



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CAMPUS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *Stricto sensu* EM CIÊNCIAS APLICADAS A
PRODUTOS PARA A SAÚDE

TAMIRES DOS SANTOS VIEIRA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DOS
EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Piptocarpha rotundifolia* (Less.) Baker
(Asteraceae)**

Anápolis – GO

2017

TAMIRES DOS SANTOS VIEIRA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DOS
EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Piptocarpha rotundifolia* (Less.) Baker
(Asteraceae)**

Dissertação de mestrado 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: Química Orgânica.
Orientador: Dr. Antônio Carlos Severo Menezes

Anápolis – GO

2017

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DOS
EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Piptocarpha rotundifolia* (Less.) Baker
(Asteraceae)

TAMIRES DOS SANTOS VIEIRA

Dissertação de mestrado 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.

Aprovada em ____ / 06 / 2017

Prof. Dr. Antônio Carlos Severo Menezes (Presidente)

Prof^a. Dr^a. Giuliana Muniz Vila Verde Safadi

Prof^a. Dr^a. Máisa Borges Costa

Dedico esse trabalho a toda minha família pelo apoio para desenvolvimento do mesmo e em especial, dedico à minha falecida mãe que sempre lutou para que meus sonhos fossem realizados.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço em primeiro lugar a Deus, que me concede diariamente o dom da vida.
- Agradeço à Universidade Estadual de Goiás pela disponibilização dos recursos e infraestrutura para a realização da pesquisa.
- 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 doutoranda Andréia Felinto pela realização dos testes de citotoxicidade frente as células tumorais;
- Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais – UNESP- Rio Claro e ao professor Odair Correa Bueno pela colaboração e realização dos ensaios de toxicidade em formigas *Atta sexdens rubropilosa*;
- Ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, pela realização dos experimentos de Ressonância Nuclear Magnética;
- À FAPEG pelo apoio financeiro recebido;
- À minha família, em especial ao meu pai e minha irmã, por me apoiar em cada segundo para a realização desse sonho;
- Ao professor Dr. Antônio Carlos Severo Menezes, pela dedicação e atenção para a orientação durante a realização desse trabalho;
- Aos meus colegas de laboratório que durante toda essa trajetória me apoiaram e contribuíram de forma significativa para a obtenção dos resultados finais;
- A todos os amigos e colegas que de alguma forma, contribuíram para esse trabalho fosse realizado com sucesso.

“Conhecimento não é aquilo que o homem sabe, mas o que ele faz com aquilo que sabe.”
Aldous Huxley, Texts & pretexts (1933).

RESUMO

ESTUDO FITOQUÍMICO, AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Piptocarpha rotundifolia* (Less.) Baker (Asteraceae): Esse trabalho teve como objetivo realizar a prospecção fitoquímica, avaliar a toxicidade, potencial citotóxico e inseticida de *Piptocarpha rotundifolia* (Asteraceae). As plantas são utilizadas com finalidade curativa ou profilática desde a antiguidade, mas foi o avanço da ciência que possibilitou o isolamento dos constituintes químicos das espécies vegetais com a finalidade de correlacionar cada princípio ativo extraído com sua função farmacológica, por meio da relação estrutura atividade, dando assim origem aos fitoterápicos e aos fármacos sintéticos ou semi-sintéticos originados de plantas. Existem inúmeras espécies vegetais que ainda não possuem seu perfil fitoquímico delineado, nesse sentido, esse trabalho tem como objetivo o estudo fitoquímico das folhas de *Piptocarpha rotundifolia*, uma planta do Cerrado conhecida popularmente como Candeia. A coleta das folhas foi realizada no campus da Universidade Estadual de Goiás em Anápolis-GO. As folhas coletadas foram secas, pulverizadas em moinho de facas e maceradas com etanol 96%. O solvente foi evaporado em rotoevaporador para obtenção do extrato bruto etanólico. Logo após, esse extrato bruto foi fracionado seguindo a ordem eluotrópica de solventes, dando origem aos extratos fracionados: hexano (PRFEH), diclorometano (PRFED), acetato de etila (PRFEA) e metanol (PRFEM). Os extratos fracionados obtidos foram submetidos a técnicas cromatográficas com a finalidade de isolamento de substâncias. Os extratos e as substâncias isoladas foram testados *in vitro* pelo método MTT (3- (4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium) para avaliação do potencial de citotoxicidade frente às linhagens de células tumorais, sendo que esse teste se mostrou satisfatório para algumas das amostras testadas, o extrato PRFEH – 40% apresentou inibição do crescimento celular na ordem de 93,15% para células HCT-116, PRFEH – 50% apresentou inibição do crescimento celular na ordem de 84,04% para células SF-295, 78,95% para PC-3 e 88,81% para HCT-116. O extrato fracionado PRFEH – 100% apresentou inibição do crescimento celular na ordem de 76,27% para células SF-295, 88,30% para PC-3 e 97,60% para HCT-116. O teste de toxicidade em *Artemia salina* foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Molina-Salinas e Said-Fernández (2006), e pôde-se verificar que apenas o extrato fracionado acetato de etila apresentou toxicidade fraca contra *Artemia salina*. A avaliação inseticida frente a formiga *Atta sexdens rubropilosa* foi realizada de acordo com metodologia de Bueno (1997) e os extratos apresentaram altos valores de toxicidade, as taxas de mortalidade obtidas ficaram acima de 70% para a concentração de 1 mg/ mL e acima de 78% para 2 mg/mL, sendo o extrato com melhor resultado o PRFEA com valores 100% e 98% respectivamente.

Palavras-chave: *Atta sexdens rubropilosa*, Asteraceae, *Piptocarpha rotundifolia*.

ABSTRACT

PHYTOCHEMICAL STUDY, EVALUATION OF TOXIC, OF THE EXTRACTS OF THE LEAVES OF *Piptocarpha rotundifolia* (Less.) Baker (Asteraceae):

The objective of this work was to carry out phytochemical prospecting, to evaluate the toxicity, cytotoxic potential and potential insecticidal of *Piptocarpha rotundifolia* (Asteraceae). The plants are used with curative or prophylactic since antiquity, but it was the advancement of science that made possible the extraction of chemical constituents of plant species in order to correlate each active ingredient extracted with its pharmacological function, by means of the structure activity, thus giving rise to herbal drugs and synthetic or semi-synthetic originating from plants. There are numerous plant species that do not have their phytochemical profile outlined, in this sense, this work aims the phytochemical study of *Piptocarpha leaves rotundifolia* (Asteraceae), a plant with occurrence in the Cerrado known popularly as Candeia. The collection of leaves was held on the campus of the Universidade Estadual de Goiás in Anapolis-GO. The samples were dried, pulverized in slicer and macerated with ethanol 96%. The solvent was evaporated in rotary evaporated to obtain the crude ethanol extract. Soon after, this crude extract suffered a fractionation eluotrópica following order of solvents, giving rise to the extracts: hexane (PRFEH), dichloromethane (PRFED), ethyl acetate (PRFEA) and methanol (PRFEM). The fractionated obtained were subjected to chromatographic techniques for the purpose of isolation of substances. Extracts and isolated substances were tested in vitro by the MTT method (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) 2,5-Diphenyl Tetrazolium bromide) to evaluate the potential of cytotoxicity against tumor cell lines. That this test was satisfactory for some of the samples tested, the PRFEH - 40% extract showed inhibition of cell growth in the order of 93.15% for HCT - 116 cells, PRFEH - 50% presented inhibition of cell growth in the order of 84, 04% for SF-295 cells, 78.95% for PC-3 and 88.81% for HCT-116. The fractionated PRFEH-100% extract presented inhibition of cell growth in the order of 76.27% for SF-295 cells, 88.30% for PC-3 and 97.60% for HCT-116. The toxicity test against *Artemia salina* was performed according to the methodology proposed by Molina-Salinas and Said-Fernández (2006), and it was verified that only ethyl acetate fractionated extract showed weak toxicity against *Artemia salina*. The insecticide evaluation against the *Atta sexdens rubropilosa* ant was performed according to Bueno (1997) methodology and the extracts showed high toxicity values, the mortality rates obtained were above 70% for the concentration of 1 mg / mL and above 78% to 2 mg / mL, the extract with the best result being PRFEA with values of 100% and 98%, respectively.

Keywords: *Atta sexdens rubropilosa*, Asteraceae, *Piptocarpha rotundifolia*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários	21
Figura 2 - Representação estrutural de alguns triterpenos isolados de plantas ...	22
Figura 3 - Representação básica dos flavonoides	23
Figura 4 - Representação estrutural do Ácido Oleanólico extraído do gênero <i>Baccharis</i>	26
Figura 5 - Representação estrutural do Alfa Bisabolol	27
Figura 6 - Representação estrutura dos ésteres do piptocarfol	28
Figura 7 – Representação estrutura das piptocarpinas de A a F.....	28
Figura 8 - Aspecto geral de <i>Piptocarpha rotundifolia</i>	29
Figura 9 - Folhas e flores de <i>Piptocarpha rotundifolia</i>	30
Figura 10 – Representação estrutural dos compostos químicos presentes no óleo essencial de <i>Piptocarpha rotundifolia</i>	30
Figura 11 – Representação Estrutural dos compostos químicos extraídos das folhas <i>Piptocarpha rotundifolia</i>	31
Figura 12 - Representação estrutural de Vincristina e da Vimblastina	34
Figura 13 - Representação estrutural do Baccharin extraído de <i>Baccharis megapotamica</i>	35
Figura 14 - Representação estrutural do esqueleto de diterpenos clerodânicos	37
Figura 15 - Fluxograma de obtenção do extrato etanólico de <i>P. rotundifolia</i>	41
Figura 16 - Rendimento os extratos de <i>Piptocarpha rotundifolia</i>	42
Figura 17 - Fluxograma de isolamento da substância PRT – 01 (Lupeol).....	44
Figura 18 - Fluxograma de isolamento das substâncias PRT – 02 (Lupeol Acetato).....	46
Figura 19 - Fluxograma de isolamento da mistura de flavonoides	48
Figura 20 - Vista geral do formigueiro de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> mantido no laboratório do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – IBRC - UNESP.....	53
Figura 21 - Operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento com o ingrediente ativo incorporado em dieta artificial.....	54
Figura 22 – Estrutura do Lupeol (PRT – 01).....	60

Figura 23 - Espectro de RMN ¹³ C da substância PRT -01 (CDCl ₃ , 500 MHz)	62
Figura 24 - Espectro de RMN ¹ H da substância PRT - 01 (CDCl ₃ , 500 MHz)	63
Figura 25 - Estrutura do Lupeol Acetato (PRT – 02)	65
Figura 26 - Espectro de RMN ¹³ C da substância PRT -02 (CDCl ₃ 500 MHz)	66
Figura 27 - Espectro de RMN ¹ H da substância PRT – 02 (CDCl ₃ 500 MHz)	67
Figura 28 - Espectro de RMN ¹ H da mistura de flavonoides (CD ₃ OD 500 MHz)..	70
Figura 29 - Espectro de RMN ¹³ C da mistura de flavonoides (CD ₃ OD 500 MHz).....	73
Figura 30 - Espectro HSQC da mistura de flavonoides (CD ₃ OD 500 MHz).....	74
Figura 31 - Espectro HMBC da mistura de flavonoides (CD ₃ OD 500 MHz)	75
Figura 32 - Espectro de Massas da mistura de flavonoides (ESI-MS [M - H] ⁺ m/z.....	76

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extrato etanólico	80
Gráfico 2	Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extrato hexânico	81
Gráfico 3	Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extrato diclometânico	82
Gráfico 4	Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extrato acetato etílico	84
Gráfico 5	Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extrato metanólico	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Materiais usados para isolamentos dos compostos químicos.....	39
Tabela 2	Reagentes usados e suas marcas	40
Tabela 3	Equipamentos usados e suas especificações	40
Tabela 4	Rendimento dos extratos fracionados a partir do extrato etanólico (PRFEE).....	43
Tabela 5	Resultados da prospecção fitoquímica de <i>Piptocarpha rotundifolia</i>	56
Tabela 6	Dados de RNM ¹³ C da substância PRT – 01 (CDCl ₃ 500 MHz) comparados com dados da literatura (Sholichin e colaboradores, 1980).....	61
Tabela 7	Dados de RNM ¹³ C da substância PRT – 02 (CDCl ₃ 500 MHz) comparados com dados da literatura (David, 2004).....	65
Tabela 8	Dados de RNM ¹ H da mistura de flavonóides	71
Tabela 9	Dados de RNM ¹³ C da mistura de flavonoides comparada com dados da literatura Agrawal(1989).....	72
Tabela 10	Determinação CL ₅₀ em µg/mL dos extratos de <i>Piptocarpha rotundifolia</i> em <i>Artemia salina</i>	77
Tabela 11	Percentual de inibição do crescimento tumoral <i>in vitro</i> e desvio padrão das amostras	78
Tabela 12	Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) das formigas <i>Atta sexdens rubropilosa</i> com incorporação do extrato etanólico (PRFEE) na dieta artificial.....	79
Tabela 13	Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) das formigas <i>Atta sexdens rubropilosa</i> com incorporação do extrato hexânico (PRFEH) na dieta artificial.....	81
Tabela 14	Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) das formigas <i>Atta sexdens rubropilosa</i> com incorporação do extrato diclorometânico (PRFED) na dieta artificial.....	82
Tabela 15	Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) das formigas <i>Atta sexdens rubropilosa</i> com incorporação do extrato acetato etílico (PRFEA) na dieta artificial.....	83
Tabela 16	Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) das formigas <i>Atta</i>	

sexdens rubropilosa com incorporação do extrato metanólico (PRFEM)
na dieta artificial..... **85**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BOD - Demanda Bioquímica de Oxigênio
- CC - Cromatografia em Coluna
- CCD - Cromatografia em camada delgada
- CCDP - Cromatografia em camada delgada preparativa
- $CDCl_3$ - Clorofórmio deuterado
- CD_3OD - Metanol deuterado
- CEIS - Centro de Estudos de Insetos Sociais
- CI_{50} - Concentração Inibitória média em $\mu g.mL^{-1}$ para 50% da população
- CL_{50} - Concentração letal média em $\mu g.mL^{-1}$ para 50% da população
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DP - Desvio padrão
- HCT-116 - Linhagem celular do carcinoma colorretal
- IC - Inibição do crescimento
- Md* - Sobrevivência mediana
- MTT - 3- (4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium.
- NCI - National Cancer Institute
- PR - *Piptocarpha rotundifolia*
- PRT 01 - *Piptocarpha rotundifolia* substância 01 (Triterpeno Lupeol)
- PRT 02 - *Piptocarpha rotundifolia* substância 02 (Triterpeno Lupeol Acetato)
- PRF 03 - *Piptocarpha rotundifolia* substância 03 (Flavonoide Quercentina 3-O- β -D-glicopiranosídeo
- PRF 04 - *Piptocarpha rotundifolia* substância 04 (Flavonoide Quercentina 3-O- β -D-galactopiranosídeo Quercitina)
- PRF 05 - Biflavonoide
- PRFED - *Piptocarpha rotundifolia* folhas extrato diclorometano
- PRFEA - *Piptocarpha rotundifolia* folhas extrato acetato de etila
- PRFEH - *Piptocarpha rotundifolia* folhas extrato hexânico
- PRFEM - *Piptocarpha rotundifolia* folhas extrato metanólico
- PRFEE - *Piptocarpha rotundifolia* folhas extrato etanólico
- ppm - Partes por milhão
- PC-3 - Linhagem celular de carcinoma de próstata
- Rf* - Fator de retenção

RMN - Ressonância Nuclear Magnética

SF-295 - Linhagem celular do carcinoma do sistema nervoso central

UCs - Unidades de Conservação

LISTA DE SÍMBOLOS

<i>d</i>	Duplete
<i>dd</i>	Duplo duplete
<i>ddd</i>	Duplo duplo duplete
<i>Hz</i>	Hertz
<i>h</i>	Altura
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
<i>m/z</i>	Relação Carga massa
<i>s</i>	Simpleto
<i>t</i>	Triplete
δ	Deslocamento químico em partes por milhão
Φ	Diâmetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1	Metabólitos Secundários.....	20
2.2	Cerrado	24
2.3	A Família Asteraceae	25
2.3.1	O Gênero <i>Piptocarpha</i>	27
2.3.2	Espécie <i>Piptocarpha rotundifolia</i>	29
2.4	Bioensaios na investigação da toxicidade	32
2.4.1	Letalidade de <i>Artemia salina</i> Leach.....	32
2.5	Câncer.....	33
2.5.1	Análise de citotoxicidade em células tumorais	35
2.6	Atividade Inseticidas.....	36
3	Objetivos	38
3.1	Objetivo Geral	38
3.2	Objetivos específicos	38
4	Materiais e métodos.....	39
4.1	Local de realização dos testes	39
4.2	Materiais e Equipamentos utilizados	39
4.3	Coleta e identificação do material botânico.....	40
4.4	Obtenção dos Extratos.....	41
4.4.1	Obtenção do Extrato Etanólico de <i>Piptocarpha rotundifolia</i>	41
4.4.2	Fracionamento do extrato etanólico.....	42
4.5	Isolamento de constituintes químicos.....	43
4.5.1	Isolamento da substância PRT- 01 (Lupeol).....	43
4.5.2	Isolamento da substância PRT- 02 (Lupeol Acetato).....	45
4.5.3	Isolamento da mistura de flavonoides PRF-03 e PRF-04 e PRF-05	47
4.6	Prospecção fitoquímica	49
4.7	Ensaio de toxicidade com <i>Artemia salina</i> Leach	50
4.8	Avaliação da Atividade Citotóxica	51
4.8.1	Linhagens celulares e manutenção do cultivo celular.....	51
4.9	Ensaio de toxicidade dos extratos em <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	52
4.9.1	Coleta e manutenção das formigas utilizadas nos bioensaios	52

4.9.2	Bioensaios para determinação da toxicidade	53
4.9.3	Bioensaio I: incorporação em dieta artificial	54
4.9.4	Análise dos dados de toxicidade	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	Prospecção Fitoquímica	55
5.2	Isolamento das substâncias	57
5.3	Determinação estrutural das substâncias isoladas	57
5.3.1	Identificação da substância PRT – 01 (Lupeol)	59
5.3.2	Identificação da substância PRT - 02 (Lupeol Acetato)	64
5.3.3	Identificação do Flavonoide PRF - 03, PRF - 04 e PRF - 05	68
5.4	Bioensaio com <i>Artemia salina</i>	76
5.5	Avaliação da Atividade Citotóxica	77
5.6	Atividade inseticida.....	78
5.6.1	Avaliação da atividade inseticida do extrato etanólico (PRFEE)	79
5.6.2	Avaliação da atividade inseticida do extrato hexânico (PRFEH)	80
5.6.3	Avaliação da atividade inseticida do extrato diclorometano (PRFED) ...	81
5.6.4	Avaliação da atividade inseticida do extrato acetato de etila (PRFEA)..	83
5.6.5	Avaliação da atividade inseticida do extrato metanólico (PRFEM).....	84
6	CONCLUSÕES	86
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

1 INTRODUÇÃO

Durante séculos, o conhecimento popular a respeito de plantas e seus constituintes químicos auxiliou no tratamento da sintomatologia de doenças, sendo empregado tanto na profilaxia como na medicação. Tal uso estava ligado ao misticismo e religião, por vezes, consistia na única alternativa de tratamento disponível (HORST, 2012).

Muitas civilizações ocidentais e orientais desenvolveram-se utilizando os recursos naturais como alavanca em várias áreas, como por exemplo, controle de pragas na agricultura e o comércio de plantas e derivados para diversos usos. Um destaque nesse sentido é a cultura chinesa, que emprega diversas plantas em sua culinária, além da medicina tradicional, a qual é bastante eficiente e desperta interesse a respeito dos princípios ativos que possibilitam sua eficácia (VIEGAS JR, BOLZANI e BARREIRO, 2006).

O conhecimento popular sobre a eficiência de plantas medicinais foi preservado de geração em geração, permitindo que as informações fossem repassadas ao longo dos anos e tornando possível que esse conhecimento norteasse estudos com objetivo de conhecer os componentes químicos das plantas, nas áreas de botânica, farmacologia e fitoquímica (MACIEL, PINTO e VEIGAS JR, 2002).

A exploração e a investigação dos recursos naturais, por sua vez, constituem a bioprospecção, campo de estudo que visa, em sua maioria, o isolamento de constituintes químicos ativos com a finalidade de conhecer suas propriedades biológicas ou perfis químicos das espécies vegetais. Trata-se de um âmbito de pesquisa multidisciplinar, que envolve diversas áreas: sociologia, economia, dentre outras, além de ser uma ferramenta de articulação entre o conhecimento popular e o conhecimento científico (TRIGUEIRO, 2006)

As diversas aplicações para uso de plantas, tais como: tratar doenças, uso como inseticidas, corantes e agentes tóxicos, foram fundamentais para obtenção de produtos naturais e medicamentos. As pesquisas realizadas com essas plantas visaram a elucidação das estruturas químicas dos compostos e da relação entre a estrutura e a atividade biológica desempenhada (VIEGAS JR, BOLZANI e BARREIRO, 2006).

Entretanto, apesar da grande quantidade de estudos fitoquímicos já realizados, ainda existem inúmeras espécies vegetais pouco conhecidas do ponto de vista científico, como é o caso da *Piptocarpha rotundifolia*. O fato de existirem poucos trabalhos relacionados a essa espécie e o uso popular relatando atividades contra sífilis, diarreia e fraqueza, foi o que norteou a escolha dessa planta como alvo dessa pesquisa, que teve como objetivo avaliar os extratos quanto a sua toxicidade em *Artemia salina* Leach, avaliar potencial citotóxico e inseticida.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Metabólitos Secundários

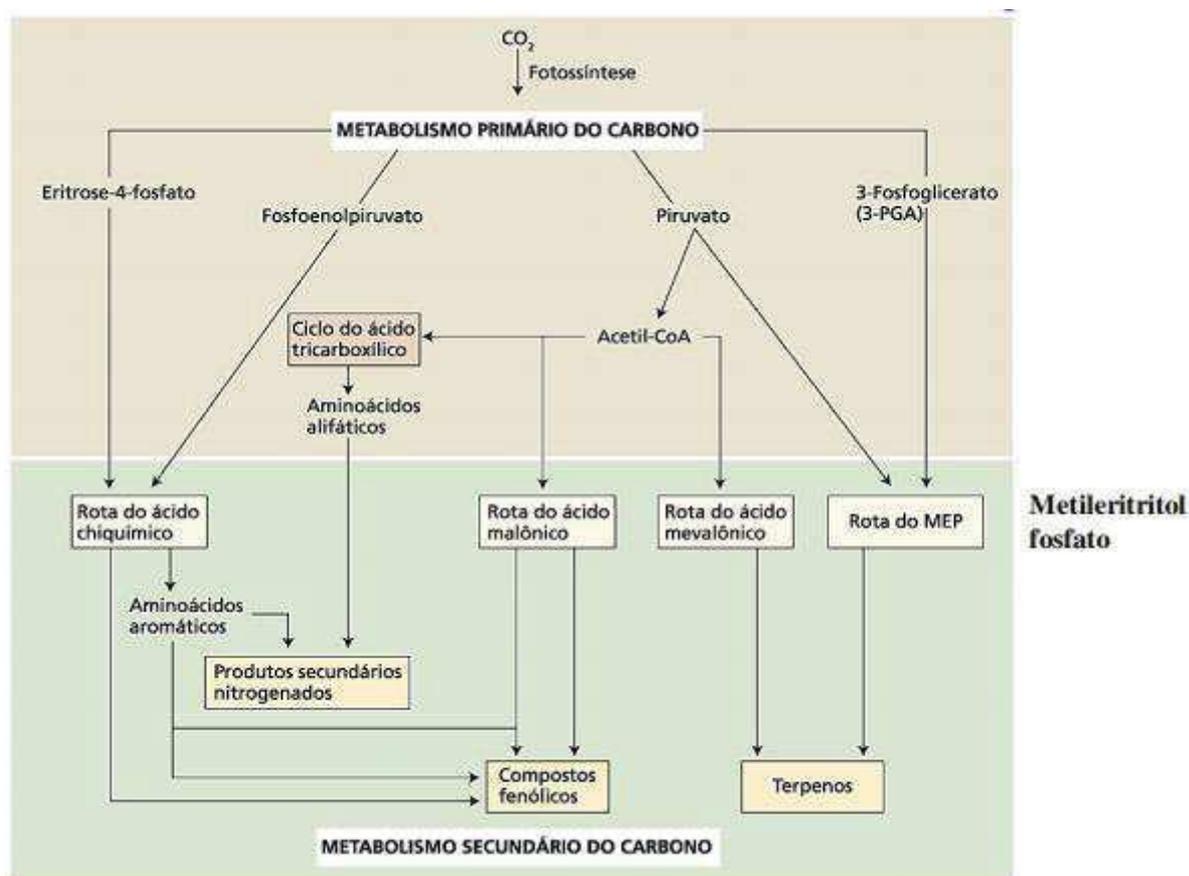
Em 1891, Kossel definiu a existência de metabólitos secundários, ele propôs que todas as plantas possuem um metabolismo primário e que decorrente disso existem substâncias comuns a todas as espécies vegetais. As demais substâncias que são encontradas em espécies vegetais, são denominadas metabólitos secundários, esses não são comuns ao metabolismo primário e não são essenciais para a sobrevivência da planta, mas desempenham algum papel em sua fisiologia (RHODES, 1994; KOSSEL, 1891).

