e apigeninidina (**16**) (OGBEDE *et al.*, 1986).

Várias espécies de *Cnestis* como *C. polyphylla*, *C. glabra*, *C. palala*, *C. ferruginea*, bem como a espécie *Rourea orientalis*, são relatadas como tóxicas, sendo usadas para envenenamento de cães e peixes. O estudo fitoquímico revelou a presença de L-metionina sulfoximina (glabrina, cnestina) (**17**), um ácido aminado neurotóxico (JEANNODA *et al.*, 1985; MURAKOSHI *et al.*, 1993; GARONA *et al.*, 2007; ISHOLA & ASHORABI, 2007).

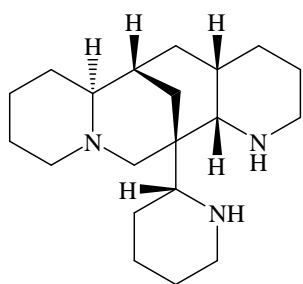
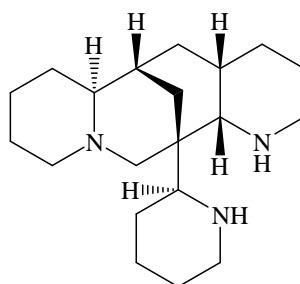
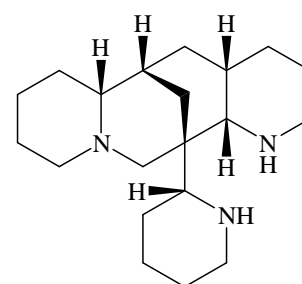
**9**R = β -D-galactopiranosídeo**10****11****12****13****14****15** $R^{3'} = R^{5'} = R_3 = OH$; $R_6 = H$ **16** $R^{3'} = R_{5'} = R_3 = R_6 = H$ **17**

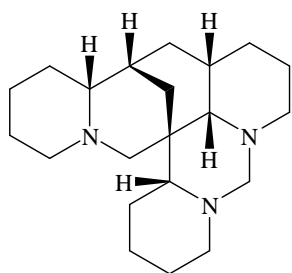
2.5.5 Gênero *Connarus*

O gênero *Connarus* é o maior gênero da família com cerca de 130 espécies (BRITANNICA, 2010). Do México ao Sul do Brasil, são encontradas 54 espécies. Este gênero pode ser distinguido dos outros quatro gêneros americanos (*Bernardinia*, *Cnestidium*, *Pseudoconnarus* e *Rourea*) por possuir apenas um carpelo em suas flores (FORERO, 2010). O decocto do caule e das raízes de *C. planchonianus* Schellenb. é usado para tratar flatulência, na Malásia (ONG & NORDIANA, 1999).

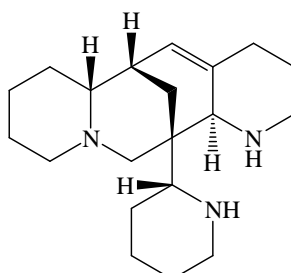
O estudo químico dos extratos das folhas e frutos de *C. paniculatus* resultou no isolamento de seis alcalóides quinolizidínicos: Piptantina (**18**), 18-Epipiptantina (**19**), Ormosanina (**20**), Homormosanina (**21**), Podopetalina (**22**), Homopodopetalina (**23**) (LE *et al.*, 2005). Foi determinada grande quantidade de óleo (40,5%) nas sementes de *C. paniculatus*, com α -tocoferol (**24**) em sua composição (355 mg/kg óleo) (MATTHAUS *et al.*, 2003). Do extrato lipossolúvel dos frutos de *C. venezuelensis* foi isolada uma quinona, rapanona (**25**), junto com outros homólogos; triglicerídeos formados com os ácidos graxos saturados e triglicerídeos insaturados; ácidos graxos e seus ésteres metílicos e etílicos; *n*-parafinas e as correspondentes 1-olefinas. Das sementes foram isolados o mio-inositol (cis-1,2,3,4-trans-4,6-cicloexanoexol) (**26**) e manitol (**27**) e do caule, um flavonóide altamente hidroxilado (MARCANO *et al.*, 1984).

Das raízes de *C. monocarpus* foram isoladas quinonas [rapanona (**25**) e embelina (**28**)], o carotenóide licopeno (**29**), a antocianidina leucopelargonidina (**30**), hentriacontano (**31**), β -sitosterol (**14**) e bergenina (**32**) (RAMIAH *et al.*, 1976; AIYAR *et al.*, 1964; 1965) e de *C. ferrugineus* foram isolados os iminoaçúcares: 1-desoximannojirimicina (DMJ) (**33**), 2-O- α -D-galactopiranosil-DMJ (**34**), 3-O- β -D-glicopiranosil-DMJ (**35**), 1,4-didesoximannojirimicina (**36**), 1,4-didesoxialonojirimicina (**37**) e 1,4-dideoxialtronojirimicina (**38**) (ASANO *et al.*, 2005).

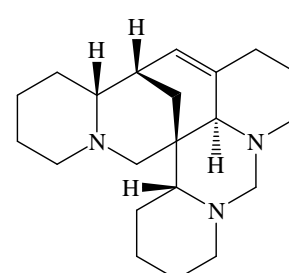
**18****19****20**



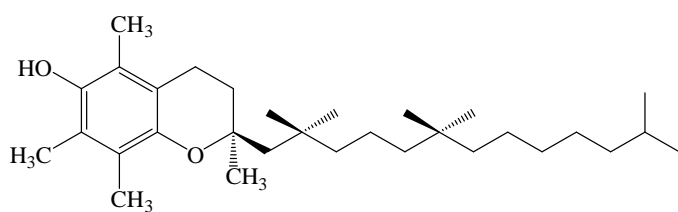
21



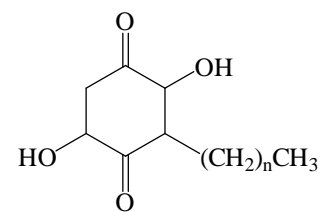
22



23

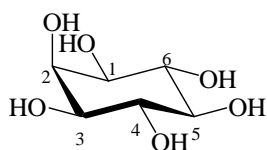


24

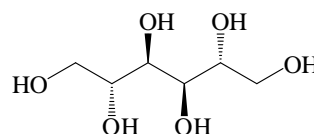


25 n = 12

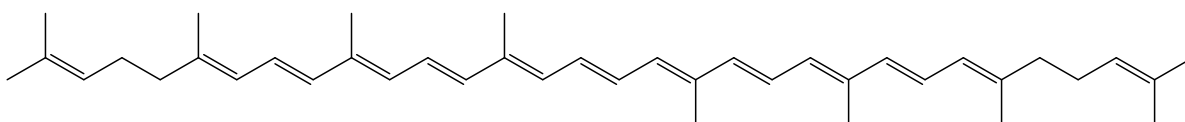
28 n = 10



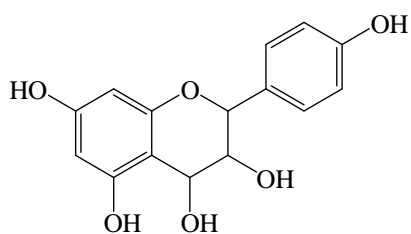
26



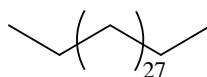
27



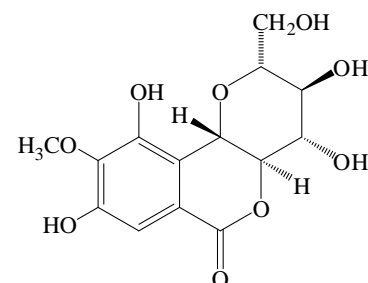
29



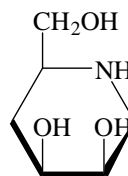
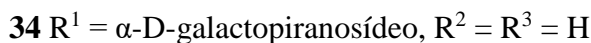
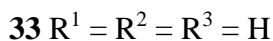
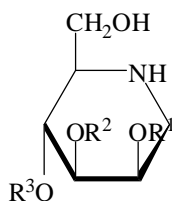
30



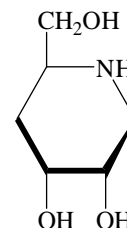
31



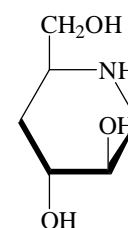
32



36



37



38

2.5.6 Gênero *Manotes*

O extrato metanólico da casca do caule *M. pruinosa* Gilg. apresentou atividade citotóxica contra células MRC-5 ($CI_{50} 27,0 \pm 2,2$) e fraca ou nenhuma atividade contra os protozoários selecionados [*Trypanosoma brucei brucei* ($CI_{50} 37,0 \pm 3,1 \mu\text{g/mL}$), *T. cruzi* ($CI_{50} > 64 \mu\text{g/mL}$) e *Plasmodium falciparum* ($CI_{50} > 64 \mu\text{g/mL}$)] (MESIA *et al.*, 2008).

2.5.7 Gênero *Roureopsis*

O decocto das raízes da espécie *R. obliquifoliolata* é utilizada na medicina tradicional de Lomela, República Democrática do Congo (África) no tratamento da diarreia e disenteria, enquanto a casca das raízes é usada no tratamento de dor de dente e elefantíase. A avaliação da atividade antidiarréica do extrato metanólico das raízes da *R. obliquifoliolata*, em camundongos com diarreia induzida por óleo de mamona, demonstrou redução significativa, validando o uso popular da planta. No entanto, não há relato de estudo químico desta espécie (OTSHUDI *et al.*, 2001).

2.5.8 Gênero *Rourea*

O gênero *Rourea* abrange mais de 80 espécies distribuídas nas regiões tropicais do mundo. Das 110 espécies de Connaraceae conhecidas na região neotropical, 48 pertencem ao gênero *Rourea* (FORERO, 2007; BRITANNICA, 2010). É um gênero considerado tipicamente distílico, sendo caracterizado por flores com cinco pistilos apocárpicos e dois grupos de estames com tamanhos diferentes (LENZA *et al.*, 2008). Algumas espécies desse gênero são utilizadas na medicina popular. Dentre as quais está a *R. minor* (Gaertn.) Aubl.,

utilizada na China para o tratamento de abrasões e lesões. No Vietnã, o decocto do caule é utilizado para tratar a febre de dengue. O estudo químico da fração clorofórmica de *R. minor*, ativa *in vitro* contra o *Plasmodium falciparum*, resultou no isolamento de dois novos compostos, rourinosídeo (39) e rouremina (40), que apresentaram fraca atividade antimalárica. Desta fração foram isolados mais cinco compostos conhecidos: 1-(26-hidroxihexacosanoil)-glicerol (41), 1-O-β-D-glicopiranosil-(2*S*,3*R*,4*E*-8*Z*)-2-N-(2'-hidroxipalmitoil)-octadecaspinga-4,8-dienina (42), ácido 9*S*,12*S*,13*S*-trihidroxi-10*E*-octadecenóico (43), diidro-vomifoliol-9-β-D-glicopiranosídeo (44) e β-sitosterol glicosilado (45). Outros estudos dessa espécie reportam a presença de triterpenos, esteróides, quinonas, flavanas, flavonas, antracenedionas e ácidos graxos (HE *et al.*, 2006).

Na Índia, as raízes da espécie *R. minor*, conhecida como *R. santaloides* (Vahl.) Wight & Arnott, são utilizadas como tônico e no tratamento da diabetes, do reumatismo e de doenças de pele. O extrato aquoso das suas raízes apresentou atividade contra *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. subfava*, enquanto o extrato em EtOH foi ativo contra *S. subfava* (PAREKH & CHANDA, 2008). Das raízes dessa espécie também foram isolados a rapanona (25) e a leucopelargonidina (30), juntamente com β-sitosterol (14) e hentriacontano (31) (RAMIAH *et al.*, 1976).

A cortiça da espécie *R. induta*, também conhecida como campeira, boticaiteira ou pau-de-porco, é usada para tratamento de reumatismo. Esta espécie está distribuída no Brasil nos estados do Maranhão, Bahia, Ceará, Pernambuco, Minas Gerais, Mato Grosso, Distrito Federal, e São Paulo, sendo abundante em áreas de cerrado campo sujo e cerrado *sensu stricto*. Estudo recente, descreveu o isolamento do extrato bruto em EtOH das folhas de *R. induta* de um hidrocarboneto de cadeia longa, *n*-tetracosano (46) e de quatro flavonóides [quercetina (2) e seus derivados glicosilados, 3-O-α-arabinofuranosilquercetina (47), 3-O-β-xilosilquercetina (48) e 3-O-β-galactosilquercetina (49) e hiperina (50)]. A avaliação de algumas atividades biológicas, com as frações e substâncias isoladas, revelaram grande capacidade antioxidante, atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *S. epidermidis* e atividade alelopática (KALEGARI, 2009).

Dos estudos fitoquímicos com a espécie *R. microphylla* foram isolados os ácidos 23-hidroxibetulínico (51) e ursólico (52), hederagenina (53), éster nonacosoil-(E)-ferúlico (54), daphnetina (55), kaempferol (56), rutina (57), 1-hentriacontanol (58) (ZHANG *et al.*, 2008), 3-O-α-L-rhamnopiranosilquercetina (59), hiperina (50), quercetina (2), astilbina (60), β-

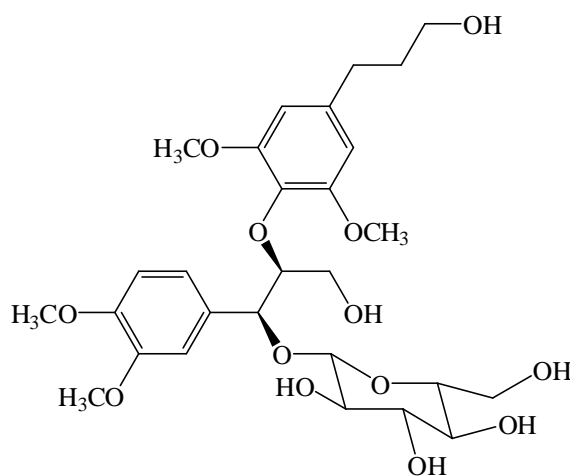
sitosterol (**14**), β -sitosteril- β -D-glicopiranosídeo (**45**), fisciona (**61**), eritroglaucina (**62**), ácido esteárico (**63**), ácido palmítico (**64**) e *n*-nonacosano (**65**) (JIANG *et al.*, 1990).

Quanto à espécie *R. doniana*, a literatura científica não relata nenhum estudo químico e/ou biológico. Desse modo, o estudo químico e a avaliação das atividades larvicida, antimicrobiana e antioxidante desta espécie contribuirão para ampliar a quimiotaxonomia do gênero *Rourea*, bem como do conhecer o potencial biológico da flora local.

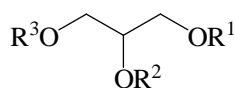
Figura 7. Fotos *Rourea doniana* Baker, Connaraceae.



Fonte: POPOVKIN, 2010.

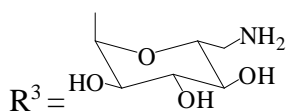


39



40 $R^1 = \text{CO}(\text{CH}_2)_{24}\text{CH}_3$

$R^2 = \text{CO}(\text{CH}_2)_{18}\text{CH}_3$

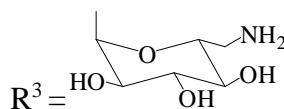


$R^3 =$

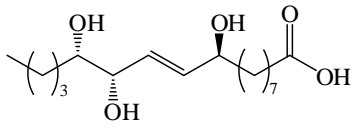
41 $R^1 = \text{CO}(\text{CH}_2)_{24}\text{CH}_2\text{OH}$, $R^2 = R^3 = \text{H}$

42 $R^1 = \text{H}$

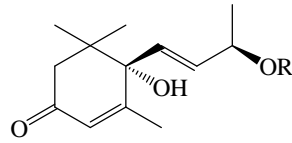
$R^2 = \text{CO}(\text{CH}_2)_{18}\text{CH}_3$



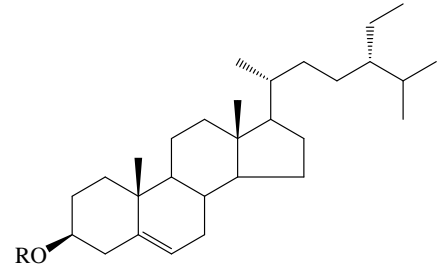
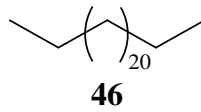
$R^3 =$



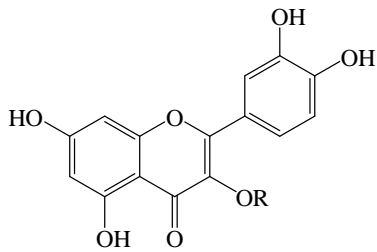
43



44

45 R = β -D-glicopiranosídeo

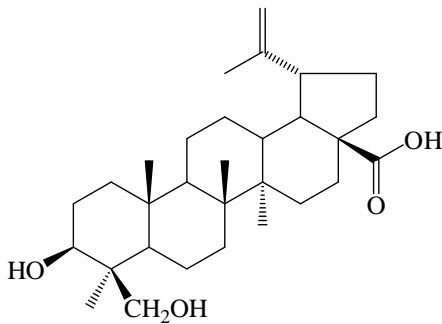
46

47 R = α -arabinofuranosídeo

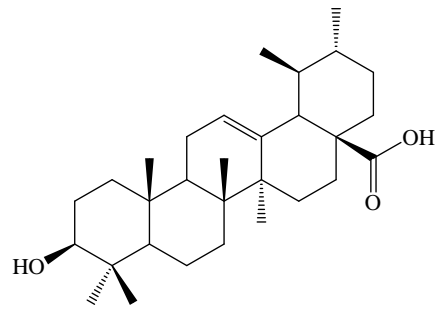
56 R = OH

48 R = β -xilose

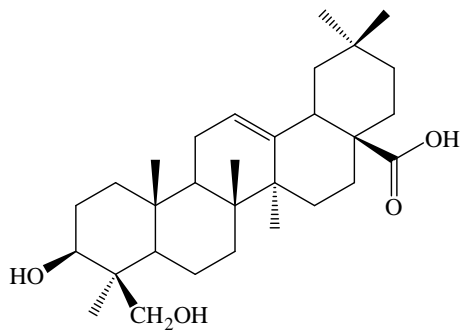
57 R = rutinosídeo

49 R = β -galactose59 R = α -L-ramnopiranosídeo50 R = β -galactopiranosídeo

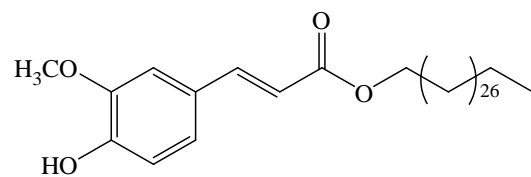
51



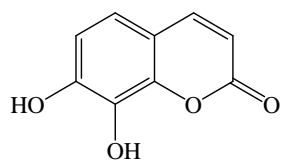
52



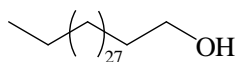
53



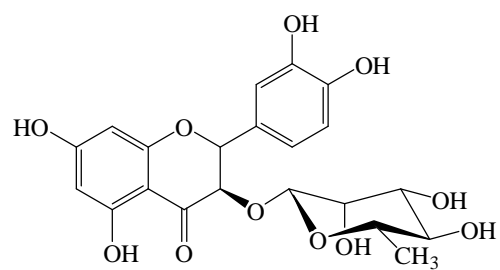
54



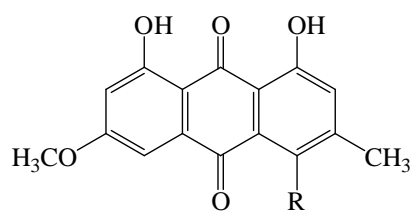
55



58

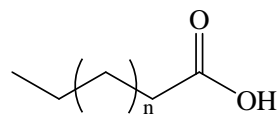


60



61 R = H

62 R = OH



63 n = 14

64 n = 12

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

O presente trabalho teve como objetivo ampliar o conhecimento da composição química e do potencial biológico do gênero *Rourea*, através do estudo químico e da avaliação das atividades larvicida, antioxidante e antimicrobiana, bem como da toxicidade frente à *Artemia salina*, de extratos das folhas e do caule da espécie vegetal *Rourea doniana* Baker (Connaraceae).

3.2 Específicos

- Avaliar o potencial larvicida, frente larvas do 4º estágio do *Aedes aegypti*, de extratos e frações da espécie acima mencionada;
- Avaliar, frente ao radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH[•]), o potencial antioxidante de extratos e frações;
- Determinar, através do método de Folin-Ciocalteu, o conteúdo de fenóis totais presentes em extratos e frações;
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos e frações frente a diferentes microrganismos;
- Avaliar a toxicidade frente à *Artemia salina* dos extratos e frações com resultados promissores nos ensaios efetuados;
- Isolar e elucidar a estrutura química de alguns dos constituintes químicos presentes nos extratos e frações, especialmente daqueles com resultados promissores nos ensaios efetuados.

4 EXPERIMENTAL

4.1 Solventes, materiais e equipamentos

- Na preparação dos extratos brutos foram utilizados extratores de vidro e etanol 90%;
- Nas partições, separações cromatográficas e outras marchas químicas foram utilizados solventes destilados no próprio laboratório ou P.A. (Labsynth, Vetec e Quimex);
- As soluções contendo grandes volumes foram concentradas em evaporadores rotativos, marcas BUCHI (modelo R-114) e IKA WERKE (modelo RV06-ML), enquanto as soluções com pequenos volumes foram concentradas à temperatura ambiente em capela de exaustão da Permutation;
- Nas separações cromatográficas em coluna foram utilizados como adsorvente sílica gel 60 G (70-230 mesh, ASTM Merck) e Sephadex LH-20 (Pharmacia);
- Nas cromatografias em camada delgada analítica (CCD - 0,50 mm de espessura) utilizaram-se sílica gel 60 PF₂₅₄ da Merck. As cromatoplasmas foram preparadas utilizando-se suspensões de sílica gel em água destilada, espalhadas sobre placas de vidro através de um espalhador mecânico e, em seguida, ativadas a 100°C, em estufa (Biomatic);
- As pesagens foram efetuadas em balança eletrônica analítica (modelo AX 200, Shimadzu) e balança semi-analítica (BEL);
- Utilizou-se Ultrasson da Brason (modelo 1210) nas solubilizações das amostras;
- A secagem da vidraria foi realizada em estufa de esterilização universal (modelo 219);
- Os cromatogramas foram revelados em lâmpada ultravioleta da Spectroline (modelo ENF-260C/F), em comprimentos de onda de 254 e 366 nm; por imersão em cubas de vidro contendo cristais e vapores de iodo; e/ou através de métodos destrutivos de revelação como a aplicação de uma solução ácida de sulfato cérico ou do reagente de Dragendorf;
- Os espectros de RMN (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz) foram registrados em espectrômetro Brüker Avance 400 (referência interna utilizada - TMS) do Instituto de Química da Universidade Federal de Alagoas (IQB/UFAL). As amostras foram dissolvidas em

solventes deuterados (metanol, clorofórmio, piridina e dimetilsulfóxido) puros ou em mistura;

- Nos ensaios para avaliação da atividade larvicida, as amostras foram solubilizadas com DMSO. A ração animal para alimentação das larvas foi esterilizada em autoclave vertical modelo 415 (Fanem) e os insetos adultos de *Aedes aegypti* foram alimentados com sacarose anidra P.A. (Vetec) ou glicose anidra P.A. (Amresco);
- Nos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* Leach foram utilizados os seguintes materiais: tubos de ensaio, luminária (Force Line Indústria e Comércio Ltda., São Paulo-SP, Brasil), ovos de *A. salina* (adquiridos da Sea Word Comercial Ltda., Maceió/AL, Brasil), recipientes plásticos 12 x 8 cm, água do mar fresca e filtrada, pipetas automáticas de volumes variáveis (Eppendorf do Brasil, Indústria e Comércio Ltda, São Paulo/SP, Brasil), ponteiros de polietileno, placas de Petri descartáveis com 9 cm de diâmetro (TPP®, Techno Plastic Products AG, Trasadingen/ Switzerland), solução de timol a 0,01% (Azul de Timol solução a 0,04%, Panreac Química, S.A.U., Barcelona, Espanha) e microscópio estereoscópico binocular (Coleman Equipamentos para Laboratório Com. e Imp. Ltda., Santo André-SP);
- Nos ensaios antirradicales qualitativos utilizou-se cromatoplasmas de gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck), o radical sintético 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) e (+)-catequina (Sigma). Nos ensaios quantitativos utilizou-se MeOH grau espectroscópico (Vetec), 2,6-di-terc-butil-4-metil-fenol (BHT), ácido ascórbico e ácido gálico (Sigma). As medidas de absorvância foram efetuadas em espectrofotômetro UV/VIS (modelo Mini-1240 da Shimadzu);
- Na determinação do teor de fenóis totais utilizou-se MeOH grau espectroscópico (Vetec), ácido gálico e Reagente Folin-Ciocalteu (Sigma), bicarbonato de sódio (Na₂CO₃) (Vetec), centrífuga, espectrofotômetro UV-VIS (modelo Mini-1240 da Shimadzu);
- Nos ensaios antimicrobianos foram utilizados: pipetas automáticas de volumes variáveis, ponteiros de polietileno, placas de Petri descartáveis de nove cm de diâmetro (Global Trade Technology), microplacas de poliestireno com 96 orifícios estéreis (JET BIOFIL® Tissue Culture Plates), tubos de ensaios, erlenmeyers, béqueres e provetas de volumes variados, pinças, alças de platina, máscaras, gorro e jaleco, luvas de procedimento, algodão, *swabs* e gazes estéreis, meios de cultivos Ágar Müller-Hinton, Brain-Heart

Infusion Broth e Ágar Sabouraud Dextrose (HIMEDIA[®]), discos para antibiograma e cepas padrão (NEWPROV Produtos para Laboratório, Pinhais/PR, Brasil; Cefar Diagnóstica Ltda, São Paulo/SP, Brasil), cloreto 2,3,5- trifeniltetrazólio (TTC) (Vetec), papel Whatman[®] n° 1, paquímetro mecânico (Starret Company, Athol/MA/USA), autoclave vertical (modelo Q316M2 Quimis[®] e estufa bacteriológica (modelo Q290 Quimis[®]), capela de fluxo laminar (Biohazard Safety Cabinet, JSR-JS Research, Veco do Brasil Indústria e Comércio de Equipamentos Sociedade Ltda, Campinas/SP, Brasil).

4.2 Coleta e identificação do material vegetal

A espécie vegetal *Rourea doniana* Baker (folhas e caule) foi coletada em março de 2007, na Fazenda Lamarão, município de Pilar/AL, e identificada pela botânica **Rosângela Pereira de Lyra Lemos**, do Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas (IMA/AL), onde um exemplar da referida espécie encontra-se catalogado (MAC-26413).

4.3 Preparo dos extratos e frações das folhas e do caule

Os materiais das folhas e do caule de *R. doniana*, obtidos após secagem à temperatura ambiente e trituração, foram individualmente extraídos através de maceração com etanol a 90%. Após concentração das soluções em evaporador rotativo e secagem à temperatura ambiente, foram obtidos os extratos brutos (folhas: 38,05 g; caule: 102,71 g).

O extrato bruto em EtOH das folhas foi suspenso em solução MeOH-H₂O (3:2) e extraído sucessivamente com hexano, clorofórmio e acetato de etila (Figura 8, p. 47). Após concentração das soluções em evaporador rotativo foram obtidas as frações em hexano (6,32 g), CHCl₃ (4,75 g), AcOEt (3,52 g) e MeOH-H₂O (8,33 g). Por sua vez, o extrato bruto em EtOH do caule foi filtrado em gel de sílica (70-230 mesh), utilizando-se solventes de diferentes polaridades. Após concentração das soluções em evaporador rotativo foram obtidas as frações em hexano (1,42 g), CHCl₃ (3,03 g), AcOEt (4,04 g) e MeOH (46,24 g) (Figura 9, p. 48). Posteriormente, os extratos brutos e suas frações foram submetidos a ensaios para avaliação do potencial larvicida (larvas do 4º instar do *Aedes aegypti*), antimicrobiano, da capacidade sequestradora de radicais livres (DPPH), do conteúdo de fenóis totais (reagente Folin-Ciocalteu) e da toxicidade frente à *Artemia salina*.

Figura 8. Procedimento experimental efetuado com as folhas de *R. doniana*.

