

ADRIANA MARY MESTRINER FELIPE DE MELO

**ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Tabernaemontana
solanifolia* A. DC. (APOCYNACEAE)**

BRASÍLIA, 2012

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ADRIANA MARY MESTRINER FELIPE DE MELO

**ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Tabernaemontana*
solanifolia A. DC. (APOCYNACEAE)**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Dâmaris Silveira
Co-Orientadora: Prof. Dra. Cláudia Andréia de Lima
Cardoso

BRASÍLIA
2012

ADRIANA MARY MESTRINER FELIPE DE MELO

**ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Tabernaemontana*
solanifolia A. DC. (APOCYNACEAE)**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 14 de dezembro de 2012

BANCA EXAMINADORA

Dra. Dâmaris Silveira (Orientadora)
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Dr. Luiz Alberto Simeoni
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Dra. Pérola Oliveira Magalhães Dias Batista
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Dra. Cláudia Masrouah Jamal
Universidade Federal do Espírito Santo

Dra. Yris Maria Fonseca
Universidade de Brasília (suplente)

Dedico este trabalho ao meu esposo Elmo, ao meu filho Gabriel e aos meus pais, Elizabeth e Benedito.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus

Ao meu esposo, Elmo, pelo amor, paciência, incentivo, companhia e força concedida nas horas de dificuldades

Aos meus pais, Elizabeth e Benedito, que sempre me apoiaram e acreditaram que esse sonho fosse possível

Aos meus familiares, minha eterna gratidão

À Prof. Dra. Dâmaris Silveira pela orientação, ensinamentos, atenção, dedicação e acolhida, desde nosso primeiro encontro

À prof. Dra. Cláudia Andréia de Lima Cardoso pela parceria, apoio na realização dos experimentos e co-orientação desse trabalho

À Magnífica Reitora da Unigran, prof. Rosa Maria D'Amato De Déa, pela amizade e por possibilitar a condução da pesquisa na Unigran

À minha prima e colega de trabalho, Tânia Rejane de Souza, pelo carinho e convivência harmoniosa

Às professoras Dra. Rosilda Mara Mussury e Dra. Shirlyne Silvana Umbelino de Barros pela amizade e auxílio constante

Aos professores André Mueller, Wanderlei Onofre Schmitz, Paulo Vasconcelos, Cláucia Honorato, Cleide Tirlone, Taline Stefanelo e Camila Nascimento pela ajuda na condução dos experimentos

À colega de doutorado, Paloma Michelle Salles

Aos acadêmicos de iniciação científica que se dedicaram na realização dos experimentos Stephanie Gama, Raquel de Oliveira, Luis Fernando Benitez, Vanessa K., Maisa Estopa Correa, Katusca Kawamoto, Danilo Santana e Késia da Silva

À Universidade de Brasília, ao Centro Universitário da Grande Dourados e a Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul pelo acolhimento, pelos recursos humanos e financeiros concedidos para a condução da pesquisa

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal pela concessão de recursos financeiros para a execução da pesquisa

A todos que se envolveram com a pesquisa.

RESUMO

Tabernaemontana solanifolia A. DC. (Apocynaceae) é endêmica do Cerrado e conhecida, popularmente, como mata-pasto. A presente tese descreve o estudo químico, biológico (antimicrobiana, antioxidante, anti-hemolítico, citotóxico, fitotóxico, inseticida e ação ansiolítica em labirinto em cruz elevado) e toxicológico das folhas dessa espécie. Do extrato hexânico foram isolados e identificados acetato de β -amirina e uma mistura de estigmasterol e β -sitosterol. Os alcaloides isovoacangina, voacangina, catarantina, 3-hidroxi-coronaridina e coronaridina foram identificados por CG-EM. Os compostos fenólicos rutina, isoquercitrina, quercetina, derivados do ácido cafeico e ácido clorogênico foram identificados por CLAE-DAD. A anatomia foliar de *T. solanifolia* também foi descrita. Os extratos brutos aquoso, etanólico e hexânico de *T. solanifolia* apresentaram atividade antioxidante e antimicrobiana. Os extratos brutos apresentaram atividade antioxidante capaz de inibir a formação de radicais livres *in vitro*. O extrato aquoso mostrou propriedades anti-hemolíticas no protocolo utilizando AAPH. Essa ação pode estar relacionada a presença de compostos fenólicos, detectados em maior proporção no extrato aquoso e etanólico de *T. solanifolia*. Acetato de β -amirina mostrou atividade antimicrobiana *in vitro*. Os extratos podem ser considerados de baixa toxicidade aguda pelo método de classes utilizando 2000 mg/Kg e não mostraram ação ansiolítica em ratos wistar submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado na concentração de 1mg/mL. Entretanto, interferem no desenvolvimento de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) sem exercer efeito antialimentar quando acrescidos à dieta artificial. Os extratos exercem efeito alelopático no crescimento (radículas ou hipocótilos), mas não na germinação das sementes de *Lactuca sativa* L. (alface) e de *Glycine max* L. (soja). A avaliação das atividades biológicas e a presença do triterpeno acetato de β -amirina foram relatadas pela primeira vez em *T. solanifolia* A DC.

Palavras-chave: *Tabernaemontana solanifolia* A. DC., triterpeno, antimicrobiana, toxicidade, fitoquímica

ABSTRACT

Tabernaemontana solanifolia A. DC. (Apocynaceae) is endemic to the Cerrado and it is colloquially known as mata-pasto. This thesis describes the chemical, biological (antimicrobial, antioxidant, anti-hemolytic, cytotoxic, insecticidal, allelopathic and anxyolitic action in elevated plus maze) and toxicological study of the leaves of this species. From the hexane extract, β -amyrin acetate and a mixture of stigmasterol and β -sitosterol were isolated and identified. The alkaloids isovoacangine, voacangine, catharanthine, 3-hydroxycoronaridine and coronaridine were identified by GC/MS. The phenolic compounds rutin, isoquercitrin, quercetin and derivatives of caffeic acid and chlorogenic acids were identified by HPLC-DAD. The leaf anatomy of *T. solanifolia* was also described. Aqueous, ethanolic and hexane extracts of *T. solanifolia* showed antioxidant and antimicrobial activity. The crude extracts showed antioxidant activity capable of inhibiting the formation of free radicals *in vitro*. The aqueous extract showed anti-hemolytic properties in the protocol using AAPH. This action can be related to the presence of phenolic compounds, found in greater proportion in the aqueous and ethanolic extract of *T. solanifolia*. β -amyrin acetate showed antimicrobial activity *in vitro*. The extracts can be considered to be of low acute toxicity by the class method using 2000 mg/Kg and did not show anxyolitic action in wistar rats submitted to elevated plus maze (EPM) at a concentration of 1 mg/mL. Also, they were able to interfere in the development of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), despite do not exert antifeedant effect when added to the artificial diet. The extracts presented allelopathic effect on growth (hypocotyl) but not on the germination of seeds of *Lactuca sativa* L. (lettuce) e de *Glycine max* L. (soya). As far as our knowledge reaches, this is the first time that the evaluation of biological activities is described for this species, and it is also the first report of the presence of triterpene β -amyrin acetate in *T. solanifolia*.

Key words: *Tabernaemontana solanifolia* A. DC., triterpene, antimicrobial, toxicity, phytochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	<i>Tabernaemontana solanifolia</i> A.DC. (a,b) abril/ 2009, Brasília – DF	25
Figura 2 -	Espectro na região do infravermelho do SMG01 (KBr, cm^{-1}).....	107
Figura 3 -	Espectro de RMN de ^1H de SMG01 (300 MHz, CDCl_3).....	108
Figura 4 -	Espectro de RMN de ^1H de SMG01 – Expansão da região entre δ 0,8 a δ 2,2 (300 MHz, CDCl_3).....	108
Figura 5 -	Espectro de RMN de ^1H de SMG01 – Expansão da região entre δ 4,0 a 5,6 (300 MHz, CDCl_3).....	109
Figura 6 -	Espectro de RMN de ^{13}C de SMG01 (75 MHz, CDCl_3)	110
Figura 7 -	Espectro de RMN de ^{13}C de SMG01 – ATP– Expansão da região δ 14,0 a δ 34,0 (75 MHz, CDCl_3).....	110
Figura 8 -	Espectro de RMN de ^{13}C de SMG01 – ATP – Expansão da região δ 33,0 a δ 57,0 (75 MHz, CDCl_3).....	111
Figura 9 -	Espectro de RMN de ^{13}C de SMG01 – ATP– Expansão da região δ 79,0 a δ 170,0 (75 MHz, CDCl_3).....	111
Figura 10-	Espectro na região do Infravermelho de SMG02 (KBr, cm^{-1}).....	113
Figura 11-	Espectro de RMN de ^1H de SMG02 – geral (300 MHz, CDCl_3).....	114
Figura 12-	Espectro de RMN de ^1H de SMG02 – Expansão da região entre δ 3,4 a δ 5,4 (300 MHz, CDCl_3)	115
Figura 13-	Cromatograma do extrato aquoso em 354 nm e espectro no ultravioleta dos compostos ácido clorogênico, ácido cafeico e rutina referentes aos picos $\text{Tr} = 14,16$ min., $\text{Tr} = 17,94$ min. e $\text{Tr} = 27,17$ min., respectivamente.....	117
Figura 14-	Cromatograma da fração aquosa da partição bifásica do extrato etanólico em 354 nm e espectro no ultravioleta dos compostos ácido clorogênico, isoquercetrina e isoquercetina referentes aos picos $\text{Tr} = 14,16$ min., $\text{Tr} = 29,06$ min e $\text{Tr} = 26,77$ respectivamente	118
Figura 15-	Cromatograma da fração inferior da partição trifásica (1ª coleta)	

	do extrato etanólico em 354 nm e espectro no ultravioleta dos compostos ácido clorogênico, rutina e isoquercitrina, referentes aos picos Tr= 14,16 min., Tr= 27,17 min. e Tr= 29,06, respectivamente.....	119
Figura 16-	Cromatograma da fração inferior da partição trifásica (2ª coleta) do extrato etanólico em 354 nm e espectro no ultravioleta dos compostos rutina e quercetina referentes aos picos Tr= 27,17 min. e Tr= 7,23 min., respectivamente.....	120
Figura 17-	Constituintes fenólicos (mg/g) em diferentes tipos de extratos obtidos das folhas de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC.....	121
Figura 18-	Constituintes fenólicos (mg/g) nas frações do extrato etanólico de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC. coletada em março de 2007, Brasília, DF.....	122
Figura 19-	Determinação do teor de Flavonoides (mg/g) das folhas de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC.....	124
Figura 20-	Esquema da reação entre a substância antioxidante (AH) e o radical DPPH'.....	125
Figura 21 -	Curva de hemólise de eritrócitos submetidos a estresse oxidativo por AAPH.....	130
Figura 22-	Curva da atividade anti-hemolítica da Vitamina C em diferentes concentrações frente a suspensão de eritrócitos (1%) em PBS submetidos à presença de AAPH (10mM) por até 6 horas em banho-maria a 37°C, ao abrigo da luz e com agitação constante (75 rpm).....	130
Figura 23-	Curva da atividade anti-hemolítica do extrato aquoso em diferentes concentrações frente a suspensão de eritrócitos (1%) em PBS submetidos à presença de AAPH (10mM) por até 6 horas em banho-maria a 37°C, ao abrigo da luz e com agitação constante (75 rpm).....	131
Figura 24-	Curva dose resposta da atividade anti-hemolítica do extrato aquoso (AqE) de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC. em	

	solução de eritrócitos em PBS (1%) submetidos à presença de AAPH (10 mM) por até 6 horas em banho-maria a 37°C, ao abrigo da luz e com agitação constante (75 rpm).....	132
Figura 25-	Curva dose resposta da atividade anti-hemolítica do extrato aquoso (AqE) de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC. em solução de eritrócitos em PBS (1%) submetidos à presença de AAPH (10 mM) por até 6 horas em banho-maria a 37°C, ao abrigo da luz e com agitação constante (75 rpm).....	133
Figura 26-	Atividade anti-hemolítica do EE de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC. em suspensão de eritrócitos em PBS (1 %) submetidos à presença de AAPH.....	133
Figura 27-	Índice hepatossomático de ratos Wistar machos tratados com diferentes extratos de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC.....	138
Figura 28-	Micrografia de fígado de ratos Wistar machos tratados com diferentes extratos de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC. (X 400)	139
Figura 29-	Pesquisa de propriedades antimicrobianas do extrato aquoso de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC. pelo método de difusão em cavidade.....	142
Figura 30-	Tamanho médio da radícula (A) e do hipocótilo (B) de <i>Lactuca sativa</i> L. após 5 dias de avaliação frente ao extrato hexânico de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC. em diferentes concentrações.....	148
Figura 31-	Tamanho médio da radícula (A) e do hipocótilo (B) de <i>Lactuca sativa</i> L. após 5 dias de avaliação frente ao extrato etanólico de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC. em diferentes concentrações	149
Figura 32-	Tamanho médio do hipocótilo (A) e das radículas (B) de <i>Lactuca sativa</i> L. após 5 dias de avaliação frente ao acetato de β - amirina (SMG01)	149
Figura 33-	Tamanho médio de crescimento dos hipocótilos de <i>Glycine max</i>	

	L. 5 dias após o tratamento com extratos obtidos a partir das folhas de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC.	151
Figura 34-	Tamanho médio de crescimento das radículas de <i>Glycine max</i> L. 5 dias após o tratamento com extratos obtidos a partir das folhas de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC.....	152
Figura 35-	Fases de desenvolvimento de <i>Anticarsia gemmatalis</i> H.....	154
Figura 36-	Secção transversal do pecíolo de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A.DC.....	157
Figura 37-	Secção transversal do pecíolo de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A.DC.....	158
Figura 38-	Secção transversal do limbo de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC.....	159

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação taxonômica de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A.DC..	25
Tabela 2 -	Espécies de <i>Tabernaemontana</i> encontradas no Brasil.....	26
Tabela 3 -	Fracionamento do extrato hexânico (HE) de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC.....	80
Tabela 4 -	Reunião das frações obtidas pelo extrato hexânico de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A.DC.	80
Tabela 5 -	Sistema para preparo da curva dose-resposta dos extratos e frações de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC. frente ao teste de hemólise com eritrócitos <i>ex vivo</i>	92
Tabela 6-	Protocolo de diluição e administração dos extratos de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC. em ratos (n = 3) para determinação da toxicidade aguda (1º e 2º dia).....	94
Tabela 7-	Atribuição dos deslocamentos químicos (CDCl ₃ , 75 MHz) obtidos pela RMN de ¹³ C de SMG01 por comparação com os dados da literatura	112
Tabela 8-	Deslocamentos químicos apresentados por SMG02 no espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) em comparação com os dados da literatura (4).....	114
Tabela 9-	Tempo de retenção dos alcaloides de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC. identificado por cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas (CG-EM).....	115
Tabela 10-	Tempo de retenção das substâncias isoladas do extrato etanólico de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A.DC. obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	116
Tabela 11-	Teor de fenóis totais dos extratos obtidos das folhas de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A.DC.....	121
Tabela 12-	Teor de fenóis totais das frações aquosa (AqF), intermediária	

	(IF), hexânica (HF) e alcaloídica (AF) do extrato etanólico (EE) das folhas de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC., coletadas em março de 2007, em Brasília, DF.....	122
Tabela 13-	Teor de flavonoides nos extratos das folhas de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC.....	123
Tabela 14-	Teor de flavonoides das frações aquosa (AqF), intermediária (IF), hexânica (HF) e alcaloídica (FA) obtidas do extrato etanólico (EE) das folhas de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC., coletadas em março de 2007, em Brasília, DF.....	124
Tabela 15-	Inibição radicalar (%) pelo Método de DPPH dos extratos das folhas de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A.DC. em comparação com os controles.....	126
Tabela 16-	Atividade redutora dos extratos etanólico e hexânico (EE, HE) de <i>T. solanifolia</i> A. DC. com relação a quercetina (mg/mL) pelo método de fosfomolibdênio.....	127
Tabela 17-	Perfil antioxidante de extratos e frações de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A.DC. pelo método de β -caroteno/ácido linoleico.....	128
Tabela 18-	Citotoxicidade dos extratos brutos (etanólico, aquoso e hexânico) e da fração alcaloídica de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A.DC. frente aos náutiplos de <i>Artemia salina</i>	135
Tabela 19-	Protocolo de diluição e administração dos extratos de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC. em ratos (n= 3) para determinar a toxicidade aguda.....	136
Tabela 20-	Efeito dos extratos de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC. (2000 mg/Kg) administrados por via oral sobre os parâmetros bioquímicos do sangue em ratos submetidos a pesquisa de toxicidade pelo Protocolo 423 da OECD	137
Tabela 21-	Atividade antibacteriana dos extratos de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A DC. e do acetato de β -amirina pelo método de difusão em disco	141
Tabela 22-	Atividade antifúngica dos extratos de <i>Tabernaemontana</i>	

	<i>solanifolia</i> A. DC. e do acetato de β -amirina pelo método de difusão em disco	142
Tabela 23-	Atividade antibacteriana dos extratos de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC. e do acetato de β -amirina pelo método de difusão em cavidade.....	143
Tabela 24-	Atividade antifúngica dos extratos de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC. e do acetato de β -amirina pelo método de difusão em cavidade	143
Tabela 25-	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)/ Concentração fungicida mínima (CFM) dos extratos e do acetato de β - amirina isolado de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC.	144
Tabela 26-	Efeito dos extratos e do acetato de β -amirina isolado de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC. (Apocynaceae) em ratos Wistar submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado (300 segundos).....	145
Tabela 27-	Efeito dos extratos e do acetato de β -amirina isolado de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC. (Apocynaceae) nos parâmetros etológicos em ratos Wistars submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado (300 segundos).....	146
Tabela 28-	Tamanho médio do crescimento do hipocótilo e da da radícula de <i>Glycine max</i> L. submetidas a diversas concentrações dos extratos de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC.....	150
Tabela 29-	Parâmetros de atividade inseticida do extrato aquoso de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC. em <i>Anticarsia gemmatallis</i> H. mantidas em dieta artificial (Dourados - MS, 2011).....	154
Tabela 30-	Parâmetros de atividade inseticida do extrato hexânico de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC. em <i>Anticarsia gemmatallis</i> H. mantidas em dieta artificial (Dourados-MS, 2011).	154

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Representação do processo de obtenção dos extratos hexânico (HE) e etanólico (EE) das folhas de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC.	76
Esquema 2 - Representação da obtenção do extrato aquoso bruto (AqE) das folhas de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC.....	77
Esquema 3 - Representação da obtenção da fração alcaloídica das folhas de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC.	78
Esquema 4 - Fitoquímica do extrato hexânico das partes aéreas de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A.DC.	81
Esquema 5 - Representação da partição líquido-líquido do extrato etanólico (EE) de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC.....	84
Esquema 6 - Partição bifásica do extrato etanólico (EE) de <i>Tabernaemontana solanifolia</i> A. DC.....	85

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	- Alcaloide
AAPH	- Dicloridrato de 2,2'- azobis (2 – metilpropionamidina)
AcFr	- Fração acetato de etila da partição bifásica do extrato etanólico
AF	- Fração alcaloídica
ALT	- Alanina-aminotransferase
AqE	- Extrato aquoso
AqF	- Fração aquosa da partição trifásica do extrato etanólico
AST	- Aspartato-aminotransferase
BA	- Braços abertos
BC1	- Células de câncer de mama humano
BF	- Bolos fecais
BHI	- Brain heart infusion
BHT	- Hidroxibutitolueno
BuChE	- Enzima butirilcolinesterase
CBM	- Concentração bactericida mínima
CC	- Cromatografia em Coluna
CCD	- Cromatografia de camada delgada
CEP	- Comitê de Ética de Pesquisas envolvendo Seres Humanos
CFM	- Concentração fungicida mínima
CG	- Cromatografia gasosa
CLAE	- Cromatografia Líquida de alta eficiência
Col2	- Células de câncer de colo de útero
Dfr	- Fração diclorometano da partição bifásica do extrato etanólico
DL ₅₀	- Dose letal para 50% de indivíduos
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DPPH	- 2,2-difenil-1-picrilidrazila
EC ₅₀	- Concentração efetiva para reduzir 50% da atividade
ED ₅₀	- Dose efetiva para inibir 50% de atividade

EE	- Extrato etanólico
FBA	- Frequencia de entradas no braço aberto
FBF	- Frequencia de entradas no braço fechado
FE	- Fase estacinária
GRO	- <i>Grooming</i> (atividade exploratória no LCE)
HD	- <i>Head-dipping</i> (imersões de cabeça no LCE)
HE	- Extrato hexânico
HF	- Fração hexânica da partição trifásica do extrato etanólico
HFr	- Fração hexânica da partição bifásica do extrato etanólico
HT	- Células de fibrosarcoma humano
IF	- Fração intermediária da partição trifásica do extrato etanólico
IHS	- Índice hepatossomático
INPI	- International plant names index
IV	- Infravermelho
KB	- Células de carcinoma epidermóide oral
KBr	- Brometo de potássio
KM-12	- Células de câncer de colo humano
LCE	- Labirinto em Cruz Elevado
LNCaP	- Células de câncer de próstata humano
Lu1	- Células de câncer de pulmão humano
MCF-7	- Células de adenocarcinoma de mama humano
MDR	- Células multi-drogas resistentes
Mel2	- Células de melanoma humano
NCCLS	- <i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
NCI-H460	- Células de câncer de pulmão humano
NP/PEG	- Difetilboratoaminoetanol e polietilenoglicol
OECD	- Organização para cooperação e desenvolvimento econômico
P	- Compostos fenólicos
P388	- Leucemia linfocítica em murinos
PA	- Padrão analítico

PBS	- Solução salina tampão fosfato monobásico
PC-3	- Células de câncer de próstata humano
PF	- Peso do fígado
ppm	- Parte por milhão
PT	- Peso total do animal
R	- Revelador
REA	- <i>Rearings</i> (ato de levantar-se no LCE)
RMN de ¹³ C	- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN de ¹ H	- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RPM	- Rotação por minuto
RPMI-8226	Células de mielomas
SAP	- <i>Strech attend posture</i>
SF-268	- Células de glioblastoma humano
SFE	- Extrato superfluido
SK-BR3	- Células de carcinoma de pulmão humano
SNC	- Sistema Nervoso Central
T	- Terpenos e esteróis
TBA	- Tempo dispendido no braço aberto
TBF	- Tempo dispendido no braço fechado
TMS	- Tetrametilsilano
U373	- Células de glioma humano
UFC	- Unidade formadora de colônia
UV	- Ultravioleta
VEGF	- Fator de crescimento endotelial
Vit. C	- Vitamina C
ZR-75-1	- Câncer de mama dose dependente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 CONSTITUINTES QUÍMICOS DE ESPÉCIES BRASILEIRAS DE <i>Tabernaemontana</i>	30
1.1.1 Alcaloides	30
1.1.2 Terpenos e esteróis	53
1.1.3 Compostos fenólicos.....	60
1.1.4 Outros constituintes	60
1.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ESPÉCIES BRASILEIRAS DE <i>Tabernaemontana</i>	63
1.2.1 Atividade antioxidante	63
1.2.2 Atividade anti-inflamatória	63
1.2.3 Efeito fitotóxico.....	64
1.2.4 Atividade antiprotozoária	64
1.2.5 Citotoxicidade.....	65
1.2.6 Atividade antimicrobiana	66
1.2.7 Inibição enzimática.....	67
1.2.8 Outras atividades.....	68
2 OBJETIVOS	70
2.1 OBJETIVO GERAL	70
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	70
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	71
3.1 MÉTODOS GERAIS.....	71
3.1.1 Padrões e reagentes.....	71
3.1.2 Cromatografia em camada delgada.....	71
3.1.2.1 Fase estacionária (FE).....	71
3.1.2.2 Reveladores.....	72
3.1.3 Cromatografia em coluna (CC).....	73

3.1.3.1 Sílica gel 60 A (70 - 230 <i>Mesh</i>).....	73
3.1.4 Equipamentos e condições de análises.....	73
3.1.4.1 Espectrometria no ultravioleta.....	73
3.1.4.2 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN de ¹ H e ¹³ C).....	74
3.1.4.3 Espectrometria no Infravermelho.....	74
3.2 ESTUDO QUÍMICO.....	74
3.2.1 Material botânico	74
3.2.2 Obtenção dos extratos	75
3.2.2.1 Extratos hexânico (HE) e etanólico (EE)	75
3.2.2.2 Extrato aquoso (AqE).....	76
3.2.2.3 Fração alcaloídica (AF)	77
3.2.2.3.1 <i>Análise da Fração alcaloídica por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)</i>	<i>78</i>
3.2.2.3.2 <i>Análise da Fração alcaloídica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....</i>	<i>79</i>
3.2.3 Fitoquímica do extrato hexânico (HE)	79
3.2.3.1 <i>Fração 76 - 83 (SMG01)</i>	<i>80</i>
3.2.3.2 <i>Fração 110 – 122 (SMG02).....</i>	<i>81</i>
3.2.3.3 <i>Fração 86 (SMG03)</i>	<i>82</i>
3.2.3.4 <i>Fração 93 - 95 (SMG04)</i>	<i>82</i>
3.2.3.5 <i>Fração 87 (SMG05)</i>	<i>82</i>
3.2.3.6 <i>Fração 110 - 122 (SMG06).....</i>	<i>83</i>
3.2.3.7 <i>Fração 79 (SMG07)</i>	<i>83</i>
3.2.4 Fitoquímica do Extrato etanólico (EE): partição trifásica.....	83
3.2.5 Fitoquímica do Extrato etanólico (EE): partição bifásica	84
3.2.5.1 <i>Análise das frações em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).</i>	<i>86</i>
3.2.6 Determinação do teor de fenóis totais	86
3.2.7 Determinação do teor de flavonoides	87
3.3 ESTUDO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	88
3.3.1 Ensaio de atividade antioxidante.....	88
3.3.1.1 Método de redução do complexo de fosfomolibdênio	88

3.3.1.2 Avaliação da inibição da peroxidação lipídica empregando o método β -caroteno/ ácido linoléico.....	89
3.3.1.3 Atividade seqüestradora do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) ($C_{18}H_{12}N_5O_6$)	90
3.3.1.4 Atividade antioxidante <i>ex vivo</i> utilizando-se eritrócitos humanos	91
3.3.2 Ensaios de toxicidade	93
3.3.2.1 Citotoxicidade frente aos náuplios de <i>Artemia salina</i> L.....	93
3.3.2.2 Toxicidade <i>in vivo</i>	94
3.3.2.2.1 Análises dos parâmetros bioquímicos.....	95
3.3.2.2.2 Análises histopatológicas.....	95
3.3.3 Pesquisa de propriedades antimicrobianas <i>in vitro</i>	96
3.3.3.1 Técnica de difusão	96
3.3.3.2 Técnica de Microdiluição.....	98
3.3.4 Testes de fitotoxicidade	99
3.3.4.1 Avaliação da germinação	99
3.3.4.2 Avaliação do crescimento	100
3.3.4.3 Análise estatística.....	100
3.3.5 Atividade inseticida com <i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)	101
3.3.6 Avaliação comportamental no labirinto em cruz elevado (LCE)	102
3.3.7 Anatomia foliar	105
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	106
4.1 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS PRESENTES NO EXTRATO HEXÂNICO.....	106
4.1.1 Identificação estrutural de SMG01	106
4.1.2 Identificação estrutural de SMG02	112
4.2 IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS NA FRAÇÃO ALCALOÍDICA.....	115
4.3 IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS NO EXTRATO AQUOSO E ETANÓLICO.....	116
4.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS	120
4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONÓIDES.....	123

4.6 DETERMINAÇÃO DE PROPRIEDADES ANTIOXIDANTE.....	125
4.6.1 Avaliação do efeito de “seqüestro” de radical empregando o radical livre 2,2- difenil–1 picrilidrazila (DPPH') (C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆).....	125
4.6.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio.....	127
4.6.3 Avaliação da inibição da peroxidação lipídica empregando o método β-caroteno/ ácido linoleico	128
4.6.4 Atividade antioxidante <i>ex vivo</i> utilizando eritrócitos humanos.....	129
4.7 ENSAIOS DE TOXICIDADE.....	134
4.7.1 Teste de citotoxicidade a náuplios de <i>Artemia salina</i> L.....	134
4.7.2 Toxicidade aguda oral.....	135
4.7.2.1 Análises bioquímicas.....	136
4.7.2.2 Análises histopatológicas.....	137
4.8 PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS.....	140
4.8.1 Método de difusão em disco.....	141
4.8.2 Método de difusão em cavidade.....	142
4.8.3 Método de microdiluição	144
4.9 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)	144
4.10 TESTES DE FITOTOXICIDADE.....	147
4.10.1 Fitotoxicidade para <i>Lactuca sativa</i> L.	148
4.10.2 Fitotoxicidade para <i>Glycine max</i> L. (soja)	150
4.11 ATIVIDADE INSETICIDA	153
4.12 ANATOMIA FOLIAR.....	155
4.12.1 Pecíolo.....	155
4.12.2 Limbo	156
5 CONCLUSÃO	160
6 PERSPECTIVAS	162
ANEXO 1 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS DA UNIGRAN.....	163
ANEXO 2 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA PARA EXPERIMENTAÇÃO	

ANIMAL.....	164
REFERÊNCIAS	165

1 INTRODUÇÃO

Inúmeras espécies vegetais compõem o campo de pesquisa com produtos naturais. A investigação científica de propriedades biológicas é fundamental para possibilitar a identificação de moléculas ativas, bem como para descobrir novas substâncias que podem ser úteis na indústria farmacêutica.