Organismos vivos necessitam de metabolismo e dos produtos desse metabolismo para a sobrevivência. O metabolismo primário que abrange os aminoácidos, lipídios, carboidratos e macromoléculas é estudado por bioquímicos, já química dos produtos naturais de metabolismo secundário é estudada por químicos orgânicos, reconhecidos como químicos de produtos naturais. Podem ser citados como produtos do metabolismo secundário de plantas os terpenos, alcalóides, glicosídeos e vários outros (SILVA, MIRANDA e CONCEIÇÃO, 2010).

As plantas produzem metabólitos de acordo com a carga genética de cada família, no entanto, esses metabólitos podem ser influenciados quanto às suas características e proporções a depender de fatores: ambiente que a cerca, ontogenia, fatores climáticos e fatores climático-edáficos, tais como, índice pluviométrico, solo e época do ano influenciam diretamente nos metabólitos sintetizados e nas funções biológicas que esses compostos podem apresentar. Esses fatores podem influenciar a composição final dos metabólitos secundários, de tal forma que a composição do solo pode influenciar diretamente nas rotas metabólicas ativando-as, ou em caso de ausência, limitando a produção de alguns metabólitos na espécie vegetal. Quando o solo for rico em nitrogênio, por exemplo, favorecerá a produção global de metabólitos nitrogenados (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

O metabolismo primário e secundário das plantas e suas interconexões estão demonstrados na figura abaixo:

Figura 1 - Principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários



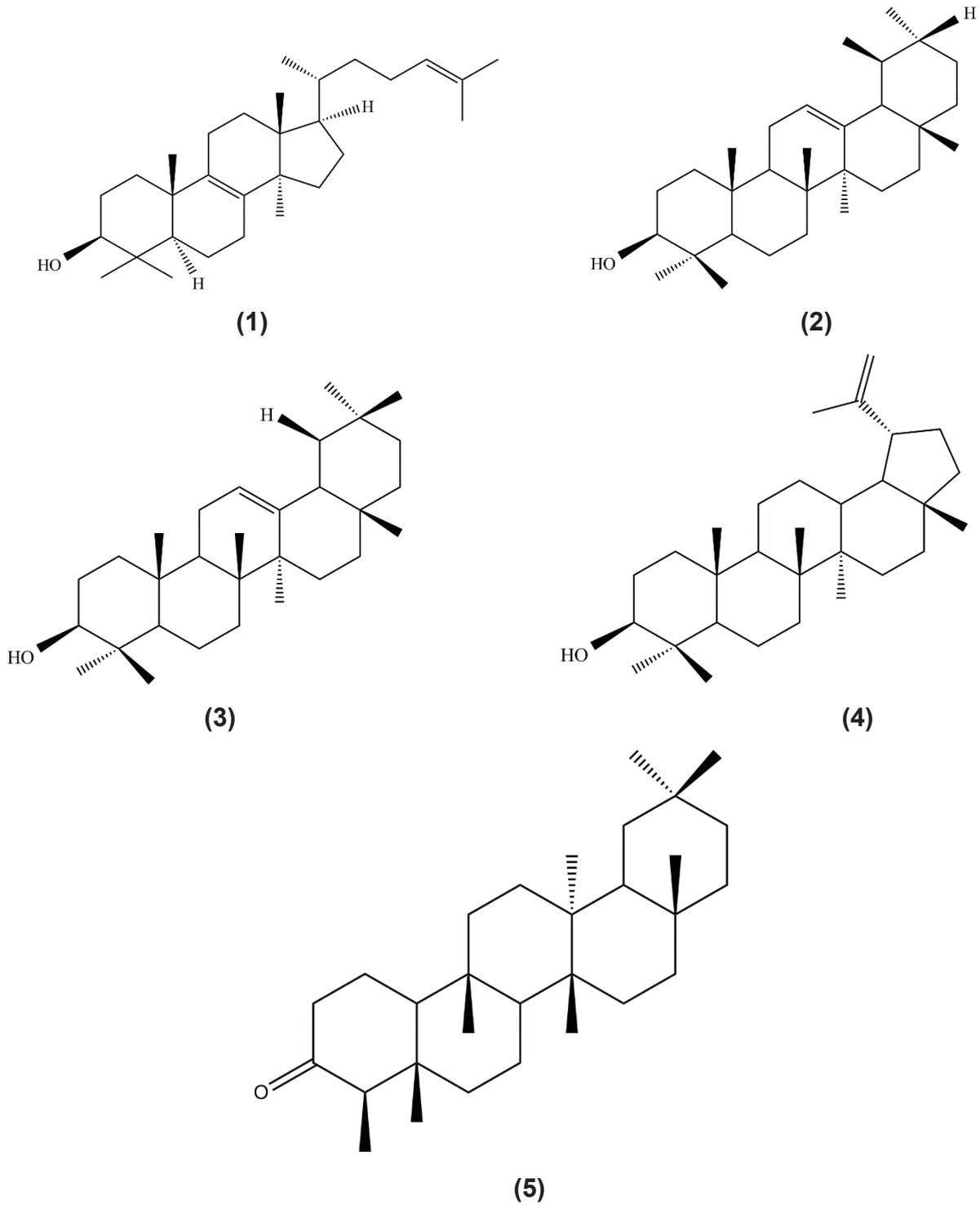
As quatro rotas metabólicas demonstradas acima dão origem a três grupos de metabólitos secundários: compostos fenólicos, terpenos e os compostos nitrogenados.

Os terpenos constituem um grande grupo de substâncias de origem vegetal, sendo que sua função ecológica está relacionada a defesa das plantas. São compostos que tem como precursor as unidades isoprenicas e são classificadas ainda pela quantidade de carbonos que possuem em sua estrutura molecular (VIEGAS JR, 2003).

Os triterpenos são exemplos de constituintes químicos provenientes do metabolismo secundário e são amplamente encontrados em espécies vegetais, esses metabólitos podem se apresentar como moléculas em uma ampla diversidade estrutural, o que possibilita encontrar triterpenos com atividades biológicas diversificadas. Em meio a essa grande ocorrência pode-se encontrar triterpenos pentacíclicos ou tetracíclicos e em sua maioria apresentam no máximo uma ou duas ligações duplas em sua molécula, dentre os triterpenos isolados de plantas

pode-se citar o lanostadienol (1), α amirina (2), β amirina (3), lupeol (4) e friedelina (5) (OLEA e ROQUE, 1990).

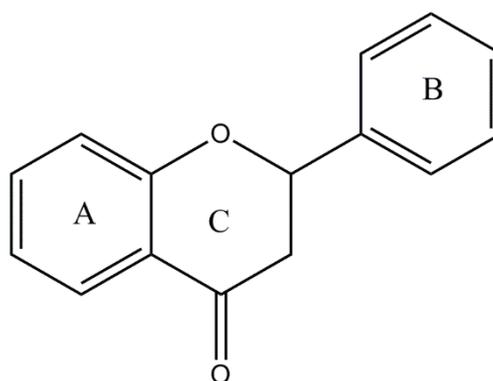
Figura 2 - Representação estrutural de alguns triterpenos isolados de plantas



Fonte: Adaptado de Olea e Roque (1990)

Os compostos fenólicos são outra classe de compostos químicos muito abundantes nas plantas, dentro dessa classe pode-se citar os flavonoides. Esses compostos apresentam várias aplicabilidades farmacológicas gerando efeitos benéficos ao organismo humano tais como: antioxidante, antialérgico, anti-inflamatório, antitumoral, dentre outras. A estrutura química desses compostos é constituída de 15 átomos de carbono no seu esqueleto básico, arranjados em anéis **(6)**. Esse núcleo fundamental é derivado do fenilpropano e três unidades de acetato. A grande quantidade de compostos diferentes dentro da classe dos flavonoides é devida as modificações que esses compostos podem sofrer, tais como: hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, entre outras (LOPES, NAGEM e PINTO, 2000).

Figura 3 - Representação básica dos flavonoides



(6)

Fonte: Adaptado de Dornas e colaboradores (2007)

Como diversos fatores podem influenciar na composição final da composição do metabolismo de plantas, e em vista da grande variação desses fatores no mundo, cada bioma vai ter mais perfis diferentes de substâncias produzidas, assim como a quantidade diferente. O bioma Cerrado, por exemplo, possui uma grande riqueza no que diz respeito a espécies vegetais com potencial farmacológico, isso é devido a suas características morfológicas e aos diversos fatores citados anteriormente (SILVA, MIRANDA e CONCEIÇÃO, 2010).

2.2 Cerrado

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro com mais de 200 milhões de hectares, ficando atrás apenas da Amazônia no quesito territorial e ocupa 21% de toda a extensão do país. Trata-se de um bioma com elevada biodiversidade, sendo a vegetação comum no Brasil Central e podendo ser definido como um conjunto de ecossistemas, savanas, matas, campos e matas de galeria (BATLLE-BAYER, BATJES e BINDRABAN, 2010)

O Cerrado brasileiro é um dos biomas que mais contribui para a biodiversidade vegetal do país, uma vez que é composto de grande heterogeneidade no que diz respeito às espécies, sendo facilmente encontradas em um mesmo local diferentes formações vegetacionais com manifestações campestres até arborescentes mais densas, aspecto florestal, e fitotipias ecotonais intermediárias (RITTER, RIBEIRO e MORO, 2010; AMARAL e MUNHOZ, 2008).

Devido à sua grande riqueza natural, o Cerrado passou a ser considerado um dos *hotspot* mundiais, uma designação para áreas de relevância ecológica e que devem ser preservadas (BATALHA e MARTINS, 2005). Essa preocupação se dá devido à grande devastação que o referido bioma tem sofrido, cada vez mais as áreas de Cerrado têm se tornado áreas de plantação, a modificação do solo com fertilizantes e calcário, possibilita a plantação de soja, um dos carros chefe da exportação brasileira (KLINK e MACHADO, 2005).

Visando minimizar a grande devastação dos biomas brasileiros, foram elaboradas políticas para criação de Unidades de Conservação (UCs). Tais políticas são fundamentais para garantir a conservação da biodiversidade e têm como objetivo frear a tendência expansionista do agronegócio em vista da conservação da fauna e flora. Entretanto, grande parte do Cerrado está fora dessas unidades de conservação, sendo que em 2009 apenas 2,89% do Cerrado brasileiro estava protegido por Ucs (DRUMMOND, FRANCO E OLIVEIRA, 2010).

Outro fator preocupante relacionado à acelerada destruição da biodiversidade, é que essa atividade pode ter levado à extinção de espécies medicinais, que não poderão mais ter seu perfil químico delineado, nem suas atividades biológicas avaliadas. Ressalta-se a necessidade de estudos contínuos nas áreas de bioprospecção e fitoquímica com intuito de descobrir novas moléculas

ativas, dessa forma espécies nativas do Cerrado são alvos promissores para estudos nessas áreas (CALIXTO e RIBEIRO, 2004).

A maior parte das espécies nativas brasileiras não possuem estudos para determinação de seus constituintes químicos e investigar atividade biológica. No entanto, muitas dessas espécies são utilizadas diariamente, devido ao conhecimento popular, sem nenhum respaldo quanto a segurança de seu uso, toxicidade ou eficácia. Tais fatores também incentivam o estudo de espécies vegetais do segundo maior bioma do Brasil e de uma das maiores famílias dentre as angiospermas, família Asteraceae (FOGLIO et al., 2006).

2.3 A Família Asteraceae

Dentre a grande variedade de espécies vegetais existentes no Cerrado, encontra-se Asteraceae, um grupo de grande prevalência dentre as Angiospermas, compreendendo 1.100 gêneros e cerca de 25.000 espécies. Devido a essa grande variedade de componentes, pode-se encontrar, nessa família as mais diversas morfologias. Essas plantas são comumente encontradas em todos os tipos de habitats, mas preferencialmente nas regiões montanhosas e de clima tropical, como alguns trechos do Cerrado (VERDI, BRIGHENTE e PIZZOLATTI, 2005).

Algumas espécies pertencentes a família Asteraceae têm sido alvo de diversos estudos científicos, levando ao desenvolvimento de novos fármacos e inseticidas, o que é possível devido à grande variedade de metabólitos secundários produzidos pelos vegetais dessa família. Os principais marcadores quimiotaxonômicos são os flavonoides. Mas também são encontrados terpenos, diterpenos e sesquiterpenos com uma ampla variedade de estrutura química (NENAAH, 2014; GONZALEZ-COLOMA et al., 2005;).

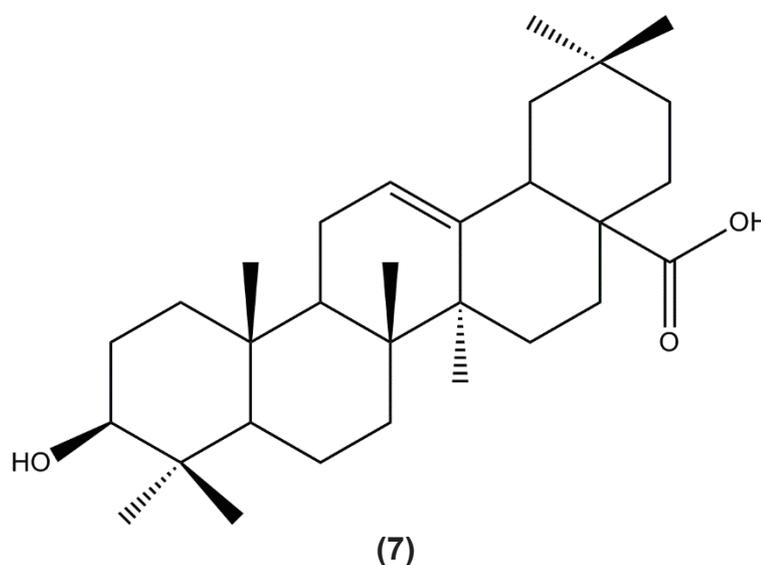
Os óleos essenciais e extratos obtidos de diversas espécies de Asteraceae demonstraram algumas propriedades biológicas, incluindo atividade antimicrobiana, antiviral, anticancerígena, analgésica e antirreumática. Atividade inseticida, antiparasitária, larvicida e moluscicida, antioxidante, acaricida e anti-inflamatória também foram testadas e evidenciadas em alguns gêneros dessa família (NENAAH, 2014).

Nessa família existem gêneros com espécies amplamente utilizadas na medicina tradicional, e com suas atividades biológicas comprovadas. Dentre eles, pode-se citar o gênero *Tanacetum*, que possui mais de 200 espécies largamente

utilizadas na culinária, na medicina popular e como princípio ativo de cosméticos. Uma espécie que merece destaque é a *Tanacetum parthenium* (L.) Sch.Bip., utilizada popularmente para tratar disfunções como: dor de dente, artrite, febre, tontura, psoríase, enxaqueca, dor de estômago, picadas de insetos e desordens menstruais (MAXIA et al., 2015).

O gênero *Baccharis* possui várias espécies utilizadas para fins terapêuticos, são contabilizadas cerca de 500 espécies, sendo que 120 tem ocorrência no Brasil. Popularmente, essas espécies são utilizadas na forma de chá, com indicação para dores no estômago, diabetes, anemia inflamação, próstata e desintoxicação. Seu uso se dá tanto no tratamento quanto na prevenção de tais sintomas. Vários triterpenos foram isolados de espécies desse gênero em especial pode-se citar o ácido oleanoico (**7**) isolado de 24 espécies (VERDI, BRIGHENTE e PIZZOLATTI, 2005).

Figura 4 - Representação estrutural do Ácido Oleanólico extraído do gênero *Baccharis*

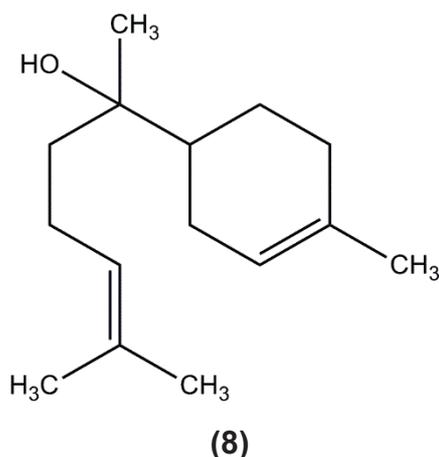


Fonte: adaptado de Verdi, Brighente e pizzolatti (2005).

Já as espécies de *Eremanthus*, são conhecidas popularmente como candeias e se dividem em três espécies distintas: *Eremanthus erythropappus* (DC.), Macleish, *Eremanthus incanus* (Less.) Less. e *Eremanthus glomerulatus* Less. Essas espécies são amplamente exploradas, pois o óleo essencial extraído delas tem como principal componente alfa bisabolol (**8**), o qual apresenta atividade antibacteriana,

antimicótica, antiflogística, espasmódica e dermatológica, fato que levou esse gênero a entrar na lista de ameaçados de extinção (RIBEIRO, SILVA e CASTRO, 2010).

Figura 5 - Representação estrutural do Alfa Bisabolol



Fonte: adaptado de Ribeiro, Silva e Castro (2010).

A espécie *Archyrocline saturoide* (Lam.) DC. é aplicada popularmente na forma de chá para problemas digestivos e inflamatórios, sendo também utilizada como antiespasmódico, hipoglicêmico, em indicações para resolver desordens intestinais, além de ser hipocolesterolêmico. Trata-se de uma erva anual que, devido a sua ampla utilização popular, destacou - se como alvo de estudos e demonstrou diversas atividades, dentre as quais pode-se citar: anti-HIV, anti-proliferativa, analgésica e sedativa, dentre outras. Sua relevância se deu de tal forma, que essa espécie foi incluída na primeira edição da Farmacopeia Brasileira (FACHINETTO et al., 2007).

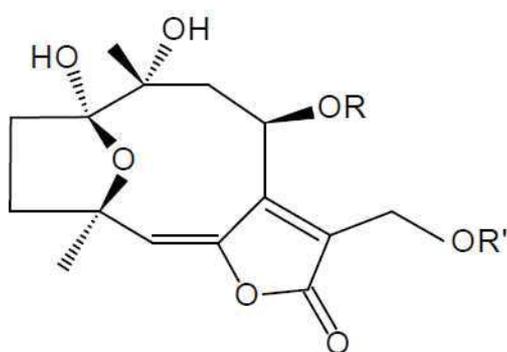
2.3.1 O Gênero *Piptocarpha*

O gênero *Piptocarpha* é um gênero neotropical, composto por cerca de 50 espécies vegetais, cuja ocorrência pode ser observada desde o sul do Brasil e norte da Argentina e se estende para a América Central. Comumente, esse gênero é composto por árvores e espécies escandentes, com a distribuição arbórea sendo muito comum nos planaltos brasileiros, porém *Piptocarpha rotundifolia*, objeto de estudo desta pesquisa, se demonstra como exceção, pois é uma árvore de meio

porte, muito comum nas regiões de Cerrado centrais do Brasil (GROKOVISKI, CERVI e TARDIVO, 2009).

O gênero possui algumas espécies que já tiveram seu perfil químico delineado. Substâncias derivadas dos ésteres de piptocafol (**9**) foram isoladas de *Piptocarpha opaca* e trata-se de seis lactonas sesquiterpênicas (piptocarpinas A-F) (**10**). Flavonoides e triterpenos, foram isolados de *Piptocarpha oblonga* Gardn. Baker e dessa espécie não foi isolado nenhuma lactona. Duas lactonas inétidas foram isoladas de *Piptocarpha opaca* Baker (HERZ e PALAHIAPPAN 1983).

Figura 6 - Representação estrutura dos ésteres do piptocarfol



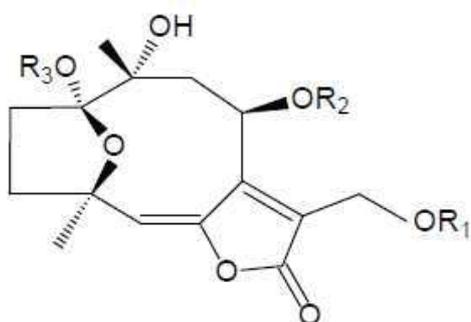
(9)

R e R' = Ac

R = Ac e R' = Et

Fonte: adaptado de Catalán e colaboradores (1986)

Figura 7 – Representação estrutura das piptocarpinas de A a F



(10)

A R₁ = Ac, R₂ = MeAc, R₃ = H

B R₁ = Ac, R₂ = Tigl, R₃ = H

C R₁ = H, R₂ = MeAc, R₃ = H

D R₁ = Ac, R₂ = R₃ = H

E R₁ = Ac, R₂ = MeAc, R₃ = Et

F R₁ = Et, R₂ = MeAc, R₃ = H

Fonte: adaptado de Cowall, e colaboradores (1981)

2.3.2 Espécie *Piptocarpha rotundifolia*

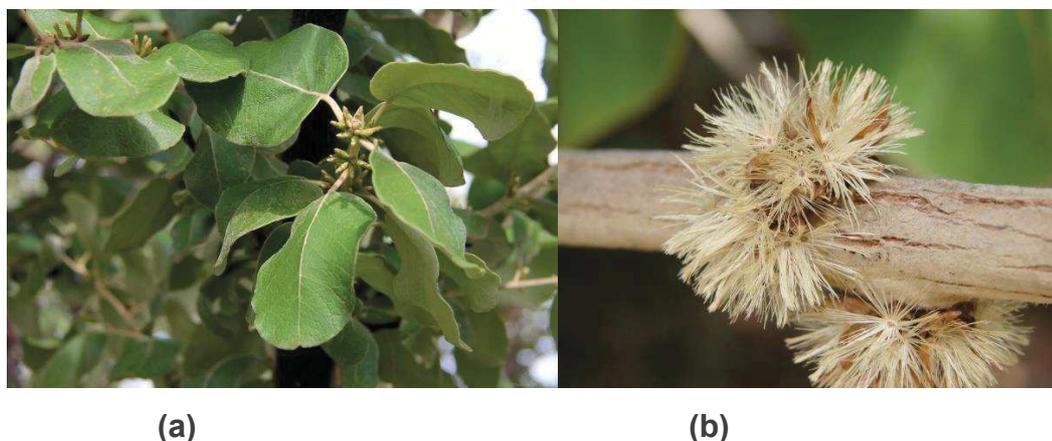
Piptocarpha rotundifolia (Less.) Baker (Figura 8) é uma planta nativa do Brasil e exclusiva das áreas de Cerrado. É conhecida pela população pela sinonímia: candeia, infalível e paratudo. Trata-se de uma árvore cujo altura pode variar podendo se estender até 8 metros de altura, sendo sua madeira útil para trabalhos de marcenaria e carpintaria. Seu tronco no geral é tortuoso com um suber desenvolvido, sua copa e arredondada e seus galhos tem a mesma característica do troco com uma leve distorção. As flores são em capítulos curto-pedunculados e axilares e o período de floração é de julho a maio. O fruto é do tipo aquênio glabro e alongado e ocorre no período de novembro a maio (ACCARINI, 2016).

Figura 8 - Aspecto geral de *Piptocarpha rotundifolia*



Fonte: próprio autor

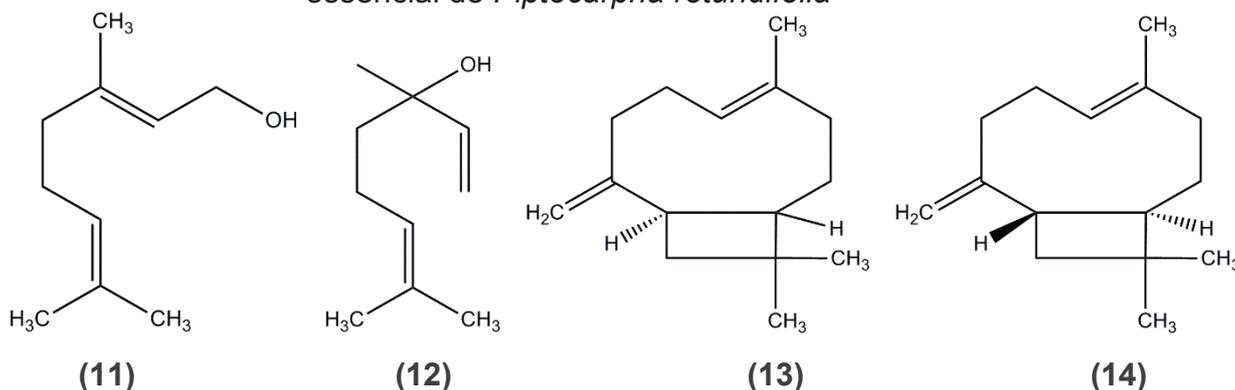
Figura 9 - Folhas e flores de *Piptocarpha rotundifolia*



a) Aspecto do ramo com detalhes da folha e flores axilares; b) Detalhes da flor

Existem poucos estudos com essa espécie como alvo, no entanto Achutti e Silva (1988) extraíram óleo essencial das folhas de *Piptocarpha rotundifolia* e obtiveram um rendimento de 0,13%, avaliaram quanto a sua composição química e caracterizaram como presentes as substâncias: geraniol (11), linalol (12), α carofileno (13) e β carofileno (14). Quanto às características físico-químicas, o óleo essencial apresentou densidade relativa 0,94 e índice de refração de 1,495.

