



CÂMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS HENRIQUE SANTILLO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *stricto sensu*
MESTRADO EM CIÊNCIAS APLICADAS A PRODUTOS PARA A SAÚDE (CAPS)

POTENCIAL TÓXICO DAS FOLHAS DE *Esenbeckia*
***pumila* Pohl (Rutaceae)**

Anápolis – GO

2017

GEANE KARLA GONÇALVES FERREIRA DUARTE

**POTENCIAL TÓXICO DAS FOLHAS DE *Esenbeckia*
pumila Pohl (Rutaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Pesquisa e Obtenção de Produtos Naturais e Sintéticos

Orientador: Dr. Antônio Carlos Severo Menezes

Coorientador: Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves

Anápolis – GO

2017

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UEG
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

G643p Gonçalves Ferreira Duarte, Geane Karla
 POTENCIAL TÓXICO DAS FOLHAS DE *Esenbeckia pumila* Pohl
 (Rutaceae) / Geane Karla Gonçalves Ferreira Duarte; orientador Antônio
 Carlos Severo Menezes; co-orientador Plínio Lázaro Faleiro Naves. --
 ANAPOLIS, 2017.
 115 p.

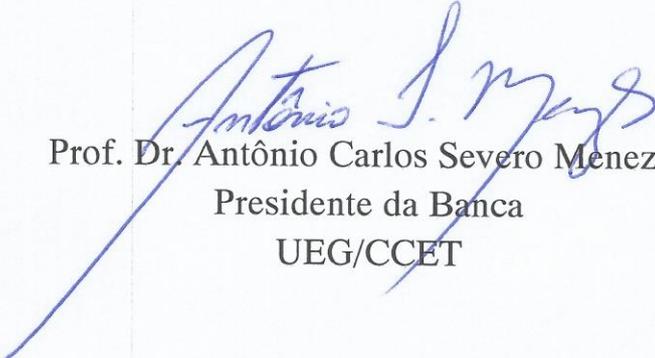
 Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação Mestrado
 Acadêmico em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde) --
 Câmpus-Anápolis CET, Universidade Estadual de Goiás, 2017.

 1. Extratos vegetais. 2. Fitoquímica. 3. Metabólitos secundários. 4.
 Atividade biológica. I. Severo Menezes, Antônio Carlos, orient. II. Faleiro
 Naves, Plínio Lázaro, co-orient. III. Título.

Geane Karla Gonçalves Ferreira Duarte

“Potencial tóxico das folhas de *Esenbeckia pumila* Pohl (Rutaceae)”

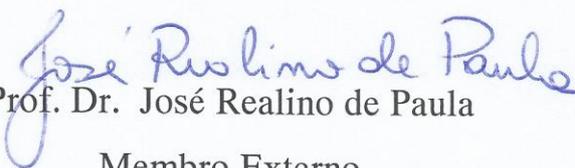
Dissertação defendida no Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás, para a obtenção do título de Mestre, aprovada em 28 de novembro de 2017, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores



Prof. Dr. Antônio Carlos Severo Menezes
Presidente da Banca
UEG/CCET



Profa. Dra. Maísa Borges Costa
Membro Interno
UEG/CCET



Prof. Dr. José Realino de Paula
Membro Externo
UFG

*Dedico este trabalho à minha família
e ao meu noivo Iron Alves Sertanejo
por sua compreensão, seu
companheirismo e incentivo durante
toda a realização do mesmo.*

AGRADECIMENTOS

- ✓ A Deus, por ter me mantido firme e perseverante no meu propósito;
- ✓ Ao professor Dr. Antônio Carlos Severo Menezes pela oportunidade, disponibilidade e orientação prestada;
- ✓ Ao professor Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves pela orientação e pelo apoio na realização dos testes biológicos;
- ✓ Aos professores da Universidade Estadual de Goiás pelo crescimento intelectual e pessoal proporcionados, especialmente à Dr^a. Joelma Abadia Marciano de Paula e à Dr^a. Luciana Machado, cujos conhecimentos transmitidos me auxiliaram demasiadamente na realização deste estudo;
- ✓ Ao Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará e aos professores Dr. Manoel Odorico de Moraes, Dr^a. Cláudia do Ó Pessoa e a doutoranda Andréa Felinto Moura pela colaboração com a realização dos experimentos de citotoxicidade;
- ✓ Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais - UNESP - Rio Claro e ao professor Dr. Odair Correa Bueno pela colaboração com a realização dos ensaios de toxicidade contra *Atta sexdens rubropilosa*;
- ✓ Ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, pela colaboração na realização dos experimentos de RMN ¹H e ¹³C;
- ✓ Aos meus colegas de laboratório Renato Gomes Santos e Weber Martins da Silva Junior pela constante ajuda na realização de várias etapas deste trabalho;
- ✓ À minha querida mãe Suely por sempre estar ao meu lado em cada momento que se seguiu para a concretização deste projeto;
- ✓ À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

POTENCIAL TÓXICO DAS FOLHAS DE *Esenbeckia pumila* Pohl (Rutaceae): O interesse pelo gênero botânico *Esenbeckia* pauta-se no potencial químico e biológico de suas espécies, bem como de outras plantas de Rutaceae. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial tóxico das folhas de *Esenbeckia pumila* Pohl (Rutaceae). No ensaio contra *Artemia salina*, que consistiu na exposição de náuplios recém-eclodidos ao extrato e às frações, *E. pumila* se mostrou altamente tóxica com valores de CL_{50} iguais a $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $57 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $65 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $149 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o extrato etanólico e as frações diclorometânica, acetato-etílica e hexânica, respectivamente. A avaliação citotóxica em culturas de células tumorais SF-295 (glioblastoma), PC-3 (próstata) e HCT-116 (côlon), realizada através do método colorimétrico de redução do MTT, demonstrou que apenas a fração diclorometânica apresentou efeito citotóxico contra SF-295, ao inibir 75,50% das células e, notavelmente, contra HCT-116, cujo valor de inibição da proliferação celular foi 94,99%. A atividade antibacteriana do extrato etanólico e da fração acetato-etílica contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* foi evidenciada em teste de Concentração Mínima Inibitória (CMI). No ensaio contra *Atta sexdens rubropilosa*, onde a toxicidade foi verificada através da ingestão do extrato e das frações, incorporados à uma dieta artificial sólida, todas as amostras testadas, com exceção do extrato etanólico 0,2 mg, apresentaram taxas de mortalidade significativas de operárias, com destaque para a fração acetato-etílica 2,0 mg, que apresentou mortalidade de 100% no 21º dia e sobrevivência mediana (Md) no 3º dia ($p < 0,05$). Os resultados obtidos nos ensaios biológicos mostraram o potencial antitumoral, antibacteriano e formicida da planta *Esenbeckia pumila* Pohl. A análise fitoquímica levou ao isolamento de uma mistura dos triterpenos α -amirina, β -amirina e lupeol e também do fitoesterol β -sitosterol da fração acetato-etílica e do flavonoide rutina da fração metanólica.

Palavras-chave: Investigação fitoquímica, atividade biológica, *Esenbeckia pumila* Pohl

ABSTRACT

TOXIC POTENTIAL OF THE LEAVES OF *Esenbeckia pumila* Pohl (Rutaceae): Interest in the botanical genus *Esenbeckia* is based on the chemical and biological potential of its species, as well as other plants of Rutaceae. Therefore, the objective of this work was to evaluate the toxic potential of the leaves of *Esenbeckia pumila* Pohl (Rutaceae). In the test against *Artemia salina*, which consisted in the exposure of newly hatched nauplii to the extract and fractions, *E. pumila* showed to be highly toxic with LC₅₀ values equal to 64 µg.mL⁻¹, 57 µg.mL⁻¹, 65 µg.mL⁻¹ and 149 µg.mL⁻¹ for the ethanolic extract and the dichloromethane, ethyl acetate and hexane fractions, respectively. The cytotoxic effect in the SF-295 (glioblastoma), PC-3 (prostate) and HCT-116 (colon) cultures of the tumor cells was evaluated using the colorimetric MTT reduction method, demonstrated that only the dichloromethane fraction showed a cytotoxic effect against SF-295, inhibiting 75.50% of cells and, notably, against HCT-116, whose inhibition value of cell proliferation was 94.99%. The antibacterial activity of the ethanolic extract and the acetate-ethylic fraction against strains of *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis* was evidenced in the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) test. In the assay against *Atta sexdens rubropilosa*, where the toxicity was verified by ingestion of the extract and the fractions, incorporated into the solid artificial diet, all the samples tested, except for the ethanolic extract 0,2 mg, presented significant mortality rates of workers, with a concentration of acetate-ethylic 2,0 mg, which presented 100% mortality on the 21st day and median survival (Md) on the 3rd day (p < 0,05). The results obtained in the biological tests showed the antitumor, antibacterial and formicidal potential of the *Esenbeckia pumila* Pohl plant. Phytochemical analysis led to the isolation of a mixture of the α-amyrin, β-amyrin and lupeol triterpenes and also of the phytosterol β-sitosterol of the ethyl acetate fraction and the flavonoid rutin of the methanolic fraction.

Key words: Phytochemical research, biological activity, *Esenbeckia pumila* Pohl

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Exemplos de fármacos oriundos de vegetais.....	21
Figura 2 -	Penicilina 6 e captopril 7	22
Figura 3 -	Vincristina 8 , vimblastina 9 , artemisinina 10 e artesunato de sódio 11	23
Figura 4 -	Exemplo de alcoloide derivado do ácido antranílico isolado de Rutaceae.....	25
Figura 5 -	Exemplos de furanocumarina ¹ e piranocumarina ² isoladas de Rutaceae.....	25
Figura 6 -	Exemplo de limonoide isolado de Rutaceae.....	25
Figura 7 -	Exemplo de flavonoide isolado de Rutaceae.....	26
Figura 8 -	<i>Esenbeckia pumila</i> Pohl – CCET (UEG), Anápolis-GO.....	38
Figura 9 -	Estrutura química do flavonoide rutina.....	39
Figura 10 -	Rotas biossintéticas de metabólitos secundários.....	40
Figura 11 -	Exemplos de terpenos extraídos de plantas tóxicas.....	42
Figura 12 -	Exemplos de alcaloides extraídos de plantas tóxicas.....	43
Figura 13 -	Exemplos de compostos fenólicos extraídos de plantas tóxicas.....	44
Figura 14 -	Moléculas antineoplásicas oriundas de <i>Catharanthus roseus</i>	47
Figura 15 -	Moléculas antineoplásicas oriundas de <i>Taxus brevifolia</i>	48
Figura 16 -	Moléculas antineoplásicas oriundas de <i>Podophyllum peltatum</i>	48
Figura 17 -	Moléculas antineoplásicas oriundas de <i>Camptotheca accuminata</i>	49
Figura 18 -	Obtenção de extrato e frações de <i>Esenbeckia pumila</i>	57
Figura 19 -	Fluxograma do isolamento de EP-01 e de EP-02.....	58
Figura 20 -	Fluxograma do isolamento de EP-03.....	59

Figura 21 - Ensaio de toxicidade com <i>Artemia salina</i>	60
Figura 22 - Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> com células tumorais.....	63
Figura 23 - <i>Layout</i> da placa de CMI.....	67
Figura 24 - Ensaio de atividade inseticida <i>in vitro</i> com <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	69
Figura 25 - Representação estrutural das substâncias isoladas das folhas de <i>E. pumila</i>	74
Figura 26 - Espectro de RMN ¹ H de EP-01, com expansão da região de δ 5,2 a 2,40 ppm (CDCl ₃ , 500 MHz).....	78
Figura 27 - Espectro de RMN ¹³ C de EP-01 (CDCl ₃ , 125 MHz).....	79
Figura 28 - Espectro de RMN ¹ H de EP-02 (CDCl ₃ , 500 MHz).....	82
Figura 29 - Espectro de RMN ¹ H de EP-03 (MeOD, 500 MHz).....	86
Figura 30 - Espectro de RMN ¹³ C de EP-03 (MeOD, 125 MHz).....	87
Figura 31 - Percentual de inibição do crescimento tumoral <i>in vitro</i>	91
Figura 32 - Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial do extrato EPFE.....	95
Figura 33 - Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial da fração EPFEH.....	96
Figura 34 - Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial da fração EPFED.....	97
Figura 35 - Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial da fração EPFEA.....	99

Figura 36 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial da fração EPFEM.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Materiais utilizados para cromatografia.....	54
Tabela 2 -	Reagentes utilizados para cromatografia.....	54
Tabela 3 -	Equipamentos utilizados para cromatografia.....	54
Tabela 4 -	Reações realizadas na prospecção fitoquímica preliminar de <i>Esenbeckia pumila</i>	56
Tabela 5 -	Classificação de toxicidade segundo Nguta et al. (2011).....	62
Tabela 6 -	Microrganismos utilizados nos ensaios microbiológicos.....	65
Tabela 7 -	Classificação de atividade antimicrobiana segundo Holetz et al. (2002).....	68
Tabela 8 -	Resultados das reações de caracterização de metabólitos secundários de <i>Esenbeckia pumila</i>	73
Tabela 9 -	Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) de α-amirina, β-amirina e lupeol identificados em comparação a dados encontrados na literatura.....	80
Tabela 10 -	Deslocamentos químicos de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de β-sitosterol identificado em comparação a dados encontrados na literatura.....	83
Tabela 11 -	Deslocamentos químicos de RMN ¹ H (MeOD, 500 MHz) e ¹³ C (MeOD, 125 MHz) de EP-03 comparados a valores da literatura.....	88
Tabela 12 -	Resultados obtidos no ensaio de toxicidade com <i>A. salina</i>	89
Tabela 13 -	Percentual de inibição do crescimento tumoral <i>in vitro</i>	90
Tabela 14 -	Atividade antimicrobiana segundo a Concentração Mínima Inibitória dos compostos.....	93

Tabela 15 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> no bioensaio com EPFE nas concentrações 0,2; 1,0 e 2,0 mg.mL ⁻¹	95
Tabela 16 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> no bioensaio com EPFEH nas concentrações 0,2; 1,0 e 2,0 mg.mL ⁻¹	96
Tabela 17 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> no bioensaio com EPFED nas concentrações 0,2; 1,0 e 2,0 mg.mL ⁻¹	98
Tabela 18 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> no bioensaio com EPFEA nas concentrações 0,2; 1,0 e 2,0 mg.mL ⁻¹	99
Tabela 19 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> no bioensaio com EPFEM nas concentrações 0,2; 1,0 e 2,0 mg.mL ⁻¹	100

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais substâncias isoladas do gênero <i>Esenbeckia</i>	27
Quadro 2 - Atividades biológicas de algumas espécies do gênero <i>Esenbeckia</i>	37
Quadro 3 - Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) do extrato e das frações.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Cell Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BOD	Demanda Biológica de Oxigênio
CCET	Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas
CCD	Cromatografia em Camada Delgada analítica
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CDCI ₃	Clorofórmio deuterado
CL ₅₀	Concentração Letal Média
CoA	Coenzima A
DHC	Dihidrocorinanteol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
EPFE	<i>Esenbeckia pumila</i> – folhas etanol
EPFEA	<i>Esenbeckia pumila</i> – folhas – etanol – acetato de etila
EPFED	<i>Esenbeckia pumila</i> – folha – etanol – diclorometano
EPFEH	<i>Esenbeckia pumila</i> – folhas – etanol – hexano
EPFEM	<i>Esenbeckia pumila</i> – folhas – etanol – metanol
HCT-116	Linhagem de células de câncer de cólon
IC	Inibição do Crescimento
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Md	Sobrevivência mediana
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium
PC-3	Linhagem de células de câncer de próstata
ppm	Partes por milhão
PVC	Policloreto de vinila
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio 1
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13
RMPI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SF-295	Linhagem de células de Glioblastoma
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
Hz	Hertz
h	Altura
J	Constante de acoplamento
m	Multiplete
s	Simpleto
t	Triplete
tdd	Triplo duplo dupleto
δ	Deslocamento químico em partes por milhão
\emptyset	Diâmetro
α	Alfa
β	Beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 PRODUTOS NATURAIS.....	20
2.2 Rutaceae.....	24
2.3 <i>Esenbeckia</i>	26
2.4 <i>Esenbeckia pumila</i> Pohl.....	38
2.5 METABOLISMO SECUNDÁRIO DE PLANTAS.....	39
2.6 TOXICIDADE DE PLANTAS.....	41
2.7 PRODUTOS NATURAIS BOTÂNICOS NA TERAPÊUTICA DO CÂNCER.....	45
2.8 MOLÉCULAS COM AÇÃO ANTIMICROBIANA.....	49
2.9 FORMIGAS CORTADEIRAS E A ATIVIDADE INSETICIDA DE PLANTAS.....	50
3 OBJETIVOS.....	53
3.1 OBJETIVO GERAL.....	53
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	54
4.1 MATERIAIS, REAGENTES E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	54
4.2 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO.....	55
4.3 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA PRELIMINAR.....	55
4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO E DAS FRAÇÕES.....	56
4.5 ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE <i>E.</i> <i>pumila</i>	57
4.5.1 Isolamento e identificação das substâncias EP-01 e EP-02.....	57
4.5.1 Isolamento e identificação do flavonoide EP-03.....	59
4.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	60
4.6.1 Ensaio de toxicidade contra <i>Artemia salina</i>	60
4.6.2 Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> com células tumorais.....	62
4.6.3 Ensaio de atividade antimicrobiana.....	64

4.6.4 Ensaio de atividade inseticida <i>in vitro</i> contra <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	68
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
5.1 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA PRELIMINAR.....	71
5.2 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.....	73
5.2.1 Substâncias isoladas.....	73
5.2.2 Identificação da mistura de triterpenos EP-01.....	75
5.2.3 Identificação do fitoesterol EP-02.....	81
5.2.4 Identificação do flavonoide EP-03.....	84
5.3 ENSAIO DE TOXICIDADE COM <i>Artemia salina</i>	89
5.4 ENSAIO CITOTÓXICO COM CÉLULAS TUMORAIS.....	89
5.5 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	91
5.6 ENSAIO DE ATIVIDADE INSETICIDA CONTRA <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	94
6 CONCLUSÃO.....	103
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105

1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais está relacionada ao desenvolvimento da sociedade desde a origem da humanidade, podendo-se destacar, sem sombra de dúvidas, a importância das plantas nesse processo, uma vez que eram utilizadas tanto na alimentação quanto no tratamento e cura de enfermidades (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Várias substâncias são produzidas metabolicamente pelas plantas, desde macromoléculas (metabólitos primários), essenciais a sobrevivência do organismo, até micromoléculas (metabólitos secundários) produzidas, em sua maioria, como mecanismos de adaptação da planta. O metabolismo secundário origina uma grande quantidade de compostos com importante e significativo valor medicinal e econômico (GARCÍA; CARRIL, 2009; BRAZ FILHO, 2010).

A biodiversidade brasileira, considerada a maior do mundo, é uma fonte inigualável de substâncias de interesse farmacológico. A busca por modelos de fitofármacos, pode contribuir para o avanço da pesquisa multidisciplinar e para o desenvolvimento tecnológico do país (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Como forma racional de obter-se fármacos de origem vegetal pode ser citada a triagem de plantas a partir de dados de estudos fitoquímicos e de atividade biológica realizados com espécies de determinado gênero ou família (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006).

Rutaceae desperta interesse pela importância farmacológica de suas espécies, como algumas pertencentes ao gênero *Esenbeckia*, bastante utilizadas para fins medicinais (COY-BARRERA; CUCA-SUÁREZ; LONDOÑO, 2013). Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo a avaliação do potencial tóxico das folhas da espécie vegetal *Esenbeckia pumila* Pohl (Rutaceae).

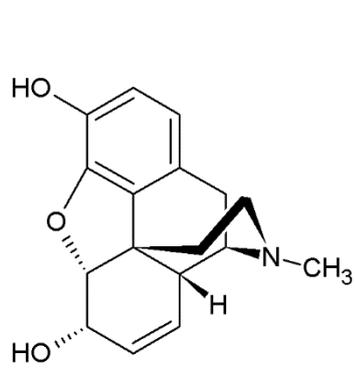
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRODUTOS NATURAIS

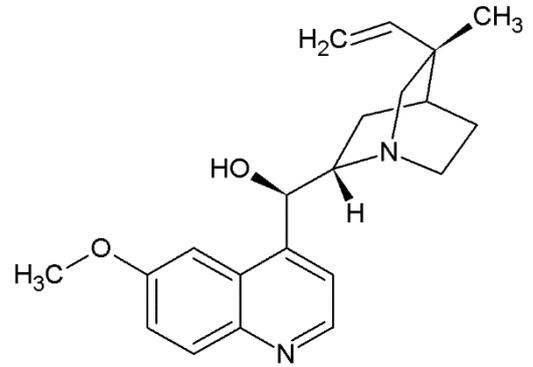
Produtos naturais são definidos, na área química, como compostos produzidos através do metabolismo secundário de organismos vivos tais como bactérias, fungos e plantas (EMERY; SANTOS; BIANCHI, 2010). Em geral, essas substâncias apresentam atividade biológica e sua utilização pelo homem, para fins terapêuticos, é bastante documentada desde a antiguidade (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Vários reinos da natureza contribuíram significativamente para a descoberta e o desenvolvimento de fármacos ao longo da história. Substâncias como a morfina **1**, a quinina **2**, a tubocurarina **3**, o ácido acetilsalicílico **4**, a digitoxina **5** (**Figura 1**) entre outras, todas oriundas de vegetais, sempre apresentaram relevância indiscutível para a terapêutica farmacológica (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

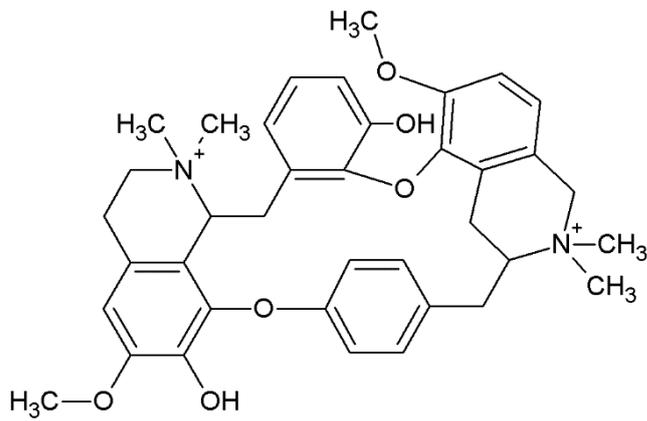
Figura 1 - Exemplos de fármacos oriundos de vegetais



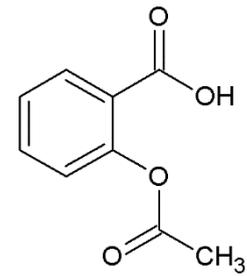
Morfina 1



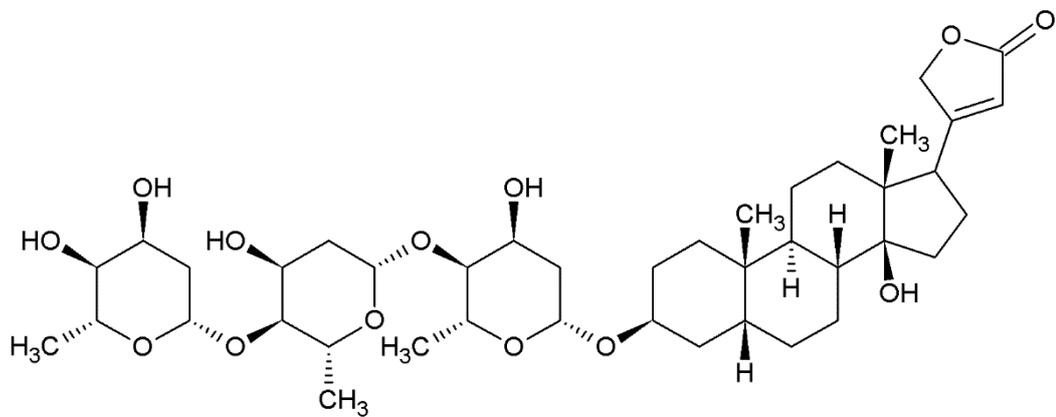
Quinina 2



Tubocurarina 3



Ácido Acetilsalicílico 4

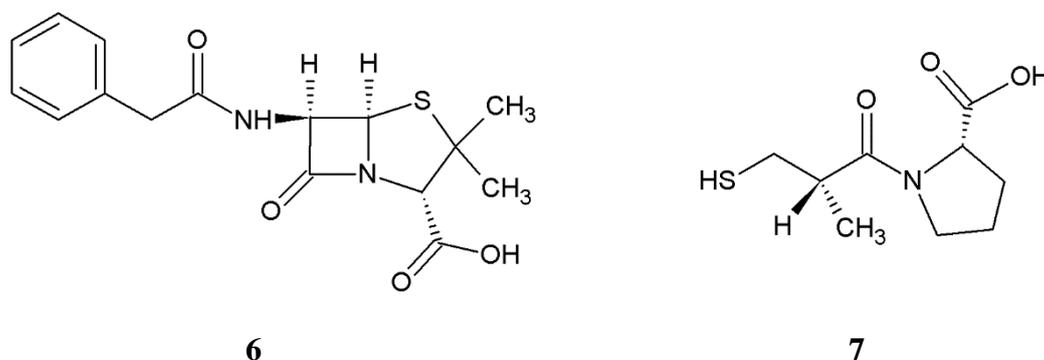


Digitoxina 5

Fonte: Adaptado de Barreiro e Bolzani (2009)

A descoberta ao acaso da penicilina (**6**) (**Figura 2**), produzida por fungos do gênero *Penicillium*, revolucionou a medicina do século XX e impulsionou enormemente o desenvolvimento de antibióticos. A obtenção do captopril (**7**) (**Figura 2**), a partir de uma substância presente no veneno da jararaca, foi de suma importância para o tratamento da hipertensão (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Figura 2 - Penicilina 6 e captopril 7



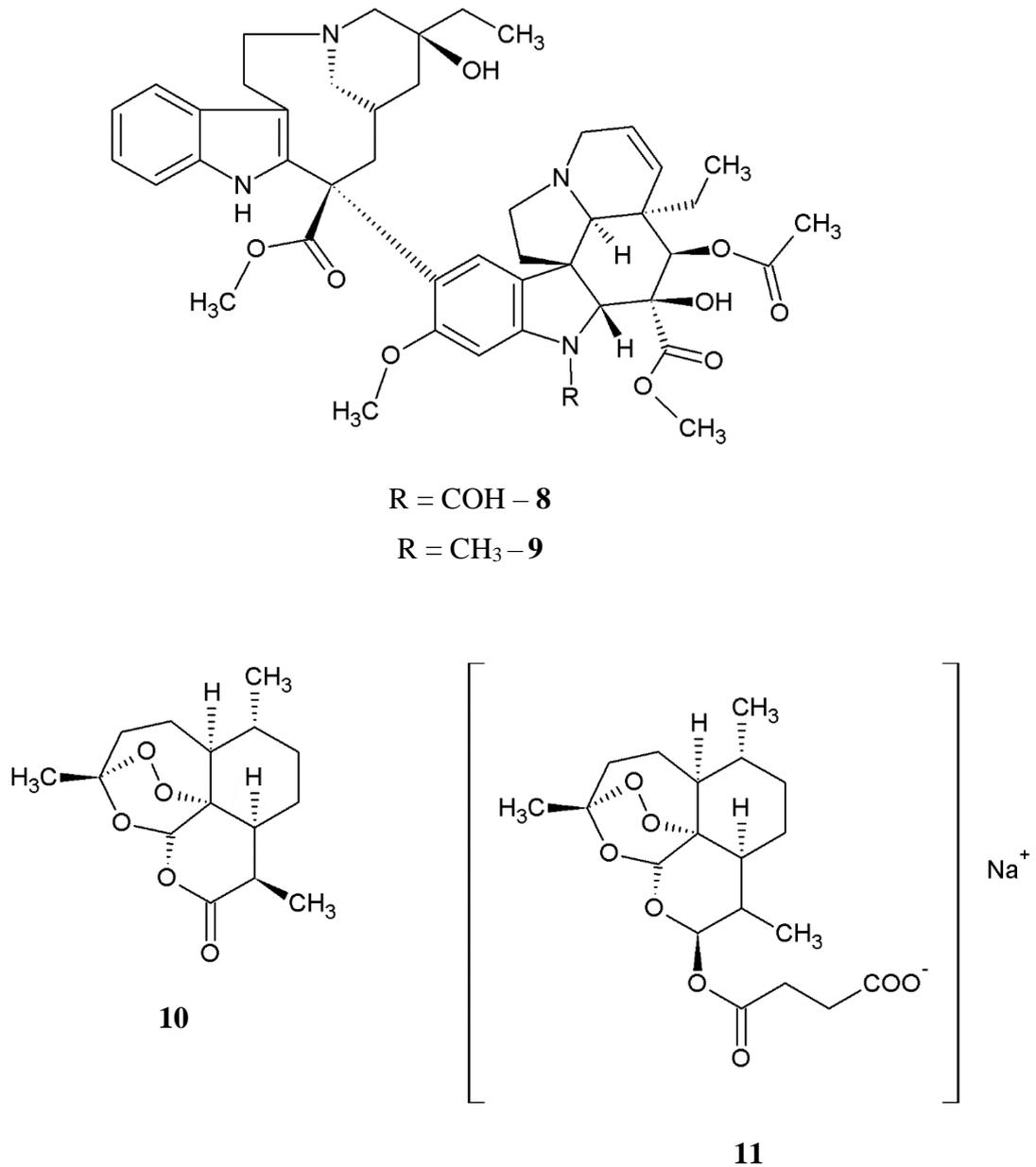
Fonte: Adaptado de Barreiro e Bolzani (2009)

É inquestionável o aporte de produtos de origem natural à obtenção de medicamentos, sendo que, atualmente, mais de 40% dos disponíveis, incluindo antimicrobianos, agentes antitumorais e antilipidêmicos, são constituídos por produtos naturais e seus derivados, o que ressalta sua importância para a saúde humana (AWAN; SHAW; ELLIS, 2016).

O interesse em produtos naturais tem sido retomado pela indústria farmacêutica, principalmente após a inserção de fármacos antineoplásicos extraídos de plantas como vincristina **8** e vimblastina **9** (**Figura 3**), e do isolamento, a partir da planta chinesa *Artemisia annua*, de artemisinina **10**, substância que serviu como protótipo para a produção de novos fármacos

antimaláricos como o artesunato de sódio **11** (**Figura 3**) (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Figura 3 - Vincristina **8**, vimblastina **9**, artemisinina **10** e artesunato de sódio **11**



Fonte: Adaptado de Viegas Junior; Bolzani e Barreiro (2006)

No Brasil, a pesquisa em produtos naturais é a área mais antiga da química do país, graças à grande biodiversidade do território e ao conhecimento

indígena acerca das propriedades medicinais das plantas brasileiras (PINTO et al., 2002). Diversos estudos mostram o grande potencial social e econômico de espécies botânicas brasileiras e demonstram a necessidade de mais pesquisas, já que milhares de espécies ainda são desconhecidas (BRAZ FILHO, 2010).