A família Apocynaceae é destaque pela produção de alcaloides (1) compreendendo 424 gêneros (2) e mais de 3700 espécies, distribuídas em zonas tropicais e subtropicais, abrangendo as Américas, África e Ásia. No Brasil, existe registro de 80 gêneros da qual faz parte pelo menos 850 espécies (6), sendo 33 endêmicas do Brasil. Dentre os gêneros, *Tabernaemontana* é um dos produtores de uma grande variedade desses compostos (1) e possui algumas espécies nativas do Brasil, como *T. angulata*, *T. hystrix*, *T. salzmännii* e *T. solanifolia* A. DC. (7), de acordo com a Lista de Espécies da Flora do Brasil (4), com Trópicos® (5) e com o banco de dados do *International Plant Names Index* (IPNI) (3) que ainda não foram exploradas do ponto de vista químico e biológico.

Diante da necessidade de ampliar essas informações, o objetivo deste trabalho foi explorar o potencial fitoquímico e biológico de *T. solanifolia* A. DC.

Inicialmente, *Tabernaemontana solanifolia* (Figura 1) foi denominada de *Peschiera affinis* (Muell. Arg.) Miers var. *campestris* Rizz por Rizzini. Mais tarde chegou-se à conclusão de que não se tratava de mais uma variedade e sim de uma nova espécie, *Peschiera campestris* (Rizz.) Rizz (8), sendo, posteriormente, renomeada como *Peschiera solanifolia* var. *fallax* (Muell. Arg) L. Allorge. Isso porque, a classificação botânica de *Tabernaemontana* tem sido objeto de controvérsias (2, 9-10). Entretanto, uma nova classificação associando a taxonomia de *Linnaeane* à filogenética tem sido proposta (11). Assim, esse gênero pode ser descrito como *Ervatamia* (Ásia e Austrália), *Peschiera* (Brasil) e *Tabernaemontana* (América do Sul e América Central) (1), sendo

este último a nomenclatura atual. A caracterização taxonômica de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. está descrita na Tabela 1.



Figura 1 – *Tabernaemontana solanifolia* A.DC. (a,b), abril/ 2009, Brasília - DF.

(Foto cedida por Sueli Maria Gomes)

Tabela 1 – Classificação taxonômica de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC.

Táxons	Classificação (7)	Espécie em estudo
Família	Apocynaceae	Apocynaceae
Sub-família	Rauvolfioideae*	Rauvolfioideae*
Tribo	Tabernaemontaneae	Tabernaemontaneae
Gênero	<i>Tabernaemontana</i>	<i>Tabernaemontana</i>
Espécie	<i>solanifolia</i> A. DC.	<i>solanifolia</i> A. DC.
Distribuição	Bahia, Serra Jacobina	Brasília
Sinonímias heterotípicas	<i>T. fallax</i> (Muell. Arg.) Miers <i>T. accedens</i> Muell. Arg. <i>T. warminguii</i> Muell. Arg. <i>T. nervosa</i> Glaz. <i>T. affinis</i> var. <i>campestris</i> Rizz.	<i>T. fallax</i> Mull Arg. <i>T. affinis</i> var. <i>campestris</i> (Rizz) Rizz
Dados da coleta	-	01/03/2007 – Brasília (DF), Asa Norte, cerrado perto da Finatec.
Vegetação	-	Cerrado
Exsicata	-	Universidade de Brasília (M. Gomes & R. G. Tostes 846)

(*) Classificação de acordo com Sennblad e Bremer (2002) (11)

Do ponto de vista fitoquímico, dentre os constituintes químicos identificados de *T. solanifolia* estão isovoacangina, isovoacristina, coronaridina, voacangina, voacangina hidroxindolenina, heineanina, voacamina e voachalotina (8).

Devido à escassez de estudos sobre essa espécie, objeto de investigação do presente trabalho, optou-se em descrever outras espécies de *Tabernaemontana*, endêmicas do Brasil (Tabela 2) que têm sido investigadas em relação ao potencial

biológico, devido aos seus constituintes fitoquímicos, como *Tabernaemontana angulata* (12), *T. fuchsiaefolia* L (13), *T. hystrix* Steud (14-15), *T. salzmännii* A. DC. (16), *T. laeta* Mart. (17) e *T. riedellii* (18), sendo *T. catharinensis* a espécie mais estudada (19-36).

Tabela 2 - Espécies de *Tabernaemontana* encontradas no Brasil (3-5) (continua)

Espécies	Sinonímias	Nome popular
<i>Tabernaemontana albiflora</i> (Miq.) Pulle*	<i>Bonafousia albiflora</i> (Miq.) Boiteau & L. Allorge; <i>Echites albiflorus</i> (Miq.) Miers; <i>Peschiera albiflora</i> Miq.; <i>Taberna albiflora</i> (Miq.) Markgr.	
<i>Tabernaemontana amygdalifolia</i> Jacq.*	<i>Tabernaemontana acapulcensis</i> Miers; <i>T. amygdalifolia</i> var. <i>glaucophylla</i> L. Allorge; <i>T. amygdalifolia</i> var. <i>obtusiloba</i> A. DC.; <i>T. deamii</i> Donn. Sm.; <i>T. dichotoma</i> Sessé & Moc.; <i>T. jasminoides</i> Kunth; <i>T. nereifolia</i> Vahl; <i>T. occidentalis</i> Miers; <i>Cestrum nervosum</i> Mill.; <i>Malouetia jasminoides</i> (Kunth) A. DC.; <i>Rauvolfia laevigata</i> Willd. ex Roem. & Schult.	berraco de la costa; jasmim do monte; jasmim doperro; huevos de toro(37)
<i>Tabernaemontana angulata</i> Mart.*#	<i>Anacampta angulata</i> (Mart. ex Müll.Arg.) Miers; <i>Bonafousia angulata</i> (Mart. ex Müll. Arg.) Boiteau & L. Allorge; <i>B. silvae</i> L. Allorge.	Pocoró (38), jasmim-da-mata; jasmim-de-cachorro (39)
<i>Tabernaemontana brasiliensis</i> Leeuwenb.*#	<i>Stemmadenia brasiliensis</i> Leeuwenb.	
<i>Tabernaemontana catharinensis</i> A.DC.*	<i>Tabernaemontana acuminata</i> Müll. Arg.; <i>T. affinis</i> Müll. Arg (<i>Peschiera affinis</i> (Müll. Arg) Miers); <i>T. affinis</i> Müll. Arg.; <i>T. affinis</i> var. <i>lanceolata</i> Müll. Arg.; <i>T. australis</i> Müll. Arg.; <i>T. hilariana</i> Müll. Arg. (<i>P. australis</i> var. <i>hilariana</i> (Müll. Arg.) L. Allorge); <i>T. hybrida</i> Hand.-Mazz.; <i>T. salicifolia</i> Hand. Mazz.; <i>P. acuminata</i> (Müll. Arg.) Miers; <i>P. affinis</i> var. <i>acuminata</i> L. Allorge; <i>P. albidiflora</i> Miers; <i>P. australis</i> (Müll. Arg.) Miers; <i>P. catharinensis</i> (A. DC.) Miers; <i>P. hilariana</i> (Müll. Arg.) Miers.	leiteira-dois-irmãos, esperta, jasmim, casca de cobra; palo de víbora (40), leiteira de vaca, grão de galo (41)
<i>Tabernaemontana coriacea</i> Link ex Roem. & Schult.*	<i>Tabernaemontana acutissima</i> Müll. Arg.; <i>T. brachyantha</i> Woodson; <i>T. luciliae</i> Leeuwenb.; <i>T. prancei</i> (L. Allorge) Leeuwenb.; <i>T. riedellii</i> Müll. Arg.; <i>T. rubrostriolata</i> Mart. ex Müll. Arg.; <i>T. submollis</i> Mart. ex Müll.Arg; <i>Anacampta coriacea</i> (Link ex Roem. & Schult.) Markgr. <i>A. acutissima</i> (Müll.Arg.) Miers; <i>A. congesta</i> Miers; <i>A. pendula</i> Markgr.; <i>A. riedellii</i> (Müll. Arg.) Markgr.; <i>A. submollis</i> Miers; <i>Bonafousia submollis</i> (Mart. ex Müll. Arg.) Boiteau & L. Allorge; <i>B. coriacea</i> (Link ex Roem. & Schult.) Boiteau & L. Allorge <i>B. brachyantha</i> Boiteau & L. Allorge; <i>B. pendula</i> (Markgr.) Boiteau & L. Allorge; <i>B. prancei</i> L. Allorge.	

Espécies	Sinonímias	Nome popular
<i>Tabernaemontana cumata</i> Leeuwenb.*#	<i>Tabernariedelii</i> (Müll. Arg.) Miers. <i>Anartia cuspidata</i> (Rusby) L. Allorge; <i>Anacampta coriacea</i> (Link ex Roem. & Schult.) Markgr.; <i>A. kuhlmannii</i> Markgr.; <i>A. tenuicornuta</i> Markgr.; <i>Woytkowskia kuhlmannii</i> (Markgr.) L. Allorge; <i>W. spermatochorda</i> Woodson.	
<i>Tabernaemontana cymosa</i> Jacq.*	<i>Tabernaemontana arcuata</i> Ruiz & Pav.; <i>T. buchtienii</i> H. Winkl.; <i>T. concinna</i> (Miers) J. F. Macbr.; <i>T. mapirensis</i> Rusby; <i>T. psychotriifolia</i> Kunth; <i>T. umbrosa</i> Kunth; <i>Merizadenia arcuata</i> (Ruiz & Pav.) Miers; <i>Peschiera arcuata</i> (Ruiz & Pav.) Markgr.; <i>P. buchtienii</i> (H. Winkl.) Markgr.; <i>P. concinna</i> Miers; <i>P. cymosa</i> (Jacq.) Dugand; <i>P. psychotriifolia</i> (Kunth) Miers; <i>P. puberiflora</i> Miers; <i>P. umbrosa</i> (Kunth) Miers; <i>Taberna cymosa</i> (Jacq.) Miers.	grão-de-galo
<i>Tabernaemontana disticha</i> A.DC.*	<i>Anacamptadisticha</i> (A.DC.) Markgr.; <i>Bonafousia disticha</i> (A.DC.) Boiteau & L. Allorge; <i>Taberna disticha</i> (A.DC.) Miers.	
<i>Tabernaemontana flavicans</i> Willd. Ex Roem & Schult.*	<i>Tabernaemontana oblongifolia</i> A. DC.; <i>T. olivacea</i> Müll. Arg.; <i>Anartia flavicans</i> (Willd. ex Roem. & Schult.) Miers; <i>A. glabrata</i> Miers; <i>A. oblongifolia</i> (A. DC.) Markgr.; <i>A. olivacea</i> (Müll. Arg.) Markgr.; <i>Bonafousia latiflora</i> Miers; <i>B. oblongifolia</i> (A.DC.) Miers; <i>B. olivacea</i> (Müll. Arg.) Miers; <i>Taberna disparifolia</i> Miers.	
<i>Tabernaemontana grandiflora</i> Jacq.*#	<i>Stemmadenia grandiflora</i> (Jacq.) Miers; <i>S. pauciflora</i> Woodson; <i>S. pennellii</i> Woodson.	
<i>Tabernaemontana heterophylla</i> Vahl.*	<i>Tabernaemontana holothuria</i> (Markgr.) Leeuwenb.; <i>T. stenoloba</i> Müll. Arg.; <i>T. tenuiflora</i> (Poepp.) Müll. Arg.; <i>T. unguiculata</i> Rusby; <i>Peschiera cuspidata</i> Miers; <i>P. diversifolia</i> Miq.; <i>P. heterophylla</i> (Vahl) Miers; <i>P. laeviflora</i> L. Allorge; <i>P. puberiflora</i> Miers; <i>P. stenoloba</i> (Müll. Arg.) Miers; <i>P. tenuiflora</i> Poepp.; <i>Stenosolen eggertii</i> fo. <i>glabra</i> Markgr.; <i>S. eggertii</i> fo. <i>pubescens</i> Markgr.; <i>S. eggertii</i> Markgr.; <i>S. grandifolius</i> Markgr.; <i>S. heterophyllus</i> (Vahl) Markgr.; <i>S. holothuria</i> Markgr.; <i>S. stenolobus</i> (Müll. Arg.) Markgr.	
<i>Tabernaemontana hystrix</i> Steud.*#	<i>Tabernaemontana collina</i> Gardner; <i>T. echinata</i> Vell.; <i>T. fuchsiaefolia</i> A. DC.; <i>T. gaudichaudii</i> A. DC.; <i>T. gracilis</i> Müll. Arg.; <i>T. gracillima</i> (Miers) Pichon; <i>T. lundii</i> A. DC.; <i>Peschiera fuchsiiifolia</i> (A. DC.) Miers; <i>P. gracillima</i> Miers; <i>P. granulosa</i> Miers; <i>P. hystrix</i> A. DC.; <i>P. lundii</i> (A. DC.) Miers; <i>P. solandri</i> Miers.	Leiteiro, gancheira
<i>Tabernaemontana juruana</i> (Markg.) K.Schun	<i>Bonafousia juruana</i> Markgr.; <i>B. siphilitica</i> (L.F.) Allorge var. <i>juruana</i> .	
<i>Tabernaemontana laeta</i> Mart.*#	<i>Tabernaemontana laeta</i> var. <i>densa</i> Müll. Arg.; <i>T. laeta</i> var. <i>minor</i> Müll. Arg.; <i>T. laeta</i> var. <i>pubiflora</i> Müll. Arg.; <i>T. spixiana</i> Martius ex Muell. Arg.; <i>Peschiera breviflora</i> (Müll. Arg.) Miers; <i>P. florida</i>	Esperta(42), leiteira (43)

Tabela 2 - Espécies de *Tabernaemontana* encontradas no Brasil (5-7) (continuação)

Espécies	Sinonímias	Nome popular
<i>Tabernaemontana lagenaria</i> Leeuwenb.*	Miers; <i>P. laeta</i> (Mart.) Miers; <i>P. spixiana</i> (Martius ex Muell. Arg.) Miers.	Grão-de-galo
<i>Tabernaemontana linkii</i> A.DC.*	<i>Tabernaemontana benthamiana</i> Müll. Arg.; <i>T. multiflora</i> Link ex Roem. & Schult.; <i>T. muricata</i> Willd. ex Roem. & Schult.; <i>T. myriantha</i> Britton ex Rusby; <i>Peschiera linkii</i> (A. DC.) Miers; <i>P. benthamiana</i> var. <i>myriantha</i> (Britton ex Rusby) L. Allorge; <i>P. benthamiana</i> (Müll. Arg.) Markgr.; <i>P. multiflora</i> Spruce ex Miers; <i>P. myriantha</i> (Britton ex Rusby) Markgr.; <i>P. ochracea</i> Miers.	janaguba
<i>Tabernaemontana lorifera</i> (Miers) Leeuwenb.*	<i>Bonafousia lorifera</i> (Miers) Boiteau & L. Allorge; <i>Peschiera lorifera</i> Miers.	
<i>Tabernaemontana macrocalyx</i> Müll.Arg.*	<i>Tabernaemontana inaequilateralis</i> (Woodson) Pichon; <i>T. benthamiana</i> Mart. ex Müll. Arg.; <i>T. muelleriana</i> Mart. ex Müll. Arg.; <i>Anacampta macrocalyx</i> (Müll. Arg.) Markgr.; <i>A. muelleriana</i> (Mart. ex Müll. Arg.) Markgr.; <i>Bonafousia macrocalyx</i> (Müll. Arg.) Boiteau & L. Allorge; <i>B. morettii</i> L. Allorge; <i>B. muelleriana</i> (Mart. ex Müll. Arg.) Boiteau & L. Allorge; <i>Codonem mamacrocalyx</i> (Müll. Arg.) Miers; <i>C. calycinum</i> Miers; <i>Quadricasa eacaquetensis</i> Woodson; <i>Q. inaequilateralis</i> Woodson.	
<i>Tabernaemontana markgrafiana</i> J.F.Macbr.*	<i>Bonafousia longituba</i> Markgr.	sanango
<i>Tabernaemontana maxima</i> Markgr.*	<i>Anacampta maxima</i> (Markgr.) Markgr.; <i>Bonafousia maxima</i> (Markgr.) Boiteau & L. Allorge.	
<i>Tabernaemontana muricata</i> Link ex Roem.&Schult.*#	<i>Tabernaemontana macrophylla</i> Müll. Arg.; <i>T. rigida</i> (Miers) Leeuwenb.; <i>Anacampta rigida</i> (Miers) Markgr.; <i>Bonafousia muricata</i> (Link ex Roem. & Schult.) Markgr.; <i>Peschiera muricata</i> (Link ex Roem. & Schult.) A. DC.; <i>Phrissocarpus rigidus</i> Miers.	
<i>Tabernaemontana palustris</i> Markgr.*	<i>Tabernaemontana rimulosa</i> Woodson; <i>T. tenuis</i> Monach; <i>Anacampta palustris</i> (Markgr.) Markgr.; <i>Bonafousia palustris</i> (Markgr.) Boiteau & L. Allorge; <i>B. rimulosa</i> (Woodson) Boiteau & L. Allorge.	
<i>Tabernaemontana paucifolia</i> Müll.Arg.	<i>Macoubea guianensis</i> Aubl.	
<i>Tabernaemontana rupicola</i> Benth.*	<i>Tabernaemontana rupicola</i> var. <i>oblongifolia</i> Müll. Arg.; <i>T. rupicola</i> var. <i>poepigii</i> Müll. Arg.; <i>T. rupicola</i> var. <i>sprucei</i> Müll. Arg.; <i>T. sessilifolia</i> Baker; <i>T. sessilifolia</i> Klotzsch; <i>T. versicolor</i> Woodson; <i>Anacampta rupicola</i> (Benth.) Markgr.; <i>Bonafousia polyneura</i> Miers; <i>B. rariflora</i> Miers; <i>B. rupicola</i> (Benth.) Miers; <i>B. rupicola</i> var. <i>oblongifolia</i> (Müll. Arg.) L. Allorge; <i>B. rupicola</i> var. <i>versicolor</i> (Woodson) L. Allorge.	
<i>Tabernaemontana salzmännii</i> A.DC.*	<i>Tabernaemontana rauwolfiae</i> A. DC.; <i>T. salzmännii</i> var. <i>lanceolata</i> Müll. Arg.; <i>T. salzmännii</i> var.	

Tabela 2 - Espécies de *Tabernaemontana* encontradas no Brasil (3-5) (conclusão)

Espécies	Sinonímias	Nome popular
<i>Tabernaemontana sananho</i> Ruiz & Pav.*	<i>longifolia</i> Müll. Arg.; <i>Peschiera salzmannii</i> (A. DC.) Miers. <i>Tabernaemontana poeppigii</i> Müll. Arg.; <i>Bonafousia sananho</i> (Ruiz & Pav.) Markgr.; <i>Merizadenia sananho</i> (Ruiz & Pav.) Miers; <i>Taberna poeppigii</i> (Müll. Arg.) Miers.	abiu bravo, sanango
<i>Tabernaemontana siphilitica</i> (L.f.) Leeuwenb.*	<i>Tabernaemontana guyanensis</i> Müll. Arg.; <i>T. hirtula</i> Mart. ex Müll. Arg.; <i>T. juruana</i> (Markgr.) Schumann ex J. F. Macbride; <i>T. killipii</i> Woodson; <i>T. longifolia</i> Benth; <i>T. repanda</i> E. Mey. ex Steud.; <i>T. speciosa</i> Lam.; <i>T. speciosa</i> Poir.; <i>T. tessmannii</i> (Markgr.) J.F. Macbr; <i>T. tetrastachya</i> Kunth; <i>Anacampta hirtula</i> (Mart. ex Müll. Arg.) Miers; <i>A. longifolia</i> (Benth.) Miers; <i>Bonafousia guyanensis</i> (Müll. Arg.) Miers; <i>B. hirtula</i> (Mart. ex Müll. Arg.) Markgr.; <i>B. juruana</i> Markgr.; <i>B. killipii</i> (Woodson) Markgr.; <i>B. siphilitica</i> (L. f.) L. Allorge; <i>B. siphilitica</i> var. <i>hirtula</i> (Mart. ex Müll. Arg.) L. Allorge <i>B. siphilitica</i> var. <i>juruana</i> (Markgr.) L. Allorge; <i>B. speciosa</i> (Poir.) Boiteau; <i>B. tessmannii</i> Markgr.; <i>B. tetrastachya</i> (Kunth) Markgr.; <i>Echites siphilitica</i> L. f.; <i>Malouetia tetrastachya</i> (Kunth) Miers.	
<i>Tabernaemontana solanifolia</i> A.DC.*#	<i>Tabernaemontana affinis</i> var. <i>campestris</i> Rizzini; <i>T. accedens</i> Müll. Arg (<i>Bonafousia albiflora</i> (Miq.) Boiteau & L. Allorge); <i>T. fallax</i> Müll. Arg.; <i>T. nervosa</i> Glaz.; <i>T. warmingii</i> Müll. Arg.; <i>Peschieria campestris</i> (Rizzini) Rizzini; <i>P. solanifolia</i> A.DC. Miers.	Mata-pasto
<i>Tabernaemontana undulata</i> Vahl*	<i>Tabernaemontana albescens</i> Rusby; <i>T. meyeri</i> G. Don; <i>T. obliqua</i> (Miers) Leeuwenb.; <i>T. perrottetii</i> A. DC.; <i>Anacampta albescens</i> (Rusby) Markgr.; <i>Anartia meyeri</i> (G. Don) Miers; <i>Bonafousia obliqua</i> Miers; <i>B. perrottetii</i> (A. DC.) Miers; <i>B. undulata</i> (Vahl) A. DC.; <i>B. undulata</i> var. <i>ovalifolia</i> Miers; <i>Echites brasiliensis</i> Thunb.; <i>Peschiera surinamensis</i> Miq.; <i>Stemmadenia nervosa</i> Standl. & L.O. Williams.	
<i>Tabernaemontana vanheurckii</i> Müll.Arg.*	<i>Tabernaemontana macrosiphon</i> Herzog; <i>T. unguiculata</i> Rusby; <i>Peschiera blanda</i> Miers; <i>P. lingulata</i> Miers; <i>P. vanheurckii</i> (Müll. Arg.) L. Allorge; <i>Stenosolen macrosiphon</i> (Herzog) Markgr.; <i>S. vanheurckii</i> (Müll. Arg.) Markgr.	

*nativa ; **América tropical; # endêmica

As espécies do gênero *Tabernaemontana* são ricas em alcaloides indólicos e bis-indólicos, compostos que são utilizados como marcadores químicos, considerando que sua classificação pelas características morfológicas é dificultada pela existência de inúmeras sinonímias. Centenas de alcaloides têm sido identificadas, das flores até a

raiz. No entanto, terpenos, esteróis e compostos fenólicos também podem ser isolados (1). Os alcaloides têm sido os responsáveis por inúmeras atividades biológicas, como atividade antitumoral e anti-hipertensiva (44); atividade antimicrobiana (45), efeito cardiovascular (46), atividade antileishmania e antibacteriana (47).

Abaixo é apresentada a ocorrência desses constituintes químicos e a relação das espécies em que foram isolados e identificados, bem como as atividades biológicas já descritas.

1.1. CONSTITUINTES QUÍMICOS DE ESPÉCIES BRASILEIRAS DE *Tabernaemontana*

1.1.1 Alcaloides

O extrato benzênico das raízes e o extrato etanólico da casca do caule, frutas verdes e maduras, bem como das sementes de *T. catharinensis* (sinonímia *T. hilariana*) revelou a presença de voacangina (**A1a**), coronaridina (**A1b**), 3-oxocoronaridina (**A1c**), isovoacangina (**A1d**), 3-hidroxicoronaridina (**A1e**), 3-hidroxiwoacangina (**A1f**), voacangina hidroxindolenina (**A2a**), voacangina pseudoindoxila a (**A3a**), coronaridina pseudoindoxila a (**A3b**), tetrafilicina (**A4**), catarantina (**A5**), ibogamina (**A6a**) e tabernantina (**A6b**) (48-50). Voacangina (**A1a**), coronaridina (**A1b**), 3-oxocoronaridina (**A1c**), voacangina hidroxindolenina (**A2a**) e ibogamina (**A6a**) também foram isolados do extrato etanólico da casca da raiz, além da heineanina (**A1g**), voacristina (**A1h**), coronaridina hidroxindolenina (**A2b**), 3-hidroxicoronaridina hidroxindolenina (**A2d**), voacristina hidroxindolenina (**A2f**), vobasina (**A7a**) e voachalotina (**A8a**) (Plancha 1, página 36) (23).

Das sementes de *T. catharinensis* (sinonímia *Peschiera australis*) foram isolados os alcaloides indólicos coronaridina (**A1b**), tabersonina (**A17**), olivacina (**A11a**), coronaridina hidroxindolenina (**A2b**), catarinensina (**A48**), decarbometoxivoacamina

(**A49a**) e tabernamina (**A29a**) (51). Coronaridina (**A1b**) e tabersonina (**A17**) foram identificadas do óleo das sementes (52).

A extração alcaloídica das raízes de *T. catharinensis* (sinonímia *P. affinis*) forneceu voacristina (**A1h**), iboxigaina (**A1m**) e afinisina (**A8b**); do extrato hexânico foram isoladas voacangina (**A1a**) e coronaridina (**A1b**). Do extrato etanólico das sementes foram isoladas voacristina hidroxindolenina (**A2f**) (32). Do extrato etanólico das raízes de *T. catharinensis* (sinonímia *P. affinis*) foram isolados 19-epi-voacristina (**A1o**) (53). Esses alcaloides também foram isolados do extrato metanólico das cascas das raízes e do caule, além de voacangina (**A1a**), coronaridina (**A1b**), ibogaina (**A1l**), afinisina (**A8b**), 19-epi-heineanina (**A10a**) e 19-hidroxiibogamina (**A15f**) (53). Também foram isoladas olivacina (**A11a**) (53-55) e derivados de 6*N*-hidroxilolivacina (**A11b**) e 2*N*-oxidoolivacina (**A11c**) (54).

Das cascas das raízes de *T. catharinensis* foram isolados doze alcaloides indólicos: voacangina (**A1a**), coronaridina (**A1b**), 3-oxocoronaridina (**A1c**), heineanina (**A1g**), voacristina (**A1h**), voacangina hidroxindolenina (**A2a**), coronaridina hidroxindolenina (**A2b**), 19-epi-voacristina hidroxindolenina (**A2c**), 3-hidroxicoronaridina hidroxindolenina (**A2d**), ibogamina (**A6a**), vobasina (**A7a**) e voachalotina (**A8a**) (56), 12-metoxi-4-metilvoachalotina (**A9**) (57). Da casca do caule foram isolados voacangina (**A1a**), coronaridina (**A1b**), ibogaina (**A1l**) e voachalotina (**A8a**) (30).

Análises do extrato clorofórmico bruto a partir dos talos de *T. catharinensis* (sinonímia *T. australis*) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) sugeriram a presença de voacangina (**A1a**), coronaridina (**A1b**), voacangina hidroxindolenina (**A2a**), rupicolina (**A3a**), ibogamina (**A6a**), voachalotina (**A8a**), ibogalina (**A15d**) e afinisina (**A8b**) (58).

Do extrato diclorometano das cascas das raízes de *T. salzmännii* foram isoladas voacangina (**A1a**), coronaridina (**A1b**), 3-oxocoronaridina (**A1c**), voachalotina (**A8a**) 19-epi-heineanina (**A10a**) e olivacina (**A11**) (16). Da extração alcaloídica das folhas foram isolados isovoacangina (**A1d**), isovoacristina (**A1i**), (3*S*)-hidroxiisovoacangina (**A1j**) (16). Voacangina (**A1a**) e coronaridina (**A1b**) têm sido isolados do extrato etanólico do caule de *T. angulata* (59).

Da casca do caule de *T. amygdalifolia* (sinonímia *T. dichotoma*) foram isolados monogagaina (**A12**) (60), coronaridina (**A1b**), 3-oxocoronaridina (**A1c**), 3,19(R)-oxocoronaridina (**A1r**), ibogamina (**A6a**), vobasina (**A7a**), perivina (**A7e**), 19(R)-heineanina (**A10a**), voacamina (**A28a**), 3'(R/S)-hidroxivoacamina (**A28b**), tabernamina (**A29a**), 3'R/S-hidroxi-N₄-dimetiltabernamina (**A29b**), N₄-dimetiltabernamina (**A29c**), 3'(R/S)-hidroxitabernamina (**A29d**), (-)-aparicina (**A59**), 3-cetopropil-coronaridina (**A60**), isometuenina (**A62**), ervahanina A (**A64a**), 3'(R/S)-hidroxi-N₄-dimetilervahanina A (**A64b**) e B (**A65b**) (45). De *T. amygdalifolia* também foram isolados homocilindrocarpidina (**A71a**), 19-dimetoxi-homocilindrocarpidina (**A71b**) e 10-oxocilindrocarpidina (**A71c**) (61).

A fração clorofórmica do extrato alcaloídico das frutas mostrou presença de coronaridina (**A1b**), vobasina (**A7a**), 19(R)-epiheineanina (**A10a**), voafillina (**A35a**), 12-metoxivoafillina (**A35b**), (-)-aparicina (**A59**), 3-cetopropilcoronaridina (**A60**), dichomina (**A61**), isometuenina (**A62**), valesamina (**A63a**) e O-acetil-valesamina (**A63b**) (62).

A fração alcaloídica do extrato metanólico do caule demonstrou 10-metoxiafinisina (**A8f**), iochnerina (**A8g**), catafolina (**A8h**), alstonerina (**A72a**), 10-metoxialstonerina (**A72b**), 19,20-desidro-10-metoxitalcarpina (**A72c**), alstonisina (**A73a**) e alstonal (**A73b**) (63).

Do extrato diclorometano da casca do caule de *T. hystrix* foram isolados coronaridina (**A1b**), 3-oxocoronaridina (**A1c**), coronaridina hidroxiiindolenina (**A2b**), 3-oxocoronaridina hidroxiiindolenina (**A2e**), ibogamina (**A6a**), vobasina (**A7a**), ibogamina-7,8-diona (**A13**), 12-metoxivoachalotina (**A14**), 5-oxocoronaridina (**A15a**) e olivacina (**A11a**) (14, 16). Também foram isolados do extrato metanólico: ibogamina (**A6a**), afinina (**A7b**), histrixnina (**A7c**), olivacina (**A11a**), afinisina (**A8b**) e N_b-metilafinisina (**A16**) (15).