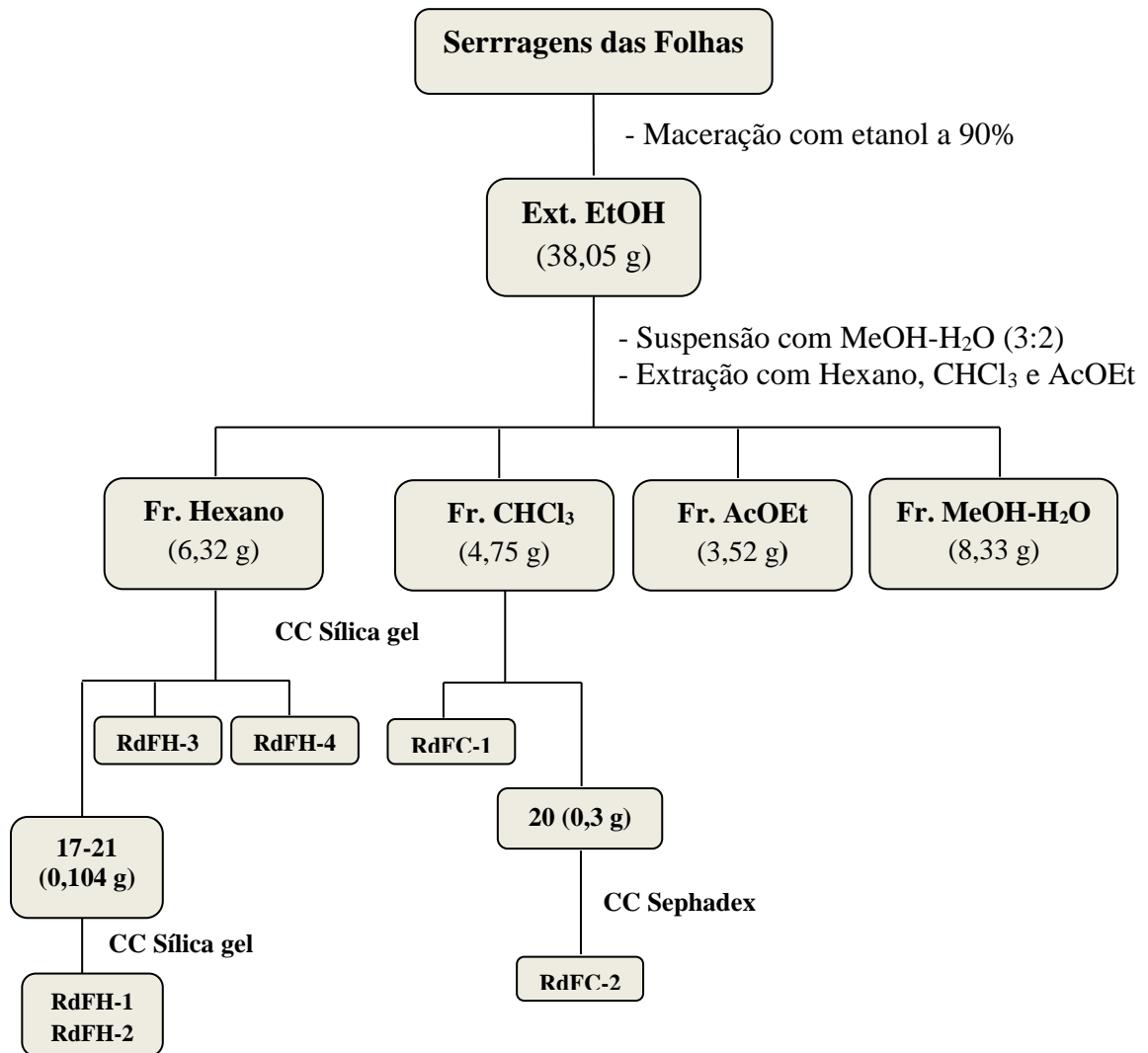
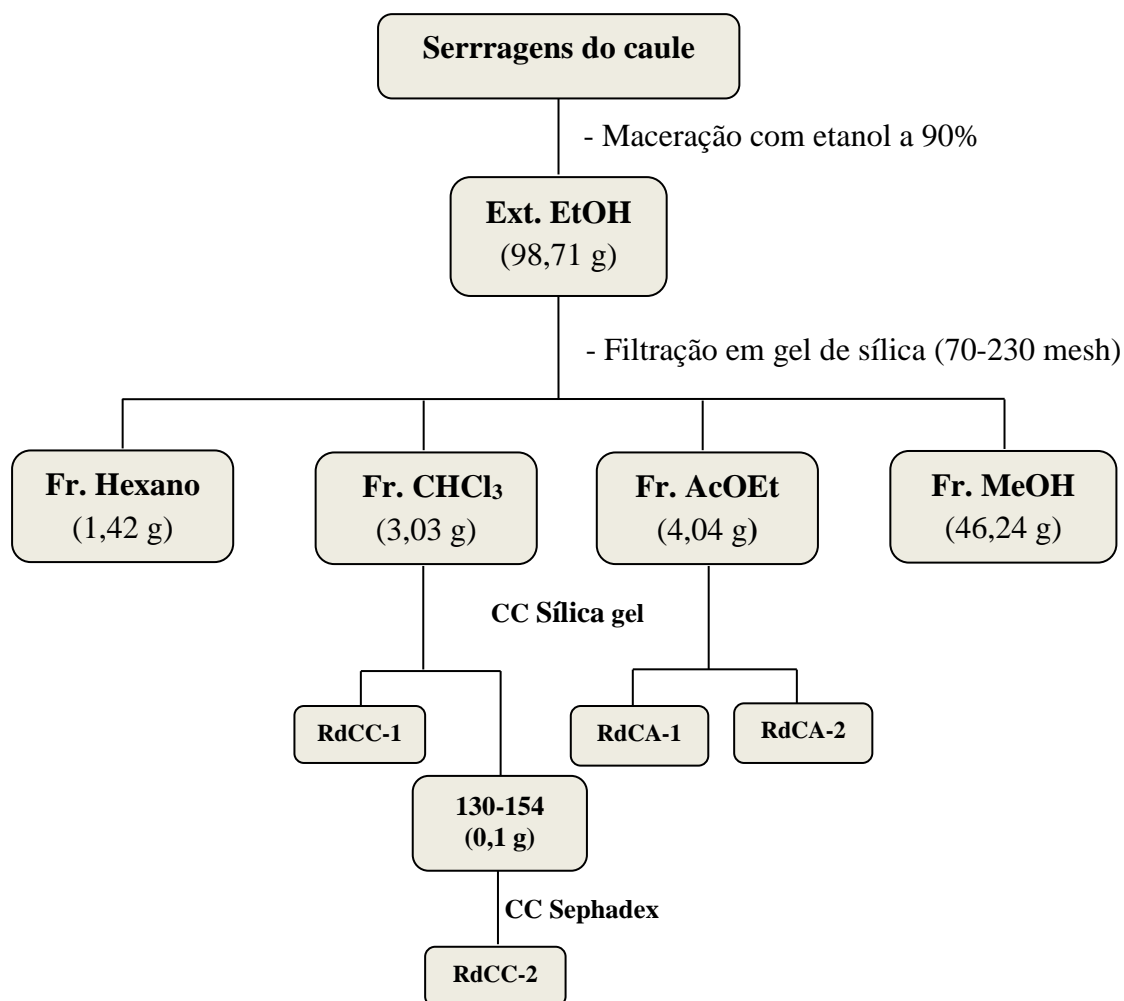


Figura 9. Procedimento experimental efetuado com o caule de *R. doniana*.



4.4 Avaliação do potencial biológico de extratos e frações

4.4.1 Avaliação da atividade larvicida

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

4.4.1.1 Criação e manutenção das larvas e dos insetos adultos

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

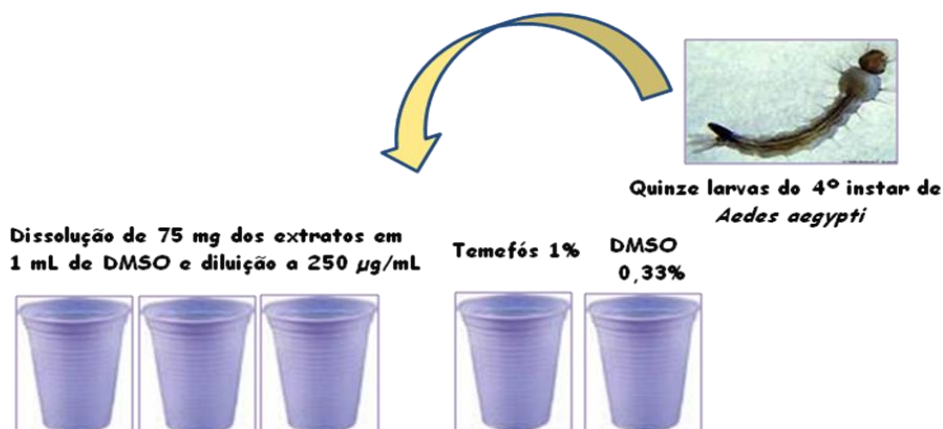
Os ovos de mosquitos, coletados três dias após a realização do repasto sanguíneo, foram colocados em bacias plásticas contendo água destilada, onde ocorreu a eclosão das larvas e seu desenvolvimento nos diferentes estádios (L₁, L₂, L₃, L₄). As larvas foram alimentadas com ração autoclavada para gatos e mantidas em bacias até o desenvolvimento das pupas. Em seguida, com auxílio de pipetas plásticas, as pupas foram manualmente separadas das larvas, acondicionadas em copos descartáveis e colocadas em gaiolas teladas para posterior emergência dos insetos adultos. Estes foram alimentados com solução de glicose anidra a 10%, em chumaços de algodão trocados diariamente. A alimentação sanguínea (repasto sanguíneo) para as fêmeas, visando à maturação dos ovos, foi realizada utilizando pombos da espécie *Columbia livia* (Gmelin, 1789).

4.4.1.2 Ensaio para avaliação da atividade larvicida

Inicialmente, os experimentos foram realizados na concentração de 250 µg/mL. Para tanto, 75 mg de cada amostra foram dissolvidos em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), e em seguida, diluídos em água destilada, obtendo-se um volume total de 300 mL. Esta solução foi distribuída, em três copos descartáveis, onde foram adicionados grupos de quinze larvas do 4º estágio de *A. aegypti*. Como controle negativo, utilizou-se uma solução aquosa de DMSO a 0,33%, e como controle positivo utilizou-se uma solução de temefós reformulado a 1% na concentração de 3 µg/mL (Figura 10, p. 50).

As larvas foram expostas as soluções das amostras e do controle por um período de 48 horas, sendo a leitura do experimento realizada em 24 horas e 48 horas após o início do teste, observando-se o percentual de mortalidade. Aos copos contendo as larvas, adicionou-se 0,005 g de ração para garantir ausência de mortalidade por falta de alimento, evitando uma falsa interpretação da atividade larvicida.

Figura 10. Ilustração do ensaio para avaliação da atividade larvicida.



De acordo com o percentual observado de mortalidade das larvas, as amostras foram classificadas como:

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

4.4.1.3 Análise estatística para avaliação da atividade larvicida

As amostras consideradas promissoras na concentração de 250 µg/mL foram testadas em menores concentrações (200, 150, 100 e 50 µg/mL). Posteriormente, os resultados obtidos para cada concentração foram submetidos ao método Próbitos de análise (FINNEY, 1972) para determinação da CL₅₀ (concentração da amostra, letal para 50% de uma população em estudo) juntamente com o intervalo de confiança de 95% (CI₉₅).

4.4.2 Toxicidade frente *Artemia salina* (TAS)

Os extratos brutos, bem como as frações oriundas de partição ou filtração das folhas e caule de *R. doniana* foram submetidos a ensaios para avaliação da toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Tratamento de Feridas (LTF) com a colaboração da **Prof^a Dr^a Maria Lysete de Assis Bastos**, da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas (ESEN FAR), de acordo com a metodologia descrita por Meyer e cols. (1982) com algumas modificações.

4.4.2.1 Obtenção das larvas de *Artemia salina*

Os ovos (cistos) de *A. salina* foram depositados em um recipiente plástico contendo água do mar e mantidos por 24 horas, sob iluminação artificial (lâmpada de 40W) (Figura 11). Após eclosão, as larvas de primeiro estágio (náuplio) foram transferidas, com o auxílio de uma pipeta automática, para placas de Petri contendo água do mar. Estas larvas foram mantidas por mais 24 horas, sob iluminação artificial, até atingirem o segundo estágio (metanáuplio), ideal para a realização dos ensaios. O recipiente utilizado continha uma divisória, onde o lado no qual os ovos eram depositados foi coberto com uma tampa, ficando o outro lado iluminado para permitir a migração das larvas (fototrópicas). A água do mar utilizada era fresca e filtrada em algodão hidrófilo antes do experimento e foi coletada em praias mais afastadas da cidade, preferencialmente no horário da manhã, em dias de semana e fora dos períodos chuvosos.

Figura 11. Deposição dos ovos de *A. salina* em recipiente contendo água do mar (A) e incubação dos ovos sob iluminação artificial (B).



Fonte: OLIVEIRA, 2010.

Fonte: BASTOS, 2008.

4.4.2.2 Preparo das amostras e dos controles

As amostras foram testadas nas concentrações de 1000, 100, 10 e 1 $\mu\text{g/mL}$. Para tanto, preparou-se uma solução estoque de cada amostra (5000 $\mu\text{g/mL}$), dissolvendo-se 10 mg em 2 mL do solvente apropriado (MeOH ou CHCl_3). Aliquotas de 500, 50 e 5 μL desta solução foram aplicadas no fundo de tubos de ensaios para a obtenção das soluções nas concentrações de 1000, 100 e 10 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Para a obtenção da solução na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, utilizou-se 25 μL de uma solução de 100 $\mu\text{g/mL}$, preparada a partir da solução

estoque. Como controle negativo, aplicou-se 500 µL de cada solvente utilizado na solubilização das amostras no fundo de tubos de ensaio. Como controle positivo, utilizou-se 100 µL de uma solução de Timol 0,01%. Cada concentração das amostras e os controles foram testados em triplicata. Os tubos de ensaio foram colocados em capela de exaustão, para evaporação do solvente.

4.4.2.3 Avaliação da toxicidade

Após secagem das amostras e controles, a cada tubo foram adicionados 2,5 mL de água do mar contendo 10 larvas, e os tubos foram mantidos sob iluminação artificial por 24 horas. A leitura do experimento foi realizada com auxílio de um microscópio estereoscópio (aumento 10X) e de iluminação incandescente, observando-se o número de larvas vivas. Foram consideradas mortas todas as larvas que não apresentavam qualquer movimento ativo em cerca de trinta segundos de observação. Os resultados obtidos para cada concentração foram submetidos ao método Próbitos de análise (FINNEY, 1972) para a determinação dos valores de CL₅₀, com seus respectivos intervalos de confiança de 95% (CI₉₅).

O grau de toxicidade das amostras estudadas foi determinado segundo Déciga-Campos e cols. (2007):

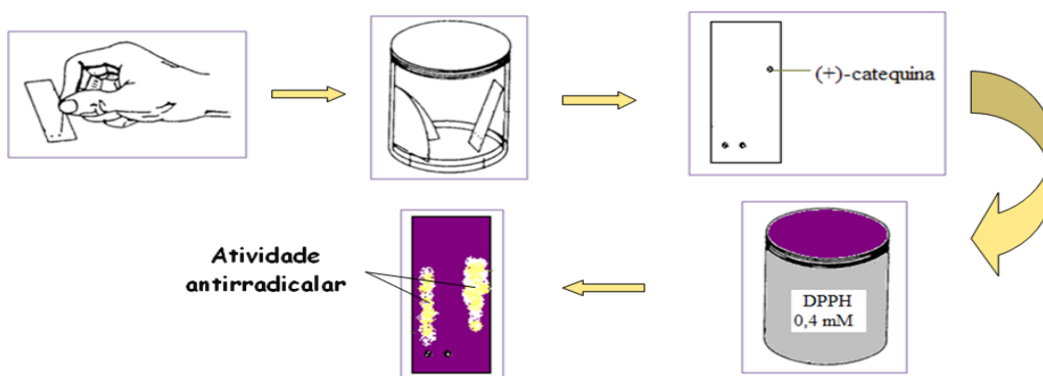
- CL₅₀ ≥ 1000 µg/mL → **atóxica**;
- CL₅₀ ≥ 500 e < 1000 µg/mL → **pouco tóxica**;
- CL₅₀ < 500 µg/mL → **altamente tóxica**.

4.4.3 Avaliação da capacidade sequestradora de radicais livres (DPPH[•])

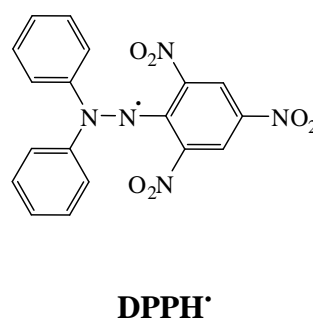
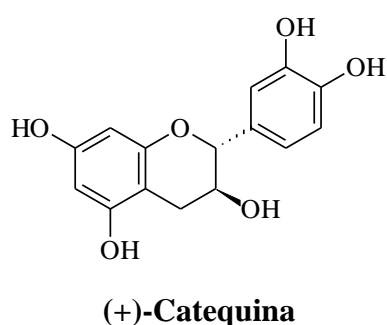
4.4.3.1 Avaliação qualitativa

A avaliação qualitativa da capacidade sequestradora de radicais livres frente ao radical o radical sintético 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]) foi efetuada de acordo com a metodologia descrita por Soler-Rivas e cols. (2000). As amostras foram dissolvidas em solventes apropriados e aplicadas em cromatoplasmas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck), que foram eluídas em sistemas de solventes adequados. Após eliminação do solvente, ao lado das amostras, aplicou-se a (+)-catequina (1 mg/mL em MeOH), como controle positivo. Em seguida, as cromatoplasmas foram submersas, durante 10 segundos, em solução metanólica do radical DPPH[•] (0,4 mM).

Figura 12. Ilustração do ensaio para avaliação qualitativa da atividade antirradicalar.



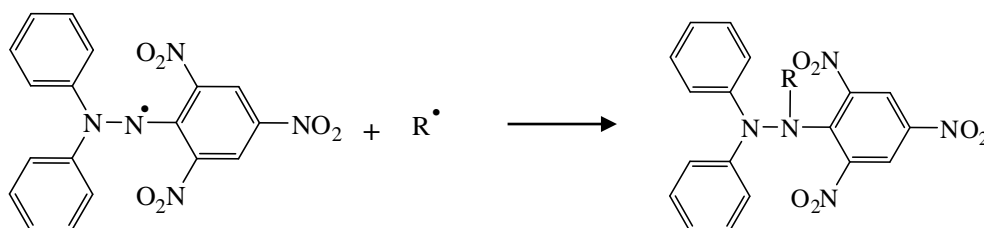
Após secagem dos cromatogramas à temperatura ambiente, o aparecimento de manchas amareladas sob um fundo roxo nas posições dos fatores de retenção (Rf) das substâncias, quando comparado com a (+)-catequina, sugeriu uma possível atividade (Figura 12).



4.4.3.2 Avaliação quantitativa

Os ensaios quantitativos frente ao radical sintético DPPH[•] foram realizados apenas com as amostras que forneceram resultados positivos nos ensaios qualitativos. A metodologia utilizada foi descrita por Brand-Williams e cols. (1995) e Sánchez-Moreno e cols. (1998), na qual a amostra cuja atividade deseja-se avaliar reage com o DPPH[•] em solução metanólica. O DPPH[•] (coloração púrpura) absorve no comprimento de onda de 515 nm; porém, ao ser reduzido por um agente antioxidante (doador de hidrogênio) ou uma espécie radicalar (R[•]) forma-se o difenil-picril-hidrazina (coloração amarela) (Figura 13, p. 54). Assim, o consumo do radical foi monitorado pelo decréscimo da absorbância.

Figura 13. Representação esquemática da reação de redução do DPPH[•].



- **Preparo das soluções e construção da curva de calibração do DPPH[•]**

Inicialmente, preparou-se uma solução estoque de DPPH[•] em MeOH grau espectroscópico (40 µg/mL ou 100 µMol/L), que foi protegida da ação da luz e mantida sob refrigeração até o momento dos testes. A partir desta solução, foram preparadas soluções nas concentrações de 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 1 µg/mL necessárias para a construção da curva de calibração.

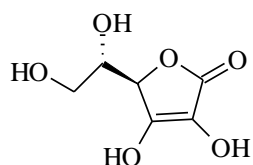
As medidas de absorvância da radiação UV a 515 nm de cada solução do DPPH[•] (1 a 40 µg/mL) foram feitas em espectrofotômetro UV/VIS (modelo Mini-1240, Shimadzu). As medidas foram feitas em triplicata, utilizando-se cubetas de poliestireno com percurso óptico de 1 cm, contendo 1 mL de cada solução. Como branco utilizou-se MeOH grau espectroscópico.

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

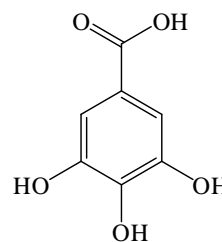
Para avaliação quantitativa da capacidade sequestradora de radical livre frente ao DPPH dos extratos e frações, a solução estoque de DPPH[•] foi preparada várias vezes. Para cada solução estoque foi construída uma curva de calibração, sendo obtidas diferentes medidas de dispersão: os desvios padrão (DP) variaram de 0,0051 a 0,0344 e os coeficientes de correlação (R) variaram entre 0,997 e 0,999.

- **Preparo das amostras**

As amostras e os controles positivos utilizados [ácido ascórbico, ácido gálico e 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (BHT)] foram testados em cinco diferentes concentrações. Foram preparadas soluções estoques na concentração de 200 µg/mL, mediante a dissolução de 2 mg de cada amostra e dos controles em 10 mL de metanol grau espectroscópico. A partir das soluções estoques, foram obtidas soluções nas concentrações de 150, 100, 50 e 25 µg/mL para as amostras e soluções em concentrações que variaram de 150 a 3,12 µg/mL para os controles positivos.



Ácido ascórbico



Ácido gálico

- **Determinação de CI_{50}**

Após obtenção da curva de calibração do DPPH[•], experimentos individuais foram efetuados com cada uma das soluções (25 a 200 µg/mL) das amostras e dos controles (150 a 3,12 µg/mL). Em cubetas de poliestireno, foram preparadas misturas reacionais constituídas por 0,1 mL da solução teste e 0,9 mL da solução estoque de DPPH[•] (40 µg/mL). Estas soluções foram homogeneizadas e protegidas da luz durante todo o experimento. As medidas de absorvância foram feitas a 515 nm, em triplicata e a cada 15 minutos durante 1 hora (tempos 0, 15, 30, 45 e 60 minutos). As absorvâncias das soluções foram registradas contra um branco (MeOH espectroscópico).

Substituindo-se **Y** da equação da curva de calibração do DPPH[•] ($Y = a + b \cdot x$) pela média dos valores de absorvância no tempo de 60 minutos de análise para cada concentração testada, foi possível determinar **x**, correspondente à concentração de DPPH[•] que permanece no meio após reação com as amostras. A percentagem de DPPH[•] remanescente (% DPPH[•]_{REM}) no meio reacional foi obtida conforme fórmula descrita por Sánchez-Moreno e cols. (1998):

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

Onde:

$[\text{DPPH}]_{\text{T=t}}$ = concentração de radical DPPH^{*} no meio após reação com a amostra;

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

Uma nova curva foi obtida a partir das % DPPH^{*}_{REM} *versus* as concentrações testadas (25 a 200 µg/mL, para as amostras; 150 a 3,12 µg/mL, para os controles), através da análise de regressão linear utilizando o programa Microcal OriginPro 7.0. Assim, determinou-se a CI₅₀, concentração de cada amostra necessária para diminuir a concentração do radical DPPH^{*} em 50%. Quanto maior o consumo de DPPH^{*} por uma amostra, menor será a sua CI₅₀ e maior a sua capacidade de sequestrar radicais livres.

- ***Análise estatística da avaliação quantitativa da capacidade sequestradora de radicais livres***

Para cada conjunto de dados foram obtidas as médias (DP) e o coeficiente de variação (CV) como medidas de expressar a variabilidade dos resultados, além do coeficiente de correlação (R) entre as duas variáveis (as concentrações testadas, como variável independente; e os percentuais de DPPH^{*}_{REM} para cada concentração, como variável dependente). Para averiguar se as diferenças entre as médias obtidas foram casuais ou significativas utilizou-se o teste Tukey aplicando-se análise de variância (ANOVA), assumindo a probabilidade de erro ao nível de 5% (P < 0,05).

4.4.4 Determinação do teor de fenóis totais (FT)

A determinação do teor de fenóis totais foi realizada apenas com as amostras que forneceram resultados positivos nos ensaios qualitativos frente ao radical DPPH^{*}, utilizando-se metodologia descrita por Sousa e cols. (2007) e Tung e cols. (2007), com algumas modificações. Neste ensaio, é feita a quantificação dos compostos fenólicos presentes nas amostras por meio de espectroscopia na região do visível utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. Este reagente consiste de mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6⁺ porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados

molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica (SOUSA *et al.*, 2007).

4.4.4.1 Ensaio para a determinação do teor de fenóis totais

Após preparo de uma solução estoque de cada amostra (2 mg/mL em MeOH-H₂O 1:1), alíquotas de 35 µL foram, individualmente, adicionadas a 2,76 mL de água destilada e 175 µL do reagente Folin-Ciocalteu em um tubo de ensaio. As misturas foram homogeneizadas e deixadas em repouso por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 525 µL de uma solução aquosa de Na₂CO₃ a 15% e centrifugou-se (10.000 rpm) durante 10 minutos. Após 1 hora de repouso, sob refrigeração, foi feita a medida da absorbância da radiação UV a 765 nm de cada solução. As medidas foram feitas em espectrofotômetro UV/VIS (modelo Mini-1240, Shimadzu), em triplicata e em cubetas de poliestireno com percurso óptico de 1 cm, contendo 1 mL de cada solução. Como branco utilizou-se uma solução de MeOH-H₂O 1:1 com todos os reagentes, menos a amostra.

Neste ensaio o ácido gálico foi utilizado como padrão. Para tanto, a partir de uma solução estoque de 2000 µg/mL em MeOH-H₂O 1:1, foram preparadas soluções nas concentrações de 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 e 100 µg/mL. Cada solução foi submetida ao mesmo procedimento descrito acima para determinação do teor de fenóis totais das amostras e com os valores médios de absorbância obtidos para estas soluções, foi possível obter uma curva de calibração, através de análise de regressão linear no programa Microcal OriginPro 7.0. Esta análise forneceu a seguinte equação matemática da curva de calibração: $Y = 0,00465 + 0,00101.x$, com coeficiente de correlação (R) de 0,998 e desvio padrão (DP) de 0,03.

O teor de fenóis totais para cada amostra testada foi determinado substituindo-se Y da curva de calibração do ácido gálico pelos valores médios de absorbâncias das amostras. O x da equação corresponde a concentração do ácido gálico, sendo o teor de fenóis totais para as amostras expresso como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por mg de extrato.

4.4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*

Os ensaios antimicrobianos foram realizados no Laboratório de Tratamento de Feridas (LTF), em colaboração com a **Prof^a Dr^a Maria Lysete de Assis Bastos**, da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas.

Inicialmente, os extratos brutos, bem como as frações oriundas de partições ou filtração das folhas e caule de *R. doniana*, foram submetidos a ensaios antimicrobianos utilizando o método de difusão em ágar com disco, descrito por Kirby-Bauer (BASTOS, 2008), frente a oito bactérias [três gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Streptococcus pyogenes*) e cinco gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*)] e um fungo (*Candida albicans*). Posteriormente, as amostras que apresentaram resultados promissores (ativos ou moderadamente ativos) contra algum microrganismo no método de difusão foram submetidas ao teste de microdiluição em caldo, para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), de acordo com metodologia descrita por Ayres e cols. (2008), com algumas modificações.

4.4.5.1 Microrganismos utilizados

Os microrganismos utilizados [*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933) e *Candida albicans* (ATCC 10231)] foram adquiridos das empresas NEWPROV Produtos para Laboratório, Pinhais/PR/Brasil e Cefar Diagnóstica Ltda. São Paulo/SP/Brasil. Todos os microrganismos foram padronizados e distribuídos pelo *American Type Cell Collection* (ATCC, Manassas/VA/USA) e foram mantidos sob refrigeração com temperatura entre 2 a 8 °C até o momento do uso.

4.4.5.2 Meios de Cultivo e Soluções Utilizadas nos Ensaio Antimicrobianos

- **Meios de cultivo: Composição e Preparo**
 - **Brain-Heart Infusion Broth** ou **Caldo Infusão de Cérebro e Coração** (BHIB, HIMEDIA[®]): Meio líquido de enriquecimento altamente nutritivo utilizado na propagação

dos microrganismos (cepas-padrão) utilizados nos testes antimicrobianos. Segundo o fabricante, este meio é composto (g/L): de infusão de cérebro de bezerro (200,0), infusão de coração bovino (250,0), protease peptona (10,00), dextrose (2,0), cloreto de sódio (5,0) e fosfato dissódico (2,5). O meio foi preparado diluindo-se 37,0 g do pó em um litro de água destilada, sob agitação manual com auxílio de um bastão de vidro. No teste da microdiluição foi utilizado BHIB duplamente concentrado, solubilizando-se 74,0 g do meio em um litro de água destilada. Após completa dissolução, a solução foi esterilizada em autoclave a 121 °C durante 15 minutos, com pH final de $7,4 \pm 0,2$ a 25°C. O meio foi armazenado sob refrigeração a uma temperatura de 2-8 °C, até o momento do uso, quando foi redistribuído em tubos de ensaios (15 x 100 mm) esterilizados, para a ativação do microrganismo.

- **Ágar Mueller-Hinton** (AMH, HIMEDIA[®]): Meio sólido recomendado para a determinação de susceptibilidade de microrganismos para agentes antimicrobianos, que apresenta boa reprodutibilidade e suporta o crescimento da maioria dos microrganismos. Foi utilizado no cultivo das bactérias. Segundo o fabricante, este meio é composto por (g/L): infusão de carne bovina (300,0), Caseína ácida hidrolizada (17,5), Amido (1,5) e Ágar (17,0). O meio foi preparado diluindo-se 38,0 g do pó em um litro de água destilada, sob agitação manual com auxílio de um bastão de vidro. Após completa dissolução, a solução foi esterilizada em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Em seguida, aproximadamente 25 mL do meio, ainda quente (temperatura em torno de 45°C) e homogeneizado, foi distribuído em placas de Petri (9 cm de diâmetro). O pH final foi de $7,3 \pm 0,2$ a 25°C.