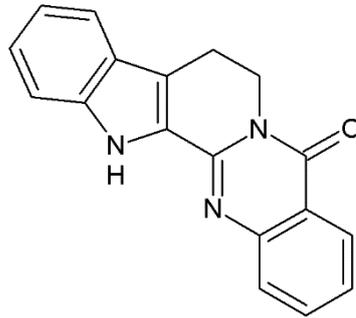
2.2 Rutaceae

Rutaceae é uma família grande e complexa de árvores e arbustos que compreende cerca de 158 gêneros e aproximadamente 1900 espécies (EPIFANO et al., 2015), concentrando-se principalmente em regiões tropicais e subtropicais do planeta. No Brasil são encontradas cerca de 32 espécies nativas, sendo que a Amazônia e Mata Atlântica abrigam a maioria dos indivíduos (PIRANI, 2005).

Entre os gêneros de Rutaceae podem ser destacados o *Citrus*, ao qual correspondem as frutas cítricas laranja, limão e tangerina, importantes para indústria alimentícia; *Chloroxylum*, *Flindersia* e *Zanthoxylum* para a silvicultura; e *Pilocarpus* e *Ruta*, dos quais são extraídos os fármacos pilocarpina e rutina (WATERMAN, 1975; CUNHA, 2010; COY-BARRERA; CUCA-SUÁREZ; LONDOÑO, 2013).

Há muito essa família atrai atenção e muitos são os estudos fitoquímicos e de atividade biológica realizados. Um dos motivos desse grande interesse é a diversidade de metabólitos secundários que essas plantas fornecem, tais como alcaloides, em especial os derivados do ácido antranílico (**Figura 4**); inúmeras cumarinas, principalmente furanocumarinas e piranocumarinas (**Figura 5**); terpenos como limonoides (**Figura 6**); flavonoides (**Figura 7**); entre vários outros (WATERMAN, 1975; COY-BARRERA; CUCA-SUÁREZ; LONDOÑO, 2013; EPIFANO et al., 2015).

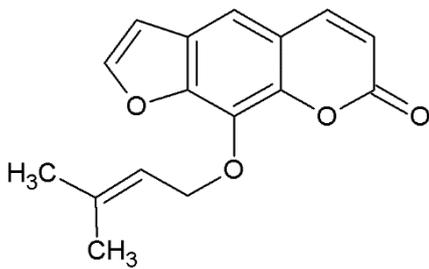
Figura 4 - Exemplo de alcaloide derivado do ácido antranílico isolado de Rutaceae



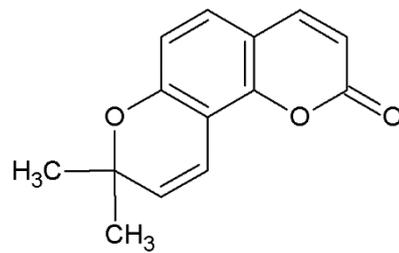
Rutaecarpina

Fonte: Adaptado de Januário et al. (2009)

Figura 5 - Exemplos de furanocumarina¹ e piranocumarina² isoladas de Rutaceae



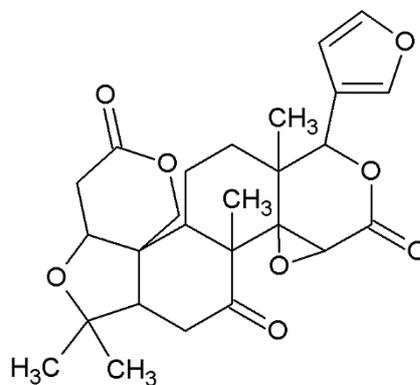
¹ Imperatorina



² Seselina

Fonte: Adaptado de Mukandiwa, Eloff e Naidoob (2015)¹ e Silva et al. (2010)²

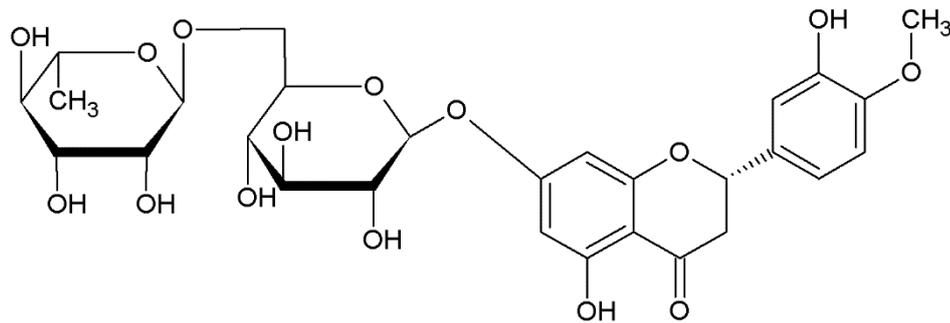
Figura 6 - Exemplo de limonoide isolado de Rutaceae



Limonina

Fonte: Adaptado de Isidoro et al. (2012)

Figura 7 - Exemplo de flavonoide isolado de Rutaceae



Hesperidina

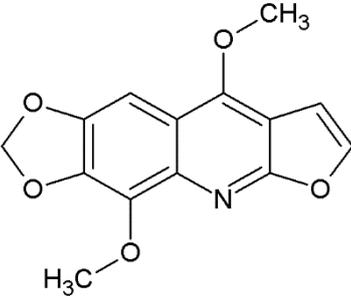
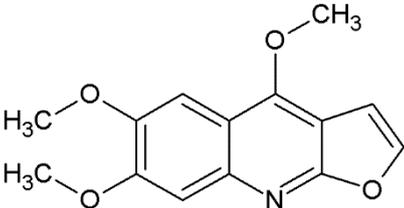
Fonte: Adaptado de Isidoro et al. (2012)

No entanto, todas estas classes de compostos estão amplamente distribuídas dentro de toda a família e, portanto, não são empregáveis para definir qualquer um dos taxons intra-familiares definidos por métodos morfológicos ou macro-moleculares (EPIFANO et al., 2015).

2.3 *Esenbeckia*

O gênero botânico *Esenbeckia* possui cerca de 30 espécies nativas da América tropical, sendo encontradas principalmente no México e no sudeste do Brasil (COY-BARRERA; CUCA-SUÁREZ; LONDOÑO, 2013). A maioria destas foram estudadas quimicamente e em graus variados, levando ao isolamento de alcaloides quinolínicos, quinolônicos e acridônicos; cumarinas e furanocumarinas; limonoides; mais raramente, alcaloides indólicos e indolopiridoquinazolínicos; além de fenilpropanoides, terpenoides, lignoides, flavonoides, poliprenóis, acilfloroglicinóis. Certamente os principais grupos de maior ocorrência no gênero são alcaloides e cumarinas (**Quadro 1**).

Quadro 1 - Principais substâncias isoladas do gênero *Esenbeckia*

COMPOSTO	ESTRUTURA QUÍMICA	ESPÉCIE	REFERÊNCIAS
Alcaloides			
Flindersiamina		<i>E. alata</i>	CUCA-SUÁREZ; COY-BARRERA; CABALLERO, 2011
		<i>E. almawillia</i>	OLIVEIRA et al., 1996
		<i>E. belizencis</i>	RIOS; DELGADO, 1992b
		<i>E. conspecta</i>	RIOS; ROSAS- ALONSO; AGUILAR- GUADARRAMA, 2002b
		<i>E. febrifuga</i>	DOLABELA et al., 2008
		<i>E. flava</i>	DREYER, 1980
		<i>E. grandiflora</i>	OLIVEIRA et al., 1996
		<i>E. grandiflora</i> subs. <i>Brevipetiolata</i>	TRANI et al., 2004
		<i>E. leiocarpa</i>	CARDOSO-LOPES et al., 2010
		<i>E. litoralis</i>	RIOS; AGUILAR- GUADARRAMA; DELGADO, 2002a
			MARIN et al., 2016
		<i>E. pentaphylla</i>	SIMPSON; JACOBS, 2005
		<i>E. pilcarpoides</i>	BEVALOT et al., 1984
<i>E. yaxhoob</i>	AGUILAR- GUADARRAMA; RIOS, 2004		
Cocusaginina		<i>E. alata</i>	CUCA-SUÁREZ; COY-BARRERA; CABALLERO, 2011
		<i>E. belizencis</i>	RIOS; DELGADO, 1992b
		<i>E. grandiflora</i>	OLIVEIRA et al., 1996
			JANUÁRIO et al., 2009
		<i>E. febrifuga</i>	DOLABELA et al., 2008
		<i>E. grandiflora</i> subs. <i>brevipetiolata</i>	TRANI et al., 2004
		<i>E. leiocarpa</i>	CARDOSO-LOPES et al., 2010
		<i>E. litoralis</i>	DREYER, 1980
MARIN et al., 2016			
<i>E. pentaphylla</i>	SIMPSON; JACOBS, 2005		

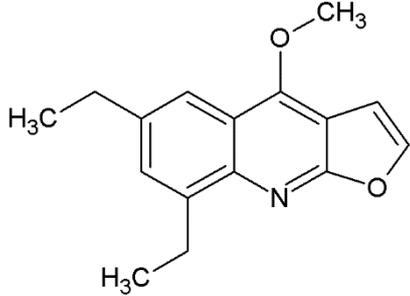
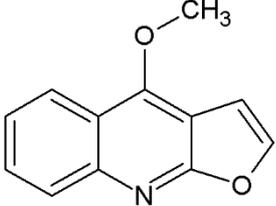
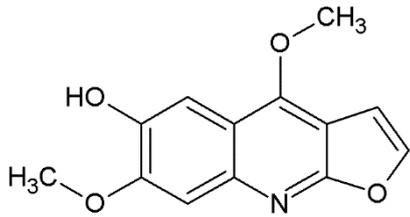
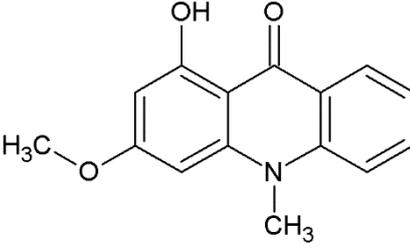
(continua)

(continuação) **Quadro 1** - Principais substâncias isoladas do gênero *Esenbeckia*

COMPOSTO	ESTRUTURA QUÍMICA	ESPÉCIE	REFERÊNCIAS
Alcaloides			
Cocusaginina		<i>E. pilcarpoides</i>	BEVALOT et al., 1984
Esquimianina		<i>E. alata</i>	CUCA-SUÁREZ; COY-BARRERA, 2007
		<i>E. febrifuga</i>	DOLABELA et al., 2008
		<i>E. flava</i>	DREYER, 1980
		<i>E. grandiflora</i> subs. <i>brevipetiolata</i>	TRANI et al., 2004
		<i>E. hartmanii</i>	DREYER; PICKERING; COHAN, 1972
		<i>E. leiocarpa</i>	CARDOSO-LOPES et al., 2010
γ -fagarina		<i>E. alata</i>	CUCA-SUÁREZ; COY-BARRERA; CABALLERO, 2011
		<i>E. febrifuga</i>	DOLABELA et al., 2008
		<i>E. grandiflora</i> subs. <i>brevipetiolata</i>	TRANI et al., 2004
		<i>E. pentaphylla</i>	SIMPSON; JACOBS, 2005
Maculina		<i>E. almawillia</i>	BARROS-FILHO et al.; 2007
		<i>E. grandiflora</i>	OLIVEIRA et al., 1996
			NUNES et al., 2005
		<i>E. leiocarpa</i>	CARDOSO-LOPES et al., 2010
		<i>E. litoralis</i>	DREYER, 1980
			RIOS; AGUILAR- GUADARRAMA; DELGADO, 2002a
	MARIN et al., 2016		
<i>E. pilcarpoides</i>	BEVALOT et al., 1984		

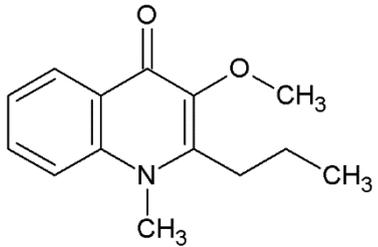
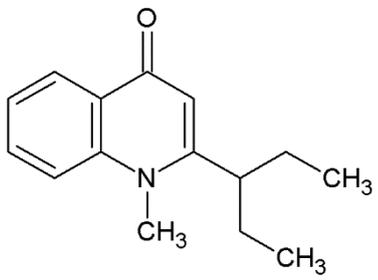
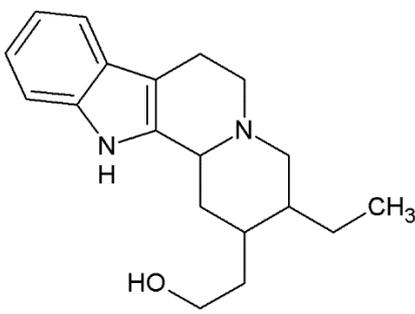
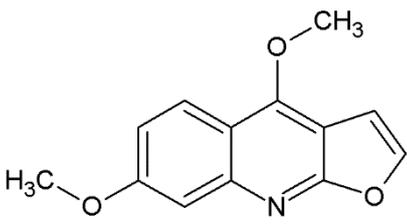
(continua)

(continuação) **Quadro 1** - Principais substâncias isoladas do gênero *Esenbeckia*

COMPOSTO	ESTRUTURA QUÍMICA	ESPÉCIE	REFERÊNCIAS
Alcaloides			
Maculosidina		<i>E. almawillia</i>	OLIVEIRA et al., 1996
		<i>E. conspecta</i>	RIOS; ROSAS-ALONSO; AGUILAR-GUADARRAMA, 2002b
		<i>E. flava</i>	DREYER, 1980
		<i>E. hartmanii</i>	DREYER; PICKERING; COHAN, 1972
		<i>E. litoralis</i>	MARIN et al., 2016
Dictamina		<i>E. alata</i>	CUCA-SUÁREZ; COY-BARRERA; CABALLERO, 2011
		<i>E. flava</i>	DREYER, 1980
		<i>E. litoralis</i>	DREYER, 1980
			MARIN et al., 2016
<i>E. pentaphylla</i>	SIMPSON; JACOBS, 2005		
Delbina		<i>E. grandiflora</i>	JANUÁRIO et al., 2009
		<i>E. grandiflora</i> subs. <i>brevipetiolata</i>	TRANI et al., 2004
1-hidroxi-3-metoxi- <i>N</i> -metilacridona		<i>E. febrifuga</i>	DOLABELA et al., 2008
		<i>E. litoralis</i>	DREYER, 1980
			MARIN et al., 2016
		<i>E. pilocarpoides</i>	BEVALOT et al., 1984
<i>E. runyonii</i>	LASPRILLA-COLL; CUCA-SUÁREZ, 2007		

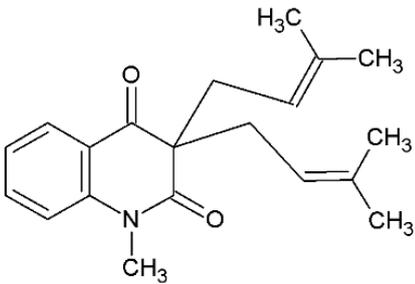
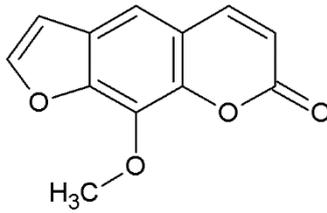
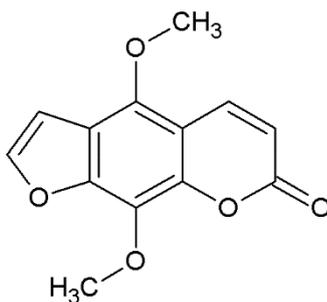
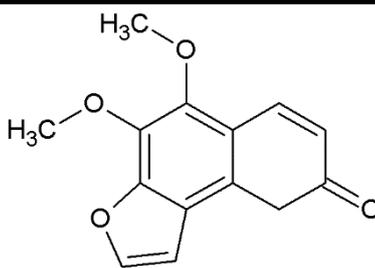
(continua)

(continuação) **Quadro 1** - Principais substâncias isoladas do gênero *Esenbeckia*

COMPOSTO	ESTRUTURA QUÍMICA	ESPÉCIE	REFERÊNCIAS
Alcaloides			
Leoquinina A		<i>E. leiocarpa</i>	NAKATSU et al., 1990
Leoquinina B		<i>E. leiocarpa</i>	NAKATSU et al., 1990
			CARDOSO-LOPES et al., 2010
DHC (Dihidrocorinanteol)			LIZ et al., 2011, 2012
		POZZATTI et al., 2013	
Evolitrina		<i>E. flava</i>	DREYER, 1980
		<i>E. litoralis</i>	DREYER, 1980

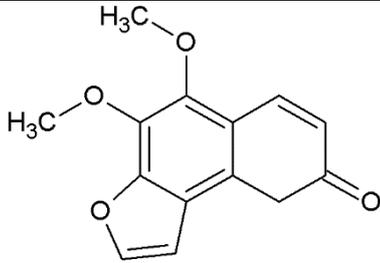
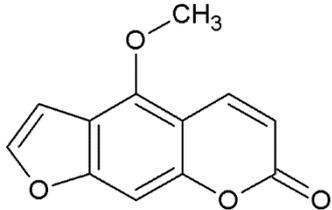
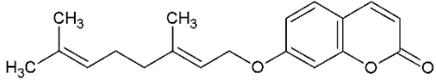
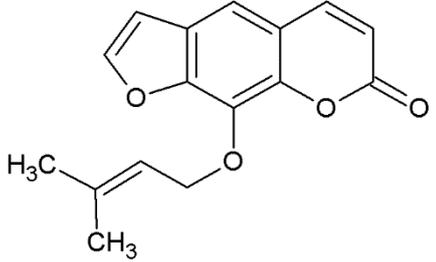
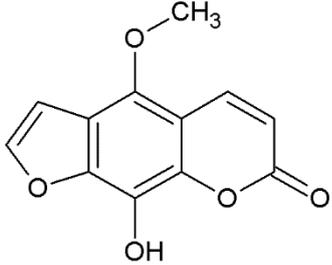
(continua)

(continuação) **Quadro 1** - Principais substâncias isoladas do gênero *Esenbeckia*

COMPOSTO	ESTRUTURA QUÍMICA	ESPÉCIE	REFERÊNCIAS
Alcaloides			
3,3-diisopropil-N-metil-2,4-quinoldiona		<i>E. flava</i>	DREYER, 1980
Cumarinas			
Xantotoxina		<i>E. grandiflora</i>	OLIVEIRA et al., 1996 OLIVEIRA et al., 2005 JANUÁRIO et al., 2009
		<i>E. grandiflora</i> subs. <i>brevipetiolata</i>	TRANI et al., 2004
		<i>E. litoralis</i>	RIOS; AGUILAR-GUADARRAMA; DELGADO, 2002a
		<i>E. ovata</i>	RIOS; DELGADO, 2002
Isopimpinina		<i>E. almawillia</i>	GUILHON et al., 1994
		<i>E. febrifuga</i>	DOLABELA et al., 2008
		<i>E. grandiflora</i>	OLIVEIRA et al., 2005
		<i>E. grandiflora</i> subs. <i>brevipetiolata</i>	TRANI et al., 2004
		<i>E. litoralis</i>	DREYER, 1980 RIOS; AGUILAR-GUADARRAMA; DELGADO, 2002a
Pimpinina		<i>E. grandiflora</i>	OLIVEIRA et al., 1996 OLIVEIRA et al., 2004 OLIVEIRA et al., 2005 JANUÁRIO et al., 2009

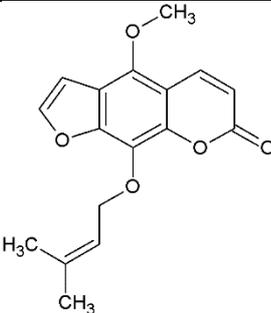
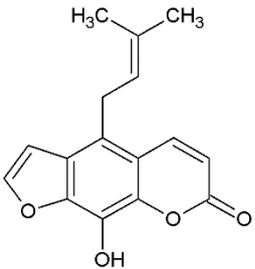
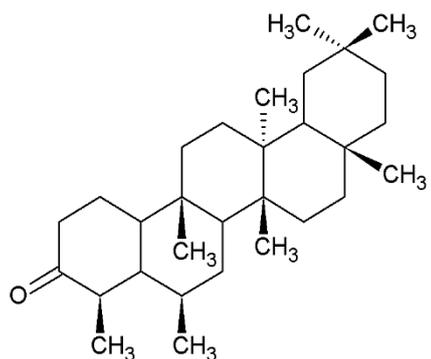
(continua)

(continuação) **Quadro 1** - Principais substâncias isoladas do gênero *Esenbeckia*

COMPOSTO	ESTRUTURA QUÍMICA	ESPÉCIE	REFERÊNCIAS
Cumarinas			
Pimpinelina		<i>E. grandiflora</i> subs. <i>brevipetiolata</i>	TRANI et al., 2004
Bergapteno		<i>E. alata</i>	GARCIA-BERTRÁN et al., 2014
		<i>E. febrifuga</i>	DOLABELA et al., 2008
		<i>E. berlandieri</i>	DREYER, 1980
		<i>E. litoralis</i>	DREYER, 1980
			RIOS; AGUILAR-GUADARRAMA; DELGADO, 2002a
<i>E. ovata</i>	RIOS; DELGADO, 2002		
Aurapteno		<i>E. conspecta</i>	RIOS; ROSAS-ALONSO; AGUILAR-GUADARRAMA, 2002b
		<i>E. febrifuga</i>	NAPOLITANO et al., 2004
		<i>E. grandiflora</i>	JANUÁRIO et al.; 2009
Imperatorina		<i>E. yaxhoob</i>	MATA et al., 1998
		<i>E. litoralis</i>	DREYER, 1980
		<i>E. pentaphylla</i>	SIMPSON; JACOBS, 2005
8-hidroxi-bergapteno		<i>E. litoralis</i>	DREYER, 1980

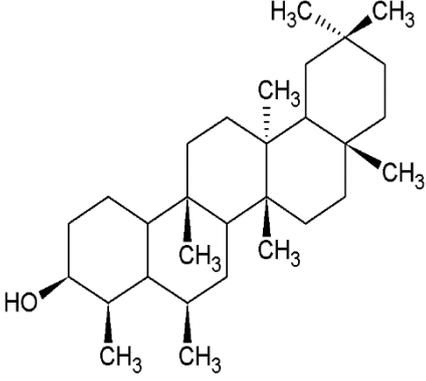
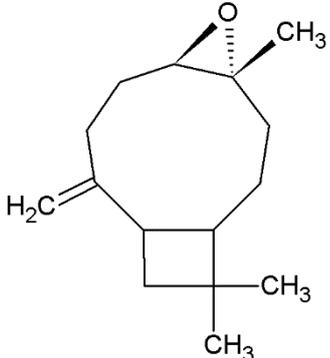
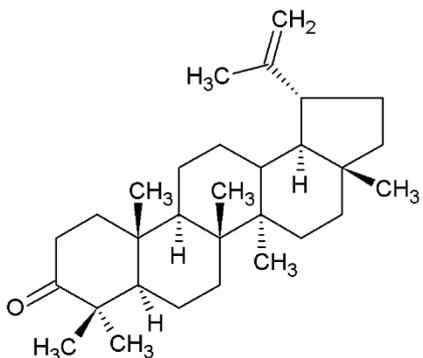
(continua)

(continuação) **Quadro 1** - Principais substâncias isoladas do gênero *Esenbeckia*

COMPOSTO	ESTRUTURA QUÍMICA	ESPÉCIE	REFERÊNCIAS
Cumarinas			
Felopterina		<i>E. litoralis</i>	DREYER, 1980
Aloimperatorina		<i>E. litoralis</i>	DREYER, 1980
Terpenos			
Friedelina		<i>E. alata</i>	CUCA-SUÁREZ; COY-BARRERA; CABALLERO, 2011
		<i>E. belizensis</i>	RIOS; DELGADO, 1992b
		<i>E. berlandieri</i> subs. <i>berlandieri</i>	CANO et al., 2000
		<i>E. berlandieri</i> subsp. <i>acapulcensis</i>	CANO et al., 2006
		<i>E. litoralis</i>	RIOS; AGUILAR- GUADARRAMA; DELGADO, 2002a
		<i>E. nesiotica</i>	RIOS; DELGADO, 1992a
		<i>E. ovata</i>	RIOS; DELGADO, 2002
		<i>E. stephani</i>	RIOS; AGUILAR- GUADARRAMA, 2002
		<i>E. velutinoso</i>	CANO et al., 2000
<i>E. yaxhoob</i>	AGUILAR- GUADARRAMA; RIOS 2004		

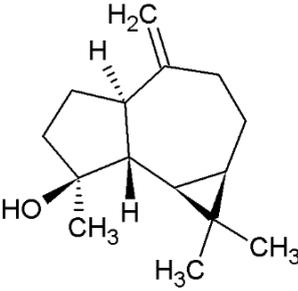
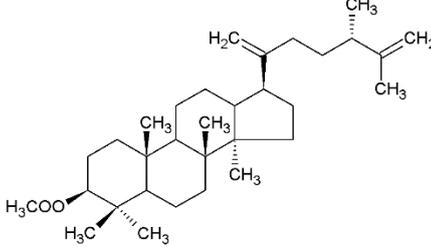
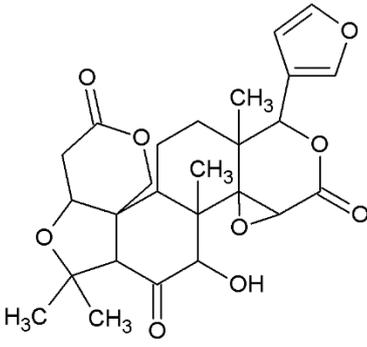
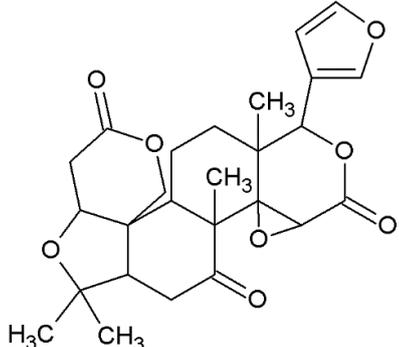
(continua)

(continuação) **Quadro 1** - Principais substâncias isoladas do gênero *Esenbeckia*

COMPOSTO	ESTRUTURA QUÍMICA	ESPÉCIE	REFERÊNCIAS
Terpenos			
Friedenalol		<i>E. alata</i>	CUCA-SUÁREZ; COY-BARRERA; CABALLERO, 2011
		<i>E. belizensis</i>	RIOS; DELGADO, 1992b
		<i>E. litoralis</i>	RIOS; AGUILAR- GUADARRAMA; DELGADO, 2002a
		<i>E. yaxhoob</i>	AGUILAR- GUADARRAMA; RIOS 2004
β-óxido- cariofileno		<i>E. belizensis</i>	RIOS; DELGADO, 1992b
		<i>E. litoralis</i>	RIOS; AGUILAR- GUADARRAMA; DELGADO, 2002a
		<i>E. nesiotica</i>	RIOS; DELGADO, 1992a
		<i>E. ovata</i>	RIOS; DELGADO, 2002
		<i>E. stephani</i>	RIOS; AGUILAR- GUADARRAMA, 2002
		<i>E. velutinosa</i>	CANO et al., 2000
Lupenona		<i>E. belizensis</i>	RIOS; DELGADO, 1992b
		<i>E. ovata</i>	RIOS; DELGADO, 2002
		<i>E. velutinosa</i>	CANO et al., 2000

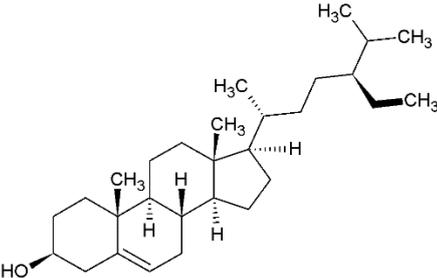
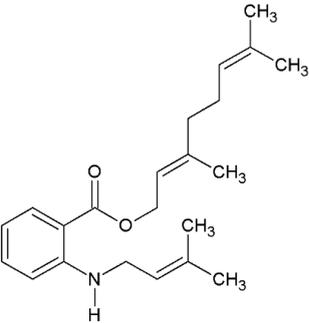
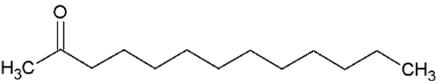
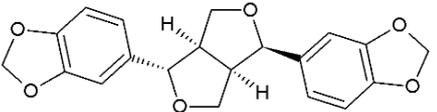
(continua)

(continuação) **Quadro 1** - Principais substâncias isoladas do gênero *Esenbeckia*

COMPOSTO	ESTRUTURA QUÍMICA	ESPÉCIE	REFERÊNCIAS
Terpenos			
Espatulanol		<i>E. belizensis</i>	RIOS; DELGADO, 1992b
		<i>E. conspecta</i>	RIOS; ROSAS-ALONSO; AGUILAR-GUADARRAMA, 2002b
		<i>E. litoralis</i>	RIOS; AGUILAR-GUADARRAMA; DELGADO, 2002a
		<i>E. yaxhoob</i>	AGUILAR-GUADARRAMA; RIOS 2004
24-S-24-metil-damara-20,25-dieno-3β-il-acetato		<i>E. yaxhoob</i>	MATA et al., 1998
Rutaevina		<i>E. berlandieri</i>	DREYER, 1980
		<i>E. flava</i>	DREYER, 1980
		<i>E. hartmanii</i>	DREYER; PICKERING; COHAN, 1972
		<i>E. litoralis</i>	DREYER, 1980
Limonina		<i>E. hartmanii</i>	DREYER; PICKERING; COHAN, 1972
		<i>E. litoralis</i>	DREYER, 1980

(continua)

(continuação) **Quadro 1** - Principais substâncias isoladas do gênero *Esenbeckia*

COMPOSTO	ESTRUTURA QUÍMICA	ESPÉCIE	REFERÊNCIAS
Esteróis			
β-sitosterol		<i>E. berlandieri</i> subs. <i>berlandieri</i>	CANO et al., 2000
		<i>E. conspecta</i>	RIOS; ROSAS-ALONSO; AGUILAR-GUADARRAMA, 2002b
		<i>E. leiocarpa</i>	LIZ et al., 2011
		<i>E. litoralis</i>	RIOS; AGUILAR-GUADARRAMA; DELGADO, 2002a
		<i>E. nesiotica</i>	RIOS; DELGADO, 1992a
		<i>E. ovata</i>	RIOS; DELGADO, 2002
		<i>E. stephani</i>	RIOS; AGUILAR-GUADARRAMA, 2002
		<i>E. velutinoso</i>	CANO et al., 2000
<i>E. yaxhoob</i>	AGUILAR-GUADARRAMA; RIOS 2004		
Aminas			
geranil <i>N</i> -dimetilalil-antranilato		<i>E. yaxhoob</i>	AGUILAR-GUADARRAMA; RIOS, 2004
Ácidos Graxos			
2-tridecanona		<i>E. yaxhoob</i>	MATA et al., 1998
Lignanas			
Asarinina		<i>E. yaxhoob</i>	MATA et al., 1998

Além do estudo fitoquímico, a avaliação da atividade biológica foi realizada com os extratos e compostos de algumas espécies, como *E. alata*, *E. febrifuga*, *E. grandiflora*, *E. leiocarpa*, *E. nesiotica*, *E. runyonii* e *E. yaxhoob*, sendo possível perceber o amplo espectro de bioatividade desse gênero: anticolinesterásica, anti-inflamatória, antitumoral, antibacteriana, antiprotozoária, larvicida e fitotóxica (**Quadro 2**).