Das folhas e da casca do caule de *T. hystrix* (sinonímia *T. fuchsiaefolia*) foram isolados voacangina (**A1a**), coronaridina (**A1b**), voacangina hidroxiiindolenina (**A2a**), rupicolina (voacangina pseudoindoxila a) (**A3a**), ibogamina (**A6a**), tabernantina (**A6b**), conofaringina (**A6c**), histrixnina (**A7c**), voachalotina (**A8a**), afinisina (**A8b**), 10-hidroxicoronaridina (**A15b**), ibogalina (**A15d**), ibogaina pseudoindoxila a (**A30**), catarantina (**A31**), 19-oxovoacangina (**A32**) (13). Da fração alcaloídica do extrato

etanólico obtido das partes aéreas (folhas, caules e cascas) de *T. hystrix* (sinonímia *Peschiera lundii*) foram isolados voacangina (**A1a**), coronaridina (**A1b**), voacristina (**A1h**), ibogaina (**A1l**), iboxigaina (**A1m**), 19-epi-voacristina (**A1o**) voacristina hidroxindolenina (**A2f**), voacristina pseudoindoxia (**A3c**) e olivacina (**A11a**) (64).

Sementes de *Tabernaemontana cymosa* Jacq. contêm voacangina (**A1a**), coronaridina (**A1b**), heineanina (**A1g**), voacristina (**A1h**), voacangina hidroxilindolenina (7- α -hidroxivoacangina indolenina) (**A2a**), 10-hidroxicoronaridina (**A15b**), 3-oxovoacangina (**A15c**), tabersonina (**A17**), tabersonina-N₃-óxido (**A18**), 3-oxotabersonina (**A19**), condilocarpina (**A20**), 14,15-desidro-16-epi-vincamina (**A21**), stemmadenina (**A22**), stemmadenina-N-óxido (**A23**), ajmalicina (tetraidroalstonina) (**A24a**), 9- β -D-glicopiranosilajmalicina (9- β -D-glicopiranosiloxitetraidroalstonina) (**A24b**) e isositsirikina (**A25a**) (65).

O extrato alcaloídico da casca do caule de *T. cymosa* (sinonímia *Peschiera buchtieni*) apresentou coronaridina (**A1b**), eglandulosina (**A1c**), eglandina (**A1e**), heineanina (**A1g**), coronaridina hidroxindolenina (**A2b**), ocropamina (**A7d**), ibogamina (**A6a**), voachalotina (**A8a**), afinisina (**A8b**), 19-epi-heineanina (**A10a**), olivacina (**A11a**), (*E*)-isositsirikina (**A25a**), normacusina B (**A27b**), 3'(*R/S*)-hidroxi-N-desmetiltabernamina (**A29b**), N-desmetiltabernamina (**A29c**), voafillina (**A35a**), N-metilpericiclina (**A36a**), 18-hidroxi afinisina (**A36b**), 18,19(*R*)-dihidroxicoronaridina (**A37**), N-oxiafinisina (**A38a**), clorometilenoaffinisinium (**A38b**), valesamina (**A39a**), voafillina hidroxindolenina (**A40**), janetina (**A41a**), 3-hidroxi-tetraidroolivacina (**A41b**), 3,14-diidroolivacina (**A42**), desmetilcedinisina (**A43**), buchtienina (**A44**), 4',17 β -diidrotchibangensina (**A45**), ceridimina (**A46a**) e desmetilceridimina (**A46b**). Das folhas foram isolados voacristina (**A1o**), voacristina hidroxindolenina (**A2f**), olivacina (**A11a**) e apodina (**A47**) (66). A fração alcaloídica do extrato metanólico de *T. cymosa* (sinonímia *T. psychotriifolia*) mostrou que afinina (**A7b**), ácido 16-epi-vobasínico (**A7f**) e taberpsichina (**A66**) (67) estavam presentes.

Das cascas das raízes de *T. laeta* foram isolados os alcaloides indólicos monoméricos voacangina (**A1a**), coronaridina (**A1b**), iboxigaina (**A1m**) e 19S-heineanina (**A10a**), além de conodurina (**A26a**), o alcaloide quaternário Nb-metilvoachalotina (**A27a**), voacamina (**A28a**) e tabernamina (**A29a**) (17). O extrato acetato

de etila da casca das raízes de *T. laeta* (sinonímia *Peschiera laeta*) apresentou coronaridina (**A1b**), voacamina (**A28a**) e conduramina (**A34a**) (68). Conodurina (**A26a**), voacamina (**A28a**), vobasina (**A7a**), afinina (**A7b**), tombosina (**A27b**) e akuamidina (**A50**) foram isolados das folhas e galhos (69). A análise por CG-EM da fração alcaloídica dos galhos mostrou presença de coronaridina (**A1b**), voacangina hidroxindolenina (**A2a**), ibogamina (**A6a**), conofaringina (**A6c**), vobasina (**A7a**), afinisina (**A8b**), normacusina B (**A8d**), olivacina (**A11a**), Nb-metil-voachalotina (**A27a**), periciclivina (**A27c**), oxindolvoachalotina (**A51**) e desidrovoachalotina (**A52**) (70).

Das folhas de *T. siphilitica* (sinonímia *Bounafousia tetrastachya*) foi isolado o alcaloide dimérico bounafosina (**A33**) (71). Da casca do caule de *T. albiflora* foram isolados coronaridina (**A1b**), heineanina (**A1g**), ibofillidina (**A56**), 1'-epi-20-ibofillidina (**A57**), desetilbofillidina (**A58**) e albifloranina (**A69**) (72-73).

Da fração alcaloídica do extrato etanólico do caule de *T. coriacea* (sinonímia *T. brachyantha*) foram isolados: o-acetil-desformoakuamidinol (**A8e**), 20-epi-voacarina (**A28b**), voacarina (**A28c**) e anidrovobasinediol (**A70**) (74).

A fração alcaloídica do extrato etanólico das folhas e galhos de *T. rupicola* forneceu presença de rupicolina (**A3a**) e montanina (**A3c**) (75-76).

Vários alcaloides foram isolados do extrato metanólico de *Tabernaemontana solanifolia* (sinonímia *Peschiera campestris*): isovoacangina (**A1d**) e isovoacristina (**A1i**), isolados das folhas; voacangina (**A1a**) e voacangina hidroxindolenina (**A2a**) foram encontradas nas raízes; vobasina (**A7a**), isolada do caule. Tanto a raiz quanto o caule revelaram a presença de heineanina (**A1g**), voachalotina (**A8a**), 12-metoxi-N_b-metilvoachalotina (**A27b**) (como iodeto) e voacamina (**A28a**) (8). De *T. solanifolia* (sinonímia *T. accedens*) foram isolados acedina (**A7g**) e 16-epi-afinina (**A7h**) (77).

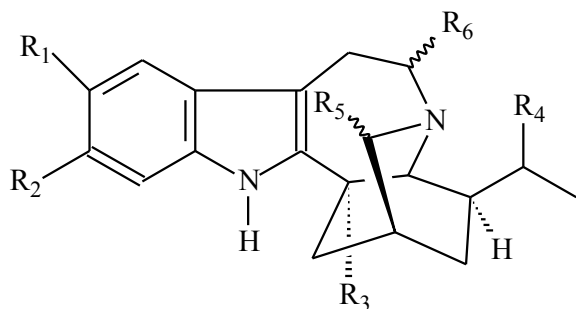
A fração alcaloídica e os extratos das sementes de *T. grandiflora* (sinonímia *Stemmadenia grandiflora*) apresentaram coronaridina (**A1b**), 11-hidroxycoronaridina (**A1q**), isovoacangina (**A1d**), voacanginahidroxindolenina (**A2a**), tabersonina (**A17**), pachisifina (**A53a**), quebrachamina (**54a**), 14β-hidroxiquebrachamina (**54b**), conoflorina (**A55**) (78).

Do extrato éter de petróleo obtido do caule fresco de *T. markgrafiana* foram isolados voacangina (**A1a**), coronaridina (**A1b**), 3 (R)-metoxycoronaridina (**A1d**), 19(S)-

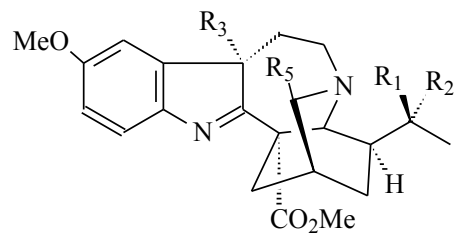
heineanina (**A1g**), 3(R)-metoxivoacangina (**A1s**), ibogamina (**A6a**), 5,6-desidro-coronaridina (**A67**) e 10,11–didesmetoxi-chipiina (**68**) (79).

Da fração alcalóidica do extrato etéreo da casca do caule de *T. undulata* isolaram-se: voacangina (**A1a**), coronaridina (**A1b**), epi-heineanina (**A10a**), voafilina (**A35a**) e quebrachidina (**A74**) (80). Coronaridina (**A1b**) também foi isolado das sementes de *T. macrocalyx* (da fração alcalóidica obtida do extrato hexânico) além da tabersonina (**A17**) (80).

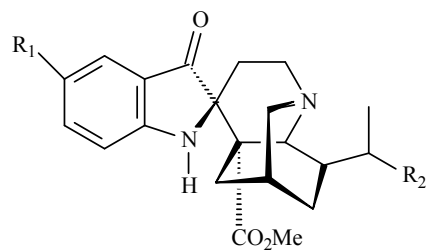
Prancha 1 - Alcaloides de espécies brasileiras de *Tabernaemontana*



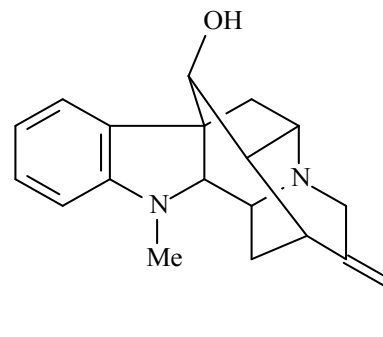
	R1	R2	R3	R4	R5	R6
A1a voacangina	OMe	H	CO ₂ Me	H ₂	H ₂	H ₂
A1b coronaridina	H	H	CO ₂ Me	H ₂	H ₂	H ₂
A1c 3-oxocoronaridina (eglandulosina)	H	H	CO ₂ Me	H ₂	=O	H ₂
A1d isovoacangina (3-metoxicoronaridina)	H	OMe	CO ₂ Me	H ₂	H ₂	H ₂
A1e 3-hidroxicoronaridina (eglandina)	H	H	CO ₂ Me	H ₂	H, OH	H ₂
A1f 3-hidroxiisovoacangina	OMe	H	CO ₂ Me	H ₂	H, OH	H ₂
A1g heineanina	H	H	CO ₂ Me	β-OH, H	H ₂	H ₂
A1h voacristina	OMe	H	CO ₂ Me	α-OH, H	H ₂	H ₂
A1i isovoacristina	H	OMe	CO ₂ Me	β-OH, H	H ₂	H ₂
A1j 3-hidroxiisovoacangina	H	OMe	CO ₂ Me	H ₂	H, OH	H ₂
A1l ibogaina (12-metoxiibogamina)	OMe	H	H	H ₂	H ₂	H ₂
A1m iboxygaina	OMe	H	H	β-OH	H ₂	H ₂
A1n 19-epi-isovoacristina	H	OMe	CO ₂ Me	α-OH	H ₂	H ₂
A1o 19-epi-voacristina	OMe	H	CO ₂ Me	β-OH	H ₂	H ₂
A1p 18-metoxicoronaridina	H	H	CO ₂ Me	OMε	H ₂	H ₂
A1q 11-hidroxicoronaridina	H	OH	CO ₂ Me	H ₂	H ₂	H ₂
A1r 3,19-oxocoronaridina	H	H	CO ₂ Me	=O	=O	H ₂
A1s 3-metoxivoacangina	OMe	H	CO ₂ Me	H ₂	OMe	H ₂



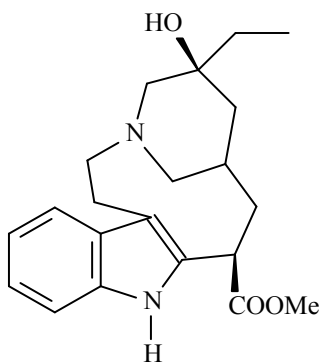
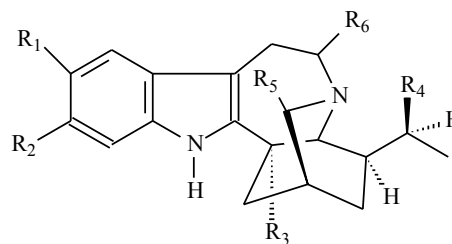
	R1	R2	R3	R4	R5
A2a voacangina hidroxiiindolenina	H	H	OH	OMe	H ₂
A2b coronaridina hidroxiiindolenina	H	H	OH	H	H ₂
A2c 19-epi-voacristina hidroxiiindolenina	H	OH	OH	OMe	H ₂
A2d 3-hidroxicoronaridina hidroxiiindolenina	H	H	OH	H	OH
A2e 3-oxocoronaridina hidroxiiindolenina	H	H	OH	H	=O
A2f voacristina hidroxiiindolenina	OH	H	OH	OMe	H ₂



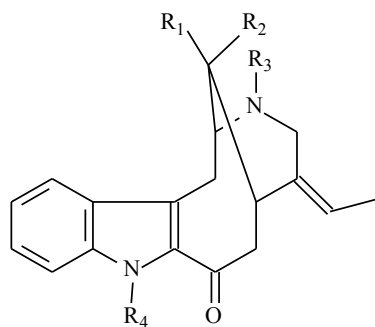
	R1	R2
A3a rupicolina (voacangina pseudoindoxila)	OMe	H ₂
A3b coronaridina pseudoindoxila	H	H ₂
A3c montanina (voacristina pseudoindoxila)	OMe	OH



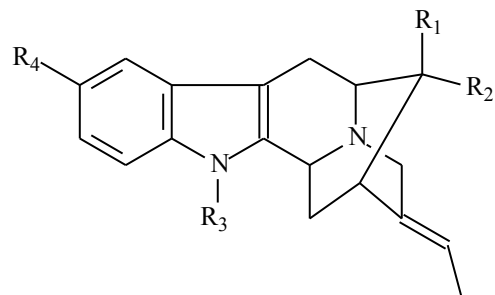
A4 tetrafillicina

**A5** catarantina

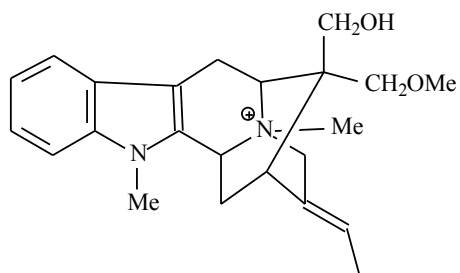
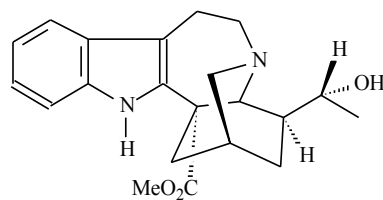
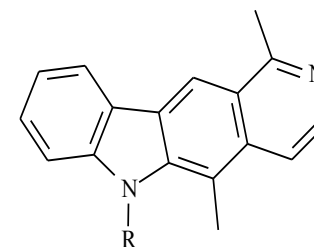
	R1	R2	R3	R4	R5	R6
A6a ibogamina	H	H	H	H	H ₂	H ₂
A6b tabernantina	H	OMe	H	H	H ₂	H ₂
A6c conofaringina	OMe	OMe	CO ₂ Me	H	H ₂	H ₂



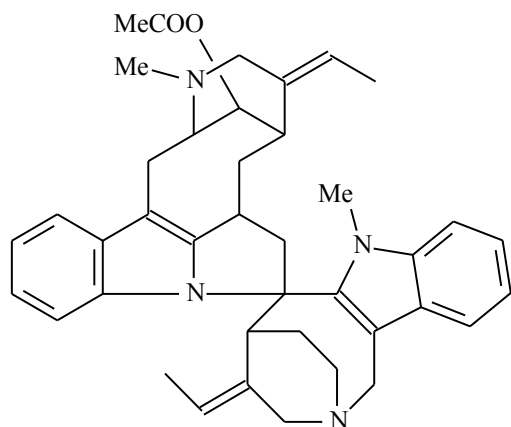
	R1	R2	R3	R4
A7a vobasina	CO ₂ Me	H	Me	H
A7b afinina	H	CH ₂ OH	Me	H
A7c histrixnina	H	CH ₂ OMe	Me	H
A7d ocropamina	CO ₂ Me	H	H	Me
A7e perivina	CO ₂ Me	H	H	H
A7f ácido 16-epi-vobasínico	H	COOH	Me	H
A7g acedina	H	CH ₂ OH	H	Me
A7h 16-epi-afinina	CH ₂ OH	H	Me	H



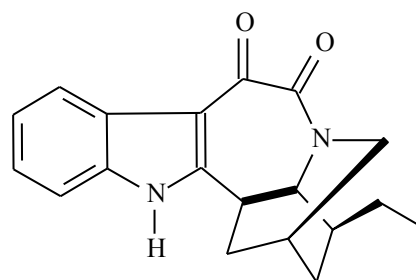
	R1	R2	R3	R4
A8a voachalotina	CH ₂ OH	CH ₂ OMe	Me	H
A8b afinisina	H	CH ₂ OH	Me	H
A8c histrixnina (16-epi-afinisina)	OMe	H	Me	H
A8d normacusina B (tombozina)	H	CH ₂ OH	H	H
A8e O-acetil-desformoakuamidinol	H	CH ₂ OCOMe	H	H
A8f metoxivoafilina	H	CH ₂ OH	Me	OMe
A8g lochnerina	H	CH ₂ OH	H	OMe
A8h catafolina	H	CO ₂ Me	Me	H

**A9** 12-metoxi-4-metilvoachalotina**A10a** 19-epi-heineanina

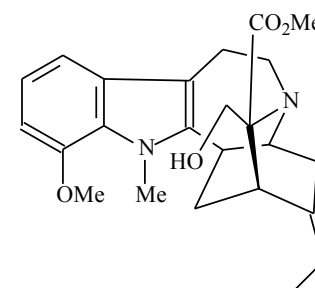
	R
A11a olivacina	H
A11b 6-N-hidroxiolivacina	OH
A11c 2-N-oxidoolivacina	O



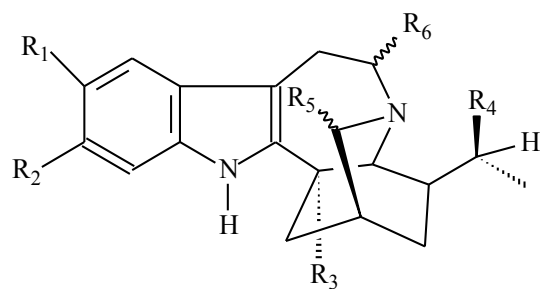
A12 monogagaina



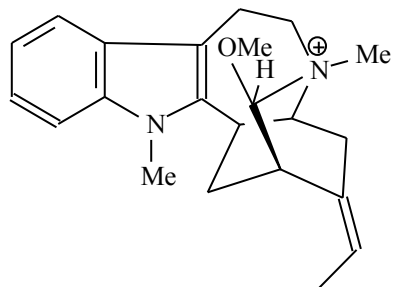
A13 ibogamina-7,8-dione



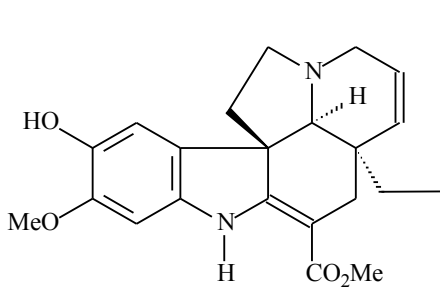
A14 12-metoxivoachalotina



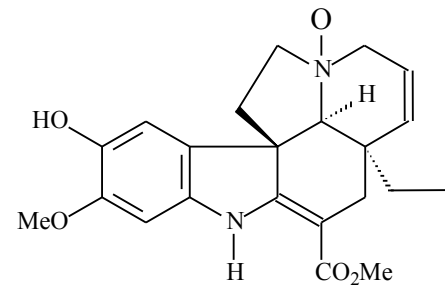
	R1	R2	R3	R4	R5	R6
A15a 5-oxo-coronaridina	H	H	CO ₂ Me	H	H ₂	=O
A15b 10-hidroxicoronaridina	H	H	CO ₂ Me	H	=O	H ₂
A15c 3-oxovoacangina	OH	OMe	CO ₂ Me	H	=O	H ₂
A15d ibogalina	OMe	OMe	H	H	H ₂	H ₂
A15f 19(S)-hidroxiibogamina	H	H	H	OH	H ₂	H ₂



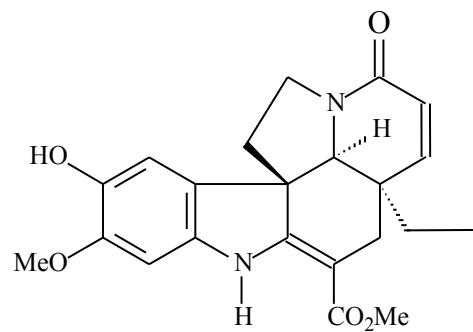
A16 N₆-metil-afisinina



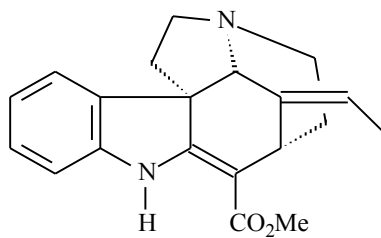
A17 tabersonina



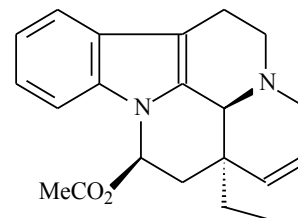
A18 tabersonina-N₃-oxido



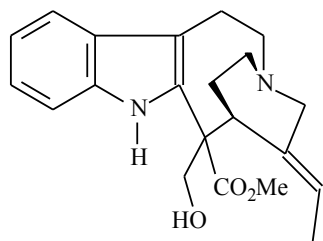
A19 3-oxotabersonina



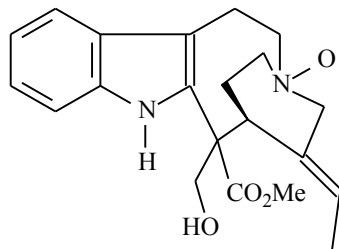
A20 condilocarpina



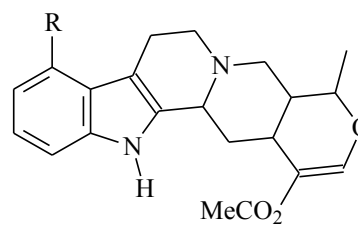
A21 14,15-desidro-16-epi-vincamina



A22 estemadenina



A23 estemadenina-N-oxido



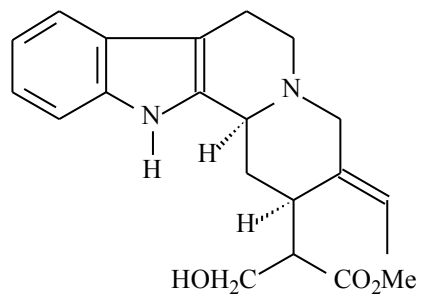
A24a ajmalicina (tetraidroalstonina)

A24b 9-β-D-glicopiranosiloxitetraidroalstonina

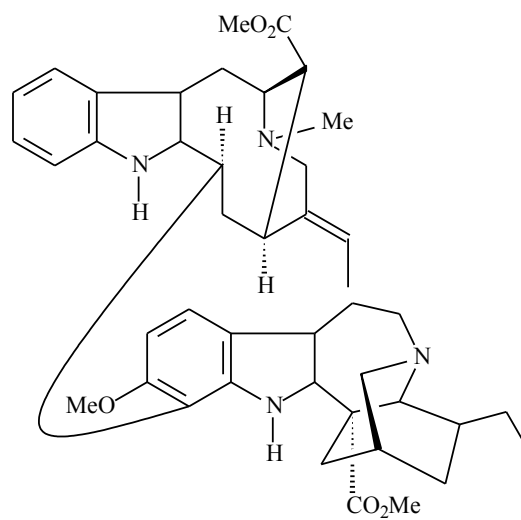
R

H

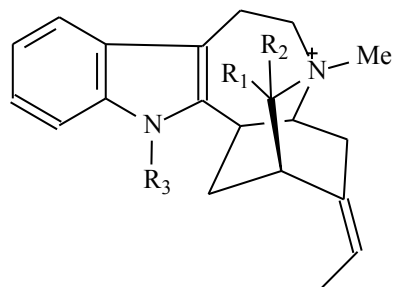
glu



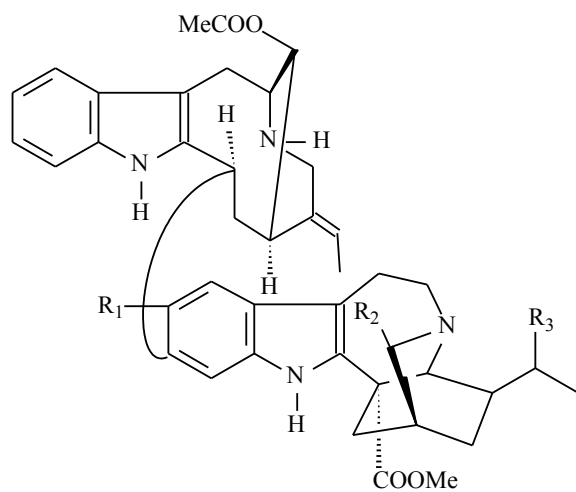
A25a isositsirikina



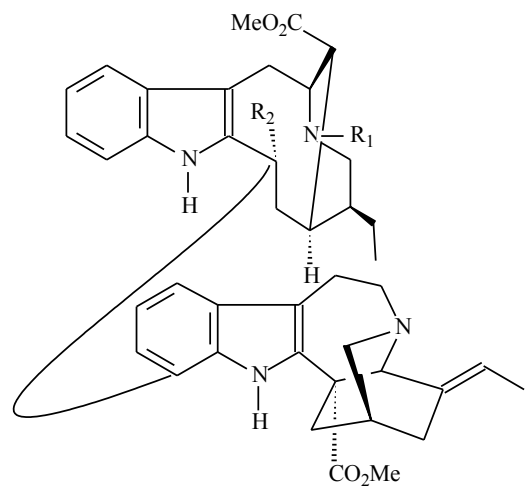
A26a conodurina

**A27a** *N_b*-metilvoachalotina**A27b** 12-metoxi-*N_b*-metilvoachalotina**A27c** periciclivina

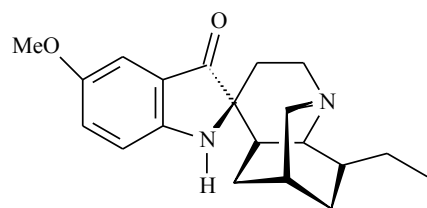
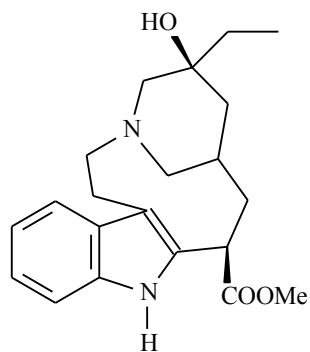
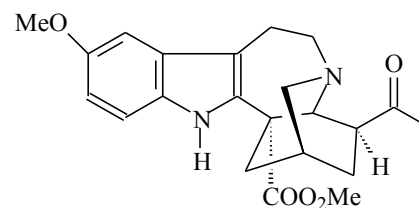
R1	R2	R3
CH ₂ OH	CO ₂ Me	H
CH ₂ OH	CO ₂ Me	OMe
H	CO ₂ Me	H

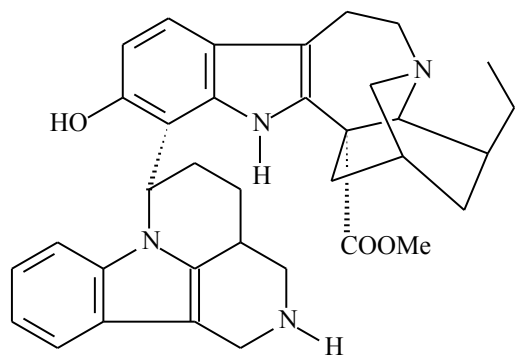
**A28a** voacamina**A28b** 3'-hidroxivoacamina (20'-epi-voacarina)**A28c** 18'-hidroxivoacamina (voacarina)

R1	R2	R3
OMe	H	H
OMe	OH	H
OMe	H	OH

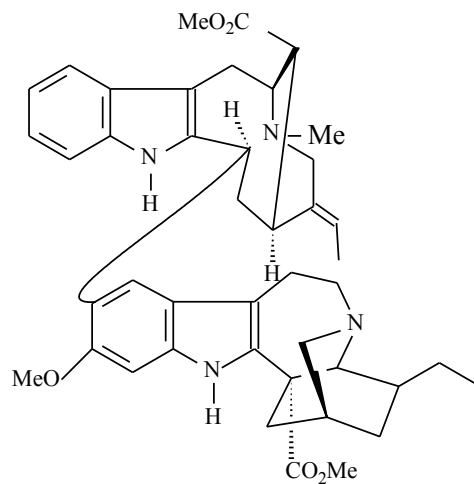


	R1	R2
A29a tabernamina	Me	H
A29b 3'R/S-hidroxi-N ₄ -dimetiltabernamina	H	OH
A29c N ₄ -dimetiltabernamina	H	H
A29d 3'(R/S)-hidroxitabernamina	Me	OH