Figura 10 – Representação estrutural dos compostos químicos presentes no óleo essencial de *Piptocarpha rotundifolia*

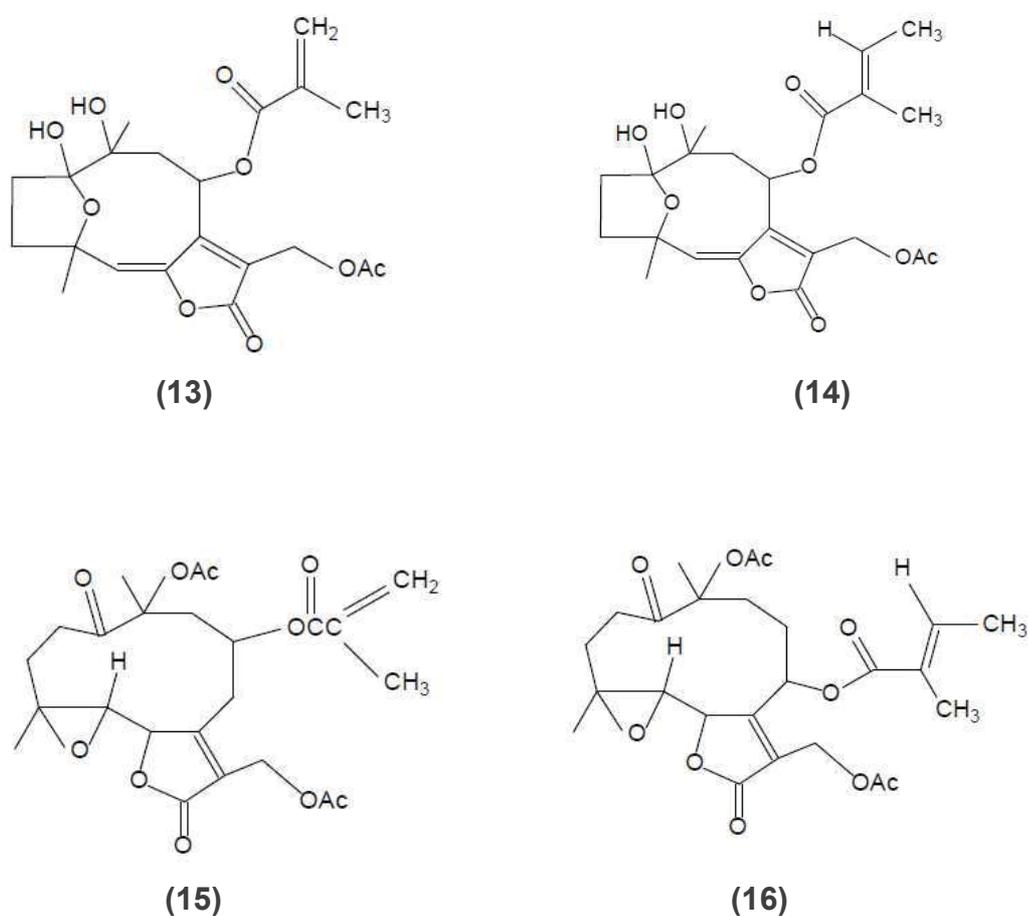


Fonte: Adaptado de Achutti e Silva (1988)

Segundo Accarini (2016), lactonas sesquiterpênicas são substâncias químicas de grande ocorrência na natureza e se mostram como uma das substâncias químicas de grande ocorrência na família Asteraceae. A partir do extrato das folhas de *Piptocarpha rotundifolia* Accarini conseguiu isolar 4 substâncias que após teste

de identificação foi possível verificar que se tratava de piptocarpina A **(13)**, piptocarpina B **(14)**, essas substâncias foram isoladas de outras espécies desse gênero podendo ser citada a espécie *Piptocarpha opaca*, da qual Herz e Palahiappan (1983) isolaram 6 piptocarpinas conforme discorrido anteriormente. Foi isolado também, glaucolide A **(15)** e glaucolide B **(16)** demonstrados na figura abaixo.

Figura 11 – Representação Estrutural dos compostos químicos extraídos das folhas *Piptocarpha rotundifolia*



Fonte: adaptado de Accarini (2016)

2.4 Bioensaios na investigação da toxicidade

Visando ter uma previsibilidade da atividade biológica, surgiram testes preliminares que são procedimentos simples e fáceis e rápidos. Dessa forma testes biológicos podem ser realizados até mesmo nos laboratórios de química demonstrando resultados relevantes sem que sejam utilizados animais, tecidos ou órgãos (NUNES et al., 2008).

Bioensaios preliminares também são experimentos que podem ser rapidamente aplicados a um grande número de amostras para determinar se uma bioatividade de interesse é apresentada pelos compostos testados, direcionando para testes mais específicos. Dentre este grupo de testes ganha destaque o bioensaio de letalidade de *Artemia salina* que é aplicável para verificação da toxicidade de substâncias naturais, uma vez que a validação farmacológica de extratos de plantas e substâncias isoladas é essencial no processo de descoberta de um fármaco (RAHMAN, CHOUDHARY e THOMSEN, 2005).

2.4.1 Letalidade de *Artemia salina* Leach

Artemia salina, é um microcrustáceo de água salgada, facilmente encontrado em qualquer centro de comercialização de produtos para peixes e aquários, e é vendido em forma de cisto. Após o desincestamento, as larvas são empregadas na alimentação de peixes. Para o teste biológico, as artemias passam por período de incubação para eclosão das larvas que são utilizadas na metodologia. Por se tratar de um teste simples, ele pode ser desenvolvido no próprio laboratório de fitoquímica (ARCANJO et al., 2012).

O ensaio de toxicidade, utilizando esse microcrustáceo tem se tornado um teste de rotina em muitos laboratórios de pesquisa em produtos naturais, uma vez que se trata de um teste de baixo custo, que não requer técnica asséptica, de rápida e fácil execução. Por se tratar de um teste preliminar, ele auxilia no direcionamento de demais testes e demonstra atividade biológica de determinado composto, além de fornecer os dados sobre a toxicidade do mesmo, podendo de acordo com seus resultados dar indícios de compostos com atividade citotóxica (SIQUEIRA et al., 1998).

2.5 Câncer

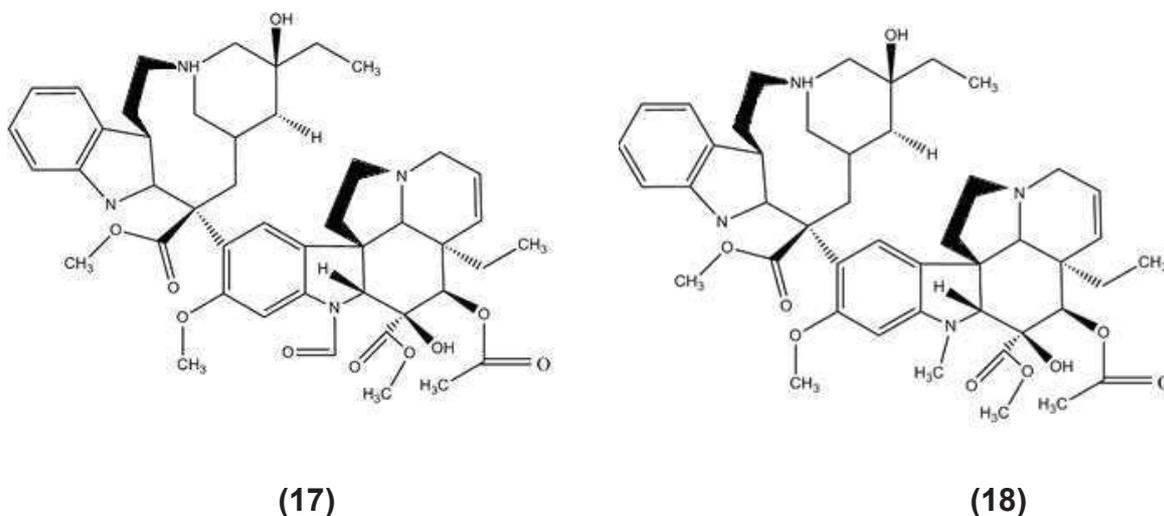
O câncer não é uma doença recente. Desde a antiguidade é relatada sua ocorrência, com a detecção da presença de câncer em múmias egípcias há mais de 3 mil anos antes de Cristo. Trata-se de uma enfermidade responsável pela segunda causa de morte no Brasil, a qual gera grande preocupação na saúde pública, devido aos impactos epidemiológicos, sociais e econômicos (ABC DO CÂNCER, 2012).

Essa doença pode ser definida como o crescimento anormal de células, e caracterizado pela perda de controle da divisão celular. É uma doença crônica e degenerativa, cujo curso de desenvolvimento pode ser lento, podendo apresentar período de latência e o seu aparecimento pode estar relacionado a fatores ambientais aos quais o indivíduo se encontra exposto (CARVALHO et al., 2009).

O Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), aponta a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos de câncer no Brasil, no biênio 2016-2017. Com a maior frequência em cânceres de próstata (61 mil) em homens e mama (58 mil) nas mulheres. As porcentagens de ocorrência foram: próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%).

Devido ao grande número casos de câncer, e a perspectiva de aumento da sua incidência, procura-se cada vez mais, formas de tratamento que sejam eficientes e que não causem efeitos colaterais às células normais. Por esse motivo, alternativas de tratamento que sejam naturais, têm se mostrado necessárias, com o destaque para pesquisa de constituintes químicos ou fitofármacos com atividade anticancerígena. Já existem medicamentos, cujos princípios ativos são alcaloides sintetizados por plantas, como, por exemplo, a vincristina **(17)** e a vimblastina **(18)**, que apresentam ótimos resultados frente a alguns tipos de câncer (LOACES, LUIZ e CABRERA, 2003).

Figura 12 - Representação estrutural de Vincristina e da Vinblastina

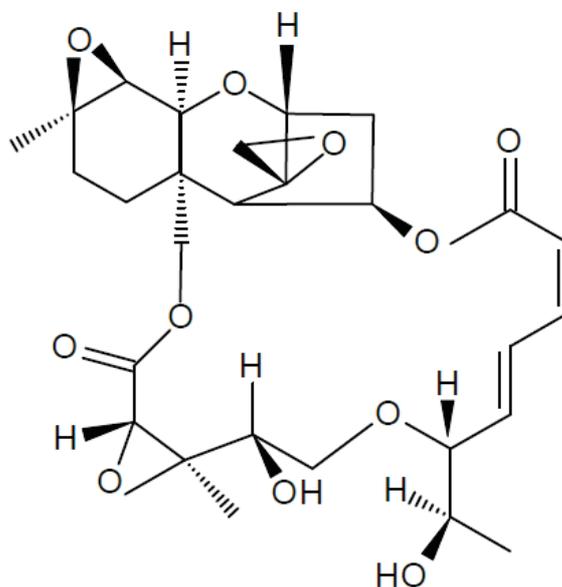


Fonte: adaptado de Loaces, Luiz e Cabrera (2003)

Um grande número de substâncias químicas isoladas de plantas tem sido estudadas e testadas quanto ao potencial citotóxico de células tumorais. Alguns compostos isolados de plantas da família Asteraceae, tais como os diterpenos clerodanicos e labdanicos, se mostraram citotóxicos para algumas linhagens de células tumorais de mamíferos. Esses efeitos podem ser devidos à danificação no DNA, indução a apoptose e modificação da membrana, que é o mecanismo mais aceito, por se tratar de agentes citotóxicos de ação mais generalizada, sem muita especificidade (GONZALEZ-COLOMA et al., 2005).

O baccharin **(19)**, tricoteceno extraído de *Baccharis megapotamica*, se mostrou ativa contra leucemia e tumores do cólon em camundongos. O gênero *Baccharis* pertence à família Asteraceae e já foi relatada presença dos metabólitos diterpenoides, flavonoides e tricotecenos macrocíclicos nessa espécie, substâncias de interesse do Instituto Nacional do Câncer nos Estados Unidos, devido à sua importância no combate ao câncer e pela atividade antiviral apresentada (BUDEL e DUARTE, 2007).

Figura 13 - Representação estrutural do Baccharin extraído de *Baccharis megapotamica*



(19)

Fonte: adaptado de Budel e Duarte (2007)

Os compostos provenientes de metabolismo secundário de plantas também podem estar envolvidos nas funções alelopáticas e semioquímicas das plantas. Essas funções ecológicas são de grande importância, pois além desses compostos exercerem sua função ecológica, as espécies vegetais com substâncias químicas fitotóxicas despertam o interesse para isolamento e avaliação do seu potencial inseticida, para desenvolvimento de bioherbicidas (DIAS e DIAS, 2007).

2.5.1 Análise de citotoxicidade em células tumorais

A análise de citotoxicidade foi realizada pelo método do MTT, sendo este um dos métodos utilizados no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN et al., 1990). É um método rápido, sensível e barato, tendo sido descrito primeiramente por Mosman (1983). Este método é capaz de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula e trata-se de uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983). O estudo citotóxico pelo método do

MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE et al., 1996).

2.6 Atividade Inseticidas

Insetos praga são um dos grandes problemas na agricultura atual, tanto para os produtos estocados, quanto para os produtos em lavoura. Alguns dos problemas encontrados podem ser: perda de material na estocagem, na ordem de 9% nos países desenvolvidos e 22% nos países em desenvolvimento; ou contaminações desses alimentos por pragas, tanto na forma de insetos inteiros, partes de insetos ou excreções químicas e físicas que esses organismos podem produzir. Além disso, pode ocorrer o acúmulo de substâncias químicas nesses alimentos, uma vez que inseticidas químicos são usados como tentativa de controle das referidas pragas (PHILLIPS e THRONE, 2009).

Uma gama de produtos químicos sintéticos que visam o controle de insetos praga está disponível hoje para comercialização como, por exemplo, organofosforados, carbamatos, piretroides e os neonicotinoides e os fumigantes, tais como fosfina e brometo de metilo, e mostram-se de certa forma eficazes. No entanto, o alto índice de aplicação desses compostos na natureza pode causar grandes impactos ambientais, como contaminação do solo e desenvolvimento de cepas resistentes a tais produtos. Além disso, há restrições quanto ao uso desses compostos pela toxicidade aos organismos não alvos (NENAAH, 2014).

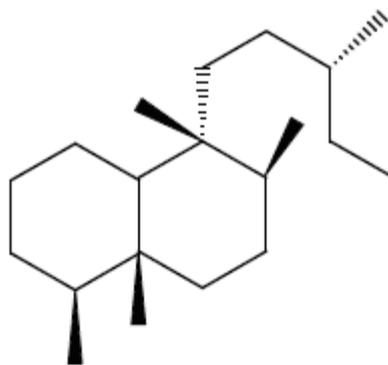
Uma dessas pragas são as formigas cortadeiras, de extrema relevância nas regiões tropicais e subtropicais, por causarem grandes perdas de produção na agricultura e silvicultura. Além dos problemas gerados para as plantações, essas formigas podem causar danos na infraestrutura do solo, reduzindo acesso às plantações, uma vez que diminui a acessibilidade de tratores e demais veículos de grande porte, pois o solo se torna instável. O uso de inseticidas muitas vezes não é eficaz, pois algumas populações de formigas apresentam resistência possibilitando o reestabelecimento da colônia (SANTOS, OLIVEIRA e SAMUEL, 2007).

Atta sexdens rubropilosa é uma formiga conhecida popularmente como cortadeira ou saúva que utiliza diversas espécies vegetais como substrato para a alimentação e cultiva um fungo, para manutenção de uma relação de simbiose. No Brasil, essas formigas ocorrem em todas as partes do país e são consideradas umas das principais pragas na agricultura neotropical. Por esse motivo, tem se tornado

alvo de pesquisa de diversos estudos com tentativa de desenvolver inseticidas biológicos (VERZA et al., 2006).

Alguns terpenos isolados de plantas da família Asteraceae, foram testados e demonstraram ação fagodeterrente contra um amplo espectro de insetos, sendo eles de adaptações alimentares divergentes. Trata-se de diterpenos clerodânicos (**20**), que possuem seletividade e produzem efeitos citotóxicos em células Sf9 de insetos. O estudo desenvolvido por Gonzalez-Coloma e colaboradores (2005), utilizou as espécies *Spodoptera littoralis* e *Leptinotarsa decemlineata* com a finalidade de averiguar essa atividade e encontrou resultados promissores.

Figura 14 - Representação estrutural do esqueleto de diterpenos clerodânicos



(20)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade tóxica dos extratos das folhas de *Piptocarpha rotundifolia* (Less). Baker (Asteraceae).

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a prospecção fitoquímica das folhas de *Piptocarpha rotundifolia*
- Obter o extrato bruto etanólico, e extratos fracionados hexânico, acetato etílico, diclorometânico e metanólico
- A identificar das substâncias isoladas dos extratos de *Piptocarpha rotundifolia*
- Verificar a toxicidade dos extratos das folhas de *Piptocarpha rotundifolia* no ensaio de toxicidade no microcrustáceo *Artemia salina*.
- Avaliar a citotoxicidade de extratos das folhas de *Piptocarpha rotundifolia* no ensaio de citotoxicidade em linhagens de células tumorais SF-295 (glioblastoma), PC-3 (próstata) e HCT-116 (cólon), além de verificar a viabilidade em linhagens de células normais L 919 (fibroblastos de camundongos).
- Avaliar a toxicidade de extratos das folhas de *Piptocarpha rotundifolia* em ensaio de toxicidade com as formigas *Atta sexdens rubropilosa*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local de realização dos testes

Os processos de coleta, preparo dos extratos, fracionamentos e isolamento de substâncias foram realizados na Universidade Estadual de Goiás, assim como os testes de toxicidade frente a *Artemia salina*.

Testes de identificação das substâncias por ressonância nuclear magnética foram realizados na Universidade Federal de Goiás.

Para os testes de citotoxicidade, as amostras foram encaminhadas para a Universidade Federal do Ceará que possui infraestrutura apropriada para realização desses testes.

Atividade inseticida frente as formigas *Atta sexdens rubropilosa* foi avaliada no laboratório do Centro de Insetos Sociais da Universidade Estadual de São Paulo campus de Rio Claro.

4.2 Materiais e Equipamentos utilizados

Os materiais utilizados para o desenvolvimento da pesquisa na Universidade Estadual de Goiás e alguns equipamentos utilizados para o desenvolvimento desta pesquisa são apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1 - Materiais usados para isolamentos dos compostos químicos

Material	Marca
Sílica gel 230 – 400 <i>mesh</i>	Macharey-Nagel
Diaion HP20	Sigma- Aldrich
Sephadex LH20	Sigma- Aldrich
Cromatofolhas de alumínio sílica gel 60 F ₂₅₄	Macharey-Nagel
Celulose Microcristalina D	Synth
Placas de vidro sílica gel (20 x 20) 60 UV254+365	Macharey-Nagel
Lâmpada UV (254 e 364 nm)	Vilber Loumat

Tabela 2 – Reagentes e solventes utilizados e suas marcas

Reagente / Solvente	Marca
Acetato de Etila	Anidrol, Neon e Dinâmina
Diclorometano	Anidrol, Neon e Dinâmina
Hexano	Anidrol, Neon e Dinâmina
Metanol	Anidrol, Neon e Dinâmina
Etanol	Anidrol, Neon e Dinâmina
Clorofórmio deuterado	Merck
Metanol deuterado	Merck
Vanilina	

Tabela 3 - Equipamentos utilizados e suas especificações

Equipamento	Marca
Estufa com circulação de ar	MA 035 - Marconi
Moinho de facas tipo cróton	Ma-580
Evaporador rotativo	TECNAL (TE 120)
Balança analítica	Mettler P163
Espectrômetro de RMN	Bruker/11,75 Tela (DQ-UFG) Advanced 3 – 500 MH

4.3 Coleta e identificação do material botânico

As folhas da planta *Piptocarpha rotundifolia* (Asteraceae) foram coletadas no Câmpus da Universidade Estadual de Goiás (UEG), no dia 18 de maio de 2015, segundo as coordenadas geográficas: latitude 16°22'49.4472" sul e longitude 48°56'41.28" oeste. Foram coletados 3,0 Kg de folhas.

A espécie foi identificada pela Prof^a. Dr^a. Mirley Luciene dos Santos. A exsicata do material vegetal foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Goiás (HUEG) sob o número de tombo 10513.

4.4 Obtenção dos Extratos

4.4.1 Obtenção do Extrato Etanólico de *Piptocarpha rotundifolia*

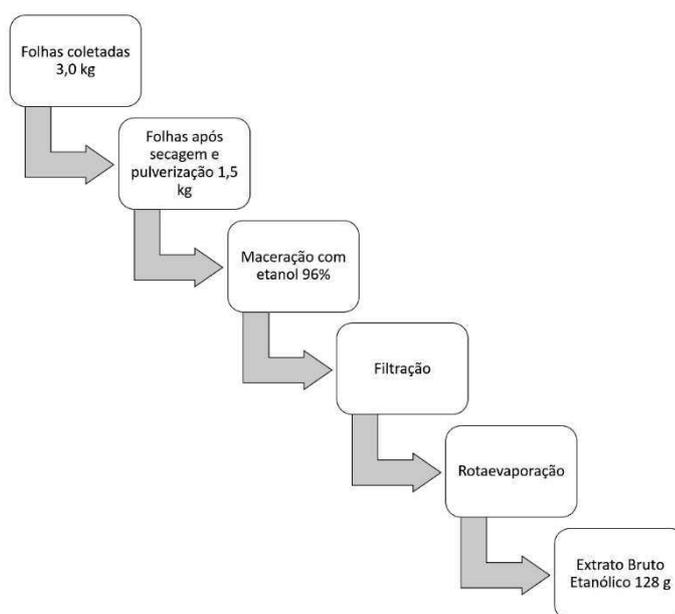
O material vegetal coletado (3,0 Kg de folhas), foi seco em estufa por 48 horas a 40°C, após processo de secagem foi realizado a moagem e obteve-se 1,5 kg de amostra pulverizada. Para obtenção do extrato bruto etanólico, esse material foi colocado em contato com álcool 96% para maceração, utilizando como metodologia uma adaptação do que foi proposto por Matos (2009) e Matos e Matos (1989).

Após 24 horas em contato com o material vegetal, o álcool foi separado da matriz vegetal por filtração e o produto proveniente das extrações foi então recolhido e evaporado em rotaevaporador, esse processo se repetiu até obtenção do extrato bruto etanólico. Foram utilizados aproximadamente 15 litros de solvente durante o processo de extração, solvente esse que após rotaevaporado resultou na obtenção de 128 gramas de extrato bruto etanólico (PRFEE).

Foram retiradas 20 gramas de extrato bruto etanólico para os testes biológicos e os demais 108 gramas foram incorporadas a celulose microcristalina D e particionadas usando a ordem eluotrópica dos solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol.

O fluxograma abaixo demonstra o processo para obtenção do extrato etanólico.

Figura 15 - Fluxograma de obtenção do extrato etanólico de *P. rotundifolia*

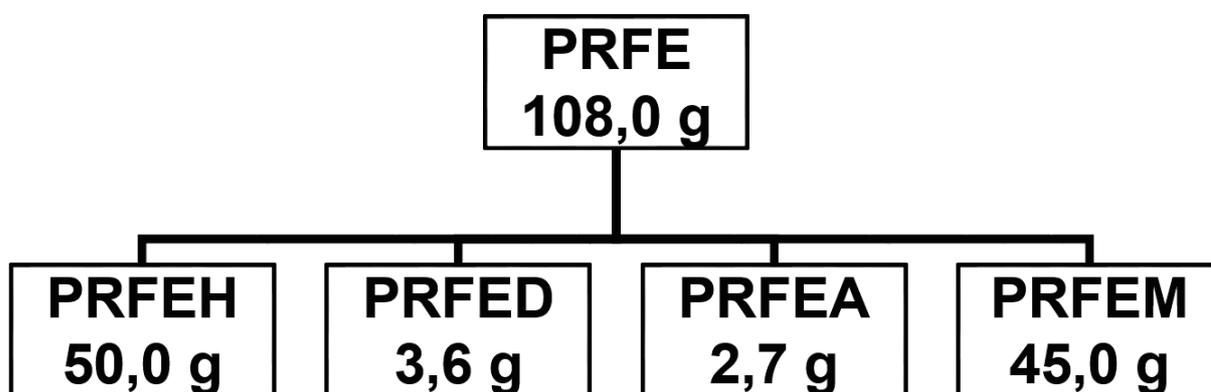


4.4.2 Fracionamento do extrato etanólico

Foi incorporado ao extrato bruto etanólico (PRFEE) celulose microcristalina D, essa mistura foi colocada em funil de buchner e um sistema de filtração à vácuo foi montado. O fracionamento foi realizado passando os solventes por ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol.