- **Agar Sabouraud Dextrose** (ASD, HIMEDIA[®]): Meio sólido recomendado para o cultivo seletivo de bolores e leveduras e também utilizado para o cultivo de bactérias acidúricas. Foi utilizado no cultivo do fungo *C. albicans*. Segundo o fabricante, este meio é composto por (g/mL): peptona micológica (10,0), dextrose (40,0) e ágar (15,0). O meio foi preparado diluindo-se 65,0 g do pó em um litro de água destilada, sob agitação manual com auxílio de um bastão de vidro. Após completa dissolução, a solução foi esterilizada em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Em seguida, aproximadamente 25 mL do meio, ainda quente (temperatura em torno de 45°C) e homogeneizado, foi distribuído em placas de Petri (9 cm de diâmetro). O pH final foi de $5,6 \pm 0,2$ a 25°C.

- **Soluções**

- **Salina Tamponada:** Utilizada para diluir o inóculo visando obter o equivalente a $1,5 \times 10^6$ Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL. Esta solução foi preparada utilizando os sais: Cloreto de sódio (5,61 g), cloreto de potássio (0,11 g), fosfato de potássio monobásico (1,0 g) e fosfato dibásico de sódio (2,0 g). Sob agitação manual com auxílio de um bastão de vidro, todos os componentes foram dissolvidos em 1 litro de água destilada. Após completa dissolução, a solução foi transferida para um erlenmeyer, o qual foi vedado com rolha de algodão com gaze protegida com papel alumínio. Após esterilização em autoclave a 121°C durante 15 minutos e ajuste do pH ($7,4 \pm 0,2$ a 25°C), armazenou-se em refrigerador a uma temperatura de $2-8^\circ\text{C}$, até o momento do uso. Posteriormente, a cada bateria de testes a solução foi redistribuída em erlenmeyer de 50 mL e, novamente esterilizada, para receber os inóculos ativos. A turbidez desta suspensão foi comparada com a turbidez do tubo 5 da Escala de MacFarland ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL), obtendo-se assim, a suspensão microbiana para semeadura das placas testes (BASTOS, 2008).

- **Solução de Sulfato de Bário da Escala de MacFarland:** Foram utilizadas soluções padrão de turbidez de sulfato de bário (BaSO_4), denominada Escala de MacFarland (Figura 14, p. 61). Esta escala é utilizada para padronização da densidade do inóculo dos microrganismos para testes *in vitro*, e ajuste do número de UFC/mL. A escala foi preparada adicionando-se em 10 tubos de ensaio, sequencialmente, quantidades crescentes de solução de cloreto de bário (BaCl_2) 1% (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0 mL). Em seguida, a cada tubo foi adicionado quantidade suficiente de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1% para completar 10 mL. Considera-se que as densidades resultantes correspondem respectivamente a:

Tubo 1 – $1,5 \times 10^5$ UFC/mL

Tubo 2 – $3,0 \times 10^5$ UFC/mL

Tubo 3 – $6,0 \times 10^5$ UFC/mL

Tubo 4 – $9,0 \times 10^5$ UFC/mL

Tubo 5 - $1,5 \times 10^6$ UFC/mL

Tubo 6 – $3,0 \times 10^6$ UFC/mL

Tubo 7 – $6,0 \times 10^6$ UFC/mL

Tubo 8 – $9,0 \times 10^6$ UFC/mL

Tubo 9 – $1,5 \times 10^7$ UFC/mL

Tubo 10 – $3,0 \times 10^7$ UFC/mL

Para o presente estudo selecionou-se o tubo nº 5, que corresponde a $1,5 \times 10^6$ UFC/mL na escala de MacFarland (BASTOS, 2008).

Figura 14. Escala de MacFarland. Destaque do tubo 5, equivalente a $1,5 \times 10^6$ UFC/mL.



Fonte: OLIVEIRA, 2010.

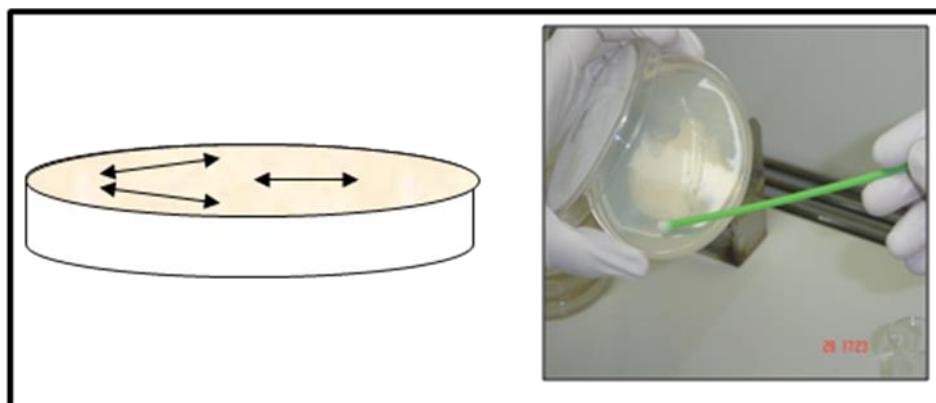
4.4.5.3 Ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*

- **Ativação dos microorganismos e preparo do inóculo**

Os microrganismos (cepas-padrão) foram ativados em meio líquido de enriquecimento (BHIB). Utilizando-se uma pinça flambada e resfriada, um disco ou um pouco do concentrado de cada microrganismo, individualmente, foi colocado em um tubo de ensaio contendo cerca de três mL de BHIB. Os tubos de ensaios foram incubados em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas (bactérias) e a 28°C por 48 horas (fungo). Em seguida, com o auxílio de uma alça de platina, os microrganismos foram semeados em placas de Petri com os meios de cultivo AMH (bactérias) e ASD (fungo) e incubados em estufa bacteriológica a 35°C por mais 24 horas (bactérias) e a 28°C por mais 48 horas (fungo).

Após crescimento dos microrganismos em meio sólido, preparou-se uma suspensão de cada microrganismo em solução salina tamponada. A turbidez da suspensão foi comparada com a turbidez do tubo 5 da escala de MacFarland, que corresponde a $1,5 \times 10^6$ UFC/mL. Após ajuste, foi obtido o inóculo utilizado nos ensaios. O inóculo foi distribuído, com auxílio de um *swab* de algodão estéril, em placas de Petri previamente preparadas com meios de cultivo AMH (bactérias) e ASD (fungo) (Figura 15, p. 62). Para retirar o excesso de material, o *swab* foi pressionado acima contra a parede interna do tubo contendo o inóculo. As placas foram semeadas esfregando-se o *swab* por toda a superfície do ágar. Com o objetivo de assegurar a distribuição uniforme do microrganismo, o procedimento foi repetido três vezes girando a placa aproximadamente 60° a cada vez. Todo procedimento foi feito assepticamente em capela de fluxo laminar.

Figura 15. Distribuição do inóculo dos microrganismos na placa de Petri.



Fonte: BASTOS, 2008.

- ***Preparo das amostras***

Foram preparadas soluções estoque de cada amostra na concentração de 5000 $\mu\text{g/mL}$ dissolvendo-se a amostras em MeOH ou CHCl_3 , de acordo com sua polaridade. Discos estéreis de papel filtro Whatman[®] n^o 1, com 6 mm de diâmetro, foram distribuídos em microplacas de poliestireno estéreis de 96 orifícios, e impregnados com 20 μL da solução estoque das amostras. Assim, as amostras foram testadas na concentração de 1000 $\mu\text{g}/\text{disco}$. Após secagem em capela de fluxo laminar, à temperatura ambiente, os discos contendo as amostras foram mantidos sob refrigeração (2 a 8°C) até o momento do uso.

- ***Controles positivos e negativos utilizados***

Discos padronizados para antibiograma (6 mm de diâmetro) (Figura 16 A, p. 63), foram utilizados como controle positivo nos ensaios com as bactérias: Gentamicina 10 $\mu\text{g}/\text{disco}$ (*S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. mirabilis*); Ciprofloxacina 5 $\mu\text{g}/\text{disco}$ (*P. aeruginosa*, *E. coli* e *K. pneumoniae*); Penicilina 10 $\mu\text{g}/\text{disco}$ (*S. pyogenes*) e Ceftriaxona 30 $\mu\text{g}/\text{disco}$ (*S. typhimurium*). Como controle positivo do fungo *C. albicans*, foram utilizados discos confeccionados artesanalmente, impregnados com 20 μL de uma suspensão de miconazol 2500 $\mu\text{g/mL}$ (50 $\mu\text{g}/\text{disco}$). Em todos os ensaios, também foi utilizado um controle negativo confeccionado artesanalmente, onde discos foram impregnados com os solventes utilizados na solubilização das amostras (MeOH e CHCl_3). Todos os discos foram mantidos sob refrigeração (2 e 8°C) até o momento do uso.

- **Método de Kirby-Bauer**

Os experimentos foram realizados em triplicata, de acordo com o método de difusão em ágar com disco descrito por Kirby-Bauer (BASTOS, 2008). Os três discos das amostras, um disco de controle positivo e outro de controle negativo foram colocados, com auxílio de uma pinça em condições assépticas, na superfície do meio de cultivo em placas de Petri previamente semeadas com o microrganismo teste ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL) (Figura 16 B). Após aplicação, os discos foram levemente pressionados, para garantir a fixação na superfície do meio e possibilitar uma difusão uniforme do material neles contidos. Em seguida, as placas foram invertidas e incubadas a 35°C durante 24 horas (bactérias) e a 28°C durante 48 horas (fungo).

Figura 16. Discos de antibiograma (A) e distribuição dos discos impregnados em placa de Petri (B).



Fonte: BASTOS, 2008.

- **Leitura das placas e interpretação dos resultados**

A avaliação da atividade inibitória do crescimento dos microrganismos foi feita com auxílio de um paquímetro, medindo-se o halo de inibição (mm) ao redor dos discos de papel impregnados com as amostras. O halo de inibição de cada amostra, que corresponde à área sem crescimento microbiano detectável a olho nu, foi comparado com os valores médios dos halos obtidos nos controles positivos (gentamicina, penicilina, ceftriaxona, ciprofloxacina e miconazol). A percentagem de inibição do crescimento dos microrganismos foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{\text{Média do halo de inibição da amostra}}{\text{Média do halo de inibição do controle}} \times 100$$

Para avaliação da atividade antimicrobiana das amostras testadas, utilizaram-se como base os critérios adotados por Caceres e cols. (1998):

- Halo de inibição $\geq 75\%$ → ativa;
- Halo de inibição $\geq 25\%$ e $< 75\%$ → moderadamente ativa;
- Halo de inibição $< 25\%$ → pouco ativa.

As amostras classificadas como ativas foram submetidas à técnica da microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

- ***Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)***

A concentração inibitória mínima (CIM) é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de impedir o crescimento visível de um microrganismo em testes de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo (NCCLS, 2003).

O ensaio de determinação da concentração inibitória mínima (adaptado de AYRES *et al.*, 2008) foi realizado utilizando-se a técnica de microdiluição em placas estéreis de 96 poços com fundo chato, que contêm 12 colunas (1 a 12) e 8 linhas (A a H). Para tanto, preparou-se uma solução estoque das amostras extrato na concentração de 4400 $\mu\text{g/mL}$, mediante a solubilização de 4,4 mg em 1 mL de MeOH. As amostras foram testadas em triplicata.

Inicialmente, adicionou-se 100 μL de caldo BHIB (duplamente concentrado) em todos os poços das colunas de 1 a 3 da microplaca. Em seguida, aos três poços da linha A contendo o meio, adicionou-se 100 μL da solução estoque da amostras. Após homogeneização, 100 μL do conteúdo de cada poço foram transferidos para os poços imediatamente abaixo, da linha B. Após homogeneização do conteúdo de cada orifício da linha B, 100 μL deste conteúdo foi transferido para os poços da linha C, repetindo-se este procedimento até a linha H, desprezando-se, após homogeneização, 100 μL do conteúdo dos poços desta linha. Em seguida, adicionou-se em cada poço mais 100 μL do caldo BHIB e 20 μL do inóculo microbiano na concentração de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL. O volume total de cada poço foi de 220 μL e ao final do procedimento foram obtidas concentrações decrescentes do extrato na direção das linhas A a H [1000 $\mu\text{g/mL}$ (linha A), 500 $\mu\text{g/mL}$ (B), 250 $\mu\text{g/mL}$ (C), 125 $\mu\text{g/mL}$ (D), 62,5 $\mu\text{g/mL}$ (E), 31,2 $\mu\text{g/mL}$ (F), 15,6 $\mu\text{g/mL}$ (G) e 7,8 $\mu\text{g/mL}$ (H)].

Foram realizados os testes de controle do experimento: controle de crescimento (CC), controle negativo (CN) e controle positivo (CP). O controle de crescimento consistiu na adição de 150 μL do caldo BHIB, 50 μL de salina e 20 μL do inóculo microbiano,

possibilitando o controle positivo da viabilidade microbiana. No controle negativo, verificou-se a influência do MeOH utilizado na solubilização do extrato, sendo composto por 150 μL do caldo BHIB, 50 μL do MeOH e 20 μL do inóculo microbiano. O controle positivo, por sua vez, consistiu em 150 μL do caldo BHIB, 50 μL de salina, $\frac{1}{4}$ de discos comerciais contendo antimicrobiano e, por fim, 20 μL do inóculo microbiano.

As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas. Decorrido este intervalo de tempo, adicionou-se em cada poço da microplaca (das amostras e dos controles) 20 μL de uma solução aquosa de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5%. A microplaca foi colocada na estufa por mais 3 horas.

O TTC é um reagente comumente utilizado para detecção de metabolismo em células eucarióticas; ele se reduz em presença de H^+ , formando o Trifenil Formazan, que tem cor vermelha (Figura 17). Portanto, o aparecimento da coloração avermelhada indica crescimento microbiano (VENZKE *et al.*, 2008). Assim, a leitura do experimento foi realizada observando-se a menor concentração da amostra, na qual não houve mudança de coloração, ou seja, não houve crescimento microbiano.

Figura 17. Representação esquemática da reação de redução do TTC (VENZKE *et al.*, 2008).

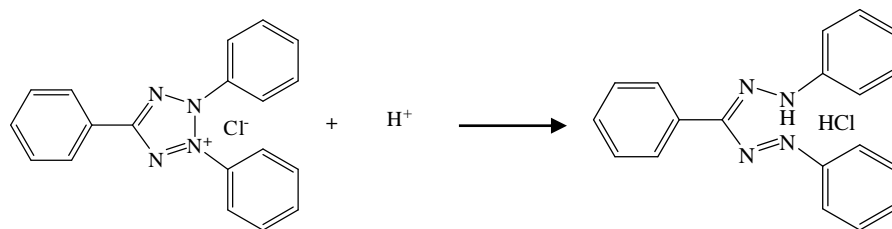
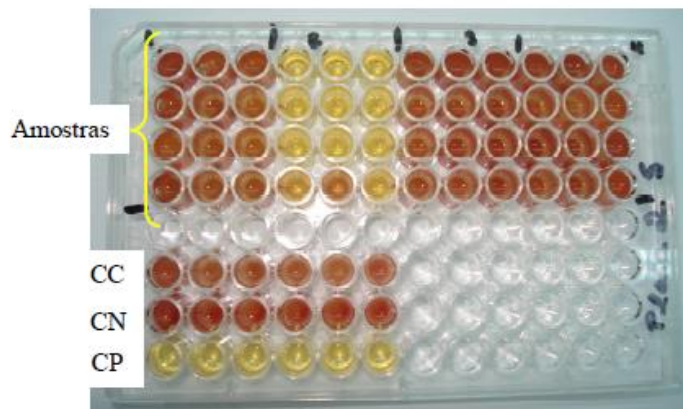


Figura 18. Ilustração do resultado da microdiluição em caldo. CC – controle de crescimento; CN – controle negativo; CP- controle positivo.



4.5 Investigação fitoquímica das frações

4.5.1 Frações resultantes da partição do extrato em EtOH das folhas

4.5.1.1 Fração em hexano

A fração em hexano das folhas (6,27 g) foi fracionada em gel de sílica 60 (70-230 mesh), utilizando-se solventes e misturas de solventes em proporções crescentes de polaridade. Coletou-se um total de 114 subfrações com cerca de 10 mL cada. Estas subfrações foram analisadas através de CCD, utilizando-se diferentes sistemas de eluição e aquelas que apresentaram Rfs semelhantes foram agrupadas. O material das subfrações reunidas 17-21 (0,104 g), procedentes da eluição em hexano foi novamente fracionada em gel de sílica 60 (70-230 mesh), utilizando-se hexano-AcOEt em proporções crescentes de polaridade. Após análise comparativa através de CCD, utilizando-se hexano-AcOEt (98:2) como eluente, as subfrações resultantes foram agrupadas. Os materiais oleosos das subfrações reunidas 12-15 (0,010 g) e 21-22 (0,032 g) apresentaram uma única mancha após revelação em vapores de iodo. Estes materiais foram codificados de **RdFH-1** e **RdFH-2**, respectivamente.

Os materiais das subfrações 29-31 reunidas (0,012 g) e 34-35 (0,066 g), procedentes da eluição em hexano-AcOEt (98:2) da fração em hexano das folhas e constituídos por sólidos brancos com aspecto amorfo, foram codificados de **RdFH-3** e **RdFH-4**, respectivamente.

As demais subfrações não conduziram ao isolamento de substâncias com grau de pureza satisfatório para obtenção dos dados espectrais.

4.5.1.2 Fração em CHCl₃

A fração em CHCl₃ das folhas (4,75 g) foi fracionada em gel de sílica 60 (70-230 mesh), utilizando-se solventes e misturas de solventes em proporções crescentes de polaridade. Foram coletadas um total de 24 subfrações com cerca de 50 mL cada. Estas subfrações foram analisadas através de CCD, utilizando-se diferentes sistemas de eluentes, e aquelas com Rfs semelhantes foram agrupadas.

O material da subfração 4 (0,007 g), procedente da eluição em hexano-CHCl₃ (7:3), constituído por um sólido amarelado com aspecto cristalino foi codificado de **RdFC-1**.

O material da subfração 20 (0,300 g), procedente da eluição em AcOEt-CHCl₃ (8:2), foi submetido a permeação em gel de Sephadex LH-20 com MeOH. Este procedimento conduziu ao isolamento de um sólido branco com aspecto amorfo codificado de **RdFC-2** (0,013 g).

As demais subfrações não conduziram ao isolamento de substâncias com grau de pureza satisfatório para obtenção dos dados espectrais.

4.5.1.3 Fração em AcOEt

A fração em AcOEt das folhas (3,52 g) foi fracionada em gel de sílica 60 (70-230 mesh), utilizando-se solventes e misturas de solventes em proporções crescentes de polaridade. Coletou-se um total de 21 subfrações com cerca de 50 mL cada. Estas subfrações foram analisadas através de CCD, utilizando-se diferentes sistemas de eluentes, e aquelas com Rfs semelhantes foram agrupadas.

Os materiais das subfrações 12 (0,526 g), 13 (0,620 g) e 14 (0,720 g), procedentes da eluição com AcOEt-MeOH (9:1), (8:2) e (7:3), respectivamente, foram individualmente submetidas à filtração em gel (Sephadex LH-20 com MeOH). Após inúmeras tentativas de purificação, através de sucessivos fracionamentos cromatográficos das subfrações resultantes, não se obteve substâncias com quantidade e grau de pureza satisfatório para obtenção dos dados espectrais.

4.5.1.4 Fração em MeOH-H₂O

A fração em MeOH-H₂O das folhas (8,33 g) deverá ser trabalhada, uma vez que apresentou um dos melhores resultados nos ensaios frente ao radical sintético DPPH.

4.5.2 Frações resultantes de filtração do extrato em EtOH do caule

4.5.2.1. Fração em hexano

Parte do material de aspecto oleoso da fração em hexano do caule (1,42 g), com resultado promissor no ensaio larvicida, foi suspenso em solução aquosa de NaOH a 2%, sob agitação em ultrassom durante 2 horas. Após este período, foram efetuadas sucessivas extrações com hexano para obtenção dos constituintes neutros e básicos (0,88 g). A fase aquosa remanescente foi tratada com HCl (pH = 3) e novamente extraída com hexano para obtenção dos componentes de caráter ácido (0,017 g). Por se tratar de um material oleoso, de difícil separação por cromatografia em coluna convencional, a fração neutra/básica deverá ser submetida à análise através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) visando à identificação de alguns dos componentes.

4.5.2.2 Fração em CHCl₃

A fração em CHCl₃ do caule (3,03 g) foi submetida a cromatografia em coluna de gel de sílica 60 (70-230 mesh), utilizando-se solventes e misturas de solventes em proporções crescentes de polaridade. Foram coletadas um total de 174 subfrações com cerca de 5 mL cada. Estas subfrações foram analisadas através de CCD, utilizando-se diferentes sistemas de eluentes, e aquelas com Rfs semelhantes foram agrupadas.

O material das subfrações reunidas 27-33 (0,065 g), proveniente da eluição em hexano-AcOEt (95:5) e constituído por um sólido branco com aspecto amorfo, apresentou apenas uma mancha após revelação em vapores de iodo, sendo codificado como **RdCC-1**.

O material das subfrações reunidas 130-154 (0,100 g) foi permeado em gel de Sephadex LH-20 com MeOH. Este procedimento conduziu ao isolamento de um sólido esverdeado com aspecto amorfo, codificado de **RdCC-2** (0,010 g), de coloração azul fluorescente sob irradiação de luz UV.

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

4.5.2.3 Fração em AcOEt

A fração em AcOEt do caule (4,04 g) foi fracionada em gel de sílica 60 (70-230 mesh), utilizando-se solventes e misturas de solventes em proporções crescentes de polaridade. Foram coletadas um total de 176 subfrações com cerca de 5 mL cada. Estas subfrações foram analisadas através de CCD, utilizando-se diferentes sistemas de eluentes e as que apresentaram Rfs semelhantes foram agrupadas. Os materiais das subfrações reunidas 131-133 (0,013 g) e 138-146 (0,044), procedentes da eluição em AcOEt-hexano (6:4), foram submetidos a sucessivas lavagens com MeOH e este procedimento conduziu ao isolamento de dois sólidos com aspecto amorfo, codificados de **RdCA-1** e **RdCA-2**, respectivamente.

4.5.2.4 Fração em MeOH

A fração em MeOH do caule (46,24 g) deverá ser trabalhada, uma vez que apresentou um dos melhores resultados nos ensaios frente ao radical sintético DPPH.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados dos ensaios larvicidas

A literatura relata vários trabalhos envolvendo a atividade de extratos vegetais contra larvas do *A. aegypti*, no entanto, no que diz respeito ao gênero *Rourea*, não foi encontrado qualquer estudo, exceto o publicado por nosso grupo de pesquisa (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Assim, na busca por um controle químico alternativo contra este vetor, avaliou-se a atividade larvicida de alguns extratos e frações das folhas e caule de *R. doniana*.

Os extratos brutos em EtOH das folhas e do caule, bem como suas frações oriundas de partição e de filtração, respectivamente, foram submetidos à ensaios preliminares, na concentração de 250 µg/mL, para avaliação da atividade larvicida frente larvas do 4º estágio de *A. aegypti*. Neste experimento, somente as frações em hexano do caule e em CHCl₃ das folhas foram consideradas promissoras, pois apresentaram percentuais de mortalidade larval superior a 75% (88,89%). O extrato em EtOH das folhas e sua fração em AcOEt foram considerados fracamente promissores, ambos com 33,33% de mortalidade; enquanto as demais amostras testadas foram inativas, pois o percentual de mortalidade larval foi menor que 25% (0 a 22,22%) (Tabela 1, p. 70). Não foi observada mortalidade nos controles negativos, constituídos por uma solução de DMSO a 0,33%.

As frações em hexano do caule e em CHCl₃ das folhas, consideradas promissoras, foram testadas em cinco diferentes concentrações (250, 200, 150, 100 e 50 µg/mL) e os resultados obtidos permitiram determinar suas CL₅₀, com seus respectivos intervalos de confiança a 95%: CL₅₀ 12,15 µg/mL (IC_{95%} 2,43-20,32 µg/mL) e CL₅₀ 170,83 µg/mL (IC_{95%} 154,5-188,1 µg/mL), respectivamente.

A fração em hexano do caule foi obtida do extrato bruto em EtOH, considerado inativo; enquanto a fração em CHCl₃ das folhas foi obtida do extrato bruto em EtOH, considerado fracamente promissor. Em geral, os extratos brutos apresentam composição química complexa e seus diferentes componentes podem interferir nas atividades uns dos outros. Portanto, os resultados obtidos para esses extratos podem ser justificados por um provável efeito antagonico dos componentes presentes, bem como pela menor concentração dos componentes potencialmente ativos. Nas frações, estes componentes estão mais concentrados, o que justifica a atividade larvicida observada para as frações em hexano do caule e em CHCl₃ das folhas.

Tabela 1. Resultados da avaliação da atividade larvicida dos extratos e frações das folhas e do caule.

Amostras	% Mortalidade (a 250 µg/mL ± DP)^a	CL₅₀ (µg/mL)	IC₉₅ (µg/mL)
<i>Folhas</i>			
Extr. EtOH	33,33 ± 17,63	> 250	-
Fr. Hexano	13,33 ± 6,66	> 250	-
Fr. CHCl ₃	88,89 ± 10,18	170,83	(154,5-188,1)
Fr. AcOEt	33,33 ± 13,33	> 250	-
Fr. MeOH-H ₂ O	0	> 250	-
<i>Caule</i>			
Extr. EtOH	22,22 ± 10,18	> 250	-
Fr. Hexano	88,89 ± 19,2	12,15	(2,43-20,32)
Fr. CHCl ₃	0	> 250	-
Fr. AcOEt	4,44 ± 7,69	> 250	-
Fr. MeOH	20,00 ± 6,67	> 250	-

^aMédia dos resultados obtidos em triplicata; **CL₅₀** – concentração que mata 50% das larvas expostas; **IC₉₅** - intervalo de confiança a 95%.

A fração em hexano do caule apresentou resultado comparável ao inseticida organofosforado temefós [CL₅₀ 8,67 µg/mL (IC_{95%} 7,03-10,26 µg/mL)]. Por se tratar de um material oleoso, de difícil separação por cromatografia em coluna convencional, esta fração será submetida à análise através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM), visando à identificação de alguns dos componentes, cuja avaliação será necessária para identificação do (s) componente (s) ativo (s).

Por sua vez, a fração em CHCl₃ das folhas apresentou CL₅₀ bem superior a do temefós. No entanto, é importante considerar que as frações, assim como os extratos brutos, porém em menor proporção, têm composição química complexa e que a(s) substância(s) ativa(s) pode(m) estar presente(s) em baixa concentração. O estudo fitoquímico desta fração resultou no isolamento dos materiais codificados **RdFC-1** (0,007 g) e **RdFC-2** (0,013 g), que deveriam ser submetidos ao ensaio larvicida, no entanto, a quantidade de material isolado foi insuficiente para a realização deste.

Rahuman e cols. (2008) demonstraram alta atividade larvicida para o extrato em éter de petróleo de *Abutilon indicum*, com valores de CL_{50} de 11,49; 3,58 e 26,67 $\mu\text{g/mL}$, contra o *A. aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus*, respectivamente. A atividade observada foi atribuída à presença do fitoesteróide β -sitosterol. Este composto foi isolado em mistura com outro fitoesteróide [**RdCC-1** (ver item 5.5.1, p. 81)] da fração em CHCl_3 do caule de *R. doniana*; no entanto, a fração não apresentou atividade larvicida na concentração testada (250 $\mu\text{g/mL}$), o que pode ser justificado pela baixa concentração deste composto na fração.

5.2 Resultados da toxicidade frente à *Artemia salina* Leach

A *A. salina* é um microcrustáceo de água salgada utilizado como alimento vivo para peixes, facilmente encontrado em lojas especializadas em aquários, que pode ser utilizado para estimar a toxicidade através da concentração média letal (CL_{50}) (MEYER *et al.*, 1982). Parra e cols. (2001), em seu trabalho sobre métodos de investigação da toxicidade de extratos de plantas, comprovaram que o teste de toxicidade frente *A. salina* (TAS) é tão eficaz quanto o da citotoxicidade aguda em ratos, enfatizando sua importância como um indicador para a condução de experimentos clínicos. O TAS permite a avaliação da toxicidade geral e, portanto é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica.

A Tabela 2 (p. 72) relaciona os extratos brutos e frações oriundas de partição ou de filtração das folhas e caule que foram submetidos à avaliação da toxicidade frente *A. salina*. Pode-se observar que de acordo com a classificação do grau de toxicidade determinado por Déciga-Campos e cols. (2007), das dez amostras testadas, cinco foram consideradas atóxicas ($CL_{50} \geq 1000 \mu\text{g/mL}$) e as demais foram altamente tóxicas ($CL_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$), com valores de CL_{50} que variaram de 36,3 a 190,1 $\mu\text{g/mL}$. Em estudo recente, as frações em hexano, CHCl_3 e em AcOEt obtidas do extrato em EtOH das folhas de *R. induta* e as substâncias isoladas desta espécie (*Hiperina* e *n-Tetracosano*), também foram avaliadas frente a *A. salina* e as amostras testadas foram consideradas atóxicas ($CL_{50} \geq 1000 \mu\text{g/mL}$) (KALEGARI, 2009).