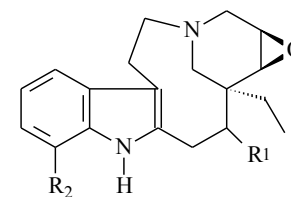
**A30** ibogaina pseudoindoxila a**A31** catarantina**A32** 1-oxovoacangina



A33 bounafosina



A34a conduramina



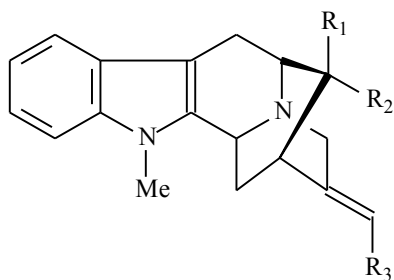
A35a voafilina (conoflorina)

A35b 12- metoxivoafilina

R1 **R2**

H₂ H

H₂ OMe



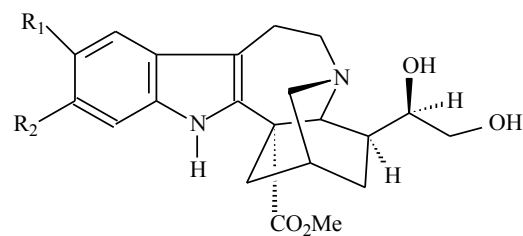
A36a metilpericiclina

A36b 18-hidroxiafinisina

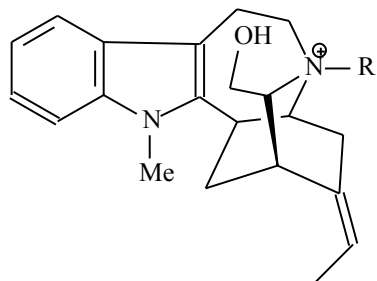
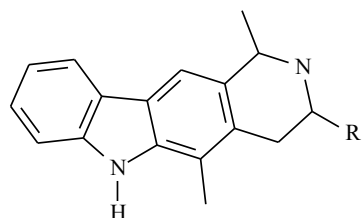
R1 **R2** **R3**

CO₂Me H Me

H CH₂OH CH₂OH

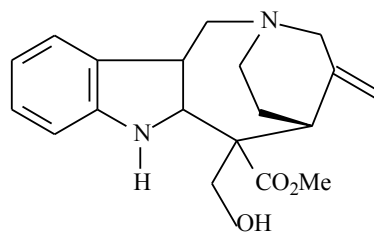
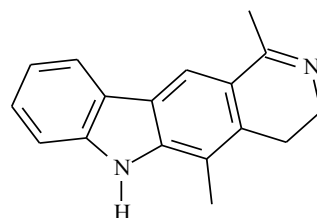


A37 18,19(R)-dihidroxicoronaridina

**A38a** N-oxiafinisina**A38b** clorometilenoaffinisinium**A41a** janetina (tetraidroolivacina)**A41b** 3-hidroxi-tetraidroolivacina

R1

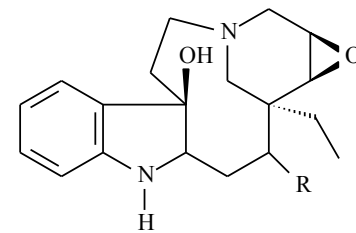
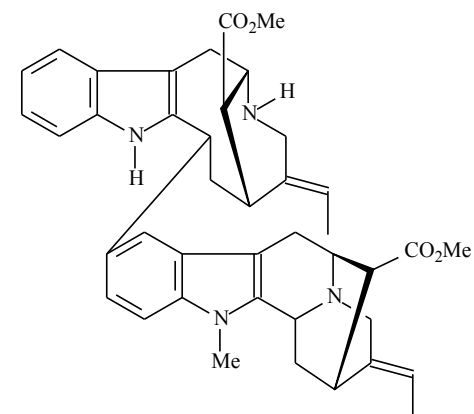
OH

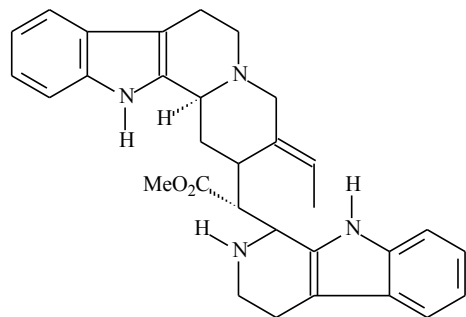
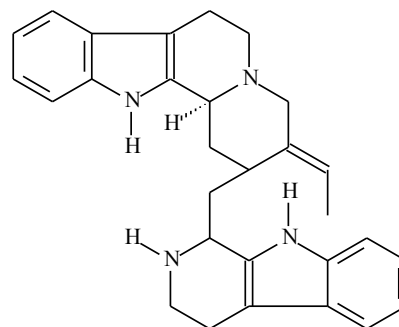
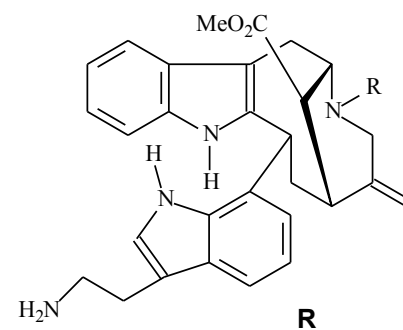
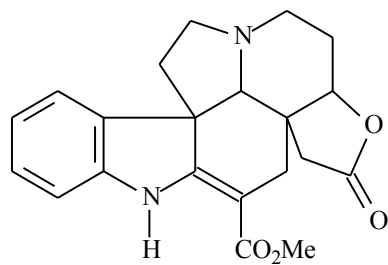
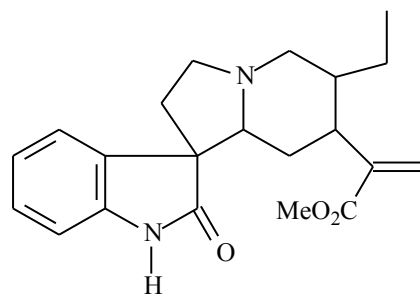
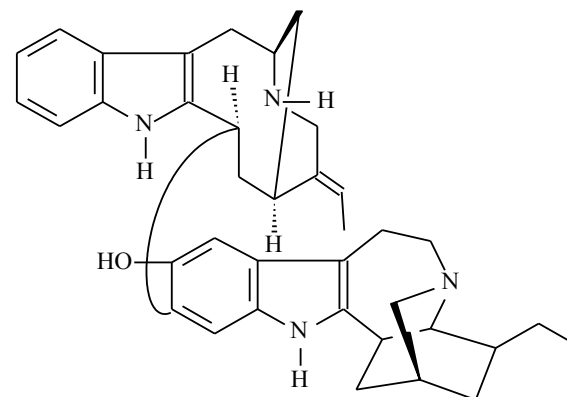
CH₂Cl**A39a** valesamina**A42** 3,14-diidroolivacina

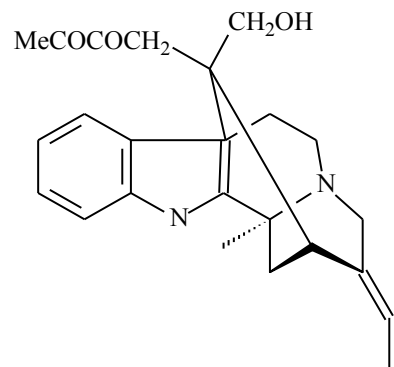
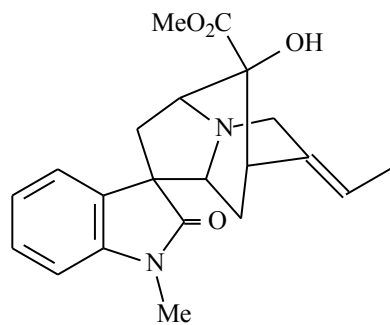
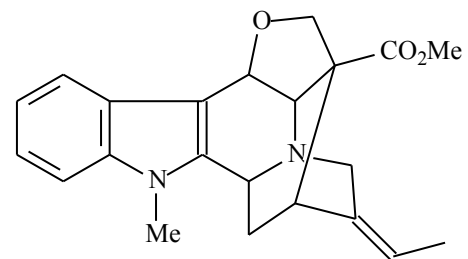
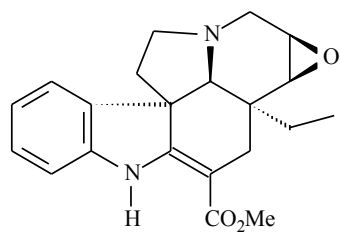
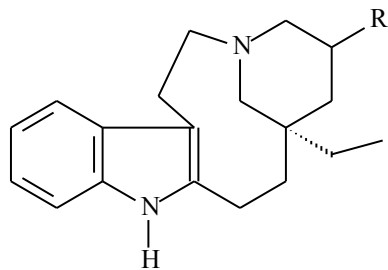
R

H

OH

**A40** voafillina hidroxiindolenina**A43** desmetilacedinisina

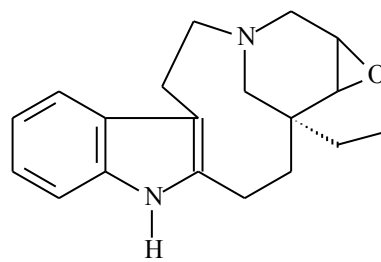
**A44** buchtienina**A45** 4',17β-diidrotchibangensina**A46a** ceridimina Me**A46b** desmetilceridimina H**A47** apodina**A48** catarinensina**A49a** decarbometoxivoacamine

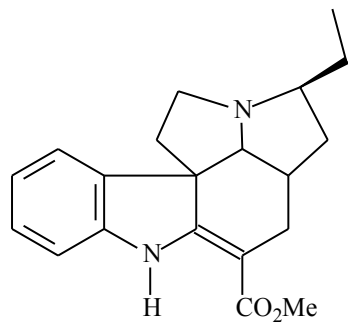
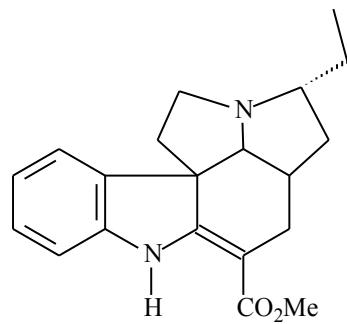
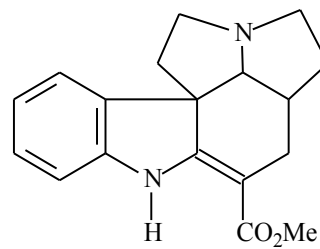
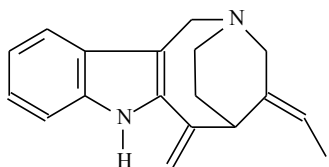
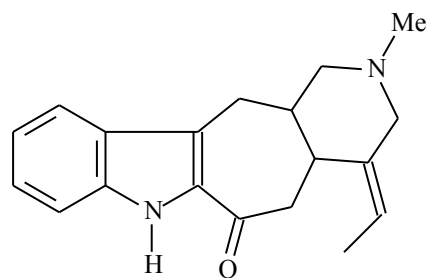
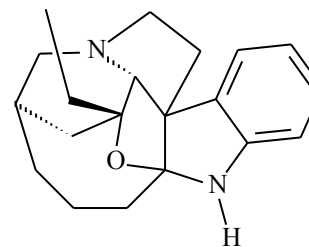
**A50** akuammidina**A51** oxindolvoachalotina**A52** desidrovoachalotina**A53a** pachisifina**A54a** quebrachamina**R**

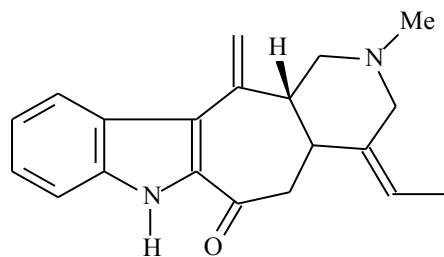
H

A54b 14β-hidroxi quebrachamina

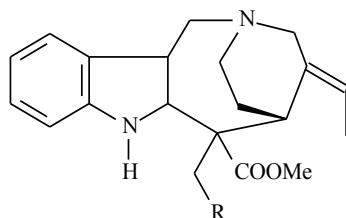
OH

**A55** conoflorina

**A56** ibofillidina**A57** 1'-epi-20-ibofillidina**A58** desetilibofillidina**A59** aparicina**A60** 3-cetopropil-coronaridina**A61** dichomina



A62 isometuenina



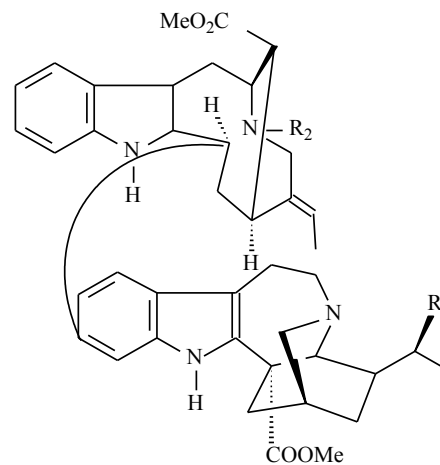
A63a valesamina

R1

OH

A63b O-acetilvalesamina

OAc



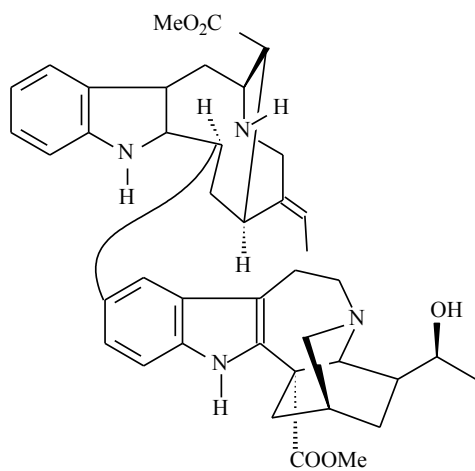
A64a ervahanine A

R1 R2

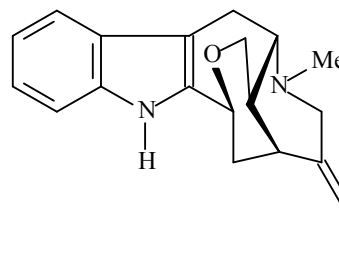
H Me

A64b 3'(R/S)-hidroxi-N₄-dimetilervahanina A

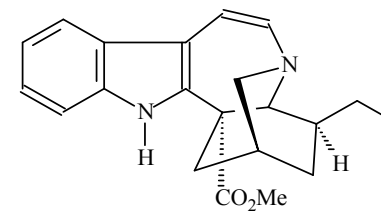
OH H



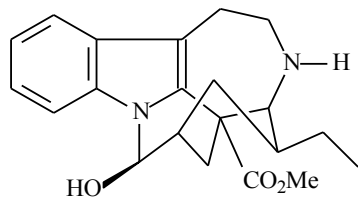
A65a 19'-hidroxi-N₄-demetilervahanina B



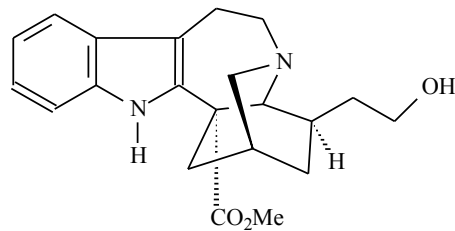
A66 taberpsichina



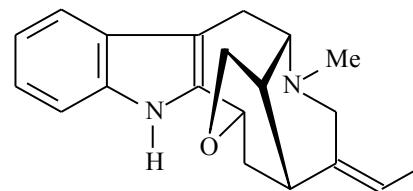
A67 5,6-desidro-coronaridina



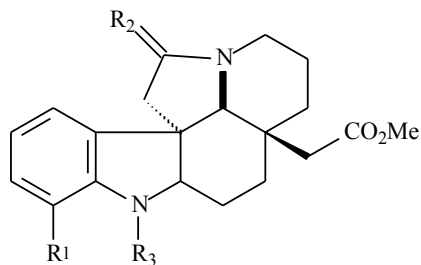
A68 10,11-didesmetoxi-chipiina



A69 albifloranina



A70 anhidrovobasinediol

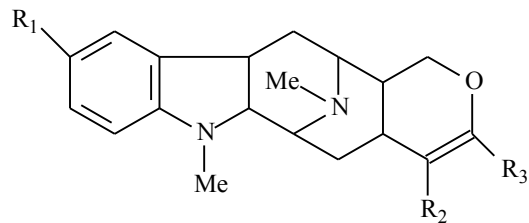


A71a homocilindrocarpidina

A71b 19-dimetoxi-homocilindrocarpidina

A71c 10-oxo-cilindrocarpidina

R1	R2	R3
OMe	H ₂	COEt
OH	H ₂	COMe
OMe	=O	COMe

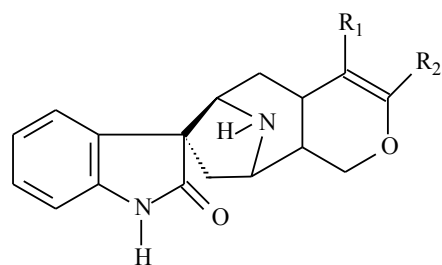


A72a alstonerina

A72b 10-metoxialstonerina

A72c 19,20-desidro-10-metoxitalcarpina

R1	R2	R3
H	COMe	H
OMe	COMe	H
OMe	CHO	Me



A73a alstonisina

R1 **R3**

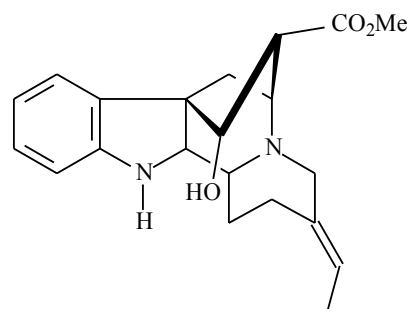
COMe

H

A73b alstonal

CHO

Me



A74 quebrachidina

1.1.2. Terpenos e esteróis

Os extratos etanólicos das cascas das raízes, frutos verdes, frutos maduros e sementes de *T. catharinensis* (sinonímia *T. hilariana*) revelaram a presença dos triterpenos α - e β -amirina e suas formas acetato (**T1a** a **T1d**, respectivamente) (Prancha 2, página 55); ácido oleanólico (**T1e**), ácido ursólico (**T1f**), taraxasterol (**T2a**) e seu acetato (**T2b**), lupeol (**T3a**) e seu acetato (**T3b**), ácido betulínico (**T3c**) e os esteróis campesterol (**T4**), estigmasterol (**T5**), sitosterol (**T6a**) (49-50) e sitosterol 3-O- β -D-glicosídeo (daucosterol) (**60b**) (49, 81). Extratos das raízes de *T. catharinensis* mostraram a presença de dez triterpenos: α -amirina (**T1a**), β -amirina (**T1c**), acetatos de lupeíla (**T3b**), iso-lupeíla (**T7b**), 20(30)-taraxasten-3 β -ila (**T8**), bauerenila (**T9**), pseudo-taraxastenina (**T10**) e iso-ursenila (**T11**) e o ester de cadeia longa de 20-hidroxi-lupeol (**T12**), além de apresentar dois esteróis: estigmasterol (**T5**) e sitosterol (**T6a**)(56).

Os triterpenos acetato de α -amirina (**T1b**), acetato de β -amirina (**T1d**) e acetato de lupeol (**T3b**) também foram isolados das cascas das raízes de *T. hystrix* (15). Os compostos acetato de α -amirina (**T1b**) e acetato de β -amirina (**T1d**) também foram encontrados no extrato etanólico dos galhos de *Tabernaemontana laeta* (70).

Do extrato metanólico do caule, da raiz e da madeira de *T. catharinensis* (sinonímia *Peschiera affinis*) foram isolados β -amirina (**T1c**), acetato de lupeol (**T3b**), β -sitosterol (**T6a**) (53) acetato de α - e β -amirina (**T1b** e **T1d**, respectivamente) (82). O acetato de α -amirina também foi isolado da fração alcaloídica do extrato etanólico das cascas do tronco de *T. coriacea* (sinonímia *T. brachyantha*) (74).

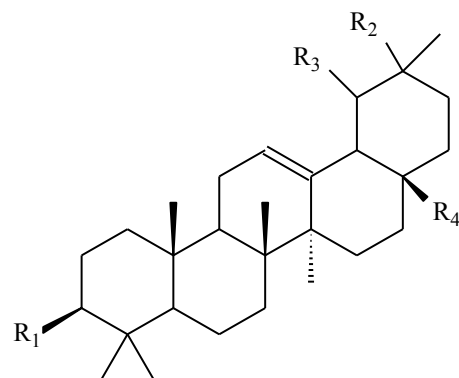
Das sementes de *T. cymosa* foram isolados lupeol (**T3a**), obtusifoliol (**T13**) e o iridoide (**T14**) (65).

Do extrato das cascas de *T. markgrafiana* foram isolados acetato de α -amirina (**T1b**), acetato de β -amirina (**T1d**), estigmasterol (**T5**), acetato de 20(30)-taraxasten-3 β -ila (**T8**), acetato de baurenila (**T9**) e acetato de isoursenila (**T11**) (79).

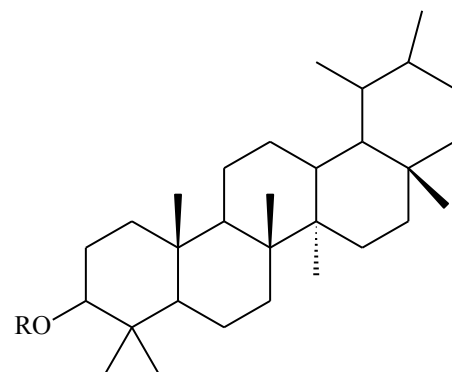
Um total de 18 substâncias foi identificado por CG-EM para óleo essencial obtido pela hidrodestilação das folhas de *T. catharinensis* partindo de uma mistura complexa de sesquiterpenos (83,52%), monoterpenos (5,46%) e triterpenos (4,56%). Os principais

componentes foram β -cariofileno (**T15**), α -cadinol (**T16**), 8S,13-cedrandiol (**T17**), α -terpineol (**T18**), β -eudesmol (**T19**), óxido de cariofilleno (**T20**) e iso-alocolato de etila (**T21**), associado com β -sitosterol (**T6a**), β -cubebene (**T22**), γ -cadinene (**T23**), cubenol (**T24**), 1,8-cineol (**T25**), o-cimeno (**T26**), curcumenol (**T27**), espatulenol (**T28**) e friedelina (**T29**) (35).

Prancha 2 - Terpenoides de espécies brasileiras de *Tabernaemontana*



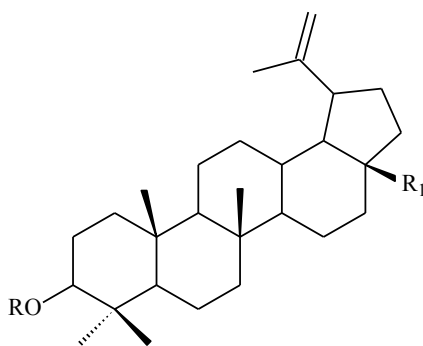
	R1	R2	R3	R4
T1a α-amirina	OH	H	Me	Me
T1b acetato de α-amirina	OAc	H	Me	Me
T1c β-amirina	OH	Me	H	Me
T1d acetato de β-amirina	OAc	Me	H	Me
T1e ácido oleanólico	OH	Me	H	COOH
T1f ácido ursólico	OH	Me	H	COOH



T2a taraxasterol

T2b acetato de taraxasterol

R
H
OAc

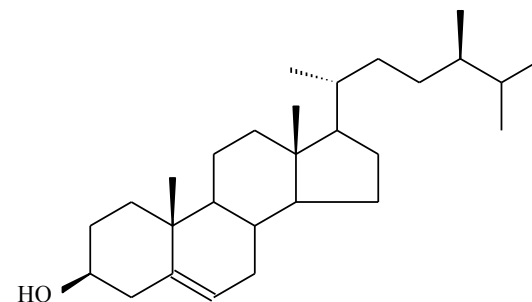


T3a lupeol

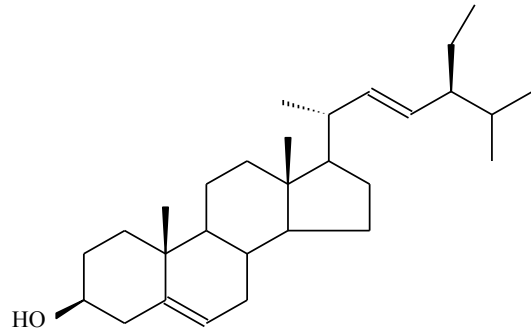
T3b acetato de lupeol

T3c ácido betulínico

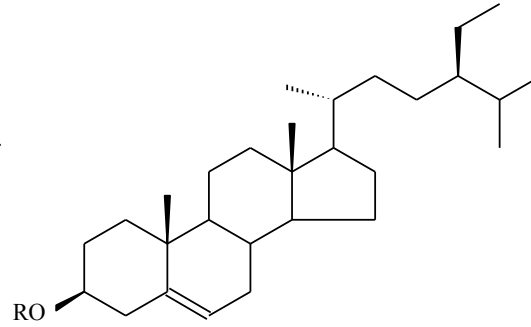
R	R1
OH	Me
OAc	Me
OH	COOH



T4 campesterol



T5 stigmasterol



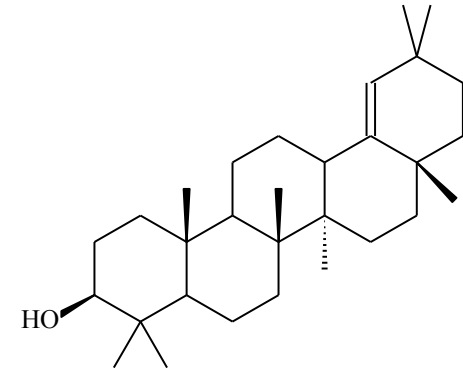
T6a sitosterol

T6b daucosterol

R

H

glu



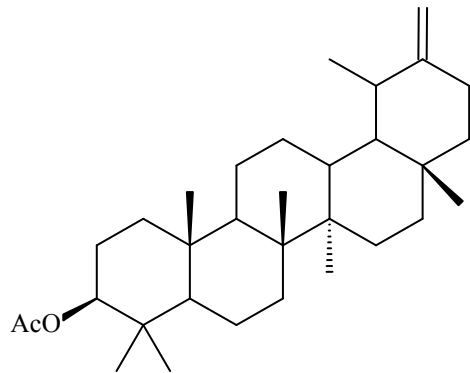
T7a germanicol

T7b acetato de germanicol

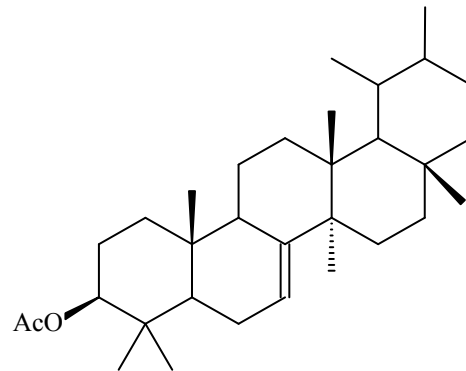
R

OH

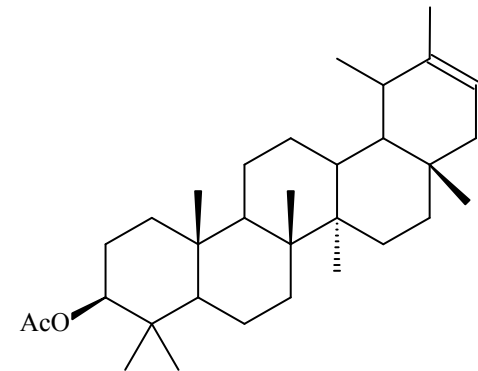
OAc



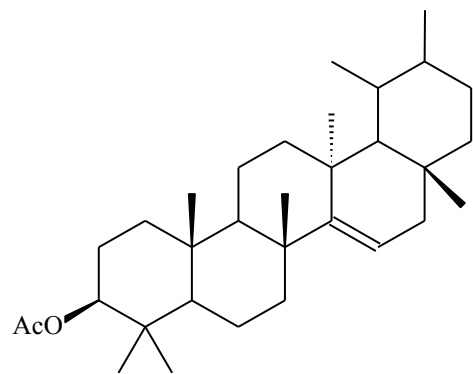
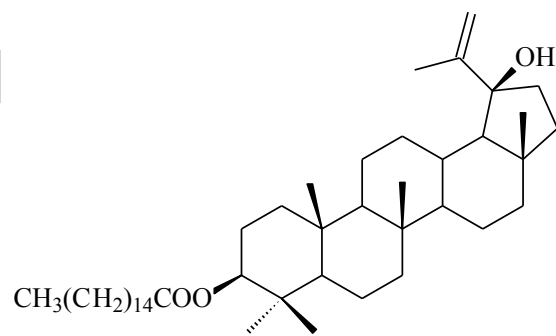
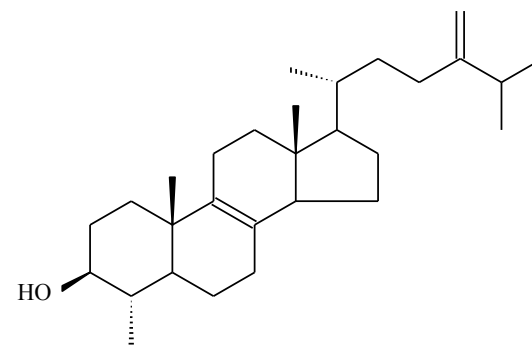
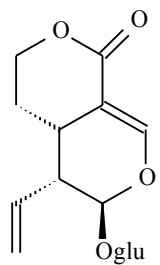
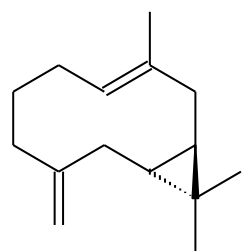
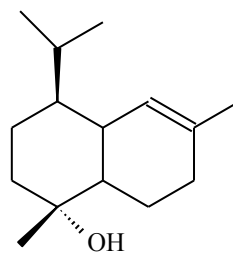
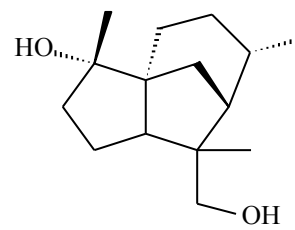
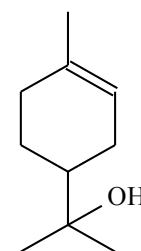
T8 20(30)-taraxasten-3β-ila