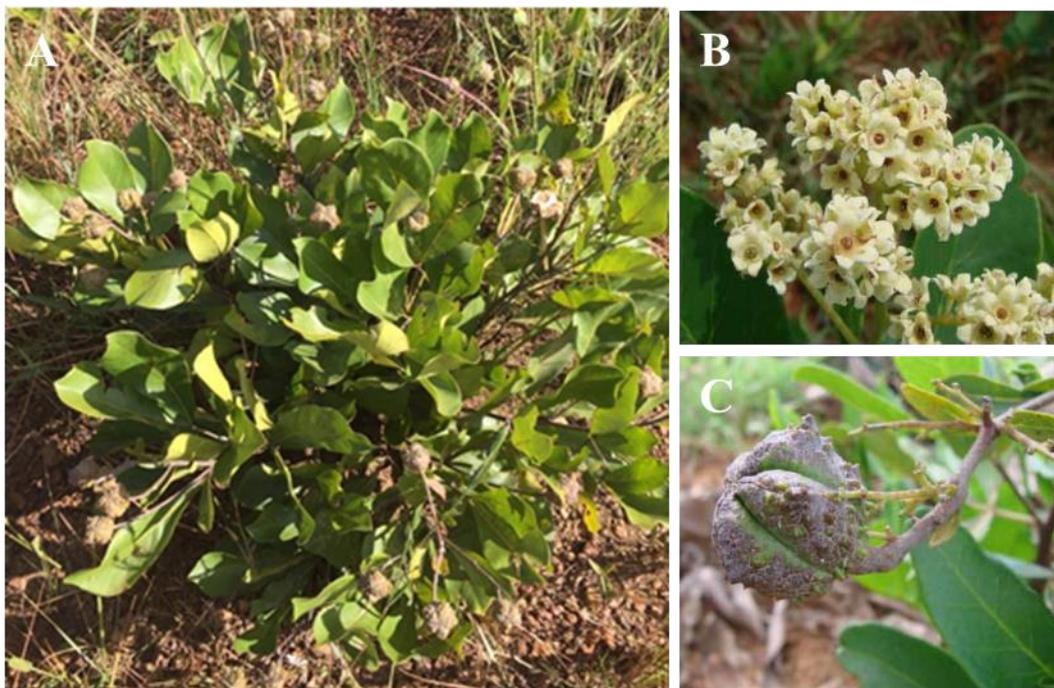
Quadro 2 - Atividades biológicas de algumas espécies do gênero *Esenbeckia*

Espécie	Extrato/Substância	Parte da planta	Ação biológica	Referências
<i>Esenbeckia alata</i>	Extrato, frações e (-)-episesamina	Cascas	Antibacteriana	BELTRÁN; CUCA-SUÁREZ, 2003
<i>Esenbeckia febrifuga</i>	Aurapteno	Folhas	Anti-Leishmania	NAPOLITANO et al., 2004
	Esquimianina e γ -fagarina	Cascas	Anti-Plasmodium	DOLABELA et al., 2008
<i>Esenbeckia grandiflora</i>	Pimpinelina	Cascas	Larvicida (<i>Aedes aegypti</i>)	OLIVEIRA et al., 2005
	Extrato	Folhas	Antibacteriana	COSTA et al., 2010
<i>Esenbeckia leiocarpa</i>	Alcaloides (leioquinina a e b)	Folhas	Antialimentadora (Lagarta rosada)	NAKATSU et al., 1990
	Leioquinina a	Caule	Anticolinesterásica	CARDOSO-LOPES et al., 2010
	Extrato, Fração alcaloide, DHC	Cascas	Anti-inflamatória	LIZ et al., 2011, 2012; POZZATTI et al., 2013
	Extrato	Folhas e caule	Fitotóxica	SOUZA; GANDOLFI; PEREZ et al., 2010
<i>Esenbeckia runyonii</i>	Alcaloide acridonico (1-hidroxi-3-metoxi-N-metilacridona)	Caule	Antitumoral	LASPRILLA-COLL; CUCA-SUÁREZ, 2007
<i>Esenbeckia yaxhoob</i>	Triterpeno do tipo damarano 24-S-24-metil-damara-20,25-dieno-3 β -il-acetato, 2-tridecanone, asarinina, imperatorina	Partes aéreas	Fitotóxica	MATA et al., 1998
	Extrato, geranil N-dimetilalantranilato (amina), espatulenol (terpeno) e flindersiamina	Folhas	Antibacteriana	AGUILAR-GUADARRAMA; RIOS, 2004

2.4 *Esenbeckia pumila* Pohl

Esenbeckia pumila Pohl (**Figura 8**) é uma espécie arbustiva que mede aproximadamente 0,5 m, que se desenvolve em áreas de cerrado *stricto sensu*, de campo sujo e de mata de borda de galeria, distribuídas por vários estados brasileiros: Tocantins, Piauí, Bahia, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal e Minas Gerais (MEDEIROS, 2011).

Figura 8 - *Esenbeckia pumila* Pohl – CCET (UEG), Anápolis-GO

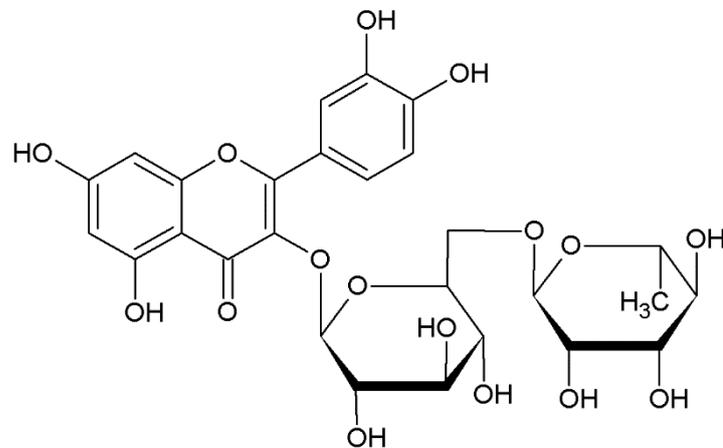


Legenda: **A** – *E. pumila* – Câmpus CCET-UEG. Partes de *E. pumila*: **B** – Flores, **C** – Fruto.

Fonte: A autora (**A**); adaptado de Medeiros (2011, p. 469) (**B** e **C**)

Não há descrição na literatura sobre o uso popular de *E. pumila*, somente um estudo realizado por Kubo, Vieira e Fukuhara (1990), com o extrato metanólico das folhas, o qual exibiu toxicidade em insetos, ao inibir o crescimento da lagarta do tabaco (*Heliothis virescens*) e da lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*). Esses pesquisadores também conseguiram isolar o flavonoide rutina (**Figura 9**) desse mesmo extrato, através de Cromatografia Contracorrente de Rotação Locular (RLCC).

Figura 9 - Estrutura química do flavonoide rutina



Fonte: Adaptado de Kubo, Vieira e Fukuhara (1990)

Assim, diante do potencial dessa planta, estudos adicionais de fitoquímica e bioatividade devem ser realizados.

2.5 METABOLISMO SECUNDÁRIO DE PLANTAS

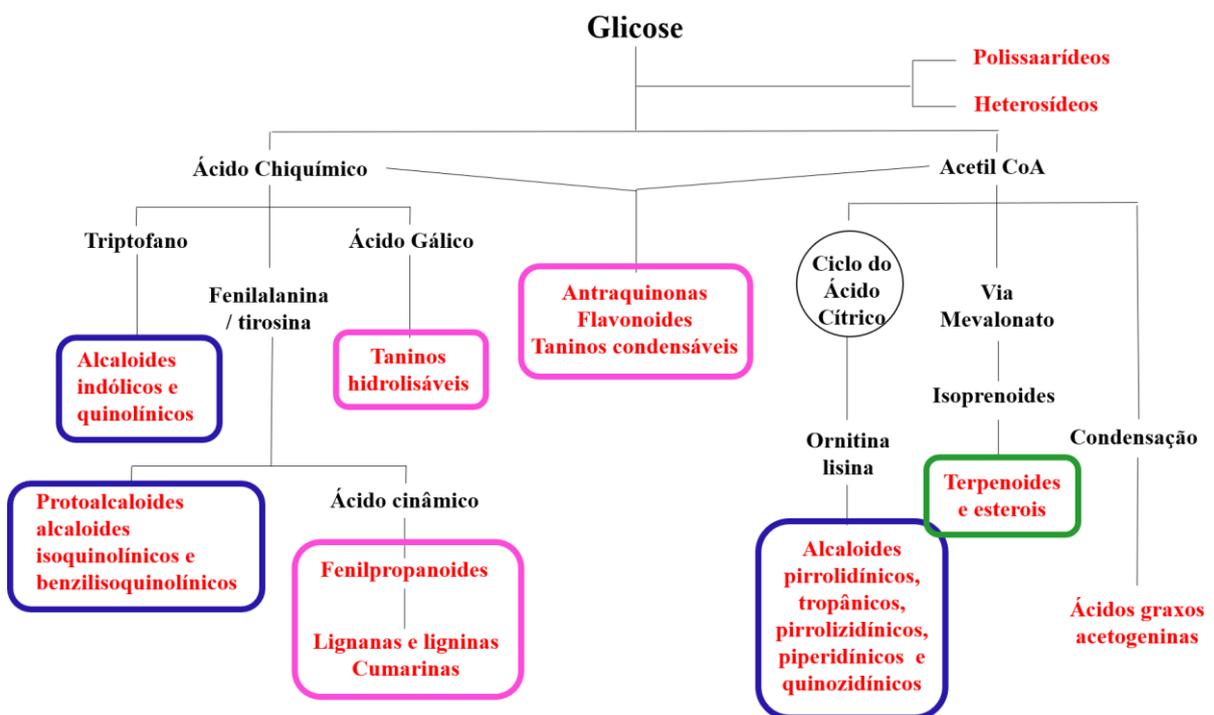
Metabolismo é definido como a soma de todas as reações químicas de síntese e decomposição de substâncias que ocorrem nas células dos organismos vivos a fim de satisfazer as necessidades energéticas e estruturais dos mesmos. Essas reações são direcionadas por serem catalisadas por enzimas específicas, o que configura a formação de vias metabólicas, através das quais é realizado o processamento de nutrientes com o objetivo de garantir a sobrevivência celular e, portanto, do organismo (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Os processos metabólicos das plantas normalmente são classificados em primário e secundário. O metabolismo primário é responsável por utilizar a maior parte dos nutrientes captados pelo vegetal para produzir substâncias essenciais à existência de qualquer organismo vivo: carboidratos, proteínas,

lipídeos e ácidos nucleicos. O metabolismo secundário parece não estar relacionado com os processos vitais da planta, mas contribui de forma definitiva para a sobrevivência da mesma. Essa divisão não é muito clara já que ambos compartilham estruturas intermediárias das mesmas vias metabólicas, devendo ser considerada para fins de agrupamento de substâncias com características comuns (GARCÍA; CARRIL, 2009).

Os metabólitos secundários costumam ser divididos em três grandes grupos: compostos fenólicos (fenóis simples, flavonoides, antraquinonas, cumarinas, taninos), compostos terpênicos (terpenos, saponinas, esteróis) e alcaloides. Apesar da enorme variedade de compostos, o número de vias biossintéticas básicas correspondentes é restrito e distinto, originadas de dois precursores principais, o ácido chiquímico e o acetato, que se originam do metabolismo primário do carbono para a produção de glicose (**Figura 10**) (SANTOS, 2010).

Figura 10 - Rotas biossintéticas de metabólitos secundários



Legenda: ■ Compostos fenólicos ■ Compostos Terpênicos ■ Alcaloides

Fonte: Adaptado de Santos (2010)

A produção dessas complexas estruturas químicas é realizada em pequenas quantidades e de modo restrito para uma dada espécie ou família de plantas, como forma destas se adaptarem ao meio em que estão inseridas. Possuem basicamente a função de proteger as plantas contra predadores, patógenos e fatores externos como temperatura, umidade e raios ultravioleta. Além disso, contribuem para a atração de insetos polinizadores e de animais dispersores de sementes (WINK, 2010).

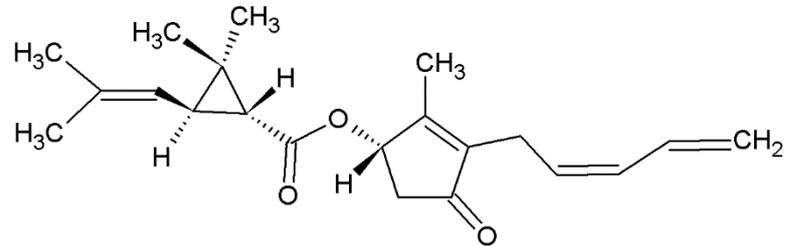
Devido ao fato de apresentarem atividades biológicas diversas em resposta aos estímulos ambientais e pela possibilidade de tornarem-se moléculas úteis ao homem, esses componentes despertam enorme interesse e são alvos de pesquisa em várias áreas como farmacológica, alimentar, agrônômica e cosmética (WINK, 2010).

2.6 TOXICIDADE DE PLANTAS

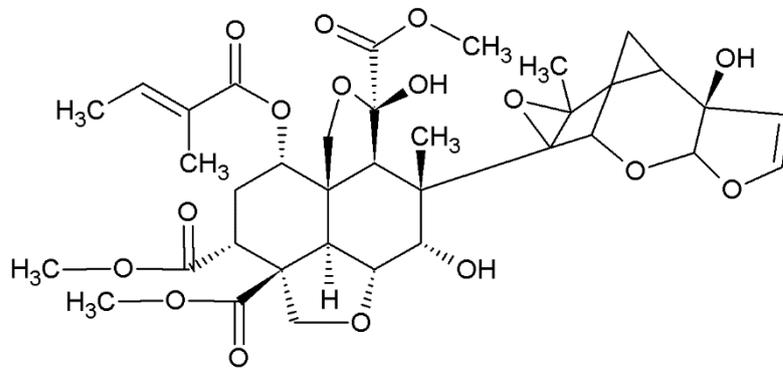
Os metabólitos secundários são responsáveis pela toxicidade observada em plantas, já que são produzidos no intuito de proteger o vegetal de predadores como animais herbívoros, microorganismos, insetos e até mesmo outras plantas (CAMPOS et al., 2016).

Inúmeros terpenos atuam na defesa de várias plantas contra herbívoros e insetos. Piretrina I **12** (monoterpeno) e azadiractina **13** (limonoide) (**Figura 11**), são substâncias de enorme poder inseticida, extraídas de *Chrysanthemum* sp. e *Azadirachta indica*, respectivamente, plantas conhecidas por serem tóxicas para insetos sendo utilizadas há séculos no controle de pragas (MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005; GARCÍA; CARRIL, 2009; CUNHA, 2010). Glicosídeos cardíacos como a digitoxina **14** e a digoxina **15** (**Figura 11**) são triterpenos isolados de *Digitalis purpúrea*, com sabor amargo e extremamente tóxicos para animais vertebrados e insetos por inibirem a Na⁺K⁺-ATPase, o que leva ao aumento da contração miocárdica ATP-dependente (RATES et al., 2017).

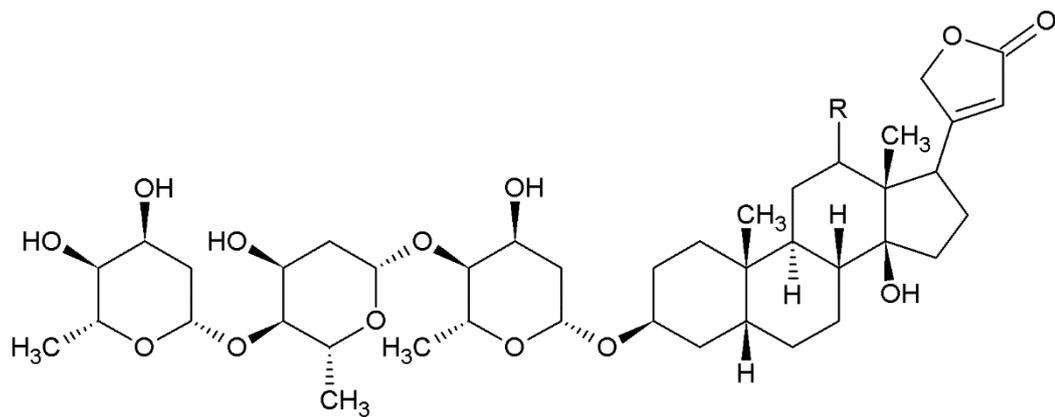
Figura 11 - Exemplos de terpenos extraídos de plantas tóxicas



Piretrina I **12**



Azadiractina **13**



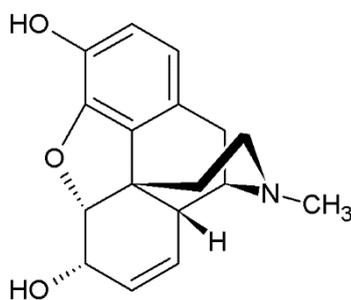
R = H₂ – Digitoxina **14**

R = OH – Digoxina **15**

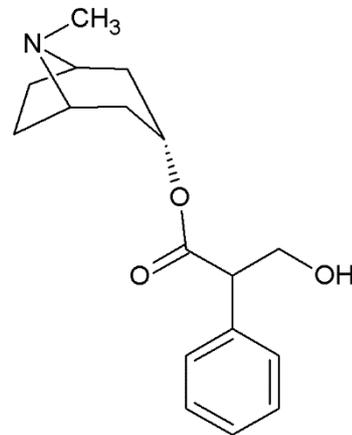
Fonte: Adaptado de García e Carril (2009) e Wink (2010)

Alcaloides em geral apresentam alta toxicidade devido às suas interações com neurotransmissores. Vários são os exemplos como a morfina **16** (*Papaver somniferum*), com atividades soporíferas; a atropina **17** (*Atropa belladonna*) com ação anticolinérgica; a coniina **18** (*Conium maculatum*), que promove a paralisia do sistema nervoso motor; e a pilocarpina **19** (*Pilocarpus jaborandi*) que estimula o sistema parassimpático (**Figura 12**) (CUNHA, 2010).

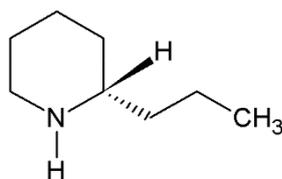
Figura 12 - Exemplos de alcaloides extraídos de plantas tóxicas



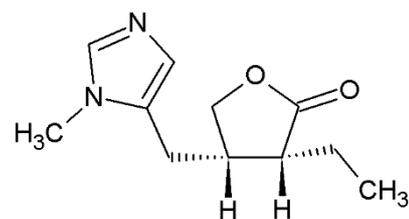
Morfina **16**



Atropina **17**



Coniina **18**



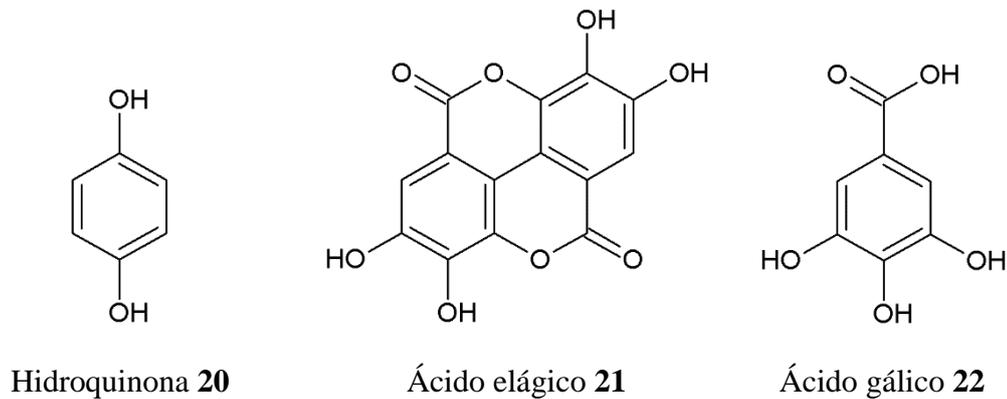
Pilocarpina **19**

Fonte: Adaptado de Cunha (2010)

Compostos fenólicos como a hidroquinona **20**, o ácido elágico **21** e estéres do ácido gálico **22** (**Figura 13**) atuam na defesa da planta e têm sido

relatada marcante atividade supressora do apetite de insetos por alguns fenilpropanoides (CARVALHO; GOSMANN e SCHENKEL, 2010).

Figura 13 - Exemplos de compostos fenólicos extraídos de plantas tóxicas



Fonte: Adaptado de Carvalho, Gosmann e Schenkel (2010)

O estudo da toxicidade de plantas é importante sob dois aspectos principais. O primeiro leva em consideração o potencial tóxico de espécies a fim de evitar casos de intoxicação tanto por plantas medicinais quanto por plantas ornamentais. O segundo considera a relação íntima que há entre toxicidade de espécies botânicas e atividade biológica, que pode levar à descoberta e ao desenvolvimento de substâncias com propriedades farmacológicas (CAMPOS et al., 2016). Um exemplo que ilustra essa relação é a obtenção de bloqueadores ganglionares a partir do curare americano (*Chondrodendron tomentosum*), veneno utilizado pelos índios para imobilizar a caça (BARREIRO; FRAGA, 2015).

Estratégias alternativas para se diminuir o uso de animais vertebrados em experimentos toxicológicos têm sido incentivadas, como o uso de invertebrados, órgãos, tecidos e culturas de células. Nos últimos 50 anos, vários invertebrados, como *Artemia salina*, foram avaliados para possível utilização em testes de *screening*. A utilização desse microcrustáceo tem como principais

vantagens o conhecimento de sua biologia, sua fácil manipulação e manutenção em laboratório, seu pequeno tamanho permitindo seu alojamento em microplacas, rapidez de incubação, o baixo custo e a facilidade para se adquirir seus cistos durante todo ano (BEDNARCZUK et al., 2010; LIBRALATO et al., 2016).

Meyer et al., (1982) sugeriram que *A. salina* é uma conveniente sonda para atividades farmacológicas em extratos de plantas, manifestadas através da toxicidade em recém-eclodidos. Vários trabalhos demonstram a correlação existente entre a toxicidade em *A. salina* e diversas atividades biológicas como antitumoral (ALBUQUERQUE et al., 2014), antifúngica (LEITE et al., 2009), antibacteriana (APU et al., 2010), inseticida (NISAR et al., 2015).

2.7 PRODUTOS NATURAIS BOTÂNICOS NA TERAPÊUTICA DO CÂNCER

O câncer surge da proliferação descontrolada de única célula normal que sofreu mutação, que se divide por mitose e cujas descendentes acumulam outras mutações que se somam até originarem uma célula cancerosa. Os danos presentes no DNA de células cancerosas lhe permitem burlar os mecanismos de controle de divisão celular e invadir tecidos e órgãos vizinhos, podendo alcançar as circulações sanguínea e linfática. Quando conseguem, se disseminam pelo organismo, e formam tumores secundários em locais diferentes de sua origem, um processo denominado metástase (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2009).

O aumento da expectativa de vida acarretou a elevação do número de casos de câncer em todo o mundo (STEWART; WILD, 2014). Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), foi estimada, para o período 2016-2017, a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos de câncer no Brasil. Com exceção dos casos de câncer de pele não melanoma, os mais frequentes tipos em homens serão próstata (28,6%), pulmão (8,1%), cólon e reto (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%). Em mulheres, os principais cânceres serão de mama

(28,1%), cólon e reto (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) (INCA, 2015).

São designadas como câncer mais de 100 doenças muito diferentes entre si (INCA, 2016). A complexidade dessa enfermidade é multifatorial e seu tratamento é difícil e, muitas vezes, ineficiente (FREIRE; ALVES, 2014). Os recursos terapêuticos utilizados atualmente para tratar tumores malignos são radioterapia, quimioterapia, cirurgia e transplante de medula óssea, adaptados segundo o tipo e o estágio do tumor. A quimioterapia vale-se do uso isolado ou associado de substâncias químicas que atuam sobre diferentes fases do ciclo celular (INCA, 2016; WHO, 2016).

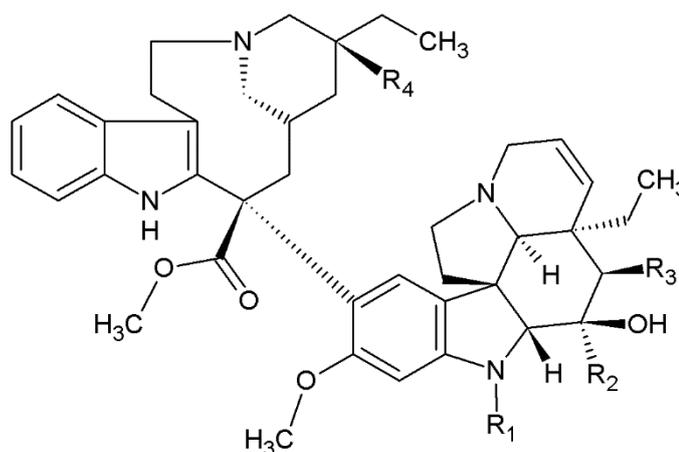
A grande problemática da quimioterapia deve-se, principalmente, aos fatores toxicidade e resistência. Os efeitos tóxicos são atribuídos à falta de seletividade, já que, geralmente, os quimioterápicos atingem e destroem tanto células neoplásicas quanto normais. A resistência aos quimioterápicos é a principal causa de falha do tratamento. As possíveis causas para essa resistência são o desenvolvimento de novas codificações genéticas (mutações) por populações celulares, ou a estimulação de tipos celulares resistentes devido a exposição às drogas, o que permite alterarem suas vias metabólicas, através de modificação de enzimas (INCA, 2016).

Nos últimos anos tem crescido o número de pesquisas com produtos naturais com potencial para o tratamento oncológico (FREIRE; ALVES, 2014). Mais da metade dos fármacos inseridos na terapêutica do câncer nas últimas décadas originam-se de produtos naturais (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

No tratamento da leucemia linfoblástica aguda, do linfoma de Hodking, e do câncer de testículo são utilizados vincristina **23** e vimblastina **24**, isolados da planta *Catharanthus roseus*, e seus análogos vindesina **25** e vinorelbina **26** (**Figura 14**). Contra o câncer de mama, temos o paclitaxel **27**, extraído de *Taxus brevifolia* e o seu análogo docetaxel **28** (**Figura 15**). Podofilotoxina **29** e os seus

análogos etoposídeo **30** e teniposídeo **31** (**Figura 16**), originários de *Podophyllum peltatum*, são empregados na terapia dos cânceres de pulmão, ovário e testículo, e da leucemia linfocítica aguda. Na quimioterapia do câncer de colon são empregados a camptotecina **32**, obtida de *Camptotheca accuminata*, e os análogos topotecano **33** e irinotecano **34** (**Figura 17**) (COSTA-LOTUFO et al., 2010; LEE et al., 2016).