Algumas espécies do gênero *Rourea*, como a *R. orientalis*, *R. volubilis* e *R. glabra*, bem como outras espécies da família Connaraceae (*Cnestis polyphylla*, *C. glabra*, *C. ferruginea* e *Byrsocarpus coccineus*) são conhecidas pela toxicidade e são usadas, entre coisas, na caça de

cães selvagens e coiotes (BRITANNICA, 2010). A toxicidade destas espécies é atribuída à presença de alguns compostos, tais como as cumarinas anticoagulantes, *Dicumarol* e 4-hidroxicumarina (VICKERY & VICKERY, 1980), e de um ácido derivado da L-metionina sulfoximina (*Glabrina*, *Cnestina*) (JEANNODA *et al.*, 1985; MURAKOSHI *et al.*, 1993; GARONA *et al.*, 2007; ISHOLA & ASHOROBI, 2007).

O estudo químico da fração em CHCl₃ das cascas do caule de *Unonopsis lindmanii* (Annonaceae), biomonitorado pelo TAS, resultou, entre outros compostos, no isolamento de uma mistura dos fitoesteróides β -Sitosterol e *Estigmasterol*, que apresentou alta toxicidade [CL₅₀ 74,0 µg/mL (IC₉₅ 58,5-93,8 µg/mL)] (SIQUEIRA *et al.*, 1998). Essa mistura também foi isolada da fração em CHCl₃ do caule de *R. doniana* [RdCC-1 (ver item 5.5.1, p. 81)]; no entanto, a fração foi considerada atóxica, o que pode ser justificado pela pequena concentração da mistura dos fitoesteróides.

Tabela 2. Toxicidade frente à *A. Salina* de extratos e frações das folhas e do caule.

Amostras	CL ₅₀ ^a (µg/mL)	IC ₉₅ (µg/mL)	Grau de toxicidade ^b
Folhas			
Extr. EtOH	190,1	108,5-351,5	Altamente tóxico
Fr. Hexano	> 1000	---	Atóxico
Fr. CHCl ₃	48,6	18,7-136,3	Altamente tóxico
Fr. AcOEt	36,3	20,5-59,3	Altamente tóxico
Fr. MeOH-H ₂ O	> 1000	---	Atóxico
Caule			
Extr. EtOH	71,1	32,0-139,2	Altamente tóxico
Fr. Hexano	> 1000	---	Atóxico
Fr. CHCl ₃	> 1000	---	Atóxico
Fr. AcOEt	> 1000	---	Atóxico
Fr. MeOH	70,7	48,3-100,9	Altamente tóxico
Controles			
Clorofórmio (CN)	--	--	Atóxico
MeOH (CN)	--	--	Atóxico
Timol (CP)	--	--	Altamente tóxico

^aConcentração letal média (calculada através de análise pelo método PROBIT); ^bSegundo Déciga-Campos e cols. (2007); CN – controle negativo; CP – controle positivo.

Os solventes, MeOH e CHCl₃, utilizados na solubilização das amostras não apresentaram influência sobre os resultados, pois não foi observada mortalidade nos controles com estes solventes. Para o controle positivo (Timol), cuja concentração testada é de 0,004 µg/mL, observou-se 100 % de mortalidade. No entanto, Ellis & Baxendale (1997) avaliaram a toxicidade do Timol frente à *A. Salina*, com valor da CL₅₀ igual a 2,9 µg/mL (IC₉₅ 2,3 – 3,3 µg/mL). Segundo estes autores, a atividade artemicida do Timol se deve a sua capacidade de romper a membrana citoplasmática e conseqüentemente levar as larvas de *A. salina* à morte por desidratação.

Tabela 3. Comparação os resultados obtidos nos ensaios larvicida e de toxicidade frente à *A. salina* dos extratos e frações das folhas e caule.

Amostra	<i>Aedes aegypti</i>		<i>Artemia salina</i>	
	CL ₅₀ (µg/mL)	CL ₅₀ (µg/mL)	CL ₅₀ (µg/mL)	Resultados
Folhas				
Ext. EtOH	> 250	190,1		Altamente tóxico
Fr. Hexano	> 250	> 1000		Atóxico
Fr. CHCl ₃	170,83	48,6		Altamente tóxico
Fr. AcOEt	> 250	36,3		Altamente tóxico
Fr. MeOH-H ₂ O	> 250	> 1000		Atóxico
Caule				
Extr. EtOH	> 250	71,1		Altamente tóxico
Fr. Hexano	12,15	> 1000		Atóxico
Fr. CHCl ₃	> 250	> 1000		Atóxico
Fr. AcOEt	> 250	> 1000		Atóxico
Fr. MeOH	> 250	70,7		Altamente tóxico

Vários outros trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *A. salina* com atividades antifúngica, viruscida, antimicrobiana, tripanossomicida e parasiticida. Este bioensaio também tem sido citado na avaliação prévia de extratos de plantas com possível atividade antitumoral e está sendo utilizado para estudo biológico inicial de um grande número de amostras para detecção simultânea de toxicidade e fototoxicidade (MEYER *et al.*, 1982). Assim, os extratos ou substâncias com elevada toxicidade frente a este microcrustáceo devem

ser avaliados quanto ao potencial antitumoral, inseticida ou pesticida. A Tabela 3 relaciona os resultados obtidos nos ensaios larvicida e de toxicidade frente *A. salina* dos extratos brutos e frações das folhas e caule de *R. doniana*.

De acordo com esta tabela pode-se observar que não houve uma boa correlação entre as amostras frente aos dois modelos experimentais. A fração em hexano do caule, que apresentou melhor atividade sobre larvas do *A. aegypti*, foi considerada atóxica contra *A. salina*. Enquanto a fração em CHCl_3 das folhas, embora considerada promissora como larvicida, mas não tanto quanto a fração em hexano do caule, foi altamente tóxica para *A. salina*. Por sua vez, fração em AcOEt das folhas, pouco promissora contra o *A. aegypti*, foi a mais tóxica das amostras testadas.

5.3 Resultados da avaliação da capacidade sequestradora de radicais livres (DPPH) e da determinação de fenóis totais

A avaliação da atividade sequestradora de radicais livres utilizando o radical sintético DPPH é um dos métodos mais usados para avaliar a atividade antioxidante em extratos vegetais e substâncias isoladas. É um método fácil e rápido, no qual os compostos que apresentam potencial para seqüestrar radicais reduzem o DPPH, doando elétrons ou átomos de hidrogênio para o radical livre.

As propriedades antioxidantes, especialmente a de captura de radicais, são muito importantes devido à função deletéria destes nos alimentos e nos sistemas biológicos. Nesse sentido, os extratos brutos e frações das folhas e do caule de *R. doniana* foram submetidos à ensaios preliminares (qualitativos) frente ao DPPH para avaliação da capacidade sequestradora de radicais livres. Dentre os extratos e frações avaliados, com exceção das frações em hexano e em CHCl_3 do caule, todos apresentaram resultados que sugeriram uma possível atividade quando comparadas com o controle positivo utilizado [(+)-catequina]. As amostras com resultados positivos foram, em seguida, submetidas à avaliação quantitativa. Neste ensaio, determinou-se a concentração da amostra necessária para diminuir a concentração inicial do DPPH em 50% (CI_{50}), pois quanto menor CI_{50} de uma amostra, maior é a sua atividade. Então, valores de $\text{CI}_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$ foram considerados promissores. Como padrões positivos foram utilizados o ácido ascórbico ($\text{CI}_{50} 37,37 \pm 3,18$, cinética rápida), ácido gálico ($\text{CI}_{50} 15,29 \pm 4,38$, cinética intermediária) e BHT ($\text{CI}_{50} 82,75 \pm 5,82$, cinética lenta). A Tabela 4 (p. 75) apresenta os resultados da avaliação (qualitativa e quantitativa) da

capacidade sequestradora de radicais livres frente ao DPPH e da determinação do conteúdo de fenóis totais dos extratos brutos e frações das folhas e caule.

Os valores de CI_{50} das amostras testadas variaram de $80,29 \pm 5,60$ a $2.200 \pm 1,64$. Das sete amostras que forneceram resultados positivos nos ensaios qualitativos, cinco foram promissoras nos ensaios quantitativos ($CI_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$). Os melhores resultados foram observados para as frações em AcOEt das folhas ($CI_{50} 80,29 \pm 5,60 \mu\text{g/mL}$) e em MeOH do caule ($CI_{50} 85,19 \pm 7,28 \mu\text{g/mL}$), os quais foram comparáveis aos do BHT ($IC_{50} 82,75 \pm 5,82 \mu\text{g/mL}$). Embora a fração em hexano das folhas tenha apresentado resultado positivo no ensaio qualitativo, a CI_{50} calculada foi muito alta ($2.200,73 \pm 1,64 \mu\text{g/mL}$), indicando ausência de compostos capazes de sequestrar radicais livres.

Tabela 4. Resultados da avaliação da atividade antioxidante (DPPH) e da determinação de fenóis totais (FT) de extratos e frações das folhas e do caule.

Parte da Planta/Amostra	DPPH (Qualitativo)	DPPH CI_{50} ($\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$)	FT (mg EAG/g $\pm \text{DP}$)
Folhas			
Extr. EtOH	+	$239,25 \pm 1,78$	$169,65 \pm 0,001$
Fr. Hexano	+	$2.200,73 \pm 1,64$	$70,64 \pm 0,003$
Fr. CHCl_3	+	$315,53 \pm 5,36$	$195,40 \pm 0,001$
Fr. AcOEt	+	$80,29 \pm 5,60$	$611,24 \pm 5,7\text{E-}4$
Fr. MeOH- H_2O	+	$158,47 \pm 2,18$	$405,30 \pm 5,7\text{E-}4$
Caule			
Extr. EtOH	+	$183,86 \pm 1,23$	$193,42 \pm 0,001$
Fr. Hexano	-	NT	NT
Fr. CHCl_3	-	NT	NT
Fr. AcOEt	+	$179,85 \pm 2,32$	$365,69 \pm 0,010$
Fr. MeOH	+	$85,19 \pm 7,28$	$580,54 \pm 0,003$
Controles positivos			
Ácido ascórbico	+	$37,37 \pm 3,18$	---
Ácido gálico	+	$15,29 \pm 4,38$	---
BHT	+	$82,75 \pm 5,82$	---

EAG = Equivalente de ácido gálico; (-) = negativo; (+) = positivo; NT = não testado.

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro*. A atividade antioxidante desses compostos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química, características que desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOUSA *et al.*, 2007). Nesse sentido, os extratos e frações submetidos à avaliação quantitativa da atividade antirradicalar também foram avaliados quanto ao conteúdo de fenóis totais presentes.

Os resultados obtidos na determinação dos fenóis totais (FT), pelo método Folin-Ciocalteu, foram expressos como equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de amostra (extrato ou fração). As amostras avaliadas apresentaram teores de compostos fenólicos compatíveis com os respectivos valores de CI_{50} . Nas frações em AcOEt das folhas e em MeOH do caule, que apresentaram os menores valores de CI_{50} , foram observados os maiores teores de fenóis totais. Assim, quanto maior a quantidade de compostos fenólicos presentes nas amostras, maior a sua capacidade de seqüestrar radicais livres. A fração em hexano das folhas, por sua vez, apresentou a menor quantidade de fenóis totais.

A avaliação da atividade antioxidante de frações e substâncias isoladas de *R. induta*, pelo método da redução do complexo do fosfomolibdênio e redução do radical DPPH, revelaram grande capacidade antioxidante da espécie, principalmente nas frações em AcOEt, $CHCl_3$ e no flavonóide isolado hiperina (**50**), com potencial antioxidante maior do que a vitamina C, composto padrão utilizado (KALEGARI, 2009). A atividade antioxidante também tem sido descrita para outras espécies da família Connaraceae (OKE & HAMBURGER, 2002; AKINDELE *et al.*, 2010).

Os compostos fenólicos estão largamente distribuídos na natureza, sendo encontrados geralmente em todo o reino vegetal e se dividem em dois grandes grupos: os flavonóides e derivados, os ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas (SOARES, 2002). A fração em $CHCl_3$ do caule não apresentou resultado positivo no ensaio preliminar (qualitativo) frente ao DPPH e, portanto, não foi submetida ao ensaio quantitativo e à determinação do teor de fenóis totais. Desta fração foi isolado o material codificado **RdCC-2** (0,010 g), identificado como sendo uma cumarina (*Escopoletina*) (ver item 5.5.2, p. 89). A CI_{50} determinada para esta cumarina foi de $480,67 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$, valor muito alto quando comparado com os resultados dos controles positivos. O flavonol [**RdFC-1** (ver item 5.5.3, p. 94)], isolado da fração em $CHCl_3$ das folhas ($CI_{50} 315,53 \pm 5,36 \mu\text{g/mL}$), bem como

as demais substâncias isoladas deverão ser submetidas a avaliação da capacidade seqüestradora de radicais livres.

5.4 Resultados da avaliação da atividade antimicrobiana

Com o objetivo de encontrar novas alternativas para o tratamento de infecções causadas por cepas de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Candida albicans*, os extratos brutos e frações das folhas e do caule de *R. doniana* foram submetidos a avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar. Os discos de papel impregnados com amostras (1000 µg/disco) foram distribuídos na superfície de um meio de cultivo específico com o microrganismo inoculado, ocorrendo difusão das substâncias impregnadas nos discos para o meio. A atividade antimicrobiana foi definida pela formação de um halo de inibição ao redor do disco, cujo diâmetro foi comparado com os valores médios dos halos de inibição dos controles positivos utilizados (gentamicina, penicilina, ceftriaxona, ciprofloxacina e miconazol).

Como parâmetro para avaliação da atividade das amostras testadas utilizou-se os valores adotados por Caceres e cols. (1998):

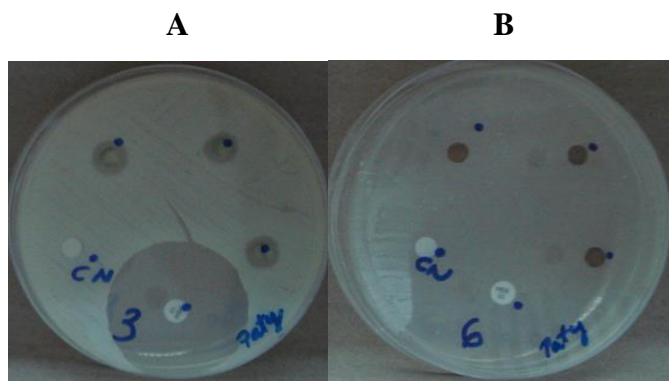
- Halo de inibição ≥ 75 : ativa;
- Halo de inibição ≥ 25 % e < 75 %: moderadamente ativa;
- Halo de inibição < 25 %: pouco ativa.

De acordo com esse critério, dentre as amostras testadas, apenas duas amostras demonstraram alguma atividade sobre os microrganismos selecionados. A fração em CHCl_3 do caule foi considerada pouco ativa, enquanto o extrato bruto em EtOH das folhas foi considerado moderadamente ativo frente à cepa de *S. pyogenes*, com 21,3% e 37,7% de inibição do crescimento da bactéria em relação ao controle positivo utilizado (penicilina 10 µg), respectivamente. As demais amostras testadas foram consideradas inativas frente os demais microrganismos, pois não houve formação de halo de inibição em torno dos discos impregnados.

De uma forma geral, a espécie *R. doniana* demonstrou fraca atividade antimicrobiana. Foi relatada atividade das frações em AcOEt e CHCl_3 e do flavonóide hiperina (**50**) isolado das folhas de *R. induta* contra as bactérias *S. aureus* e *S. epidermidis*. Aplicando-se os critérios adotados por Caceres e cols. (1998) aos resultados obtidos neste estudo, as amostras

avaliadas foram consideradas moderadamente ativas nas concentrações testadas (500 μg e 1000 μg), com percentual de inibição que variou de 25,3 a 40,8 % em relação ao controle positivo utilizado (cloranfenicol). O flavonóide hiperina, na concentração de 500 μg , foi pouco ativo contra *S. epidermidis* (19,0 % inibição; cloranfenicol) (KALEGARI, 2009).

Figura 19. Resultado do teste de difusão em ágar frente à cepa *S. pyogenes* da fração em CHCl_3 do caule (A) e do extrato bruto em EtOH das folhas (B).



A fração em CHCl_3 do caule e o extrato bruto em EtOH das folhas foram submetidos a técnica da microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). A avaliação da atividade antimicrobiana foi feita de acordo com os valores de CIM descritos por Holetz e cols. (2002):

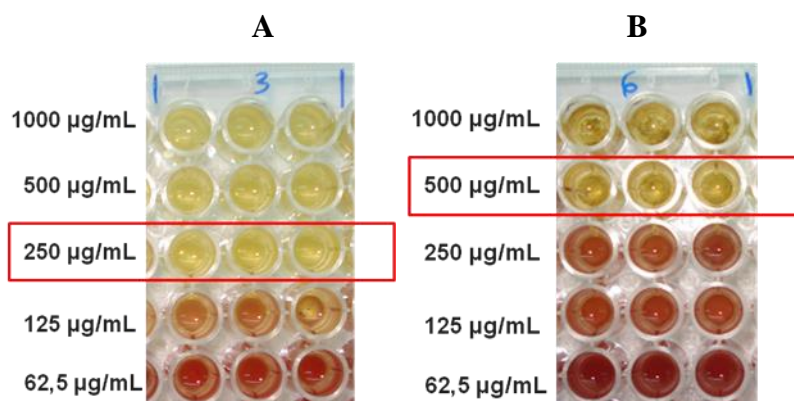
- CIM < 100 $\mu\text{g/mL}$: Ativo;
- CIM $\geq 100 < 500$ $\mu\text{g/mL}$: Moderadamente ativo;
- CIM $\geq 500 < 1000$ $\mu\text{g/mL}$: Pouco ativo;
- CIM ≥ 1000 $\mu\text{g/mL}$: Inativo.

Desse modo, a fração em CHCl_3 do caule foi moderadamente ativa (CIM 250 $\mu\text{g/mL}$), enquanto o extrato bruto em EtOH das folhas foi pouco ativo (CIM 500 $\mu\text{g/mL}$) contra *S. pyogenes* (Figura 20, p. 79).

Segundo o documento do NCCLS (2003), a CIM não representa um valor *absoluto*, e a “verdadeira” CIM está num ponto entre a menor concentração do teste que inibe o crescimento do organismo (ou seja, a leitura da CIM) e a próxima menor concentração do teste. Assim, para a fração em CHCl_3 do caule a “verdadeira” CIM estará entre 250 e 125 $\mu\text{g/mL}$, enquanto para o extrato bruto em EtOH das folhas a CIM estará entre 500 e 250 $\mu\text{g/mL}$. Por esse motivo, quando há inibição do crescimento na menor concentração testada, o verdadeiro valor da CIM não

pode ser determinado com precisão e deve ser relatado como igual a ou menor que a menor concentração testada.

Figura 20. Determinação da CIM frente à cepa *S. pyogenes* da fração em CHCl₃ do caule (A) e do extrato bruto em EtOH das folhas (B).



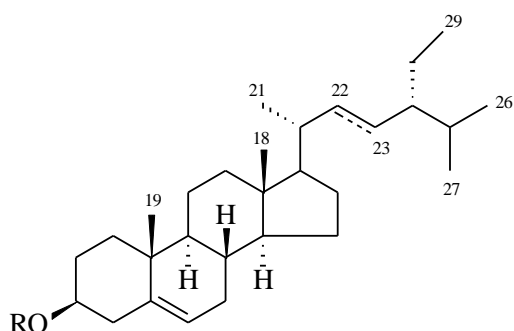
A tabela 5 relaciona os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana (CIM) da fração em CHCl₃ do caule e o extrato bruto em EtOH das folhas com a toxicidade destas amostras frente à *A. salina*. Alguns autores tentam correlacionar os resultados desses dois ensaios (amostra tóxica frente à *A. salina* deve apresentar atividade antimicrobiana). No entanto, esta correlação nem sempre é observada. Ramos e cols. (2009), por exemplo, avaliando a atividade antimicrobiana e toxicidade frente à *A. salina* de extratos de *Muntingia calabura*, observaram que o extrato hexânico das flores foi tóxico e apresentou atividade contra *B. subtilis*, enquanto o extrato em EtOH das folhas não apresentou toxicidade, mas inibiu o crescimento *in vitro* de *S. aureus* e *Bacillus subtilis*. Outros autores consideram a ausência de toxicidade, indispensável para uso seguro, elegendo as amostras atóxicas à condição de promissoras, com potencial antimicrobiano livre de efeitos adversos (BASTOS, 2008).

Tabela 5. Comparação dos resultados dos ensaios antimicrobianos com a toxicidade frente à *A. salina*.

Amostras	Atividade antimicrobiana	Toxicidade (<i>Artemia salina</i>)
Ext. EtOH das folhas	Pequena	Altamente tóxico
Fr. CHCl ₃ do caule	Moderada	Atóxico

5.5 Resultados do estudo fitoquímico

O estudo fitoquímico efetuado com alguns dos extratos que apresentaram resultados promissores nos ensaios resultou no isolamento de onze substâncias, que foram codificadas de acordo com o nome da espécie [*R. doniana* (**Rd**)], parte da planta (**F** = folhas e **C** = caule) e fração das quais foram isoladas (**A** = AcOEt, **C** = clorofórmio, **H** = hexano). Todos os compostos isolados tiveram suas estruturas identificadas com base na análise dos dados obtidos dos espectros de RMN ^1H e de ^{13}C , incluindo experimento DEPT 135 e técnicas bidimensionais, tais como NOESY, HSQC e HMBC, bem como comparação com dados dos compostos correspondentes descritos na literatura.

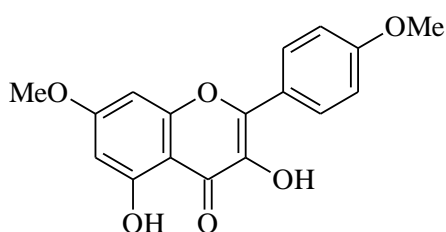


RdCC-1a R = H, Δ^{22} diidro, H-24 α

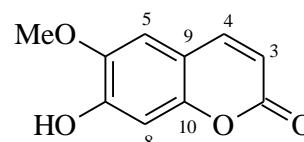
RdCC-1b R = H, Δ^{22}

RdCA-2a R = Glc, Δ^{22} diidro

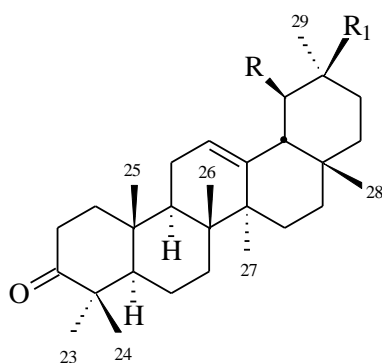
RdCA-2b R = Glc, Δ^{22}



RdFC-1

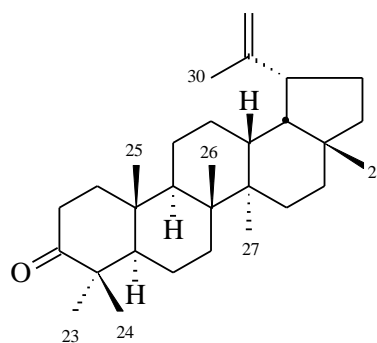


RdCC-2

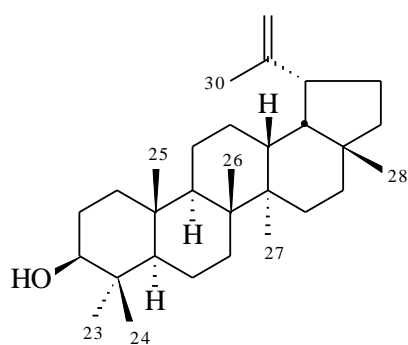
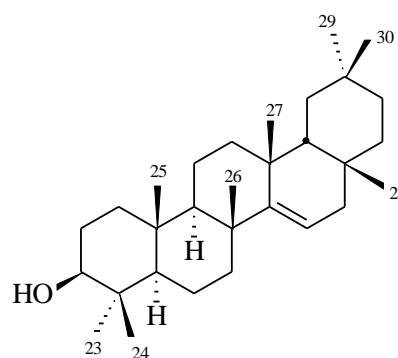


RdFH-2b R = Me, R₁ = H

RdFH-2c R = H, R₁ = Me



RdFH-2a

**RdFH-3a****RdFH-3b**

5.5.1 Identificação estrutural das substâncias codificadas de **RdCC-1a**, **RdCC-1b**, **RdCA-2a** e **RdCA-2b**

As substâncias codificadas de **RdCC-1a** (componente majoritário) e **RdCC-1b** (componente minoritário) e **RdCA-2a** (componente majoritário) e **RdCA-2b** (componente minoritário) foram isoladas duas a duas em mistura. Estas substâncias foram identificadas como sendo fitoesteróides da série estigmastano com base na análise dos dados obtidos dos respectivos espectros de RMN das misturas, bem como pela comparação com dados descritos na literatura.

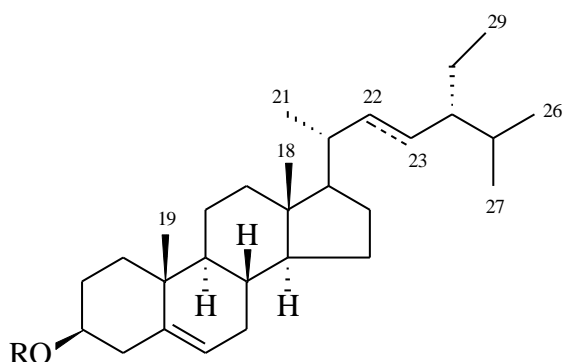
A análise dos dados do espectro de RMN ^1H da mistura de **RdCC-1a** e **RdCC-1b** (Figura 21, p. 85; Tabela 6, p. 83) e de **RdCA-2a** e **RdCA-2b** (Figura 24, p. 87; Tabela 7, p. 84) permitiu reconhecer valores de deslocamentos químicos compatíveis com a presença de hidrogênios carbinólicos [**RdCC-1a** e **RdCC-1b**: δ 3,51 (m, H-3); **RdCA-2a** e **RdCA-2b**: δ 3,95-3,89 (m, H-3)], hidrogênios olefínicos [**RdCC-1a** e **RdCC-1b**: δ 5,35 (sl, H-6) e **RdCC-1b**: δ 5,13 e 5,01 (m, H-22 e H-23); **RdCA-2a** e **RdCA-2b**: δ 5,33 (sl, H-6)] e **RdCA-2b**: δ 5,18 e 5,06 (m, H-22 e H-23)] e para vários grupos metilas (**RdCC-1a** e **RdCC-1b**: δ 0,67 a δ 1,02; **RdCA-2a** e **RdCA-2b**: δ 0,63 a δ 0,97). Estes dados permitiram sugerir para os quatro componentes esqueletos de fitoesteróides. Adicionalmente, foram observados no espectro de **RdCA-2a** e **RdCA-2b** sinais para uma unidade glicopiranosídica (Tabela 7, p. 84), cujo valor da constante de acoplamento do hidrogênio anomérico ($J = 7,7$ Hz), sugeriu uma unidade do tipo 3-O- β -D-glicopiranosídica.

A análise conjunta dos dados obtidos dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135 da mistura de **RdCC-1a** e **RdCC-1b** (Figuras 22 e 23, p. 86; Tabela 6, p. 83) e de **RdCA-2a** e **RdCA-2b**

[Figuras 25 (p. 88) e 26 (p. 89); Tabela 7, p. 84] revelou para os quatro componentes valores de deslocamentos químicos coerentes com a presença de carbono carbinólico [**RdCC-1a** e **RdCC-1b**: δ 71,78 (CH); **RdCA-2a** e **RdCA-2b**: δ 77,84 (CH)], de carbonos olefínicos para uma ligação dupla trissubstituída [**RdCC-1a** e **RdCC-1b**: δ 140,72 (C, C-5) e δ 121,70 (CH, C-6); **RdCA-2a** e **RdCA-2b**: δ 121,70 (CH, C-6) e 140,66 (C, C-5)] e de uma dissubstituída [**RdCC-1a**: δ 138,31 (CH, C-22) e δ 129,24 (CH, C-23); **RdCA-2b**: δ 138,64 (CH, C-22) e δ 129,21 (CH, C-23)], compatíveis com ligações duplas entre C-5/C-6 e/ou C-22/C-23 de um núcleo estigmastano. Adicionalmente, foram observados no espectro da mistura de **RdCA-2a** e **RdCA-2b** sinais para uma unidade 3-O- β -D-glicopiranosídica.

A análise conjunta dos dados espectrais discutidos permitiu identificar **RdCC-1a** e **RdCC-1b**, respectivamente, como sendo os fitoesteróides conhecidos como sitosterol (*estimasta-5-en-3 β -ol*) e estigmasterol (*5,22-estimastadien-3 β -ol*) e **RdCA-2a** e **RdCA-2b** como sendo o 3-O- β -D-glicopiranosil-sitosterol e 3-O- β -D-glicopiranosil-estigmasterol, respectivamente. Estas propostas estruturais foram confirmadas pela comparação dos dados de RMN ^{13}C obtidos com os dos compostos correspondentes descritos na literatura.