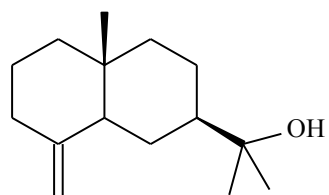


T9 bauerenila

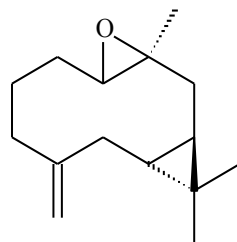


T10 pseudo-taraxastenina

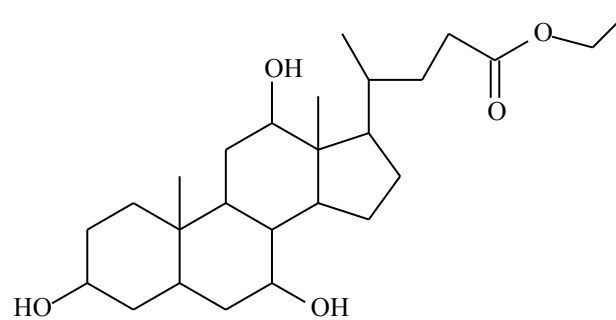
**T11** iso-ursenila**T12** 20-hidroxi-lupeol**T13** obtusifoliol**T14** iridoide**T15** β -cariofileno**T16** α -cadinol**T17** 8S,13-cedrandiol**T18** α -terpineol



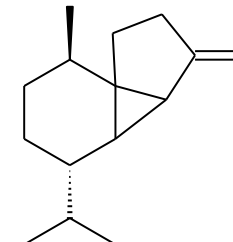
T19 β -eudesmol



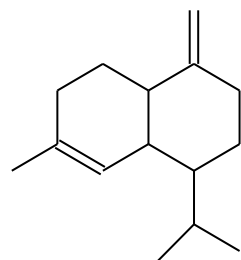
T20 óxido de cariofilleno



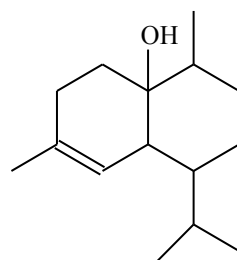
T21 iso-alcolato de etila



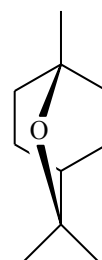
T22 β -cubebene



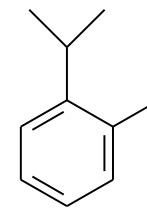
T23 γ -cadinene



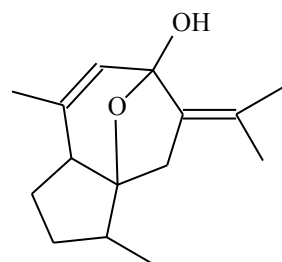
T24 cubenol



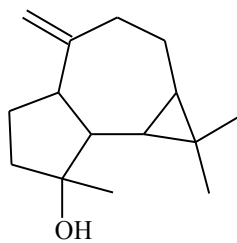
T25 1,8-cineol



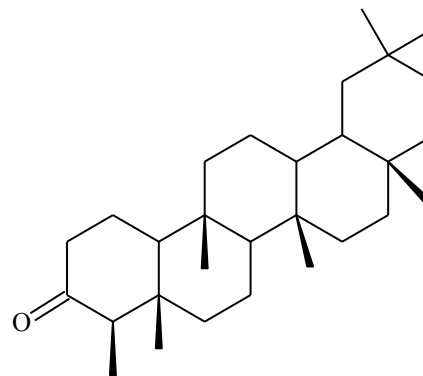
T26 o-cimeno



T27 curcumenol



T28 espatulenol



T29 friedelina

1.1.3 Compostos fenólicos

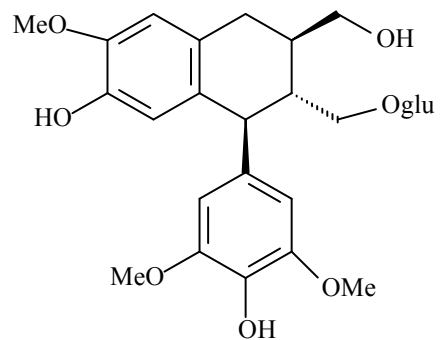
As sementes de *Tabernaemontana cymosa* forneceram (+)-lioniresinol (**P1a**) (Prancha 3, página 62), (+)- e (-)-3 α -O-(β -D-glicopiranosil)-lioniresinol (**P1b**), (-)-2 α -O-(β -D-glicopiranosil)-lioniresinol (**P1c**), (-)-3 α -O-(β -D-glicopiranosil)-5'-metoxiisolariciresinol (**P2**), (-)-8,8'-dimetoxi-1-O- β -D-glicopiranosil)-secolariciresinol (**P3**), (+)-5,5'-dimetoxi-9-O- β -D-glicopiranosil)-lariciresinol (**P4**), 3-O-(β -D-glicopiranosil)-5-O-metil-ácido gálico (**P5**) (65).

Do extrato etanólico das raízes de *T catharinensis* (sinonímia *Peschiera australis*) foram isolados quatro ácidos fenólicos: ácido vanílico (**P6a**), ácido siríngico (**P6b**), ácido gentísico (**P6c**) e ácido salicílico (**P6d**) (51).

1.1.4 Outros constituintes

O ácido oléico foi o principal ácido graxo encontrado nas sementes de *Tabernaemontana catharinensis* (sinonímia *Peschiera australis*) (52).

Prancha 3 – Compostos fenólicos de espécies brasileiras de *Tabernaemontana*



P1a (+)-lioniresinol

P1b(-)-3 α -O-(β -D-glicopiranosil)-lioniresinol

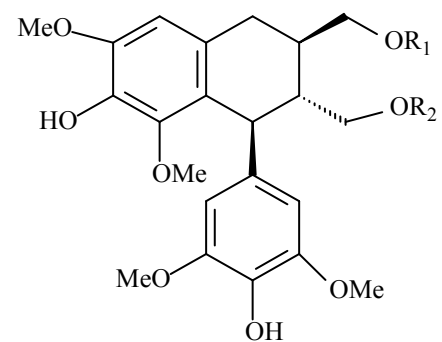
P1c(-)-2 α -O-(β -D-glicopiranosil)-lioniresinol

R1 R2

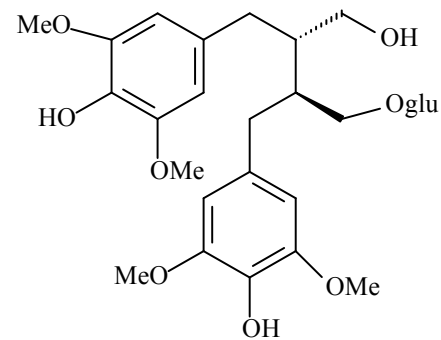
H H

H glu

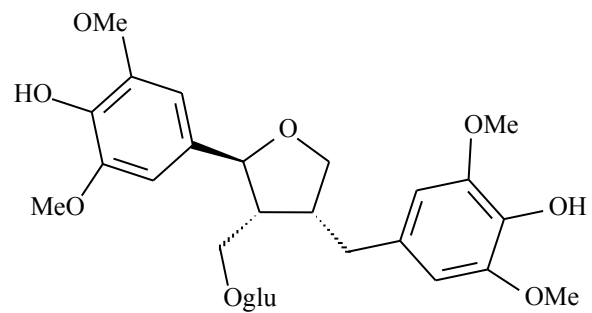
glu H



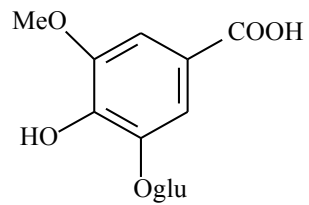
P2 (-)-3 α -O-(β -D-glicopiranosil)-5'-metoxiisolariciresinol



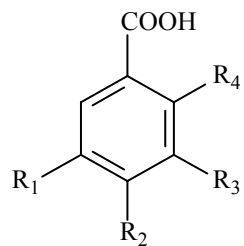
P3(-)-8,8'-dimetoxi-1-O- β -D-glicopiranosil)-secolariciresinol



P4 (+)-5,5'-dimetoxi-9-O- β -D-glicopiranosil)-lariciresinol



P5 3-O-(β -D-glicopiranosil)-5-O-metil-ácido gálico



P6a ácido vanílico

R1	R2	R3	R4
H	OH	OMe	H
OMe	OH	OMe	H
OH	H	H	OH
H	H	H	OH

P6b ácido siríngico

P6c ácido gentísico

P6d ácido salicílico

1.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ESPÉCIES BRASILEIRAS DE *Tabernaemontana*

1.2.1 Atividade antioxidante

O extrato etanólico (100 µg/mL) de *Tabernaemontana markgrafiana* (sinonímia *Bonafousia longituba*) e *T. sananho* (sinonímia *B. sananho*) foi avaliado quanto ao potencial de inibição da peroxidação lipídica, no fígado de ratos, para o que se utilizou cloreto férrico-ascorbato, não se apresentando, entretanto, atividade significativa (83).

O extrato etanólico, fração alcaloídica e não alcaloídica de *T. catharinensis* (sinonímia *P. affinis*), tanto quanto os compostos isolados voacangina (**A1a**) e voacristina hidroxindolenina (**A2f**), foram avaliados sobre a atividade de radical pelo método de 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH), em comparação com Trolox e vitamina C; os resultados demonstraram que os extratos, frações e compostos puros apresentaram atividade significativa (82). O extrato superfluido e as frações dos ramos e folhas de *T. catharinensis* também mostraram atividade antioxidante *in vitro* (24).

O óleo essencial das folhas de *T. catharinensis* apresentou ação antioxidante frente à captação de radicais livres pelo método de DPPH (35).

1.2.2 Atividade anti-inflamatória

Os extratos etanólicos (100 µg/mL) de *Tabernaemontana markgrafiana* (sinonímia *Bonafousia longituba*) e *T. sananho* (sinonímia *B. sananho*) foram avaliados quanto ao potencial anti-inflamatório *in vivo* em modelo de edema de pata induzido pela carragenina; quando comparados com fenilbutazona não apresentaram atividade significativa (83). Os extratos aquoso e etanólico das folhas, administrados em ratos 1h antes da injeção sub-plantar, mostraram uma resposta dose-dependente significativa, mostrando potencial anti-inflamatório, bem como

ação analgésica frente à dor induzida por ácido acético quando administrado intraperitonealmente (51).

O extrato etanólico das cascas do caule de *T. catharinensis* mostrou ação antinociceptiva central e periférica, bem como ação anti-inflamatória *in vivo* (32).

1.2.3 Efeito fitotóxico

O extrato aquoso liofilizado das folhas de *T. catharinensis* foi ativo para inibir as sementes de *Lactuca sativa* e *Bidens pilosa* (84).

1.2.4 Atividade antiprotozoária

O extrato metanólico (100 µg/mL) das folhas de *Tabernaemontana undulata* (sinonímia *T. obliqua*) foi pesquisado quanto à atividade antimalárica por meio de modelo *in vitro* com dois clones de *Plasmodium falciparum*; atividade leishmanicida frente à forma amastigota de *Leishmania (V.) panamensis* e atividade tripanossomicida frente à forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*. Os resultados mostraram que *T. undulata* foi ativa contra *L. (V.) panamensis* e *P. falciparum*; no entanto, o extrato foi inativo frente a *T. cruzi* (85).

Coronaridina (**A1b**) e 18-metoxicoronaridina (**A1p**) mostraram atividade tripanossomissoda proeminente contra *L. amazonensis*, sem efeito tóxico aos macrófagos dos camundongos (86).

O extrato bruto e fração alcaloídica das cascas das raízes de *Tabernaemontana catharinensis* foram testados *in vitro* frente à forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*. Heineanina (**A1g**) e 12-metoxi-4-metilvoachalotina (**A9**) mostraram fraca atividade [dose letal para 50% dos indivíduos (DL₅₀) de 890,89 e 356,73 µg/mL, respectivamente] em comparação com o cristal violeta (DL₅₀ de 31 µg/mL) (21).

Os extratos alcaloídico e acetato de etila das cascas do caule de *T. rupicola* (sinonímia *T. sessilifolia* = *Muntafara sessilifolia*) foram ativos *in vitro* nas cepas

resistentes à cloroquina de *P. falciparum* (valores de IC₅₀ ativos foram de 1,6 e 6,5 µg/mL, respectivamente) (87).

1.2.5 Citotoxicidade

O extrato acetato de etila das cascas do caule de *T. laeta* (sinonímia *P. laeta*) exibiu citotoxicidade significativa com células KB-V1 multi-resistentes (MDR) na presença de vimblastina [dose efetiva para 50% (DE₅₀) = 1,7 µg/mL], enquanto nenhuma citotoxicidade foi exibida com células KB na ausência de vimblastina (DE₅₀ > 20 µg/mL) (68).

Os extratos brutos das sementes e folhas de *T. catharinensis* (sinonímia *P. australis*) apresentaram atividade antineoplásica *in vivo* para dois modelos experimentais de tumores: carcinoma de Ehrlich's e Sarcoma 180 (51).

Os extratos clorofórmico e metanólico do caule de *T. angulata* foram avaliados para células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e células de câncer de próstata humano (PC-3), células de câncer de pulmão humano (NCI-H460), células de cólon (KM-12), células do sistema nervoso central (SF-268), células leucêmicas (RPMI-8226) e não mostraram citotoxicidade (59).

Os alcaloides coronaridina (**A1b**), voacamina (**A28a**) e conduramina (**A34a**) foram avaliados quanto à citotoxicidade com 11 linhagens de células tumorais. O composto coronaridina (**A1b**) apresentou atividade para células de câncer de mama humano (BC1), carcinoma epidermoide oral (KB) e linhagens resistentes a fármacos (KB-V1), ao câncer de próstata humano (LNCaP), câncer de pulmão humano (Lu1), leucemia linfocítica em murinos (P388) e células de glioma humano (U373), com DE₅₀ < 14 µg/mL. Os compostos voacamina (**A28a**) e conduramina (**A34a**) também apresentaram atividade quando testados para células com valores inferiores de ED₅₀. Adicionalmente, ambos os compostos também apresentaram citotoxicidade frente a outras linhagens celulares como carcinoma epidermoide humano (A431), câncer de colo de útero (Col2), fibrosarcoma humano (HT), melanoma humano (Mel2) e câncer de mama dose dependente (ZR-75-1) (68, 88).

O composto 12-metoxi-N_b-metilvoachalotina (**A27b**) foi submetido a teste antileucemia (*leukemia screen test*-3PS31) e não apresentou atividade (8). Por outro

lado, voacangina (**A1a**) e isovoacangina (**A1d**) foram testados frente a células THP-1 e apresentaram elevada atividade, comparado ao controle sulfato de vimcristina (16).

Voacamina (**A28a**) foi avaliada quanto à capacidade de melhorar o efeito citotóxico de doxorubicinas de linhagens de células linfoblásticas (CEM-WT), células de osteosarcoma (U-2 OS-WT) e duas linhagens resistentes a drogas (CEM-R e U-2 OS-R). Voacamina (**A28a**) induziu um aumento significativo de retenção do fármaco em células resistentes, por um aumento do efeito da citotoxicidade de doxorubicina (89). Foi ainda capaz de inibir a ação da glicoproteína-P de forma competitiva (90).

Voacangina (**A1a**) apresentou atividade antiangiogênica *in vitro* pela supressão da formação tubular e quimio-invasão induzida pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). No entanto, os compostos inibiram angiogênese na membrana corioalantóide em doses não tóxicas e foram capazes de disponibilizar e promover a diminuição dos níveis de expressão do fator induzível de hipóxia (fator-1 α) e gene alvo, VEGF, de forma dose-dependente (91).

1.2.6 Atividade antimicrobiana

O extrato bruto das folhas de *T. catharinensis* (sinonímia *P. affinis*) mostrou atividade frente ao *Mycobacterium tuberculosis*, *M. kansasii* e *M. malmoense* (92). O extrato metanólico (1 mg) da casca do caule de *T. catharinensis* inibiu o crescimento de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* MR ATCC 43300, *S. epidermidis* ATCC 1220228 e *Acinetobacter Iwoffii*. A fração alcaloídica (0,5 mg) foi ativa para *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 35218, *S. aureus* MR ATCC 43300, *Streptococcus faecalis* ATCC 29232, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Shigella flexneri*, *S. epidermidis* ATCC 1220228 e cepas de *A. Iwoffii* (30).

O extrato etanólico do caule e o alcaloide 12-metoxi-4-metilvoachalotina (**A9**) foram efetivos frente ao *Trichophyton rubrum* (27). O extrato bruto das partes aéreas e o extrato metanólico do caule de *T. catharinensis* (sinonímia *P. australis*) foram avaliados para atividade fungicida frente ao *Microsporum canis*, *M. gypseum*,

Trychophyton mentagrophytes, *T. rubrum* e *Epidermophyton floccosum*. O extrato do caule mostrou atividade frente ao *T. rubrum* e *E. floccosum* (93).

O extrato aquoso ácido e etanólico de diferentes partes de *T. amygdalifolia* (sinonímia *T. dichotoma*) foram testados frente a *B. subtilis* (ATCC 6633), *S. aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *E. coli* (ATCC 8739); *Aspergillus niger* (ATCC 16904) e *Candida albicans* (ATCC 10235). Os extratos das cascas das raízes, da casca do caule, do extrato das folhas verdes e secas e das frutas frescas foram ativos frente ao *B. subtilis* e *S. aureus*. Os extratos aquoso e etanólico das cascas do caule fresco, o extrato aquoso das frutas frescas, o extrato das frutas frescas, o extrato etanólico das raízes frescas e caule, tanto frescas quanto secas, foram ativos frente a *E. coli* e *C. albicans*. O extrato etanólico das cascas do caule secas e do caule foi ativo frente a *A. niger*. Entretanto, nenhum extrato foi ativo frente a *P. aeruginosa* (94).

O extrato clorofórmico/metanólico das partes aéreas de *T. angulata* apresentou atividade antimicrobiana frente a *P. aeruginosa* (ATCC 9027) e *C. albicans* (ATCC 10231) (12). Esse mesmo extrato do caule também apresentou ação frente a *S. aureus* (ATCC 6538) (59).

Os compostos coronaridina (**A1b**), isovoacangina (**A1d**), heineanina (**A1g**), voacangina hidroxindolenina (**A2a**), voachalotina (**A8a**) e 12-metoxi-N_b-metilvoachalotina (**A27b**) foram avaliados frente à *Candida albicans* B311 em comparação à anfotericina B e não revelaram qualquer atividade (8). Monogagaína (**A12**) apresentou atividade frente à *Bacillus subtilis* (95).

O extrato etanólico da casca do caule de *T. catharinensis* foi capaz de inibir *P. aeruginosa* e *S. aureus* quando comparado com ceftriaxona (31).

O extrato bruto das folhas de *T. catharinensis* (sinonímia *P. affinis*) mostrou atividade frente ao *Mycobacterium*. Por outro lado, o mesmo extrato não apresentou atividade frente a *M. fortuitum* (96). O extrato superfluido (SFE) e suas frações dos galhos e folhas de *T. catharinensis* mostraram atividade anti-*Mycobacterium* frente a *M. tuberculosis* H37Rv (24).

1.2.7 Inibição enzimática

O extrato clorofórmico bruto dos talos de *T. catharinensis* (sinonímia *T. australis*) mostrou inibição da acetilcolinesterase (58).

Os compostos voacangina (**A1a**), coronaridina (**A1b**), isovoacangina (**A1d**), heineanina (**A1g**), ibogaina (**A1l**), iboxigaina (**A1m**), 19-*epi*-isovoacristina (**A1n**), voacanginahidroxiindolenina (**A2a**), rupicolina (**A3a**), ibogamina (**A6a**), afinina (**A7b**), voachalotina (**A8a**), afinisina (**A8b**), histrixnina (**A8c**), olivacina (**A11a**), ibogalina (**A15d**), *N_b*-metilafinisina (**A16**), conodurina (**A26a**), *N_b*-metilvoachalotina (**A27a**), voacamina (**A28a**) e tabernamina (**A29a**) foram avaliados frente à inibição da acetil e butiril colinesterase. Os compostos ibogamina (**A6a**), afinina (**A7b**), afinisina (**A8b**), histrixnina (**A8c**), olivacina, 6-N-hidroxiolivacina, 2-n-oxidoolivacina (**A11**) e conodurina (**A26a**) foram capazes de inibir ambas as enzimas; os compostos **A1b** e **A1j** inibiram a acetilcolinesterase; e os compostos heineanina (**A1g**) e voacangina hidroxiindolenina (**A2a**) mostraram especificidade em inibir a butirilcolinesterase (70, 97-98).

1.2.8 Outras atividades

A fração alcaloídica da casca da raiz do extrato aquoso de *T. catharinensis* mostrou atividade *in vivo* frente ao veneno de *Crotalus durissus terrificus*, neutralizando a ação letal do veneno (33). O alcaloide quaternário, 12-metoxi-4-metilvoachalotina (**A9**) apresentou ação inibitória (99). Ainda, o extrato aquoso demonstrou ação inibitória para o veneno de *Bothrops jararacussu* quando pré-incubado antes da administração do veneno nos animais (19). O extrato hidroalcoólico de *T. catharinensis* mostrou ação antiofídica para camundongos inoculados experimentalmente com veneno de *Bothrops jararacussu* reduzindo as alterações dos níveis de aspartato aminotransferase, de ácido úrico e alteração do tecido muscular esquelético provocada pelo veneno (100).

O extrato alcaloídico das frutas de *T. amygdalifolia* (sinonímia *T. dichotoma*) mostrou atividade anticonvulsivante e espasmolítica (94). Já o extrato metanólico do caule apresentou ação vasodilatadora na artéria aorta de ratos. Além disso, metoxivoafillina (**A8f**), catafolina (**A8h**), e alstonisina (**A73a**) isolados desse extrato, também apresentaram atividade vasodilatadora mediada parcialmente por liberação de óxido nítrico das células endoteliais. Adicionalmente, metoxivoafillina (**A8f**) mostrou efeito hipotensor em ratos normotensos (63).

Uma triagem hipocrática de diferentes extratos (aquoso e etanólico) de todas as partes da planta - com exceção das sementes - de *Tabernaemontana amygdalifolia* (sinonímia *T. dicothoma*) mostrou alta toxicidade, provocando convulsões nos animais. Os extratos das frutas, das folhas, da casca do caule mostraram ação colinérgica com efeitos tais como salivação e lacrimejação. O extrato obtido das sementes foi menos tóxico, mas mostrou pronunciada sedação que pode estar relacionada ao comum efeito hipotensor, manifestado como enoftalmia e hiperemia. Para todos os extratos testados houve perda de aderência em vários graus o que pode ser interpretado como um efeito relaxante da musculatura (94).

O efeito hipotensor encontrado para todos os extratos foi confirmado pela pressão sanguínea e os extratos das sementes mostraram um efeito pronunciado na contração uterina. Os extratos de frutas e sementes estimularam a contração uterina e o das folhas mostrou inibição da contração uterina. Os extratos obtidos da casca da raiz e da casca do caule não demonstraram ação na musculatura uterina (94).

Coronaridina (**A1b**), vobasina (**A7a**), perivina (**A7e**), stemmadenina (**A22**) e dicomina (**A61**) apresentaram efeito hipotensor em ratos. Stemmadenina (**A22**) também foi ativa em prolongar o efeito da acetilcolina na pressão sanguínea e promover relaxamento na musculatura despolarizando bloqueadores neuromusculares (101).

O extrato etanólico da casca do caule de *T. catharinensis* foi eficaz em inibir a emergência das moscas *Zaprionus indianus* (Díptera: Drosophilidae) (Gupta, 1970). No entanto, o extrato não afetou as moscas na fase adulta, quando comparado com o número total e o grupo controle por gênero (36).

Ibogaína (**A1I**) tem sido utilizada globalmente, tanto na área médica quanto na área não médica, para tratar dependência de drogas e álcool (98).

Tabernaemontana cymosa foi pesquisada quanto ao seu potencial larvicida contra *Aedes aegypti*. O extrato etanólico das flores, caule e folhas não apresentaram atividade; no entanto, o extrato etanólico mostrou ação significativa com dose letal para 90% dos indivíduos (LD₉₀) de 331 mg/mL (102).

O potencial cicatrizante do extrato hidroalcoólico das folhas de *T. catharinensis* foi avaliado e mostrou-se bastante efetivo *in vivo* (29).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo fitoquímico e de atividade biológica de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Isolar e identificar compostos presentes nos extratos brutos e frações das folhas de *T. solanifolia* A. D.C.;

Determinar a toxicidade potencial dos extratos brutos de *T. solanifolia* em modelos *in vitro* e *in vivo*;

Pesquisar propriedades antimicrobianas dos extratos brutos de *T. solanifolia*;

Avaliar o potencial antioxidante de *T. solanifolia* em modelos *in vitro* e *ex vivo*;

Determinar a atividade ansiolítica dos extratos brutos em modelo experimental *in vivo* utilizando o Labirinto em Cruz Elevado (LCE);

Verificar o potencial fitotóxico dos extratos de *T. solanifolia in vitro* frente a *Lactuca sativa* L. e *Glycine max* L.;

Investigar a interferência dos extratos de *T. solanifolia* no desenvolvimento e na mortalidade de *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) mantidas em dieta artificial.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MÉTODOS GERAIS

3.1.1 Padrões e reagentes

Os solventes de padrão analítico (PA) (hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol, etanol 95%) foram utilizados no preparo dos extratos, na cromatografia em coluna (CC), cromatografia em camada delgada (CCD), análises para teste de atividade antioxidante e testes biológicos. A acetonitrila utilizada foi de grau cromatográfico.

Os reagentes utilizados foram ácido gálico, ácido ascórbico (vitamina C), 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH), ácido linoleico, β -caroteno, *Folin-Cicauteau*, acetato de potássio, cloreto de alumínio, molibdato de amônio tetra-hidratado, carbonato de sódio e ácido sulfúrico.

3.1.2 Cromatografia em camada delgada

3.1.2.1 Fase estacionária (FE)

A análise do perfil cromatográfico foi realizada em placas de alumínio ou de vidro impregnadas com sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck® e Macherey-Nagel®) com espessura de 0,2 mm empregando os seguintes reveladores: solução ácida de anilsaldeído (R1), reagente de Dragendorff (R2), reagente difenilboratoaminoetanol e polietilenoglicol (PEG 4000) (NP/PEG) (R3), além da utilização da radiação ultravioleta (R4).

3.1.2.2 Reveladores

Solução ácida de anisalaldeído (R1) (103)

A placa cromatográfica foi borrifada com as soluções A e B e, então, aquecida por aproximadamente 10 minutos, a 100 °C.

- Solução A: solução de anisalaldeído em ácido acético a 2%;
- Solução B: solução etanólica de ácido sulfúrico a 20%.

Reagente de Dragendorff (R2)

Para borrifação da placa cromatográfica foi preparada uma solução composta de 5,0 mL de solução B, 20 mL de ácido acético e 70 mL de água. A presença de alcaloides e peptídeos foi evidenciada pelo surgimento de mancha amarelo-alaranjado imediatamente após a borrifação.

- Solução A: nitrato básico de bismuto (1,7 g) foi dissolvido em 100 mL de solução de ácido acético: água (1: 4).
- Solução B: solução aquosa de iodeto de potássio a 40%.

Reagente difenilboratoaminoetanol e polietilenoglicol (PEG 4000) (NP/PEG) (R3)

A cromatoplaça foi pulverizada utilizando-se a solução A e, em seguida, com solução B e observada sob luz ultravioleta (UV).

- Solução A: solução metanólica de difenilboriloxietilamina a 2 %.
- Solução B: solução etanólica de polietilenoglicol - 4000 a 5 %.

Radiação ultravioleta (R4)

A placa foi analisada sob luz ultravioleta ($\lambda = 254$ e 365 nm) a fim de se detectarem substâncias contendo grupos cromóforos.

3.1.3 Cromatografia em coluna (CC)

3.1.3.1 Sílica gel 60 A (70 - 230 Mesh)

Para o fracionamento cromatográfico foram utilizadas colunas de vidro de diversos diâmetros, cuja maior parte foi eluída sob pressão atmosférica. A proporção utilizada entre a amostra e a fase estacionária foi, em geral, de 1:30.

A fase estacionária utilizada foi Sílica Gel 60 (Merck[®]) de granulometria 70 - 230 *mesh* ($\varphi = 0,063 - 0,20$ mm). A sílica foi suspendida com o solvente utilizado inicialmente como fase móvel e empacotada em coluna de vidro até decantação da sílica. A amostra foi incorporada com quantidade suficiente de sílica e solvente e, então, foi aplicada no topo da coluna, sendo, posteriormente, iniciada a eluição, com gradiente em ordem crescente de polaridade.

3.1.4 Equipamentos e condições de análises

3.1.4.1 Espectrometria no ultravioleta

A leitura empregada para os testes químicos de avaliação de atividade antioxidante, teor de flavonoides e fenóis totais, foi realizada por meio de um Espectrofotômetro 700S (Femto[®]), com comprimento de onda na faixa de 190 - 1100 nm.