Foram obtidos aproximadamente 15 litros de cada um dos solventes que passaram pelo sistema de filtração, esses solventes foram rotaevaporados para obtenção dos extratos fracionados: PRFEH (*Piptocarpha rotundifolia* folha extrato hexânico), PRFED (*Piptocarpha rotundifolia* folha extrato diclorometânico), PRFEA (*Piptocarpha rotundifolia* folha extrato acetato de etila) e PRFEM (*Piptocarpha rotundifolia* folha extrato metanólico). O fluxograma de obtenção dos extratos fracionados está demonstrado abaixo:

Figura 16 - Rendimento os extratos de *Piptocarpha rotundifolia*



O rendimento está demonstrado na tabela 4, os extratos diclorometano (3,6 g) e acetato de etila (2,7 g), que possuem os compostos de polaridade intermediária mostraram um rendimento muito baixo, já o extrato hexano com um rendimento de (50g) possui compostos apolares e o metanol (45 g) os compostos polares.

Tabela 4 - Rendimento dos extratos fracionados a partir do extrato etanólico (PRFEE)

PRFEE	SOLVENTE	MASSA OBTIDA	% EM RELAÇÃO AO EXTRATO BRUTO (PRFEE)	CÓDIGO
108 g	Hexano	50 g	46,3	PRFEH
	Diclorometano	3,6 g	3,3	PRFED
	Acetato de Etila	2,7 g	2,5	PRFEA
	Metanol	45 g	41,6	PRFEM

4.5 Isolamento de constituintes químicos

Para obter a separação dos compostos foi empregado nas colunas fases móveis de acordo com a característica do extrato ou fração que seria alvo da separação, dessa forma foi usado hexano – acetato de etila, diclorometano – metanol, metanol – água iniciando sempre com uma porcentagem menor do reagente mais polar e o gradiente da coluna foi sendo alterado ao longo da sua eluição, em ordem crescente de polaridade.

Após realização dos pré-fracionamentos, também foi utilizado, como auxílio em todas as técnicas, a cromatografia em camada delgada (CCD) para a triagem dos compostos, com o intuito de avaliar a separação e ter um indicativo da pureza das substâncias isoladas após cada técnica cromatográfica empregada.

4.5.1 Isolamento da substância PRT- 01 (Lupeol)

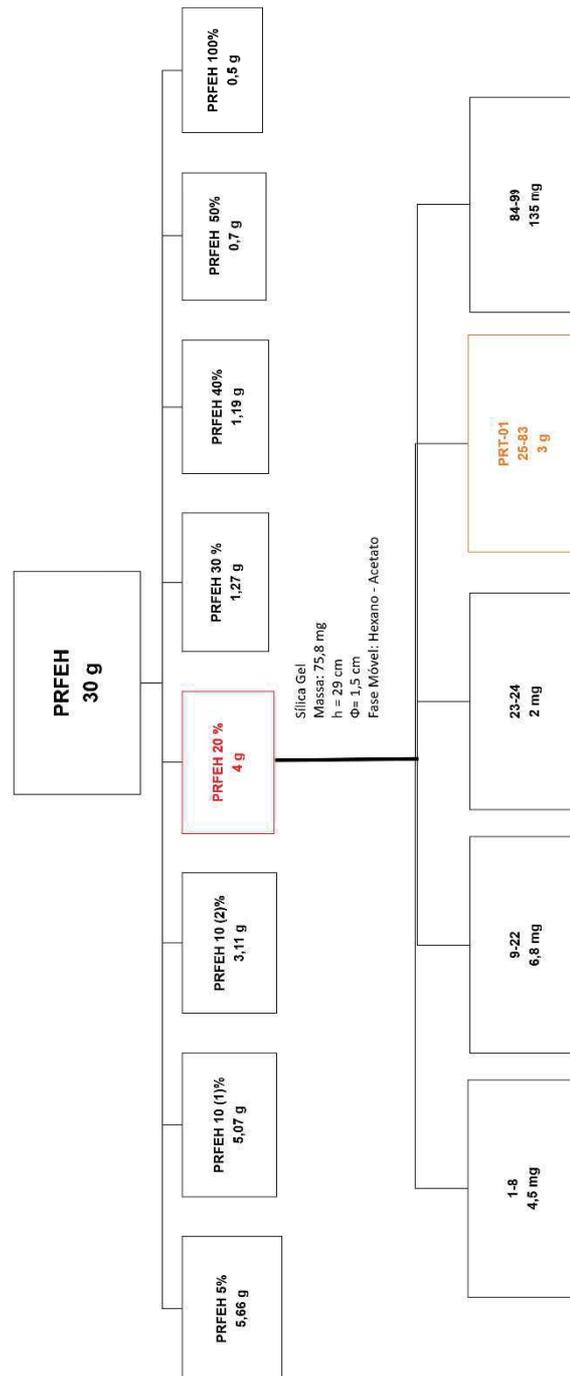
Foram pesados 30 gramas do extrato hexânico (PRFEH) e uma coluna (h = 15 cm e Φ = 5 cm) foi preparada, foi utilizado sílica gel como fase estacionária e um gradiente crescente de polaridade de solventes hexano e acetato de etila como fase móvel. Após a eluição dessa coluna e agrupamento das frações semelhantes obteve-se as seguintes frações: PRFEH 5%, PRFEH 10 (1) %, PRFEH 10 (2) %, PRFEH 20%, PRFEH 30%, PRFEH 40%, PRFEH 50%, PRFEH 100%.

Após esse fracionamento foram feitas triagens com CCD, a fase móvel empregada foi hexano e acetato de etila e a fração PRFEH 20% (4,0 g) apresentava

manchas com maior resolução, ou seja, R_f mais distantes, dessa forma essa fração foi submetida a novo processo cromatográfico, coluna de sílica gel ($h = 11 \text{ cm}$ e $\Phi = 5 \text{ cm}$) usando fase móvel com gradiente de polaridade hexano e acetato de etila. Com esse processo conseguiu-se cinco novas frações sendo que a fração (25-83) se trata de uma substância de cor branca com massa (3 g).

O isolamento pode ser observado de acordo com o fluxograma abaixo (Figura 17):

Figura 17 - Fluxograma de isolamento da substância PRT – 01 (Lupeol)

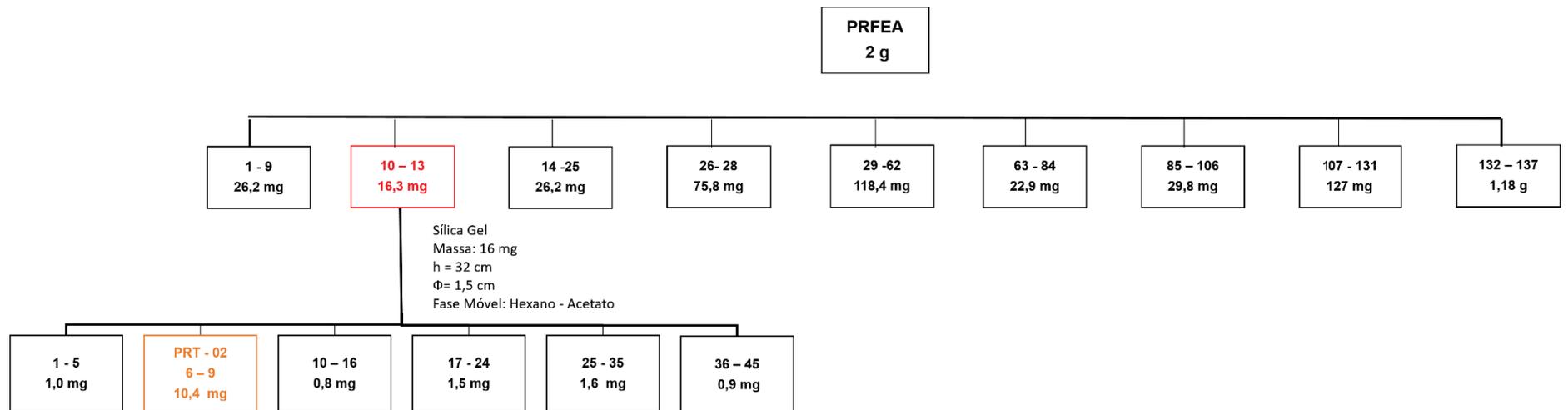


4.5.2 Isolamento da substância PRT- 02 (Lupeol Acetato)

Foi pesado 2 g do extrato acetato de etila (PRFEA) foi fracionado utilizando uma coluna de sílica gel ($h = 10$ cm e $\Phi = 5$ cm), a fase móvel utilizada foi um gradiente crescente de polaridade de hexano e acetato de etila, resultando em 137 frações. Com auxílio de cromatografia em camada delgada usando fase móvel hexano e acetato de etila essas frações foram sendo reunidas de acordo com o fator de retenção (R_f) resultando em 9 frações.

A partir desses resultados com análise realizada por cromatografia em camada delgada, a fração resultante da junção dos frascos 10-13 com massa 16,3 mg foi novamente fracionada em coluna de sílica ($h = 32$ cm e $\Phi = 1,5$ cm) e fase móvel hexano e acetato de etila com aplicação do gradiente crescente de polaridade obtendo-se 5 frações das quais a (6-9) com massa 10,4 g é o composto isolado PRT – 03 conforme demonstrado no fluxograma a seguir (Figura 18).

Figura 18 - Fluxograma de isolamento das substâncias PRT – 02 (Lupeol Acetato)



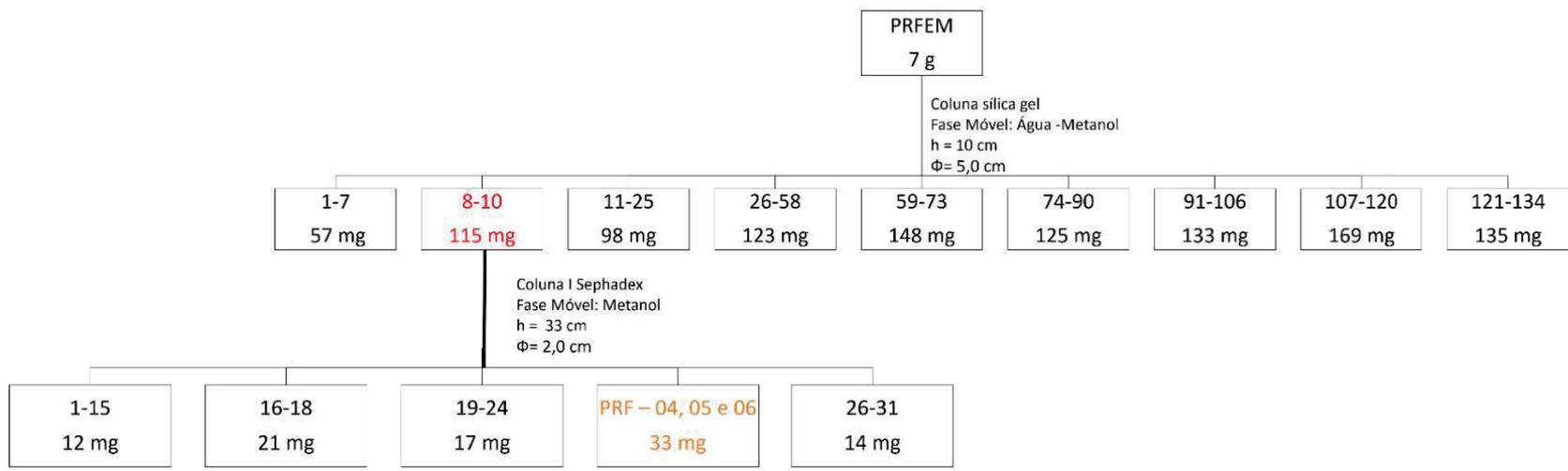
4.5.3 Isolamento da mistura de flavonoides PRF-03 e PRF-04 e PRF-05

O extrato metanólico (PRFEM), 7g foi pesado e inicialmente fracionado usando uma coluna com fase estacionária diaion com as dimensões ($h = 32$ cm e $\Phi = 2,5$ cm), e como fase móvel água e metanol usando gradiente inverso de polaridade chegando no final da eluição com 100% de metanol. Desse fracionamento obteve-se 195 frações os quais foram agrupadas de acordo com a polaridade dos compostos e no final foi obtido 9 frações. A sétima fração (8-10) com massa 115 mg, passou por novo processo de separação, em uma coluna de sephadex ($h = 33$ cm e $\Phi = 2$ cm) e a fase móvel utilizada foi 100%.

A coluna da fração 8-10 resultou em 5 frações, a quarta delas trata-se de uma mistura que propomos ser uma mistura de flavonoides PRF – 04, PRF – 05 e PRF – 06, com massa 33 mg.

O isolamento dessas substâncias se deu conforme fluxograma demonstrado abaixo (figura 19):

Figura 19 - Fluxograma de isolamento da mistura de flavonoides



4.6 Prospecção fitoquímica

A pesquisa e identificação dos compostos flavonoides baseiam-se em reações características do núcleo fundamental benzopirano e em reações características de hidroxilas fenólicas. Para a reação de Shinoda, é necessário preparar uma solução alcoólica da amostra que é colocada em contato com fita de magnésio e ácido clorídrico. A reação Oxalo-bórica é realizada com ácido bórico 3% e luz ultravioleta e a reação com ácido sulfúrico concentrado necessita de posterior avaliação do resultado luz ultravioleta. Já para a determinação da presença de compostos fenólicos totais utiliza reações com hidróxidos alcalinos hidróxido de sódio 20% e cloreto de alumínio 5% e cloreto férrico 4,5%.

Para heterosídeos antraquinônicos é possível verificar a presença ou ausência por meio da reação de Bornträger indireta, que consiste na utilização de ácido clorídrico, éter etílico e amônia 50%. Após realização desse teste ocorre formação de fenatos de amônia caso heterosídeos antraquinônicos estejam presentes na amostra.

As cumarinas são compostos químicos que apresentam fluorescência natural, geralmente de cor azul. Após preparo da amostra em meio alcalino é formado o ácido cis-o-hidroxicinâmico que pode ser observado em luz UV e que apresenta fluorescência esverdeada, dessa forma é possível verificar presença ou ausência de cumarinas.

Para taninos foi realizada reação com gelatina, reação com alcaloides, reação com hidróxidos alcalinos e reação com sais metálicos. Os alcaloides podem ser identificados pelos reagentes iodados que são capazes de precipitar os alcaloides de soluções ácidas, podem ser citados os reativos de Mayer, Dragendorff, Bouchardat e Reativo de Bertrand. Reagentes a base de ácidos orgânicos também precipitam alcaloides tais como o Reativo de Hager e o Ácido Tânico.

Os compostos terpênicos respondem a reação de Liebermann-Burchard, reação de Pesez, Reação de Keller-Kiliani e reação de Kedde. Um indicativo da presença de espuma, pode ser verificado pela presença de uma espuma duradoura em uma solução da amostra, sendo aplicado para essa investigação o teste de índice de espuma.

4.7 Ensaio de toxicidade com *Artemia salina* Leach

O ensaio foi realizado segundo a metodologia de Molina-Salinas e Said-Fernández (2006), com algumas adaptações. Foi empregado o meio de água marinha sintética preparado com a dissolução de sal marinho (40 g.L^{-1}) em água destilada, suplementado com extrato de leveduras (6 mg.L^{-1}) e esterilizado em autoclave. O pH foi ajustado a 8,5 com solução de Na_2CO_3 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.

Os cistos (100 mg) foram incubados por 36 horas em 1 L do meio com iluminação natural, temperatura ambiente ($20\text{-}25^\circ\text{C}$) e oxigenação constante, a fim de promover a eclosão dos cistos e liberação dos náuplios. Após a eclosão, os náuplios foram atraídos por fonte de luz, pipetados e transferidos para uma placa de Petri com 10 mL de meio fresco, para que então fossem transferidos para microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços. Os inóculos foram padronizados com 10 ± 1 náuplios por cada poço.

O extrato etanólico das folhas de *P. rotundifolia* e demais extratos fracionados foram solubilizados em solução salina (1 mL) e 5 % de DMSO (dimetilsulfóxido) nas concentrações de 4000, 2000, 1000, 500, 250 e $125 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ e, em seguida, foram adicionados aos poços das microplacas, apresentando concentrações finais de 2000, 1000, 500, 250, 125 e $62,5 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$. Foram incluídos controles de viabilidade e de letalidade, com diluições de $100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, água marinha sintética e DMSO 2,5% (concentração máxima obtida após diluição seriada dos extratos). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas independentes.

O cálculo das CL_{50} foi realizado pela contagem de náuplios mortos e vivos após 24h de exposição aos compostos ($20\text{-}25^\circ\text{C}$) pelo método gráfico para dose-resposta – *Probit*, no programa *Statplus®* versão 5.7.8 – 2014 *professional* (AnalystSoft), a partir da regressão linear obtida da relação entre a porcentagem de náuplios mortos e a concentração do extrato bruto e das suas frações.

Para a classificação do nível de toxicidade, foi utilizado o critério proposto por Nguta et al. (2011). Os autores consideram toxicidade forte para compostos com valores de CL_{50} de até $100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, toxicidade moderada para CL_{50} entre 100 e $500 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, toxicidade baixa para CL_{50} entre $500 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1000 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, e não tóxico para valores acima de $1000 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.8 Avaliação da Atividade Citotóxica

4.8.1 Linhagens celulares e manutenção do cultivo celular

Para os ensaios biológicos, foram utilizadas as linhagens tumorais SF-295 (glioblastoma), PC-3 (próstata) e HCT-116 (colon) para células controle, foi utilizada a linhagem normal L919 fibroblastos de camundongo, essas células foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA). As linhagens celulares foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de antibióticos e incubadas em estufa à 37 °C, 5% CO₂.

As análises foram realizadas no Laboratório de Oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará (UFC), sob responsabilidade do professor Dr. Manoel Odorico de Moraes, Dr^a. Cláudia do Ó Pessoa e doutoranda Andréia Felinto Moura.

As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril, seguindo o protocolo de análise do laboratório, o extrato bruto de *P. rotundifolia* foi testado na concentração única de 50 µg.mL⁻¹, enquanto que as frações e o composto isolado na concentração única de 25 µg.mL⁻¹.

As células tumorais foram plaqueadas nas concentrações 0,1 x 10⁶ cél.mL⁻¹ para as linhagens SF-295 e PC-3, e 0,7 x 10⁵ cél.mL⁻¹ para a linhagem HCT-116. Após 24 horas de incubação, as células foram tratadas com os compostos-teste e incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium) a 1%, e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida, após dissolução do precipitado em 150 µL de DMSO puro, em espectrofotômetro de placa a 595nm.

Os experimentos foram analisados segundo a média ± desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento (IC) celular, usando o programa *GraphPad Prism*.

A partir dos valores de IC (Inibição de Crescimento) apresentados pelos compostos sobre as linhagens tumorais testadas, pode-se direcionar as amostras mais promissoras para teste de viabilidade baseado na CI₅₀ (Concentração Inibitória de 50% da população). Utiliza o mesmo método descrito acima com o controle de células normais, linhagem L919 (fibroblasto murinho), e como controle positivo um medicamento antitumoral de mercado.

Para essa determinação de CL_{50} , são utilizadas diluições para obter concentrações que variaram de 25 $\mu\text{g/mL}$ a 0,19 $\mu\text{g/mL}$ tanto das amostras a serem testadas quanto do padrão / controle.

4.9 Ensaio de toxicidade dos extratos em *Atta sexdens rubropilosa*

4.9.1 Coleta e manutenção das formigas utilizadas nos bioensaios

As operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, com massa corpórea variando de 15 a 25 mg, foram coletadas de formigueiros mantidos em laboratório no Centro de Estudos de Insetos Sociais - UNESP - *Campus* Rio Claro. Para a manutenção desses formigueiros diariamente foram oferecidas folhas de *Eucalyptus* ssp. e flocos de *Avena sativa* L. e, ocasionalmente, outras plantas palatáveis às saúvas como *Hibiscus* sp., *Ligustrum* sp. ou folhas e pétalas de roseiras (Figura 19).

Para a manutenção das formigas isoladas do formigueiro, conseqüentemente na ausência do fungo simbiote e de folhas considerados seus alimentos foi utilizada uma dieta artificial sólida, preparada com 1,25 g de glicose, 0,25g de peptona bacteriológica, 0,025g de extrato de levedura e 0,25g de ágar bacteriológico, dissolvidos em 25 mL de água destilada. Após a mistura das substâncias, a dieta foi levada ao forno de microondas para melhor solubilização dos ingredientes e, posteriormente autoclavada a 120°C e 1atm por 15 minutos. Em seguida foi vertida ainda quente em placas de Petri de 10 cm de diâmetro, previamente esterilizadas em estufa a 180° C e, após o resfriamento e a solidificação, foi embrulhada em filme de PVC e mantida em geladeira, sendo utilizada nos dias subseqüentes, durante o período do experimento (BUENO et al., 1997).

Figura 20 - Vista geral do formigueiro de *Atta sexdens rubropilosa* mantido no laboratório do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – IBRC - UNESP



Fonte: CEIS (2016)

4.9.2 Bioensaios para determinação da toxicidade

Em todos os bioensaios as formigas foram retiradas dos formigueiros e distribuídas em lotes de 50 operárias para cada concentração testada, divididas em grupos de 10 formigas e mantidas em 5 placas de Petri de 10 cm de diâmetro forradas com papel filtro (Figura 20). Essas placas foram colocadas em estufa para BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) com temperatura de 24°C + 1°C e umidade relativa acima de 70%. Os bioensaios foram examinados diariamente, para a retirada e anotação do número de formigas mortas, durante um período de 25 dias.

A dieta para manutenção das formigas (controle) ou dieta acrescida dos ingredientes ativos (tratamentos) foi colocada em papel alumínio na quantidade aproximada de 0.4 a 0.5g/placa. A cada 24 horas a dieta foi renovada e sempre que necessário, os papéis filtro (que geralmente são cortados pelas formigas) foram trocados, a fim de se evitar o desenvolvimento de fungos contaminantes bem como manter o ambiente limpo para as formigas.

Foi estipulado um período máximo de 25 dias para a realização dos experimentos de toxicidade, levando-se em conta o período normal de sobrevivência das formigas mantidas com dieta artificial (BUENO et al., 1997).

Figura 21 - Operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento com o ingrediente ativo incorporado em dieta artificial



Fonte: CEIS (2016)

4.9.3 Bioensaio I: incorporação em dieta artificial

Os extratos *Piptocarpha rotundifolia* foram incorporados na dieta utilizando o método *dry-mix*, que consiste em acrescentar o princípio ativo à glicose e aos demais ingredientes secos da dieta e, posteriormente, à água destilada. Neste caso, não é utilizado solvente. O extrato foi incorporado na dieta por diluição e depois foi autoclavado com todo o material.

4.9.4 Análise dos dados de toxicidade

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*”, com nível de significância de 5% (ELANDT - JOHNSON et al., 1980), utilizando-se o *software Graph-Pad*, aplicativo Prisma 3.0.

Em seguida, procedeu-se a comparação das curvas de sobrevivência de formigas submetidas aos tratamentos com extratos *Piptocarpha rotundifolia* e a curva do controle dieta pura.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Prospecção Fitoquímica

O conhecimento prévio de quais classes de compostos químicos estão presentes nas espécies vegetais é essencial para fornecer informações prévias da constituição química do material vegetal. Após obtenção da informação sobre a presença ou ausência de determinados grupos químicos, o estudo fitoquímico e biológico é direcionado (LÔBO et al., 2010).

Os testes utilizados para a prospecção são metodologias propostas por Costa (2001), Matos (2009), Matos & Matos (1989) e Simões et al. (2010) para identificação de grupos de metabólitos secundários através de reações químicas. Os compostos químicos foram separados em três grandes grupos de acordo com sua rota de síntese pelo metabolismo da planta: compostos fenólicos (fenois simples, cumarinas, flavonoides, antraquinonas e taninos); compostos nitrogenados (alcaloides) e terpenos (heterosídeos cardioativos e saponinas).

Para determinação da presença de flavonoides foi possível verificar na reação de Shinoda o aparecimento de uma coloração vermelha, na Oxalo-bórica e na reação com ácido sulfúrico concentrado o produto da reação foi exposto a luz UV e foi possível observar uma fluorescência amarelo-esverdeada. Para a determinação da presença de compostos fenólicos totais foram aplicadas as reações com hidróxidos alcalinos com desenvolvimento de uma coloração vermelha na amostra, a reação com cloreto de alumínio, onde a amostra ao ser observada na luz UV apresentava fluorescência e reação com cloreto férrico onde a amostra apresentou uma coloração marrom avermelhada.

Os heterosídeos antraquinônicos também estavam presentes na amostra pois possível verificar uma coloração rosa ao final da reação de Bornträger indireta. As cumarinas foram observadas pela presença de fluorescência em luz UV após preparo da amostra em meio alcalino e extração com éter.

Para taninos foi realizada reação com gelatina, reação com alcaloides, reação com hidróxidos alcalinos e reação com sais metálicos onde foi possível verificar em todas as reações a formação de precipitado o que determina a presença de taninos na amostra.

Os alcaloides não estão presentes nas folhas dessa espécie vegetal uma vez que não houve formação de precipitado com os reagentes de Mayer, Dragendorff, Bouchardat e Reativo de Bertrand, Reativo de Hager e ácido tânico. Segundo a metodologia utilizada, quando alcalóides entram em contato com esses reagentes o produto da reação é um precipitado com uma cor característica para cada uma das reações, o que não foi observado em nenhum desses testes.