Figura 14 - Moléculas antineoplásicas oriundas de *Catharanthus roseus*



$R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{CO}_2\text{CH}_3$, $R_3 = \text{OCH}_2\text{CH}_3$, $R_4 = \text{OH}$ – Vincristina **23**

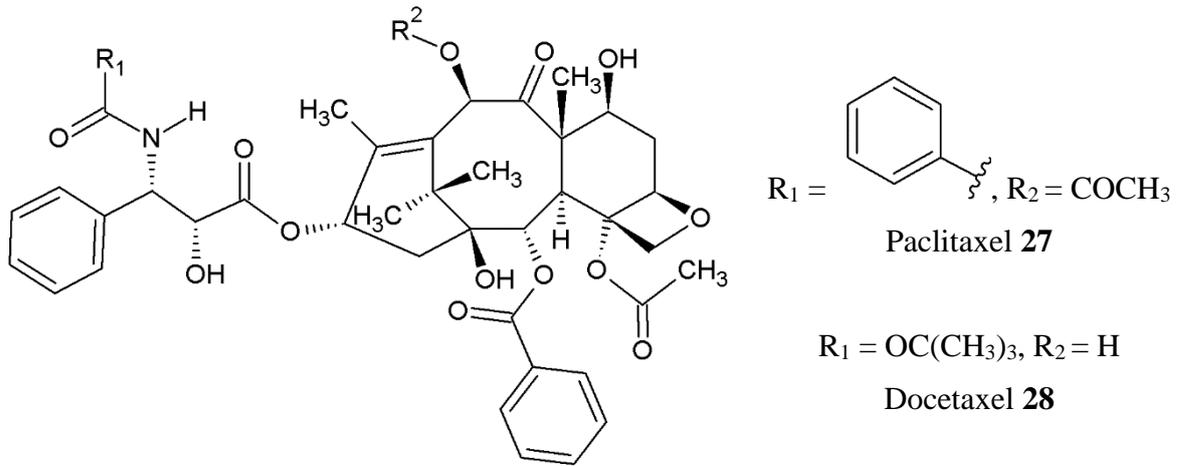
$R_1 = \text{COH}$, $R_2 = \text{CO}_2\text{CH}_3$, $R_3 = \text{OCH}_2\text{CH}_3$, $R_4 = \text{OH}$ – Vimblastina **24**

$R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{CO}_2\text{NH}_2$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{OH}$ – Vindesina **25**

$R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{CO}_2\text{CH}_3$, $R_3 = \text{OCH}_2\text{CH}_3$, $R_4 = \text{H}$ – Vinorelbina **26**

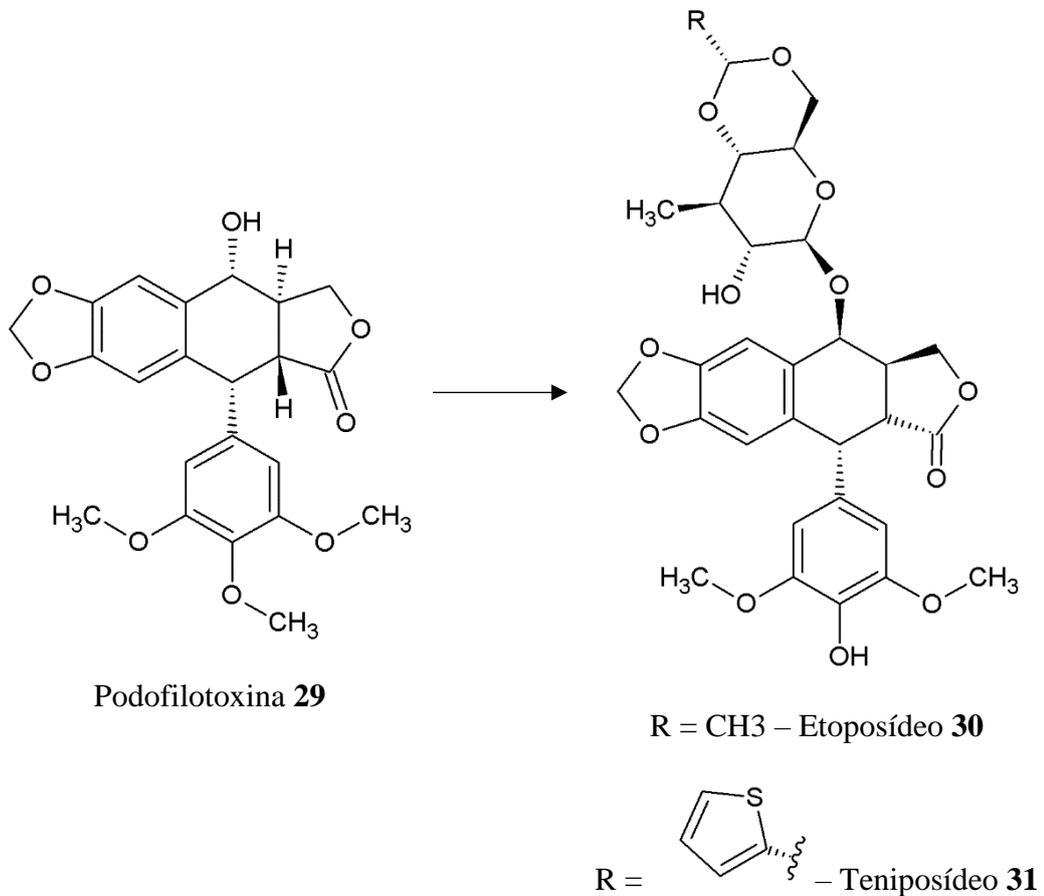
Fonte: Adaptado de Costa-Lotufo et al. (2010)

Figura 15 - Moléculas antineoplásicas oriundas de *Taxus brevifolia*



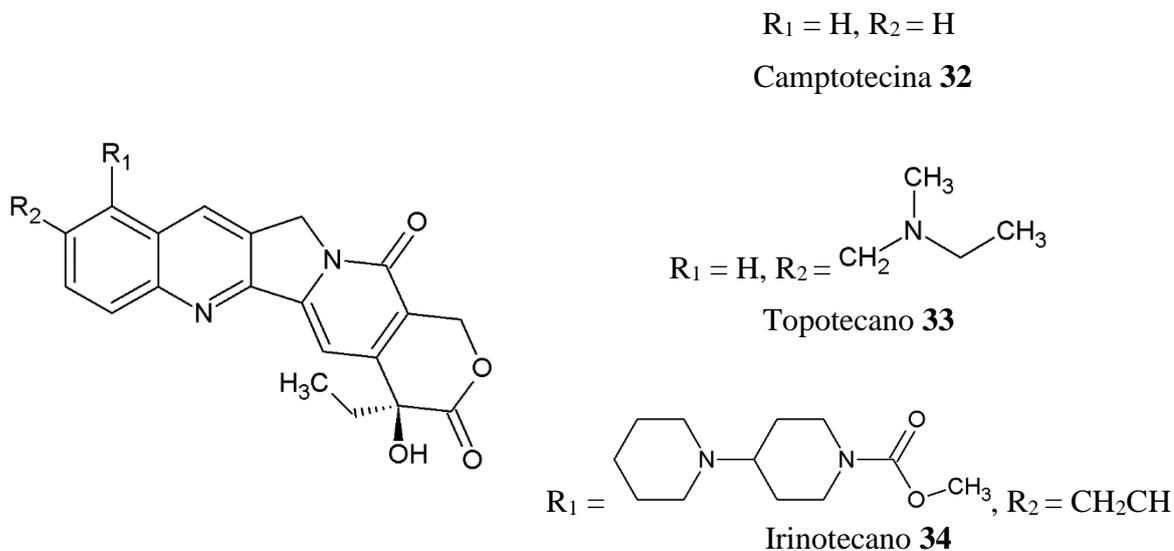
Fonte: Adaptado de Costa-Lotufo et al. (2010)

Figura 16 - Moléculas antineoplásicas oriundas de *Podophyllum peltatum*



Fonte: Adaptado de Costa-Lotufo et al. (2010)

Figura 17 - Moléculas antineoplásicas oriundas de *Camptotheca accuminata*



Fonte: Adaptado de Costa-Lotufo et al. (2010)

A busca por novas moléculas antitumorais é necessária diante da inexistência de tratamento adequado para muitos tipos de tumores. Testes para a avaliação de atividade antitumoral foram realizados com um número muito pequeno de espécies de plantas superiores, o que reflete o grande potencial de descoberta de novos fármacos antineoplásicos de fonte natural, principalmente em regiões de grande diversidade biológica, como o Brasil (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

2.8 MOLÉCULAS COM AÇÃO ANTIMICROBIANA

A descoberta de novos antibióticos se torna urgente a cada dia tanto que, em publicação recente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) apresentou uma lista com 12 bactérias resistentes e pediu o desenvolvimento de novos fármacos direcionados ao combate desse grupo de microrganismos (WHO, 2017).

No Brasil Fernandes et al. (2016) relataram o primeiro caso de isolamento de *Escherichia coli* resistente a colistina de um paciente com infecção

de pé diabético. A colistina, também conhecida por polimixina E, é considerada a última opção no combate a bactérias gram negativas multirresistentes devido ao seu grande poder bactericida contra esses microrganismos (GUPTA et al., 2009).

Diante do real risco de entrarmos em uma era onde infecções simples causarão a morte das pessoas por falta de medicamentos que as combatam (DAVIES; DAVIES, 2010), esforços devem ser intensificados no intuito de obter-se novas substâncias antimicrobianas e uma das grandes fontes promissoras dessas moléculas é o reino vegetal (DUARTE, 2006).

Inúmeros estudos a fim de avaliar o potencial antimicrobiano de plantas têm sido realizados e dentre estes merece destaque o trabalho realizado por Muhs et al. (2017), o qual demonstrou a atividade antibacteriana dos frutos da aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolia*) contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticiclina, um sério problema em infecções hospitalares.

2.9 FORMIGAS CORTADEIRAS E A ATIVIDADE INSETICIDA DE PLANTAS

As formigas cortadeiras são consideradas as principais pragas das plantações brasileiras causando perdas a áreas agrícolas e de reflorestamento. Representadas pelas quenquéns e pelas saúvas, as quais pertencem, respectivamente, aos gêneros *Atta e Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini), esses insetos cortam partes de plantas frescas, principalmente folhas, para o cultivo de fungos do gênero *Leucoagaricus* e *Leucocoprinus*. Estes fungos, ricos em carboidratos e proteínas, constituem-se em fonte de alimento básica para toda a colônia. Esta é uma característica que singulariza essas formigas em meio às demais (GALLO et al., 2002; ZANETTI et al., 2014).

Esses insetos são conhecidos pelo alto grau de organização social (eussocialidade) devido à existência de cooperação nos cuidados com a prole, de gerações sobrepostas e da clara divisão de trabalho (WARD, 2006). Cada colônia é formada pela rainha, responsável pela reprodução; por machos e fêmeas alados, que deixam eventualmente a colônia para formar novas; e pelas operárias que desempenham diversas tarefas. Essa estrutura exige complexidade e interação social para permitir a coexistência de até milhões de indivíduos em uma única colônia (NICKELE et al., 2013).

Dentre as inúmeras espécies e subespécies de *Atta* e *Acromyrmex*, menos de dez espécies de cada gênero representam, de fato, um grande problema econômico, sendo consideradas espécies daninhas. Uma das espécies que mais causam prejuízos às plantações brasileiras, é *Atta sexdens rubropilosa*, conhecida popularmente como saúva-limão. Elas causam danos principalmente a áreas de plantios florestais, como as de *Eucalyptus* spp. e *Pinus* spp. (ANTUNES et al., 2016).

O controle de formigas cortadeiras pode ser realizado através de métodos mecânicos, químicos, culturais e biológicos. Destes, o mais comumente utilizado é o químico, o qual consiste em aplicar produtos tóxicos diretamente no ninho, sob a forma de pó, líquido ou líquido nebulizável; ou nos arredores da colônia, sob a forma de iscas granuladas (BOARETTO; FORTI, 1997). No entanto, o uso de inseticidas causa prejuízo à saúde do homem bem como à de outros animais; além disso, há o potencial risco de poluição de solos, água e vegetação (NASCIMENTO; MELNYK, 2016).

Outros dois grandes problemas observados são a resistência demonstrada pelos insetos a esses compostos e os resíduos destes que podem ser encontrados em produtos de origem animal. Assim, diante da sua toxicidade e ineficácia, há a necessidade do desenvolvimento de métodos de controle de menor impacto ambiental e de maior eficácia, como a utilização de extratos de plantas,

prática esta, utilizada há vários séculos (CHAGAS, 2004; DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014). A procura de novas moléculas com atividade inseticida provenientes de plantas com atividade tóxica ou repelente cresceu nos últimos anos, principalmente por haver uma presumível segurança destes compostos naturais ao homem e ao meio ambiente (DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014).

Várias espécies de plantas apresentam atividade formicida, e dentre essas, algumas pertencem à família Rutaceae: *Citrus (sinensis, limon, reticulata)* (FERNANDES et al., 2002), *Pilocarpus grandiflorus* (GODOY et al., 2002), *Raulinoa echinata* (BIAVATTI et al., 2005), *Helietta puberula* (ALMEIDA et al.; 2007), *Spiranthera odoratissima* (TEREZAN et al., 2010), *Esenbeckia grandiflora* e *Zanthoxylum rhoifolium* (GOMES et al., 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Avaliar o potencial tóxico das folhas de *Esenbeckia pumila* Pohl (Rutaceae).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar a prospecção fitoquímica das folhas de *E. pumila*;
- ✓ Obter o extrato etanólico e as frações hexânica, diclorometânica, acetotilíca e metanólica das folhas de *E. pumila*;
- ✓ Avaliar a toxicidade do extrato e das frações das folhas de *E. pumila* no ensaio com náuplios de *Artemia salina*;
- ✓ Avaliar a citotoxicidade do extrato e das frações das folhas de *E. pumila* em linhagens de células tumorais SF-295 (glioblastoma), PC-3 (próstata) e HCT-116 (cólon);
- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato e das frações das folhas de *E. pumila* contra bactérias gram-positivas e gram-negativas;
- ✓ Avaliar a atividade inseticida do extrato e das frações das folhas de *E. pumila* em ensaio de toxicidade *in vitro* contra formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa*;
- ✓ Identificar compostos bioativos por meio de isolamento e determinação das substâncias presentes no extrato e nas frações de *E. pumila*.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS, REAGENTES E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Os materiais cromatográficos utilizados são apresentados na **Tabela 1**, assim como os solventes na **Tabela 2** e equipamentos na **Tabela 3**.

Tabela 1 - Materiais utilizados para cromatografia

Material	Marca
Celulose microcristalina D	Synth
Sílica gel 230-400 <i>mesh</i>	Macherey-Nagel
Diaion HP-20	Sigma-Aldrich
Sephadex LH-20	Sigma-Aldrich
Lâmpada UV (254 e 365 nm)	-

Tabela 2 - Reagentes utilizados para cromatografia

Reagente	Marca
Acetato de etila PA	Anidrol, Dinâmcia e Neon
Diclorometano PA	Anidrol, Dinâmcia e Neon
Etanol PA	Anidrol, Dinâmcia e Neon
Hexano PA	Anidrol, Dinâmcia e Neon
Clorofórmio deuterado	Merck
Metanol deuterado	Merck
Vanilina ácida	-

Tabela 3 - Equipamentos utilizados para cromatografia

Equipamentos	Marca
Estufa com circulação de ar	MA035 - Marconi
Moinho de facas tipo cróton	MA-580
Evaporador rotativo	TECNAL (TE120) e Quimis Q344B
Balança Analítica	Mettler P163
Espectrômetro de RMN	Bruker Advanced III – 500 MHz/11,75 Tesla, sonda multinuclear (BBO) 5 mm com detecção direta e gradiente de campo do eixo z (IQ-UFG)

4.2 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

As folhas (3100 g) da espécie *Esenbeckia pumila* foram coletadas em maio de 2015 no Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás (UEG) nas seguintes coordenadas geográficas: 16° 22' 48,8'' ao sul e 48° 56' 40,1'' a oeste. A identificação do material foi realizada pela Prof^a. Dr^a. Mirley Luciene dos Santos e as exsiccatas da espécie foram depositadas no Herbário da UEG (HUEG) sob o número 10883.

4.3 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA PRELIMINAR

O material botânico, após a coleta, foi seco em estufa a 45 °C, com circulação de ar, por 48 horas e, em seguida, foi triturado em moinho de facas. Posteriormente, foi submetido a reações de caracterização dos metabólitos mais relevantes, separados em três grandes grupos: compostos fenólicos (fenóis simples, flavonoides, antraquinonas cumarinas e taninos), compostos nitrogenados (alcaloides) e compostos terpênicos (terpenos/esteróis e saponinas). Todas as reações foram realizadas em triplicata e a metodologia utilizada foi adaptada de Matos (2009), Simões (2010), Costa (2001) e Matos e Matos (1989). Os grupos pesquisados bem como as reações utilizadas são mostrados na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Reações realizadas na prospecção fitoquímica preliminar de *Esenbeckia pumila*

Metabólitos Secundários	Reações de Caracterização
Flavonoides	Colorimétricas (Shinoda, hidróxido de sódio e cloreto férrico) e de fluorescência sob luz ultravioleta (oxalobórica, ácido sulfúrico, cloreto de alumínio e hidróxido de potássio)
Antraquinonas	Bornträger Indireta
Cumarinas	Fluorescência sob luz ultravioleta potencializada com hidróxido de sódio
Terpenos/esteróis	Liebermann-Burchard, Pesez, Keller-Kiliam e Kedde
Taninos	Precipitação (gelatina, sulfato de quinino, sulfato de brucina, acetato de cobre e cloreto férrico) e colorimétrico (hidróxido de sódio)
Alcaloides	Mayer, Dragendorff, Bouchardat, Bertrand e Hager, ácido tânico
Saponinas	Agitação-espuma

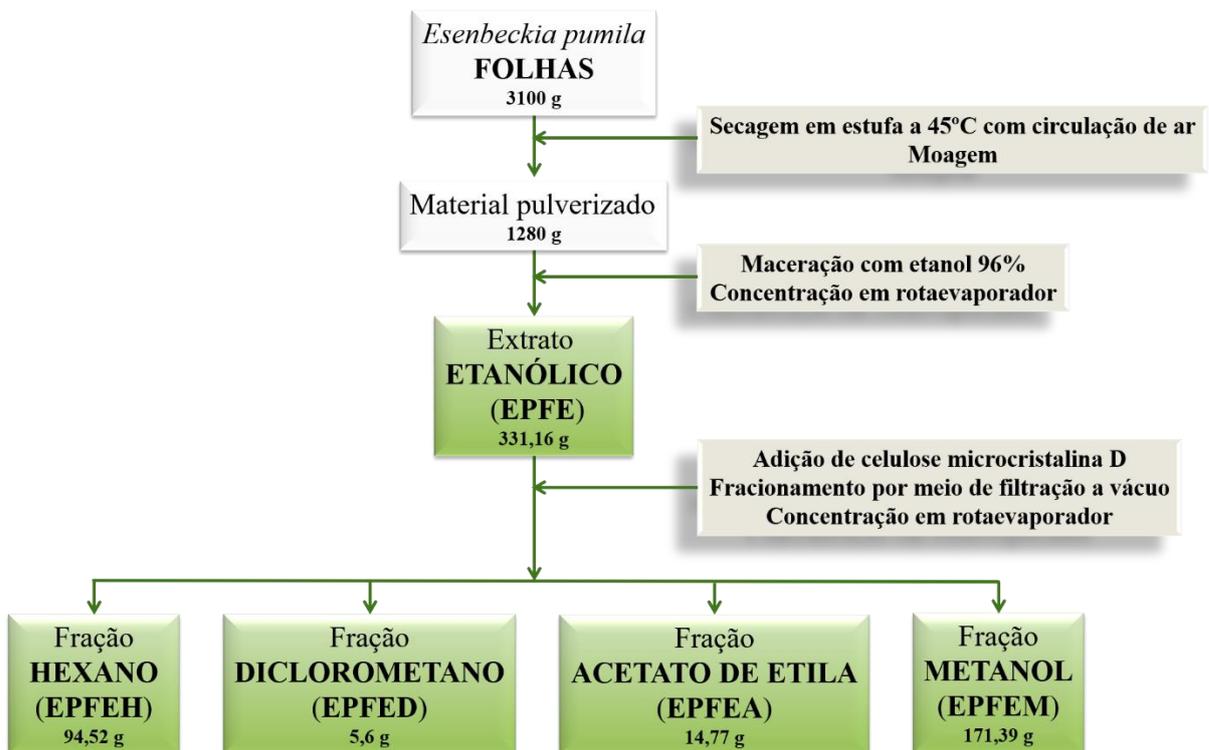
4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO E DAS FRAÇÕES

O material botânico (3100 g), após a coleta, foi seco em estufa a 45 °C, com circulação de ar, por 48 horas e, em seguida, foi triturado em moinho de facas. Esse material pulverizado foi, então, submetido a extração através de maceração a frio em etanol 96% por um período de três dias. Após esse tempo, foi submetido à processo de remaceração com renovação do líquido extrator a cada 24 horas. Todo o extrato obtido foi, posteriormente, filtrado e concentrado em evaporador rotatório (MATOS, 2009).

O extrato etanólico (EPFE) foi fracionado e para tanto foram utilizados solventes em ordem de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol). Tal processo foi realizado por meio de filtração a vácuo após a

incorporação de celulose microcristalina D ao extrato etanólico. Foram obtidas quatro frações: hexânica (EPFEH), diclorometânica (EPFED), acetato-etílica (EPFEA) e metanólica (EPFEM). O processo de obtenção do extrato e frações pode ser observado na **Figura 18**.

Figura 18 - Obtenção de extrato e frações de *Esenbeckia pumila*



4.5 ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *E. pumila*

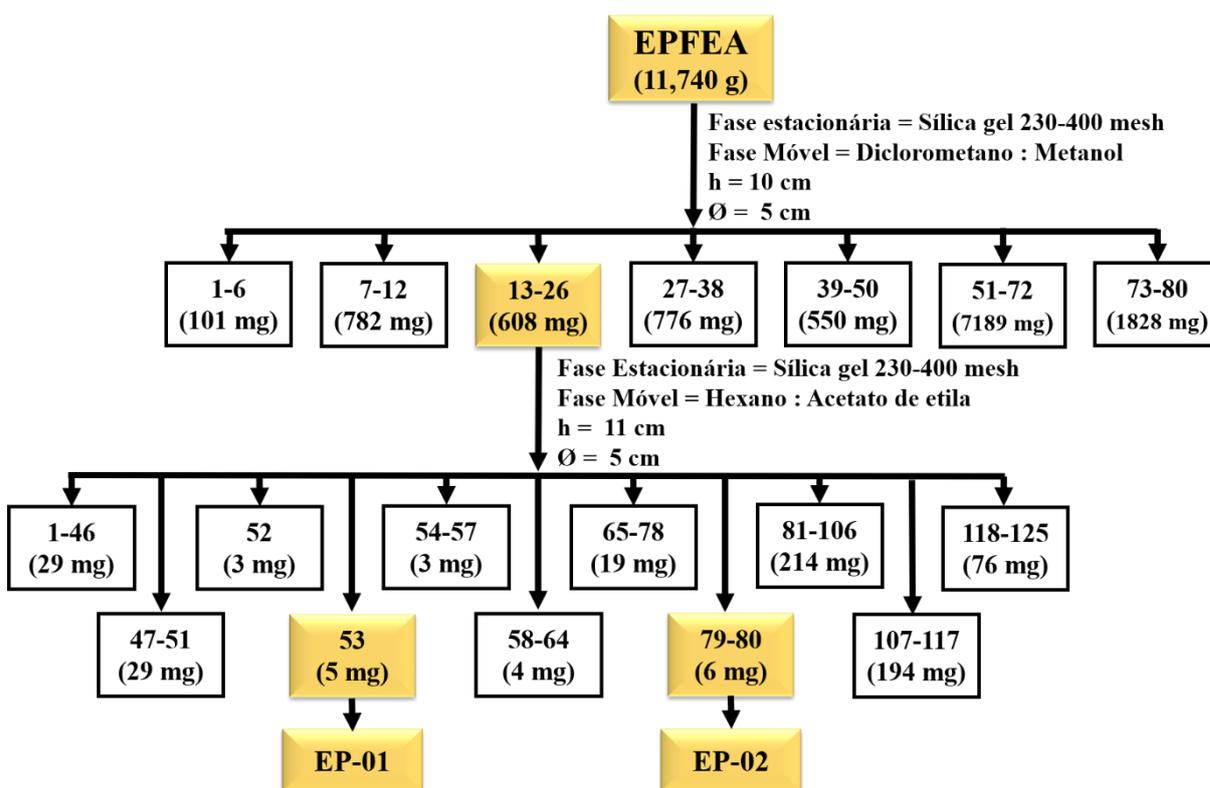
4.5.1 Isolamento e identificação das substâncias EP-01 e EP-02

A fração EPFEA (11,74 g) foi submetida à cromatografia em coluna ($h = 17$ cm e $\varnothing = 5$ cm), cuja fase estacionária foi sílica gel 60 e a fase móvel foi um gradiente de polaridade crescente entre diclorometano e metanol, para a obtenção de sete frações.

Após monitoramento por CCD, dentre as sete frações, a terceira (13-26 – 608 mg) foi submetida a um novo fracionamento por cromatografia em coluna ($h = 11$ cm e $\varnothing = 5$ cm), com a utilização de sílica gel 60 como fase estacionária, e hexano e AcOEt, com gradiente de polaridade crescente, como fase móvel, para a obtenção de onze novas frações.

Dessas frações, a terceira (53 – 5 mg), denominada **EP-01**, bem como a oitava fração (79-80 – 6 mg), **EP-02**, foram encaminhadas para caracterização por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ^1H e ^{13}C . A **Figura 19** apresenta um fluxograma do processo de isolamento dessas substâncias.

Figura 19 - Fluxograma do isolamento de EP-01 e de EP-02



As análises de RMN foram realizadas a 25 °C e os espectros foram obtidos a 500 MHz para ^1H e a 125 MHz para ^{13}C , com CDCl_3 como solvente e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

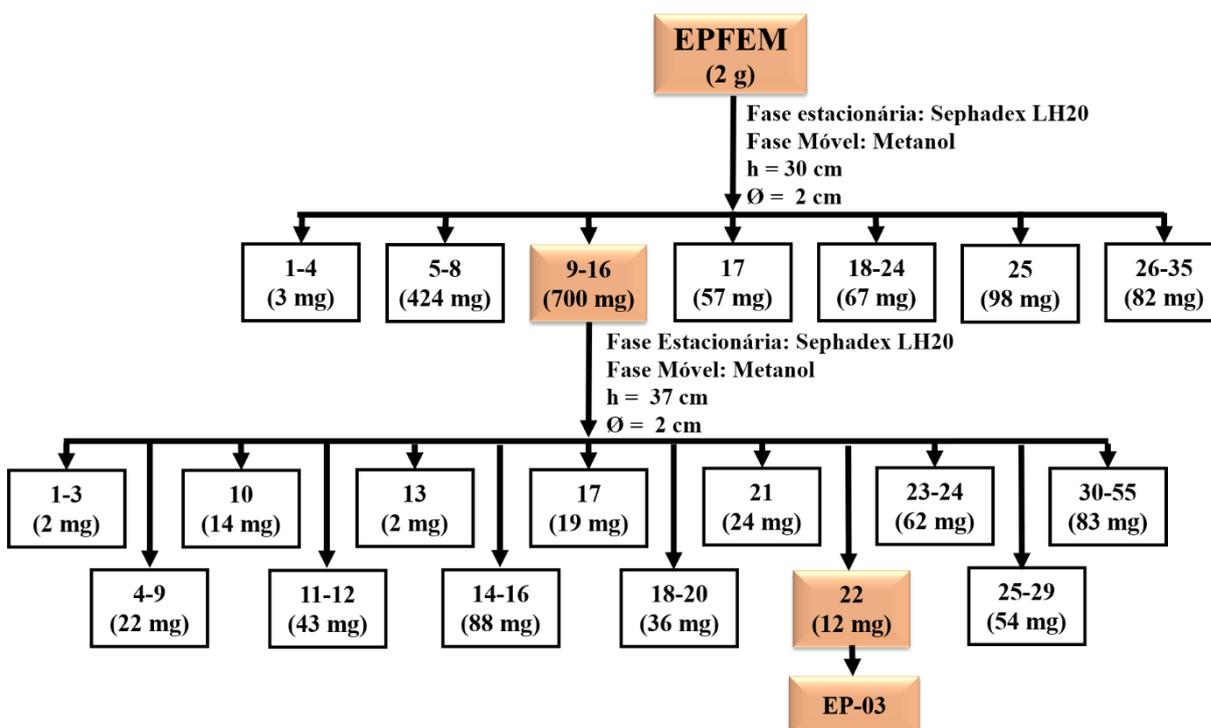
4.5.2 Isolamento e identificação do flavonoide EP-03

A fração EPFEM (2 g) foi submetida à cromatografia em coluna (h = 30 cm e $\varnothing = 2$ cm), com Sephadex LH-20 como fase estacionária e metanol como fase móvel, para a obtenção de sete frações.

Após avaliação por CCD, das sete frações, a terceira (9-16 – 700 mg) foi submetida a um novo fracionamento por cromatografia em coluna (h = 37 cm e $\varnothing = 2$ cm). Foi utilizado como fase estacionária Sephadex LH-20 e como fase móvel, metanol, para a obtenção de treze novas frações.

A terceira fração desse novo fracionamento (22 – 12 mg), denominada **EP-03**, foi submetida à caracterização por RMN ^1H e ^{13}C . A **Figura 20** apresenta um fluxograma do processo de isolamento de tal substância.

Figura 20 - Fluxograma do isolamento de EP-03



As análises de RMN foram realizadas a 25 °C e os espectros foram obtidos a 500 MHz para ^1H e a 125 MHz para ^{13}C , com MeOD como solvente e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

4.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.6.1 Ensaio de toxicidade com *Artemia salina*

Este teste se baseou no método descrito por Meyer et al. (1982) e adaptado por Molina-Salinas e Said-Fernández (2006).

O teste consistiu na exposição de náuplios de *Artemia salina* ao extrato e às frações de *Esenbeckia pumila* em cinco concentrações distintas obtidas através de microdiluição e posterior obtenção de CL_{50} (concentração letal média) (**Figura 21**).

Figura 21 - Ensaio de toxicidade com *Artemia salina*



Os náuplios foram obtidos da eclosão de cistos de *A. salina*, adquiridos comercialmente, após incubação, por 36 horas, em um recipiente com solução salina (água do mar artificial), sob aeração constante e temperatura entre 20 e 25 °C.

Para o preparo da água do mar artificial foram utilizados sal marinho (48 g.L⁻¹), extrato de leveduras (6 mg.mL⁻¹) e água destilada. Em seguida essa solução foi esterilizada em autoclave por 15 minutos e a 121 °C. Após o resfriamento, seu pH foi ajustado para 8,5 com solução de Na₂CO₃ 0,1 mol.L⁻¹.

Após a liberação dos náuplios de *A. salina*, estes foram atraídos por fonte de luz artificial e coletados em placa de petri contendo meio salino fresco. Em seguida, através de micropipetagem, foram transferidos para microplacas de poliestireno de 96 poços numa relação de 10 (±1) indivíduos por poço.

O extrato etanólico e as frações foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e solução salina para obtenção de diferentes concentrações (4000, 2000, 100, 500, 250 e 125 µg.mL⁻¹). Posteriormente, foram adicionados aos poços das microplacas de 96 poços contendo os microcrustáceos, atingindo, então, concentrações finais de 2000, 100, 500, 250, 125 e 62, 5 µg.mL⁻¹.

Como controle de viabilidade foi utilizada solução de DMSO 2,5%, e como controle de letalidade, solução de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇). A água do mar artificial foi o diluente utilizado em ambos os controles.

Após um período de 24 horas de incubação em temperatura ambiente e iluminação artificial, foi realizada contagem dos indivíduos vivos e mortos para cada experimento realizado em triplicata.

Os valores de CL₅₀ foram obtidos a partir da regressão linear obtida da relação entre a porcentagem de náuplios mortos e a concentração do extrato. Para tanto, foi utilizado o método *PROBIT* de análise, através do *software STATPLUS*® 2009.

A classificação da toxicidade do extrato e das frações foi realizada segundo o método apresentado por Nguta et al. (2011) onde valores de CL₅₀ menores que 100 µg.mL⁻¹ foram considerados de forte toxicidade, valores entre 100 µg.mL⁻¹ e 500 µg.mL⁻¹ de toxicidade moderada; entre 500 µg.mL⁻¹ e 1000

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ de baixa toxicidade e maiores que $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram considerados atóxicos (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Classificação de toxicidade segundo Nguta et al. (2011)

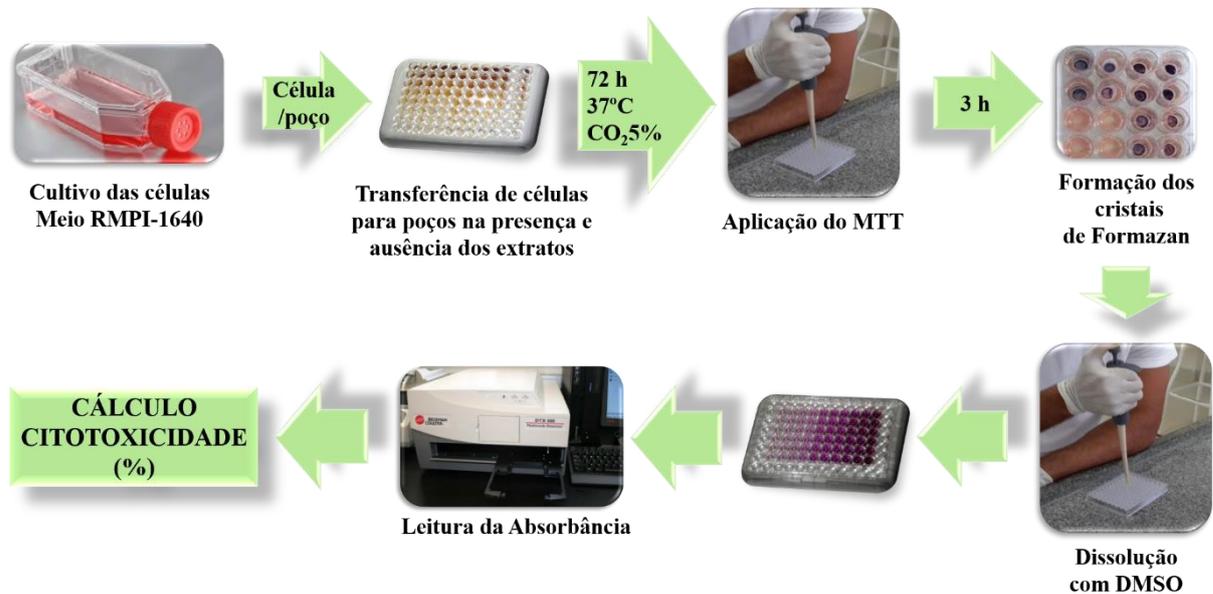
Valores de CL_{50}	Toxicidade
Menores que $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Forte
Entre $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Moderada
Entre $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Baixa
Maiores que $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Não tóxico

4.6.2 Ensaio de citotoxicidade *in vitro* com células tumorais

Todos os testes para avaliação da atividade citotóxica foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, através do método de redução do MTT, descrito pela primeira vez por Mosmann (1983).