3.1.4.2 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C)

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetro Varian Mercury Plus (300Hz; 7,04T; EUA) do Instituto de Química (IQ) - UnB, por meio de sondas de detecção ATB e SW de 5 mm de diâmetro interno. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm e os solventes deuterados foram dioxano D_2O e MeOD_4 e CDCl_3 com tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os deslocamentos químicos foram registrados em unidade e as constantes de acoplamento dadas em Hz.

3.1.4.3 Espectrometria no infravermelho

Os espectros no infravermelho foram obtidos no espectrofotômetro Bomem Hartmann & Braun MB – 100 (Alemanha) pertencente ao Instituto de Química (IQ) - UnB, com valores expressos em cm^{-1} .

A análise das amostras foi realizada com pastilhas preparadas com brometo de potássio (KBr).

3.2 ESTUDO QUÍMICO

3.2.1 Material botânico

As folhas de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. (Apocynaceae) foram coletadas em Brasília (DF) pela Profa. Dra Sueli Maria Gomes e equipe multidisciplinar integrante de projeto de bioprospecção da flora do cerrado. Um exemplar da exsicata encontra-se registrada e depositada no Herbário da Universidade de Brasília (UB) (S.M. Gomes e R. G. Tostes 846).

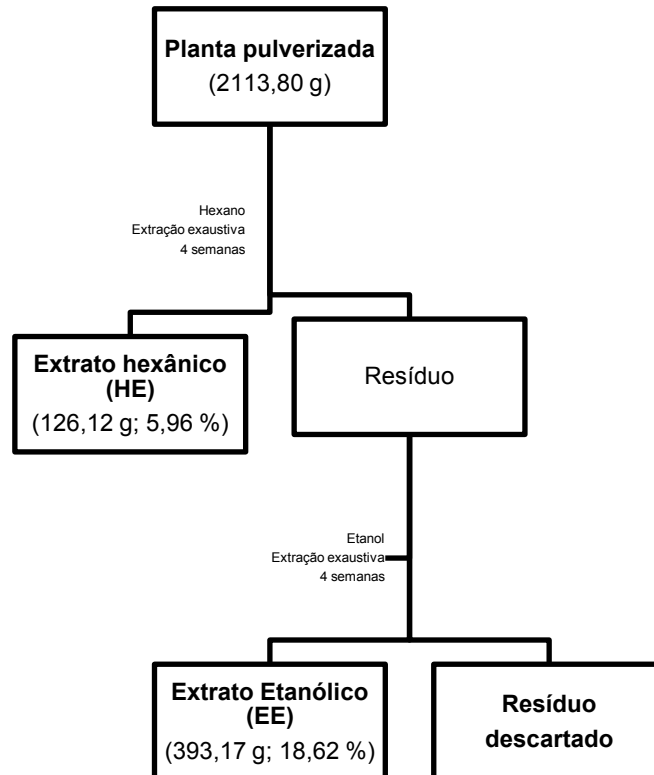
A coleta foi realizada em dois momentos distintos. O trabalho iniciou com material vegetal coletado em março de 2007. Entretanto, para a obtenção de material botânico adicional foi realizada uma coleta em abril de 2009.

As partes aéreas da planta foram secadas em estufa de circulação de ar forçada a 40 °C, por 72 horas. Em seguida, as folhas foram pulverizadas em moinho de facas e o pó resultante da moagem (2113,8 g) foi armazenado em sacos de papel e acondicionados sob proteção de luz e umidade.

3.2.2 Obtenção dos extratos

3.2.2.1 Extratos hexânico (HE) e etanólico (EE)

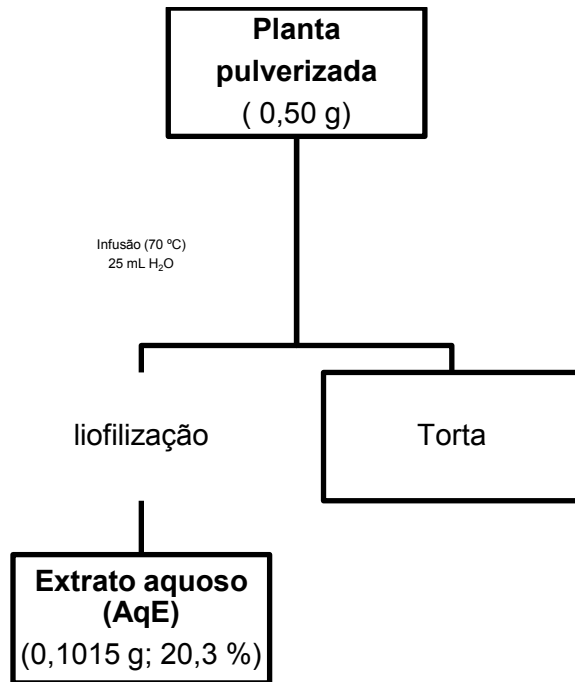
Os extratos brutos hexânico e etanólico foram preparados na Universidade de Brasília (UnB). Foram utilizados 2113,8 g de material botânico pulverizado e hexano como solvente extrator. A mistura foi submetida ao processo de maceração durante quatro semanas e, subseqüentemente, pelo mesmo período, com etanol. Após filtração, a solução extrativa foi submetida à evaporação do solvente sob vácuo utilizando o rotaevaporador, com temperatura inferior a 40 °C, até a obtenção do extrato hexânico (HE) e extrato etanólico (EE) (Esquema 1). O rendimento do HE foi de 6 % (126,1 g) e do EE foi de 18,6 % (393,2 g).



Esquema 1 – Representação do processo de obtenção dos extratos hexânico (HE) e etanólico (EE) das folhas de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC.

3.2.2.2 Extrato aquoso (AqE)

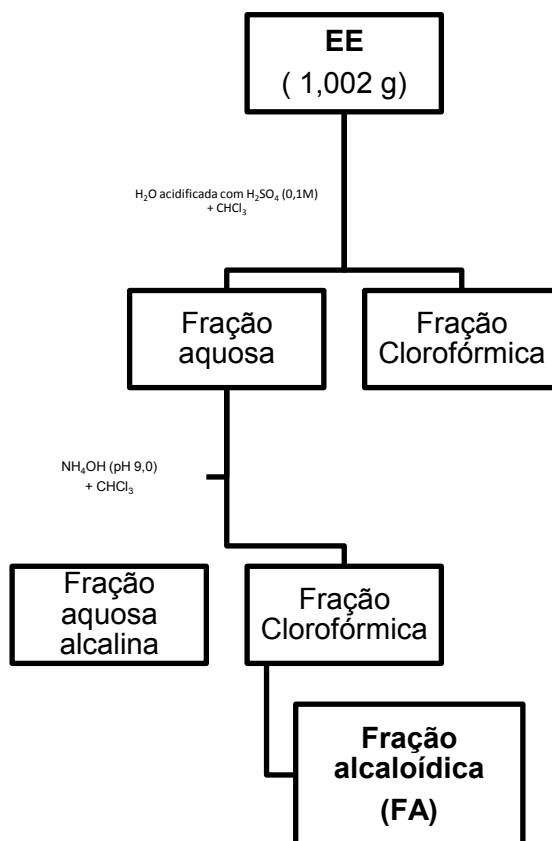
O extrato aquoso foi obtido na Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS) utilizando o método de infusão para parte do material pulverizado (0,50 g) em água destilada (25 mL) a aproximadamente 70 °C. A mistura foi deixada em repouso por 30 minutos, filtrada e levada ao congelador a -70 °C e, posteriormente, submetida à liofilização, fornecendo o extrato aquoso bruto liofilizado (Esquema 2). O rendimento do extrato aquoso foi de 20,3 % (0,1015 g).



Esquema 2 – Representação da obtenção do extrato aquoso bruto (AqE) das folhas de *Tabernaemontana solanifolia* A.DC.

3.2.2.3 Fração alcaloídica (AF)

O preparo da fração alcaloídica também foi realizado na Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS) utilizando parte do extrato etanólico (1,0 g) e dissolvendo em 20 mL de água destilada acidificada com H_2SO_4 (0,1 M) até o pH 3,0. A parte aquosa foi alcalinizada adicionando NH_4OH até o pH 9,0. Em seguida foi adicionado clorofórmio e após formação de duas fases, a fase aquosa e a fase clorofórmica foram separadas, sendo obtida, desta forma, a fração alcaloídica bruta (0,14 g) (Esquema 3).



Esquema 3 – Representação da obtenção da fração alcaloídica das folhas de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC.

3.2.2.3.1 Análise da fração alcaloídica por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

A análise da fração alcaloídica foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) em cromatógrafo Shimadzu GC-17 AQP-500 com detector de massa seletivo, com impacto de ionização (70 eV), acoplado ao cromatógrafo gasoso GF-17B com coluna capilar de sílica fundida LM-5 (15 m X 0,2 mm i.D., 0,2 μ). O gás Hélio foi utilizado como gás de arraste (fluxo de 0,6mL/ min) e a faixa do MS scan foi de 50 – 550 μ .m.a. O volume de injeção foi de 1 μ L, razão split (1:20), com temperatura inicial de 250 °C. A temperatura da coluna foi programada para a faixa de 150 a 280 °C com 15 °C/min.; esta temperatura foi

mantida por 20 min. A temperatura do injetor foi de 290 °C. Amostras de 1 µL foram injetadas com um injetor Hamilton (10µL). Os dados foram processados e a identificação dos compostos foi realizada por meio da comparação de seus índices de retenção e espectros de massas com os dados da literatura e com a biblioteca do equipamento (Nist 2.0) (49).

3.2.2.3.2 Análise da fração alcaloídica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A fração alcaloídica também foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando sistema LaChrom Elite[®] (Hitachi, Tokyo, Japan) equipado com bomba L2130, injetor automático L2200; coluna L2300 a 25 °C com detector DAD L2455 (Hitachi, Tokyo, Japan). O detector foi fixado em 280 nm. A separação foi realizada em coluna de fase reversa C₁₈ (partículas de 5 µm, 150 mm x 4,6 mm i.d.) combinado com coluna apropriada (4 x 4; 5 µm de tamanho de partícula) (Merck[®], Germany). Para a fase móvel foi utilizado sistema gradiente linear composto por ácido fosfórico (1 %) (A) e CH₃CN (B) com fluxo de 0,6 mL/min. A captura dos dados foi realizada utilizando EZChrom Elite software (version 3.3.2 SP1) (Scientific Software. Inc.). Os compostos presentes nas amostras foram caracterizados de acordo com seu espectro de UV-visível e identificados pelo seu tempo de retenção em comparação com padrões comerciais.

3.2.3 Fitoquímica do extrato hexânico (HE)

A fitoquímica do extrato hexânico foi realizada integralmente na Universidade de Brasília (UnB).

O extrato hexânico (20 g) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel 60G (Merck[®]) (altura = 43 cm, diâmetro = 9 cm), sendo coletadas 257 frações. Os solventes utilizados na eluição foram hexano: acetato de etila, em diferentes proporções com gradiente crescente de polaridade conforme descrito na Tabela 3.

As frações (175 mL) foram coletadas e concentradas à secura sob vácuo sendo monitoradas por CCD utilizando placas cromatográficas de sílica (Merck®) 60G e o reagente anisaldeído/ H₂SO₄ como revelador para a visualização (103).

Tabela 3 - Fracionamento do extrato hexânico (HE) de *T. solanifolia* A. DC.

Eluentes	Frações
hexano	1-75
hexano:acetato de etila (9: 1)	76 - 83
hexano:acetato de etila (9: 1)	87
hexano:acetato de etila (9: 1)	88 - 109
hexano:acetato de etila (8: 2)	110 - 122
hexano:acetato de etila (8: 2)	123 - 275

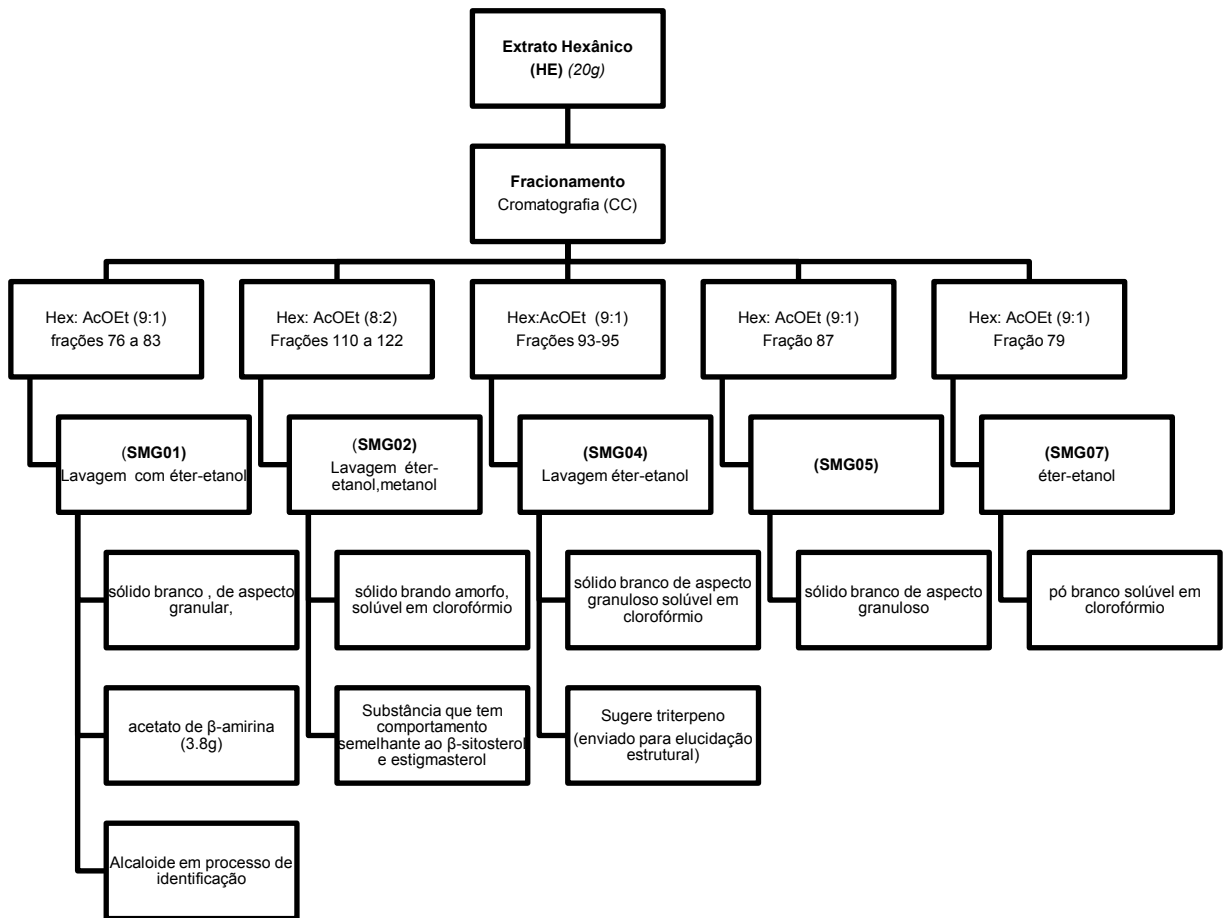
As frações que apresentaram perfis cromatográficos semelhantes foram reunidas, totalizando 7 grupos (SMG 01 a 07) que estão descritos na tabela 4.

Tabela 4 - Reunião das frações obtidas pelo extrato hexânico de *Tabernaemontana solanifolia* A.DC.

Grupos	Frações	Massa (g)
SMG01	76 - 83	3,8
SMG02	110 – 122 (e)	1,0
SMG03	86	1.4
SMG04	93-95 (b)	2,8
SMG05	87	0, 2
SMG06	110 – 122 (f)	2,6
SMG07	79	-

3.2.3.1 Fração 76 - 83 (SMG01)

A fração 76 - 83 (3,8 g) (SMG01) foi lavada com mistura éter-etanol (1:1), fornecendo um sólido branco de aspecto granular, solúvel em clorofórmio (Esquema 4). A fração solúvel na mistura éter: etanol foi submetida à CCD e o cromatograma foi revelado com Dragendorff (R3) aparecendo uma mancha amarela alaranjada indicativa da presença de alcaloide.



Esquema 4 - Fitoquímica do extrato hexânico das partes aéreas de *Tabernaemontana solanifolia* A.DC.

3.2.3.2 Fração 110 – 122 (SMG02)

A fração 110-122 (1,0 g) (SMG02) foi lavada com mistura éter-etanol e, posteriormente, com metanol, fornecendo um sólido branco amorfo, solúvel em clorofórmio.

A comparação por CCD entre SMG02 e uma mistura contendo β -sitosterol e estigmasterol [utilizando mistura Hexano: acetato de etila (8:2) como eluente e anisaldeído/ácido sulfúrico como revelador] mostrou que as duas amostras apresentavam o mesmo Rf. A substância foi submetida à análise por infravermelho (IV) e RMN de ^1H e de ^{13}C para confirmar a mistura.

3.2.3.3 Fração 86 (SMG03)

A fração SMG03, após lavagem com acetona, forneceu um sólido branco amorfo solúvel em clorofórmio (1,4 g). Esse sólido foi enviado para análise dos espectros de IV e RMN de ^1H e de ^{13}C para comparação dos deslocamentos químicos apresentados com os dados constantes na literatura.

3.2.3.4 Fração 93 - 95 (SMG04)

A fração SMG04 (2,8 g) foi lavada com a mistura éter-etanol, fornecendo um sólido branco de aspecto granuloso solúvel em clorofórmio. A substância foi analisada por espectrometria e os resultados foram comparados com a literatura para elucidação estrutural.

3.2.3.5 Fração 87 (SMG05)

SMG05 após lavagem com a mistura éter-etanol forneceu um sólido branco de aspecto granuloso solúvel em clorofórmio (0,2 g). O composto foi analisado por espectrometria de IV e por RMN.

3.2.3.6 Fração 110 - 122 (SMG06)

A fração SMG06 após lavagem com a mistura éter-etanol e, posteriormente, com metanol forneceu um sólido branco amorfo, solúvel em clorofórmio (2,6 g). Esse sólido foi enviado para análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .

3.2.3.7 Fração 79 (SMG07)

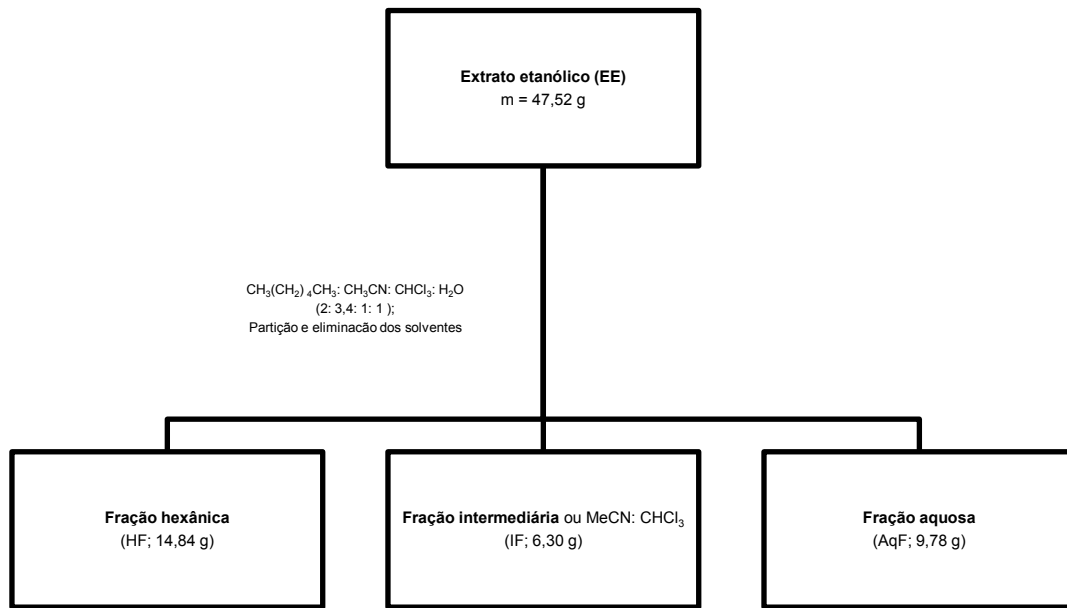
SMG07 forneceu um sólido branco, amorfo, solúvel em clorofórmio após lavagem com éter: etanol.

O resumo do estudo fitoquímico foi apresentado no Esquema 4 (página 81).

3.2.4 Fitoquímica do extrato etanólico (EE): partição trifásica

Parte do extrato etanólico bruto (EE) (47,52 g) foi submetida à partição em sistema líquido trifásico (104), empregando mistura hexano:clorofórmio:acetronitrila:água (2:1:3,4:1) como solvente. Após a partição foram obtidas três frações: fração aquosa (AqF), fração intermediária ou de interfase (acetronitrila:clorofórmio) (IF) e fração hexânica (HF) (Esquema 5).

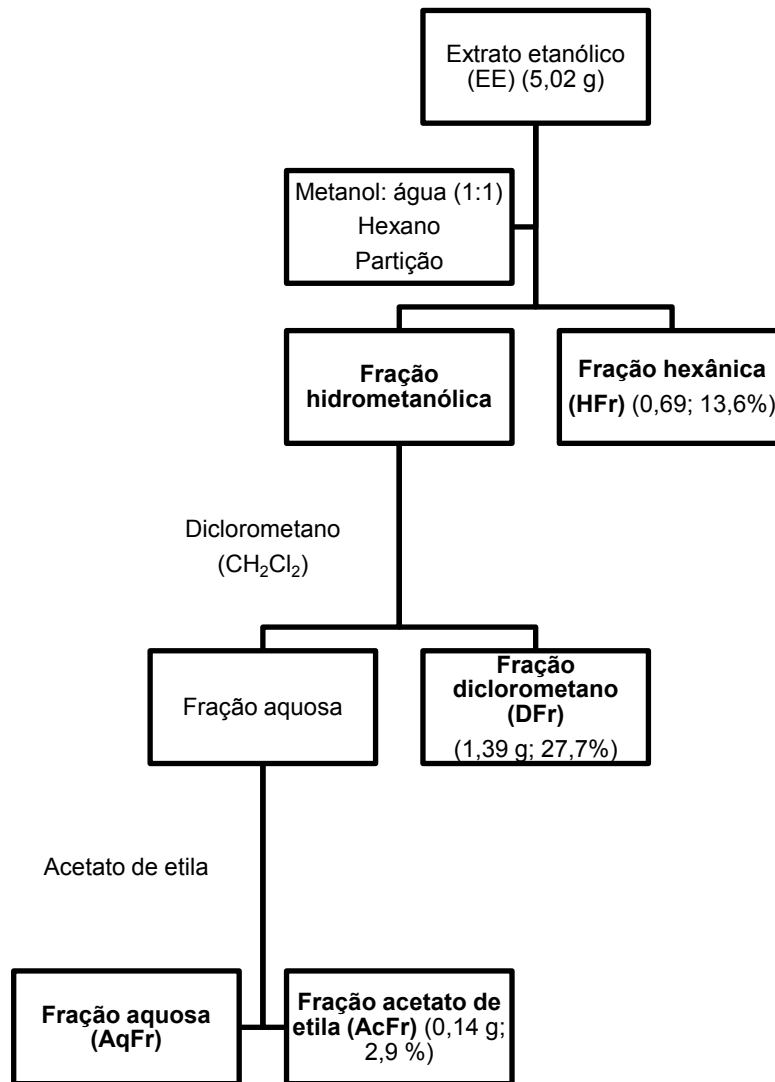
As frações obtidas após eliminação dos solventes por evaporação tiveram os seguintes valores de massa e rendimento, respectivamente: HF (10,3 g; 37,8 %), IF (1,1g; 4,14 %) e AqF (5,9 g; 21,8 %).



Esquema 5 - Representação da partição líquido-líquido do extrato etanólico (EE) de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC.

3.2.5 Fitoquímica do Extrato etanólico (EE): partição bifásica

Parte do extrato etanólico bruto (EE) (5,02 g) foi particionado num sistema líquido bifásico, empregando a mistura metanol: água e hexano como solventes. Após a partição foram obtidas quatro frações: fração hexânica (HFr), fração diclorometano (DFr), fração acetato de etila (AcFr) e fração aquosa (AqFr) (Esquema 6). O resíduo de água das frações com solventes orgânicos foi retirado com aplicação de sulfato de sódio anidro seguido de filtração. As frações obtidas da partição bifásica do extrato hexânico tiveram os solventes eliminados por evaporação tendo como massa e rendimentos os seguintes valores, respectivamente: DFr (1,39 g; 27,7%), AcFr (0,14 g; 2,9 %) e HFr (0,69 g; 13,6%).



Esquema 6 - Partição bifásica do extrato etanólico (EE) de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC.

Posteriormente, as frações obtidas pela partição bifásica do extrato etanólico bruto foram analisadas por CCD utilizando placas de cromatofolhas de alumínio com sílica 60 F₂₅₄ (Malogran[®]) empregando as misturas hexano: acetato de etila (7:1) e reveladores anilsaldeído (R1) e luz ultravioleta (R4).

As frações aquosas e acetato de etila foram analisadas quanto à presença de flavonoides utilizando como eluente a mistura acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26) e reveladas, primeiramente com UV (R4) (365

nm) e depois com R3 (NP/PEG) e comparadas com os padrões (ácido clorogênico, ácido fórmico, rutina, ácido cafeico, ácido ferrúlico, quercetina).

3.2.5.1 Análise das frações em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As frações obtidas pelas partições (trifásica e bifásica) do extrato etanólico de *T. solanifolia* foram analisadas utilizando sistema LaChrom Elite[®] (Hitachi, Tokyo, Japan) equipado com bomba L2130, injetor automático L2200; coluna L2300 a 25 °C com detector DAD L2455 (Hitachi, Tokyo, Japan). A separação foi realizada em coluna de fase reversa C₁₈ (partículas de 5 µm, 150 mm x 4,6 mm i.d.) combinado com coluna apropriada (4 x 4; 5 µm de tamanho de partícula) (Merck[®], Germany). Para a fase móvel foi utilizado sistema gradiente linear composto por ácido fosfórico (1%) (A) e CH₃CN (B) com fluxo de 0,6 mL/min. A captura dos dados foi realizada utilizando EZChrom Elite software (version 3.3.2 SP1) (Scientific Software. Inc.). Os compostos presentes nas amostras foram caracterizados de acordo com seu espectro de UV-visível e identificados pelo seu tempo de retenção em comparação com padrões comerciais.

3.2.6 Determinação do teor de fenóis totais

O ensaio para a determinação do teor de fenóis totais foi realizado com as amostras do extrato aquoso (AqE), extrato hexânico bruto (HE), extrato etanólico bruto (EE) e suas frações hexânica (HF), intermediária (IF) e aquosa (AqF) da partição trifásica do extrato etanólico de acordo com o método descrito por Ling e Tang (2007) (105) na Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS).

A determinação do teor de fenóis foi realizada a partir de uma alíquota de 0,1 mL de amostra, adicionada a 1,5 mL de carbonato de sódio 2%, 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu (1:10 v/v) e 1 mL de água destilada sendo possível determinar o teor de fenóis. As amostras foram incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente e seguido da leitura em 760 nm. O branco foi preparado com todos os

reagentes, exceto a amostra, a qual foi substituída por 0,1 mL de etanol 95%. Os testes foram realizados em triplicata. Uma curva analítica do padrão, ácido gálico, foi obtida empregando-se diferentes concentrações (2,06; 10,3; 20,06; 30,9; 41,2; 82,4; 123,6 $\mu\text{g/mL}$) e por meio das absorvâncias obtidas para cada concentração foi plotado um gráfico de concentração *versus* absorvância.

Com esses dados, foi calculada a regressão linear e obtida a equação da reta ($y = 0,02443 + 0,01266x$), a qual teve seus dados empregados no cálculo das amostras reais. O resultado foi expresso μg de ácido gálico por g de extrato.

3.2.7 Determinação do teor de flavonoides

A determinação do teor de flavonoides foi realizada na Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul utilizando uma alíquota de 0,5 mL de amostra acrescida a 1,5 mL de álcool etílico 95%, 0,1 mL de cloreto de alumínio hexa-hidratado (10 %) ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 0,1 mL de acetato de sódio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (1 mol L^{-1}) e 2,8 mL de água destilada foi o ponto de partida para se determinar o teor de flavonoides. Os testes foram realizados em triplicata, sendo corrido em paralelo o branco em que a amostra foi substituída pelo solvente utilizado em seu preparo. Os tubos foram incubados durante 40 minutos, à temperatura ambiente, e a leitura da absorvância foi realizada a 415 nm, para o que se empregou espectrofotômetro (Fentom[®]) (105-106).

Uma curva analítica do padrão quercetina foi obtida pelo emprego das seguintes concentrações: 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 125,0 $\mu\text{g/mL}$; através da absorvância obtida para cada concentração foi plotado um gráfico de concentração *versus* absorvância. Com esses dados, foi calculada a regressão linear e obtida a equação da reta ($y = 0,00246 + 0,01048x$) a qual teve seus dados empregados no cálculo das amostras reais. O resultado foi expresso em μg de quercetina por g de extrato.

3.3 ESTUDO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

3.3.1 Ensaio de atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi pesquisada por três métodos *in vitro* (método de 2,2–difênil-1-picrilidrazila (DPPH), fosfomolibdênio e, também, pelo método de β -caroteno/ ácido linoleico) e por um método *ex vivo* utilizando eritrócitos humanos.

As análises foram realizadas em quatro instituições: Universidade de Brasília (UnB), Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), Centro Universitário da Grande Dourados (UNIGRAN) e Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).

3.3.1.1 Método de redução do complexo de fosfomolibdênio

A avaliação da capacidade antioxidante dos extratos brutos e das frações de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. foi realizada por meio do método baseado na redução do complexo de fosfomolibdênio com adaptações (107), como segue abaixo.