Foi possível observar a formação de uma cor castanho ao final da reação de Liebermann-Burchard e aparecimento de fluorescência verde-amarelada na reação de Pesez, esses dois testes evidenciam a presença de compostos terpênicos, que possuem núcleos esteroides, tais como heterosídeos. A reação Keller-Kilian se mostrou positiva apresentando uma coloração azul-esverdeada, demonstrando que anéis lactônicos pentacíclicos estão presentes na amostra. Na reação de Kedde um vermelho violeta foi desenvolvido, confirmando a presença de desoxiaçúcares.

As saponinas não estão presentes na amostra pois não foi gerada espuma na realização do teste de índice de espuma.

Tabela 5 - Resultados da prospecção fitoquímica de *Piptocarpha rotundifolia*

Metabólitos	Reação de caracterização	Resultados
Flavonoides	Shinoda, oxalo-bórica, ácido sulfúrico, hidróxido de sódio, cloreto de alumínio, cloreto férrico e hidróxido de potássio	+
Taninos	Gelatina, acetato de cobre e cloreto férrico	+
	Sulfato de quinino e brucina	-
Alcaloides	Ácido tânico, Mayer, Dragendorff, Bouchardat, Bertrand e Hager	-
Esteroides e triterpenoides	Pesez, Keller-Kilian e Liebermann-Burchard	+
	Kedde	-

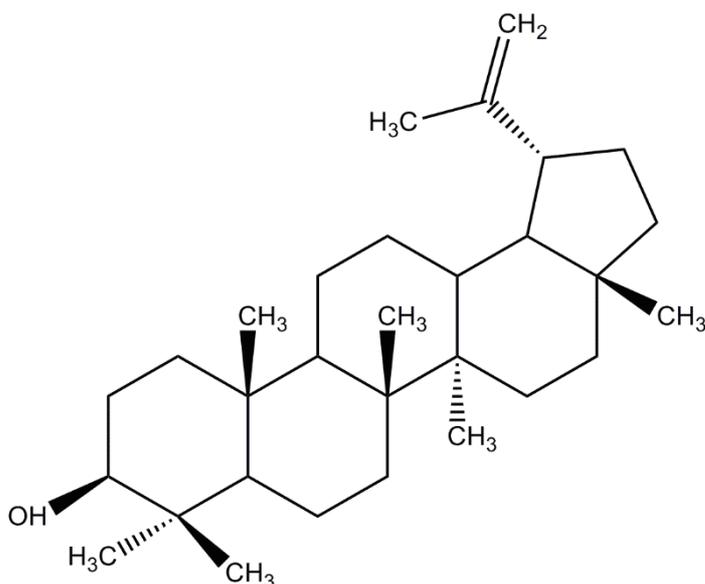
Antraquinonas	Bornträger Indireta	+
Cumarinas	Hidróxido de sódio	+
Saponinas	Índice de espuma	-

5.2 Isolamento das substâncias

Para fracionamento dos extratos e isolamento dos constituintes químicos de *Piptocarpha rotundifolia* foram utilizados métodos de cromatografia em coluna (CC) de sílica gel com o fundamento de separação por adsorção, coluna com diaion com o princípio de separação por solubilidade, coluna de sephadex com a separação dos compostos por peso molecular e cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) como fases estacionárias.

Após isolamento de substâncias, foi possível propor sua estrutura de acordo com os dados obtidos com as análises de ressonância nuclear magnética, junto com a comparação desses dados com a literatura. As estruturas propostas estão demonstradas abaixo:

5.3 Determinação estrutural das substâncias isoladas

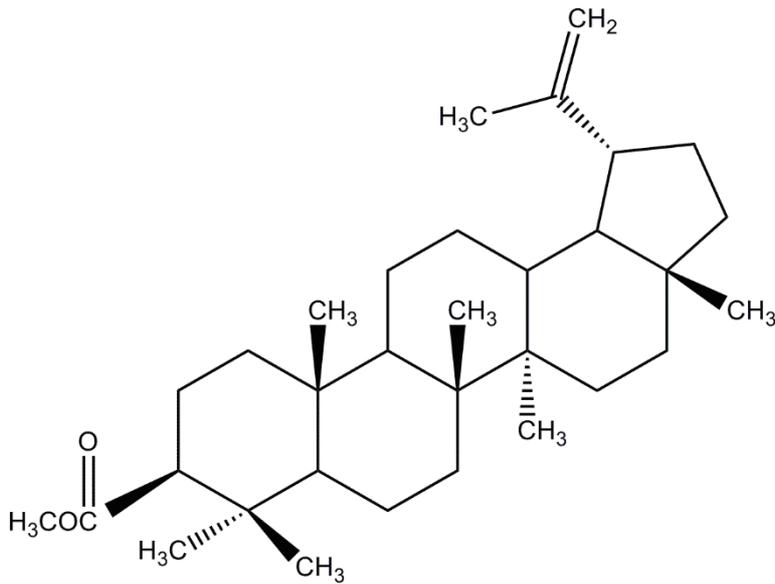


Lupeol (PRT – 01)

Massa: 3 g

Isolamento: p.43

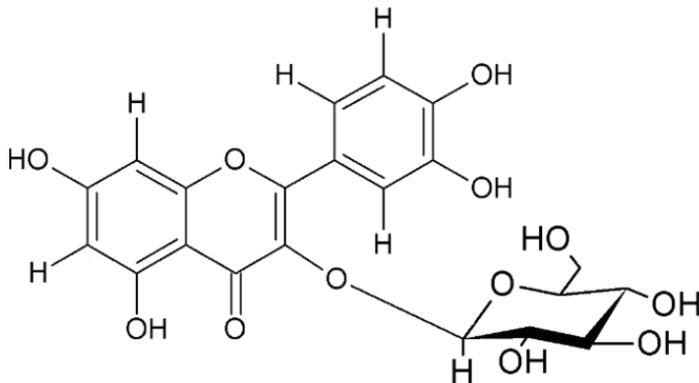
Identificação: p.59


Lupeol Acetato (PRT – 02)

Massa: 10,4 mg

Isolamento: p. 44

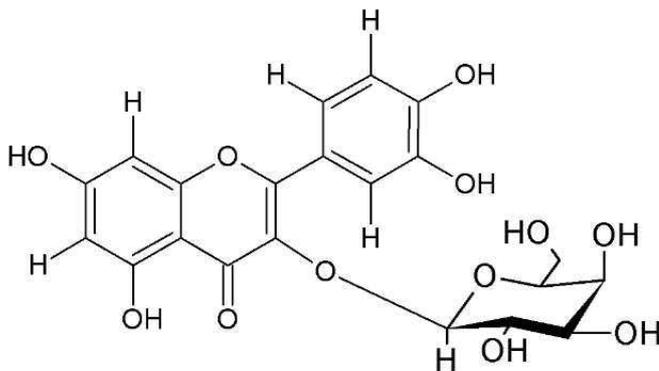
Identificação: p.64


Flavonoide 1 (PRF – 03)

Massa: -

Isolamento: p. 46

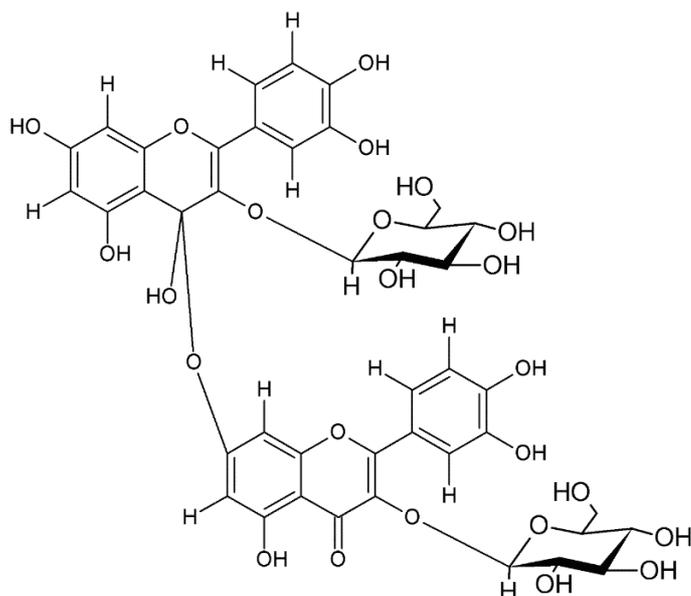
Identificação: p.69


Flavonoide 2 (PRF – 04)

Massa: -

Isolamento: p. 46

Identificação: p.69


Flavonoide 3 (PRF – 05)

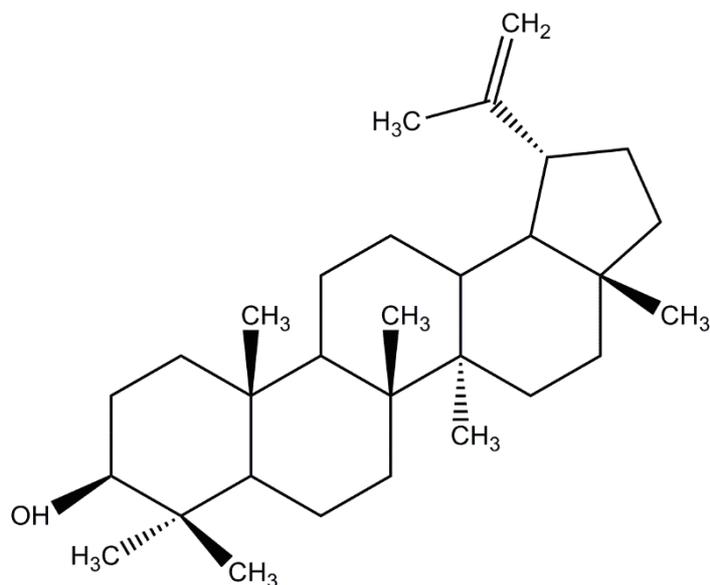
Massa: -

Isolamento: p. 46

Identificação: p.69

5.3.1 Identificação da substância PRT – 01 (Lupeol)

O isolamento da substância foi realizado a partir do extrato hexânico (PRFEH) o isolado se apresentou na forma de um sólido branco, com massa de 3,0 g. Para elucidação desses compostos a amostra foi analisada por ressonância nuclear magnética (RMN) utilizando técnicas de ^1H e ^{13}C comparando com dados da literatura.


PRT – 01

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 24) foi possível observar 30 sinais de ressonância de carbonos entre 14.570 e 150.936 ppm, de acordo com esses sinais e com dados da literatura foi possível propor que se tratava de um triterpeno pentacíclico. A elucidação foi possível ao comparar os dados obtidos com os dados de autores que isolaram triterpenos a partir de plantas.

Foi possível observar deslocamento químico em δ 150,9 e δ 109,3 é característico do grupo olefínico, ou seja, ligação dupla entre os carbonos 20 e 29. Observou-se também sinal referente ao carbono carbinólico C-3 que ressonou em δ 79,0 (SHOLICHIN, et al., 1980); (CURSINO, et al., 2009).

No espectro de RMN ^1H (Figura 25) observou-se 7 sinais correspondentes a metilas, que são apresentados nos espectros de RMN de ^1H (500 MHz) entre 0,8 e 1,7 ppm, que são apresentados na forma de simpletos e que foram encontrados com os dados da amostra com os seguintes sinais δ 1,68, δ 1,02, δ 0,96, δ 0,94, δ 0,82, δ 0,78, δ 0,76. Dados espectrais bastante semelhantes foram encontrados por Cursino, (2009) que isolou Lupeol da espécie vegetal *Minquartia guianensis*, Oleaceae.

Os sinais encontrados em δ 4,68 s e 4,56 δ são correspondentes aos dois H da ligação dupla terminal (H 20 – H29), outro sinal característico pode ser observado com o *dd* em 3,19 δ ($J= 11,4$ e $4,9$ Hz) referente ao H₃.

Figura 22 – Estrutura do Lupeol (PRT – 01)

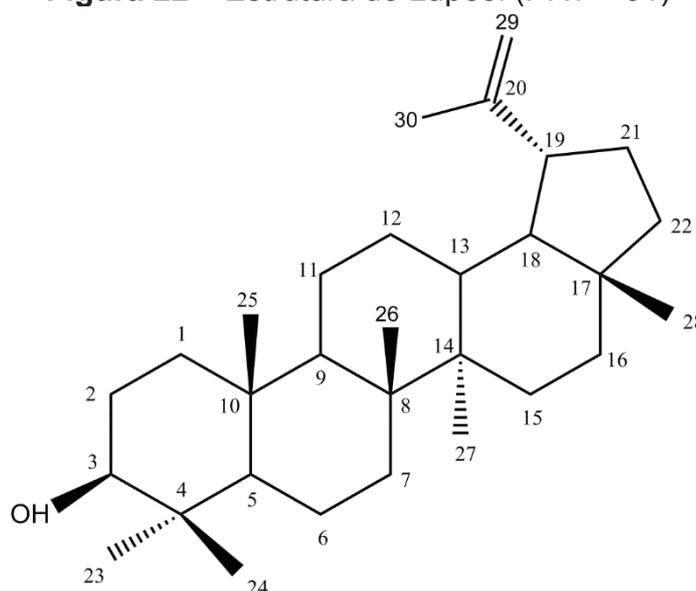


Tabela 6 - Dados de RNM ^{13}C da substância **PRT – 01** (CDCl_3 500 MHz) comparados com dados da literatura (Sholichin e colaboradores, 1980)

Posição do C	Observado	Sholichin e Colaboradores (1980).	Posição do C	Observado	Sholichin e Colaboradores (1980).
C 1	38,7	38,7	C 16	35,6	35,6
C 2	27,4	27,5	C 17	43,0	43,0
C 3	79,0	79,0	C 18	48,0	48,0
C 4	38,8	38,9	C 19	48,3	48,3
C 5	55,3	55,3	C 20	150,9	150,9
C 6	18,3	18,3	C 21	29,8	29,9
C 7	34,3	34,3	C 22	40,0	40,0
C 8	40,8	40,9	C 23	28,0	28,0
C 9	50,4	50,5	C 24	15,3	15,3
C 10	37,1	37,2	C 25	16,1	16,1
C 11	20,9	21,0	C 26	16,0	16,0
C 12	25,1	25,2	C 27	14,5	14,6
C 13	38,0	38,1	C 28	18,0	18,0
C 14	42,8	42,9	C 29	19,3	19,3
C 15	27,4	27,5	C 30	109,3	109,3

Figura 23 - Espectro de RMN ^{13}C da substância **PRT - 01** (CDCl_3 , 500 MHz)

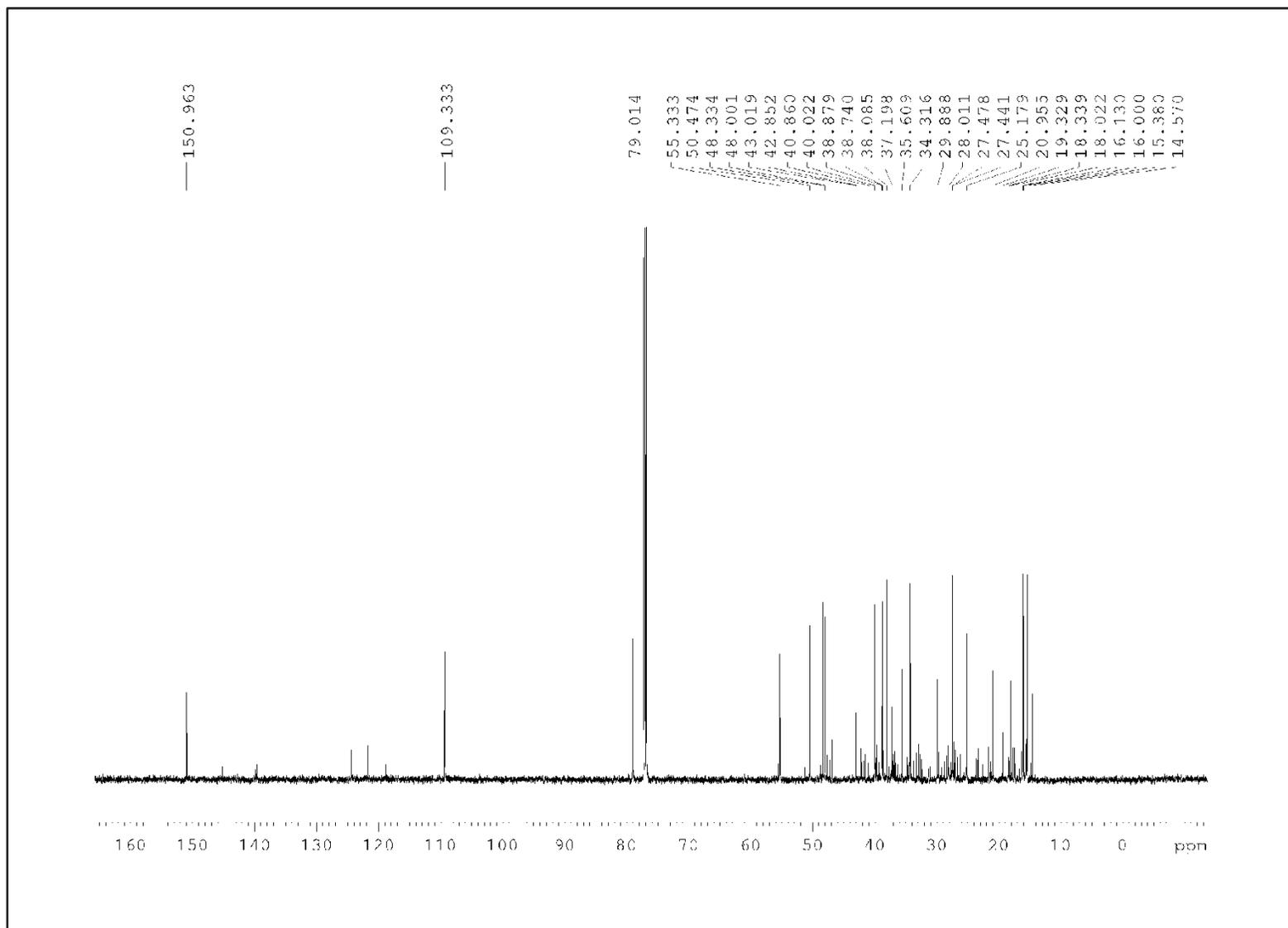
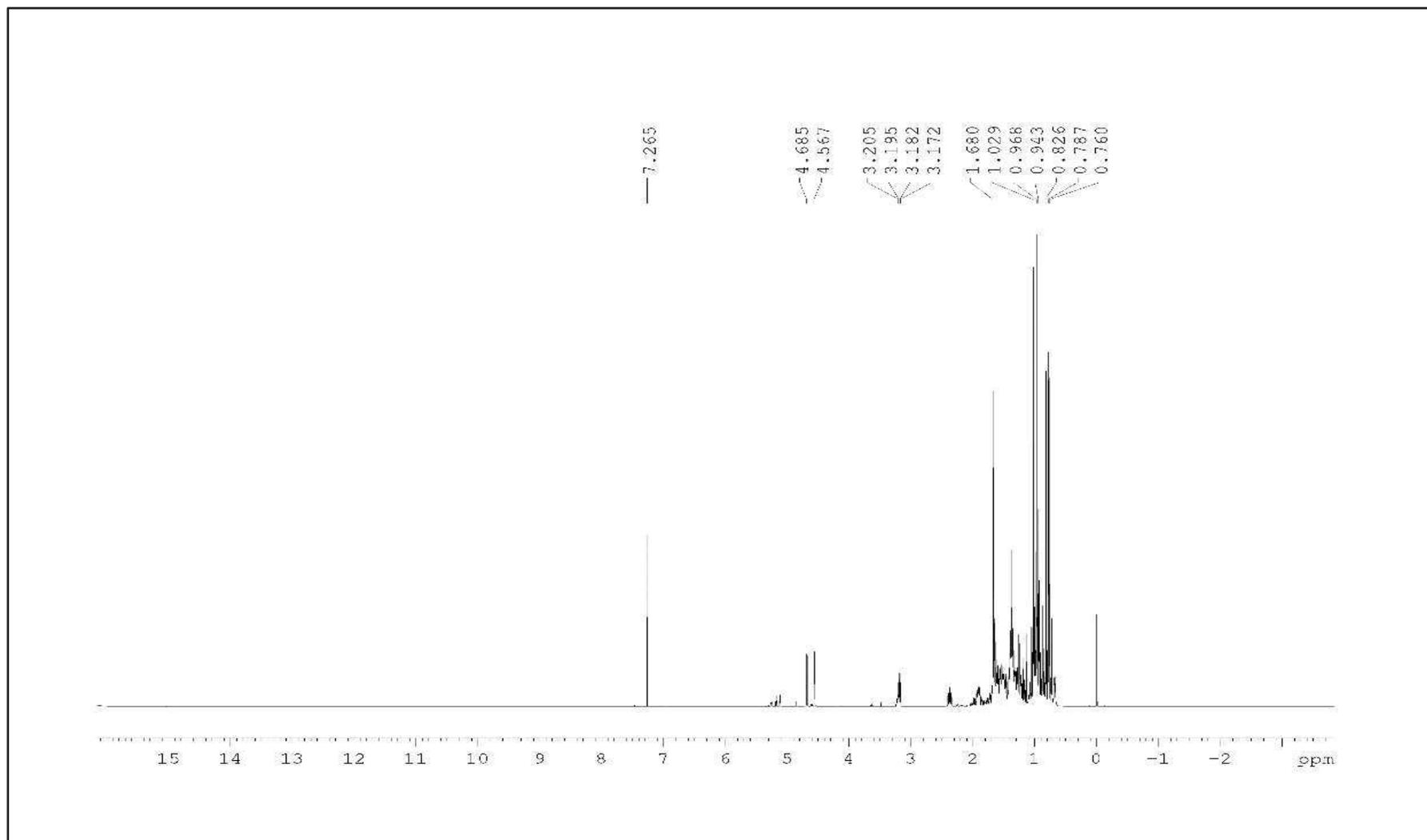


Figura 24 - Espectro de RMN ^1H da substância PRT - 01 (CDCl_3 , 500 MHz)

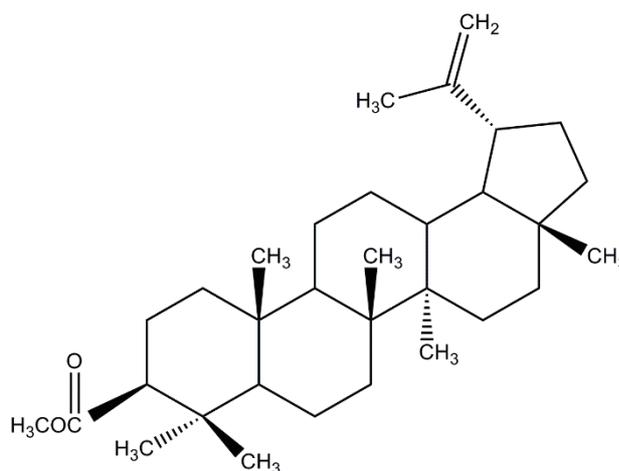


Com a análise dos espectros de ressonância nuclear magnética ^1H e ^{13}C foi possível identificar que o composto isolado, tratava-se de um triterpeno. Ao analisar esses dados em conjunto com a literatura foi possível definir a substância como o Lupeol.

Triterpenos estão presentes em plantas e tem despertado interesse dos estudiosos nos últimos anos devido a descoberta do seu potencial farmacológico, com inúmeras atividades biológicas, tais como: anti-inflamatório, antileprótico, antibacteriano, antifúngico, antiviral, antitumoral, diurético, giardicida e inibidores da enzima acetilcolinesterasicas (BANDEIRA et al., 2007).

No entanto, quando essa substância foi submetida a avaliação de atividade citotóxica, a mesma não apresentou esse tipo de atividade biológica em nenhuma linhagem celular conforme demonstrado na tabela 11 pela amostra número 15 é referente a fração de lupeol isolada de *Piptocarpha rotundifolia*.

5.3.2 Identificação da substância PRT - 02 (Lupeol Acetato)



PRT - 02

De acordo com o composto encontrado por David (2004), pode-se comparar os dados espectrais da literatura com os dados obtidos com análise de ressonância nuclear magnética (RMN) da amostra PRT - 03, e definir que se trata do Lupeol Acetato, uma vez que se trata de outro triterpeno também foi isolado e identificado, possui as mesmas características de elucidação estrutural do lupeol, mas difere pela modificação em um dos radicais dessa molécula.

Pode-se observar no espectro de RMN de ^1H (Figura 28), os sete sinais de metila com os valores δ 0,78, δ 0,83, δ 0,88, δ 0,94, δ 1,03, δ 1,25, δ 1,68. Um sinal de multiplicidade foi encontrado em δ 4,47 (dd $J= 9,7$ e $5,5$ Hz), esse deslocamento

é gerado pelo grupamento acetila no carbono 3, ligante diferente do que foi apresentado na molécula de lupeol, dessa forma esse sinal não foi encontrada no espectro de ^1H do lupeol. Além dessa diferença pode se observar uma metila do grupamento acetila com sinal de ressonância em δ 2,04 que não é encontrado no lupeol. Também foi possível verificar em δ 4,68 e δ 4,56 sinais referentes aos hidrogênios terminais H29 e H30 e no espectro RMN ^{13}C verificou-se a presença dos 30 sinais referentes ressonância dos carbonos do anel triterpênico (Figura 27).