A comparação dos dados espectrais obtidos com os descritos na literatura permitiu a distinção entre **RdCC-1a** (*Sitosterol*) e o *Clionasterol* (WRIGHT *et al.*, 1978), uma vez que a única diferença entre ambos consiste na configuração em C-24 (Tabela 6, p. 83).



RdCC-1a R = H, Δ^{22} diidro, H-24 α

RdCC-1b R = H, Δ^{22}

RdCA-2a R = Glc, Δ^{22} diidro

RdCA-2b R = Glc, Δ^{22}

Clionasterol R = H, Δ^{22} diidro, H-24 β

Tabela 6. Dados de RMN das substâncias **RdCC-1a** e **RdCC-1b** (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, δ , J em Hz), do **β -Sitosterol** (MACARI *et al.*, 1990) e **Estigmasterol** (^{13}C : 50 MHz, CDCl_3 , δ) (MARQUES, 2001) e **Clionasterol** (WRIGHT *et al.*, 1978).

Posição	RdCC-1a		RdCC-1b		β -Sitosterol	Clionasterol	Estigmasterol
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
1	37,22		37,22		37,33	37,30	37,25
2	31,60		31,60		31,63	31,60	31,64
3	71,78	3,51 m	71,78	3,51 m	71,73	71,70	71,78
4	42,25		39,74		42,20	42,30	39,77
5	140,7		140,7		140,71	140,80	140,75
	2		2				
6	121,7	5,35 (sl)	121,7	5,35 (sl)	121,63	121,60	121,68
	0		0				
7	31,89		31,60		31,96	31,90	31,64
8	31,86		31,86		31,81	31,90	31,90
9	50,09		50,09		51,13	50,20	50,16
10	37,22		36,48		36,43	36,50	36,50
11	21,06		21,06		21,09	21,10	21,08
12	39,74		39,65		39,79	39,80	39,77
13	42,29		42,18		42,37	42,30	42,21
14	56,83		56,73		56,75	56,80	56,77
15	24,34		24,28		24,15	24,30	24,29
16	28,92		28,23		28,25	28,30	28,23
17	56,01		55,90		56,17	56,10	56,06
18	11,96	0,68 s	11,84	0,67 s	11,84	11,90	11,84
19	19,81	0,81 s	18,76	0,81 s	19,46	19,40	19,03
20	36,13		40,50		36,07	36,10	40,46
21	18,96	0,99 (<i>d</i> , $J = 7,5$)	21,20	1,02 s	18,97	18,20	21,20
22	33,90		138,3	5,13 m	33,95	34,00	138,29
			1				
23	26,00		129,2	5,01 m	26,10	26,40	129,28
			4				
24	45,78		51,21		45,82	46,10	51,22
25	29,07		31,86		29,15	29,00	31,90
26	19,38	0,90 (<i>d</i> , $J = 6,5$)	21,20	0,92 (<i>d</i> , $J = 6,5$)	19,77	19,10	21,20
27	19,01	0,83 (<i>d</i> , $J = 6,7$)	18,76	0,85 (<i>d</i> , $J = 6,7$)	19,21	-	18,77
28	23,03		25,40		23,13	23,10	25,39
29	12,25	0,81 (<i>t</i> , $J = 7,8$)	12,25	0,81 (<i>t</i> , $J = 7,8$)	11,04	12,30	12,22

^a Natureza dos carbonos definida com auxílio do espectro DEPT.

Tabela 7. Dados de RMN das substâncias **RdCA-2a** e **RdCA-2b** (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ , J em Hz), do **3-O- β -D-Glicopiranosil Sitosterol** ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$; BAYOUMI *et al.*, 2010) e do **Estigmasterol**.

Posição	RdCA-2a		RdCA-2b		3-O- β -D-Glc-Sitosterol	Estigmasterol
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
1	37,25		37,25		37,5	37,25
2	29,99		31,60		30,2	31,64
3	77,84	3,95-3,89 m	77,84	3,95-3,89 m	78,1	71,78
4	39,07		39,60		39,5	39,77
5	140,66		140,6		140,9	140,75
6	121,70	5,33 (sl)	121,7	5,33 (sl)	121,9	121,68
7	31,91		31,84		32,2	31,64
8	31,80		31,96		32,0	31,90
9	50,10		50,10		50,3	50,16
10	36,68		36,68		36,9	36,50
11	21,12		21,28		21,3	21,08
12	39,72		39,60		39,9	39,77
13	42,25		42,11		42,5	42,21
14	56,60		56,70		56,8	56,77
15	24,28		24,28		24,5	24,29
16	29,77		29,71		28,5	28,23
17	56,00		55,82		56,2	56,06
18	11,75	0,63 s	11,94	0,65 s	12,0	11,84
19	19,20	0,90 s	18,98	0,81-0,90 s	19,2	19,03
20	36,18		40,61		36,4	40,46
21	18,79	0,97 (<i>d</i> , $J=6,6$)	21,12	1,06 s	19,0	21,20
22	33,94		138,6	5,18 m	34,2	138,29
23	26,07		129,2	5,06 m	26,4	129,28
24	45,79		51,21		46,0	51,22
25	29,18		31,96		29,4	31,90
26	19,78	0,83-0,87 m	21,28	0,81-0,89 m	20,0	21,20
27	18,97	0,83-0,87 m	18,98	0,81-0,90 m	19,4	18,77
28	23,13		25,51		23,4	25,39
29	11,92	0,83-0,87 m	12,34	0,81-0,90 m	12,1	12,22

Continua

1'	102,31	5,03	102,3	5,03	102,6
2'	75,06	(<i>d</i> , <i>J</i> = 7,7)	1	(<i>d</i> , <i>J</i> = 7,7)	75,3
3'	78,33	4,03 (<i>t</i> , <i>J</i> = 8)	75,06	4,03 (<i>t</i> , <i>J</i> = 8)	78,6
4'	71,38	4,27 <i>m</i>	78,33	4,27 <i>m</i>	71,7
5'	78,23	4,27 <i>m</i>	71,38	4,27 <i>m</i>	78,5
6 a'	62,55	3,95-3,89 <i>m</i>	78,23	3,95-3,89 <i>m</i>	62,8
6 b'	62,55	4,55	62,55	4,55	
		(<i>dd</i> , <i>J</i> = 12 e 2)	62,55	(<i>dd</i> , <i>J</i> = 12 e 2)	
		4,40		4,40	
		(<i>dd</i> , <i>J</i> = 12; 5)		(<i>dd</i> , <i>J</i> = 12 e 5)	

Figura 21. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) das substâncias **RdCC-1a** e **RdCC-1b**.

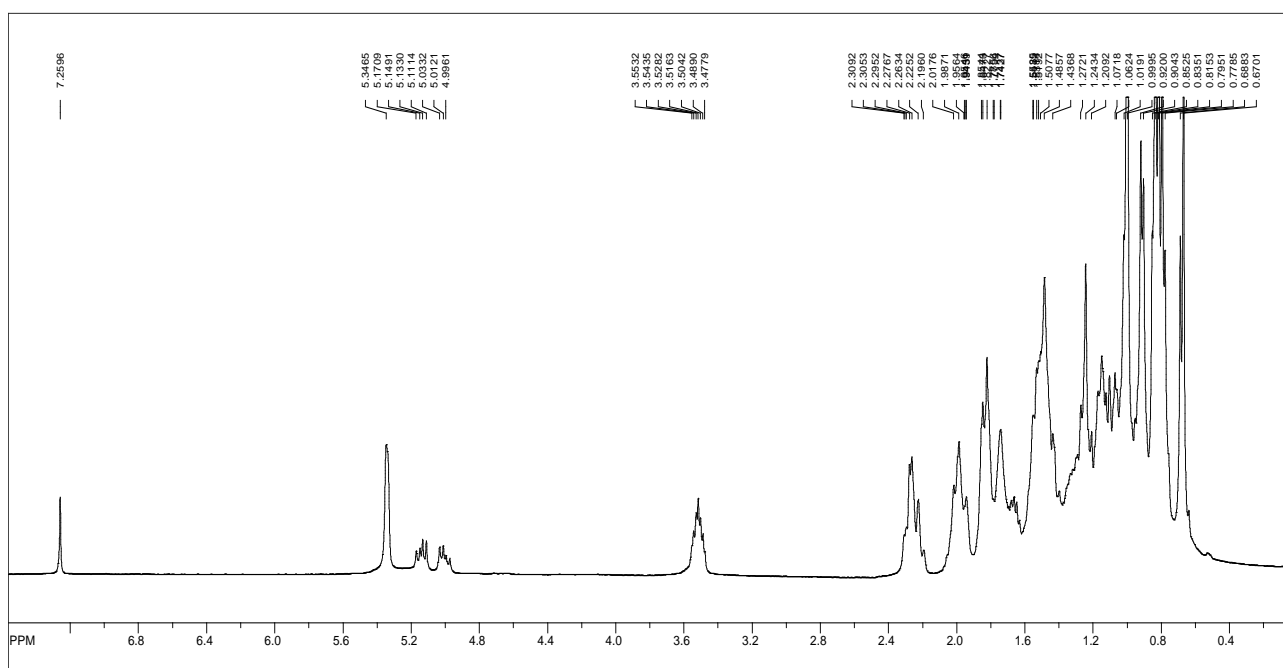


Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) das substâncias **RdCC-1a** e **RdCC-1b**.

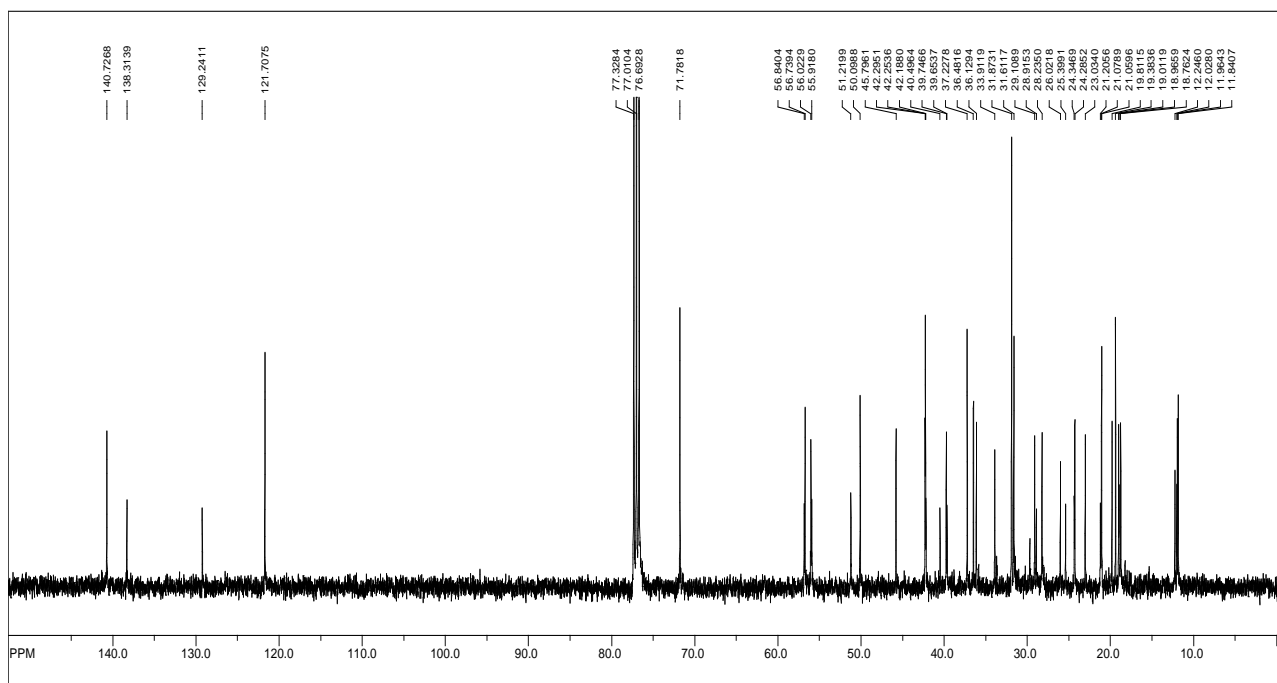


Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) das substâncias **RdCC-1a** e **RdCC-1b**.

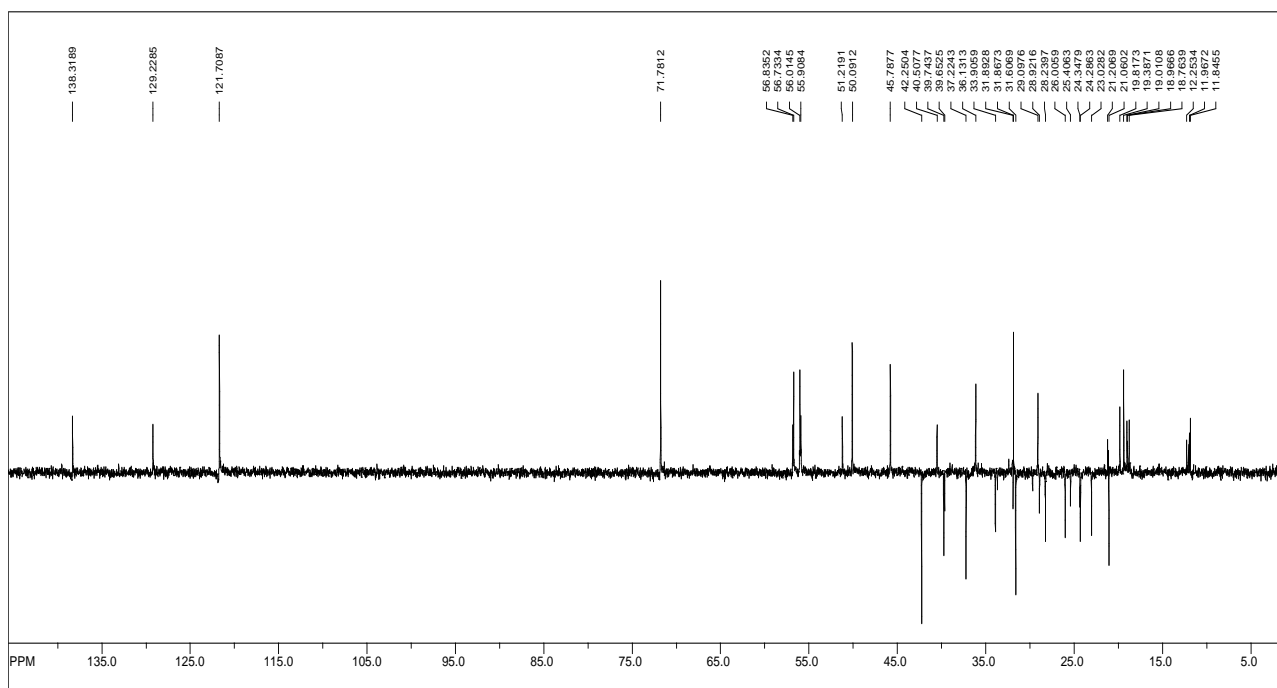


Figura 24. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) das substâncias **RdCA-2a** e **RdCA-2b**.

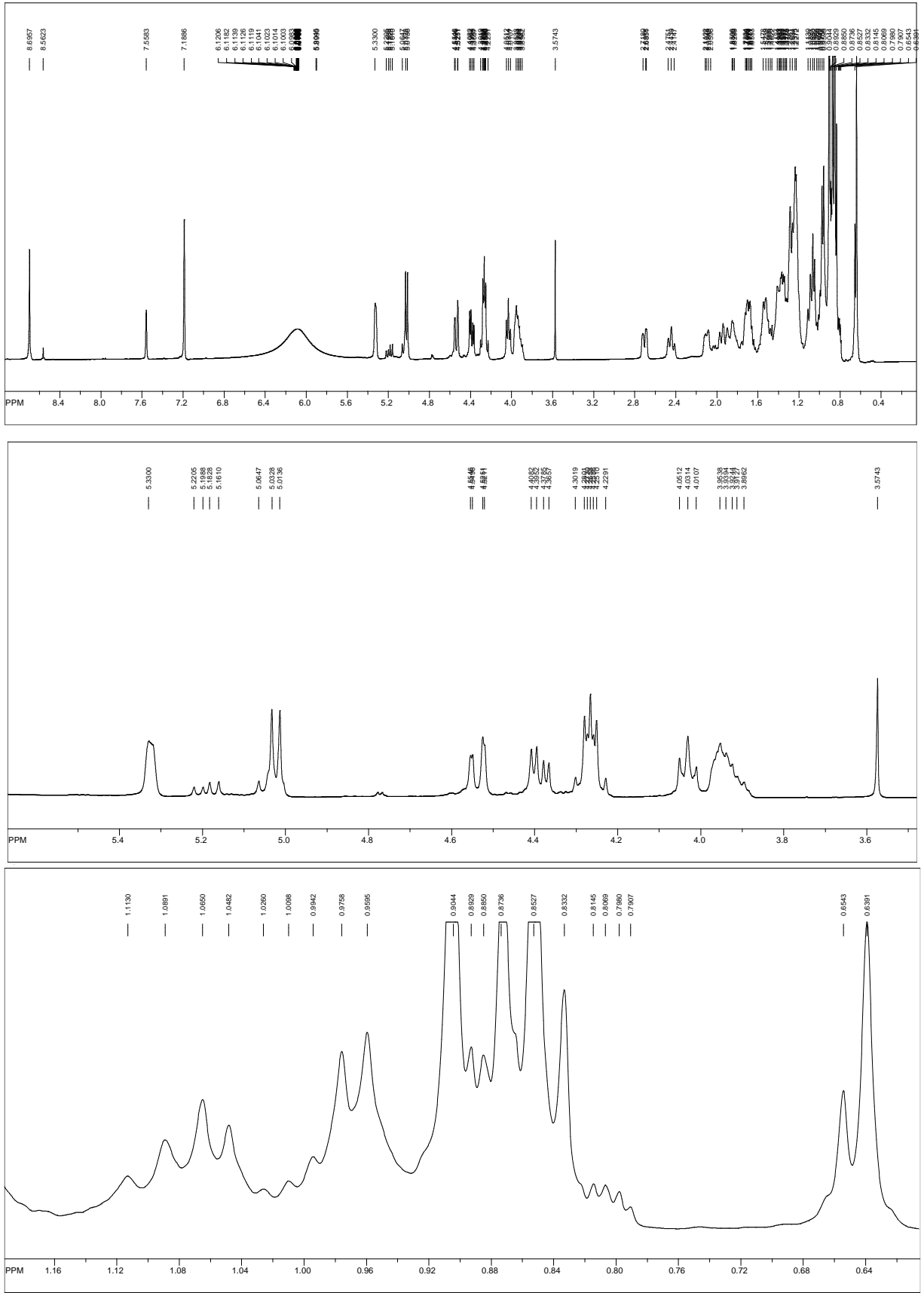


Figura 25. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) das substâncias **RdCA-2a** e **RdCA-2b**.

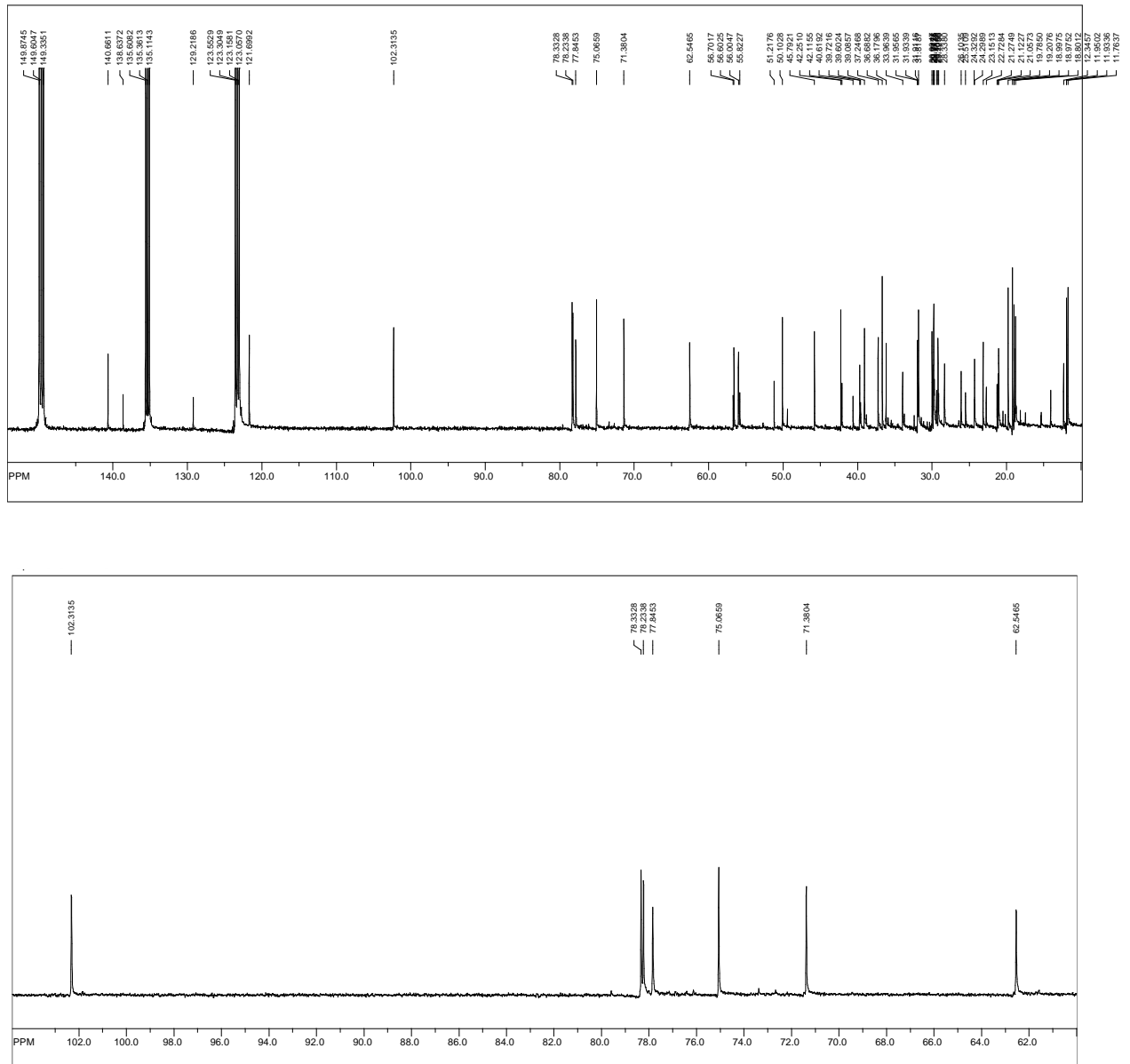
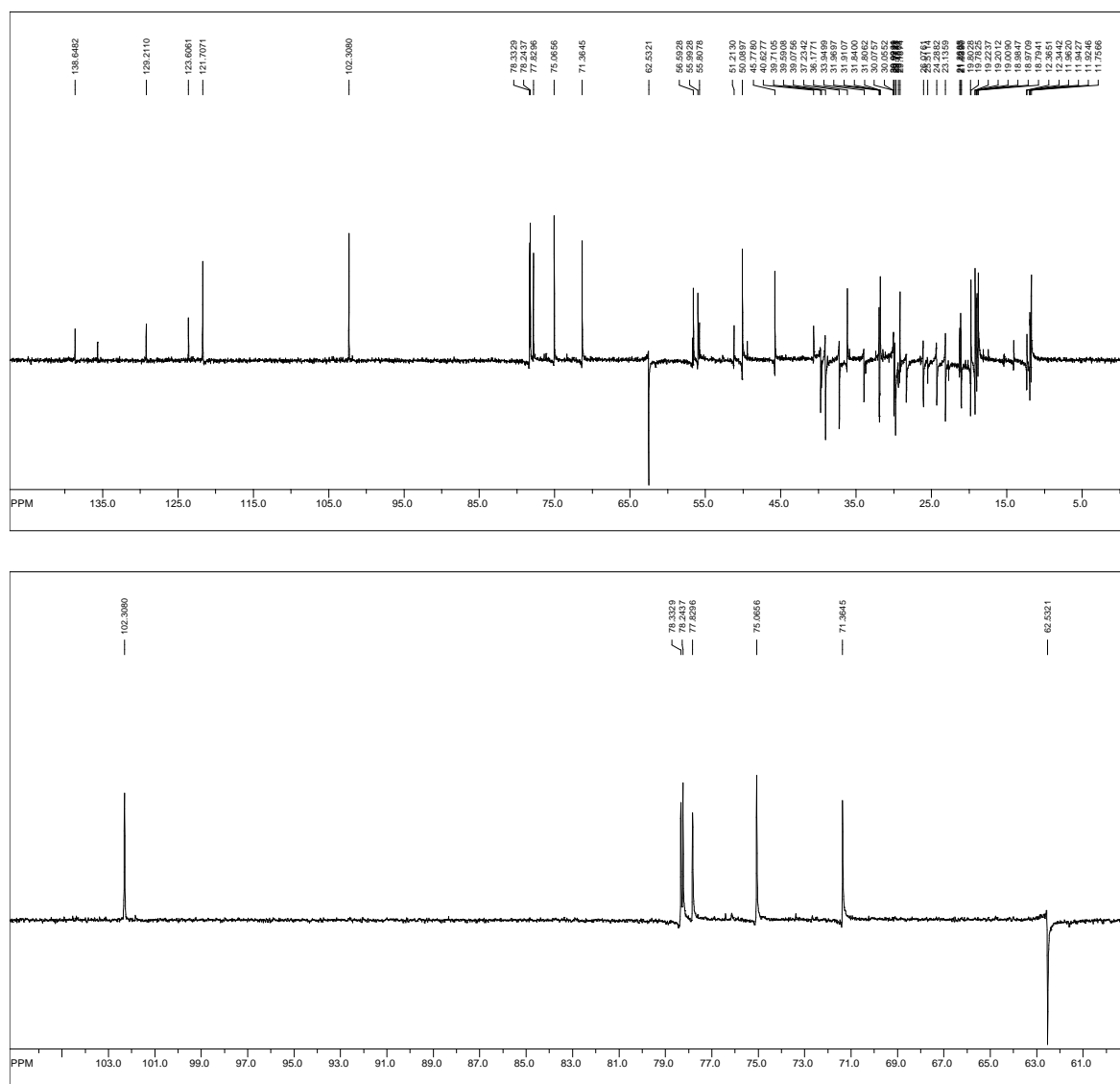


Figura 26. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) das substâncias **RdCA-2a e RdCA-2b.**

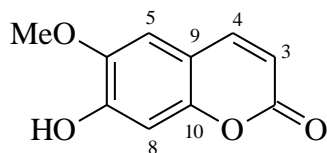


5.5.2 Identificação estrutural da substância codificada de RdCC-2

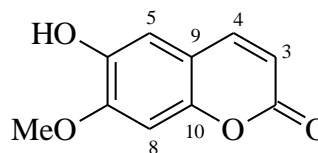
A substância codificada de **RdCC-2** foi identificada como sendo uma cumarina, conhecida como *Escopoletina*, com base na análise dos dados obtidos dos espectros de RMN, bem como pela comparação com dados de modelos descritos na literatura (BAYOUMI *et al.*, 2010).

Os dados obtidos do espectro de RMN ^1H (Figura 27, p. 91) permitiram reconhecer sinais, cujos valores de deslocamentos químicos e multiplicidades estão condizentes com a presença de um núcleo cumarínico 6,7-dissubstituído [δ 6,18 e δ 7,61 (d, $J = 9,4$ Hz cada), δ

6,80 e δ 6,79 (s, cada)] e para um grupo metoxila [δ 3,85 (s)]. Estas informações, associadas à análise comparativa com os dados da *Escopoletina* e da *Isoescopoletina* (Tabela 8, p. 91) permitiram sugerir ambas as possibilidades para **RdCC-2**.



Escopoletina



Isoescopoletina

A análise dos dados obtidos dos espectros de RMN ^{13}C , DEPT (Figuras 28 e 29, p. 92) e HSQC (Figura 30, p. 93) permitiu reconhecer a natureza para dez átomos de carbono (cinco não hidrogenados, quatro monoidrogenados e um triidrogenado), compatível, portanto, com núcleo cumarínico 6,7-dissubstituído (Tabela 8, p. 91). Dentre esses carbonos foram observados valores dos deslocamentos químicos condizentes com a presença de uma carbonila de γ -lactona de núcleo cumarínico [δ 162,59 (C)], para os carbonos olefínicos *alfa* [δ 111,71 (CH, C-3)] e *beta* [δ 144,21 (CH, C-4)] a este grupo, além de sinais para dois carbonos aromáticos que sustentam oxigênio [δ 145,29 (C, C-6) e δ 150,93 (C, C-7)], dois carbonos aromáticos monoidrogenados protegidos [δ 107,96 (CH, C-5) e δ 102,98 (CH, C-8)] e para um grupo metoxila (δ 55,90). Estas informações permitiram propor para **RdCC-2** a estrutura da *Escopoletina* ou da *Isoescopoletina*.

As correlações observadas no mapa de contorno do espectro bidimensional HMBC (Figura 31, p. 93), apesar de permitir a atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos da molécula, não permitiram distinguir entre as duas possibilidades estruturais. Entretanto, a comparação dos dados espectrais obtidos com os dos isômeros *Escopoletina* e da *Isoescopoletina* (Tabela 8, p. 80), sugeriu a identificação de **RdCC-2** com a *Escopoletina*, especialmente pela proteção observada para o C-5 (**RdCC-2**: δ 107,96; *Escopoletina*: δ 109,9 e *Isoescopoletina*: δ 112,9) e para o C-9 (**RdCC-2**: δ 110,91; *Escopoletina*: δ 112,6 e *Isoescopoletina*: δ 113,5).