Este método teve por objetivo verificar a viabilidade e o estado metabólico de células tumorais expostas ao extrato e às frações de *Esenbeckia pumila*. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em cristais de formazan (cor púrpura), a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas (**Figura 22**).

Figura 22 - Ensaio de citotoxicidade *in vitro* com células tumorais



Foram utilizadas linhagens de células tumorais humanas SF-295 (glioblastoma), PC-3 (próstata) e HCT-116 (côlon), todas cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂.

As células tumorais foram transferidas para placas de 96 poços nas concentrações 0,1 x 10⁶ células/mL para as linhagens SF-295 e PC-3, e 0,7 x 10⁵ células/mL para a linhagem HCT-116 e, em seguida, incubadas por 24 horas.

O extrato e as frações foram diluídos em DMSO puro estéril, para a obtenção de uma concentração única de 50 µg.mL⁻¹ para o extrato e de 25 µg.mL⁻¹ para as frações.

Após a incubação, as células foram tratadas com os compostos nas concentrações obtidas na diluição e incubadas por 72 horas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂. Ao término da incubação, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium) a 1%, e após um período de incubação de

3 h, foram acrescentados 150 μ L de DMSO puro a cada poço, para a dissolução dos cristais de formazan.

Após a dissolução do precipitado, a absorbância foi lida com o auxílio de espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda 595 nm e, para finalizar, foi determinada a porcentagem de células vivas viáveis. Os experimentos foram analisados segundo a média \pm desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular, usando o programa *GraphPad Prism*.

Esta metodologia consistiu em uma triagem de compostos promissores, devido a isso não foram utilizados controles para a técnica.

Como observado, essa técnica não se valeu da inclusão de controles da técnica bem como da avaliação da atividade dos compostos em células normais. Esse é um procedimento adotado e padronizado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, que tem por finalidade realizar uma triagem dos compostos testados. Aqueles que apresentarem resultados mais promissores, deverão ser testados novamente em ensaios que incluam controles positivos e negativos, assim como a avaliação da atividade citotóxica em células normais.

4.6.3 Ensaio de atividade antimicrobiana

Os ensaios microbiológicos foram realizados no laboratório de Microbiologia do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas (CCET) da Universidade Estadual de Goiás.

O objetivo dos testes foi determinar a CMI (Concentração Mínima Inibitória) e a CMB (Concentração Mínima Bactericida) do extrato e das frações em bactérias gram positivas e negativas através do método de microdiluição em caldo conforme norma M7-A6 (CLSI, 2003) e suplemento M100-S15 (CLSI, 2005) do Manual do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI), com adaptações.

Foram utilizadas culturas de seis cepas de bactérias de referência ATCC *American Type Culture Collection*, mantidas no Laboratório de Microbiologia do CCET da Universidade Estadual de Goiás (**Tabela 6**).

Tabela 6 - Microrganismos utilizados nos ensaios microbiológicos

Microorganismos	ATCC
Bactérias Gram (+)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213 – UFG
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923 – UFG
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228 – UFG
Bactérias Gram (-)	
<i>Escherichia coli</i>	25312 – UFG
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	700603 – UFG
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853 – UFG

Para manutenção e conservação das cepas-padrão foi utilizado o método descrito por Silva, Costa e Chinarelli (2008), com pequenas alterações. A manutenção da cultura foi feita por semeadura das bactérias em meio ágar BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubação a 35 °C por 24 horas. Para a conservação, 3 a 5 colônias isoladas e típicas de cada microrganismo foram transferidas para um tubo com 15 mL de caldo BHI + 3 mL de glicerol. Após homogeneização em agitador do tipo vortex por 15 segundos os tubos foram incubados a 35 °C por 12 horas. Nova homogeneização foi realizada após a incubação e, então, alíquotas de 1 mL foram fracionadas em microtubos tipo *ependorf*, previamente esterilizados e identificados. Os tubos foram refrigerados por sete dias a 8 °C e congelados posteriormente em freezer a -20 °C.

Os inóculos foram preparados a partir dessas culturas estoque, após serem descongeladas e terem atingido temperatura ambiente. Primeiramente

foram feitos repiques pela técnica de esgotamento em placas contendo ágar Mueller Hinton (MH), as quais foram incubadas a 35 °C por 24 horas.

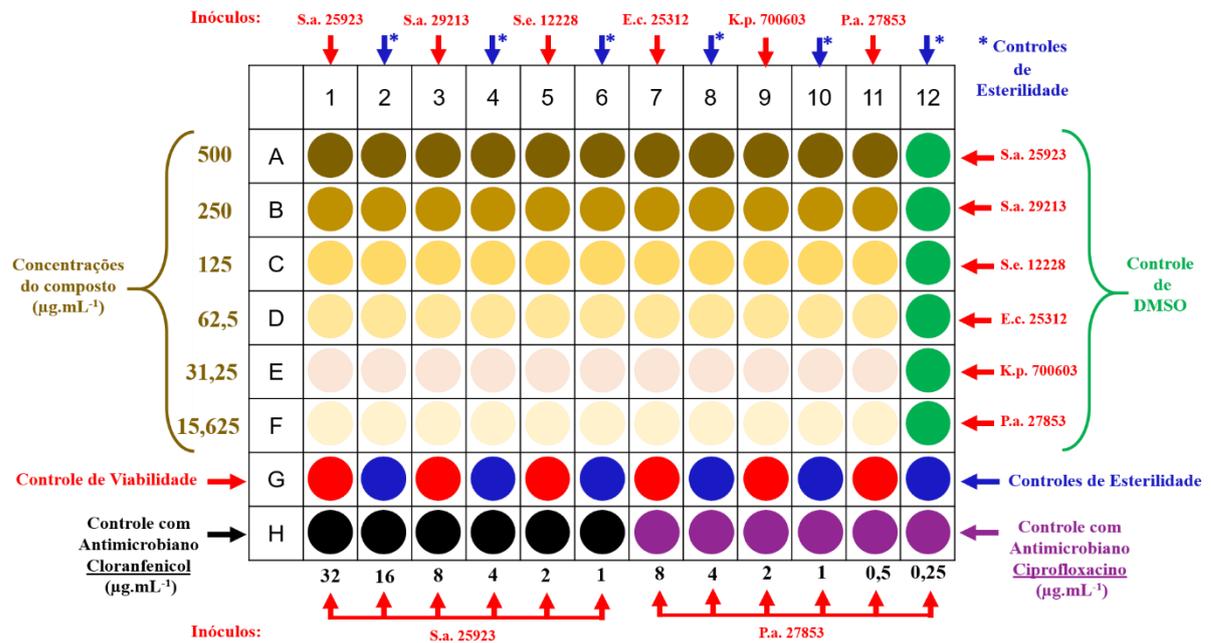
Após incubação, 3 a 5 colônias isoladas e típicas foram transferidas para um tubo com 5 mL de solução fisiológica 0,9%, para se obter um meio turvo correspondente a 0,5 da escala de McFarland (10^8 UFC.mL⁻¹), por leitura em espectrofotômetro a 625 nm (79,4% a 83,2% de transmitância). Em seguida 0,5 mL da suspensão de microrganismos foi diluída em 4,5 mL de solução fisiológica (1:10), atingindo portanto, a concentração de 10^7 UFC.mL⁻¹. O procedimento foi realizado 15 minutos antes da inoculação nos poços das placas de CMI.

O extrato e as frações foram solubilizados em Dimetilsulfóxido (DMSO) a 5% e diluídos em caldo MH até a obtenção de seis diferentes concentrações (500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 15, 625 µg.mL⁻¹).

Como controle do método foram utilizados os antimicrobianos cloranfenicol, nas concentrações de 32, 16, 8, 4, 2 e 1 µg.mL⁻¹; e o ciprofloxacino nas concentrações 8; 4; 2; 1; 0,5 e 0,25 µg.mL⁻¹, conforme recomendado pelo CLSI.

Posteriormente às diluições, foram transferidos para placa de 96 poços (fundo em V) 100 µL/poço de todas as concentrações das amostras e dos antimicrobianos bem como 0,5 µL dos inóculos conforme mostra a **Figura 23**. Para controle de viabilidade foi utilizado apenas caldo MH estéril (100 µL/poço) e para avaliar a possível interferência de DMSO foi incluído caldo MH estéril com 5% de Dimetilsulfóxido (100 µL/poço). Controle de esterilidade na presença e na ausência de compostos também puderam ser realizados. As microplacas foram tampadas e incubadas a 35 °C por 24 horas. Cada amostra foi avaliada em placas individuais contra as seis bactérias simultaneamente.

Figura 23 - Layout da placa de CMI



Após o período de incubação, foi realizada a leitura das placas visualmente sendo considerada CMI da amostra a menor concentração onde não se observou a formação de depósito de colônias do tipo “botão” no fundo do poço.

A classificação da atividade antimicrobiana do extrato e das frações foi realizada segundo o critério sugerido por Holetz et al. (2002) onde valores de CMI menores que 100 µg.mL⁻¹ apresentam boa atividade antimicrobiana, valores entre 100 µg.mL⁻¹ e 500 µg.mL⁻¹ atividade moderada; entre 500 µg.mL⁻¹ e 1000 µg.mL⁻¹ baixa atividade e maiores que 1000 µg.mL⁻¹ são considerados inativos (Tabela 7).

Tabela 7 - Classificação de atividade antimicrobiana segundo Holetz et al. (2002)

Valores de CMI	Atividade Antimicrobiana
Menores que 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Boa
Entre 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Moderada
Entre 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Fraca
Maiores que 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Inativo

A maior concentração dos compostos empregados neste estudo foi de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, uma vez que, em concentrações mais altas, a intensa coloração prejudicaria a leitura dos resultados. Além disso, de acordo com Holetz et al. (2002), concentrações acima dessa faixa possuem fraca atividade, sendo de difícil aproveitamento farmacêutico no tratamento de infecções bacterianas.

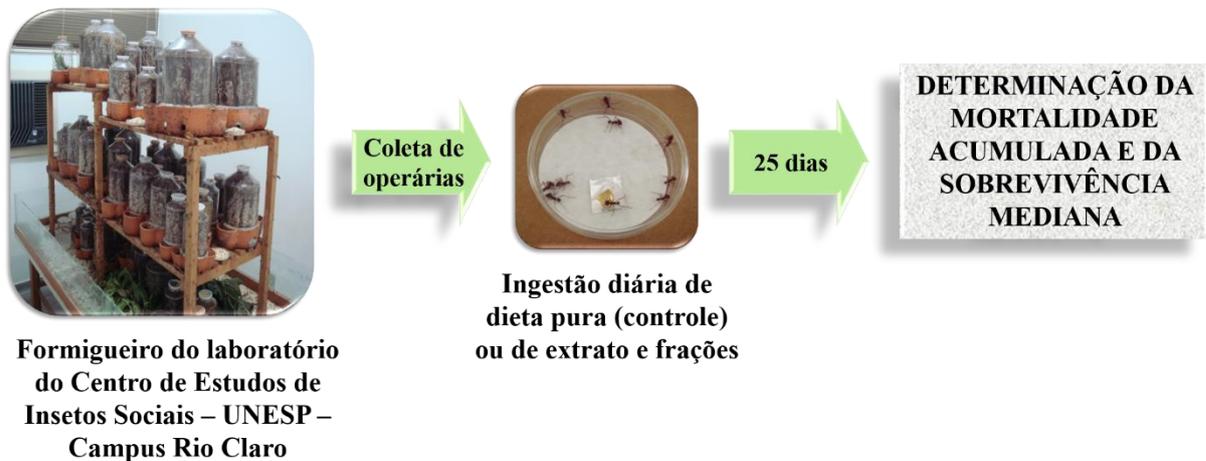
A determinação de CMB consistiu em avaliar a concentração subsequente àquela onde se observou CMI, através de semeadura em placa com ágar MH e incubação da placa a 35 °C por 24 horas. Após incubação, foi verificado se houve ou não crescimento de colônias.

4.6.4 Ensaio de atividade inseticida *in vitro* contra *Atta sexdens rubropilosa*

Os ensaios foram realizados no Centro de Estudos de Insetos Sociais – Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Campus Rio Claro, baseados na metodologia de Bueno et al. (1997).

O método consistiu basicamente em verificar a porcentagem de mortalidade e a sobrevivência mediana de formigas operárias de *Atta sexdens rubropilosa* após a ingestão diária do extrato e das frações de *Esenbeckia pumila* em três concentrações distintas, por um período de 25 dias (**Figura 24**).

Figura 24 - Ensaio de atividade inseticida *in vitro* com *Atta sexdens rubropilosa*



Foram utilizadas operárias de tamanho médio coletadas de ninhos adultos mantidos em salas climatizadas com temperatura de 24 ± 1 °C e U. R. acima de 70%. Para a manutenção do formigueiro foram oferecidas diariamente folhas de *Eucalyptus* sp., flocos de aveia e, ocasionalmente, outras plantas palatáveis às saúvas tais como *Hibiscus* sp., *Ligustrum* sp. ou folhas e pétalas de roseiras.

As formigas isoladas do formigueiro, foram mantidas com uma dieta artificial sólida preparada com 1,25 g de glicose, 0,25 g de peptona bacteriológica, 0,025 g de extrato de levedura, 0,25 g de ágar bacteriológico e 25 mL de água destilada. Após solubilizada em forno micro-ondas e autoclavada por 15 minutos a 120 °C e 1 atm, a mistura foi vertida quente em placas de Petri de 10 cm de diâmetro, previamente esterilizadas e, após o resfriamento e a solidificação, foi embrulhada em filme de PVC e mantida em geladeira, para utilização durante o período do experimento.

A atividade tóxica sobre as formigas foi verificada pela ingestão do extrato e das frações de *E. pumila* incorporados à dieta artificial sólida em três concentrações distintas (0,2; 1,0 e 2,0 mg). Primeiramente, foram incorporados à

glicose e aos demais ingredientes secos da dieta e, posteriormente, à água destilada, sem a utilização de solvente. Em seguida, a mistura obtida foi solubilizada em forno micro-ondas, autoclavada a 120 °C (1 atm por 20 minutos) e armazenada da mesma forma que a dieta pura.

Para cada tratamento, as formigas, com massa corpórea variando de 15 a 25 mg, foram distribuídas em lotes de 50 operárias com grupos de 10 indivíduos colocados em 5 placas de Petri de 10 cm de diâmetro forradas com papel filtro. A dieta pura (controle) ou a dieta acrescida do extrato e frações (tratamento) foi colocada em papel alumínio na quantidade aproximada de 0,4 a 0,5 g/placa. Essas placas foram colocadas em estufa para BOD a 24 °C (± 1) e umidade relativa acima de 70%. Os bioensaios foram examinados diariamente, para a retirada e anotação do número de formigas mortas, renovação da dieta e troca do papel de filtro, durante um período máximo de 25 dias, levando-se em conta o período normal de sobrevivência das formigas mantidas com dieta artificial.

A análise gráfica foi realizada através das determinações das porcentagens acumuladas de formigas vivas por dia para cada tratamento. Posteriormente, o tempo de sobrevivência mediana foi determinado e as curvas de sobrevivência foram comparadas por meio do teste não paramétrico *log-rank* ($p < 0,05$) (ELANDT-JOHNSON; JOHNSON, 1980), com a utilização do *software Graph-Pad*, aplicativo Prisma 3.0. Em seguida, foi feita a comparação entre as curvas de sobrevivência de formigas submetidas aos tratamentos e ao controle (dieta pura).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA PRELIMINAR

As reações de caracterização apontaram para a presença de flavonoides, antraquinonas, cumarinas, taninos e terpenos/esteróis nas folhas de *Esenbeckia pumila*. Apenas as reações para identificação de alcaloides e saponinas apresentaram resultados negativos.

Para a caracterização dos compostos fenólicos em geral o material vegetal foi submetido ao teste de identificação de hidroxilas fenólicas, para o qual foram utilizados hidróxido de sódio a 20% (p/v), que resultou no surgimento de uma coloração amarelada no tubo de reação; cloreto de alumínio a 5% (p/v), com observação de fluorescência amarela intensa sob luz U.V.; e cloreto férrico a 4,5% (p/v), onde observou-se coloração enegrecida no tubo.

As reações específicas para flavonoides também foram realizadas: Shinoda, na qual a coloração marrom foi observada (soma das cores vermelha e verde da clorofila da amostra); oxalo-bórica, com aparecimento de fluorescência amarelo-esverdeada sob U.V.; e com ácido sulfúrico concentrado, também com aparecimento de fluorescência.

A presença de antraquinonas também foi investigada através da reação de Bornträger indireta, com a observação de coloração rósea na fase amoniacal. Para identificar cumarinas após a extração com HCl 1 N, a fluorescência emitida por esses compostos foi observada de forma pouca intensa sob luz U.V.

Para identificar taninos foram empregados testes de precipitação com gelatina, alcaloides (sulfato de quinino e solução sulfúrica de brucina), sais metálicos (acetato de cobre e cloreto férrico) e hidróxido de sódio, cujos resultados foram formação de precipitados com gelatina, alcaloides e sais

metálicos bem como formação de coloração de coloração escura no tubo com hidróxido de sódio.

Para a pesquisa de alcaloides foram empregados os reativos de Mayer, Dragendorff, Bouchardat e de Hager, além de ácido tânico, para os quais deveria ser evidenciada a formação de precipitados branco, vermelho tijolo, marrom-avermelhado, branco, amarelo e bege. No entanto, não houve formação de precipitado nos tubos.

A identificação de compostos terpenos/esteróis foi possível pela realização das reações de Liebermann-Burchard e Pesez para caracterização do núcleo esteroidal, com formação de coloração verde escuro e emissão de fluorescência verde-amarelada; da reação de Keller-Killiani para a detecção de desoxi-açúcares, na qual foi observada a formação de um anel de coloração castanho-avermelhada; e da reação de Kedde, específica para o anel lactônico, com desenvolvimento de cor laranja clara estável por ter sido utilizado ácido pícrico em substituição ao ácido 3,5-dinitrobenzóico.

A presença de saponinas foi feita através do teste agitação-espuma, em que a espuma formada não persistiu após 15 minutos.

Os resultados da prospecção fitoquímica preliminar podem ser visualizados na **Tabela 8**.

Tabela 8 - Resultados das reações de caracterização de metabólitos secundários de *Esenbeckia pumila*

Metabólitos Secundários	Resultados das Reações
Flavonoides	+
Antraquinonas	+
Cumarinas	+
Terpenos/esteróis	+
Taninos	+
Alcaloides	-
Saponinas	-

Legenda: + positivo, - negativo

Os principais metabólitos presentes nas folhas de *E. pumila* são flavonoides, antraquinonas, cumarinas, taninos e terpenos/esteróis. A presença de cumarinas confirma o papel destes constituintes como marcadores químicos do gênero *Esenbeckia*.

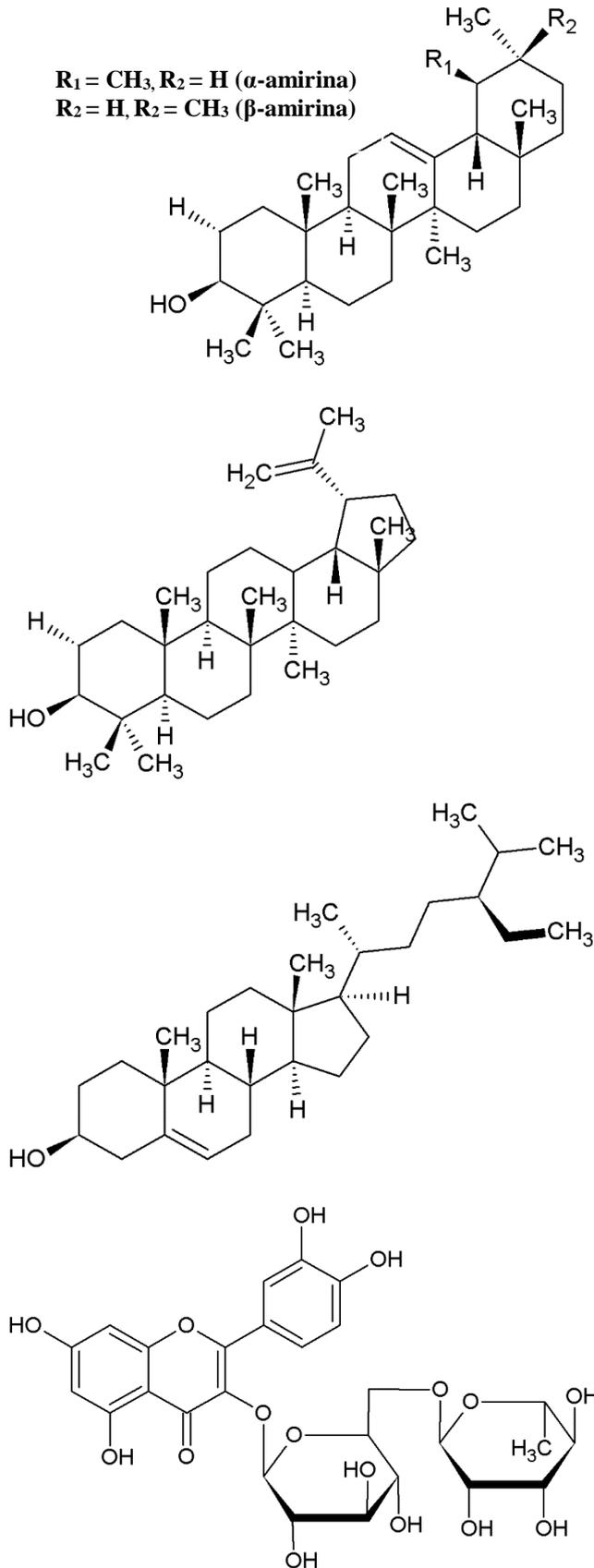
Embora os resultados dos testes para caracterização de alcaloides, outro grupo considerado quimiomarcador, tenham mostrado-se negativos para folhas de *E. pumila*, estas substâncias podem estar presentes em outros órgãos do vegetal.

5.2 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

5.2.1 Substâncias isoladas

Através deste estudo fitoquímico foi possível isolar das folhas de *Esenbeckia pumila* quatro substâncias (**Figura 25**).

Figura 25 - Representação estrutural das substâncias isoladas das folhas de *E. pumila*



α -amirina e β -amirina (EP-01)

Massa: 5 mg (em mistura)

Isolamento: p. 57

Identificação: p. 75

Lupeol (EP-01)

Massa: 5 mg (em mistura)

Isolamento: p. 57

Identificação: p. 75

β -sitosterol (EP-02)

Massa: 6 mg

Isolamento: p. 57

Identificação: p. 81

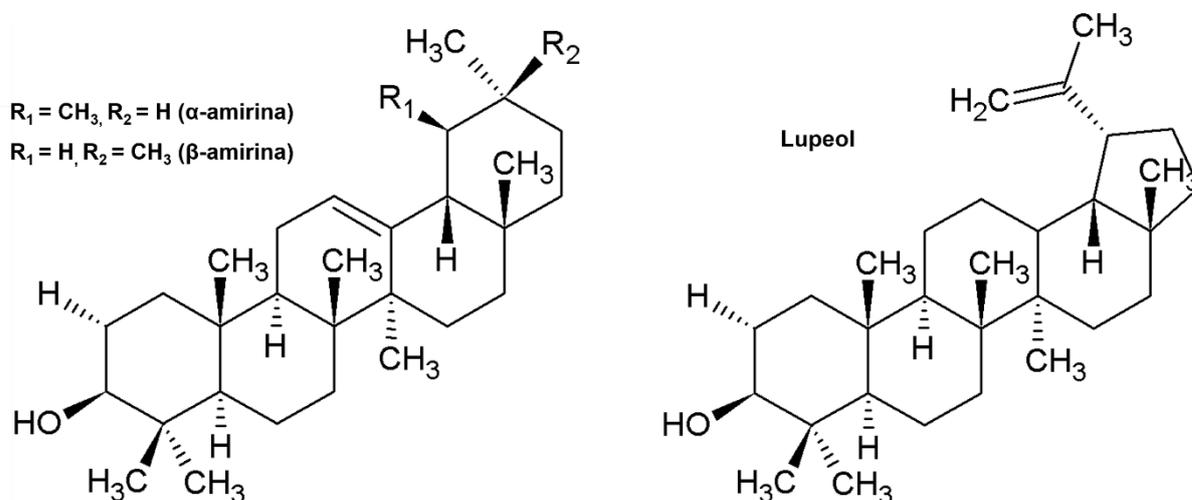
Rutina (EP-03)

Massa: 12 mg

Isolamento: p. 59

Identificação: p. 84

5.2.2 Identificação da mistura de triterpenos EP-01



A mistura de substâncias EP-01 (5 mg), originária da fração EPFEA, apresentou-se na forma de sólido branco. Sua identificação foi realizada por meio de análises de RMN ^1H , RMN ^{13}C e comparação com dados da literatura, que indicaram a presença de α -amirina, β -amirina e lupeol.

No espectro de RMN ^1H de EP-01 (**Figura 26**, p. 78) estão presentes vários sinais entre $\delta_{\text{H}} 0,7$ e $\delta_{\text{H}} 1,5$ os quais são característicos de carbonos metílicos e metilênicos de triterpenos (GUIMARÃES; SIANI, 2007). Em $\delta_{\text{H}} 1,68$ encontra-se um simpleto indicativo de hidrogênios do grupo metila (H-30) ligado a carbono insaturado sp^2 do lupeol (JEFFREYS; NUNEZ, 2016). É possível observar também em aproximadamente $\delta_{\text{H}} 3,2$ ppm um duplo duplo ($J = 5,0$ e $11,0$ Hz) característico de triterpenos $3\beta\text{-OH}$ que podem ser confirmados no espectro de RMN ^{13}C (**Figura 27**, p. 79) pela presença do sinal δ_{C} em torno de 79 ppm (C-3), região característica da função álcool em triterpenos (AYRES et al., 2008; OLEA; ROQUE, 1990).

Em $\delta_{\text{H}} 4,68$ observa-se um duplo (1H, d , $J = 2,3$ Hz) e em $\delta_{\text{H}} 4,56$ um multiplo (1H, m), referente ao hidrogênio vinílico da dupla terminal do lupeol

(H-29). Também há um multiplete em δ_H 3,2 (1H, *m*) relativo ao hidrogênio ligado ao carbono carbinólico (H-3) do lupeol (JEFFREYS; NUNEZ, 2016).

Dois tripletos localizados na região característica de hidrogênios olefínicos (δ_H 4,5-7,5) confirmam a presença das substâncias α -amirina e β -amirina na mistura. O da α -amirina está localizado em δ_H 5,12 (1H, *t*, $J = 3,6$ Hz) e o da β -amirina em δ_H 5,18 (1H, *t*, $J = 3,6$ Hz), ambos referentes ao carbono 12 de cada substância, cuja diferença de deslocamento justifica-se pelas interações que a metila (C-19) exerce sobre esses hidrogênios, já que encontram-se em posições diferentes em cada uma das substâncias (DIAS; HAMERSK; PINTO, 2011).

No espectro de RMN ^{13}C (**Figura 27**, p. 79), são observados sinais característicos de carbonos de triterpenos pentacíclicos semelhantes à α -amirina e β -amirina, referentes aos carbonos C-18, C-19 e C-20, cujos deslocamentos químicos são δ 59,1, δ 39,6, δ 39,6; e δ 47,2, δ 46,8, δ 31,2, respectivamente. Os valores encontrados para esses mesmos carbonos no lupeol foram δ 48,3, δ 48,0 e δ 150,9, respectivamente. Todos os valores mencionados são similares aos da literatura, o que pode ser verificado na **Tabela 9** (p. 80).

Um dos critérios de diferenciação mais adotados para a distinção desses três triterpenos em mistura é a presença de dois sinais correspondentes aos carbonos sp^2 de cada molécula. A α -amirina apresenta para C-12 e C-13 valores característicos de deslocamento químico de 124,4 e 139,4 ppm, respectivamente, enquanto que a β -amirina apresenta, para os mesmos carbonos, valores de 121,7 e 145,1 ppm, respectivamente. O lupeol, por sua vez, apresenta a dupla ligação entre os carbonos C-20 e C-29 do lupeol, cujos valores de deslocamento químico são 150,5 e 109,3 ppm, respectivamente (OLEA; ROQUE, 1990; AYRES et al., 2008; DIAZ et al., 2008; JEFFREYS; NUNEZ, 2016).

No espectro de ^{13}C os sinais referentes aos carbonos C-13, de α -amirina e β -amirina, e C-20 de lupeol não estão presentes. Esse fato é explicado pelo

processo de relaxação molecular o qual permite gerar um sinal e produzir um espectro. No caso de carbonos quaternários, como é o caso, esses possuem tempos de relaxação mais longos em comparação a carbonos ligados a hidrogênios, e precisam de mais tempo para gerar um sinal de RMN. Apesar da falta desses sinais no espectro, os outros três sinais presentes 124,4; 121,7 e 109,3 ppm são, respectivamente, característicos dos três triterpenos em questão, não podendo ser atribuídos a outros esqueletos triterpênicos (OLEA; ROQUE, 1990; PAVIA et al., 2011).