Figura 25 - Estrutura do Lupeol Acetato (PRT- 02)

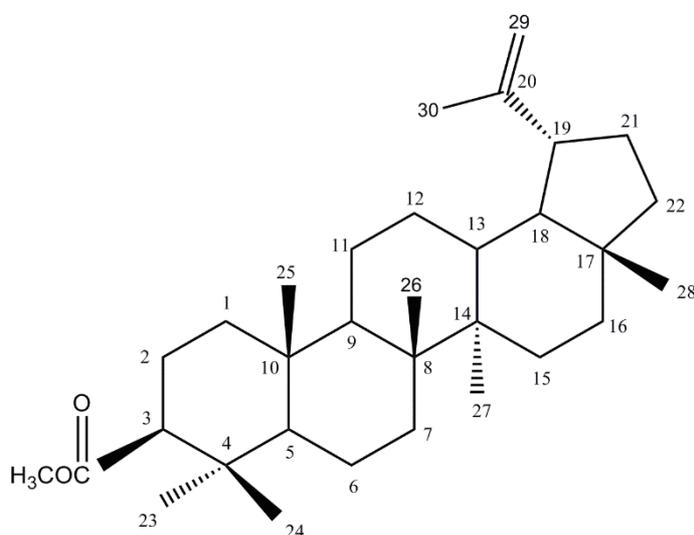


Tabela 7 - Dados de RNM ^{13}C da substância **PRT - 02** (CDCl_3 500 MHz) comparados com dados da literatura (David, 2004)

Posição do C	Observado	David (2004)	Posição do C	Observado	David (2004)
C 1	38,4	38,4	C 17	55,4	56,3
C 2	23,7	23,6	C 18	48,0	46,9
C 3	80,6	80,9	C 19	48,3	49,2
C 4	37,8	37,8	C 20	150,9	150,3
C 5	55,4	55,4	C 21	29,5	29,6
C 6	18,2	18,1	C 22	37,1	37,0
C 7	34,2	34,2	C 23	27,9	27,9
C 8	40,0	40,9	C 24	16,5	16,4
C 9	50,3	50,4	C 25	16,1	16,1
C 10	37,1	37,1	C 26	15,9	16,0
C 11	20,9	20,8	C 27	14,5	14,6
C 12	25,1	25,4	C 28	18,0	18,0
C 13	38,0	38,4	C 29	109,3	109,4
C 14	40,0	42,4	C 30	19,3	19,3
C 15	29,8	30,5	H ₃ C <u>C</u> CO	22,6	21,2
C 16	31,9	32,1	H ₃ C <u>C</u> CO	173,7	171,0

Figura 26 - Espectro de RMN ^{13}C da substância **PRT - 02** (CDCl_3 500 MHz)

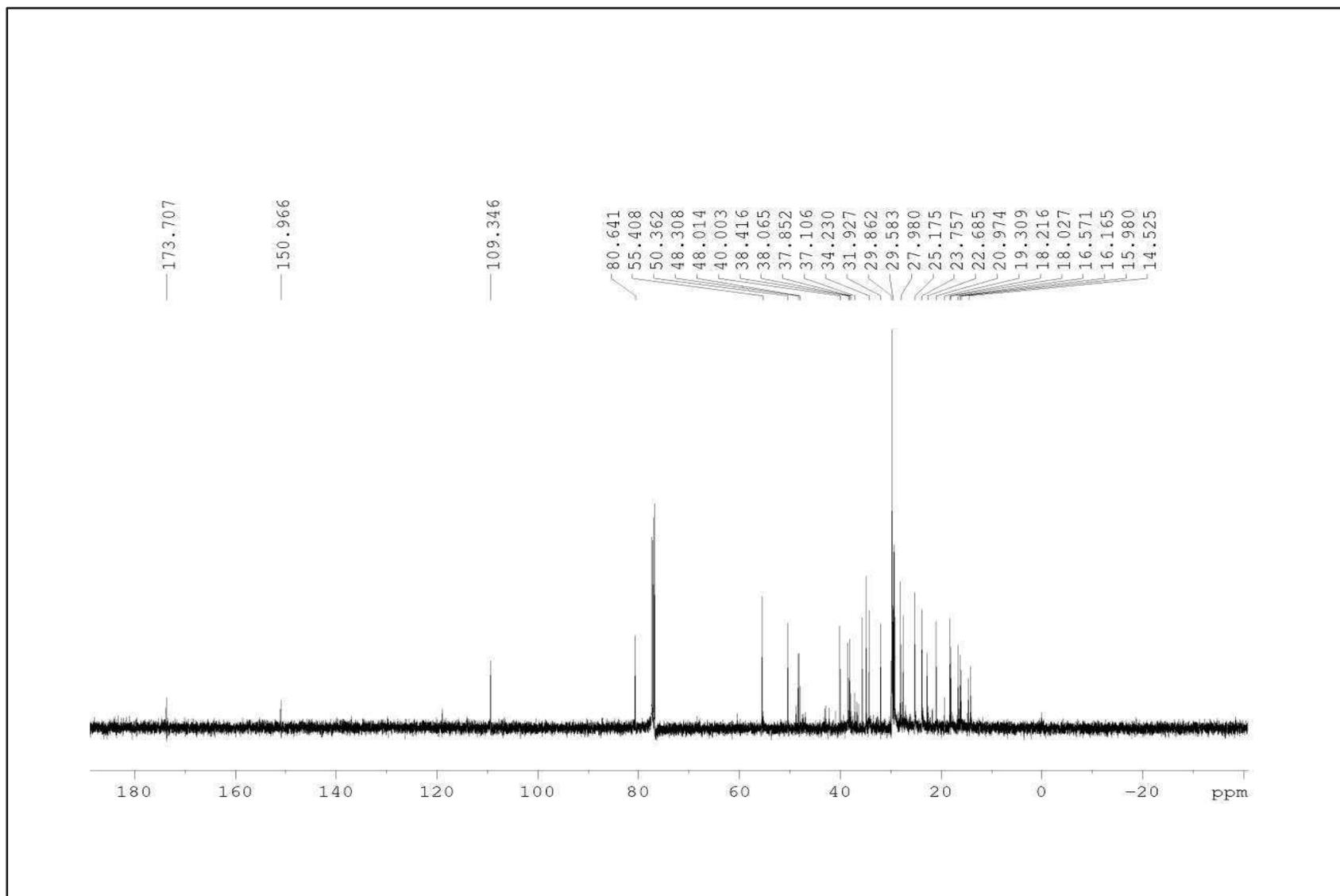
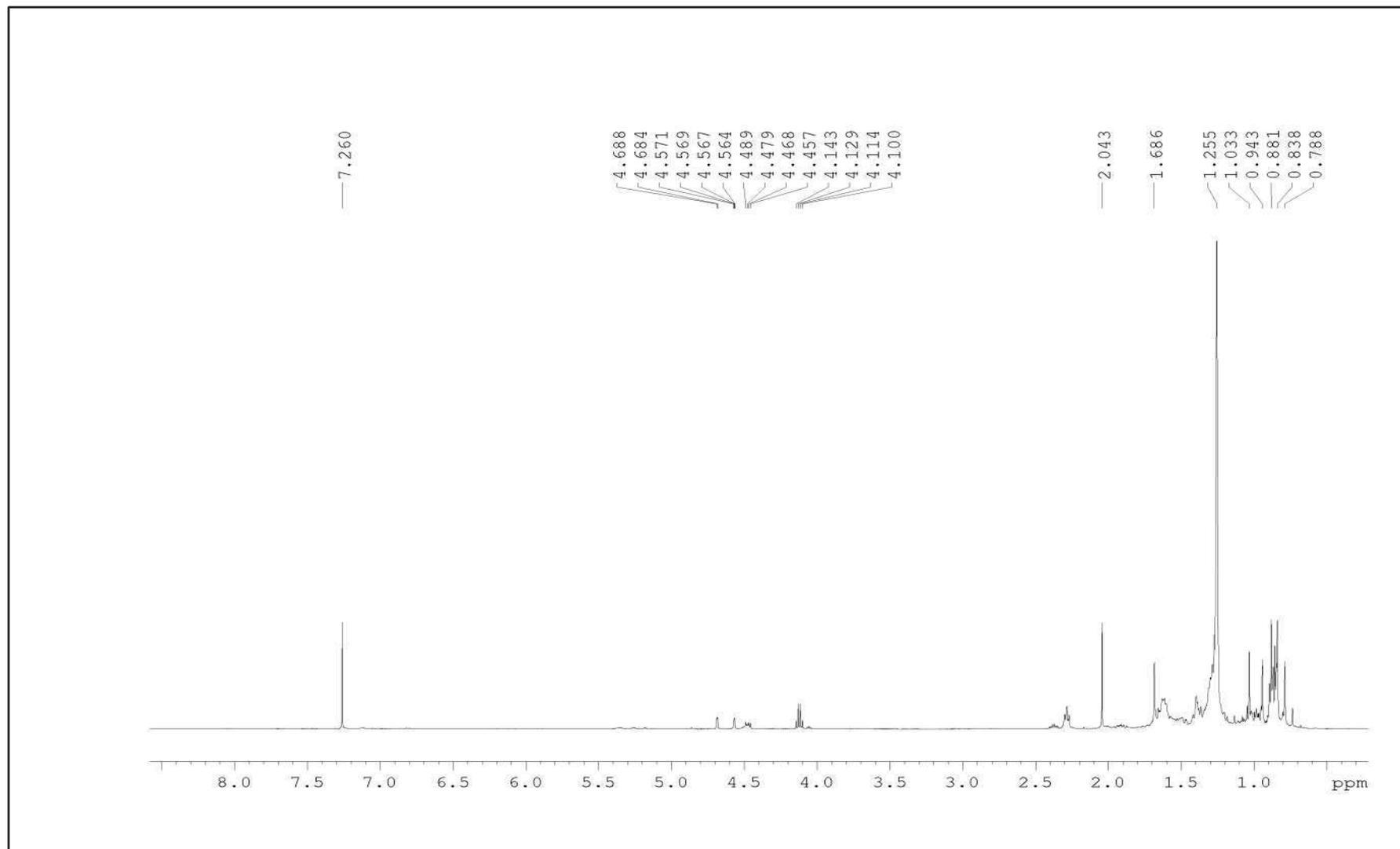
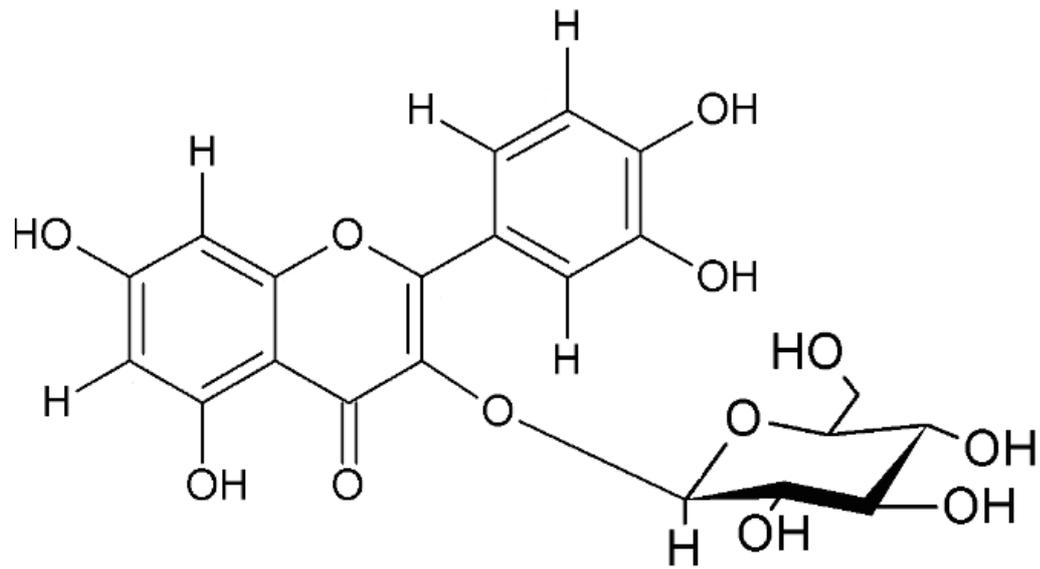


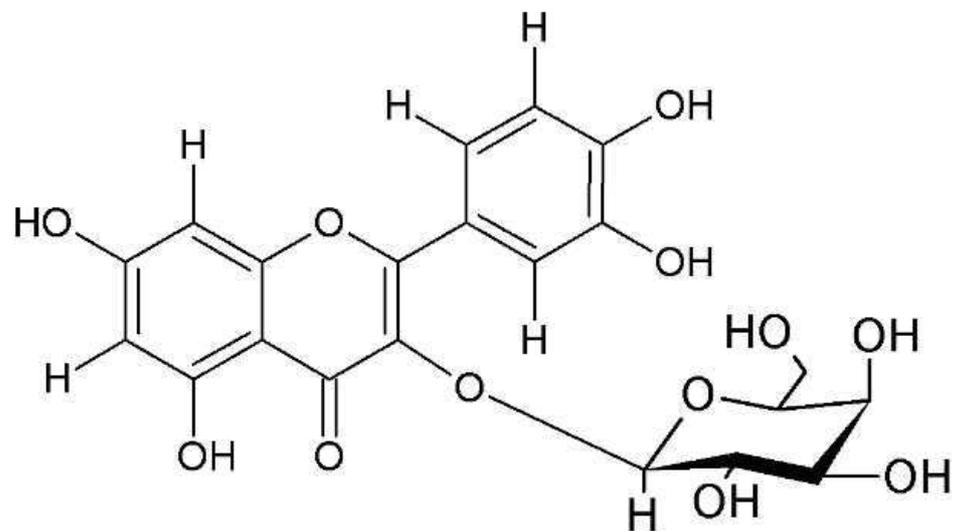
Figura 27 - Espectro de RMN ^1H da substância **PRT - 02** (CDCl_3 500 MHz)



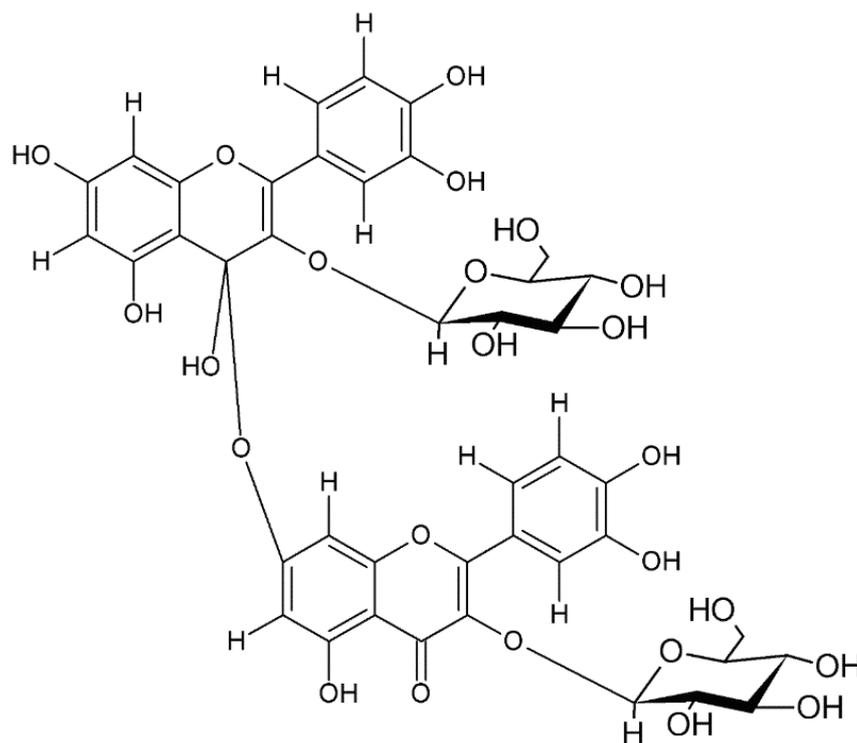
5.3.3 Identificação do Flavonoide PRF - 03, PRF - 04 e PRF - 05



PRF- 03



PRF - 04



PRF - 05

No espectro de RMN ^1H (Figura 29) observa-se, na região de hidrogênios aromáticos, um duplo duplete em torno de δ 7,5 referente ao hidrogênio H-6' ($J = 8,5$ e $2,5$ Hz); duplete em δ 7,7 referente ao hidrogênio H-2' ($J = 2,0$ Hz) e em δ 6,8 referente ao hidrogênio H-5' ($J = 8,5$ Hz). Além de dois dupletos em δ 6,3 ($J = 2,0$ Hz) e 6,2 ($J = 2,0$ Hz) correspondentes aos hidrogênios H-8 e H-6, respectivamente (Tabela 7). As integrais dos hidrogênios H-6, H-8, H-2', H-5' e H-6' correspondem a 4, o que sugere quatro estruturas com os mesmos sistemas de anéis A, B e C.

Figura 28 - Espectro de RMN ¹H da mistura de flavonoides (CD₃OD 500 MHz)

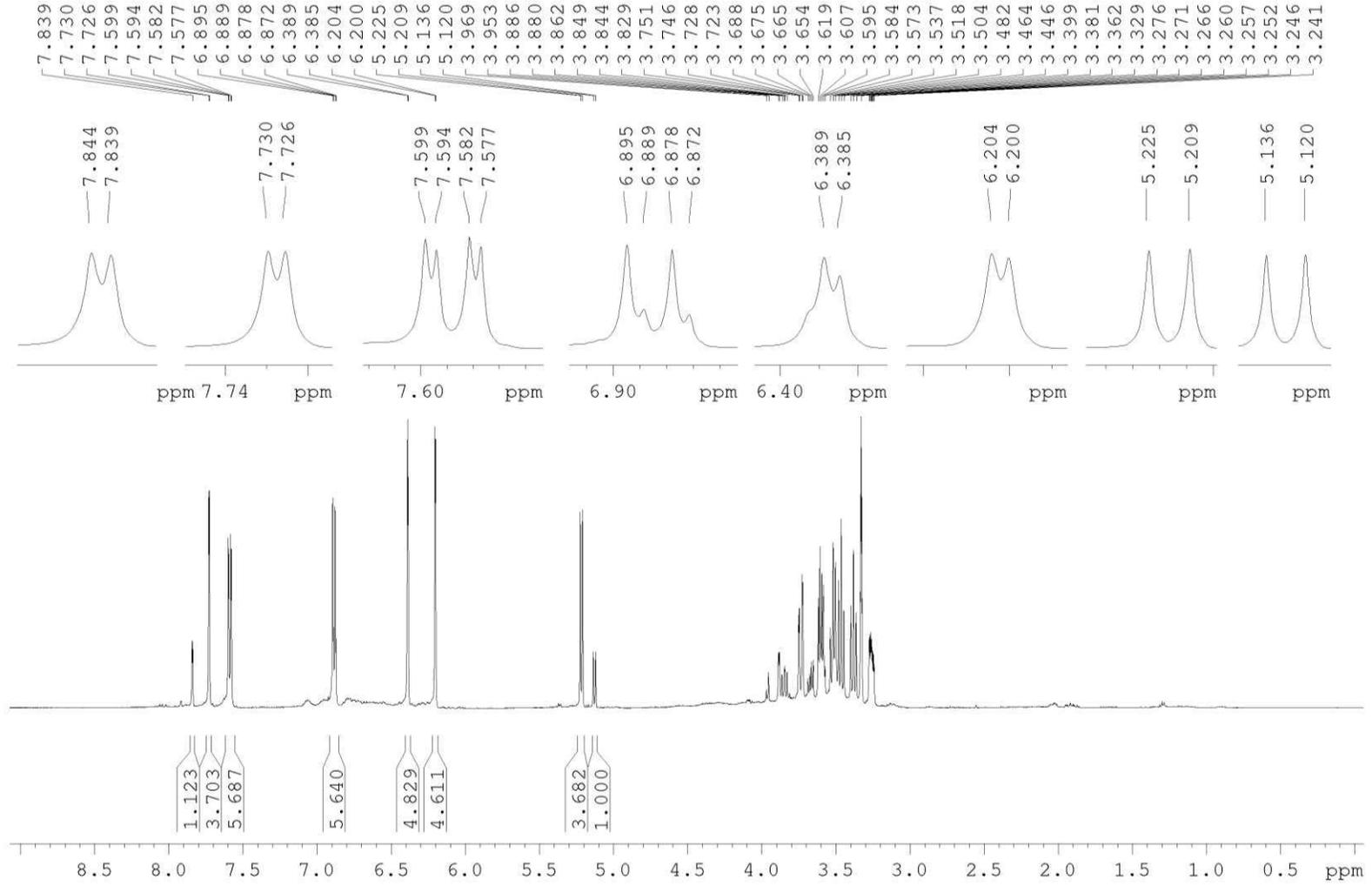


Tabela 8 - Dados de RNM ^1H da mistura de flavonoides

H	PRF-03	PRF-04	PRF-05
H-6	6,20	6,20	6,20
H-8	6,38	6,38	6,38
H-2'	7,72	7,72	7,72
H-5'	6,87	6,87	6,87
H-6'	7,59	7,59	7,59
H-1''	5,21	5,13	5,21
H-2''- 6''	3,00-4,00	3,00-4,00	3,00-4,00

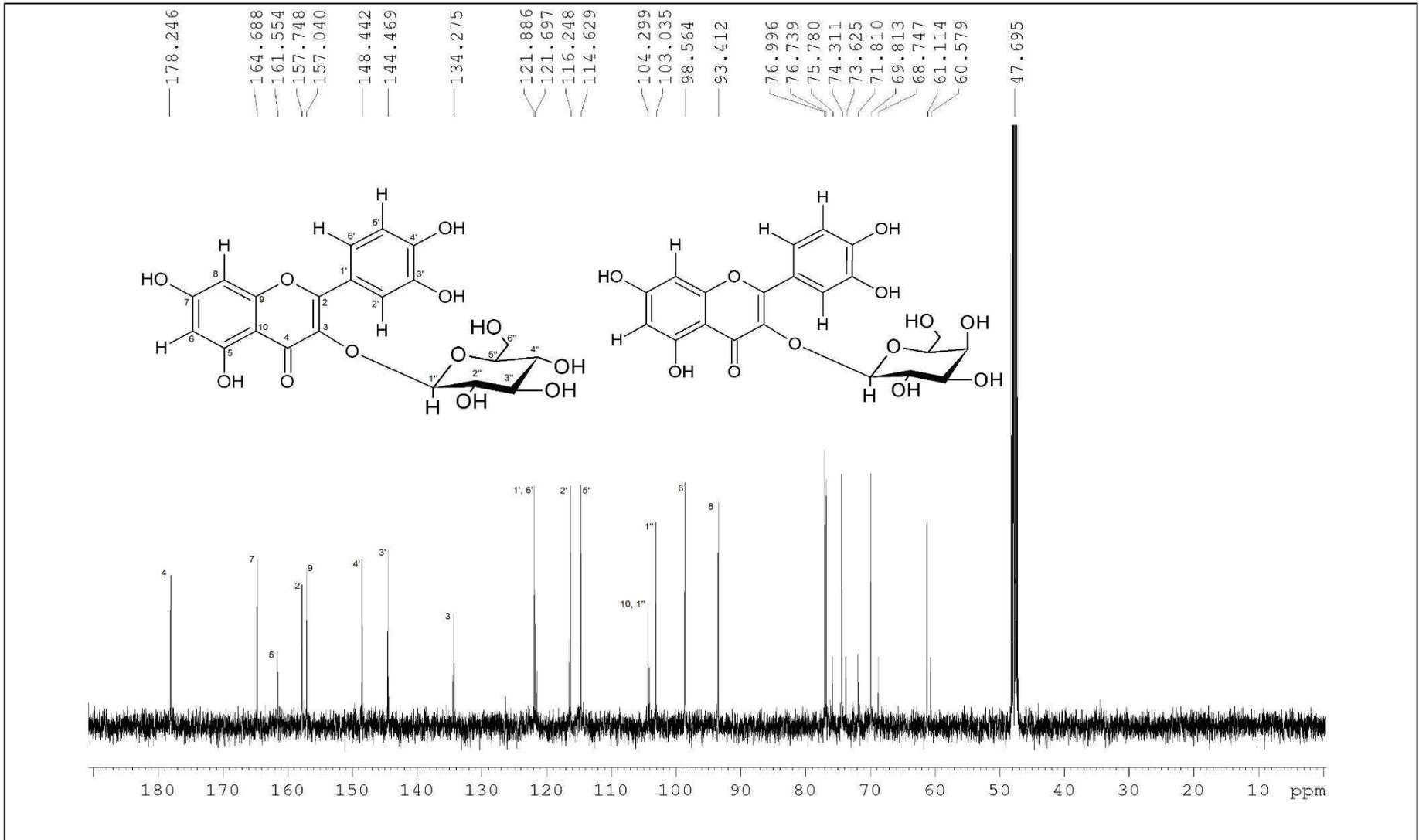
A presença de multipletos relativos a hidrogênios carbinólicos na região entre δ 3,0 e 4,0, além de dois dupletos absorvendo em δ 5,2 e 5,1, atribuídos a hidrogênios anoméricos H-1'', sugerem a existência de unidades de açúcares ligadas a estes flavonoides. As constantes de acoplamento de H-1'' com H-2'' iguais a 8,0 Hz para ambos hidrogênios anoméricos, indicam um ângulo diedro de 0–20° ou 150-180° entre estes hidrogênios, o que sugere que os açúcares estão ligados aos seus respectivos flavonoides pela face β . As integrais dos hidrogênios anoméricos em δ 5,21 e δ 5,13 estão na proporção de 3:1, o que indica a existência de quatro unidades de açúcares.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 30; Tabela 8) apresenta um sinal com deslocamento químico de δ 178,2 atribuída a C-4, uma vez que é um sinal típico de carbonilas queladas em flavonoides ocorrência de dez sinais na região entre δ 77,0 e δ 60,5 e dois sinais, um em δ 103,0 e outro em δ 104,3, referentes aos carbonos anoméricos C-1'', confirmam a existência de dois tipos de unidades de açúcares, sendo que o carbono δ 61,1 é típico do grupo hidroximetileno da glicose.