Preparo da solução reagente: O reagente foi preparado pela mistura de 25 mL de solução aquosa de fosfato de sódio (Na_3PO_4 , 28 mM), 25 mL de solução aquosa de molibdato de amônio tetra-hidratado [$(\text{N}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 4 mM] e 25 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico (H_2SO_4 ; 0,6 M).

Preparo da substância de referência: a solução estoque foi preparada a partir da solubilização de 1 mg/mL de quercetina em etanol.

Obtenção da curva-padrão da quercetina: A partir da solução estoque de quercetina, foram preparadas diluições (0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1 e 0,05 mg/mL) em etanol. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. A curva de calibração foi realizada em tubos com 0,1 mL da solução estoque (1 mg/mL) e

para as diluições foi adicionado 1 mL de reagente, em triplicata. Os tubos foram tampados e mantidos em banho-maria a 95 °C por 90 min. Após esse tempo, as amostras foram deixadas em arrefecimento até a temperatura ambiente. O conteúdo de cada um dos tubos foi transferido para cubetas de plástico e analisado sob o comprimento de onda 695 nm em espectrofotômetro (Shimadzu® e Fentom®), previamente zerado com uma mistura de 1 mL do reagente e 0,1 mL de etanol. Os dados foram analisados estatisticamente para o que se utilizou o programa Prisma; a curva padrão foi construída.

Teste de atividade antioxidante: Para avaliar a atividade antioxidante do extrato e das frações, foi preparada uma solução etanólica (1 mg/mL) de cada extrato e frações. Em tubos 0,1 mL da solução do extrato (1 mg/mL) foi adicionado de 1 mL de reagente, em triplicata. Os tubos foram submetidos a um processo idêntico ao da quercetina explicitado anteriormente.

Resultados: os resultados foram expressos em equivalentes de quercetina a partir da curva-padrão de quercetina. A média das absorbâncias (695 nm) foi aplicada à equação da reta, sendo obtida a concentração relativa aos controles. A equivalência foi obtida dividindo a concentração obtida para o padrão (quercetina) pela concentração usada nas amostras.

3.3.1.2 Avaliação da inibição da peroxidação lipídica empregando o método β -caroteno/ ácido linoleico

O ensaio de atividade antioxidante por meio do sistema β -caroteno/ácido linoleico foi realizado como descrito por Tepes e cols. (2005) (108) com modificações. Uma solução estoque de β -caroteno e ácido linoleico foi preparada a partir de 0,5 mg de β -caroteno dissolvido em 1 mL de clorofórmio e adicionado a 25 μ L de ácido linoleico e 200 mg de Tween 20. O clorofórmio foi removido sob o nitrogênio líquido. A mistura resultante teve seu volume completado para 100 mL de água ultra-pura aerada. O teste foi realizado por meio da adição de 2,5 mL da mistura e 0,3 mL de amostra em diversas concentrações (10-160 μ g/mL), sendo lido

logo em seguida no tempo zero a 470 nm e duas horas após incubação dos tubos a 50 °C em banho-maria. O controle foi preparado substituindo a amostra pelo mesmo volume de metanol. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A inibição da peroxidação lipídica (%) foi calculada a partir da equação: [conteúdo de β -caroteno depois de 2 h do ensaio/ conteúdo inicial de β -caroteno] x 100.

3.3.1.3 Atividade seqüestradora do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) ($C_{18}H_{12}N_5O_6$)

A determinação da atividade antioxidante empregando o radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) baseia-se na habilidade de compostos com propriedades antioxidantes presentes na amostra em sequestrar o radical livre DPPH^{*} em formar estruturas de ressonância estáveis, estabilizando assim o radical livre (109).

Foram preparadas soluções de DPPH em etanol 80 % na concentração de 0,11 mM, e controles positivos com ácido ascórbico (vit. C) e hidroxibutiltolueno (BHT) na concentração de 2 mg/mL, a partir das quais foram realizadas diluições seriadas (1000, 500, 100, 50, 25, 10, 5, 1, 0,1 ug/mL). O controle negativo foi preparado substituindo a amostra pelo mesmo volume de solvente usado para solubilizar as amostras. Os extratos também foram solubilizados em etanol 80 %, com exceção do extrato hexânico. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Após incubação por 30 minutos em temperatura ambiente a leitura das absorbâncias de cada amostra foi realizada em espectrofotômetro ($\lambda = 517$ nm).

O percentual de inibição ou “sequestro” de radical livre (% Δ_0) foi calculado a partir da equação (110):

$$\% \Delta_0 = \frac{[A_0 - (A - A_A)]}{A_0} \times 100$$

Onde:

(A_0) é a absorbância do DPPH em metanol no início da reação,

(A) é a absorbância da amostra em DPPH decorridos 30 min. de reação e

(A_0) corresponde à leitura da amostra com metanol

3.3.1.4 Atividade antioxidante *ex vivo* utilizando-se eritrócitos humanos

O protocolo de atividade anti-hemolítica frente a eritrócitos humanos foi aprovado previamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário da Grande Dourados, uma vez que envolveu seres humanos (protocolo 136/09) (Anexo 1).

O extrato hexânico não foi utilizado no ensaio de atividade anti-hemolítica por não se mostrar solúvel em tampão fosfato monobásico (PBS). Assim, apenas os extratos aquoso e etanólico, juntamente com suas frações (fração hexânica, fração intermediária e fração aquosa) foram objetos de análise, pois o solvente deveria ser obrigatoriamente o PBS (0,9 %) (pH 7,4) de forma a não interferir no processo de hemólise das hemácias. o que não foi possível com o extrato bruto hexânico.

O teste foi realizado conforme descrito por Lenfant e cols. (110) com algumas adaptações.

Coleta de sangue: foram coletados, em tubo com anticoagulante (heparina), 12 mL de sangue total através de punção venosa da fossa cubital de um doador saudável, que não fazia uso algum de medicamentos e/ou de suplementos vitamínicos. Após a coleta, os eritrócitos foram separados por centrifugação. Em seguida, foram lavados com a adição de solução fisiológica a 0,9 %, no próprio tubo com anticoagulante, e centrifugados a 2.500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante obtido foi descartado e o procedimento repetido por mais duas vezes ou até que o sobrenadante ficasse totalmente límpido. Uma suspensão de eritrócitos 1 % (v/v) foi preparada em tampão fosfato de potássio (10 mM, pH 7,4) e incubado com dicloridrato de 2,2'- azobis (2-metilpropionamida) (AAPH) em diferentes concentrações, a 37 °C com agitação constante (75 rpm) entre 0 e 6 horas. O grau de hemólise (%) foi determinado pela medida de absorbância a 540 nm.

Curva dose resposta do dicloridrato de AAPH: uma suspensão de eritrócitos (1 %) (v/v) em tampão fosfato de potássio monobásico contendo NaCl (0,9 %) foi preparada e adicionada de 300 µL do concentrado de eritrócitos a concentrações diferentes de AAPH (2,5 mM; 5,0 mM e 10 mM) para volume final de 30 mL. A mistura foi incubada a 37 °C e agitada a 75 rpm durante 6 horas. A cada intervalo de

1 hora uma alíquota de 3 mL foi retirada, incubada em banho de gelo (0,5 a 1 °C) por 10 minutos, para interromper a reação do AAPH, e centrifugada por 5 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi retirado para a leitura da hemólise em 540 nm. A partir desse experimento a concentração de 10 mM de AAPH foi escolhida para realizar os ensaios com os extratos (Tabela 5).

Tabela 5 – Sistema para preparo da curva dose-resposta dos extratos e frações de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. frente ao teste de hemólise com eritrócitos *ex vivo*

Papa de hemácia (µL)	Amostra (10 mg/mL)	AAPH (mg/mL)	Volume do Tampão (mL)	Volume do extrato (µL)	Concentração final do extrato (mg/mL)
300	-	2,7	29,7	-	0
300	EE	2,7	28,7	1000	0,330
300	EE	2,7	28,9	800	0,266
300	EE	2,7	29,3	400	0,133
300	EE	2,7	29,5	200	0,066
300	EE	2,7	29,6	100	0,033
300	AqE	2,7	28,7	1000	0,330
300	AqE	2,7	28,9	800	0,266
300	AqE	2,7	29,3	400	0,133
300	AqE	2,7	29,5	200	0,066
300	AqE	2,7	29,6	100	0,033
300	AqF	2,7	28,7	1000	0,330
300	AqF	2,7	28,9	800	0,266
300	AqF	2,7	29,3	400	0,133
300	AqF	2,7	29,5	200	0,066
300	AqF	2,7	29,6	100	0,033
300	HF	2,7	28,7	1000	0,330
300	HF	2,7	28,9	800	0,266
300	HF	2,7	29,3	400	0,133
300	HF	2,7	29,5	200	0,066
300	HF	2,7	29,6	100	0,033
300	IF	2,7	28,7	1000	0,330
300	IF	2,7	28,9	800	0,266
300	IF	2,7	29,3	400	0,133
300	IF	2,7	29,5	200	0,066
300	IF	2,7	29,6	100	0,033

Solução estoque dos extratos e frações de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC.

e curva dose resposta: o preparo da solução estoque das amostras foi realizado em tampão fosfato de potássio monobásico (10 mM, pH 7,4) contendo NaCl (0,9 %) para obtenção de concentração final de 10 mg/mL. A solução após homogeneização foi centrifugada a 2500 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado nos testes. Para construção da curva de dose-resposta dos extratos e frações de *T. solanifolia*, foram preparadas suspensões com o concentrado de eritrócitos (1 %) em tampão fosfato de potássio monobásico (pH 7,4) contendo NaCl (0,9 %) e AAPH (10

mM); cada uma delas foi submetida a uma concentração diferente dos extratos a serem testados, com volume final de 30 mL (Tabela 5).

3.3.2 Ensaio de toxicidade

As análises toxicológicas foram realizadas inicialmente com o teste de citotoxicidade frente aos náuplios de *Artemia salina* L. (Universidade de Brasília – UnB, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul - UEMS e Centro Universitário da Grande Dourados - UNIGRAN) e, posteriormente, com o teste *in vivo* utilizando o método de classes estabelecido pelo protocolo 423 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) (111).

3.3.2.1 Citotoxicidade frente aos náuplios de *Artemia salina* L. (112)

Preparo da solução salina: uma solução de sal marinho (36,5 g/L) foi preparada e ajustada com solução 0,1 M de NaOH, até pH 8 - 9. Essa solução foi utilizada para a eclosão dos ovos de *Artemia salina* e para o preparo das diluições.

Eclosão dos ovos: os ovos de *A. salina* foram postos para eclodir em solução salina, por 48 horas, com aeração constante e com exposição à luz artificial.

Preparo do extrato: o extrato (20 mg) foi solubilizado em 0,2 mL de DMSO e o volume foi completado para 20 mL com solução salina (1000 ppm). A partir dessa solução foram preparadas as diluições (500, 250 e 125 ppm) em triplicatas. Em seguida, foram adicionadas 10 larvas de *A. salina* em cada tubo. Os tubos foram mantidos sob iluminação e as larvas sobreviventes foram contadas após 24 horas.

Controle negativo: cresceu-se apenas o solvente utilizado para o preparo das amostras; (0,2 mL de DMSO).

Controle positivo: para o controle positivo foi utilizado 2,0 mg de dicromato de potássio.

A DL₅₀ foi calculada utilizando o programa PROBITOS.

3.3.2.2 Toxicidade *in vivo*

O protocolo experimental para toxicidade foi aprovado pelo Comitê de Experimentação Animal da Unigran (protocolo 171/09) (Anexo 2).

Os extratos foram ressuspensos em solução salina com 25 % de Tween 80[®].

Foram utilizados 32 ratos Wistar (*Ratus norvegicus*), machos, adultos jovens com 8 a 12 semanas de vida e o peso de 347,000 ± 0,005 g do biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Os animais foram mantidos no biotério da UNIGRAN, à temperatura de 23 °C, com umidade relativa do ar variando de 50 a 70 % e fotoperíodo claro e escuro de 12 horas durante 10 dias. Água e ração (Nuvilab[®]) foram oferecidas aos animais *ad libitum*, exceto nas doze horas que antecederam à administração dos extratos. Cada grupo de três animais foi colocado aleatoriamente em caixa de polipropileno.

O procedimento experimental foi realizado segundo o protocolo 423 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) (111) que determina as doses a serem utilizadas no estudo (5, 50, 300 ou 2000 mg/ kg) e o número de animais por dose (três ratos). A dose de 2000 mg/Kg foi escolhida por não existirem dados disponíveis na literatura sobre a espécie testada (Tabela 6).

Tabela 6 – Protocolo de diluição e administração dos extratos de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. em ratos para determinação da toxicidade aguda (1^o e 2^o dia)

Grupos	Dose (mg/Kg)	Peso médio dos ratos (kg)		Volume administrado (mL)*	
		1 ^o dia	2 ^o dia	1 ^o dia	2 ^o dia
Extrato Etanólico	2000	0,34	0,35	1,70	1,75
Extrato Hexânico	2000	0,35	0,38	1,77	1,9
Extrato Aquoso	2000	0,35	0,34	1,72	1,7
Salina + 2,5% Tween 80	0	0,35	0,34	1,74	1,7

* Os valores representam o cálculo do volume do extrato diluído a ser administrado em função da média do peso corporal dos ratos (n= 3).

Após a administração dos extratos, os animais foram observados por 3 horas (30 min.; 1 hora; 3 horas) e em seguida a cada 24 horas até completar o período de 14 dias para verificação de qualquer alteração no comportamento geral ou de atividades fisiológicas, tais como atividade geral, irritabilidade, contorção, posição trem posterior, reflexo endireitamento, tônus do corpo, força para agarrar, ataxia, tremores, convulsões, lacrimação, ptose paupébral, micção, defecação, piloereção, respiração e morte. Também foi observada a ocorrência de alterações da pele, pelos, mucosas e olhos.

3.3.2.2.1 Análises dos parâmetros bioquímicos

As amostras sanguíneas foram coletadas por punção caudal em tubos não heparinizados e, posteriormente, centrifugadas. A análise laboratorial de parâmetros bioquímicos foi realizada em amostras de soro utilizando-se o método enzimático para ureia e o método de cinética para creatinina, L-alanina-aminotransferase e L-aspartato-aminotransferase. Os ensaios foram realizados com kits comerciais (Gold Analisa[®] e Lab Test[®]) utilizando espectrofotômetro Bio 200 (Bioplus[®]).

3.3.2.2.2 Análises histopatológicas

Após a eutanásia, a avaliação macroscópica dos órgãos foi realizada com vista desarmada, além de pesagem do fígado (PF) para que se determinassem os pesos denominados de índice hepatossomático (IHS), obtido em função da relação entre o peso do fígado (PF) e o peso total do corpo dos animais (PT): $IHS = \text{peso do fígado} / \text{peso total do rato}$.

Posteriormente, as amostras de fígado foram fixadas em solução de formol tamponada (10 %) por 24 horas. Após a fixação, procedeu-se à lavagem em álcool 70% para desidratação em série alcoólica crescente, diafanização em série de xilóis, inclusão em Histosec e cortados em espessura variando entre 2 a 5 μm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (113).

Os cortes histológicos foram fotomicrografados com fotomicroscópio Axioskop-Zeiss e analisados quanto às alterações em suas estruturas e morfologia celular quando comparados aos cortes obtidos dos animais pertencentes ao controle.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, correspondendo a um controle e três extratos de *T. solanifolia*. Quando a análise de variância mostrou diferenças significativas entre tratamentos ($p < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste Tukey, realizados no *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc., version 6.12, 1999).

3.3.3 Pesquisa de propriedades antimicrobianas *in vitro*

As propriedades antimicrobianas foram pesquisadas por duas técnicas, sendo, primeiramente, realizado um “screening” para avaliar a atividade biológica de cada extrato e fração, para o que se utilizou a técnica de difusão em meio sólido adaptado do protocolo da “Clinical and Laboratory Standards Institute” (114) (cavidade e disco) sendo, posteriormente, quantificados pela técnica de microdiluição para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)(115).

Ambos os testes foram realizados pela parceria da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) com o Centro Universitário da Grande Dourados (UNIGRAN).

Os extratos brutos (aquoso, etanólico e hexânico) foram empregados para investigação desta propriedade.

3.3.3.1 Técnica de difusão

Os microrganismos *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 8739 e 25922), *E. coli* produtora de β -lactamase (ATCC 35218), *C. albicans* (ATCC 10231, 2219 e 36801) e *C. crusei* (ATCC 2419) foram inoculados em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Difco®) e incubados a 37 °C/24 a 48h para reativação da cepa, após esse

período, os microorganismos foram cultivados em Agar *Müller-Hinton* (MH) (Merck®) e incubados novamente a 37 °C/24 a 48h.

A solução estoque das amostras foi preparada em salina estéril na concentração de 40 mg/mL, enquanto o acetato de β -amirina (SMG01) foi de 10 mg/mL.

O controle positivo para bactérias foi tetraciclina e para fungos foi cetoconazol e anfotericina B, ambos solubilizados em solução salina estéril na concentração de 20 mg/mL. Paralelamente aos testes, foi realizado o controle negativo pela adição do mesmo solvente utilizado na dissolução dos extratos e/ou partições (hexano para o extrato hexânico bruto, etanol absoluto para o extrato etanólico e suas partições e soro fisiológico para o extrato aquoso e acetato de β -amirina).

O inóculo microbiano foi padronizado em solução fisiológica 0,9 % em uma turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de *Mac Farland*, homogeneizado em vortex e semeado na superfície das placas de Agar MH (20 mL em placas com diâmetro de 90 x 15 mm) com auxílio de *swabs* estéreis.

Para o teste de difusão em cavidade foram realizadas perfurações de 6 mm de diâmetro com cânulas de alumínio estéreis, em cujas cavidades foi adicionado o equivalente a 100 uL do composto a ser testado ou substâncias referente aos controles positivo e negativo.

Para o teste de difusão em disco, discos estéreis de papel filtro com 6 mm de diâmetro (Whatman n. 6) foram impregnados com alíquotas das amostras (100 μ L) e colocados para secar em temperatura ambiente e acrescido às placas após a semeadura dos inóculos (15 min.).

As placas foram incubadas a 37 °C, por 24-48 horas para bactérias e de 48-72 horas para os fungos. Decorrido o tempo de incubação, foi realizada a interpretação dos dados por meio da mensuração do diâmetro dos halos de inibição; os resultados foram expressos em milímetros (mm) (116). Os testes foram realizados em triplicata e os controles realizados nas mesmas condições do teste citado anteriormente.

As amostras que apresentaram halos de inibição foram submetidas à determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida ou Fungicida Mínima (CBM ou CFM) pela técnica de microdiluição.

3.3.3.2 Técnica de Microdiluição

Para a preparação da solução estoque dos extratos foram preparadas soluções na concentração de 40 mg/mL, enquanto para acetato de β -amirina e para os controles positivos (tetraciclina e cetoconazol) as soluções preparadas foram de 4 mg/mL. As concentrações intermediárias foram preparadas por meio de diluições seriadas na própria microplaca. Assim, a faixa de concentração final testada para os extratos foi de 15,6 a 2000 μ g; de 1,56 a 200 μ g para acetato de β -amirina e controles positivos.

Os cultivos microbianos foram subcultivados em agar MH por 24 h a 35 – 37°C. Após a ativação, foi feita a padronização do inóculo em solução fisiológica estéril a 0,9%, comparando-se com a turvação do tubo 0,5 da escala de *Mac Farland* (1×10^8 UFC/mL). Em seguida, essa suspensão foi diluída a 1:10 (1×10^7 UFC/mL) e volumes de 10 μ L foram transferidos para as cavidades de microplaca estéril, contendo 100 μ L de caldo MH acrescido das diferentes concentrações finais do extrato a serem testadas, resultando num inóculo final de aproximadamente 1×10^6 UFC/mL.

Paralelamente, foram preparados os controles do extrato, do caldo MH e dos microorganismos. As placas, após serem vedadas com tampas plásticas, foram incubadas em estufa bacteriológica a 37° C, por 24 horas; a leitura foi feita em espectrofotômetro de microplacas ($\lambda = 620$ nm).

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pela observação da menor concentração do extrato que inibiu o crescimento microbiano; a concentração bactericida (CBM) ou fungicida (CFM) mínimas constituiu na menor concentração que impediu a multiplicação microbiana. Para a determinação desses parâmetros uma alíquota das amostras foi tomada dos poços (10 μ L) e semeada em ágar MH, incubando-se à temperatura de 37 °C durante 24h (117).

3.3.4 Testes de fitotoxicidade

Os testes de alelopatia foram realizados com sementes de *Lactuca sativa* L. (alface) e sementes de *Glycine max* L. (soja). Os experimentos conduzidos com a semente da alface foram realizados e confirmados pelas Universidades UnB e Uems, respectivamente. Já os testes envolvendo a fitotoxicidade das sementes de *Glycine max* L. foram realizados no Centro Universitário da Grande Dourados (UNIGRAN).

3.3.4.1 Avaliação da germinação

Preparo das sementes: as sementes foram submetidas à desinfecção por imersão em solução aquosa de hipoclorito de sódio a 2 %, por 5 minutos e, posteriormente, foram lavadas com água destilada. Essas sementes foram colocadas em placa de petri com 20 mL de água destilada para pré-germinar, por 48 horas. O teste foi realizado com os extratos brutos (hexânico, etanólico e aquoso), as frações obtidas do extrato etanólico (partição trifásica) e acetato de β -amirina.

Preparo dos extratos e controles: o extrato hexânico de *T. solanifolia* (60 mg) foi solubilizado em 60 mL de diclorometano (1000 ppm) e a partir dessa solução foram preparadas as diluições subsequentes (500 ppm e 250 ppm) e 10 mL das soluções obtidas foram utilizadas para umedecer o papel que revestiu cada placa de petri. Após evaporação do solvente, 10 mL de água destilada foram adicionados a cada placa e 10 sementes foram distribuídas sobre o papel de forma aleatória. O conjunto foi mantido sob condições controladas de luminosidade e temperatura. Para cada tratamento foram feitas três repetições.

O extrato etanólico e frações (AqF, HF, IF) foram preparados utilizando-se etanol para obtenção da concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ (500 ppm). As concentrações obtidas foram: 500, 250 e 125 ppm.

A solução de acetato de β -amirina foi preparada utilizando-se 6 mg diluídos em 60 mL de clorofórmio, seguindo o mesmo procedimento acima descrito. As concentrações obtidas foram: 100, 50 e 25 ppm.

O controle negativo foi preparado pelo umedecimento do papel com o qual a placa foi revestida com o solvente utilizado para o preparo das soluções (diclorometano, etanol ou clorofórmio), sendo o conjunto submetido ao mesmo protocolo descrito para os grupos das amostras.

A ocorrência de germinação das sementes foi monitorada (24, 48, 72, 96 e 120 horas) e o critério utilizado para a germinação foi a emergência da radícula de 2 mm seguida de curvamento geotrópico da raiz. As sementes germinadas foram excluídas do experimento a cada intervalo de observação. Para a análise dos testes foram usadas as contagens diárias de germinação (G%) (118).

3.3.4.2 Avaliação do crescimento

Após a germinação prévia das sementes, à temperatura controlada por até 40 horas, dez sementes foram distribuídas em placa de petri de 9 cm de diâmetro. Às placas, previamente preparadas como descrito para o teste de germinação, foram adicionados 10 mL de soluções a serem testadas para evaporação completa do solvente.

Os extratos foram preparados nas mesmas concentrações e condições descritas para o teste de germinação. Cada tratamento foi repetido três vezes, totalizando 30 plântulas para cada grupo.

As plântulas cresceram por 7 dias mantidas sobre a bancada, à temperatura ambiente média de 25 °C. O tamanho da radícula e dos hipocótilos foi medido após sete dias.

3.3.4.3 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do Software Origin 6.0 utilizando Anova seguida pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foi considerado estatisticamente diferente quando $p < 0,05$.

3.3.5 Atividade inseticida com *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)

As lagartas *A. gemmatalis* H. foram coletadas e mantidas em dieta artificial elaborada à base de feijão, proteína de soja, germem de trigo, caseína e Agar adaptado de Greene e cols. (1976) (119). Os experimentos foram realizados na Unigran sob temperatura (T) $26 \pm 3^\circ\text{C}$, umidade relativa (UR) $65 \% \pm 5 \%$ e fotoperíodo de 12 horas. Os respectivos solventes puros e a água foram utilizados no grupo de tratamento-controle em paralelo. Para realização do bioensaio, as lagartas recém-eclodidas foram transferidas, com o auxílio de um pincel fino, para o recipiente contendo a dieta incorporada com os respectivos tratamentos.

A avaliação dos efeitos biológicos dos extratos de *T. solanifolia* sobre o desenvolvimento de *A. gemmatalis* foi avaliada acompanhando-se os seguintes parâmetros biológicos: número médio de lagartas, mortalidade (%) (equação 1), consumo da dieta, número, massa e tamanho de pupas.

$$(Equação 1) \%Mortalidade = \left\{ 1 - \left[\frac{\text{Tratamento}^1}{\text{Controle}^2} \right] \right\} \times 100$$

Onde: ¹ Número de lagartas no tratamento

² Número de lagartas no controle

Para medir o consumo da dieta foi determinada a ingestão, a excreção das fezes (g) e a digestibilidade aproximada (%). O cálculo dos índices de digestibilidade (equação 2) e balanço (equação 3) foi realizado utilizando-se as seguintes equações:

$$(Equação 2) \text{Índice de digestibilidade} = \frac{\text{dieta ingerida (g)} - \text{fezes excretadas (g)}}{\text{dieta ingerida (g)}}$$

$$(Equação 3) \text{Índice de balanço} = \text{dieta ingerida (g)} - \text{fezes excretadas (g)}$$

Foram conduzidos 2 experimentos, sendo o experimento 1 realizado adicionando-se somente os solventes (água, hexano e etanol) à dieta artificial das lagartas para observação do comportamento dos mesmos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo os tratamentos representados pelos três solventes, com 10 repetições. No experimento 2, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com os tratamentos arranjados em fatorial (3 x 4), sendo três extratos (aquoso, hexânico e etanólico) e quatro concentrações (0, 250, 500 e 1000 ppm de extrato), com 10 repetições. Os parâmetros avaliados nos dois experimentos foram os mesmos acima já descritos.

Satisfeitas as pressuposições de que os dados experimentais possuíam uma distribuição normal e que as variâncias dentro de tratamentos (e dentro de blocos) fossem constantes, deu-se prosseguimento à análise de variância dos dados e a aplicação do teste T de significância ($\alpha = 0,05$). A análise teve prosseguimento com a aplicação do teste de comparação de médias Tukey com 5% de probabilidade para os fatores qualitativos.

3.3.6 Avaliação comportamental no labirinto em cruz elevado (LCE)

Para a realização do teste de avaliação comportamental no Labirinto Cruz Elevado (LCE), o protocolo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Unigran (Anexo 2), local que os testes foram conduzidos. O método do LCE, adaptado de Pelow e cols. (1985) (120), foi utilizado para investigar o comportamento emocional induzido por drogas ansiolíticas ou ansiogênicas e por outros tipos de estressores.

O labirinto utilizado neste estudo foi construído de madeira com dois braços abertos opostos (50 x 10 x 1 cm) e dois fechados, com e sem bordas de proteção (50 x 10 x 40 cm), dispostos, perpendicularmente, aos braços abertos em forma de cruz grega posicionados a uma altura de 50 cm do chão. Os braços, abertos e fechados, estavam conectados por uma plataforma central (10 x 10 cm).

Fármacos e solventes: Os solventes utilizados foram de grau padrão analítico (P.A.). Diazepam (Campaz[®]) foi utilizado como controle positivo.

Preparação dos extratos e substâncias: os extratos (etanólico, hexânico e aquoso) e a substância acetato de β -amirina foram dissolvidos em solução de polisorbato 80 (Tween 80[®]) (8 %) em salina estéril (0,9%) e homogeneizados em banho de ultrassom por 20 minutos.

Animais: foram utilizados ratos *Wistar* machos adultos (*Rattus norvegicus*), cujo peso variava entre 300 e 400 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), *campus* Campo Grande. Os ratos foram acomodados em gaiolas plásticas, em número de seis por gaiola; permaneceram em salas com temperatura controlada (25 ± 4 °C) e ciclo de luz de 12/12 h, recebendo água e ração "ad libitum", exceto durante as 12 horas que precederam a realização dos experimentos.

Tratamentos: os extratos (aquoso, etanólico e hexânico) (1,0 g/kg) e acetato de β -amirina (21 mg/Kg) foram administrados por via oral (gavagem). Todos os grupos experimentais foram constituídos de oito animais. A escolha da dose foi padronizada de acordo com os experimentos prévios para outras atividades, visto que nenhum outro trabalho utilizando-se a planta ou este modelo de pesquisa de atividade ansiolítica foi registrado com esta espécie.

Os tratamentos empregados foram: (1) grupo controle com solução com polisorbato 80 (Tween 80[®]) (8 %) em salina estéril (0,9 %) (SAL); (2) grupo controle positivo com Diazepam (DZP) (2 mg/ kg; intraperitoneal - *i.p.*); (3) grupo tratado com extrato etanólico (EE) (1,0 g/ kg; via oral - *o.p.*); (4) grupo tratado com extrato hexânico (HE) (1,0 g/kg; *o.p.*); (5) grupo tratado com extrato aquoso (AqE) (1,0 g/Kg; *o.p.*) e (6) grupo tratado com acetato de β -amirina (SMG01) (21 mg/Kg; *o.p.*).

Avaliação da atividade ansiolítica pelo Labirinto em Cruz Elevado (LCE): os animais receberam os diferentes tratamentos via oral (gavagem); trinta minutos depois, foram posicionados no centro do labirinto, voltados para o braço aberto e observados durante 300 segundos por meio de filmagem com câmera (Power Shop Pro 1/ Canon[®]) auxiliada por tripé. Considerou-se a entrada do animal em um dos braços, quando as quatro patas se achavam dentro do respectivo braço. A solução

de polisorbato 80 (Tween 80[®]) (8 %) em salina (0,9 %) foi utilizada como controle negativo; o diazepam (2 mg/Kg; *i.p.*), como controle positivo.