Figura 26 – Espectro de RMN ¹H de EP-01, com expansão da região de δ 5,2 a 2,40 ppm (CDCl₃, 500 MHz)

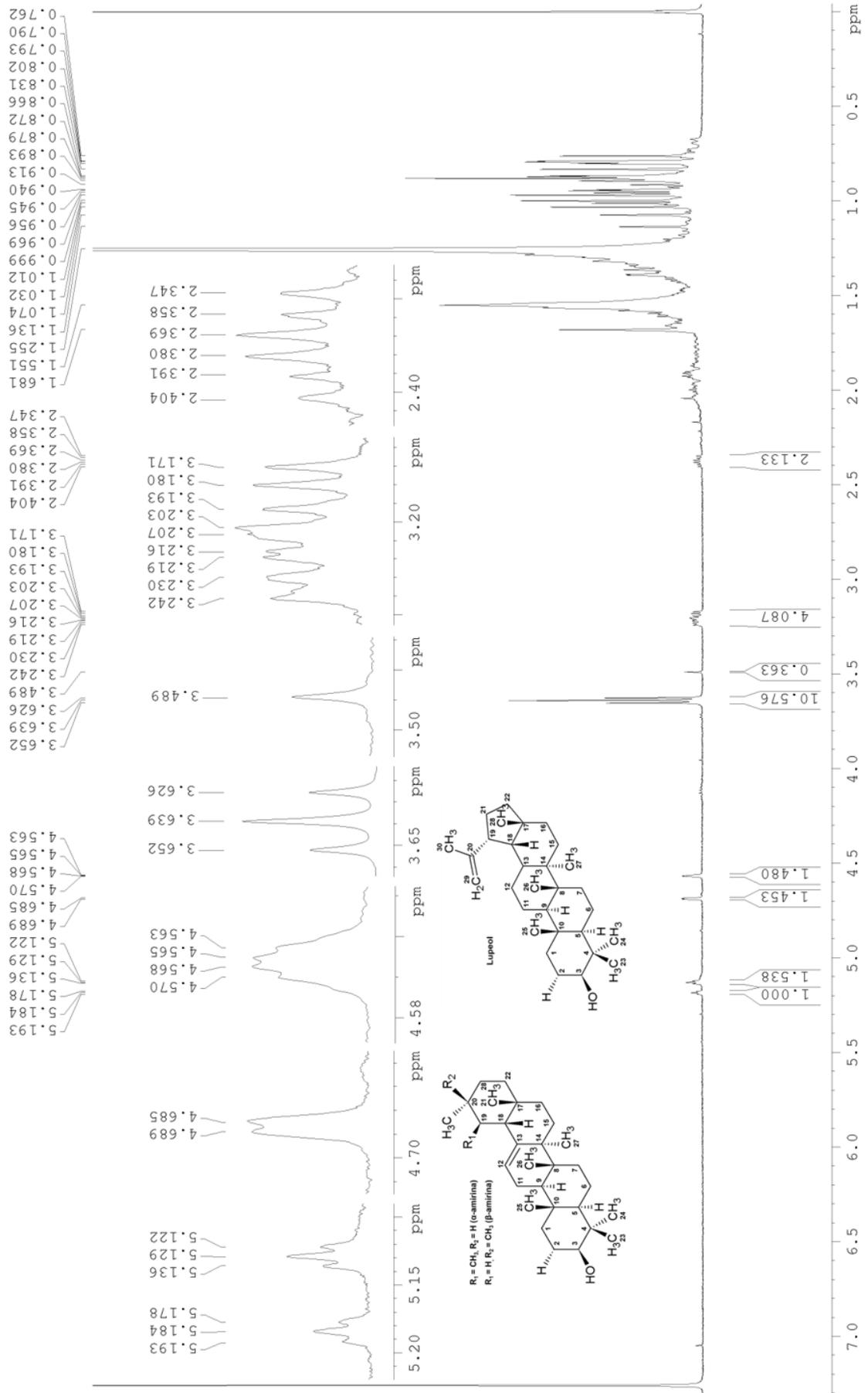


Figura 27 – Espectro de RMN ^{13}C de EP-01 (CDCl_3 , 125 MHz)

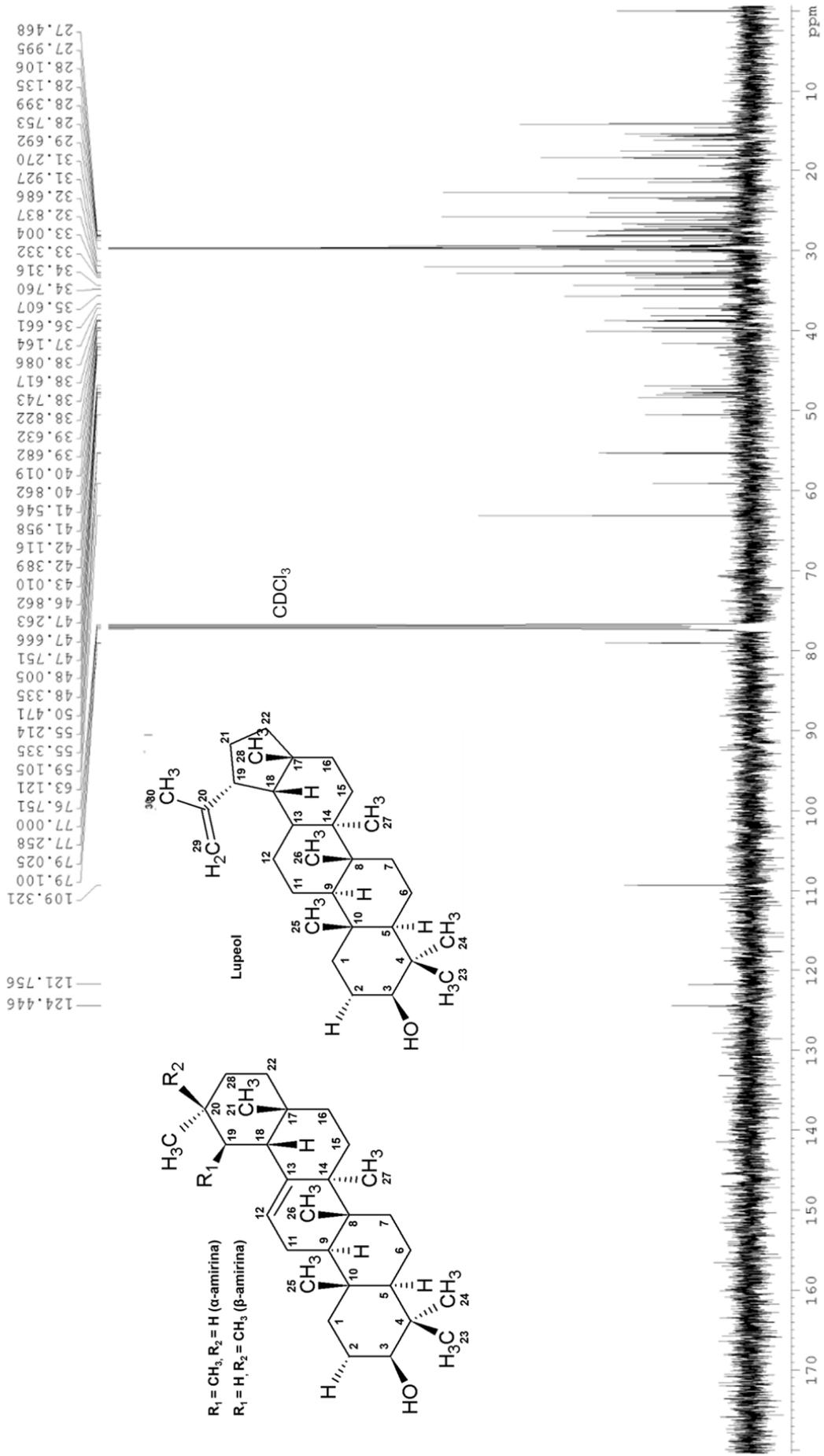
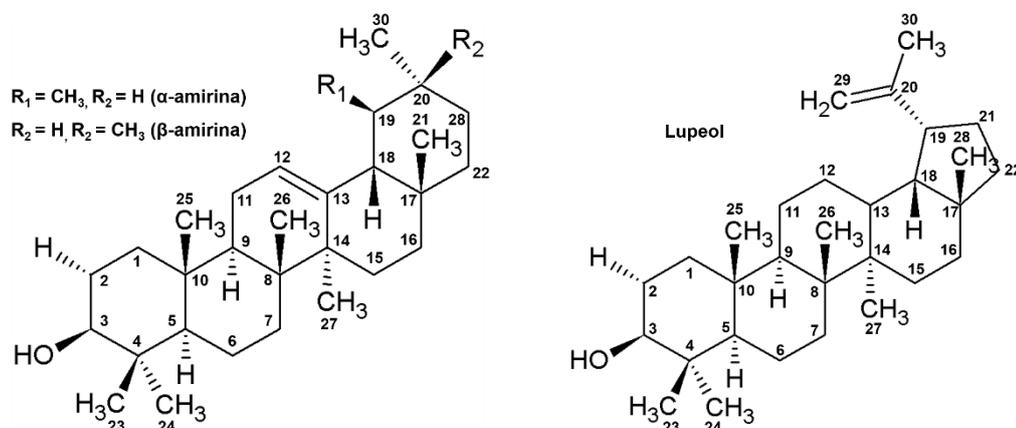


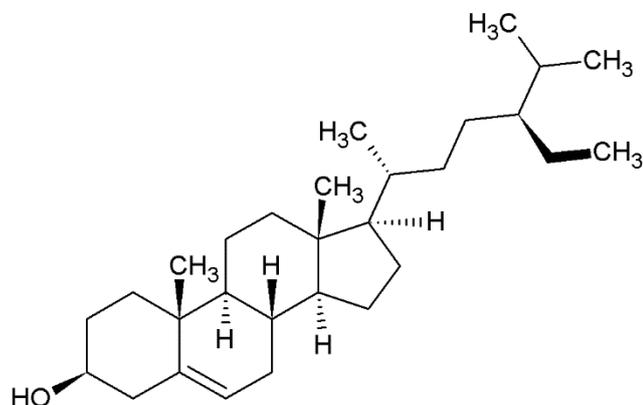
Tabela 9 - Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de α -amirina, β -amirina e lupeol identificados em comparação a dados encontrados na literatura



	α -amirina	Lit. ¹	β -amirina	Lit. ¹	Lupeol	Lit. ²
C-1	38,7	38,7	38,7	38,7	38,7	38,7
C-2	28,7	28,7	27,2	27,2	27,4	27,4
C-3	79,1	79,6	79,0	79,3	79,0	79,0
C-4	38,7	38,7	38,6	38,5	38,8	38,8
C-5	55,2	55,2	55,2	55,2	55,3	55,3
C-6	18,3	18,4	18,4	18,6	18,3	18,3
C-7	31,9	32,2	32,6	32,4	34,3	34,3
C-8	40,0	40,0	39,6	39,8	40,8	40,8
C-9	47,7	47,7	47,6	47,6	50,4	50,4
C-10	36,6	36,9	36,6	36,9	37,1	37,2
C-11	23,3	23,3	23,5	23,6	20,9	20,9
C-12	124,4	124,4	121,7	121,7	25,1	25,2
C-13	-	139,5	-	145,2	38,0	38,1
C-14	42,1	42,0	41,7	41,7	42,8	42,8
C-15	27,3	27,2	26,2	26,2	27,4	27,4
C-16	26,6	26,6	26,0	26,1	35,6	35,6
C-17	33,0	33,7	32,8	32,6	43,0	43,0
C-18	59,1	59,0	47,2	47,2	48,3	48,3
C-19	39,6	39,6	46,8	46,8	48,0	48,0
C-20	39,6	39,6	31,2	31,0	-	150,9
C-21	31,2	31,2	34,7	34,7	29,6	29,9
C-22	41,5	41,5	37,1	37,1	40,0	40,0
C-23	28,1	28,1	27,9	28,0	27,9	28,0
C-24	15,6	15,6	15,5	15,4	15,3	15,4
C-25	15,6	15,6	15,5	15,4	16,1	16,1
C-26	16,8	16,8	16,8	16,8	16,0	16,0
C-27	23,2	23,2	25,7	25,9	14,1	14,5
C-28	28,1	28,1	28,3	28,4	18,0	18,0
C-29	17,4	17,4	33,3	33,8	109,3	109,3
C-30	21,3	21,4	23,6	23,7	19,3	19,3

Legenda: Lit.¹ (DIAS; HAMERSK; PINTO, 2011); Lit.² (JÚNIOR et al., 2013)

5.2.3 Identificação do fitoesterol EP-02



O composto EP-02 (6 mg) foi obtido como um sólido cristalino, em forma de agulhas, incolor e solúvel em clorofórmio. O espectro de RMN ^1H de EP-02 (**Figura 28**, p. 82), obtido em CDCl_3 revelou sinais de um multiplete em $\delta_{\text{H}} 5,34$ (1H) apontando para a presença de hidrogênio olefínico (H-6), bem como de outro multiplete em $\delta_{\text{H}} 3,51$ (1H) de H-3, ambos típicos de núcleo esteroidal (BULAMA; DANGOGGO; MATHIAS, 2015). Outros sinais característicos também são observados como os simpletos em $\delta_{\text{H}} 0,67$ (3H) e $\delta_{\text{H}} 1,00$ (3H) atribuídos a H-18 e H-19, respectivamente. Também os sinais de dupletos em $\delta_{\text{H}} 0,92$; $\delta_{\text{H}} 0,84$; $\delta_{\text{H}} 0,82$ e $\delta_{\text{H}} 0,86$ todos com 3 hidrogênios integrados cada, correspondentes aos hidrogênios metílicos nas posições 21, 26, 27 e 29 (AHMED et al., 2013). A comparação entre os deslocamentos encontrados e os dados da literatura podem ser observados na **Tabela 10** (p. 83).

Figura 28 – Espectro de RMN ^1H de EP-02 (CDCl_3 , 500 MHz)

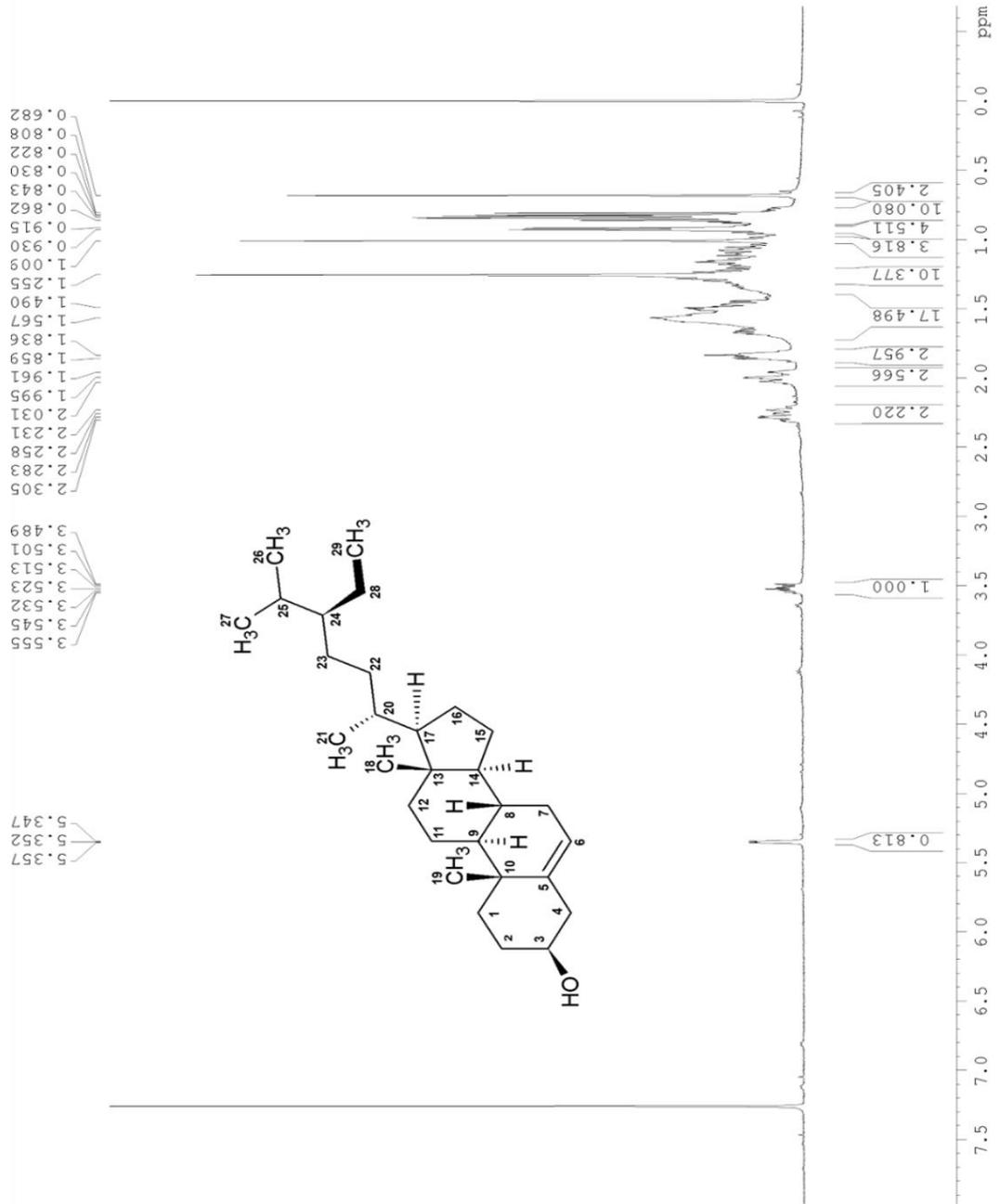
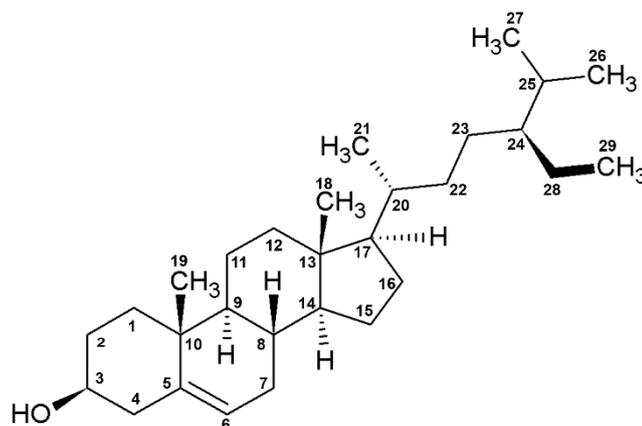


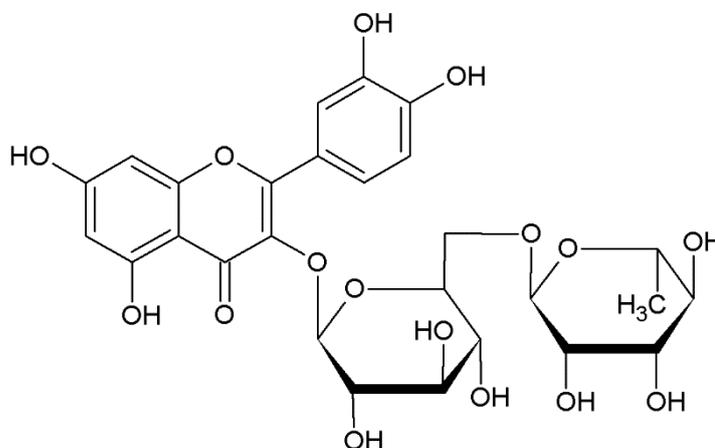
Tabela 10 - Deslocamentos químicos de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de β -sitosterol identificado em comparação a dados encontrados na literatura



Posição	β -sitosterol	Literatura ¹
H-1	-	-
H-2	-	-
H-3	3,51 (m, 1H)	3,51 (m, 1H)
H-4	-	-
H-5	-	-
H-6	5,34 (d, 1H, J = 5,2 Hz)	5,34 (d, 1H, J = 5,2 Hz)
H-7	-	-
H-8 a H-17	-	-
H-18	0,68 (s, 3H)	0,67 (s, 3H)
H-19	1,00 (s, 3H)	1,00 (s, 3H)
H-20	-	-
H-21	0,92 (d, 3H, J = 6,0 Hz)	0,92 (d, 1H, J = 6,0 Hz)
H-22	-	-
H-23	-	-
H-24	-	-
H-25	-	-
H-26	0,84 (d, 3H, J = 6,0 Hz)	0,83 (d, 3H, J = 6,0 Hz)
H-27	0,80 (d, 3H, J = 7,2 Hz)	0,79 (d, 3H, J = 7,2 Hz)
H-28	-	-
H-29	0,86 (d, 3H, J = 8,0 Hz)	0,85 (d, 3H, J = 8,0 Hz)

Legenda: Literatura ¹ (AHMED et al., 2013)

5.2.4 Identificação do flavonoide EP-03



A substância EP-03 (12 mg), um sólido de coloração amarela advindo da fração EPFEM teve sua identificação realizada por meio de RMN ^1H , ^{13}C , e comparação dos dados com a literatura.

O espectro de RMN ^1H (**Figura 29**, p. 86) apresentou sinais típicos de um sistema de substituição 3', 4' do anel B de um esqueleto flavonoídico, com valores de multiplicidade dentro dos estabelecidos para acoplamentos orto e meta, δ_{H} 7,56 (H-2', *d*, $J = 2,1$ Hz), δ_{H} 7,53 (H-6', *dd*, $J = 2,1$ e 8,5 Hz) e δ_{H} 6,76 (H-5', *d*, $J = 8,5$ Hz). A presença de outros dois sinais de hidrogênios em δ_{H} 6,30 (H-8, *d*, $J = 2,1$ Hz) e δ_{H} 6,11 (H-6, *d*, $J = 2,1$ Hz) permitiram caracterizar um sistema de acoplamento AX do anel A.

Podem ser identificados dois sinais de hidrogênios anoméricos na região de açúcares, um em δ_{H} 5,01 (H-1'', *d*, $J = 7,8$ Hz) e o outro em 4,42 (H-1''', *d*, $J = 1,2$), que sugerem a presença dos monossacarídeos β -D-glicose e α -L-raminose. Um outro sinal característico da raminose é evidenciado em δ_{H} 1,01 (H-6''', $J = 6,2$ Hz).

A presença dos sinais dos demais hidrogênios carbinólicos das unidades glicosídicas podem ser encontrados entre δ_{H} 4,00 e 3,00 ppm, enquanto os

deslocamentos químicos para os seus carbonos entre δ_C 77,00 e 65,9 ppm (**Figura 30**, p. 87) servindo de indício da presença de uma unidade de raminose ligada diretamente à glicose na posição C-6'' numa ligação O-glicosídica. Na **Tabela 11** (p. 88) é possível perceber a correlação entre os valores de deslocamento químico do espectro de ^1H e de ^{13}C obtidos e os apresentados pela literatura.

Deste modo, sugere-se que a estrutura da substância em questão pertença ao flavonoide rutina ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$ - quercetina-3-O- β -D-glicose-6''-O- α -L-raminosil).

Figura 29 – Espectro de RMN ^1H de EP-03 (MeOD, 500 MHz)

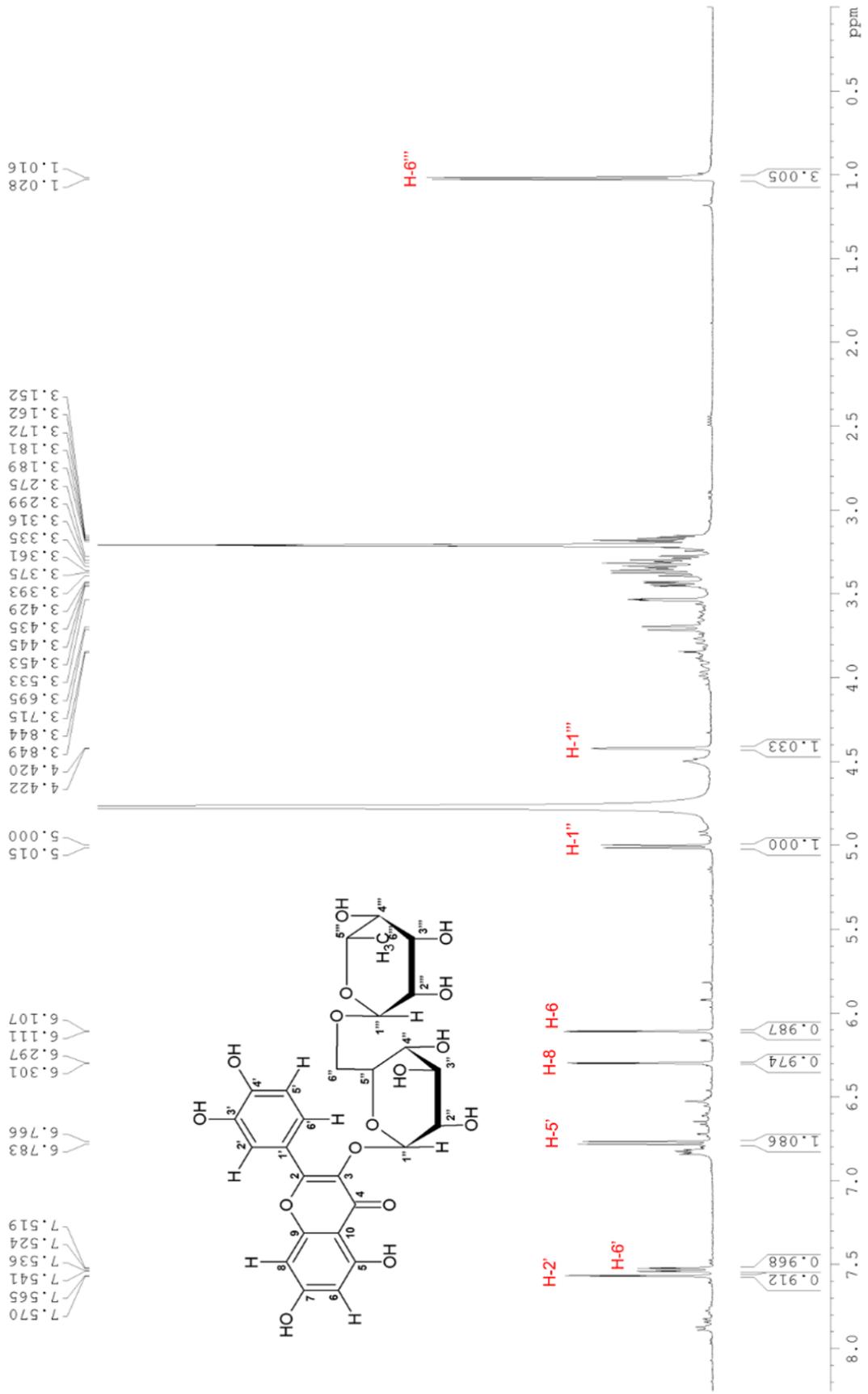


Figura 30 – Espectro de RMN ^{13}C de EP-03 (MeOD, 125 MHz)

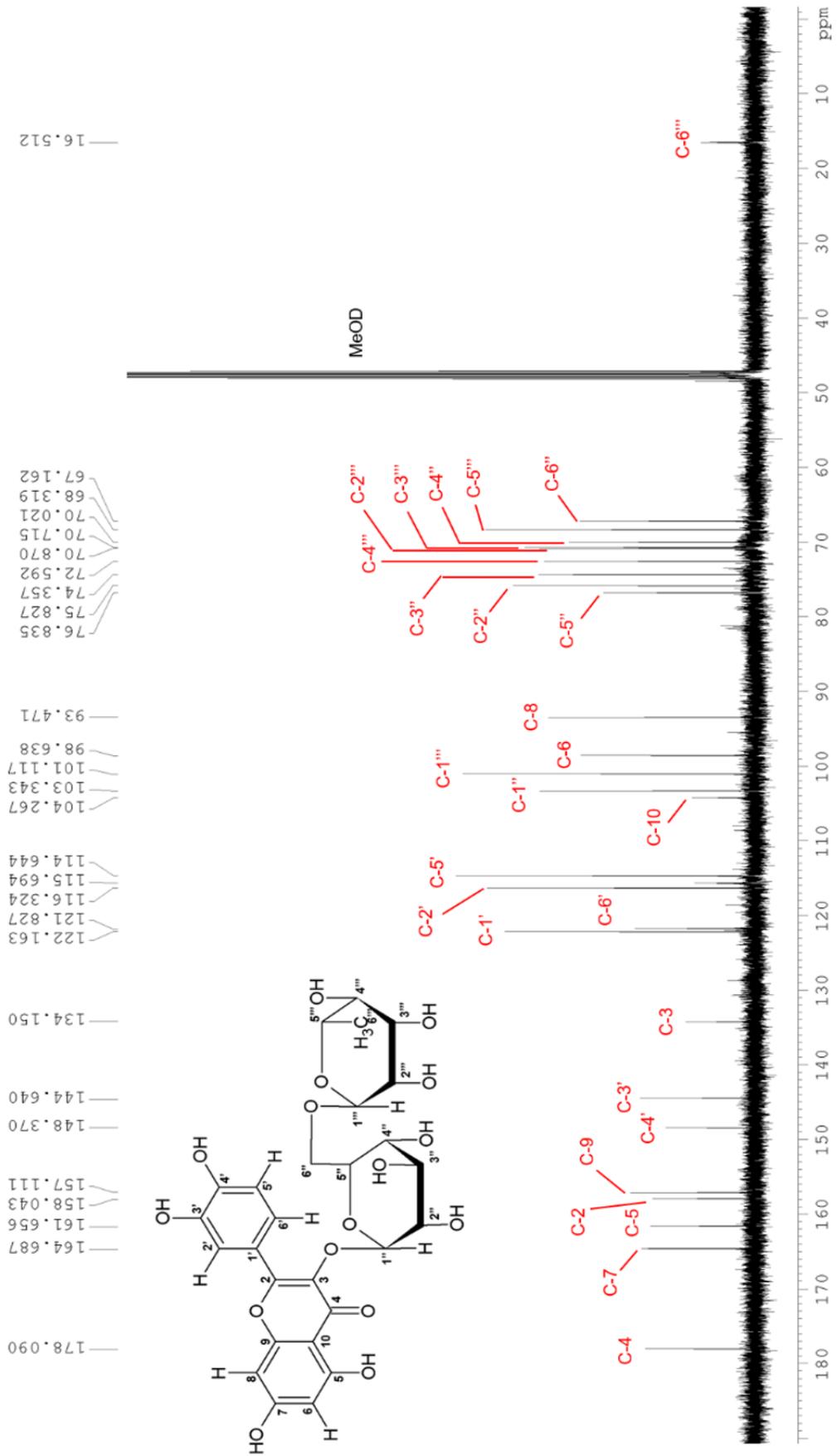
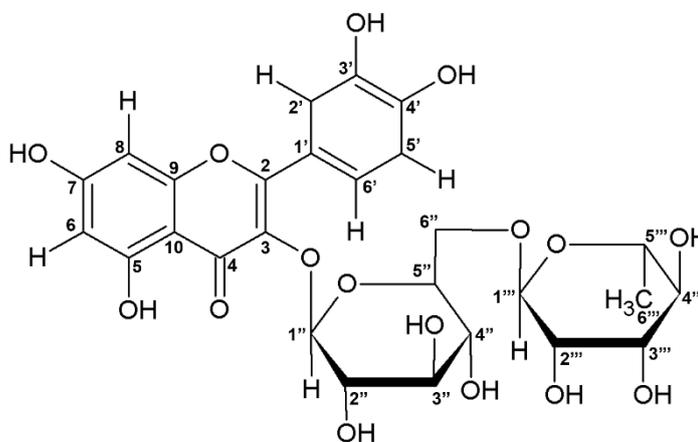


Tabela 11 - Deslocamentos químicos de RMN ^1H (MeOD, 500 MHz) e ^{13}C (MeOD, 125 MHz) de EP-03 comparados a valores da literatura



H/C	Rutina isolada δ_{H} (ppm), J (Hz)	Literatura ¹	Rutina isolada δ_{C} (ppm)	Literatura ¹
2	-	-	158,0	156,5
3	-	-	134,1	133,2
4	-	-	178,0	177,3
5	-	-	161,6	161,2
6	6,11 (<i>d</i> , $J = 2,1$)	6,20 (<i>d</i> , $J = 2,1$)	98,6	98,7
7	-	-	165,6	164,5
8	6,30 (<i>d</i> , $J = 2,1$)	6,40 (<i>d</i> , $J = 2,1$)	93,4	93,6
9	-	-	157,1	156,4
10	-	-	104,2	103,7
1'	-	-	122,1	121,5
2'	7,56 (H-2', <i>d</i> , $J = 2,1$)	7,53 (<i>d</i> , $J = 2,0$)	116,3	116,2
3'	-	-	144,6	115,2
4'	-	-	148,3	148,5
5'	6,76 (<i>d</i> , $J = 8,5$)	6,83 (<i>d</i> , $J = 9,0$)	114,6	115,2
6'	7,53 (<i>dd</i> , $J = 8,5$ e $2,1$)	7,75 (<i>dd</i> , $J = 7,8$ e $2,4$)	121,8	121,0
1''	5,01 (<i>d</i> , $J = 7,6$)	5,44 (<i>d</i> , $J = 7,2$)	103,3	101,2
2''	-	-	75,8	75,8
3''	-	-	74,3	74,0
4''	-	-	70,0	69,9
5''	-	-	76,8	76,4
6''	-	-	67,1	66,9
1'''	4,42 (<i>d</i> , $J = 1,2$)	4,38 (<i>d</i> , $J = 1,0$)	101,1	100,7
2'''	-	-	70,8	70,5
3'''	-	-	70,7	70,3
4'''	-	-	72,5	71,8
5'''	-	-	68,3	68,2
6'''	1,01 (<i>d</i> , $J = 6,2$)	0,99 (<i>d</i> , $J = 6,0$)	16,5	17,6

Legenda: Literatura¹ (MOURA; VILEGAS; SANTOS, 2011); RMN ^1H (DMSO-*d*₆, 500 MHz); RMN ^{13}C (DMSO-*d*₆, 125 MHz)

5.3 ENSAIO DE TOXICIDADE COM *Artemia salina*

Todos os compostos testados, com exceção da fração metanol **EPFEM**, se mostraram tóxicos a náuplios de *A. salina*, ou seja, apresentaram valores menores que 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. De acordo com a classificação de Nguta et al. (2011), o extrato etanolico **EPFE** ($\text{CL}_{50} = 64 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e as frações diclorometano **EPFED** ($\text{CL}_{50} = 57 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e acetato de etila **EPFEA** ($\text{CL}_{50} = 65 \mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentaram alta toxicidade, enquanto que, a fração **EPFEH** ($\text{CL}_{50} = 149 \mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentou toxicidade moderada, sugerindo, de acordo com Meyer et al. (1982) grande potencial de bioatividade destes compostos. A fração **EPFEM** ($\text{CL}_{50} = 1618 \mu\text{g.mL}^{-1}$) se mostrou atóxica para *A. salina*, porém esse fato não a exclui da possibilidade de possuir atividade biológica, sugerindo que pode ser bem tolerada em sistemas biológicos (**Tabela 12**).