Tabela 9 - Dados de RNM ^{13}C da mistura de flavonoides comparada com dados da literatura Agrawal (1989)

C	PRF - 03	PRF - 04	PRF - 05	Literatura (AGRAWAL, 1989)
C-2	157,7	157,7	157,7	156,5
C-3	134,2	134,2	134,2	133,7
C-4	178,2	178,2	121,0 / 178,2	177,6
C-5	161,5	161,5	161,5	161,3
C-6	98,5	98,5	98,5	98,8
C-7	164,6	164,6	164,6	164,2
C-8	93,4	93,4	93,4	93,6
C-9	157,0	157,0	157,0	156,5
C-10	104,3	104,3	104,3	104,2
C-1'	121,7	121,7	121,7	121,4
C-2'	116,2	116,2	116,2	115,2
C-3'	144,4	144,4	144,4	144,8
C-4'	148,4	148,4	148,4	148,5
C-5'	114,6	114,6	114,6	116,5
C-6'	121,9	121,9	121,9	121,6
C-1''	103,0	104,3	103,0	101,4
C-2''	74,3	71,8	74,3	74,3
C-3''	76,7	73,6	76,7	76,8
C-4''	69,8	68,7	69,8	70,3
C-5''	77,0	75,7	77,0	77,5
C-6''	61,1	60,5	61,1	61,3

Figura 29 - Espectro de RMN ^{13}C da mistura de flavonoides (CD_3OD 500 MHz)



Com o espectro de HSQC (Figura 31), observa-se então, a existência de 3 açúcares cujo carbono anomérico corresponda a δ 103,0 e outra unidade de açúcar cujo carbono anomérico corresponda a δ 104,3. Confrontando os dados encontrados com a literatura sugere-se que haja 3 unidades de glicose e 1 unidade de galactose. A análise do espectro de HMBC mostra a relação destes hidrogênios com o carbono C-3 (δ 134,2). Esta e as demais correlações observadas no espectro de HMBC (Figura 32) são evidenciadas na figura.

Figura 30 - Espectro HSQC da mistura de flavonoides (CD₃OD 500 MHz)

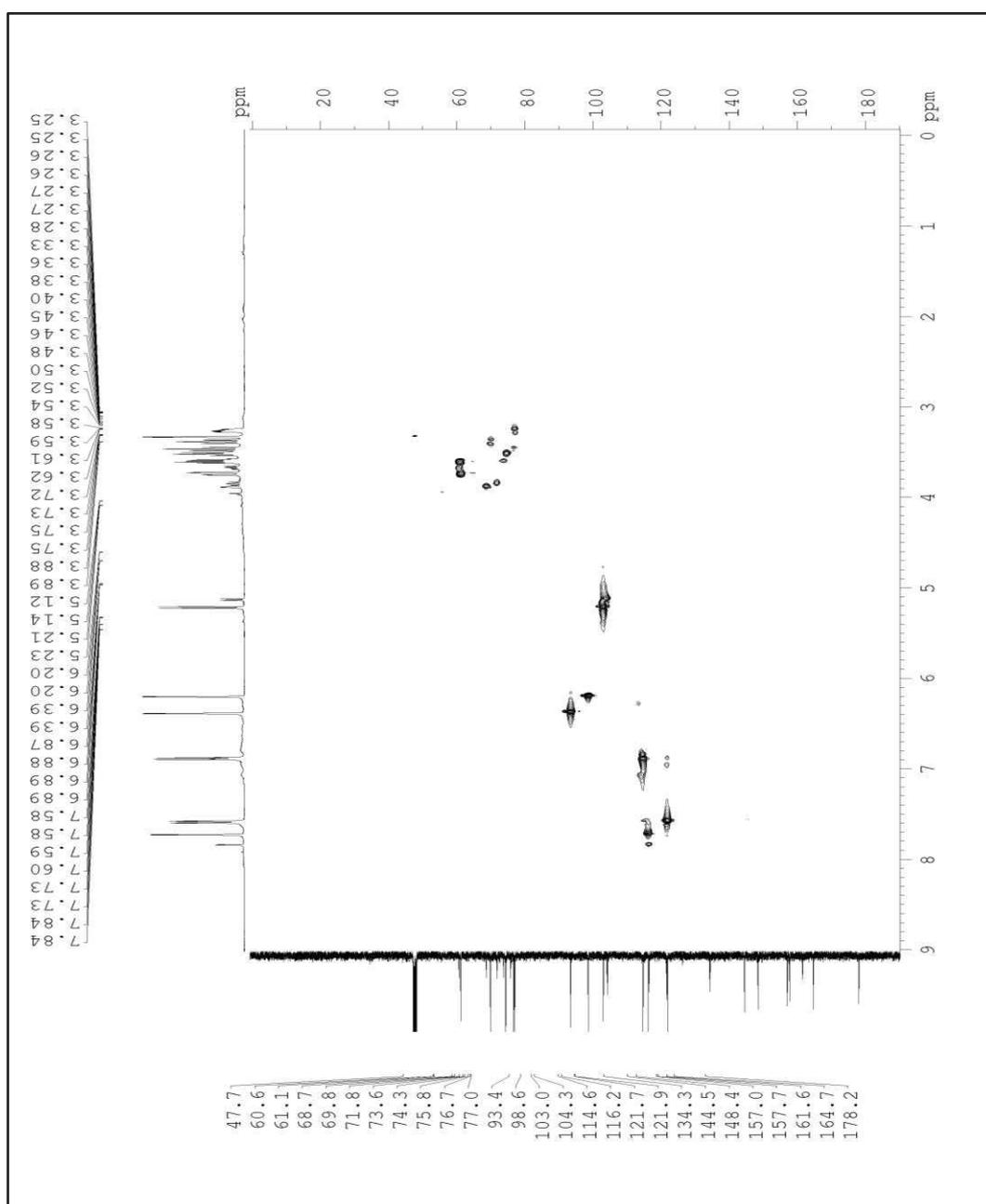
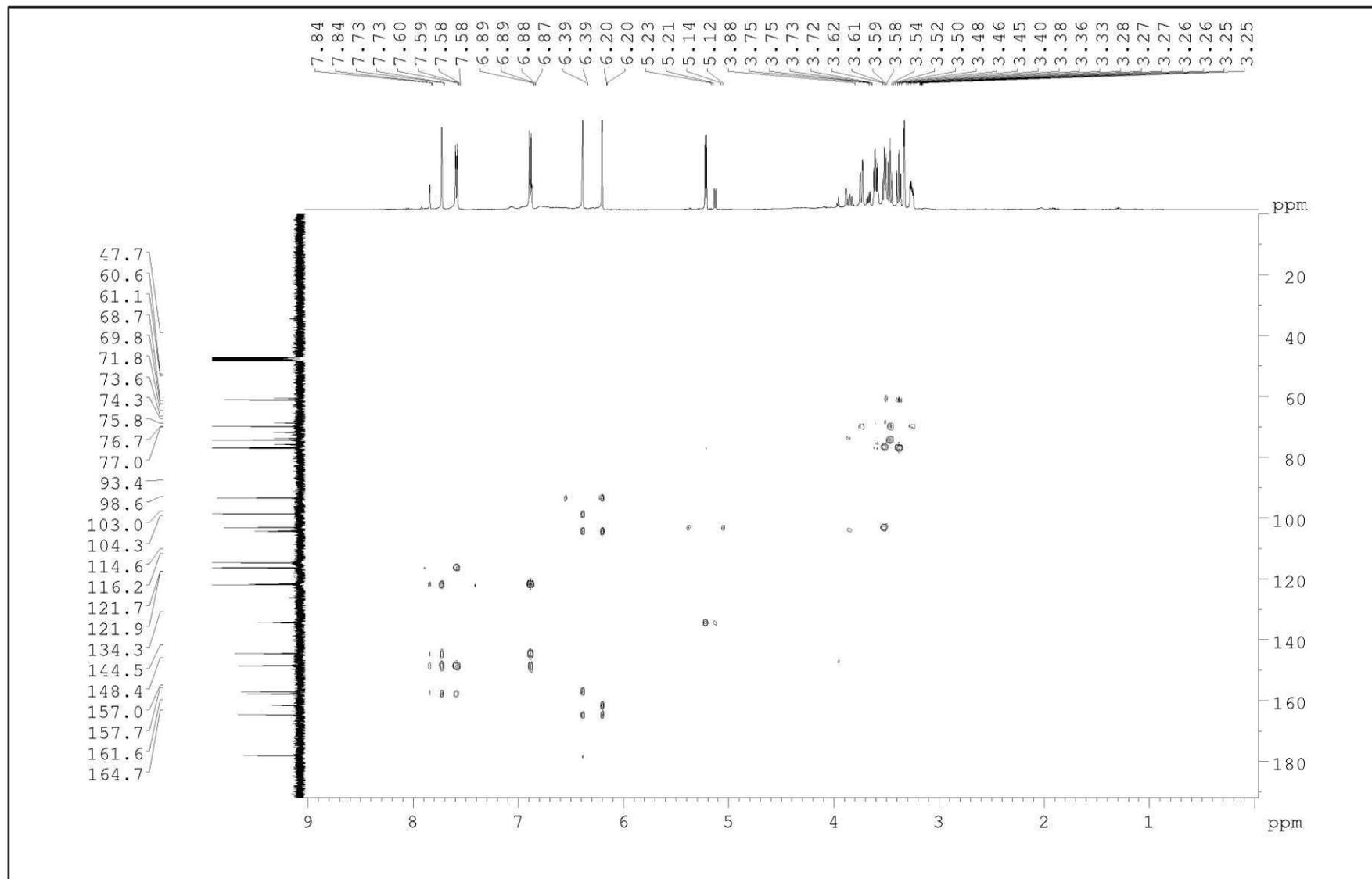
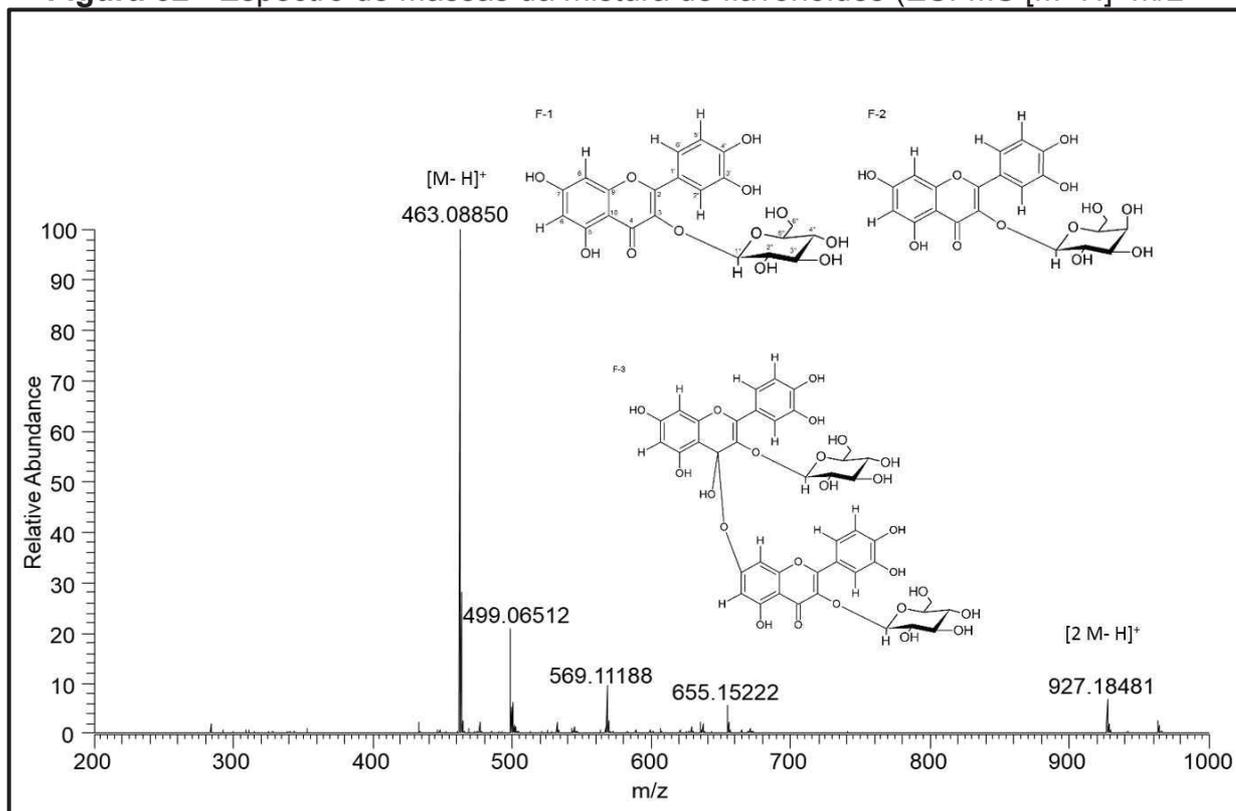


Figura 31 - Espectro HMBC da mistura de flavonoides (CD₃OD 500 MHz)



As análises dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, MS e posterior comparação com dados descritos na literatura (AGRAWAL, 1989) resultaram na identificação dos flavonoides Quercentina 3-O- β -D-glicopiranosídeo (**PRF-03**) e Quercentina 3-O- β -D-galactopiranosídeo (**PRF-04**), ambos com fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$, o que é observado por ESI-MS $[\text{M} - \text{H}]^+ m/z = 463,08850$ (Figura 33).

Figura 32 - Espectro de Massas da mistura de flavonoides (ESI-MS $[\text{M} - \text{H}]^+ m/z$)



Após a análise dos dados obtidos, propomos também a existência de um biflavonoide (**PRF-05**) com núcleos flavonoides A, B e C semelhantes aos de PRF-03, ligados C-3-O-C-7, $\text{C}_{42}\text{H}_{40}\text{O}_{24}$. O que é pode ser confirmado pela análise por ESI-MS $[\text{M} - \text{H}]^+ m/z = 927,18481$. O que corrobora com os valores de integrais observadas, tanto para H-6, H-8, H-2', H-5' e H-6' quando para H-1''.

5.4 Bioensaio com *Artemia salina*

Os extratos PRFEE, PRFEH, PRFEA, PRFED E PRFEM foram testados quanto a sua toxicidade em *Artemia salina*, de acordo com a metodologia de Molina-Salinas e Said-Fernández (2006) com algumas adaptações. Os autores consideram

toxicidade forte para compostos com valores de CL_{50} de até $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, toxicidade moderada para CL_{50} entre 100 e $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, toxicidade baixa para CL_{50} entre $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e não tóxico para valores acima de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 4, a seguir.

Tabela 10 - Determinação CL_{50} em $\mu\text{g/mL}$ dos extratos de *Piptocarpha rotundifolia* em *Artemia salina*

Extrato	CL 50%	Toxicidade
Extrato Etanólico(PRFEF)	$> 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Atóxico
Hexânico (PRFEH)	$> 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Atóxico
Acetato-etílico (PRFEA)	$565 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Fraca
Metanólico (PRFEM)	$> 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Atóxico
Diclorometano (PRFED)	$> 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Atóxico

De todos os extratos testados, o único que apresentou toxicidade foi o extrato acetato de etila, de acordo com a classificação de Nguta et al. (2011) a toxicidade apresentada é fraca.

5.5 Avaliação da Atividade Citotóxica

Todos os extratos obtidos, o extrato etanólico (PRFEF) e os extratos fracionados PRFEH, PRFEA, PRFED E PRFEM e algumas substâncias isoladas foram avaliadas quanto a atividade citotóxica. As análises de citotoxicidade foram realizadas no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Ao total, foram enviadas 16 amostras, dentre extratos e frações, além de compostos isolados, a fim de se verificar seus potenciais citotóxicos contra três linhagens de células tumorais, SF-295, PC-3 e HCT-116. As amostras identificadas pelos números de 1 a 5 foram testadas na concentração única de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto as demais na concentração única de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 11).

Tabela 11 - Percentual de inibição do crescimento tumoral *in vitro* e desvio padrão das amostras

AMOSTRAS	SF-295		PC-3		HCT-116	
	IC (%)	DP (%)	IC (%)	DP (%)	IC (%)	DP (%)
01 PRFEH	33,43	6,99	27,58	0,00	19,33	12,58
02 PRFEM	19,02	8,30	10,69	2,81	6,09	8,18
03 PRFEA	14,90	3,01	24,46	2,44	14,10	4,87
04 PRFEE	27,90	2,88	37,02	0,12	11,43	3,77
05 PRFED	29,41	3,63	32,61	3,42	9,59	3,06
06 PRFEH – 5%	23,15	3,97	28,88	2,57	3,42	4,40
07 PRFEH1–10%	11,46	0,89	27,93	0,00	1,30	2,20
08 PRFEH2–10%	14,71	0,27	24,64	2,69	3,86	11,95
09 PRFEH – 15%	47,89	0,27	37,63	7,83	34,29	1,33
10 PRFEH – 30%	38,53	3,08	32,00	8,94	42,97	3,06
11 PRFEH – 40%	50,46	4,73	84,92	0,48	93,15	1,33
12 PRFEH – 50%	84,08	0,54	78,95	0,85	88,81	1,18
13 PRFEH – 100%	76,27	0,20	88,30	1,34	97,60	0,55
14 PRT-01	45,37	3,70	59,37	0,12	22,22	1,10

Legenda: IC = Inibição do Crescimento; DP = Desvio Padrão.

Considerando citotóxicos apenas os compostos capazes de inibir acima de 75% da proliferação celular, a partir da avaliação da tabela 11 verifica-se que quatro amostras apresentaram efeito citotóxico em pelo menos uma linhagem celular, sendo que PRFEH – 50% apresentou taxa de inibição de 84,08% frente a linhagem SF – 295, 78,95% frente a PC-3 e 88,81% contra HCT-116.

Já PRFEH – 100% apresentou inibição de 76,27% frente a SF – 295, 88,30% contra PC-3 e 97,60% HCT-116, PRFEH – 40% apresentou inibição apenas para HCT – 116, porém com valor elevado, 93,15%.

5.6 Atividade inseticida

Para o ensaio de toxicidade com as formigas *Atta sexdens rubropilosa* foi empregado o extrato etanólico (PRFEE), extrato fracionado hexânico (PRFEH), extrato fracionado acetato de etila (PRFEA), extrato fracionado diclometânico

(PRFED) e extrato fracionado metanólico (PRFEM). Cada extrato foi analisado em três concentrações distintas 0,2, 1.0 e 2,0 mg.mL⁻¹.

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 (Md) e a interpretação do teste “log rank”.

5.6.1 Avaliação da atividade inseticida do extrato etanólico (PRFEE)

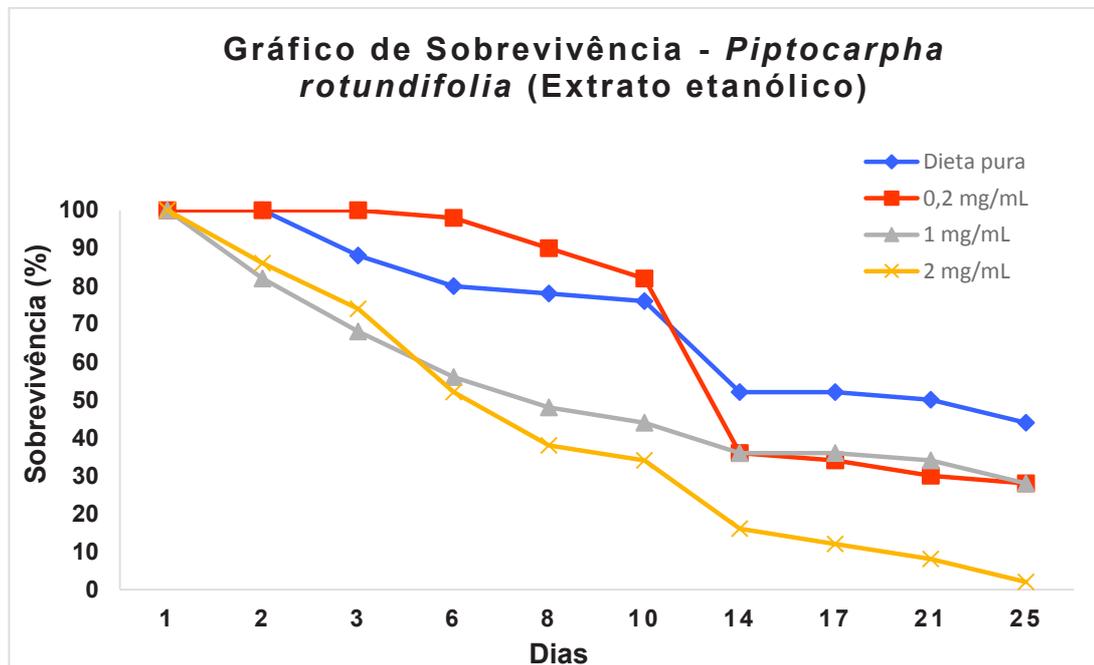
Foi possível observar, através da análise estatística, que o extrato bruto etanólico (PRFEE) nas concentrações de 0,2 mg/mL e 1mg/mL apresentaram mortalidade acumulada, ao final do experimento (25 dias), de 72%, enquanto a concentração 2mg/mL, apresentou 98% de mortalidade nesse mesmo período. Esses valores representam uma mortalidade significativa quando comparada com o controle dieta pura, que apresentou sobrevivência mediana superior a 25 dias, enquanto que para essas concentrações a mediana foi 13, 8 e 6 dias respectivamente (Tabela 13; Gráfico 1) demonstrando uma relação de mortalidade dose dependente, uma vez que com o aumento da concentração a mortalidade aumentou.

Tabela 12 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) das formigas *Atta sexdens rubropilosa* com incorporação do extrato etanólico (PRFEE) na dieta artificial

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	12	20	22	24	48	48	50	56	21 ^a
PRFEE 0,2mg/mL	0	0	0	2	10	18	64	66	70	72	13 ^a
PRFEE 1mg/mL	0	18	32	44	52	56	64	64	66	72	8 ^b
PRFEE 2mg/mL	0	14	26	48	62	66	84	88	92	98	6 ^b

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste “log rank” (p< 0,05).

Gráfico 1 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extrato etanólico



5.6.2 Avaliação da atividade inseticida do extrato hexânico (PRFEH)

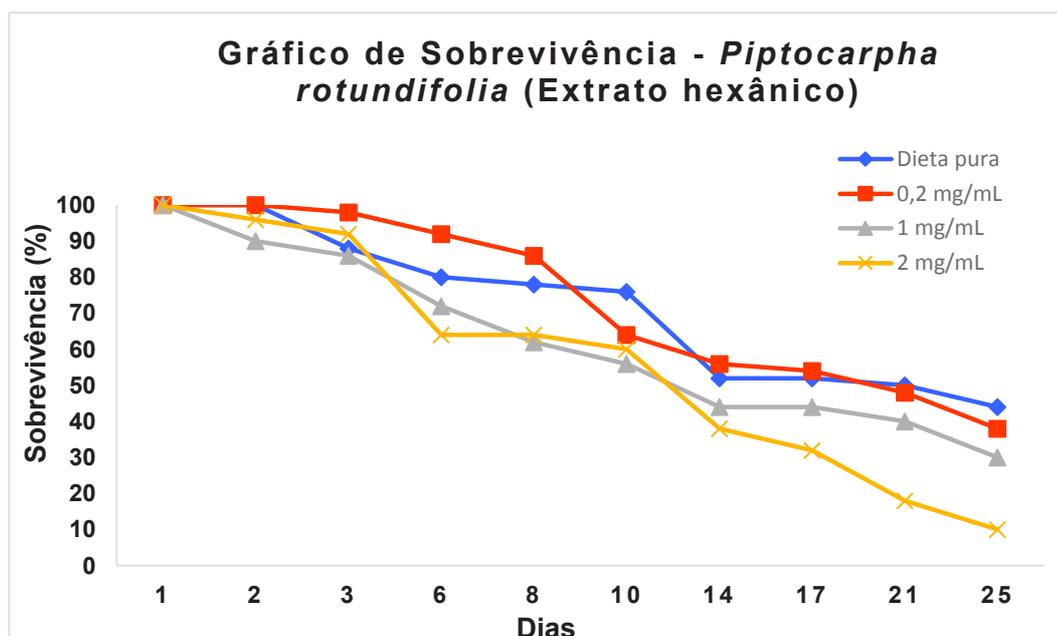
A análise estatística revelou que o extrato hexânico (PRFEH) nas concentrações 0,2mg/mL, 1mg/mL e 2mg/mL, apresentaram mortalidade de 62%, 70% e 90% respectivamente, sendo que a concentração de 0,2mg/mL demonstrou resultados que não são indicativos de potencial inseticida por demonstrar valores de mortalidade próximos aos resultados obtidos com dieta pura. Já as concentrações de 1 mg/mL e 2 mg/mL se mostraram significativos quanto a toxicidade nas formigas quando comparadas com o controle dieta pura, que apresentou sobrevivência mediana superior a 25 dias, enquanto que para essas concentrações os valores foram 13 e 12,5 dias respectivamente (Tabela 14; Gráfico 2).