As correlações espaciais observadas no mapa de contorno do espectro NOESY (Figura 32, p. 94) entre o sinal de H-5 (δ 6,80) com o de H-4 (δ 7,61) e com os hidrogênios do grupo metoxila (δ 3,85) permitiram confirmar esta proposta estrutural.

Tabela 8. Dados de RMN (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, δ , Hz) da substância codificada de **RdCC-2** e comparação com dados da *Escopoletina* e da *Isoescopoletina* (BAYOUMI *et al.*, 2010).

Posição	RdCC-2		<i>Escopoletina</i> *		<i>Isoescopoletina</i> *	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
2	162,59		164,1		164,0	
3	111,71	6,18 (d, $J = 9,4$)	112,6	6,19 (d, $J = 9,0$)	113,5	6,22 (d)
4	144,21	7,61 (d, $J = 9,4$)	146,1	7,84 (d, $J = 9,0$)	145,9	7,79 (d)
5	107,96	6,80 (s)	109,9	7,09 (s)	112,9	6,93 (s)
6	145,29		147,1		153,5	
7	150,93		153,0		145,3	
8	102,98	6,79 (s)	104,0	6,75 (s)	100,6	6,71 (s)
9	110,91		112,6		113,5	
10	149,80		151,4		150,3	
OMe	55,90	3,85 (s)	56,8	3,90 (s)	56,8	3,94 (s)

* Os espectros foram obtidos em CD_3OD

Figura 27. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância **RdCC-2**.

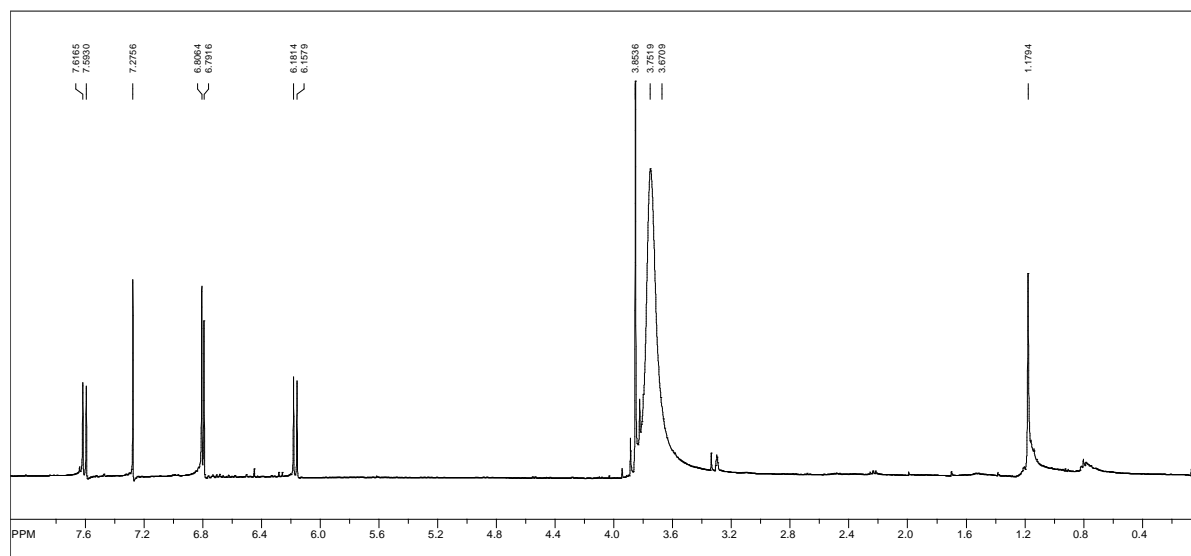


Figura 28. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância **RdCC-2**.

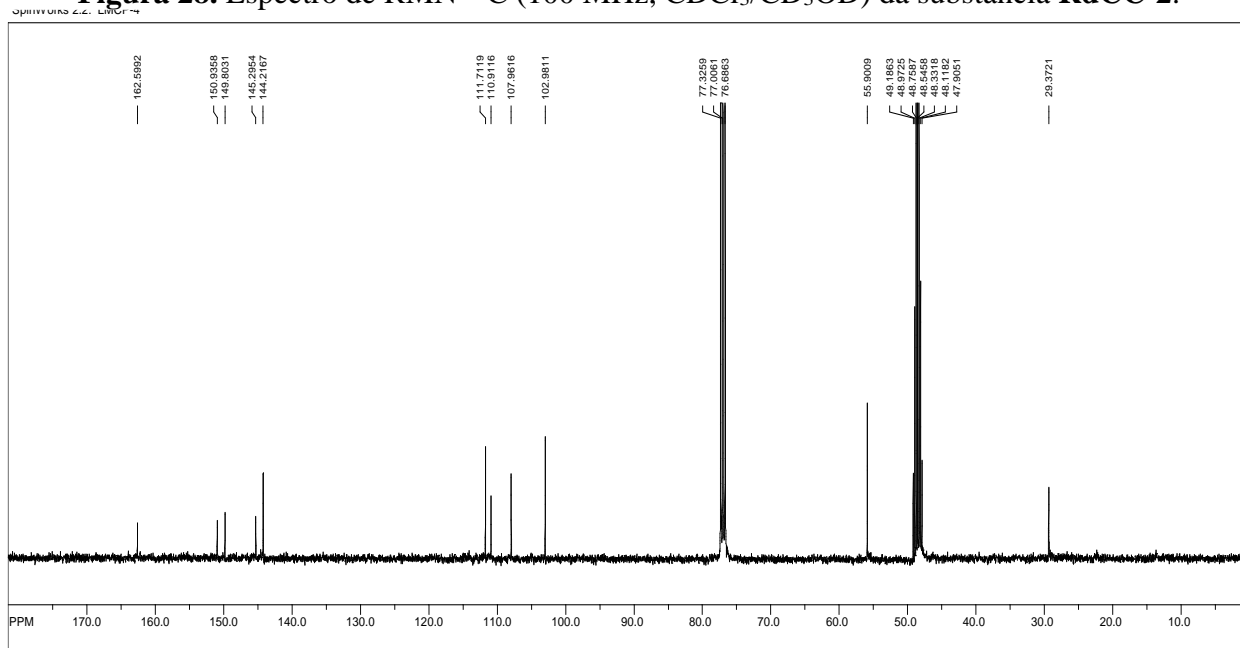


Figura 29. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância **RdCC-2**.

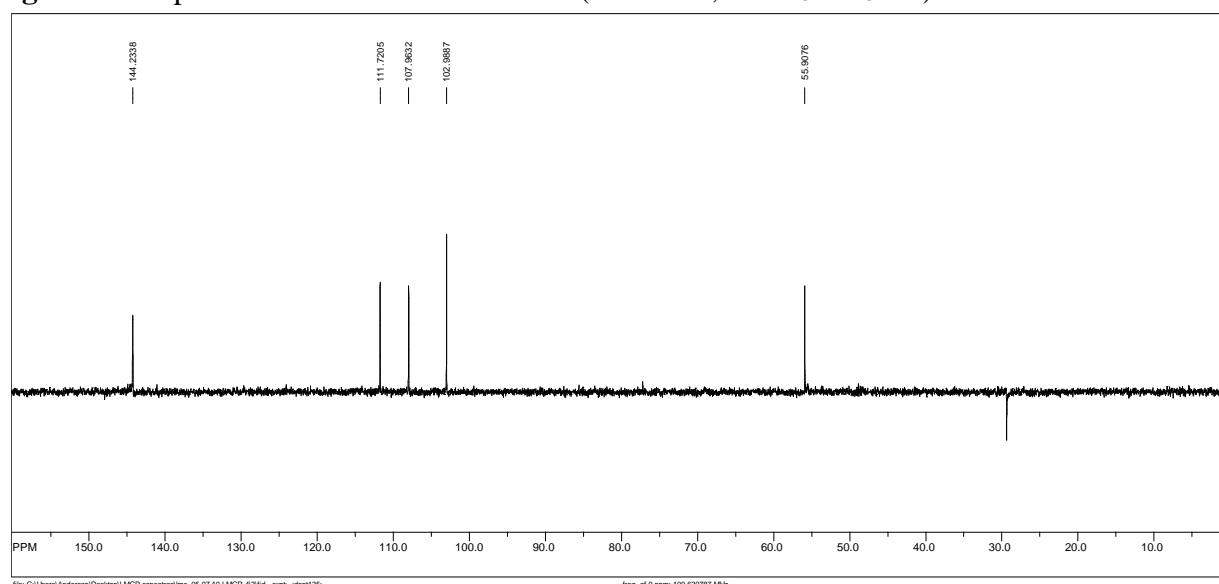


Figura 30. Espectro HSQC (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância **RdCC-2**.

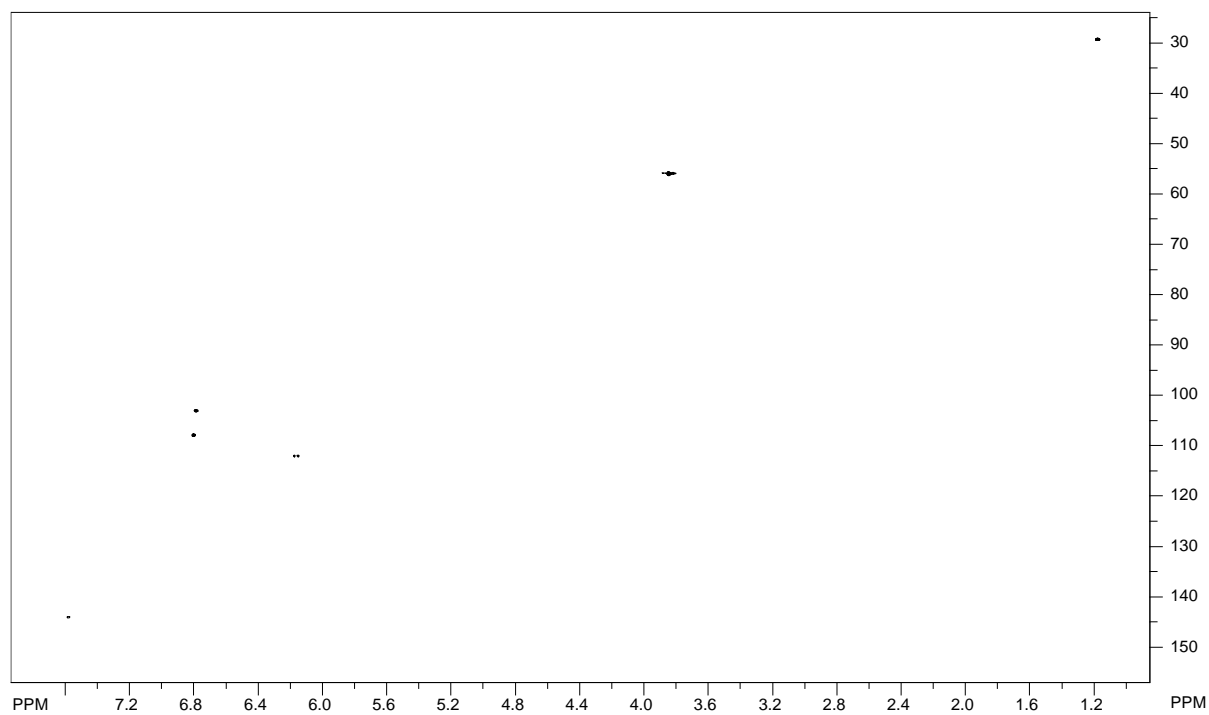


Figura 31. Espectro HMBC (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância **RdCC-2**.

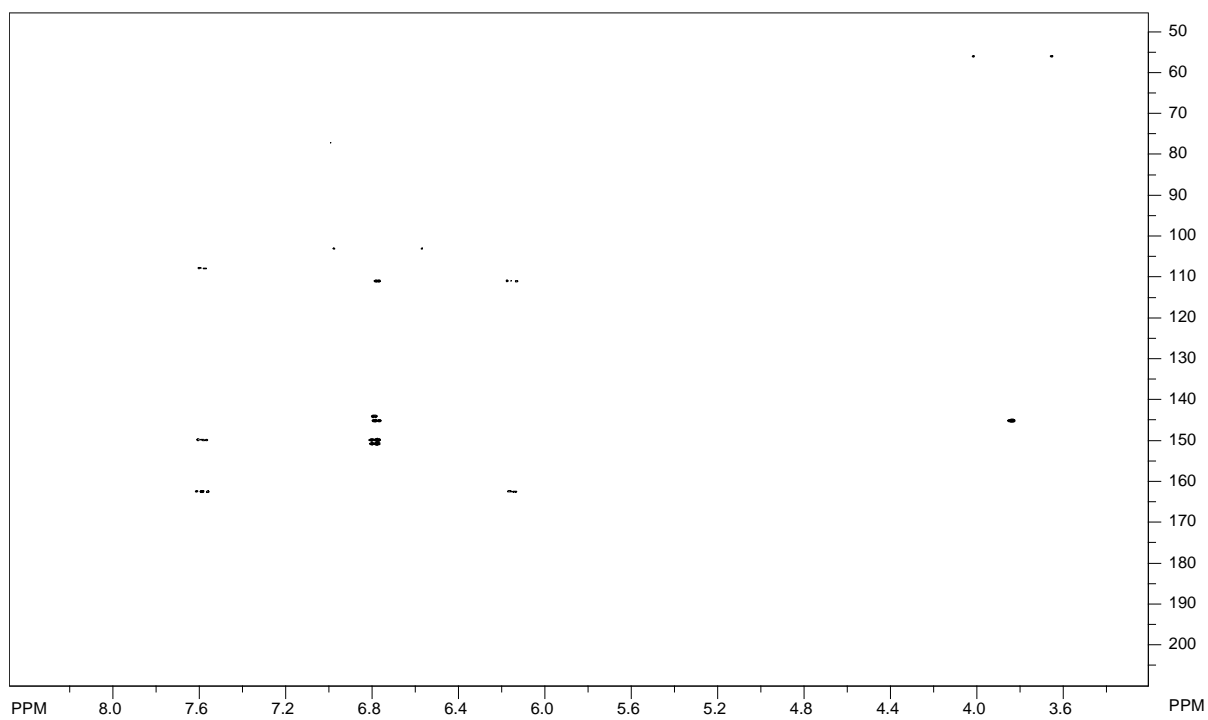
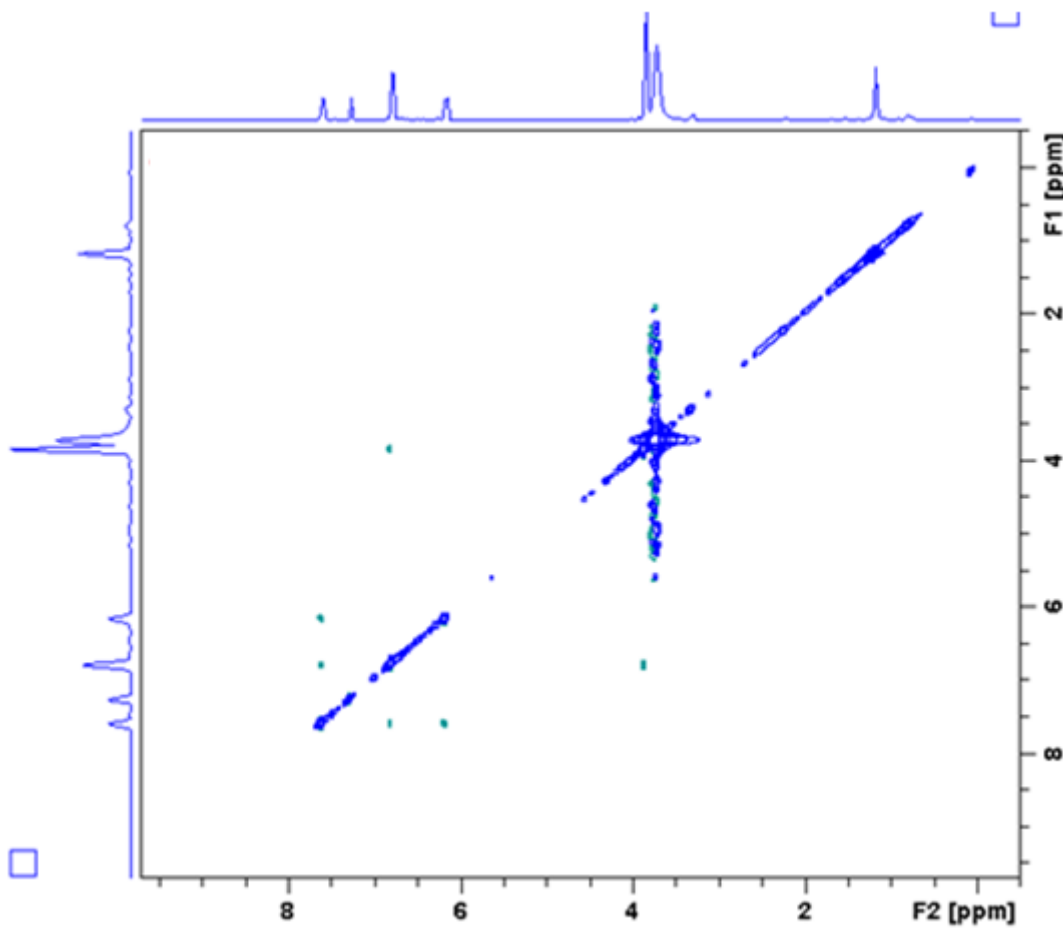


Figura 32. Espectro NOESY (400 MHz, CDCl₃/CD₃OD) da substância RdCC-2.



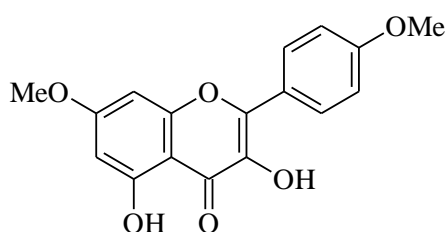
5.5.3 Identificação estrutural da substância codificada de RdFC-1

A substância codificada de **RdFC-1** foi identificada como sendo um flavonol com base na análise dos dados dos espectros de RMN, bem como a comparação com dados da literatura.

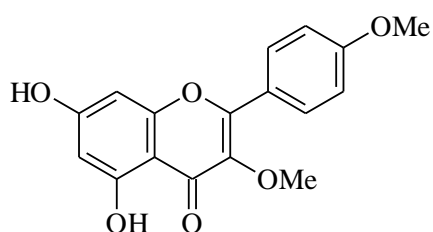
Os dados obtidos dos espectros de RMN ¹H (Figura 33, p. 97) mostraram sinais cujos valores de deslocamento químico, multiplicidades e constantes de acoplamento estão compatíveis com a presença de um esqueleto flavonoídico substituído no anel A nas posições 5 e 7 [δ 6,31 (d, $J = 2,0$ Hz, H-6) e δ 6,42 (d, $J = 2,0$ Hz, H-8)] e no anel B na posição 4' [δ 6,98 (d, $J = 8,8$ Hz, H-3' e H-5') e δ 8,09 (d, $J = 8,9$ Hz, H-2' e H-6')]. Adicionalmente, foi observada a presença de dois singletos para dois grupos metoxilas (δ 3,82 e δ 3,83) e de um singlete em δ 11,67, compatível com a presença de um grupo hidroxila em ligação de hidrogênio (Tabela 9, p. 96). Estas informações, associadas à ausência de um singlete em

torno de δ 6,50, correspondente ao H-3 de flavona, sugeriu para **RdFC-1** o esqueleto de um flavonol (AGRAWAL *et al.*, 1989).

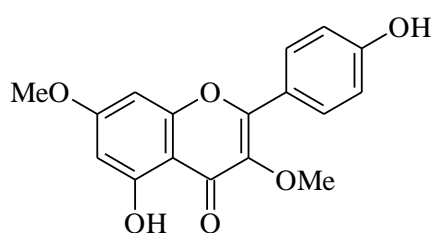
A análise conjunta dos dados obtidos dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT (Figuras 34 e 35, p. 98) permitiu reconhecer um total de 16 átomos de carbonos (08 não hidrogenados, 06 monoidrogenados e dois triidrogenados), cuja natureza e valores de deslocamentos químicos estão condizentes com a presença de um flavonol [δ 135,67 (C, C-3)] substituído no anel A nas posições 5 e 7 [δ 92,21 (CH, C-8) e δ 97,90 (CH, C-6)] e no anel B na posição 4' [δ 114,09 (CH, C-3' e C-5') e δ 129,40 (CH, C-2' e C-6')], além de sinais para dois grupos metoxilas [δ 55,43 e δ 55,85 (CH₃ cada)] (Tabela 9, p. 96). Estas informações, associadas à análise dos dados obtidos do espectro de RMN ^1H , permitiram propor para **RdFC-1** três possibilidades estruturais (A-C).



A



B



C

A proteção observada para C-3' e C-5' (δ 114,09), bem como nos valores de deslocamentos químicos dos sinais atribuídos aos carbonos dos grupos metoxilas (δ 55,43 e δ 55,85) permitiram excluir as possibilidades estruturais **B** e **C** (AGRAWAL *et al.*, 1989). A comparação dos dados de RMN ^{13}C obtidos com os do composto correspondente (3,5-Dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavonol, possibilidade estrutural **A**) (Tabela 9, p. 96) permitiu a identificação de **RdFC-1** com este composto (SILVA *et al.*, 2009).

Tabela 9. Dados de RMN (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3 , δ) da substância **RdFC-1** e comparação com dados descritos na literatura (SILVA *et al.*, 2009).

<i>Posição</i>	RdFC-1		7,4-di-O-Metilkaempferol*	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
2	145,74		147,25	
3	135,67		135,96	
4			176,02	
5	160,81		159,30	
6	97,90	6,31 (<i>d</i> , $J = 2,0$)	97,46	6,36 (<i>d</i>)
7	165,71		164,89	
8	92,21	6,42 (<i>d</i> , $J = 2,0$)	92,02	6,75 (<i>d</i>)
9	156,84		156,09	
10	103,98		104,03	
1'	123,19		121,56	
2', 6'	129,40	8,09 (<i>d</i> , $J = 8,8$)	129,57	8,09 (<i>d</i>)
3', 5'	114,09	6,98 (<i>d</i> , $J = 8,8$)	115,45	6,94 (<i>d</i>)
4'	161,15		160,35	
7-OMe	55,85	3,83 (<i>s</i>)	56,08	3,87 (<i>s</i>)
4'-OMe	55,43	3,82 (<i>s</i>)	56,03	3,87 (<i>s</i>)
OH		11,67 (<i>s</i>)		12,48 (<i>s</i>)

* Espectro obtido em DMSO-d_6

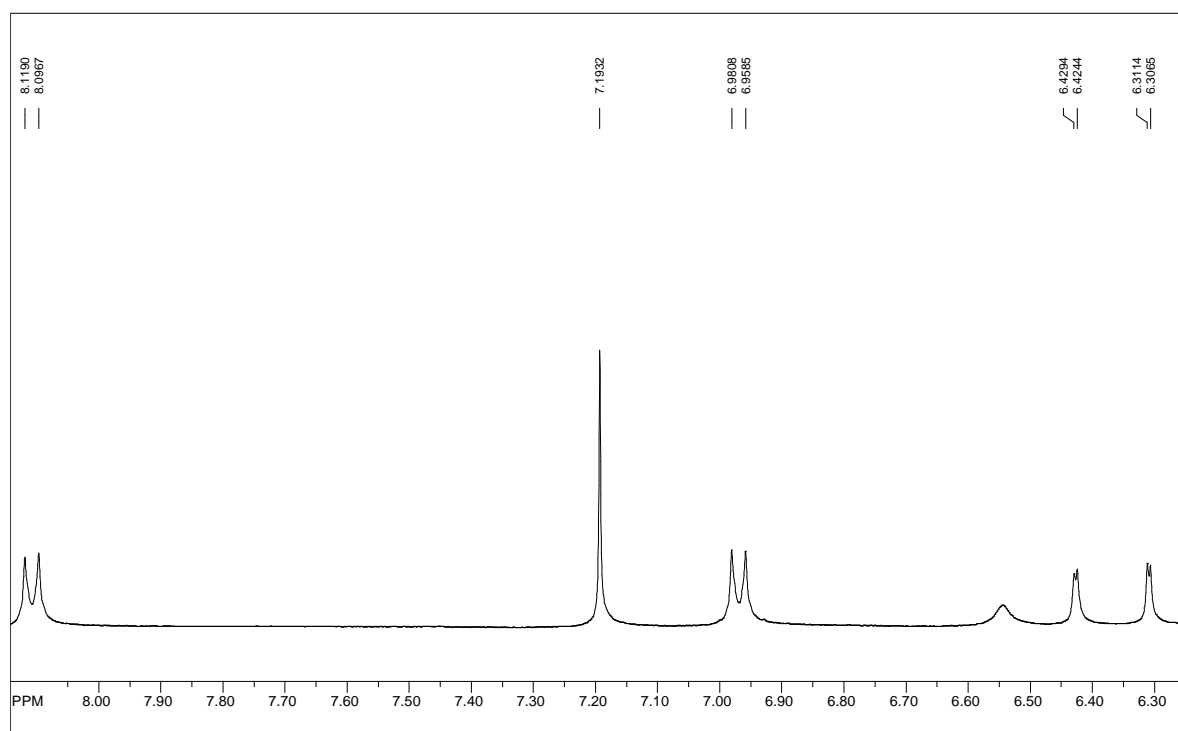
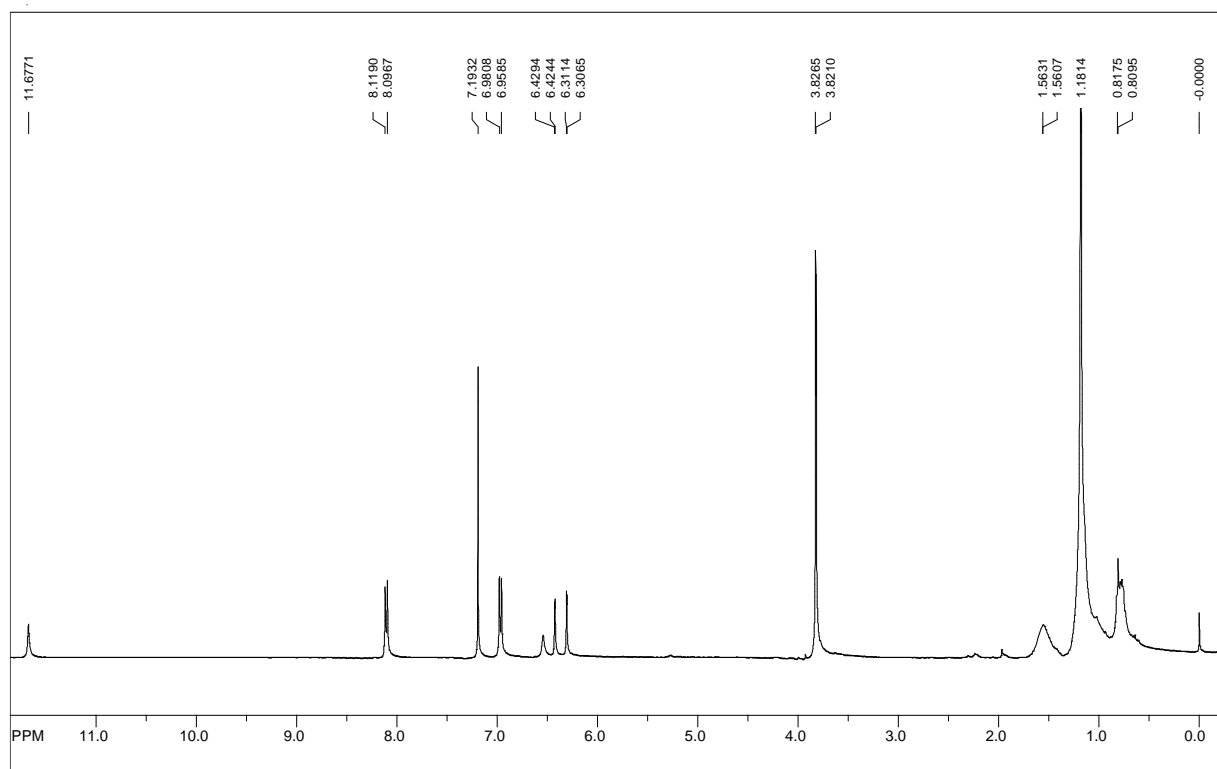
Figura 33. Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **RdFC-1**.

Figura 34. Espectro RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância **RdFC-1**.