Tabela 12 - Resultados obtidos no ensaio de toxicidade com *A. salina*

Extrato e frações	CL_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Toxicidade
EPFE	64	Alta
EPFED	57	Alta
EPFEA	65	Alta
EPFEH	149	Moderada
EPFEM	1618	Nenhuma

5.4 ENSAIO CITOTÓXICO COM CÉLULAS TUMORAIS

Foram testados cinco compostos a fim de verificar do potencial citotóxico destes frente à três linhagens de células tumorais (SF-295, PC-3 e HCT-116). A amostra EPFE foi testada na concentração única de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e as amostras EPFEH, EPFED, EPFEA e EPFEM foram testadas na concentração única de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Foram considerados citotóxicos, aqueles compostos capazes

de inibir acima de 75% da proliferação celular. Os valores de inibição do crescimento de todas as amostras são apresentados na **Tabela 13**.

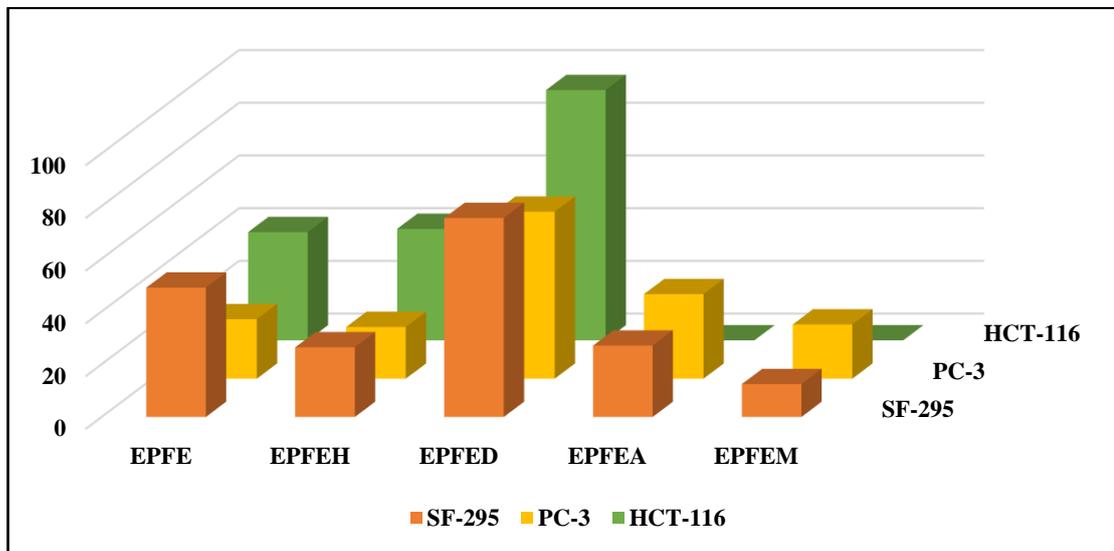
Tabela 13 - Percentual de inibição do crescimento tumoral *in vitro*

Extrato e frações	SF-295		PC-3		HCT-116	
	IC (%)	DP (%)	IC (%)	DP (%)	IC (%)	DP (%)
EPFE	49,06	2,88	22,56	0,24	41,08	0,86
EPFEH	26,45	7,13	19,61	0,48	42,30	2,43
EPFED	75,50	1,30	63,36	5,26	94,99	0,62
EPFEA	27,08	3,08	32,09	1,22	0,00	0,00
EPFEM	12,48	3,84	20,57	2,32	0,00	0,00

IC = Inibição do Crescimento, DP = Desvio Padrão

A partir da **Tabela 13** é possível verificar que apenas o composto **EPFED** apresentou efeito citotóxico frente às linhagens de células tumorais testadas, especificamente contra SF-295 ao inibir 75,50% das células e, notavelmente, contra HCT-116 cujo valor de inibição da proliferação celular chegou próximo a 95% (94,99%). Diante da relevância desses resultados, novos testes devem ser realizados para analisar sua atividade em células humanas normais. Os resultados obtidos podem ser melhor visualizados na **Figura 31**.

Figura 31 - Percentual de inibição do crescimento tumoral *in vitro*



5.5 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Foram submetidos ao teste de CMI (Concentração Mínima Inibitória) o extrato etanólico (**EPFE**) e as frações diclorometânica (**EPFED**), acetato-etílica (**EPFEA**) e metanólica (**EPFEM**). A avaliação foi realizada através de método de microdiluição em placas de 96 poços e consistiu em expor seis cepas bacterianas a seis concentrações distintas de cada composto.

Após um período de 24 horas de exposição dos microrganismos aos compostos, foi realizada leitura visual das placas observando a formação de depósito de colônias do tipo “botão” no fundo dos poços. CMI foi determinada como a menor concentração do composto onde não se verificou esse depósito de bactérias. A avaliação de CMB foi realizada nas concentrações subsequentes àquela considerada CMI, através de método de semeadura em ágar, a fim de verificar crescimento de colônias. Os resultados obtidos podem ser visualizados no **Quadro 3**.

Quadro 3 - Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) do extrato e das frações

Bactérias gram positivas						
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	
	CMI¹	CMB¹	CMI¹	CMB¹	CMI¹	CMB¹
EPFE	250	> 500	250	> 500	250	> 500
EPFED	> 500	–	> 500	–	> 500	–
EPFEA	125	> 500	62,5	> 500	> 500	–
EPFEM	> 500	–	> 500	–	> 500	–
Bactérias gram negativas						
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25312		<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 700603		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	
	CMI¹	CMB¹	CMI¹	CMB¹	CMI¹	CMB¹
EPFE	> 500	–	> 500	–	> 500	–
EPFED	> 500	–	> 500	–	> 500	–
EPFEA	> 500	–	> 500	–	> 500	–
EPFEM	> 500	–	> 500	–	> 500	–

¹Os resultados são expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$. EPFE = Extrato etanólico; EPFED = Fração diclorometânica; EPFEA = Fração acetato-etílica; EPFEM = Fração metanólica

Diante dos dados apresentados no **Quadro 3**, constata-se que nenhuma das concentrações dos compostos testados apresentaram atividade contra os microrganismos gram negativos, no entanto o extrato etanólico (EPFE) e a fração acetato-etílica (EPFEA) demonstraram atividade contra as bactérias gram positivas.

O extrato EPFE apresentou CMI de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em relação às cepas de *Staphylococcus* testadas, ao passo que a CMB em todos os casos mostrou ser $> 500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, diante do crescimento de colônias na placa em que se avaliou essa concentração.

Os resultados mais expressivos couberam à fração EPFEA cujos valores da CMI em relação às duas cepas de *Staphylococcus aureus*, ATCC 29213 e ATCC 25923, foram respectivamente 125 e $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Apesar desse composto ter demonstrado capacidade de inibir o crescimento desses

microrganismos, a sua maior concentração ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) avaliada não apresentou poder bactericida.

Mesmo tendo apresentado $\text{CMB} > 500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, os valores de CMI de EPFEA se mostraram bastante promissores, sugerindo um investigação mais aprofundada do poder antibacteriano dessa fração.

De acordo com a classificação de Holetz et al., (2002) a fração EPFEA apresentou atividade moderada contra a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e boa atividade contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, enquanto o extrato EPFE apresentou moderada atividade contra todas as três cepas gram positivas testadas. Como todas as outras amostras não conseguiram inibir o crescimento microbiano na maior concentração testada ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$), considerou-se que as mesmas apresentaram fraca (entre $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ou nenhuma ($> 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) atividade antimicrobiana, já que não foi possível precisar o resultado de CMI apresentado no ensaio ($> 500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Tabela 14).

Tabela 14 - Atividade antimicrobiana segundo a Concentração Mínima Inibitória dos compostos

Extrato e frações	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	Bactérias gram negativas
EPFE	Moderada	Moderada	Moderada	Fraca a inativa
EPFED	Fraca a inativa	Fraca a inativa	Fraca a inativa	Fraca a inativa
EPFEA	Moderada	Boa	Fraca a inativa	Fraca a inativa
EPFEM	Fraca a inativa	Fraca a inativa	Fraca a inativa	Fraca a inativa

Diante dos resultados da análise fitoquímica de EPFEA, a atividade antibacteriana evidenciada poderia ser atribuída ao triterpeno lupeol isolado dessa fração, já que estudos realizados atestam sua forte atividade contra bactérias gram positivas (GALLO; SARACHINE, 2009).

Outras espécies do gênero *Esenbeckia* também apresentaram atividade antibacteriana. Garcia-Beltrán e Cuca-Suárez (2003) demonstraram que o extrato éter de petróleo, as frações do extrato e a substância (-)-episesamina, provenientes das cascas de *E. alata* conseguiram inibir o crescimento de bactérias gram positivas e negativas. O extrato acetato-etílico das folhas de *E. grandiflora* mostrou ação inibitória contra estirpes de *S. aureus* enquanto que o alcaloide flindersiamina extraído de *E. yaaxhokob* se mostrou ativa contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*.

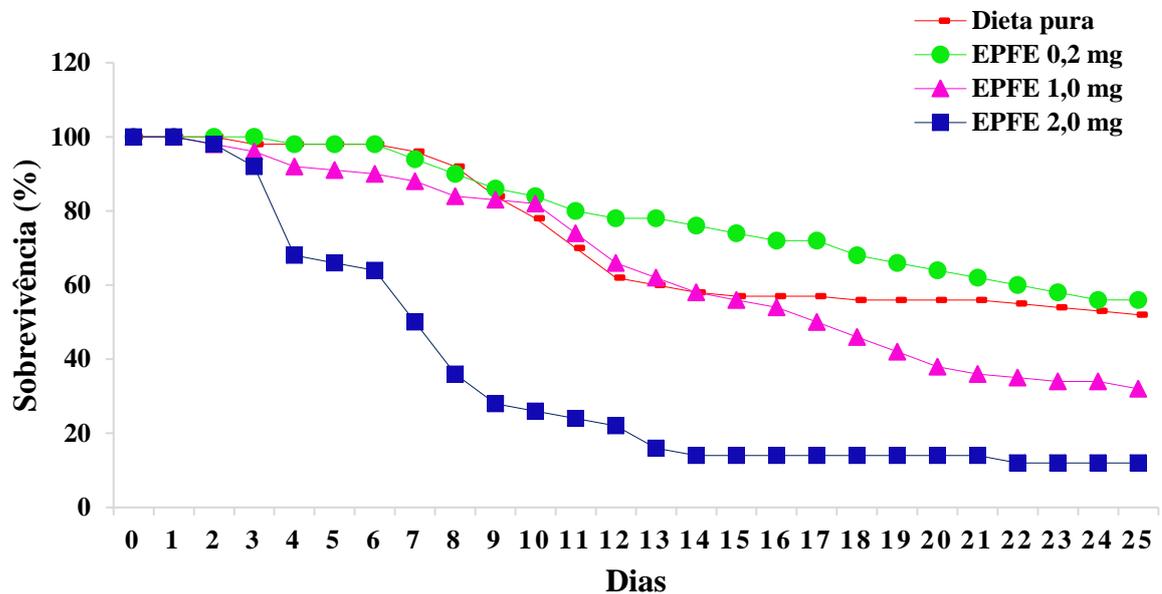
5.6 ENSAIO DE ATIVIDADE INSETICIDA CONTRA *Atta sexdens rubropilosa*

Os ensaios contra as formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* foram realizados com o extrato etanólico (**EPFE**) e com as frações hexânica (**EPFEH**), diclorometânica (**EPFED**), acetato de etílica (**EPFEA**) e metanólica (**EPFEM**) nas concentrações 0,2; 1,0 e 2,0 mg.

Os resultados obtidos para cada bioensaio estão apresentados através das análises gráficas das curvas de sobrevivência e das tabelas que resumem as porcentagens acumuladas de mortalidade diária, o tempo de sobrevivência mediana e a interpretação do teste *log rank*.

A análise do extrato EPFE (**Figura 32 e Tabela 15**) nas concentrações 0,2 mg; 1,0 mg e 2 mg, revelou Md de 25, 17 e 7 dias, respectivamente, enquanto que a mortalidade ao final do tratamento (25° dia), para as mesmas concentrações, apresentou valores de 44%, 68% e 88%. A análise estatística revelou que apenas o extrato EPFE 0,2 mg (mediana de 25 dias) não apresentou valores significativos quando comparados com o controle da dieta pura (mediana superior a 25 dias). A amostra EPFE 2,0 mg apresentou o melhor resultado (Md de 7 dias e 88% de mortalidade ao fim do tratamento).

Figura 32 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial do extrato EPFE



Legenda: EPFE: Extrato Etanólico

Tabela 15 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de *Atta sexdens rubropilosa* no bioensaio com EPFE nas concentrações 0,2; 1,0 e 2,0 mg.mL⁻¹

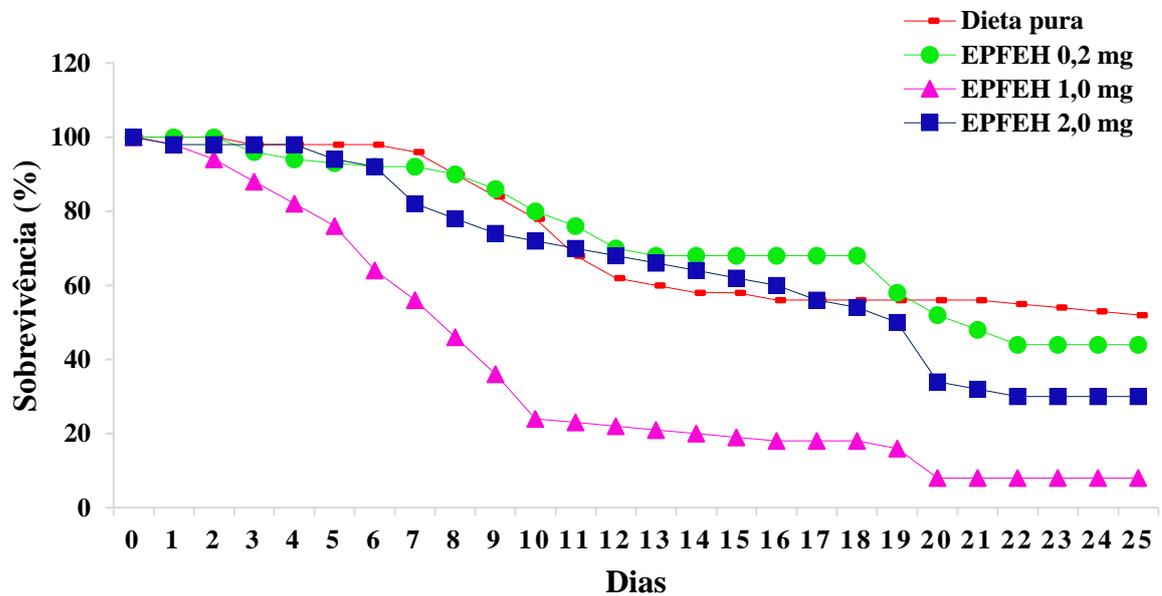
Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta pura	0	0	2	2	8	22	42	44	44	48	>25a
EPFE 0,2 mg	0	0	0	2	10	16	24	28	38	44	25a
EPFE 1,0 mg	0	2	6	10	16	18	42	50	64	68	17b
EPFE 2,0 mg	0	2	8	36	64	74	86	86	86	88	7b

Legenda: *Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste *log-rank* ($p < 0,05$)

A fração EPFEH (**Figura 33** e **Tabela 16**) apresentou Md de 21, 8 e 19 dias e 56%, 92% e 70% de mortalidade acumulada ao final do ensaio, para as concentrações 0,2 mg; 1,0 mg e 2 mg, respectivamente. Ao observar os resultados percebe-se que os mesmos independem da concentração já que com a amostra EPFEH 1,0 mg 50% das formigas haviam morrido já no 8º dia e 92%, ao final do

bioensaio, mostrando melhor atividade inseticida, ao passo que a maior concentração (2,0 mg) matou metade das formigas somente no 19º dia e apenas 70% no 25º. Esses dados são interessantes ao se pensar numa possível utilização desse extrato, já que uma menor quantidade de matéria-prima seria utilizada para obter um resultado mais efetivo.

Figura 33 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial da fração EPFEH



Legenda: EPFEH: Fração Hexânica

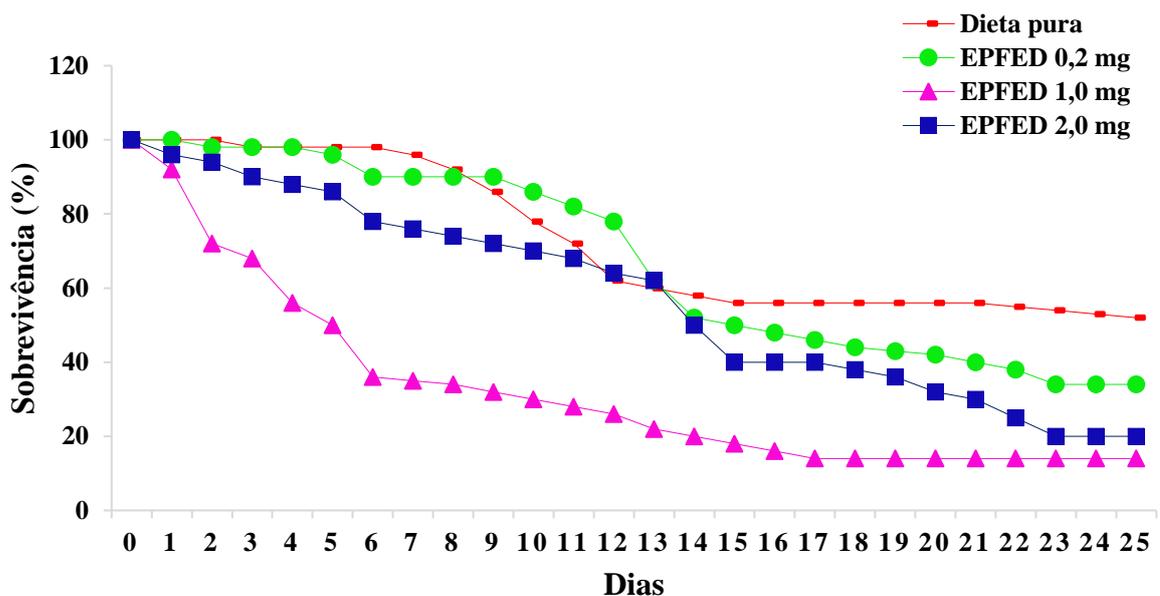
Tabela 16 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de *Atta sexdens rubropilosa* no bioensaio com EPFEH nas concentrações 0,2; 1,0 e 2,0 mg.mL⁻¹

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta pura	0	0	2	2	8	22	42	44	44	48	>25a
EPFEH 0,2 mg	0	0	4	8	10	20	32	32	52	56	21b
EPFEH 1,0 mg	2	6	12	36	54	76	80	82	92	92	8b
EPFEH 2,0 mg	2	2	2	8	22	28	36	44	68	70	19b

Legenda: *Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste *log-rank* ($p < 0,05$)

Os resultados obtidos para EPFED (**Figura 34 e Tabela 17**) nas concentrações 0,2 mg; 1,0 mg e 2 mg, foram Md em 15, 6 e 14 dias, respectivamente, e mortalidade acumulada de 66%, 86% e 80%. Os resultados aqui são semelhantes aos obtidos pela fração EPFEH, apesar dos valores de Md serem bem mais significativos. A amostra EPFED 1,0 mg apresentou melhor atividade pois dizimou 50% das operárias no 6º dia e acumulou 86% de mortalidade aos 25 dias. No entanto a concentração de 2,0 mg apresentou Md no 14º dia e acumulou 80% de formigas mortas no 25º dia.

Figura 34 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial da fração EPFED



Legenda: EPFED: Fração Diclorometânica

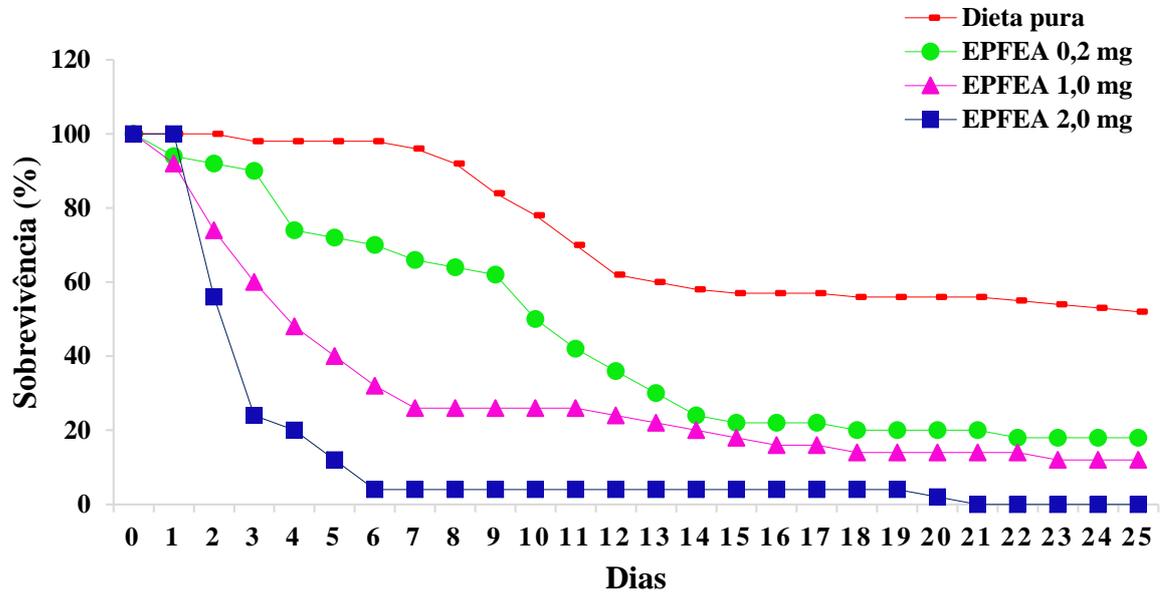
Tabela 17 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de *Atta sexdens rubropilosa* no bioensaio com EPFED nas concentrações 0,2; 1,0 e 2,0 mg.mL⁻¹

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta pura	0	0	2	2	8	22	42	44	44	48	>25 ^a
EPFED 0,2 mg	0	2	2	10	10	14	48	54	60	66	15 ^b
EPFED 1,0 mg	8	28	32	64	66	70	80	86	86	86	6 ^b
EPFED 2,0 mg	4	6	10	22	26	30	50	60	70	80	14 ^b

Legenda: *Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste *log-rank* ($p < 0,05$)

Mediana de sobrevivência (Md) no 10^o, 4^o e 3^o dias bem como taxas de mortalidade acumulada de 82%, 88% e 100% (**Figura 35 e Tabela 18**) foram obtidos pela fração EFEA nas concentrações 0,2 mg; 1,0 mg e 2 mg, respectivamente. Os resultados são bastante expressivos principalmente o referente a EPFEA 2,0 mg, com Md logo no 3^o dia, e acúmulo de cortadeiras mortas de 96% no 6^o dia e 100% no 21^o dia. As outras concentrações também mostraram resultados bastante promissores, como EPFEA 0,2 mg, concentração dez vezes menor, cuja Md se deu ao 10^o dia e acúmulo de 82% de formigas mortas ao fim do teste.

Figura 35 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial da fração EPFEA



Legenda: EPFEA: Fração Acetato-etílica

Tabela 18 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de *Atta sexdens rubropilosa* no bioensaio com EPFEA nas concentrações 0,2; 1,0 e 2,0 mg.mL⁻¹

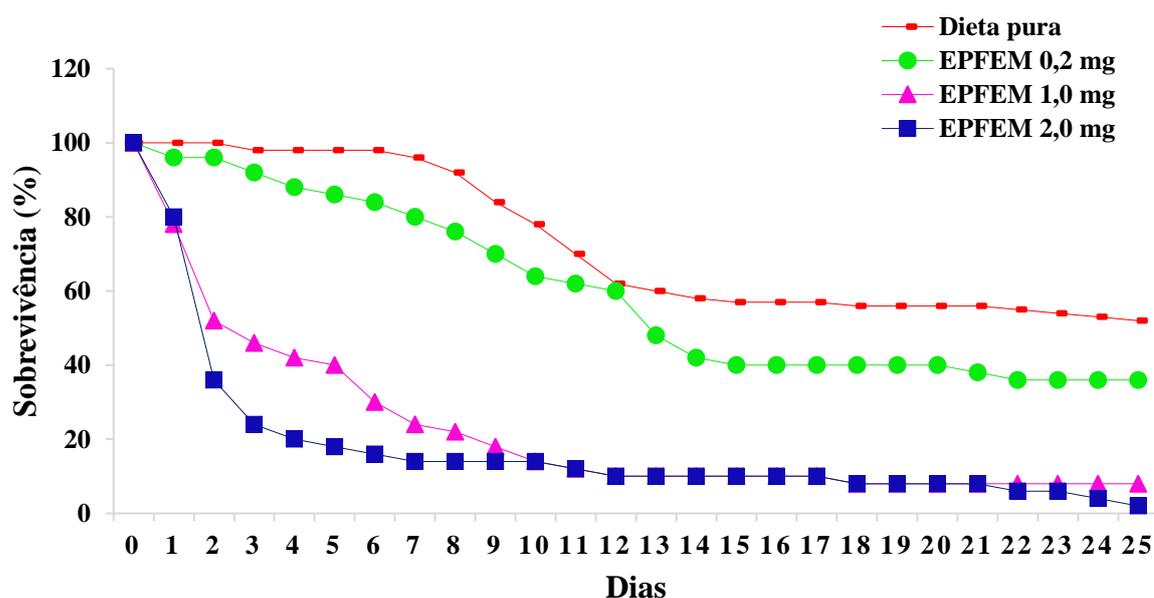
Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta pura	0	0	2	2	8	22	42	44	44	48	>25 ^a
EPFEA 0,2 mg	6	8	10	30	36	50	76	78	80	82	10 ^b
EPFEA 1,0 mg	8	26	40	68	74	74	80	84	86	88	4 ^b
EPFEA 2,0 mg	0	44	76	96	96	96	96	96	100	100	3 ^b

Legenda: *Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste *log-rank* ($p < 0,05$)

As concentrações 0,2 mg; 1,0 mg e 2 mg de EPFEM apresentaram, respectivamente Mediana de sobrevivência (Md) no 13º, 3º e 2º dias, e mortalidade acumulada de 64%, 92% e 98% (**Figura 36 e Tabela 19**). Ao comparar os resultados entre si, é possível notar que as concentrações 1,0 e 2,0 mg são as que evidenciam os melhores números: mortalidade acumulada de 92%

e 98% ao término do ensaio e Md no 3º e no 2º dia, respectivamente. São resultados quase equivalentes e extremamente significativos se comparados com o controle com a dieta pura.

Figura 36 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial da fração EPFEM



Legenda: EPFEM: Fração Metanólica

Tabela 19 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de *Atta sexdens rubropilosa* no bioensaio com EPFEM nas concentrações 0,2; 1,0 e 2,0 mg.mL⁻¹

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta pura	0	0	2	2	8	22	42	44	44	48	>25 ^a
EPFEM 0,2 mg	4	4	8	16	24	36	58	60	62	64	13 ^b
EPFEM 1,0 mg	22	48	54	70	78	86	90	90	92	92	3 ^b
EPFEM 2,0 mg	20	64	76	84	86	86	90	90	92	98	2 ^b

Legenda: *Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste *log-rank* ($p < 0,05$)

A análise estatística revelou que o extrato EPFE e as quatro frações EPFEH, EPFED, EPFEA e EPFEM, em todas as concentrações (0,2; 1,0 e 2,0 mg), levaram à diminuição da sobrevivência das operárias de forma significativa em relação ao controle da dieta pura, indicando alta toxicidade em formigas cortadeiras, com exceção do extrato EPFE 0,2 mg, o qual não apresentou valores significativos quando comparadas com o controle, o qual apresentou mediana superior a 25 dias. Além disso, as concentrações testadas não se mostraram dose-dependentes, sugerindo grande potencial formicida de *E. pumila*.

Os resultados mais expressivos couberam aos tratamentos com a fração EPFEA 2,0 mg, onde foi observada mortalidade acumulada de 100% no 21º dia, e sobrevivência mediana (Md) no 3º dia; bem como com a fração EPFEM 2,0 mg, com mortalidade de 98% no 25º dia, e sobrevivência mediana (Md) já no 2º dia, diferindo do controle pelo teste *log-rank* ($p < 0,05$).