Tabela 13 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) das formigas *Atta sexdens rubropilosa* com incorporação do extrato hexânico (PRFEH) na dieta artificial

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	12	20	22	24	48	48	50	56	21 ^a
PRFEH 0,2mg/mL	0	0	2	8	14	36	44	46	52	62	19 ^a
PRFEH 1mg/mL	0	10	14	28	38	44	56	56	60	70	13 ^a
PRFEH 2mg/mL	0	4	8	36	36	40	62	68	82	90	12,5 ^b

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

Gráfico 2 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extrato hexânico



5.6.3 Avaliação da atividade inseticida do extrato diclorometano (PRFED)

Com os resultados obtidos foi possível avaliar estatisticamente que o extrato fracionado diclorometânico (PRFED) na concentração de 0,2 mg/mL não apresenta valores significativos de toxicidade frente as formigas *Atta sexdens rubropilosa*, apresentando valor de mortalidade de 64%, valor muito próximo ao resultado observado com dieta pura 56%. As concentrações 1mg/mL e 2mg/mL, apresentaram

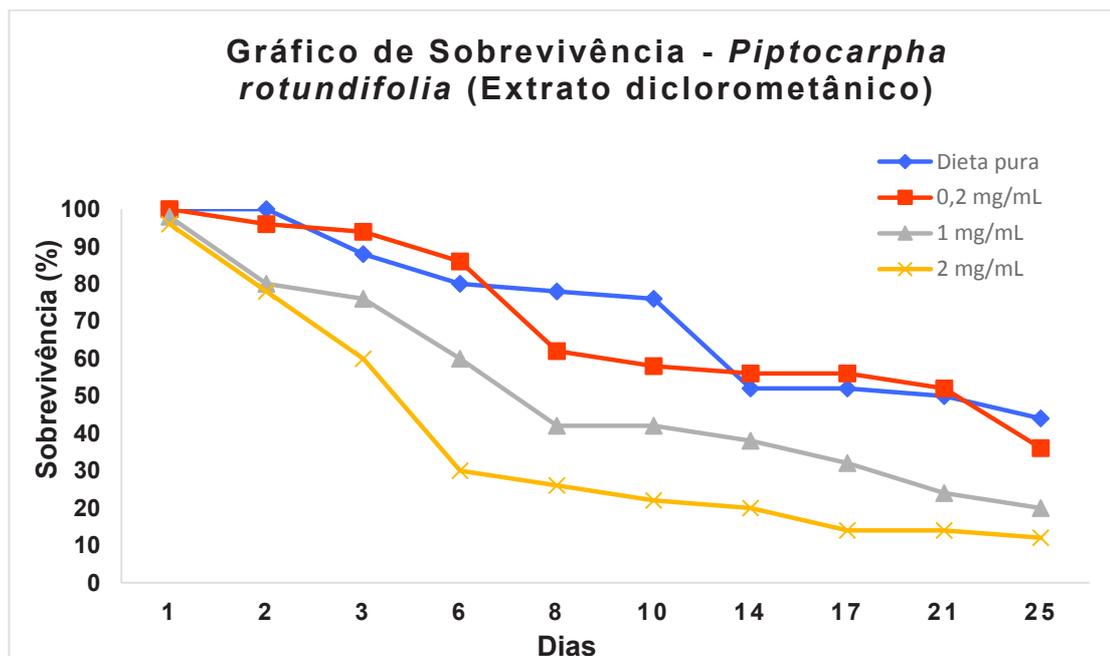
mortalidade de 80% e 88% respectivamente, sendo que esses valores se mostram significativos quando comparados com o controle dieta pura, que apresentou sobrevivência mediana superior a 25 dias e para essas concentrações os valores apresentados foram 7,5 e 4 respectivamente, também demonstrando que os resultados obtidos são dose dependentes (Tabela 15; Gráfico 3).

Tabela 14 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) das formigas *Atta sexdens rubropilosa* com incorporação do extrato diclorometânico (PRFED) na dieta artificial

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	12	20	22	24	48	48	50	56	21a
PRFED 0,2mg/mL	0	4	6	14	38	42	44	44	48	64	23a
PRFED 1mg/mL	2	20	24	40	58	58	62	68	76	80	7,5b
PRFED 2mg/mL	4	22	40	70	74	78	80	86	86	88	4b

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

Gráfico 3 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extrato diclorometânico



5.6.4 Avaliação da atividade inseticida do extrato acetato de etila (PRFEA)

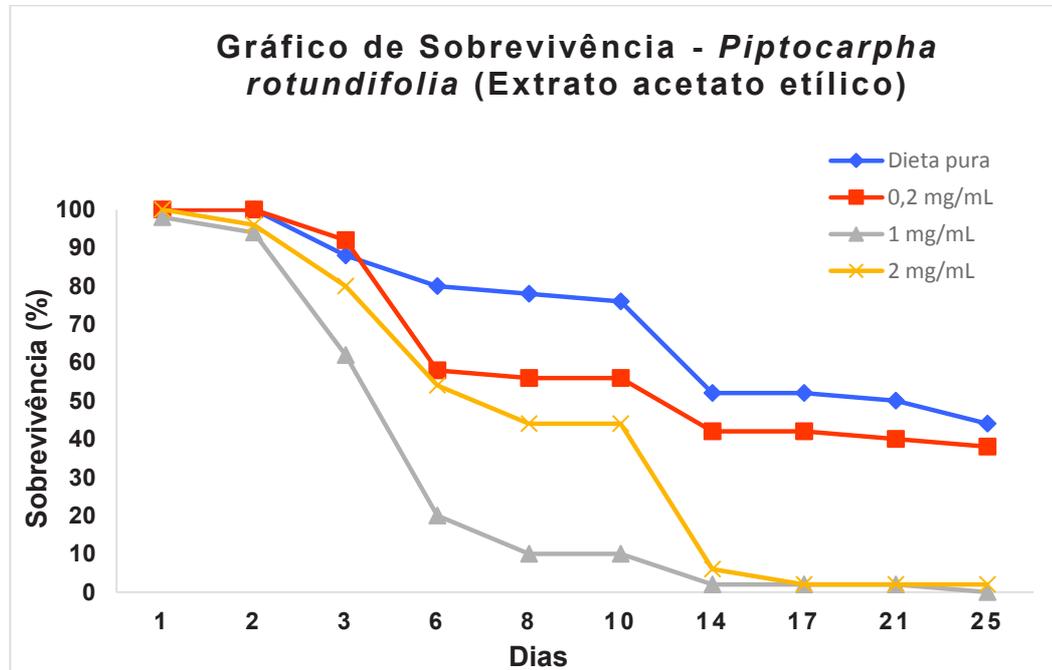
A partir da análise estatística, observou-se com os dados obtidos que o extrato fracionado acetato etílico (PRFEA) na concentração de 0,2 mg/mL não demonstrou toxicidade frente as formigas por não ter valores de mortalidade muito distintos daquele observado com a dieta pura. A concentração de 1mg/mL apresentou o valor máximo de mortalidade, ou seja, em 25 dias, 100% das formigas morreram, sendo esse o extrato mais promissor quanto ao potencial inseticida e nessa mesma concentração, uma vez que o valor de mortalidade obtida com a concentração 2mg/mL foi 98%, demonstrando nesse caso que a relação de mortalidade não foi dose dependente como os demais extratos. A taxa de sobrevivência mediana demonstrada foi de 13, 4 e 7 dias respectivamente (Tabela 16; Gráfico 4).

Tabela 15 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) das formigas *Atta sexdens rubropilosa* com incorporação do extrato acetato etílico (PRFEA) na dieta artificial

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	12	20	22	24	48	48	50	56	21 ^a
PRFEA 0,2mg/mL	0	0	8	42	44	44	58	58	60	62	13 ^a
PRFEA 1mg/mL	2	6	38	80	90	90	98	98	98	100	4 ^b
PRFEA 2mg/mL	0	4	20	46	56	56	94	98	98	98	7 ^b

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste “log rank” (p< 0,05).

Gráfico 4 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extrato acetato etílico



5.6.5 Avaliação da atividade inseticida do extrato metanólico (PRFEM)

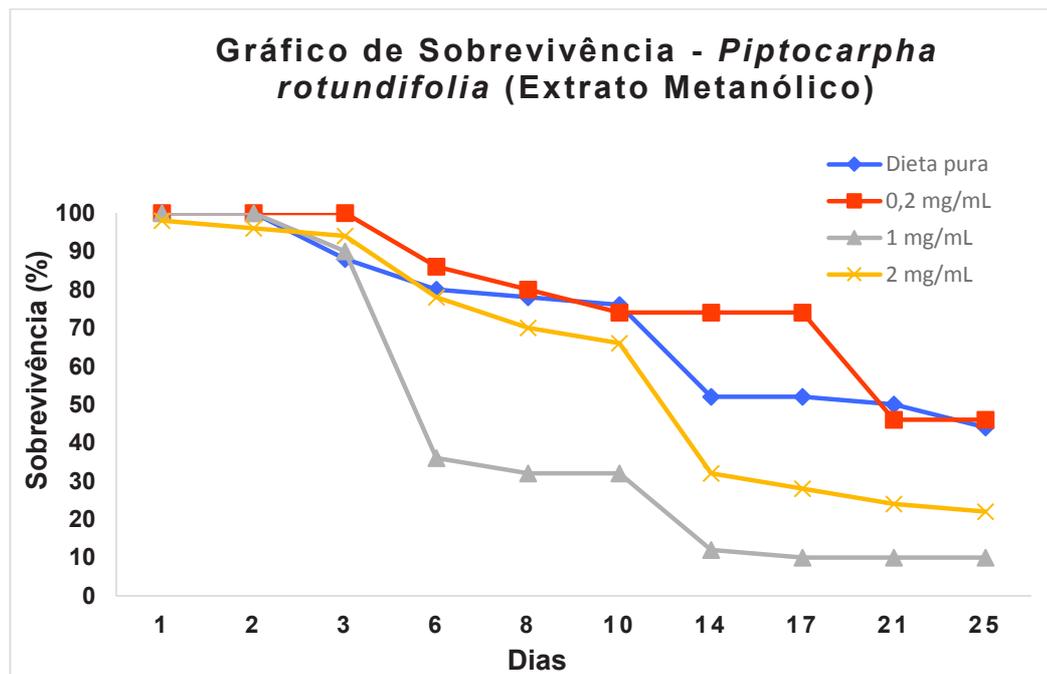
A análise estatística, dos dados obtidos com o extrato fracionado metanólico (PRFEM) demonstrou na concentração de 0,2mg/mL uma mortalidade de 54%, valor esse inferior ao obtido com dieta pura. Nas concentrações de 1mg/mL e 2mg/mL, mortalidade de 90% e 78% respectivamente, não tendo valores dose dependente. A mediana de sobrevivência encontrada foi 19, 5 e 13 dias respectivamente, sendo que para 1mg/mL e 2mg/mL, os valores demonstrados são significativos quando comparadas com o controle dieta pura, que apresentou mediana superior a 25 dias (Tabela 17; Gráfico 5).

Tabela 16 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) das formigas *Atta sexdens rubropilosa* com incorporação do extrato metanólico (PRFEM) na dieta artificial

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	12	20	22	24	48	48	50	56	21 ^a
PRFEM 0,2mg/mL	0	0	0	14	20	26	26	26	54	54	19 ^a
PRFEM 1mg/mL	0	0	10	64	68	68	88	90	90	90	5 ^b
PRFEM 2mg/mL	2	4	6	22	30	34	68	72	76	78	13 ^b

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

Gráfico 5 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extrato metanólico



6 CONCLUSÕES

- Foram identificados como metabólitos presentes na espécie *Piptocarpha rotundifolia*: flavonoides e triterpenos.
- Os extratos etanólico, hexânico, diclorometânico e metanólico se mostraram atóxicos em *Artemia salina*, enquanto o extrato acetato etílico apresentou toxicidade fraca.
- O teste de avaliação do potencial citotóxico mostrou-se satisfatório para algumas frações, PRFEH – 40% apresentou inibição do crescimento celular na ordem de 93,15% para células HCT-116. Já PRFEH – 50% apresentou inibição do crescimento celular na ordem de 84,04% para células SF-295, 78,95% para PC-3 e 88,81% para HCT-116. A fração PRFEH – 100% apresentou inibição do crescimento celular na ordem de 76,27% para células SF-295, 88,30% para PC-3 e 97,60% para HCT-116. O composto PR- 01 apresentou os valores 92,96% para células SF-295 e 87,92% para HCT-116. Valores esses considerados inibidores do crescimento em vista que estão acima do valor de 70% que é o critério para esse teste.
- Os bioensaios com as formigas *Atta sexdens rubropilosa*, mostraram resultados promissores no que diz respeito ao potencial inseticida dos extratos de *P. rotundifolia*, o maior valor de mortalidade foi apresentado pelo extrato acetato de etila na concentração de 1 mg/mL que matou 100% das formigas no 25º dia.
- Foi possível isolar Lupeol e Lupeol Acetato dessa espécie, e devido aos poucos trabalhos com essa espécie como alvo, esse triterpenos se mostram inéditos nessa espécie vegetal.
- Se mostra necessário o desenvolvimento de mais testes avaliativos do potencial inseticida, uma vez que os extratos se mostraram muito promissores mostrando a possibilidade de desenvolvimento de um bioherbicida.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHUTTI, M.H.C. and DA SILVA, J.B., Oleo Essencial das Folhas de *Piptocarpha rotundifolia* (Less.) Baker (Compositae). **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, p. 51-54, 1988.

ABC do Câncer, Abordagens Básicas para o Controle do Câncer. INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Ministério da Saúde**. 2º Edição. Rio de Janeiro, 2012.

AGRAWAL, P. K. "Flavonoid glycosides." Carbon-13 NMR of flavonoids, 1989.

AMARAL, A., G.; MUNHOZ, C. R. Planejamento do traçado de uma trilha interpretativa através da caracterização da Flora do Parque Ecológico e de uso múltiplo Águas Claras, DF. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S1, p. 639-641, 2008.

ARCANJO, D.D.R., ALBUQUERQUE, A.C.M., MELO-NETO, B., SANTANA, L.C.L.R., MEDEIROS, M. and CITÓ, A.M.G.L., Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 505-509, 2012.

BANDEIRA, P.N., LEMOS, T.L., COSTA, S.M. and SANTOS, H.S. Obtenção de derivados da mistura triterpenoídica α -e β -amirina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 204-20, 2007.

BATALHA, M. A. and MARTINS F. R. The vascular flora of the cerrado in Emas National Park (Central Brazil): a savanna flora summarized. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 2, p. 269-277, 2007.

BATLLE-BAYER, L., BATJES, N.H. and BINDRABAN, P.S., Changes in organic carbon stocks upon land use conversion in the Brazilian Cerrado: a review. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.137, n.1, p.47-58, 2010.

BERRIDGE, M.V.; TAN, A.S.; MCCOY, K.D.; WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, v.4, n.1, p.14-19, 1996.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R. Caracteres morfoanatômicos de partes vegetativas aéreas de *Baccharis coridifolia* DC.(Asteraceae-Astereae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 723, 2007.

BUENO, O. C., MORINI, M. S., PAGNOCCA, F. C., HEBLING, M. J., & 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.

CARVALHO, C.M.R.G.; BRITO, C.M.S.; NERY, I.S.; FIGUEIREDO, M.L.F. "Prevenção de câncer de mama em mulheres idosas: uma revisão. **Revista brasileira de enfermagem**, v.62, n.4, p. 579-582, 2009.

CALIXTO, J. S.; RIBEIRO, E. M. R.; O Cerrado como fonte de plantas medicinais para uso dos moradores de comunidades tradicionais do alto Jequitinhonha, MG. **II Encontro nacional de Pós graduação em Ambiente e Sociedade**, Indaiatuba, 2004.

CATALÁN, C.A. N., IGLESIAS, D.I.A., KAVLA, J, SOSA, V.E., HERZ, W. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Vernonia mollissima* and *Vernonia squamulosa*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 2, p. 351-353, 1986.

COWALL, P., CASSADY, J.M., CHANG, C.J., KOZLOWSKI, J.F. Isolation and structure determination of piptocarphins AF, cytotoxic germacranolide lactones from *Piptocarpha chontalensis*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 46, n.6, p.1108-1114, 1981.

CURSINO, L.M.C., MESQUITA, A.S.S., MESQUITA, D.W.O., FERNANDES, C.C., JUNIOR, O.L.P., AMARAL, I.L., NUNEZ, C.V., Triterpenes from the leaves of *Minquartia guianensis* Aubl.(Olacaceae). **Acta Amazonica**, v. 39, n. 1, p. 181-185, 2009.

DAVID, J.P., MEIRA, M., DAVID, J.M. and da S. GUEDES, M.L., 2004. Triterpenos e ferulatos de alquila de *Maprounea guianensis*. **QUIMICA NOVA**, 27(1), pp.62-65.

DIAS, L. S.; DIAS, A. S. Metabolitos secundários como fontes de bioherbicidas: situação atual e perspectivas. **Revista de Ciências Agrárias**, v.30, n.1, p.510-517, 2007.

DRUMMOND, J. A.; FRANCO, J. L. A.; OLIVEIRA, D. Uma análise sobre a história e a situação das unidades de conservação no Brasil. **Conservação da biodiversidade: legislação e políticas públicas**. Brasília: Câmara dos Deputados, **Edições Câmara**, p. 341-385, 2010.

ELANDT-JOHNSON, R.C.;JOHNSON, N.L., 1º Edição, **Incomplete Mortality Data: Follow-up Studies** Editora John Wiley & Sons, Inc. p. 150-180, 1980.

FACHINETTO, J.M., BAGATINI, M.D., DURIGON, J., SILVA, A.C.F. and TEDESCO, S.B., 2007. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 49-54, 2007.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUZA, I. M. O.; RODRIGUES F. A. R. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Construindo a história dos produtos naturais**, v. 7, p. 1-8, 2006.

GONZALEZ-COLOMA, A. GUADAÑO, A., TONN, C.E., SOSA, M. E., Antifeedant/insecticidal terpenes from Asteraceae and Labiatae species native to

Argentinean semi-arid lands. **Zeitschrift fur Naturforschung C-Journal of Biosciences**, v. 60, n. 11-12, p. 855-861, 2005.

GOBBO-NETO, L. and LOPES, N.P., 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química nova*, v. 30, n.2, p.374.

GROKOVISKI, L., CERVI, A.C. and TARDIVO, R.C.,. The genus *Piptocarpha* R. Br.(Asteraceae: Vernonieae) in the Paraná state, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23,n. 2, p. 486-498, 2009.

HORST, Heros. **Investigação Fitoquímica e Biológica da Espécie *Esenbeckia leiocarpa* Engl.** Universidade Federal de Santa Catarina, 2012. 250 folhas. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

HERZ, W. PALAHIAPPAN K. Piptocarphol esters from *Piptocarpha opaca*. **Phytochemistry**, v.22, n. 5, p. 1286-1287, 1983.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=2>>. Acesso em agosto de 2016.

KLINK, C. A.; and MACHADO, R.B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.

KOSSEL, A. Uber die chemishe Zusammensetzung der Zelle. **Arch Physiol Physiol Abt, Arch Anat Physiol**, p.181-186, 1891.

LOACES, D. L.; LUIS, I. R.; CABRERA, G. S. Descubrimiento y desarrollo de agentes anticancerígenos derivados de plantas medicinales. **Revista Cubana Plant Med, Ciudad de la Habana**, v. 8, n. 3, p. 0-0, 2003.

LÔBO, K.M.S., ATHAYDE, A.C.R., SILVA, A.M.A., RODRIGUES, F.F.G., Lôbo, I.S., Bezerra, D.A.C. and Costa, J.G.M., 2010. Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. e *Operculina hamiltonii* (G. Don) DF Austin & Staples, do semi-árido paraibano. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.12, n.2, p.227-233, 2010.

LOPES, R.M., OLIVEIRA, T.D., NAGEM, T.J. and PINTO, A.D.S., Flavonoides. *Biotechnologia ciência & desenvolvimento*, v. 3, n. 14, p.18-22, 2000..

MAXIA. A.; SANNA, C.; PIRAS, A.; PORCEDDA, S.; FALCONIERI, D.; GONÇALVEZ, M. J.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, S.,. Chemical composition and biological activity of *Tanacetum audibertii* (Req.) DC.(Asteraceae), an endemic species of Sardinia Island, Italy. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 472-476, 2015.

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.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 3ed. Fortaleza: UFC, 2009. 150p.

MATOS, J.M.D.; MATOS, M.E. **Farmacognosia**. Fortaleza: UFC, 1989.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.

NENAAH, G. E. Bioactivity of powders and essential oils of three Asteraceae plants as post-harvest grain protectants against three major coleopteran pest. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 17, n. 4, p. 701-709, 2014.

NGUTA, J. M., MBARIA, J. M., GAKUYA, D. W., GATHUMBI, P. K., KABASA, J. D., & KIAMA, S. G. Biological screening of Kenyan medicinal plants using *Artemia salina* L.(Artemiidae). **Pharmacologyonline**, v. 14, n. 2, p. 358-361, 2011.

OLEA, R.S.G., ROQUE, N.F. Análise de misturas de triterpenos por RMN de ¹³C. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 278-281, 1990.

PHILLIPS, T.W. and THRONE, J.E.,. Biorational approaches to managing stored-product insects. **Annual review of entomology**, v. 55, n. 1, p.375, 2009.

RAHMAN, A., CHOUDHARY, M.I.; THOMSEN, W. J.; Bioassay Techniques for Drug Development. 1^a. ed. Singapure: Taylor & Francis e-Library, 2005.

RHODES, M. J. C. Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. **Plant molecular biology**, v. 24, n. 1, p. 1-20, 1994.

NUNES, X.P., MESQUITA, R.F., SILVA, D.A., LIRA, D.P., COSTA, V.C., SILVA, M.V., XAVIER, A.L., DINIZ, M.F. and AGRA, M.D.F., Chemical constituents, Evaluation of the cytotoxic and antioxidant activities of *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p.718-723, 2008.

RIBEIRO, A. O., A. F. SILVA, and A. H. F. CASTRO. Identificação de espécies da família Asteraceae, revisão sobre usos e triagem fitoquímica do gênero *Eremanthus* da Reserva Boqueirão, Ingaí-MG. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, n. 12, p. 456-65, 2010.

RITTER, L. M. O.; RIBEIRO, M. C.; MORO, R. S. Composição florística e fitofisionomia de remanescentes disjuntos de Cerrado nos Campos Gerais, PR, Brasil–limite austral do bioma. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 3, p. 379-414, 2010.

SANTOS, A.V.; OLIVEIRA, B.L. and SAMUELS, R.I. Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub-lethal doses of imidacloprid: perspectives for the control of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Mycopathologia**, v. 163, n. 4, p. 233-240, 2007.

SILVA, N.L.A., MIRANDA, F.A.A., GONÇALO, M.C. Triagem fitoquímica de plantas de Cerrado, da área de proteção ambiental municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v. 6, n. 2, 2010.

SIQUEIRA, J.M.D., BOMM, M.D., PEREIRA, N.F.G., GARCEZ, W.S. and BOAVENTURA, M.A.D., Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 557-559, 1998.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; Boyd, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SHOLICHIN, M., YAMASAKI, K., KASAI, R., TANAKARA, O. ¹³C nuclear magnetic resonance of lupane-type triterpenes, lupeol, betulin and betulinic acid. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 3, p. 1006-1008, 1980.

TRIGUEIRO, M. Bioprospecção, uma nova fronteira da sociedade. Proyecto PARBIO, 2006. Disponível em: <www.ige.unicamp.br/parbio> Acesso em: Setembro, 2016.

VERDI, L.G., BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

VERZA, S.S., FORTI, L.C., MATOS, C.A., GARCIA, M.G. and NAGAMOTO, N.S., Attractiveness of citrus pulp and orange albedo extracts to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 47, n. 2, p. 391-400, 2006.

VIEGAS JR, 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.

VIEGAS JR, C., Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p.390-400, 2003.