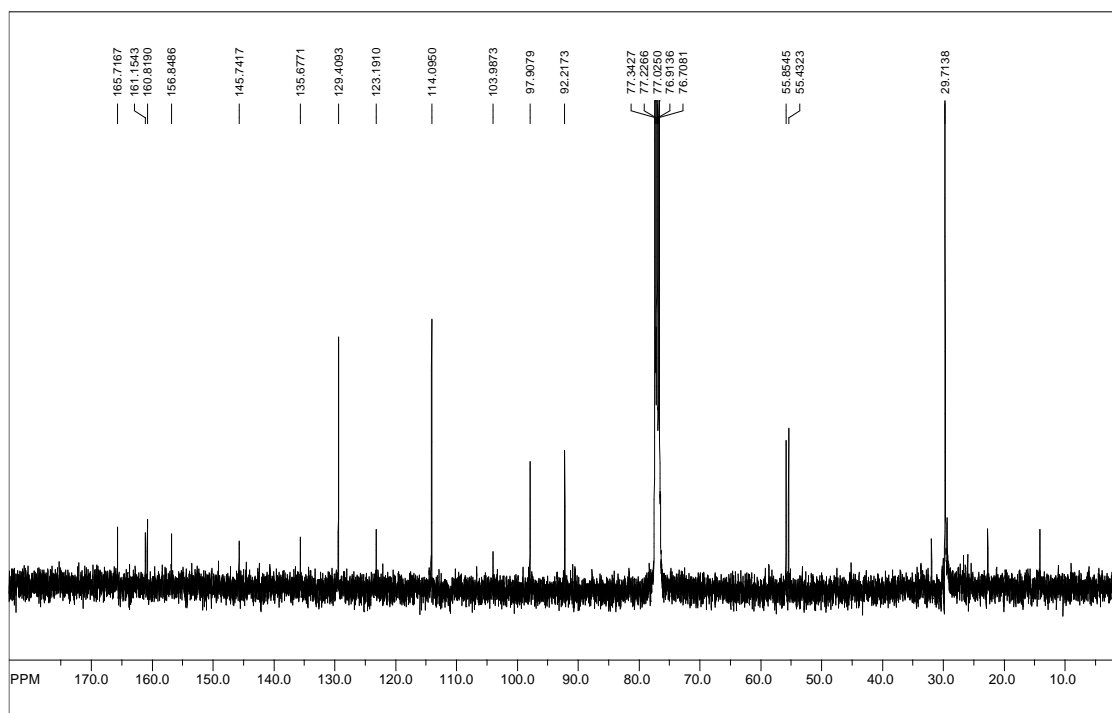
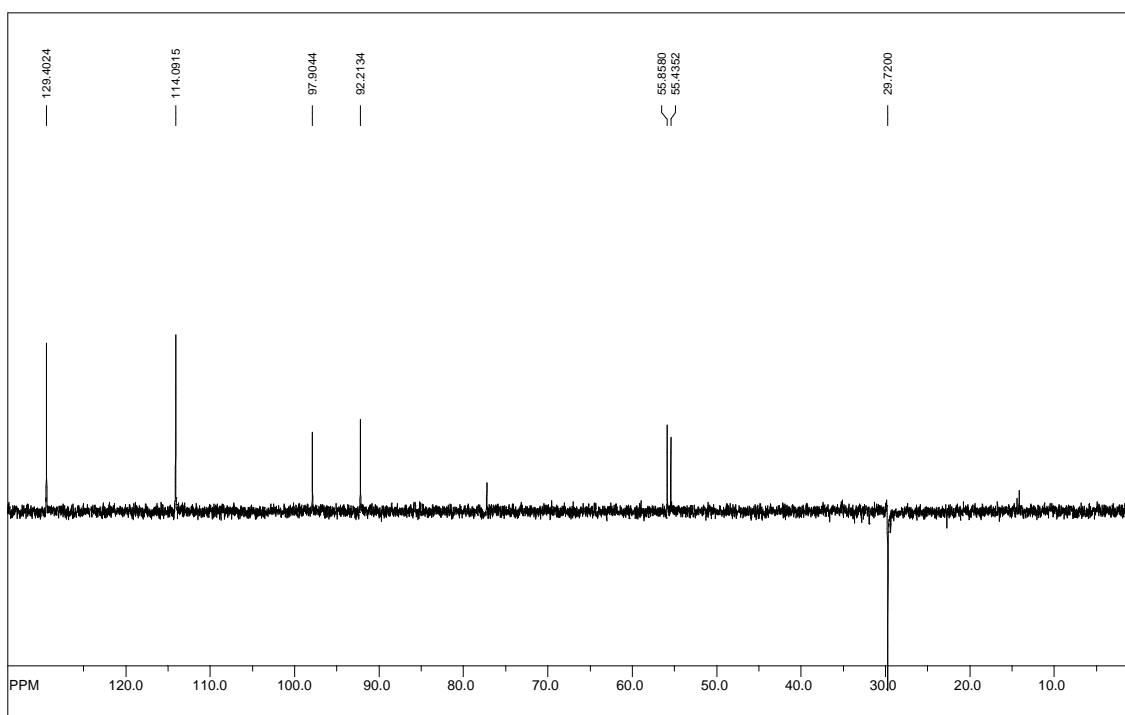
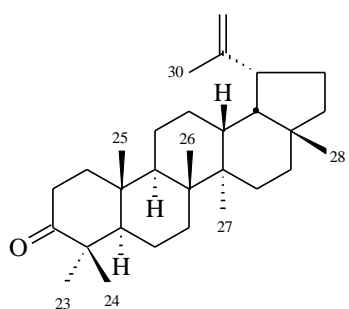


Figura 35. Espectro DEPT 135 (100 MHz, CDCl_3) da substância **RdFC-1**.

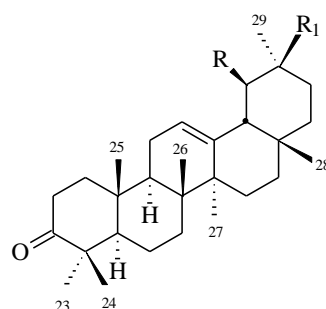


5.5.4 Identificação estrutural das substâncias codificadas de **RdFH-2a**, **RdFH-2b** e **RdFH-2c**

As substâncias codificadas de **RdFH-2a**, **RdFH-2b** e **RdFH-2c** foram isoladas em mistura e identificadas como sendo triterpenos pentacíclicos das séries lupano (majoritário), ursano e oleanano (minoritários), respectivamente, com base na análise dos dados obtidos dos espectros de RMN, bem como pela comparação com dados da literatura (CURSINO *et al.*, 2009).



RdFH-2a



RdFH-2b R = Me, R₁ = H

RdFH-2c R = H, R₁ = Me

Os dados obtidos do espectro de RMN ¹H da mistura (Figura 36, p. 102) permitiram reconhecer sinais, cujos valores de deslocamentos químicos e multiplicidades estão condizentes com a presença de uma ligação dupla do tipo metileno terminal [**RdFH-2a**: δ 4,69 e 4,57 (sl cada)], ligação dupla do tipo trissubstituída [**RdFH-2b**: 5,21 (t, *J* = 3,1Hz); **RdFH-2c**: δ 5,15 (t, *J* = 3,4 Hz)] e para vários grupos metílicos (Tabelas 10 e 11, pp. 100 e 101).

A análise dos dados obtidos dos espectros de RMN ¹³C (Figura 37, p. 103) e DEPT (Figura 38, p. 103) permitiu reconhecer a natureza dos carbonos dos três componentes e sugerir, portanto, esqueletos triterpênicos. Os valores dos deslocamentos químicos observados permitiram identificar a presença de seis carbonos sp² de ligação dupla, sendo dois do tipo metileno terminal [**RdFH-2a**: δ 109,41 (CH₂), 150,89 (C)] (Tabelas 10, p. 100), quatro do tipo trissubstituída [**RdFH-2b**: δ 124,19 (CH) e δ 139,72 (C); **RdFH-2c**: δ 121,49 (CH) e δ 145,27 (C)], três carbonilas de cetona [**RdFH-2a**: δ 218,33 (C); **RdFH-2b**: δ 217,99 (C); **RdFH-2c**: δ 217,94 (C)] e para vários grupos metilas (Tabela 11, p. 101). Estas observações, associada à ausência de sinais para hidrogênios e carbonos carbinólicos, permitiram propor para **RdFH-2a**, **RdFH-2b** e **RdFH-2c** estruturas de triterpenos pentacíclicos das séries lupano, ursano e oleanano, conhecidos, respectivamente, como *Lupenona*, *α-Amirenona* e *β-*

Amirenosa. Esta proposta estrutural foi confirmada pela comparação dos dados espectrais obtidos com os dos compostos descritos na literatura (MAHATO & KUNDU, 1994; CURSINO *et al.*, 2009).

Tabela 10. Dados de RMN (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3 , δ , Hz) da substância **RdFH-2a** comparação com dados da literatura da *Lupen-3-ona* (CURSINO *et al.*, 2009).

Posição	RdFH-2a		<i>Lupen-3-ona</i>
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	39,61		39,56
2	34,17	2,40 (m)	34,07
3	218,33		217,90
4	47,34		47,24
5	54,89		54,88
6	19,67		19,63
7	33,54		33,53
8	40,76		40,73
9	49,77		49,75
10	36,87		36,83
11	21,45		21,43
12	25,12		25,12
13	38,14		38,14
14	42,74		42,84
15	27,41		27,39
16	35,50		35,48
17	42,93		42,93
18	48,21		48,21
19	47,95		47,89
20	150,89	1,90 (m)	150,70
21	29,80		29,79
22	39,96		39,93
23	26,63	1,03 (s)	26,61
24	21,51	0,80 (s)	20,98
25	15,99	0,93 (s)	15,90
26	15,78	1,08 (s)	15,74
27	14,47	1,26 (s)	14,43
28	18,01	0,96 (s)	17,97
29	109,41	4,69 e 4,57 (sl)	109,36
30	21,04	1,69 (s)	19,27

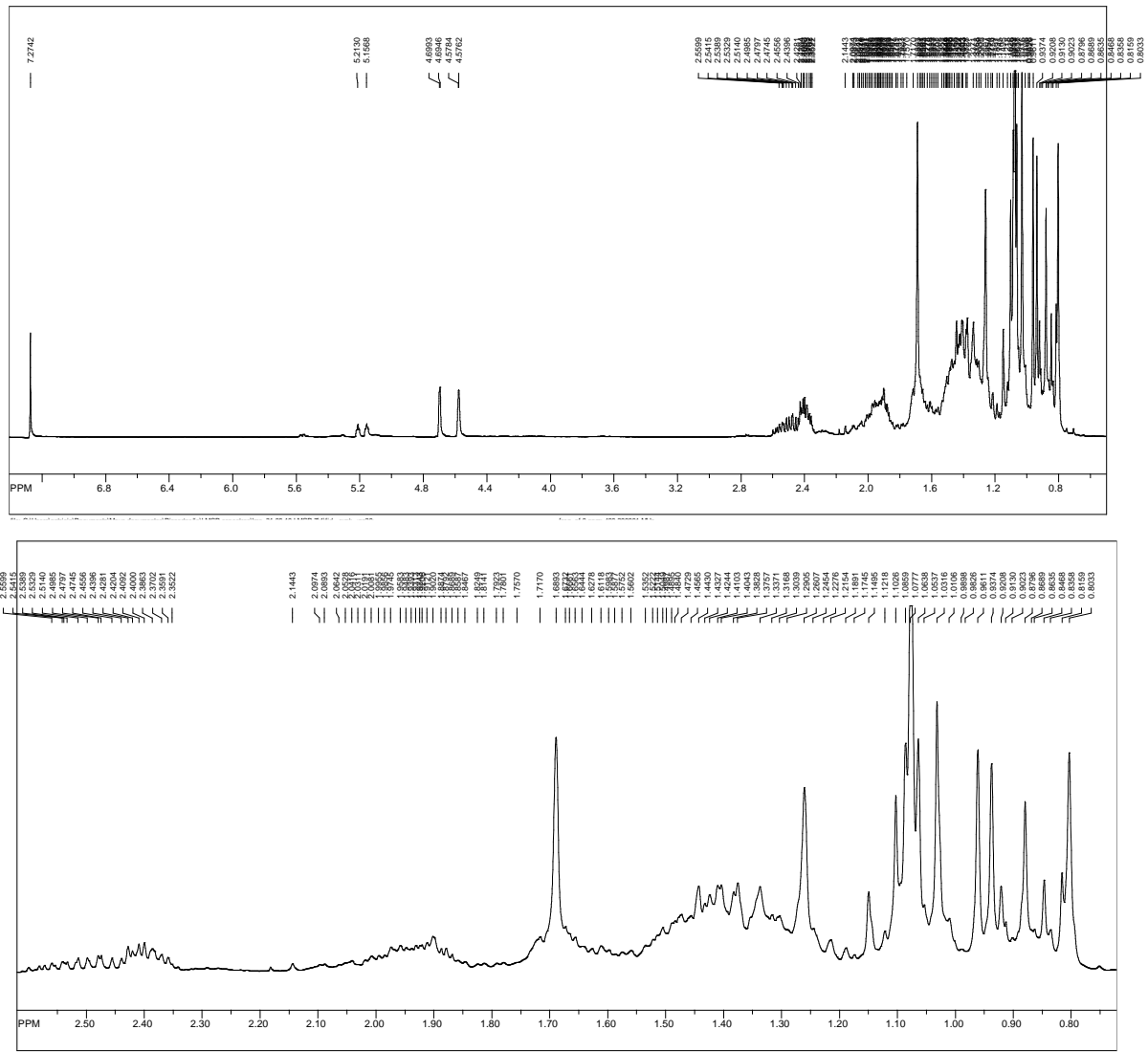
^a Natureza dos carbonos definida com auxílio do espectro DEPT.

Tabela 11. Dados de RMN (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3 , δ , Hz) das substâncias **RdFH-2b** e **RdFH-2c** comparação com dados do α -*Amirenona* e β -*Amirenona* descritos na literatura (MAHAT & KUNDU, 1994).

Posição	RdFH-2b		RdFH-2c		α - <i>Amirenona</i>	β - <i>Amirenona</i>
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
C						
1	39,48		39,29		39,4	39,1
2	34,23	2,48 (m)	34,22	2,48 (m)	34,2	34,1
3	217,99		217,94		217,8	217,6
4	48,74		47,89		47,4	47,4
5	55,28		55,23		55,4	55,3
6	19,64		19,64		19,7	19,6
7	32,44		32,15		32,6	32,2
8	39,77		41,08		39,1	39,3
9	46,90		46,85		46,8	46,0
10	36,60		37,09		36,6	36,7
11	23,64		23,53		23,6	23,0
12	124,19	5,21 (t, $J = 3,1$)	121,49	5,15 (t, $J = 3,4$)	124,3	121,8
13	139,72		145,27		139,3	145,1
14	42,21		41,84		42,2	41,8
15	29,71		26,56		28,7	26,2
16	26,90		28,06		26,6	27,0
17	34,70		33,70		33,7	32,5
18	59,11		47,28		58,9	47,4
19	39,68	2,01 (m)	46,76	2,54 (m)	39,6	46,9
20	39,58		31,09		38,9	30,6
21	31,42		34,70		31,2	34,8
22	41,48		37,09		41,5	37,2
23	26,45	0,81-1,15 (s)	26,45	0,81-1,15 (s)	26,6	26,4
24	21,40	0,81-1,15 (s)	21,40	0,81-1,15 (s)	21,5	21,4
25	15,48	0,81-1,15 (s)	15,23	0,81-1,15 (s)	15,2	14,9
26	16,82	0,81-1,15 (s)	16,72	0,81-1,15 (s)	16,9	16,7
27	23,82	0,81-1,15 (s)	25,88	0,81-1,15 (s)	23,5	25,8
28	28,42	0,81-1,15 (s)	28,78	0,81-1,15 (s)	28,1	28,4
29	17,48	0,81-1,15 (s)	33,34	0,81-1,15 (s)	17,4	33,3
30	19,30	0,81-1,15 (s)	23,67	0,81-1,15 (s)	21,3	23,7

^a Natureza dos carbonos definida com auxílio do espectro DEPT.

Figura 36. Espectro RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) das substâncias **RdFH-2a**, **RdFH-2b** e **RdFH-2c**.



Os dados do espectro de RMN ^1H da mistura (Figura 39, p. 106; Tabelas 12, p. 105) permitiram reconhecer a presença de vários singletos (**RdFH-3a**: δ 0,75 a 1,02; **RdFH-3b**: δ 0,79 a 1,24) atribuídos a grupos metílicos angulares, multipletos (**RdFH-3a** e **RdFH-3b**: δ 3,18) para hidrogênios oximetínicos e para hidrogênios olefínicos [**RdFH-3a**: δ 4,56 e δ 4,67 (sl); **RdFH-3b**: δ 5,52 (*dd*, $J = 8,0$ e $3,0$ Hz)]. Adicionalmente, foi observado um singletto em δ 1,67, condizente com a presença de hidrogênios de grupo metila ligado a carbono sp^2 . Essas feições espectrais e valores de deslocamentos químicos permitiram sugerir para os dois componentes esqueletos de triterpenos pentacíclico da série lupano para **RdFH-3a** e da série taraxerano para **RdFH-3b**.

A análise dos dados obtidos do espectro de RMN ^{13}C e DEPT 135 [Figuras 40 (p. 106) e 41 (p. 107)] permitiu reconhecer valores de deslocamentos químicos compatíveis com a presença de carbonos carbinólicos [**RdFH-3a**: δ 78,98 (CH) e **RdFH-3b**: δ 79,03 (CH)], de ligações duplas dos tipos metileno terminal [**RdFH-3a**: δ 150,95 (C) e 109,31 (CH_2)] e trissubstituída [**RdFH-3b**: δ 158,03 (C) e 116,84 (CH)], além de sinais para vários grupos metilas (Tabela 12, p. 105). Estes valores de deslocamentos químicos permitiram confirmar o esqueleto de triterpenos pentacíclicos do tipo lupano para **RdFH-3a** e sugerir esqueleto taraxerano para **RdFH-3b**.

A análise conjunta dos dados espectrais discutidos e a comparação com dados descritos na literatura (Tabela 12, p. 105) permitiram identificar a substância **RdFH-3a** como sendo o triterpeno conhecido como *Lupeol* e para **RdFH-3b** como sendo *Taraxerol*.

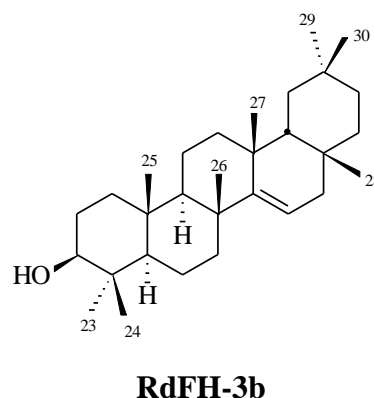
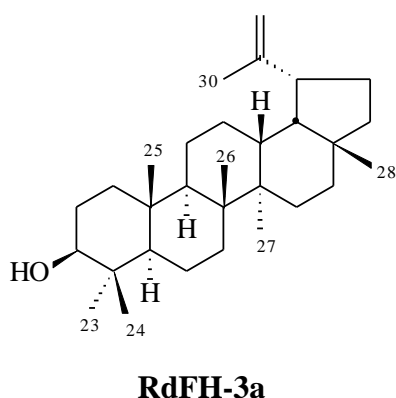


Tabela 12. Dados de RMN (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3 , δ , Hz) das substâncias **RdFH-3a** e **RdFH-3b** comparação com dados do *Lupeol* e *Taraxerol* descritos na literatura (MAHATO & KUNDU, 1994).

<i>Posição</i>	RdFH-3a		RdFH-3b		<i>Lupeol</i>	<i>Taraxerol</i>
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
C						
1	38,66		37,66		38,7	38,1
2	27,40		27,09		27,4	27,3
3	78,98	3,18 (m)	79,03	3,18 (m)	78,9	79,2
4	39,90		38,83		38,8	39,1
5	55,24		55,46		55,3	55,7
6	18,28		18,75		18,3	19,0
7	34,23		35,06		34,2	35,3
8	40,79		38,67		40,8	38,9
9	50,38		48,67		50,4	48,9
10	37,13		37,69		37,1	37,9
11	20,89		17,46		20,9	17,7
12	25,08		35,54		25,1	35,9
13	38,00		37,67		38,0	37,9
14	42,79		158,03		42,8	158,1
15	27,37		116,84	5,52 (<i>dd</i> , $J = 8,0$ e $3,0$)	27,4	117,0
16	35,54		36,62		35,5	36,9
17	42,97		37,95		43,0	38,1
18	48,25		49,22		48,2	49,4
19	47,95		41,26		47,9	41,4
20	150,95		28,78		150,9	29,0
21	29,80		33,64		29,8	33,9
22	39,96		33,04		40,0	33,2
23	27,95	0,93 (s)	27,95	0,97 (s)	28,0	28,1
24	15,35	0,75 (s)	15,39	0,94 (s)	15,4	15,6
25	16,09	0,78 (s)	15,46	1,08 (s)	16,1	15,6
26	15,94	0,96 (s)	29,91	0,79 (s)	15,9	30,1
27	14,51	1,02 (s)	25,59	1,24 (s)	14,5	26,0
28	17,97	0,82 (s)	29,91	0,81 (s)	18,0	30,1
29	109,31	4,56; 4,67 (sl)	33,33	0,91 (s)	109,3	33,5
30	19,23	1,67 (s)	21,29	0,89 (s)	19,3	21,5

^a Natureza dos carbonos definida com auxílio do espectro DEPT.

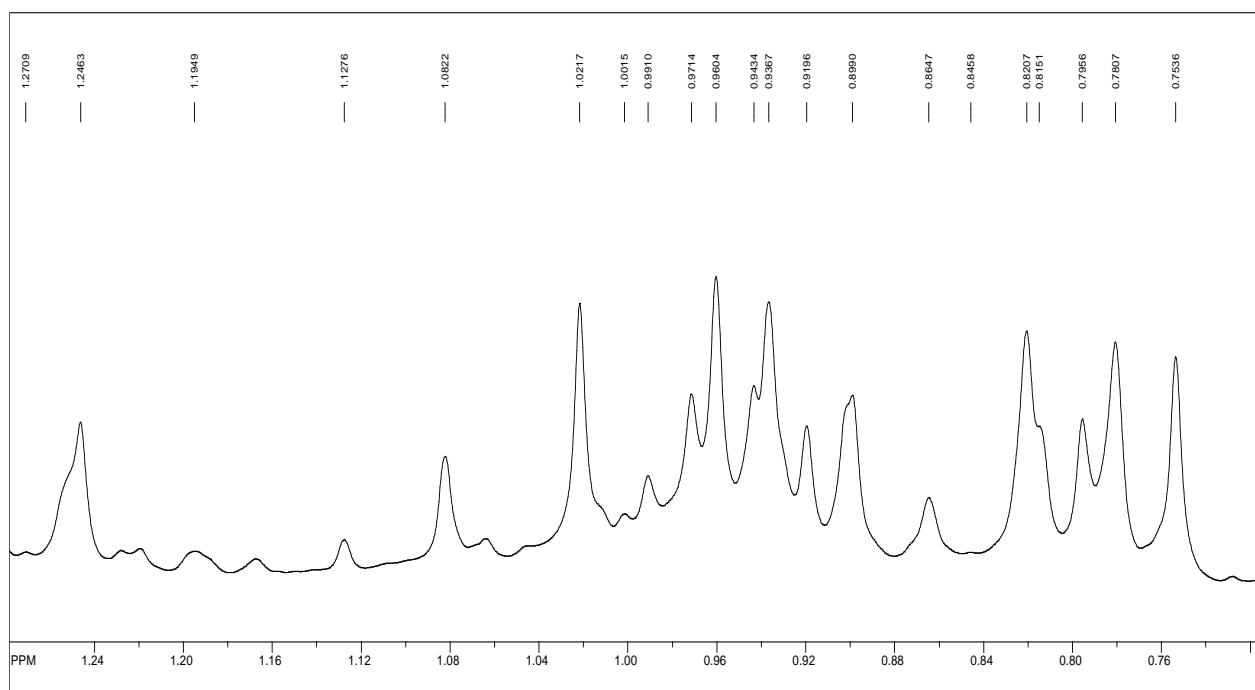
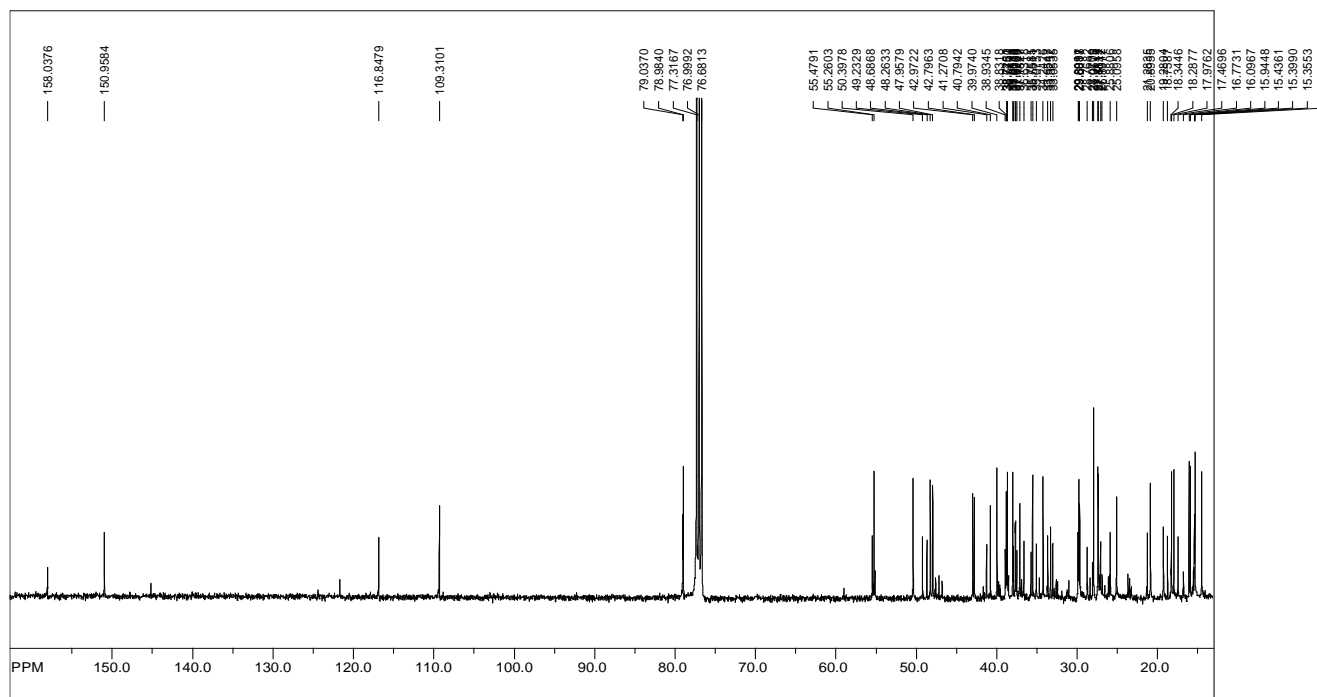
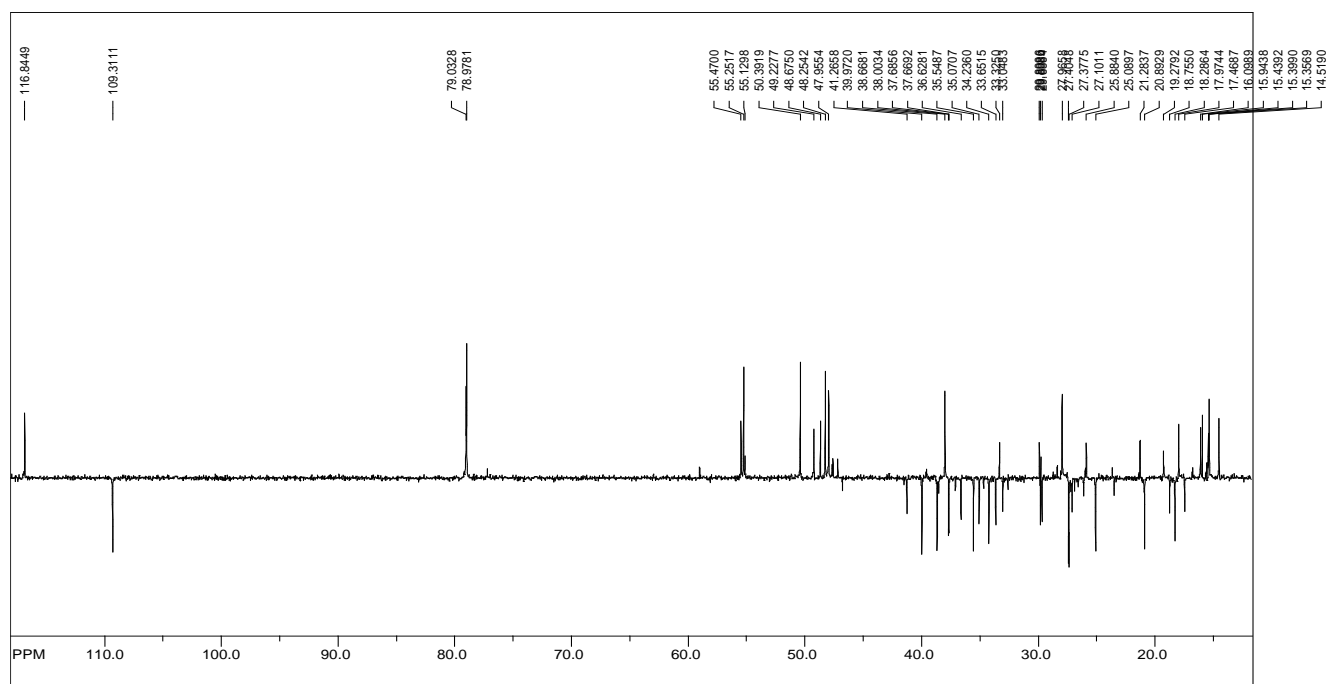
Figura 39. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) das substâncias **RdFH-3a** e **RdFH-3b**.**Figura 40.** Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) das substâncias **RdFH-3a** e **RdFH-3b**.