Ao comparar os resultados de EPFEA e EPFEM, é bastante claro que na concentração 2,0 mg os resultados são mais favoráveis para a amostra EPFEA, no entanto quando comparamos os números obtidos pela concentração 1,0 mg para as duas frações, nota-se que EPFEM possui melhor atividade formicida, já que são necessários apenas metade da concentração de EPFEA 2,0 mg para obter um resultado similar.

As frações EPFEA e EPFEM passaram por processos cromatográficos com o intuito de se isolar substâncias bioativas. Da fração acetato-etílica (EPFEA) foram isolados o fitoesterol beta-sitosterol e uma mistura dos triterpenos alfa e beta-amirina e lupeol; e da fração metanólica (EPFEM) foi isolado o flavonoide rutina.

Salatino et al. (1998) mostrou que o lupeol, um dos componentes das ceras da epicutícula de *Didymopanax vinosum* (Araliaceae), é um importante dissuasor da atividade de forrageamento de *Atta sexdens rubropilosa*. Baseado

nesses dados, pode ser que a atividade de EPFEA seja devida ao lupeol presente na fração.

Como já relatado anteriormente neste trabalho, estudos realizados evidenciaram atividade inseticida do extrato metanólico das folhas de *E. pumila* e também da fração da qual foi isolada rutina (KUBO; VIEIRA; FUKUHARA, 1990; KUBO, 1991). Vários trabalhos mostram essa bioatividade da rutina, como o estudo de Silva et al. (2016) que mostrou a ação dessa substância no prolongamento da fase larval, diminuição do peso da larva peso larval e pupal e viabilidade pupal da lagarta *Spodoptera frugiperda*, principal praga das plantações de milho brasileiras.

De fato, a rutina é empregada contra insetos tanto que o extrato de arruda (*Ruta graveolens*), cujo princípio ativo é o dado flavonoide, é utilizado no combate de insetos como pulgões e cochonilhas (BARBOSA; SILVA; CARVALHO, 2006).

Também é o principal flavonoide do extrato de timbó (*Ateleia glazioviana*), eficiente formicida de ação de choque produzido e comercializado em Santa Catarina com o nome “Citromax” (CANTARELLI et al., 2005).

Esses dados reforçam a possibilidade de *Esenbeckia pumila* ser utilizada no combate às formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa*.

6 CONCLUSÃO

✓ A prospecção fitoquímica permitiu identificar flavonoides, antraquinonas, cumarinas, taninos e terpenos/esteróis como os principais grupos de metabólitos presentes nas folhas de *E. pumila*;

✓ Foram isolados dessa espécie α -amirina, β -amirina, lupeol, β -sitosterol e rutina;

✓ O extrato etanólico e as frações diclorometânica e acetato-etílica apresentaram alta toxicidade contra *Artemia salina*, enquanto que a fração metanólica demonstrou moderada toxicidade contra o microcrustáceo;

✓ A fração diclorometânica conseguiu inibir o crescimento de linhagens de células tumorais testadas, especificamente SF-295 (75,50%) e, notavelmente, HCT-116 (94,99%);

✓ O extrato etanólico e as frações diclorometânica, acetato-etílica e metanólica não mostraram atividade contra microrganismos gram-negativos testados, no entanto contra gram-positivos o extrato e a fração acetato-etílica apresentaram atividade de inibição significativa;

✓ O extrato etanólico e todas as frações apresentaram resultados expressivos, com diferenças significativas entre controle e tratamentos, no bioensaio com formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa*, apontando para o potencial formicida desta espécie botânica; podendo vir a ser utilizada no controle desses insetos;

✓ Sugere-se que as atividade antibacteriana e formicida da fração acetato-etílica possa ser atribuída à substância lupeol, isolada da mesma; havendo fortes evidências da a atividade formicida da fração metanólica ser devida à rutina;

✓ Os resultados de alta toxicidade do extrato etanólico e das frações diclorometânica e acetato-etílica, revelados nos ensaios com *A. salina* apresentaram correlação com os resultados de bioatividade obtidos para as

mesmas amostras nos testes de atividade antitumoral, antimicrobiana e inseticida;

✓ A atoxicidade da fração metanólica em *Artemia salina* é um resultado bastante promissor ao considerar-se a atividade formicida detectada no ensaio com *Atta sexdens ruginosa*, o que encoraja testes posteriores para avaliar seu uso no combate a essas formigas, apresentando pouca toxicidade a outros sistemas biológicos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR-GUADARRAMA, A. B.; RIOS, M. Y. Geranyl N-dimethylallylanthranilate, a new compound from *Esenbeckia yaaxhokob*. **Planta Medica**, v. 70, p. 85-86, 2004.
- AHMED, Y.; RAHMAN, S.; AKHTAR, P.; ISLAM, F.; RAHMAN, M.; YAAKOB, Z. Isolation of steroids from n-hexane extract of the leaves of *Saurauia roxburghii*. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 5, p. 2939-2943, 2013.
- ALBUQUERQUE, L. P.; PONTUAL, E. V.; SANTANA, G. M. S.; SILVA, L. R. S.; AGUIAR, J. S.; COELHO, L. C. B. B.; RÊGO, M. J. B. M.; PITTA, M. G. R.; SILVA, T. G. da; MELO, A. M. M. A.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G. Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*. **Acta Tropica**, v. 138, p. 23-27, 2014.
- ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16 (Supl.), p. 678-689, 2006.
- ALMEIDA, R. N. A.; PEÑAFLORES, M. F. G. V.; SIMOTE, S. Y.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. da. Toxicity of substances isolated from *Helietta puberula* RE Fr. (Rutaceae) to the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. **BioAssay**, v. 2, n. 2, p. 1-8, 2007.
- ANTUNES, L. R.; JUNQUEIRA, L. R.; MENDES, J. E. P.; SALVADOR, J. F.; CARMARGO, M. B. de; SOLIMAN, E. P.; MARANGON, C. B.; TANGANELLI, K. M. Derrogação para uso de Deltametrina, Fenitrothion, Fipronil e Sulfluramida em florestas certificadas FSC® no Brasil. **Documentos Técnicos IPEF**, v. 4, n. 4, p. 1-38, 2016.
- APU, A. S.; MUHIT, M. A.; TAREQ, S. M.; PATHAN, A. H.; JAMALUDDIN, A. T. M.; AHMED, M. Antimicrobial activity and brine shrimp lethality bioassay of the leaves extract of *Dillenia indica* Linn. **Journal of Young Pharmacists**, v. 2, n. 1, p. 50-53, 2010.
- AWAN, A. R.; SHAW, W. M.; ELLIS, T. Biosynthesis of therapeutic natural products using synthetic biology. **Advanced Drug Delivery Reviews** v. 105, p. 96-106, 2016.
- AYRES, M. C. C.; ESCÓRCIO, S. P. E.; COSTA, D. A.; CHAVES, M. H.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; CAVALHEIRO, A. J. Constituintes químicos das folhas de *Qualea grandiflora*: Atribuição dos dados de RMN de dois flavonoides

- glicosilados acilados diasterioisomericos. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1481-1484, 2008.
- BARBOSA, F. R.; SILVA, C. S. B. de; CARVALHO, G. K. L. Uso de inseticidas alternativos no controle de pragas agrícolas. Petrolina: **Embrapa Semi-Árido**, 2006.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**, 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.
- BARROS-FILHO, B. A.; NUNES, F. M.; OLIVEIRA, M. C. F. de; ANDRADE-NETO, M.; MATTOS, M. C. de; BARBOSA, F. G.; MAFEZOLI, J.; PIRANI, J. R. Metabólitos secundários de *Esenbeckia almawillia* Kaastra (Rutaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 7, 1589-1591, 2007.
- BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Revista Visão Acadêmica, Curitiba**, v. 11, n. 2, 2010.
- BÉVALOT, F.; FOURNET, A.; MORETTI, C.; VAQUETTE, J. Alkaloids from *Esenbeckia pilocarpoides*. **Planta Medica**, v. 50, p. 522, 1984.
- BIAVATTI, M. W.; WESTERLON, R.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. da; FERNANDES, J. B.; PEÑAFLORES, M. F. G. V.; BUENO, O. C.; ELLENA, J. Leaf-cutting ants toxicity of limonexic acid and degraded limonoids from *Raulinoa echinata*. X-ray structure of epoxy-fraxinellone. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1443-1447, 2005.
- BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série Técnica IPEF**, v. 11, n. 30, p. 31-46, 1997.
- BRAZ FILHO, R. A contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.
- BUENO, O. C.; MORINI, M. S. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A.; SILVA, O. A. Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) isoladas do formigueiro e alimentadas com dietas artificiais. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26, n. 1, p. 107-113, 1997.
- BULAMA, J. S.; DANGOGGO, S. M.; MATHIAS, S. N. Isolation and Characterization of Beta-Sitosterol from ethyl acetate extract of root bark of *Terminalia glaucescens*. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 5, n. 3, 2015.
- CAMPOS, S. C.; SILVA, C.G.; CAMPANA, P.R.V.; ALMEIDA, V.L. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 18, n. 1, supl. I, p. 373-382, 2016.

- CANO, A.; BUCIO, J. L.; ESPINOZA, M.; RUÍZ-CANCINO, A. Sesqui- and Tri- Terpenoids from *Esenbeckia* species (Rutaceae). **Revista de la Sociedad Química de México**, v. 44, n. 2, 2000.
- CANO, A.; ESPINOZA, M.; RAMOS, C. H.; DELGADO, G. New prenylated flavanones from *Esenbeckia berlandieri* ssp. *acapulcensis*. **Journal of Mexican Chemical Society**, v. 50, n. 2, p. 71-75, 2006.
- CANTARELLI, E. B.; COSTA, E. C.; OLIVEIRA, L. S.; PERRANDO, E. R. Efeito de diferentes doses do formicida “Citromax” no controle de *Acromyrmex lundii* (Hymenoptera: Formicidae). **Ciência Florestal, Santa Maria**, v. 15, n. 3, p. 249-253, 2005.
- CARDOSO-LOPES, E. M.; MAIER, J. A.; SILVA, M. R.; REGASINI, L. O.; SIMOTE, S. Y.; LOPE, N. P.; PIRANI, J. R.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M. Alkaloids from stems of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae) as potential treatment for Alzheimer Disease. **Molecules**, v. 15, p. 9205-9213, 2010.
- CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In SIMÕES, C. M. O. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: Editora da UFSC; Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2010. p. 519 a 535.
- CHAGAS, A. C. S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 156-160, 2004.
- CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: Norma aprovada – sexta edição. Norma M7-A6, v. 23, n. 2, Wayne, Pennsylvania, USA, 2003.
- CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana: 15º suplemento informativo. Norma M100-S15, v. 25, n. 1, Wayne, Pennsylvania, USA, 2005.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**, 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.
- COSTA, J. F. O.; JUIZ, P.; SÃO PEDRO, A.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; GIULIETTI, A. M.; FRANÇA, F.; SANTOS, R. R. dos; SOARES, M. B. P. Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from Rutaceae species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 502-505, 2010.
- COSTA-LOTUFO, L. V; MONTENEGRO, R. C; ALVES, A. P. N. N; MADEIRA, S. V. F; PESSOA, C; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.
- COY-BARRERA, C. A.; CUCA-SUÁREZ, L. E.; LONDOÑO, C. Q. Farmacognosia y farmacobotánica de especies pertenecientes a los géneros *Esenbeckia* y *Raputia* (Rutaceae). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.

18, n. 4, p. 638-653, 2013.

CUCA-SUÁREZ, L. E.; COY-BARRERA, C. A. Metabolites isolated from *Esenbeckia alata* (Karst & Triana) (Rutaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 386-388, 2007.

CUCA-SUÁREZ; L. E.; COY-BARRERA, C. A.; CABALLERO, J. M. A. Quinoline alkaloids and friedelane-type triterpenes isolated from leaves and wood of *Esenbeckia alata* Kunt (Rutaceae). **Química Nova**, v. 34, n. 6, 984-986, 2011.

CUNHA, A. P. **Farmacognosia e Fitoquímica**, 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2010.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.

DELLA LUCIA, T. M. C.; GANDRA, L. C.; GUEDES, R. N. C. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. **Pest Management Science**, v. 70, p. 14-23, 2014.

DIAS, M. O.; HAMERSKI, L.; PINTO, A. Separação semipreparativa de α -amirina e β -amirina por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 704-706, 2011.

DOLABELA, M. F.; OLIVEIRA, S. G.; NASCIMENTO, J. M.; PERES, J. M.; WAGNER, H.; PÓVOA, M. M.; OLIVEIRA, A. B. de. *In vitro* antiplasmodial activity of extract and constituents from *Esenbeckia febrifuga*, a plant traditionally used to treat malária in the Brazilian Amazon. **Phytomedicine**, v. 15, p. 367-372, 2008.

DREYER, D. L. Alkaloids, limonoids and furocoumarins from three mexican *Esenbeckia* species. **Phytochemistry**, V. 19, p. 941-944, 1980.

DREYER, D. L.; PICKERING, M. V.; COHAN, P. Distribution of limonoids in the Rutaceae. **Phytochemistry**, v. 11, p. 705-713, 1972.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Multiciência**, n. 8, out., 2006.

ELANDT-JOHNSON, R. C.; JOHNSON, N. L. **Survival models and data analysis**. Toronto: John Wiley and Sons; 1980.

EMERY, F. S.; SANTOS, G. B. dos; BIANCHI, R. C. **A química na natureza**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2010.

EPIFANO, F.; FIORITO, S.; GENOVESE, S.; GRANICA, S.; VITALINI, S.; ZIDORN, C. Phytochemistry of the genus *Skimmia* (Rutaceae). **Phytochemistry**, v. 115, p. 27-43, 2015.

FERNANDES, J. B.; DAVID, V.; FACCHINI, P. H.; SILVA, M. F. G. F. da.; RODRIGUES FILHO, E.; VIEIRA, P. C. Extrações de óleos de sementes de citros e suas atividades sobre a formiga cortadeira *Atta sexdens* e seu fungo simbionte. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1091-1095, 2002.

FERNANDES, M. R.; McCULLOCH, J. A.; VIANELLO, M. A.; MOURA, Q.; PÉREZ-CHAPARRO, P. J.; ESPOSITO, F.; SARTORI, L.; DROPA, M.; MATTÉ, M. H.; LIRA, D. P. A.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. First report of the globally disseminated IncX4 plasmid carrying the *mcr-1* gene in a colistin-resistant *Escherichia coli* ST101 isolated from a human infection in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 6415-6417, 2016.

FREIRE, L. H. M. S.; ALVES, F. Ação de extratos naturais sobre o câncer. **Periódico Científico do Núcleo de Biociências**, v. 4, n. 8, 2014.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ; 2002.

GALLO, M. B. C.; SARACHINE, M. J. Biological activities of lupeol. **International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, (special issue 1), p. 46-66, 2009.

GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P. U. Metabolismo secundario de plantas. **Revista Reduca (Biología)**. Serie Fisiología Vegetal, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.

GARCÍA-BELTRÁN, O.; ARECHE, C.; CASSELS, B. K.; CUCA-SUÁREZ, L. E. Coumarins isolated from *Esenbeckia alata* (Rutaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 52, p. 38-40, 2014.

GARCÍA-BELTRÁN, O.; CUCA-SUÁREZ, L. E. Constituyentes no polares de la corteza de *Esenbeckia alata* y actividad antimicrobiana. **Revista Colombiana de Química**, v. 32, n. 1, 2003.

GARCÍA-BELTRÁN, O.; CUCA-SUÁREZ, L. E. Espectroscopía RMN como herramienta en la elucidación estructural de coumarinas 3(1', 1'-dimetilalil) sustituidas aisladas de *Esenbeckia alata* (Karst & Triana) TR. & PL. (RUTACEAE). **Actualidades Biológicas**, v. 27, supl. 1, p. 71-74, 2005.

GODOY, M. F. P.; SOUZA, R. C.; ZANCUL, M. S.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI JUNIOR, M.; SILVA, M. F. G. da; VIERIA, P. C. Toxicidade de *Pilocarpus grandiflorus* para o fungo simbionte de *Atta sexdens*. **Arquivos do Instituto de Biologia, São Paulo**, v. 69, p. 1-306, 2002.

GOMES, M. C. A. R.; PAULA, V. F.; MOREIRA, A. A.; CASTELLANI, M. A.; MACEDO, G. E. L. Toxicity of plant extracts from Bahia, Brazil, to *Atta sexdens sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) workers. **Sociobiology**, v. 63, n. 2, p. 770-776, 2016.

GUILHON, G. M. S. P., BAETAS, A. C. S., MAIA, J. G. S.; CONSERVA, L. M. 2-alkyl-4-quinolone alkaloids and cinnamic acid derivatives from *Esenbeckia almawillia*. **Phytochemistry**, v. 37, n. 4, p. 1193-1195, 1994.

- GUIMARÃES, A. C.; SIANI, A. C. Triterpenos das folhas de *Protium strumosum*. **Revista Fitos**, v. 3, n. 1, p. 67-76, 2007.
- GUPTA, S.; GOVIL, D.; NAKAR, P. N.; PRAKASH, O. M.; ARORA, D.; DAS, S.; GOVIL, P.; MALHOTRA, A. Colistin and polymyxin B: A re-emergence. **Indian Journal of Critical Care Medicine**, v. 13, n. 2, p. 49-53, 2009.
- INCA. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Câncer**. Disponível em <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>. Acesso em 01 out. 2016.
- INCA. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2015.
- ISIDORO, M. M.; SILVA, M. F. G. F. da; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; ARRUDADA, A. C.; SILVA, S. C. Fitoquímica e quimiosistemática de *Euxylophora paraensis* (Rutaceae). **Química Nova**, v. 35, n. 11, 2012.
- JANUÁRIO, A. H; VIERA, P. C; SILVA, M. F. G. F.; da; FERNANDES, J. B. Alcaloides β -indolopiridoquinazolínicos de *Esenbeckia grandiflora* Mart. (Rutaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2034-2038, 2009.
- JEFFREYS, M. F.; NUNEZ, C. V. Triterpenos das folhas de *Piranhea trifoliata* (Picrodendraceae). **Acta Amazônica**, v. 46, n. 2, p. 189-194, 2016.
- JÚNIOR, L. R. A.; GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; GUTERRES, Z. R. Pregnanos e outros constituintes das raízes de *Macrosiphonia petraea* (A. St.-Hil.) Kuntze (Apocynaceae). **Química Nova**, v. 36, n. 4, p. 519-523, 2013.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- KUBO, I. Recent applications of counter-current chromatography the isolation of bioactive natural products. **Journal of Chromatography**, v. 538, p. 187-191, 1991.
- KUBO, I.; VIEIRA, P. C.; FUKUHARA, K. Efficient isolation of the insect growth inhibitory flavone glycoside rutin from two tropical medicinal plants by Rotation Locular Countercurrent Chromatography (RLCC). **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13, n. 12, p. 2441-2448, 1990.
- LASPRILLA-COLL, J. A.; CUCA-SUÁREZ, L. E. Estudio fitoquímico del extracto etanólico de la corteza de *Esenbeckia runyonii* (Rutaceae). **Scientia et Technica**, año XIII, n. 33, 2007.
- LEE, D.; KIM, I. Y.; SAHA, S.; CHOI, K. S. Paraptosis in the anti-cancer arsenal of natural products. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 162, p. 120-133, 2016.
- LEITE, J. J. G.; BRITO, E. H. S.; CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S. N.; SIDRIM, J. J. C.; BERTINI, L. M.; MORAIS, S. M.; ROCHA, M. F. G. Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 110-113, 2009.

- LIBRALATO, G.; PRATO, E.; MIGLIORE, L.; CICERO, A. M.; MANFRA, L. A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. **Ecological Indicators**, v. 69, p. 35-49, 2016.
- LIZ, R.; PEREIRA, D. F.; HORST, H.; DALMARCO, E. M.; DALMARCO, J. B.; SIMIONATTO, E. L.; PIZZOLATTI, M. G.; GIRARD, D.; FRÖDE, T. S. Protected effect of *Esenbeckia leiocarpa* upon the inflammatory response induced by carrageenan in a murine air pouch model. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 1991-1999, 2011.
- LIZ, R.; PEREIRA, D. F.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M. G.; FRÖDE, T. S.; GIRARD, D. Activation of human neutrophils by *Esenbeckia leiocarpa*: comparison between the crude hydroalcoholic extract (CHE) and an alkaloid (Alk) fraction. **Journal of Inflammation**, v. 9, n. 19, p. 1-19, 2012.
- MARIN, F. J.; TORRES, O. L.; SANTAFÉ, G. G.; ROBLEDO, S. M. Estudio fitoquímico y evaluación del potencial leishmanicida de la especie *Esenbeckia littoralis* (Rutaceae). **Información Tecnológica**, v. 27, n. 1, p. 159-168, 2016.
- MATA, R.; MACÍAS, M. L.; ROJAS, I. S.; LOTINA-HENNSSEN, B.; TOSCANO, R. A.; ANAYA, A. L. Phytotoxic compounds from *Esenbeckia yaxhoob*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 2, p. 441-449, 1998.
- MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: UFC, 2009.
- MATOS, J. M. D.; MATOS, M. E. **Farmacognosia**. Fortaleza: UFC, 1989.
- MEDEIROS, J. D. **Guia de campo: vegetação do Cerrado 500 espécies**. Brasília: MMA/SBF, 2011.
- MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. A.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.
- MOLINA-SALINAS, G. M.; SAID-FERNÁNDEZ, S. A modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 633-638, 2006.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MOSSINI, S. A. G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos usos. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 24, n. 1, p. 139-148, 2005.
- MOURA, A. C. S.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* linn. (Fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar. **Química Nova**, v. 34, n. 7, 2011.
- MUHS, A.; LYLES, J. T.; PARLET, C. P.; NELSON, K.; KAVANAUGH, J. S.; HORSWILL, A. R.; QUAVE, C. L. Virulence inhibitors from Brazilian Peppertree block quorum sensing and abate dermonecrosis in skin infection models. **Scientific Reports**, v. 7, 42275, 2017.

- MUKANDIWA, L.; ELOFF, J. N.; NAIDOOB, V. Larvicidal activity of leaf extracts and seselin from *Clausena anisata* (Rutaceae) against *Aedes aegypti*. **South African Journal of Botany**, v. 100, p. 169-173, 2015.
- NAKATSU, T.; JOHNS, T.; KUBO, I.; SAKAI, M.; CHATANI, K.; SAITO, K.; YAMAGIWA, Y.; KAMIKAWA, T. Isolation, structure, and synthesis of novel 4-quinolinone alkaloids from *Esenbeckia leiocarpa*. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 6, p. 1508-1513, 1990.
- NAPOLITANO, H. B.; SILVA, M.; ELLENA, J.; RODRIGUES, B. D. G.; ALMEIDA, A. L. C.; VIEIRA, P. C.; OLIVA, G.; THIEMANN, O. H. Aurapten, a coumarin with growth inhibition against *Leishmania major* promastigotes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 12, 2004.
- NASCIMENTO, L.; MELNYK, A. A química dos pesticidas no meio ambiente e na saúde. **Revista Mangaio Acadêmico**, v. 1, n. 1, p. 54-61, 2016.
- NGUTA, J. M.; MBARIA, J. M.; GAKUYA, D. W.; GATHUMBI, P. K.; KABASA, J. D.; KIAMA, S. G. Biological screening of Kenya medicinal plants using *Artemia salina* L. (Artemiidae). **Pharmacologyonline**, v. 2, p. 458-478, 2011.
- NICKELE, M. A.; PIE, M. R.; REIS FILHO, W.; PENTEADO, S. R. C. Formigas cultivadoras de fungos: estado da arte e direcionamento para pesquisas futuras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 73, p. 53-72, 2013.
- NISAR, M.; SHAH, S. M. M.; KHAN, I.; SHEEMA; SADIQ, A.; KHAN, S.; SHAH, S. M. H. Larvicidal, insecticidal, brine shrimp cytotoxicity and anti-oxidant activities of *Diospyros kaki* (L.) reported from Pakistan. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 4, p. 1239-1243, 2015.
- NUNES, F. M.; BARROS-FILHO, B. A.; OLIVEIRA, M. C. F. de; ANDRADE-NETO, M.; MATTOS, M. C. de; MAFEZOLI, J.; PIRANI, J. R. ¹H and ¹³C NMR spectra of 3,8-dimethoxyfuro[3,2-g]coumarin and maculine from *Esenbeckia grandiflora* Martius (Rutaceae). **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, p. 864-866, 2005.
- OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F. Análise de misturas de triterpenos por RMN ¹³C. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 278-281, 1990.
- OLIVEIRA, F. M.; SANTANA, A. E. G.; CONSERVA, L. M.; MAIA, J. G. S.; GUILHON, G. M. P. Alkaloids and coumarins from *Esenbeckia* species. **Phytochemistry**, v. 41, n. 2, p. 647-649, 1996.
- OLIVEIRA, P. E. S. de.; CONSERVA, L. M.; BRITO, A. C.; LEMOS, R. P. L. Coumarin derivatives from *Esenbeckia grandiflora* and its larvicidal activity against *Aedes aegypti*. **Pharmaceutical Biology**, vol. 43, n. 1, p. 53-57, 2005.
- OLIVEIRA, P. E. S. de.; CONSERVA, L. M.; SIMONE, C. A. de.; PEREIRA, M. A.; MALTA, V. R. S.; IMBROISI, D. O. A pimpinellin monomer and dimer isolated from the roots of *Esenbeckia grandiflora*. **Acta Crystallographica Section C**, v. C60, p. o900-o902, 2004.

- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia – Tradução da 4ª edição norte americana**. Boston: Cengage Learning, 2011.
- PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.
- PIRANI, J. R. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rutaceae. **Rodriguésia**, v. 56, n. 86, p. 189-204, 2005.
- POZZATTI, P.; REIS, G. O. dos; PEREIRA, D. F.; HORST, H.; ESPINDOLA, L.; HELLER, M.; MICKE, G. A.; PIZZOLATTI, M. G.; FRÖDE, T. S. Relationship of chemical structure and anti-inflammatory activity of dihydrocorynantheol and its analogues. **Pharmacological Reports**, n. 65, p. 1263-1271, 2013.
- RAINSFORD, K. D. **Aspirin and the Salicylates**. London: Butterworths, 1984.
- RATES, S. M. K.; BRIDI, R.; BRAGA, F. C.; SIMÕES, C. M. O. Heterosídeos cardioativos. In SIMÕES, C. M. O. (Org.). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 271 a 284.
- RIOS, M. Y.; AGUILAR-GUADARRAMA, A. B. Terpenes and a new bishomotriterpene from *Esenbeckia stephani* (Rutaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 1006-1008, 2002.
- RIOS, M. Y.; AGUILAR-GUADARRAMA, A. B.; DELGADO, G. Furoquinoline alkaloids, furocoumarins and terpenes from *Esenbeckia litoralis* (Rutaceae) **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 977-979, 2002a.
- RIOS, M. Y.; DELGADO, G. Furocoumarins, terpenes and sterols from *Esenbeckia ovata* Kunth (Rutaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 697-699, 2002.
- RIOS, M. Y.; DELGADO, G. Polyprenols and acylphloroglucinols from *Esenbeckia nesiotica*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 10, p. 3491-3494, 1992a.
- RIOS, M. Y.; DELGADO, G. Terpenoids and alkaloids from *Esenbeckia belizencis*. Spontaneous oxidation of furoquinoline alkaloids. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 9, p. 1307-1309, 1992b.
- RIOS, M. Y.; ROSAS-ALONSO, E.; AGUILAR-GUADARRAMA, A. B. Alkaloids, coumarins and sesquiterpenes from *Esenbeckia conspecta* Kunt (Rutaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 367-369, 2002b.
- SALATINO, A.; SUGAYAMA, R. L.; NEGRI, G.; VILEGAS, W. Effect of constituents of the foliar wax of *Didymopanax vinosum* on the foraging activity of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 86, p. 261-266, 1998.

- SANTOS, R. I. dos. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In SIMÕES, C. M. O. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: Editora da UFSC; Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2010. p. 403 a 434.
- SILVA, C. V. da; REIS, A. L. V.; FERRER, S. R.; GUERREIRO, H. M. N.; BARROS, T. F.; VELOZO, E. S. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste Brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 355-360, 2010.
- SILVA, J. O.; COSTA, P. P.; CHINARELLI, S. H.; Manutenção de leveduras por congelamento a - 200 °C. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n. 1, p. 73-74, 2008.
- SILVA, J. R. A.; RAMOS, A. S.; MACHADO, M.; MOURA, D. F. de; NETO, Z.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; FIGUEIREDO, P.; ROSÁRIO, V. E. do; AMARAL, A. C. F.; LOPES, D. A review of antimalarial plants used in traditional medicine in communities in Portuguese-Speaking countries: Brazil, Mozambique, Cape Verde, Guinea-Bissau, São Tomé and Príncipe and Angola. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, supl. I, p. 142-158, 2011.
- SILVA, T. R. F. B.; ALMEIDA, A. C. S.; MOURA, T. L.; SILVA, A. R. da; FREITAS, S. S.; JESUS, F. G. Effect of the flavonoid rutin on the biology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Acta Scientiarum. Agronomy, Maringá**, v. 38, n. 2, p. 165-170, 2016.
- SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: UFSC, 2010. 1104p.
- SIMPSON, D. S.; JACOBS, H. Alkaloids and coumarins from *Esenbeckia pentaphylla* (Rutaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 841-844, 2005.
- SOUZA, F. M.; GANDOLFI, S.; PEREZ, S. C. J. G. A.; RODRIGUES, R. R. Allelopathic potential of bark and leaves of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 1, p. 169-174, 2010.
- STEWART, B. W.; WILD, C. P. (Ed.). **World Cancer Report: 2014**. Lyon: IARC, 2014.
- TEREZAN, A. P. et al. Activities of extracts and compounds from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. (Rutaceae) in leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 5, p. 882-886, 2010.
- TRANI, M.; CARBONETTI, A.; MONACHE, G. D.; MONACHE, F. D. Dihydrochalcones and coumarins of *Esenbeckia grandiflora* subsp. *brevipetiolata*. **Fitoterapia**, v. 75, p. 99-102, 2004.
- VIEGAS JUNIOR, C., BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- WARD, P. S. Ants. **Current Biology**, v. 16, issue. 5, p. R152-155, 2006.

WATERMAN, P. G. Alkaloids of the Rutaceae: their Distribution and Systematic Significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 3. p. 149-180, 1975.

WHO. World Health Organization. **Cancer**. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>. Acesso em 09 out. 2016.

WHO. World Health Organization. **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics**. Disponível em <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>. Acesso em 29 mai. 2017.

WINK, M. **Biochemistry of plant secondary metabolism**. Annual plant reviews v. 40, 2010.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; SANTOS, J. C.; SILVA, W. L. P.; RIBEIRO, G. T.; LEMES, P. G. An overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in brazilian forest plantations. **Forests**, v. 5, p. 439-454, 2014.