Figura 41. Espectro de RMN 13C-DEPT 135 (100 MHz, CDCl₃) das substâncias **RdFH-3a** e **RdFH-****3b.**

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

- Nos ensaios frente larvas do 4º estágio do *A. aegypti*, dentre as amostras testadas, os melhores resultados foram obtidos com as frações em hexano do caule e em CHCl₃ das folhas. Nos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina*, das dez amostras avaliadas, cinco foram consideradas altamente tóxicas, entre as quais, a fração em CHCl₃ das folhas com promissora atividade larvicida.
- Os resultados obtidos nos ensaios preliminares frente ao DPPH sugerem a presença de substâncias com atividade antirradicalar na maioria dos extratos e frações testados. Das sete frações que forneceram resultados positivos, cinco delas foram promissoras nos ensaios quantitativos (CI₅₀ < 200 µg/mL). Os melhores resultados foram observados para as frações em AcOEt das folhas (CI₅₀ 80,29 ± 5,60 µg/mL) e em MeOH do caule (CI₅₀ 85,19 ± 7,28 µg/mL), que foram comparáveis aos do BHT (CI₅₀ 82,75 ± 5,82 µg/mL).
- Quanto à atividade antimicrobiana, os resultados não foram muito significativos, pois apenas duas amostras, o extrato em EtOH das folhas e a fração em CHCl₃ do caule, apresentaram alguma atividade sobre um (*S. pyogenes*) dos nove microrganismos testados.
- O estudo fitoquímico efetuado com as frações das folhas e do caule conduziu ao isolamento de cinco triterpenos, um flavonol e uma cumarina, todos relatados pela primeira vez na família Connaraceae; além de quatro fitoesteróides (*Sitosterol*, *Estigmasterol*, *3-O-β-D-Glicopiranosilsitosterol* e *3-O-β-D-glicopiranosil-estigmasterol*).

Considerando que a literatura científica não relata qualquer estudo químico ou biológico para a espécie *Rourea doniana*, os resultados obtidos no presente trabalho, além de ampliar o conhecimento da composição química do gênero, sugerem que a espécie *R. doniana* possui potencial larvicida e antioxidante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDAE-KYEREME, J.; CROFT, S.L.; KENDRICK, HOWARD; WRIGHT, C.W. Antiplasmodial activities of some Ghanaian plants traditionally used for fever/malaria treatment and of some alkaloids isolated from *Pleiocarpa mutica*; *in vivo* antimalarial activity of pleiocarpine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 99–103, 2001.
- AGRAWAL, P.K.; THAKUR, R.S.; BANSAL M.C. (1989) Flavonoids. In: Agrawal, P.K. (Org.). Studies in Organic Chemistry 39. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Elsevier, p. 95-182.**
- AHMADU, A.A.; AKPULU, I.N.; HASSAN, H.S.; SULE, M.I.; PATEH, U.U. Preliminary phytochemical and antimicrobial screening of the leaves of *Byrsocarpus coccineus* Schum and Thonn. (Connaraceae). **Journal of Pharmaceutical Bioresources**, v. 3, n. 2, 107-110, 2006.
- AHMADU, A.A.; HASSAN, H.S.; ABUBAKAR, M U; AKPULU, I.N. Flavonoid glycosides from *Byrsocarpus coccineus* leaves. schum and thonn (Connaraceae). **Afr. J. Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 4, n. 3, p. 257- 260, 2007.
- AIYAR, S.N.; KRISHNAMURTI, M.; SESHADRI, T.R. Rapanone from *Connarus monocarpus* roots. **Bulletin of the National Institute of Sciences of India**, v. 28, p. 8-13, 1965.
- AKINDELE, A.J.; ADEYEMI, O.O. Analgesic activity of the aqueous leaf extract of *Byrsocarpus coccineus*. **Nigerian Journal of Health and Biomedical Sciences**, v. 5, n. 1, p. 43-46, 2006a.
- AKINDELE, A.J.; ADEYEMI, O.O. Evaluation of the antidiarrhoeal activity of *Byrsocarpus coccineus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.108, p. 20–25, 2006b.
- AKINDELE, A.J.; ADEYEMI, O.O. Antiinflammatory activity of the aqueous leaf extract of *Byrsocarpus coccineus*. **Fitoterapia**, v. 78, p. 25–28, 2007a.
- AKINDELE, A.J.; ADEYEMI, O.O. Antipyretic activity of *Byrsocarpus coccineus* Schum and Thonn. (Connaraceae). **International Journal of Pharmacology**, v. 3, n. 4, p. 357-361, 2007b.
- AKINDELE, A.J.; ADEYEMI, O.O. Anxiolytic and sedative effects of *Byrsocarpus coccineus* Schum. and Thonn. (Connaraceae) extract. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 3, n. 1, p. 28-36, 2010.
- AKINDELE, A.J.; EZENWANEBE, K.O.; ANUNOBI, C.C.; ADEYEMI, O.O. Hepatoprotective and *in vivo* antioxidant effects of *Byrsocarpus coccineus* Schum. and Thonn. (Connaraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 46–52, 2010.
- AMARAL, E.A.; SILVA, R.M.G. Avaliação da toxicidade aguda de angico (*Anadenanthera falcata*), pau-santo (*Kilmeyera coreacea*), aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) e cipó-de-são-

joão (*Pyrostegia venusta*), por meio do bioensaio com *Artemia salina*. **Perquirêre, Revista Eletrônica da Pesquisa**. Edição 5, Ano 5, jun 2008. Disponível em: <http://www.unipam.edu.br/perquirere/file/file/2008_cb/artigo_eni.pdf>. Acesso em: 15 nov 2010.

AMOS, S.; BINDA, L.; KUNLE, O.F; WAMBEBE, C.; GAMANIEL, K. Uterotonic properties of the ethanolic extract of *Byrsocarpus coccineus*. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, p. 33–38, 2002.

ANDRIOLLI, A. C., SANTOS, D. da S., TEIXEIRA, S. C. G., TEIXEIRA, L. R., BERALDO, H., ZIOLLI, R. L. Avaliação do potencial citotóxico de 2-piridiniformamida tiossemicarbazonas e de seus complexos de Fe (III) utilizando *Artemia salina*. **Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal**, v. 8, n. 2, 19-23, 2007.

ASANO, N.; YAMAUCHI, T.; KAGAMIFUCHI, K.; SHIMIZU, N.; TAKAHASHI, S.; TAKATSUKA H.; IKEDA, K.; KIZU, H.; CHUAKUL, W.; KETTAWAN, A.; OKAMOTO, T. Iminosugar-Producing Thai Medicinal Plants. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 8, p. 1238-1242, 2005.

ASCHFALK, A; STEINGASS, H; MULLER, W; DROCHNER, W. Acceptance and digestibility of some selected browse feeds with varying tannin content as supplements in sheep nutrition in west Africa. **Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine**, v. 47, n. 9, 513-24, 2000.

AYRES, M. C. C.; BRANDÃO, M. S.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; MENOR, J. C. A. S.; SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 90-97, 2008.

BADAMI, R.C.; PATIL, K.B., 1981. Structure and occurrence of unusual fatty acids in minor seed oils. *Progress in Lipid Research* 19: 119–153. In: PEDNEAULT, K.; ANGERS, P.; GOSELIN, A.; TWEDDELL, R. J. Fatty acid composition of lipids from mushrooms belonging to the family Boletaceae. **Mycological Research**, v. 110, p. 1179 -1183, 2006.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2001.cap. 2, p. 53.

BASTOS, M. L. A. **Avaliação da atividade antimicrobiana “in vitro e in vivo” e estudo químico biomonitorado de *Piper hayneanum* C. DC. (Piperaceae) e *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae)**. Maceió, 2008. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas.

BAYOUNI, S.A.L., ROWAN, M.G., BEECHING, J.R., BLAGBROUGH, I.S. Constituents and secondary metabolite natural products in fresh and deteriorated cassava roots. **Phytochemistry**, v.71, p. 598-604, 2010.

BERO, J.; GANFON, H.; JONVILLE, M.-C.; FRÉDÉRICH, M.; GBAGUIDI, F.; DEMOL, P.; MOUDACHIROU, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. *In vitro* antiplasmodial activity of plants used in Benin in traditional medicine to treat malaria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 439–444, 2009.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL, 2009a. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2009. 160 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/diretrizes_epidemias_dengue_11_02_10.pdf> Acesso em: 01 nov. 2010.

BRASIL, 2009b. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica. 7. ed. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2009. 816 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_febre_amarela_09_12_09.pdf>. Acesso em: 01 nov. 2010.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

BRITANNICA, **Encyclopædia Online**. Connaraceae. Disponível em: <<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/132916/Connaraceae>>. Acesso em: 01 dez 2010.

CÁCERES, A.; LÓPEZ, B.; GONZÁLEZ, S.; BERGER, I.; TADA, I.; MAKI, J. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, n. 3, p. 195-202, 1998.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-103, 1998.

CERQUEIRA, F. M.; DE MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CHIOMA, N.K.; IRUKA, N.O.; ADEBAYO, L.; SIMEON, A.K.; OLIADIPO, A. Antibacterial activity of aqueous extracts of selected chewing sticks. **The journal of contemporary dental practice**, v. 6, n. 3, p. 86-94, 2005.

Ciclo evolutivo do *Aedes aegypti*. Disponível em: <<http://www.prdu.unicamp.br/dengue/dengue.html>>. Acesso em: 20 nov 2010.

COLOMBO, A.L. Apresentação. In: PASQUALOTTO, A. C. & SCHWARZBOLD, A. V. **Doenças infecciosas**: consulta rápida. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 15-16.

COSTA, J.G.M.; RODRIGUES, F.F.G.; ANGÉLICO, E.C.; SILVA, M.R.; MOTA, M.L.; SANTOS, N.K.A.; CARDOSO, A.L.H.; LEMOS, T.L.G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n.4, p. 304-309, 2005.

CURSINO, L.M.C.; MESQUITA, A.S.S.; MESQUITA, D.W.O.; FERNANDES, C.C.; PEREIRA JUNIOR, O.L.; AMARAL, I.L.; NUNEZ, C.V. Triterpenos das folhas de *Minuartia guianensis* Aubl. (Olacaceae). **Acta amazônica**, v. 39, n. 1, p. 181-186, 2009.

DA LUZ, P.L.; LAURINDO, F.R. Radicais livres e antioxidantes em doenças cardiovasculares. In: BATLOUNI, M.; RAMIRES, J. A. F. **Farmacologia e terapêutica cardiovascular**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. cap. 33, p. 519.

DÉCIGA-CAMPOS, M.; RIVERO-CRUZ, I.; ARRIAGA-ALBA, M.; CASTAÑEDA-CORRAL, G.; ANGELES-LÓPEZ, G.E.; NAVARRETE, A.; MATA, R. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 334-342, 2007.

Eclosão das larvas de *Artemia salina*. ARTOXKIT M™ MICROBIOTESTS. Disponível em: <<http://www.microbiotests.be/toxkits/artoxkit.pdf>>. Acesso em: 15 nov 2010.

EIRAS, E. A. **Culicidae**. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. cap. 43, p. 355.

ELLIS, M.D.; BAXENDALE, F.P. Toxicity of seven monoterpenoids to tracheal mites (*Acar*i: Tarsonemidae) and their honey bee (*Hymenoptera*: Apidae) hosts when applied as fumigants. **J. Economic Entomology**, v. 90, p. 1087-1091, 1997.

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

FORERO, H. A revision of american species of *Rourea* Subg. *Rourea* (Connaraceae). **Mem New York Bot Garden**, v.26, n.1, p.1-119, 1976.

FORERO, E. Uma nueva especie mexicana de *Rourea* (Connaraceae). **Caldasia**, v.29, n.1, p. 19-21, 2007.

FORERO, E. Connaraceae. **Flora Neotropica Monograph**, v. 36, p. 1-208, 1983.

FORERO, E. **Neotropical Connaraceae**. Disponível em: <<http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Connaraceae.htm>>. Acesso em: 15 nov. 2010.

FURTADO, R.F.; LIMA, M.G.A.; NETO, M.A.; BEZERRA, J.N.S.; SILVA, M.G.V. Atividade Larvicida de Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 843-847, 2005.

GARONA, D.; CHOSSON, E.; RIOULT, J.-P.; PECOULAS, P.E.; BRASSEUR, P.; VÉRITÉ, P. Poisoning by *Cnestis ferruginea* in Casamance (Senegal): An etiological approach. **Toxicon**, v. 50, p. 189–195, 2007.

HAYLER, R.; STEINGASS, H.; DROCHNER, W. Effect of various feedstuffs rich in tannin content on rumen methanogenesis *in vitro* – using the Hohenheim gas test. **Proc. Soc. Nutr. Physiol.**, v. 7, p. 35, 1998.

HE, Z-D.; MA, C.-Y.; TAN, G.T.; SYDARA, K.; TAMEZ, P.; VONG, B.S.; BOUAMANIVONG, S.; SOEJARTO, D.D.; PEZZUTO, J.M.; FONG, H.H.S.; ZHANG H.-J. Rourinoside and Rouremin, antimalarial constituents from *Rourea minor*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1378-1384, 2006.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

ISHOLA, I.O.; ASHOROBI, R.B. Anti-stress potencial of aqueous root extract of *Cnestis ferruginea*. **International Journal of Pharmacology**, v. 3, n. 3, p. 295-298, 2007.

JEANNODA, V.L.; RAKOTO-RANOROMALALA, D.A.; VALISOLALAO, J.; CREPPY, E.E.; DIRHEIMER, G. Natural occurrence of methionine sulfoximine in the Connaraceae family. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 14, n. 1, p. 11-17, 1985.

JIANG, J.; FANG, S.; XU, C.; LUO, J. Chemical constituents of *Rourea microphylla* (Hook. et Arn) Planch. **Zhiwu Xuebao**, v. 32, n. 5, p. 376-9, 1990.

KALEGARI, M. **Composição Fitoquímica e Atividades Biológicas de Rourea induta Planch, Connaraceae**. Curitiba, 2009. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, UFPR, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos.

KAMANZI ATINDEHOU, K.; KONÉ, M.; TERREAUX, C.; TRAORE, D.; HOSTETTMANN, K.; DOSSO, M. Evaluation of the antimicrobial potential of medicinal plants from the Ivory Coast. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 5, p. 497-502, 2002.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R.N. Patologia geral das doenças infecciosas. **Robbins: patologia básica**. Trad. 8th. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. cap. 9, p. 349-370.

KUWABARA, H.; MOURI, K.; OTSUKA, H.; KASAI, R.; YAMASAKI, K. Tricin from a Malagasy Connaraceous Plant with Potent Antihistaminic Activity. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 9, p. 1273-1275, 2003.

LE GRAND, A.; WONDERGEM, P.A.; VERPOORTE, R.; POUSET, J.L. Anti-infectious phytotherapies of the tree-savannah of Senegal (West-Africa) II. Antimicrobial activity of 33 species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, n. 1, p. 25-31, 1988.

LE, P.M.; MARTIN, M.-T.; HUNG, N.V.; GUÉNARD, D.; SÉVENET, T.; PLATZER, N. NMR study of quinolizidine alkaloids: relative configurations, conformations. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, n. 4, p. 283-293, 2005.

LENZA, E.; FERREIRA J.N.; CONSOLARO, H.; AQUINO, F.G. Biologia reprodutiva de *Rourea induta* Planch. (Connaraceae), uma espécie heterostífica de cerrado do Brasil Central. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 389-398, 2008.

LOPES, W.B.; MORONI, F.T.; BRANDEBURGO, H.M.I.; HAMAGUCHI, A. **Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais**. Disponível em: <<http://www.scribd.com/doc/8390956/Avaliacao-de-Toxicidade-de-Extratos-Vegetais>>. Acesso em: 15 nov 2010.

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

MACHADO, A. Uso tópico de antimicrobianos. In: BARROS, E. *et al.* Antimicrobianos: consulta rápida. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. cap. 7, p. 107-115.

MACHADO, A. & BARROS, E. Princípios básicos do uso de antimicrobianos. In: BARROS, E. *et al.* Antimicrobianos: consulta rápida. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. cap. 1, p. 17-23.

MAHATO, S.B., KUNDU, A.P. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - A Compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

MARCANO, D.; FIFFE, S. P.; RAMIREZ, I. Chemical constituents of *Connarus venezuelensis* B. A preliminary study. **Acta Científica Venezolana**, v. 35, n. 3-4, p. 241-3, 1984.

MARQUES, V.L.L. **Derivados dicromenoxantônicos e terpenoídicos das raízes de *Tovomita brasiliensis* (Guttiferae)**. Maceió, 2001. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Alagoas.

MATTHAUS, B.; VOSMANN, K.; PHAM, L.Q.; AITZETMÜLLER, K. FA and Tocopherol Composition of Vietnamese Oilseeds. **JAOCs**, v. 80, n. 10, 2003.

MCLAUGHLIN, J.L.; CHANG, C-J.; SMITH, D.L.; In **Studies in Natural Products Chemistry**, Vol. 9, Ed. Atta-ur- Rahman, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1991, p. 383-409.

MESIA, G.K.; TONA, G.L.; NANGA, T.H.; CIMANGA, R.K.; APERS, S.; COS, P.; MAES, L.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J. Antiprotozoal and cytotoxic screening of 45 plant extracts from Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 409-415, 2008.

MEYER, B.N., FERRIGNI, N.R., PUTNAM, J.E., JACOBSEN, L.B., NICHOLS, D.E., MCLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med.**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. Oxidales, Connaraceae. Disponível em: <www.mobot.org>. Acesso em: 05 dez. 2010.

MICHAEL, A. S.; THOMPSON, C. G.; ABRAMOVITZ, M. *Artemia salina* as a Test Organism for Bioassay. **Science**, v. 1, n. 123, p. 464, 1956. Disponível em: <www.sciencemag.org>. Acesso em: 16 de nov. 2010.

MIZUSHINA, Y.; NAKANISHI, R.; KURIYAMA, I.; KAMIYA, K.; SATAKE, T.; SHIMAZAKI, N.; KOIWAI, O.; UCHIYAMA, Y.; YONEZAWA, Y.; TAKEMURA, M.; SAKAGUCHI, K.; YOSHIDA, H. β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside: A eukaryotic DNA polymerase λ inhibitor. **Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 99, p. 100-107, 2006.

MS. Ministério da Saúde, 2009. **Dengue-Histórico**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31123>. Acessado em: 01 nov. 2010.

MS/FUNASA. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD)**. Brasília/DF, 2002. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pncd_2002.pdf>. Acesso em: 01 set. 2008.

MS/SVS. Febre Amarela Silvestre, Brasil, 2009. **BOLETIM DE ATUALIZAÇÃO – Dezembro/2009 Emergências em Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN) de Febre Amarela Silvestre em São Paulo e no Rio Grande do Sul e a Situação Epidemiológica Atual no Brasil (2008/2009)**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_febre_amarela_09_12_09.pdf. Acessado em: 02/11/2010.

MS/SVS, 2010a. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **NOTA TÉCNICA N.º 118 / 2010 CGPNCD/DEVEP/SVS/MS**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_denv_4_24_09_2010_eh.pdf>. Acesso em: 01 nov. 2010.

MS/SVS, 2010b. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Informe Epidemiológico da Dengue Análise de situação e tendências - Até a semana 26 de 2010**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_se_26_final_11_8_10.pdf>. Acesso em: 01 nov. 2010.

MS/SVS, 2010c. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **NOTA TÉCNICA N.º 162 / 2010 CGPNCD/DEVEP/SVS/MS**. Casos importados da Febre do Chikungunya Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_162_20100001_dengue.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2011.

MSENGI, L.M; MOSHA, R.D; MATOVELO, J.A.; HANSEN, N.G. The toxicity of *Burttia prunoides* in rats and goats. **Veterinary and human toxicology**, v. 29, n .5, p. 398-400, 1987.

MUGERA, G.M.; JIWA, S.F. Acute *Burttia prunoides* toxicity in livestock. **Bulletin des epizooties en Afrique**, v. 18, n. 3, 253-8, 1970.

MURAKOSHI, I.; SEKINE, T.; MAESHIMA, K.; IKEGAMI, F.; YOSHINAGA, K.; FUJII, Y.; OKONOGI, S. Absolute configuration of L-methionine sulfoximine as a toxic principle in

Cnestis palala (Lour.) Merr. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 41, n. 2, 388-90, 1993.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada**. Trad. ANVISA. 6 ed. M7-A6, v. 23, n. 2, 2003.

NOVY, J.W. Medicinal plants of the eastern region of Madagascar. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, p. 119-126, 1997.

OGA, S., 1937. **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2003. cap. 1, p. 40.

OGBECHIE, A.K.; OLUGBADE, T.A.; OLUWADIYA, J.O. Chemical constituents of *Cnestis ferruginea* DC: II. Petroleum ether extract of the fruit. **Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 2, 36-8, 1987.

OGBEDE, O.N.; EGUAVOEN, O.I.; PARVEZ, M. Chemical studies in the anthocyanins of the flowers of local plants. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v. 8, n. 4, 545-7, 1986.

OKE, J.M.; HAMBURGER, M.O. Screening of some Nigerian medicinal plants for antioxidant activity using 2,2-diphenyl-picryl-hydrazyl radical. **African Journal of Biomedical Research**, v. 5, p. 77-79, 2002.

OLIVEIRA, V.O., FERREIRA JÚNIOR, J.C., MOURA, F. S.; LIMA, G. S., OLIVEIRA, F. M., OLIVEIRA, P. E. S.; CONSERVA, L. M.; GIULIETTI, A. M., LEMOS, R. P. L. Larvicidal activity of 94 extracts from ten plant species of northeastern of Brazil against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Parasitol Res**, v. 107, p. 403-407, 2010.

OLOWOKUDEJO, J. D.; KADIRIY, A. B.; TRAVIHZ, V. A. An Ethnobotanical Survey of Herbal Markets and Medicinal Plants in Lagos State of Nigeria. **Ethnobotanical Leaflets**, v. 12, n. 1, p. 851-65, 2008.

OLUGBADE, T.A.; OLUWADIYA, J.O.; YISAK, W.AB. Chemical constituents of *Cnestis ferruginea* DC. I. Petroleum ether fraction. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 6, n. 3, p. 365-70, 1982.

ONG, H.C.; NORDIANA, M. Malay ethno-medico botany in Machang, Kelantan, Malaysia. **Fitoterapia**, v. 70, p. 502-513, 1999.

OTSHUDI, A.L.; VERCRUYSSSE, A.; FORIERS, A. Antidiarrhoeal activity of root extracts from *Roureopsis obliquifoliolata* and *Epinetrum illosum*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 291-294, 2001.

PAREKH, J.; CHANDA, S.V. Antibacterial Activity of Aqueous and Alcoholic Extracts of 34 Indian Medicinal Plants against Some *Staphylococcus* Species. **Turk J Biol**, v. 32, p. 63-71, 2008.

PARRA, A.L., YHEBRA, R.S., SARDINAS, I.G., BUELA, L.I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the Medium Lethal Dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, p. 395-400, 2001.

PARVEZ, M.; RAHMAN, A. A novel antimicrobial isoflavone galactoside from *Cnestis ferruginea* (Connaraceae). **J. Chem. Soc. Pakistan**, v. 14, p. 221-223, 1992.

PASQUALOTTO, A. C. & SCHWARZBOLD, A. V. Prefácio. **Doenças infecciosas: consulta rápida**. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 17-19.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v. 67, n. 5, p. 289-297, 1997.

POPOVKIN, A. **Fotos *Rourea doniana* Baker, Connaraceae**. Bahia, Brazil. Disponível em: <http://www.flickr.com/photos/plants_of_russian_in_brazil/3120765088/in/set-72157611417943030/>. Acesso em: 01 nov 2010.

RÁCZ, M. L. Doenças virais transmitidas por artrópodes e roedores. In: Trabulsi, L.K.; Alterthum, F.; Martinez, M.B.; Campos, L.C.; Gompertz, O.F.; RÁCZ, M.L. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. cap. 97, p. 671.

RAHUMAN, A.A.; GOPALAKRISHNAN, G.; VENKATESAN, P.; GEETHA, K. Isolation and identification of mosquito larvicidal compound from *Abutilon indicum* (Linn.) Sweet. **Parasitol Res**, v. 102, p. 981-988, 2008.

RAMIAH, N.; PRASAD, N. B. R.; NAIR, G. A. Chemical investigation of the fruits (seeds, pericarp and aril) of *Connarus monocarpus*. **Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry**, v. 14B, n. 6, p. 475, 1976.

RAMIAH, N.; PRASAD, N. B. R.; ABRAHAM, KOSHY. Rapanone and leucopelargonidin from the roots of *Rourea santaloides*. **Journal of the Institution of Chemists (India)**, v. 48, p. 196-7, 1976.

RAMOS, S.C.S.; OLIVEIRA, J.C.S.; CÂMARA, C.A.G.; CASTELAR, I.; CARVALHO, A.F.F.U.; LIMA-FILHO, J.V. Antibacterial and cytotoxic properties of some plant crude extracts used in Northeastern folk medicine. **Rev. bras. Farmacogn**, v. 19, n. 2a, p. 376-381, 2009.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. Ed. Premier, São Paulo, 1997.

RUEBHART, D.R.; COCK, I.E.; SHAW, G.R. Brine Shrimp Bioassay: Importance of Correct Taxonomic Identification of *Artemia* (Anostraca) Species. **Environmental Toxicology** DOI 10.1002/tox. Publicação online em 23 Jan 2008 em Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). p. 555-560, 2008.

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

- SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS/UFSC, 2007. cap. 15, p. 371.
- SILVA, P. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
- SILVA, M.B.S. Flavonóides com capacidade antioxidante. **Química Aplicada**, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. Disponível em: <<http://www.dp.fct.unl.pt>>. Acessado em: 08/08/2008.
- SILVA, T.M.S., CARVALHO, M.G., BRAZ-FILHO, R. Estudo espectroscópico em elucidação estrutural de flavonóides de *Solanum jabrense* Agra & Nee e *S. paludosum* Moric. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1119-1128, 2009.
- SIMAS, N.K.; DE LIMA, E.C.; CONCEIÇÃO, S.R.; KUSTER, R.M.; FILHO, A.M.; LAGE, C.S. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue - atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**, v. 27, n.1, p. 46-49, 2004.
- SIQUEIRA, J.M.; BOMM, M.D. ; PEREIRA, N.F.G.; GARCEZ, W.S.; BOAVENTURA, M.A.D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* leach. **Química Nova**, v. 21, n.5, p. 557-559, 1998.
- SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.
- SOLER-RIVAS, C.; ESPÍN, J.C.; WICHERS, H.J. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 1-9, 2000.
- SOLIS, P.N.; WRIGHT, C.W.; ANDERSON, M. M.; GUPTA, M. P.; PHILLIPSON, J. D. A microwell cytotoxicity using *Artemia salina* (Brine shrimp). *Planta Med.*, **59**, 250-252, 1992.
- SOUSA, C.M.M.; ROCHA E SILVA, H.; VIEIRA-JR., G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C. L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
- SPENCER, G.F.; PAYNE-WAHL, K.; PLATTNER, R.D.; KLEIMAN, R. Lactobacillic and Methyl-Branched Olefinic Acids in *Byrsocarpus coccineus*. **Seed Oil, Lipids**, v. 14, p. 72-74, 1979. In: CARBALLEIRA, M. *et al.* Fatty Acid Composition of Bacteria Associated with the Toxic Dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis* and with Caribbean *Palythoa* Species Néstor. *Lipids*, Vol. 33, no. 6, 627-632, 1998.
- TAUIL, P.L. Urbanization and dengue ecology. **Caderno de Saúde Pública**, v. 17, p. 99-102, 2001.
- TAUIL, P.L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 867-871, 2002.
- TRIPATHI, K.D. **Farmacologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

TUNG, Y.-T.; WU, J.-H.; KUO, Y.-H.; CHANG, S.-T. Antioxidant activities of natural phenolic compounds from *Acacia confusa* bark. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1120-1123, 2007.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

VASCONCELOS, P.F.C. Febre amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 275-293, 2003.

VENZKE, D. *et al.* Eficiência do Cloreto de 2,3,5-Trifenil Tetrazólio em teste de atividade antibacteriana “in vitro”. XVI Encontro de Química da Região Sul (16-SBQSul). FURB, 2008. Disponível em:
<http://www.furb.br/temp_sbqsul/_app/_FILE_RESUMO_CD/398.pdf>. Acesso em: 15 nov 2010.

VICKERY, M; VICKERY, B. Coumarins and related compounds in members of the Connaraceae. *Toxicology Letters*, v. 5, n. 2, p. 115-118, 1980.

WIART, C. Medicinal plants of Asia and the Pacific. Chapter 18. **Medicinal Plants Classified in the Family Connaraceae**, p. 118. Taylor & Francis Group, 2006.

WRIGHT, J.L., MCINNES, A.G., SHIMIZU, S., SMITH, D.G., WALTER, J.A., IDLER, D., KHALIL, W. **Can. J. Chem.**, v. 56, p. 1898, 1978.

WHO – World Health Organization. Instructions for Determining the Susceptibility or Resistance of Mosquito Larvae to Insecticide. WHO/VBC/81.807, 1-6.995, 1981.

ZULLI, F.; LIECHTI, C.H.; SUTER, F. Controlled delivery of lipophilic agents to cell cultures for *in vitro* toxicity and biocompatibility assays. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 22, n. 4, p. 265-270, 2000.