O sistema de LCE foi limpo com etanol 70 % após observação de cada animal. Todo procedimento foi realizado em luz ambiente artificial (60 W).

A frequência de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos (BA) e fechados (BF) foram determinados, sendo a frequência total de entradas obtida pela soma simples das frequências de entradas nos braços abertos e nos fechados. Os seguintes parâmetros comportamentais também foram determinados: "head-dippings" (HD) (imersões de cabeça), "rearings" (REA) (levantar), associado ao comportamento de emocionalidade também foram quantificados, como a emissão de bolos fecais (BF).

O aumento seletivo nos parâmetros correspondentes aos braços abertos (frequência e tempo) revela um efeito ansiolítico; o inverso é verdade para compostos ansiogênicos. O número de entradas nos braços fechados avalia a atividade motora dos animais (121), enquanto as medidas etológicas aumentam a sensibilidade do teste aos compostos com ação diferente dos benzodiazepínicos.

Para análise dos resultados foram considerados os valores absolutos (tempo de permanência e número de entradas nos braços abertos e fechados), bem como os respectivos valores percentuais, segundo as fórmulas abaixo:

% tempo no braço aberto (% TBA) = (tempo no braço aberto/tempo total) x 100

% tempo no braço fechado (% TBF) = (tempo no braço fechado/tempo total) x 100

% frequência de entradas no braço aberto (% FBA) = (entradas no braço aberto/total de entradas) x 100

% frequência de entradas no braço fechado (% FBF) = (entradas no braço fechado/total de entradas) x 100

Análise estatística: os resultados foram expressos em média ± erro padrão e como tratamento estatístico empregou-se ANOVA para comparação das médias e teste de Tukey quando $p < 0,05$. As análises e os gráficos foram confeccionados no programa Prisma 3.0[®].

3.3.7 Anatomia foliar

Para a análise da anatomia foliar, folhas adultas pertencentes ao quinto nó foram coletadas por integrantes do projeto na Universidade de Brasília e conservadas em álcool 70 % (19) até o processamento na Unigran e na UFGD.

As análises anatômicas foram efetuadas a partir de secções transversais do bordo do limbo e pecíolo, utilizando material apenas fixado. As secções obtidas foram clarificadas com hipoclorito de sódio a 20 % e, após serem lavadas em água acética 1% foram submetidas à coloração com safranina e azul de astra (*safrablau*) (122) e montadas em gelatina glicerinada (123).

Foram efetuados cortes paradérmicos na região do limbo, a mão livre, com lâmina de aço, para observação do tipo de estômatos.

As fotomicrografias foram obtidas em fotomicroscópio Zeiss, modelo Axiovision 3.1 com analisador de imagem Axioskop 2 plus. Para todas as ilustrações foram preparadas escalas nas condições ópticas adequadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com o estudo fitoquímico e de *T. solanifolia* A. DC. são apresentados para o extrato hexânico, extrato aquoso e extrato etanólico, bem como suas frações (alcaloídica, trifásica e bifásica).

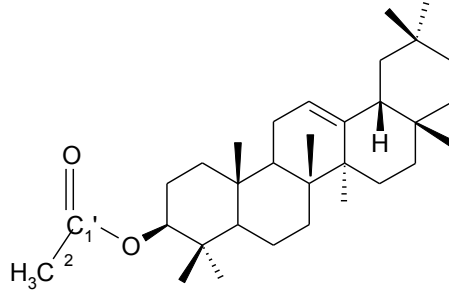
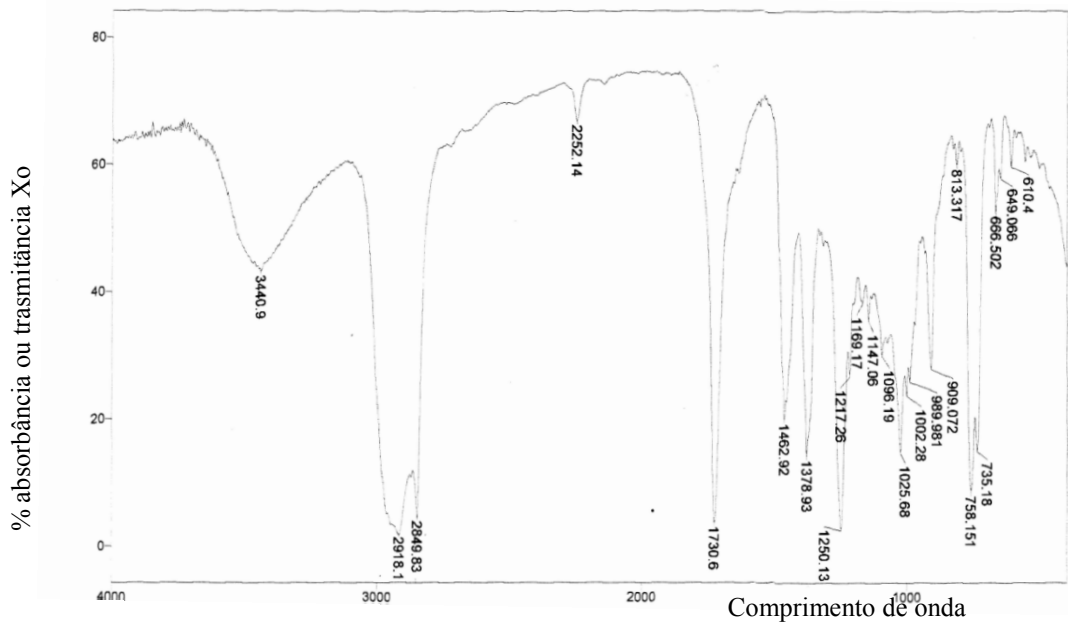
4.1 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS PRESENTES NO EXTRATO HEXÂNICO

O estudo fitoquímico do extrato hexânico resultou na identificação de dois compostos denominados de SMG01 e SMG02 que serão descritos abaixo. Outros compostos não puderam ser investigados por insuficiência de massa obtida durante seu fracionamento.

4.1.1 Identificação estrutural de SMG01

A análise do espectro de IV de SMG01 (KBr, cm^{-1}) (Figura 2) mostrou duas bandas de absorção em 2918 e 2849 cm^{-1} , característica de estiramento da ligação C - H de carbono sp^3 (124). O espectro apresentou ainda banda em 1730 cm^{-1} correspondente a deformação axial de ligação dupla (C = O), bandas de absorção em 1002 e 1025 cm^{-1} atribuídas a deformações angulares de ligação C - H em grupos metilênicos e metílicos (124).

A análise dos espectros de RMN de ^1H de SMG01 mostrou deslocamentos químicos que sugeriram a presença de um triterpeno do tipo oleanano, acetato de β -amirina (**71d**). Sinais na região entre δ 0,80 a 1,80 (Figura 4), atribuídos a hidrogênios de grupos metínicos, metílicos e metilênicos e um sinal em δ 5,1; característico de hidrogênio metílico. A análise também mostrou um simpleto em δ 2,05 típico de hidrogênio de grupo acetila (Figuras 3, 4 e 5).

Acetato de β -amirina (**T1d**)**Figura 2** – Espectro na região do infravermelho do SMG01 (KBr, cm^{-1})

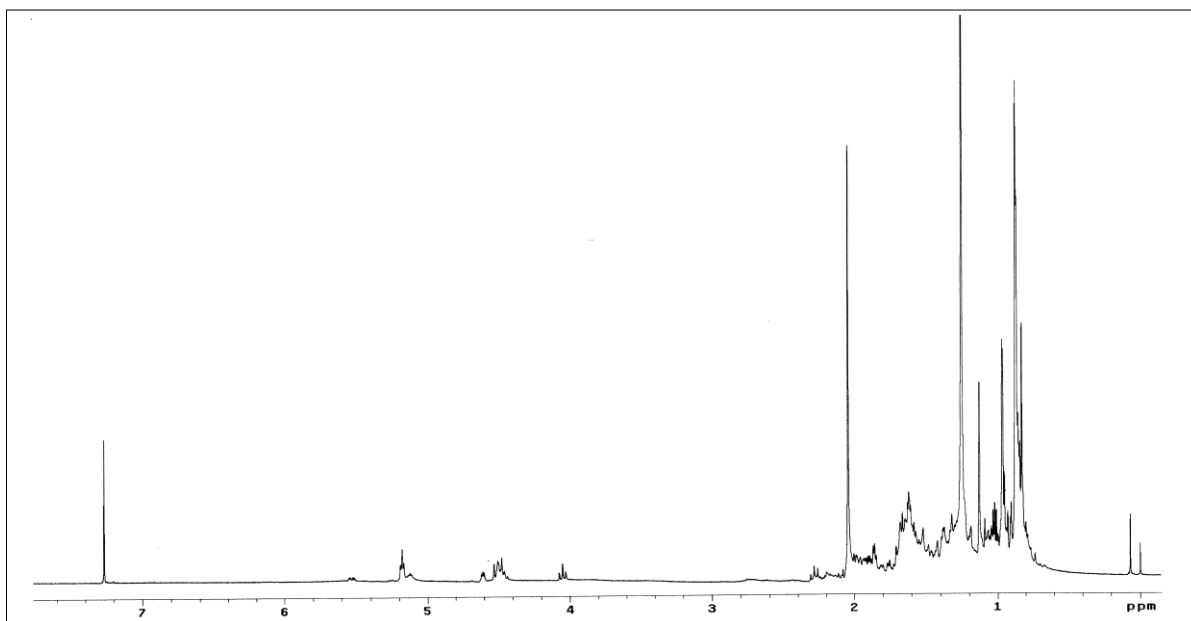


Figura 3 – Espectro de RMN de ¹H de SMG01 (300 MHz, CDCl₃)

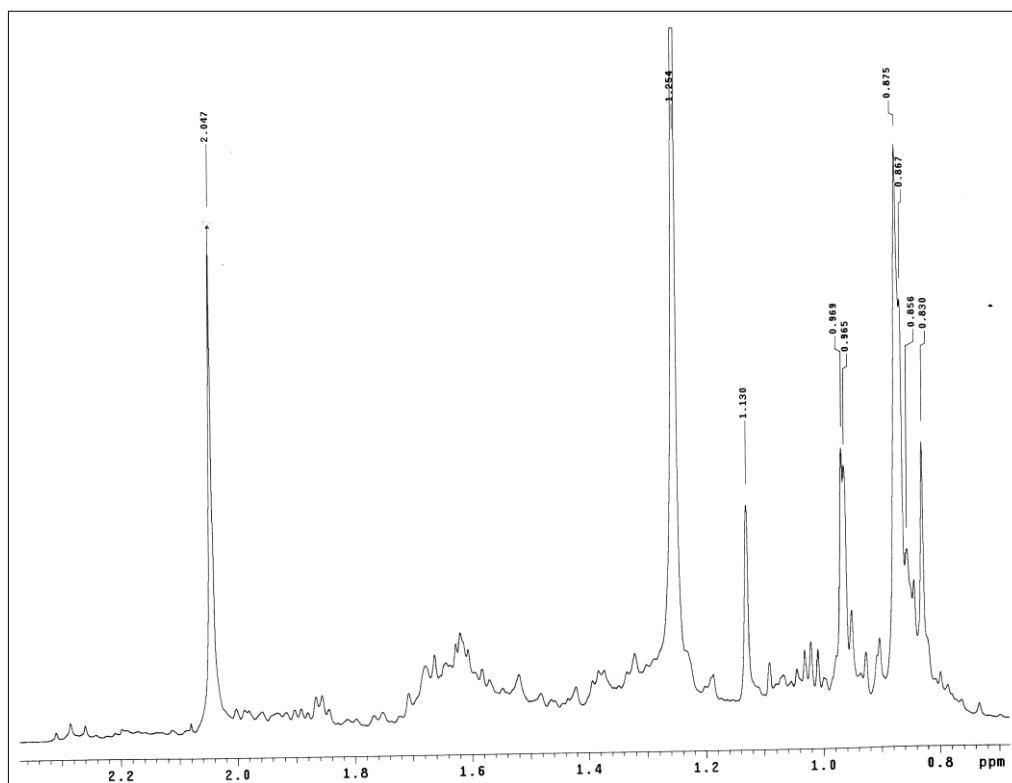


Figura 4 – Espectro de RMN de ¹H de SMG01 – Expansão da região entre δ 0,8 a δ 2,2 (300 MHz, CDCl₃)

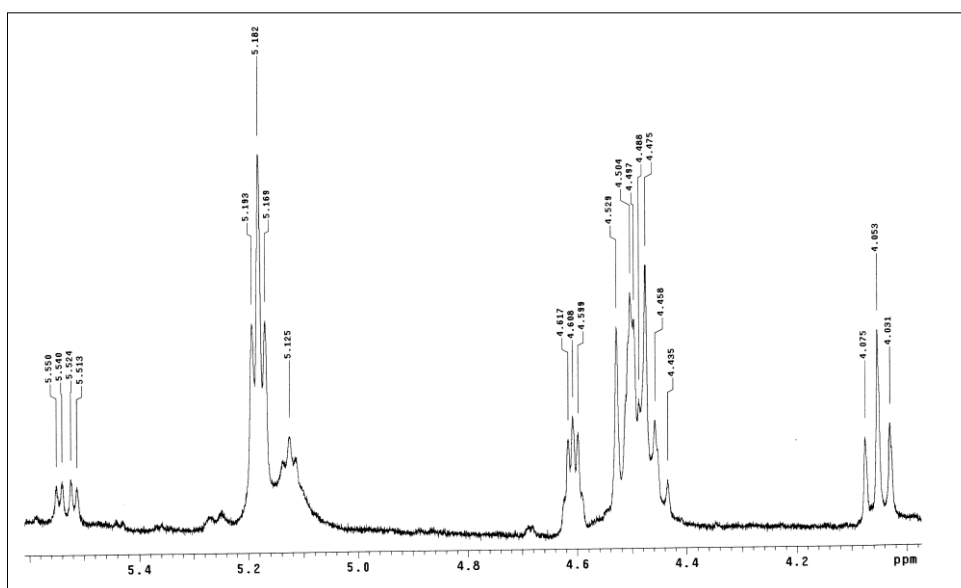


Figura 5 – Espectro de RMN de ^1H de SMG01 – Expansão da região entre δ 4,0 a 5,6 (300 MHz, CDCl_3)

O espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) confirmou a natureza triterpênic da substância. Os sinais exibem a presença de grupos metilas já visualizados no espectro de RMN de ^1H . A presença de grupo acetila foi confirmada por um sinal em δ 171 referente a carbono carbonílico, e do sinal em δ 56, atribuído ao carbono de grupo metila de éster (Figura 6). O sinal em δ 80,9 foi atribuído ao carbono ligado a oxigênio de éster (Figura 7) confirmando a absorção do espectro do infravermelho. Além disso, o espectro mostrou vários sinais entre δ 14 e δ 50 característicos de carbonos metílicos, metínicos e metilênicos (Figura 8). A comparação dos dados de RMN de ^{13}C registrados na literatura para o acetato de β -amirina com os dados obtidos de SMG01 confirmou a estrutura já descrita na literatura por Balestrin (2006) (125) (Tabela 7).

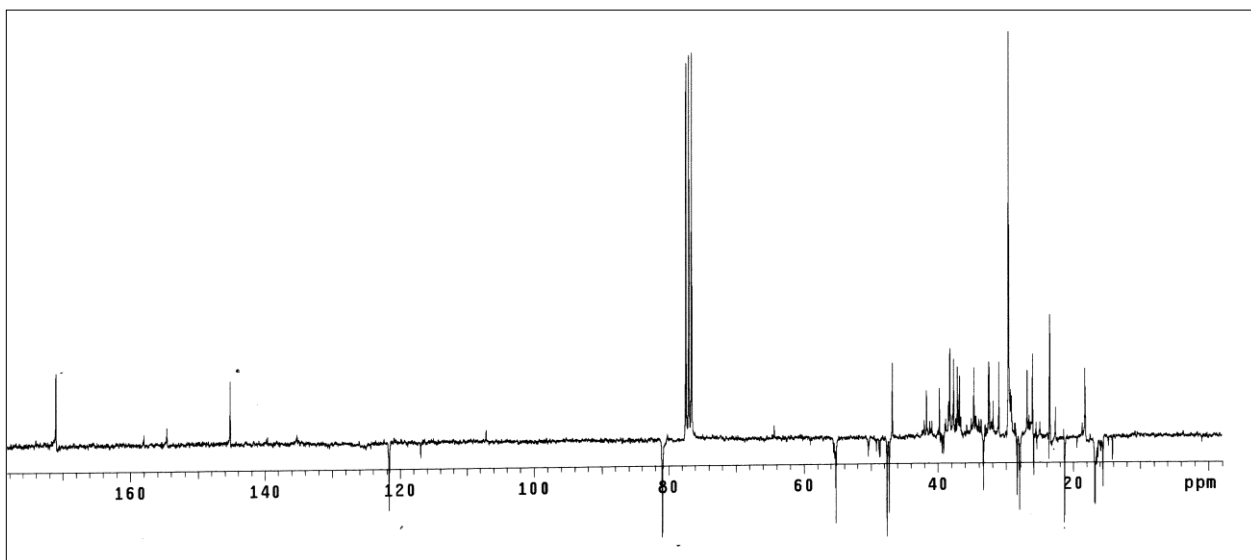


Figura 6 – Espectro de RMN de ¹³C de SMG01 (75 MHz, CDCl₃)

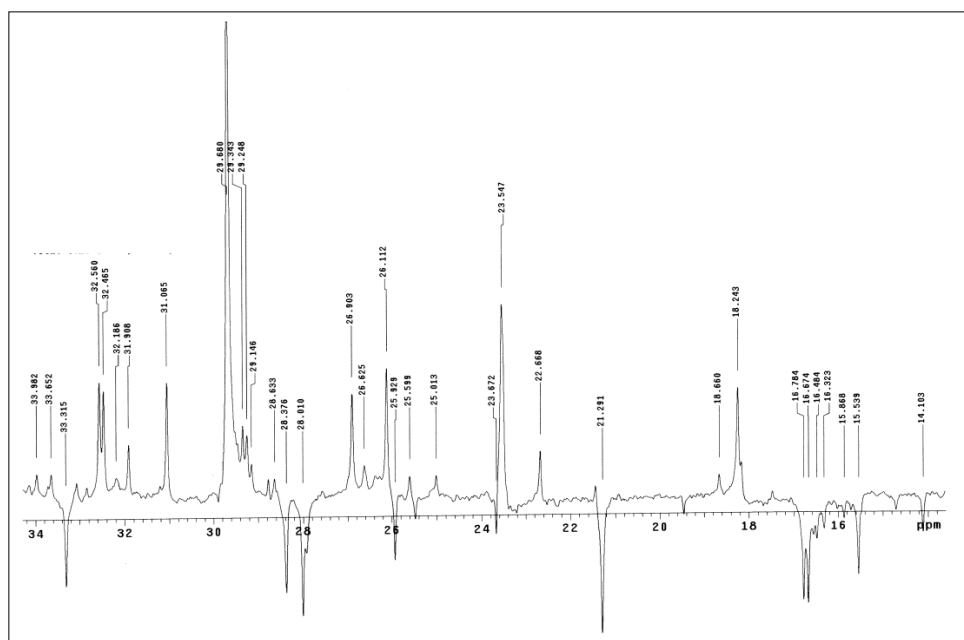


Figura 7 – Espectro de RMN de ¹³C de SMG01 – ATP– Expansão da região δ14,0 a δ34,0 (75 MHz, CDCl₃)

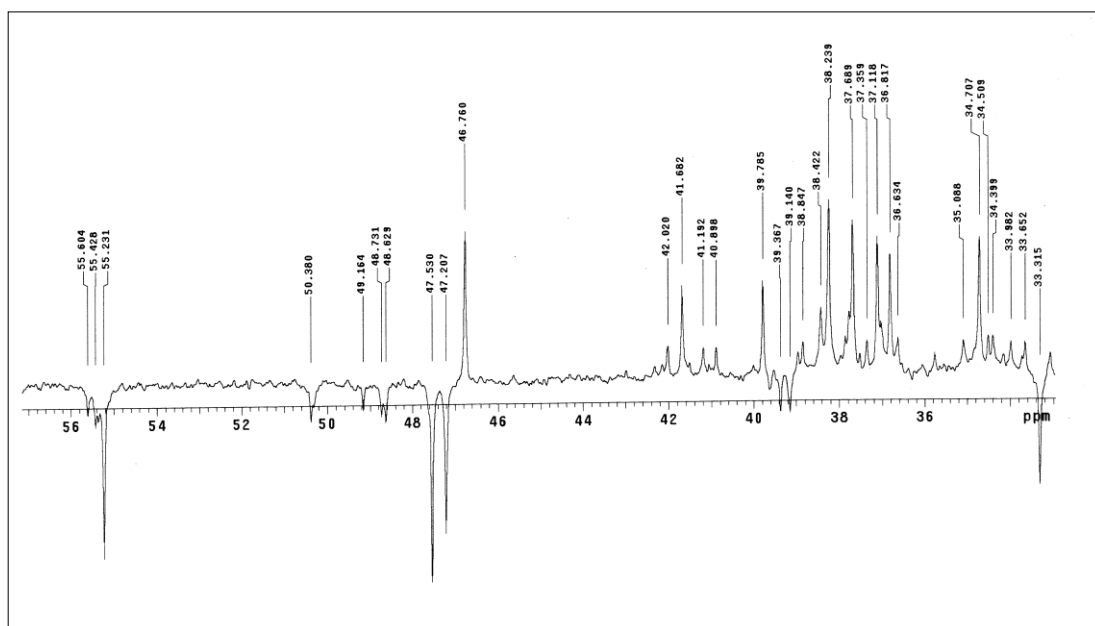


Figura 8 – Espectro de RMN de ^{13}C de SMG01 – ATP – Expansão da região δ 33,0 a δ 57,0 (75 MHz, CDCl_3)

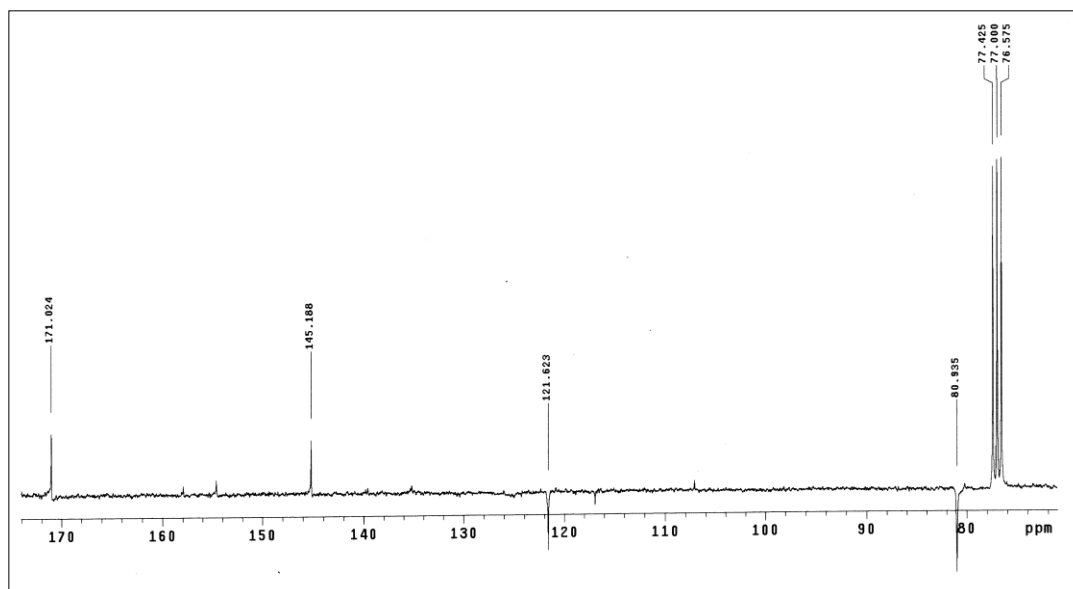


Figura 9 – Espectro de RMN de ^{13}C de SMG01 – ATP – Expansão da região δ 79,0 a δ 170,0 (75 MHz, CDCl_3)

Tabela 7 - Atribuição dos deslocamentos químicos (CDCl_3 , 75 MHz) obtidos pela RMN de ^{13}C de SMG01 por comparação com os dados da literatura (125)

C	Acetato de β-amirina (125)	SMG01
1	28,3	28,3
2	23,6	23,6
3	80,9	80,9
4	37,7	37,6
5	55,2	55,2
6	18,2	18,2
7	32,6	32,5
8	39,8	39,7
9	47,5	47,5
10	36,8	36,8
11	23,5	23,5
12	121,6	121,6
13	145,2	145,2
14	41,7	41,6
15	26,9	26,9
16	26,1	26,1
17	32,5	32,4
18	47,2	47,2
19	46,8	46,7
20	31,1	31,0
21	30,7	34,1
22	37,1	37,1
23	28,0	28,0
24	16,6	16,7
25	15,5	15,5
26	16,8	16,7
27	25,9	25,9
28	16,8	16,8
29	21,3	21,3
30	33,3	33,3
1'	171,0	171,0
2'	21,2	21,3

4.1.2 Identificação estrutural de SMG02

O espectro da região do infravermelho (KBr , cm^{-1}) (Figura 10), de SMG02 apresentou larga banda em 3438 cm^{-1} típica de estiramento de ligação O-H de alcoóis. As absorções em 2959 cm^{-1} , 2937 cm^{-1} , 2866 cm^{-1} , 1465 cm^{-1} e 1382 cm^{-1} foram atribuídas à deformação e estiramento de ligação C - H, sugerindo a presença de sistema alifático saturado. As absorções em 1053 cm^{-1} e 1022 cm^{-1} foram

atribuídas ao estiramento da ligação C - O em alcoóis, enquanto aquela em 1635 cm^{-1} foi atribuída a deformação da ligação dupla C = C. As absorções em 958 cm^{-1} e 838 cm^{-1} foram atribuídas à deformação de ligação C - H olefínica (124).

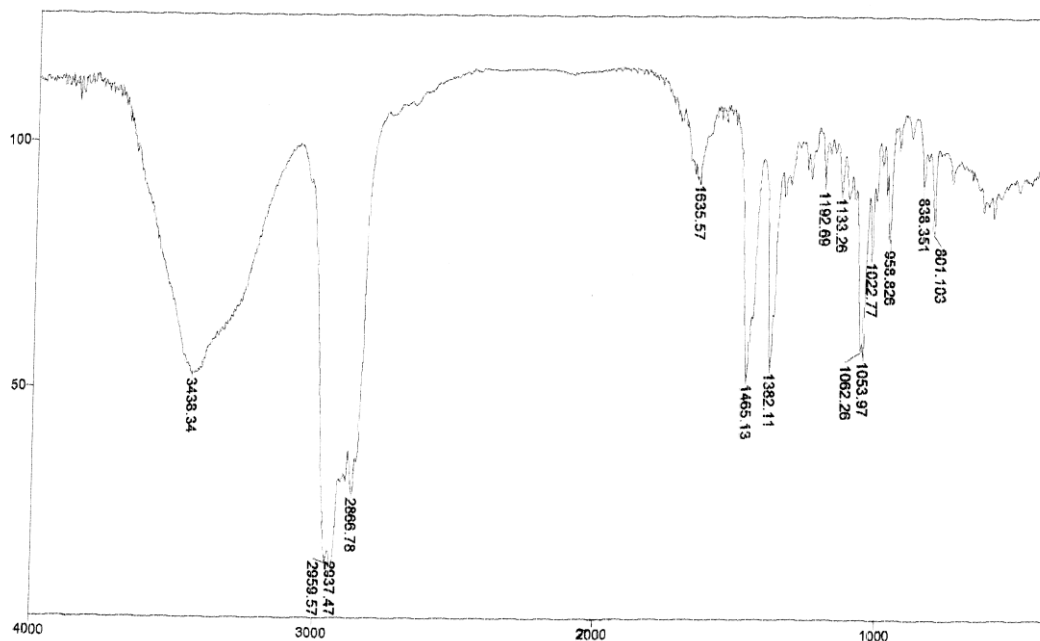
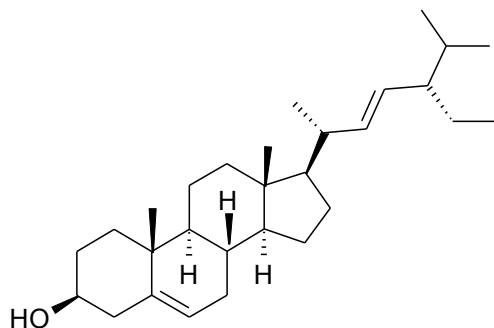
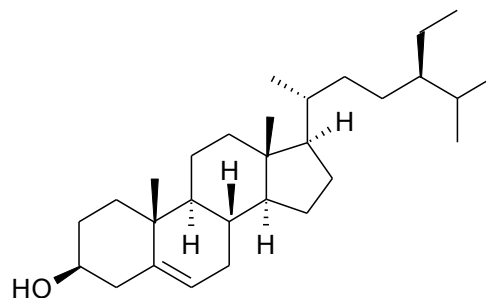


Figura 10 – Espectro na região do Infravermelho de SMG02 (KBr, cm^{-1})

O espectro de RMN de ^1H mostrou a presença de simpletos entre δ 0,68 e δ 2,30 atribuídos a hidrogênios metílicos (Figuras 11 e 12). O sinal em δ 3,50 foi atribuído ao hidrogênio H-3, ligado a um grupo hidroxila; e os sinais entre δ 5,10 e δ 5,02 foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-22 e H-23 do estigmasterol (**T5**) (Tabela 8) (126).



Estigmasterol (**T5**)



β -sitosterol (**T6a**)

Tabela 8 - Deslocamentos químicos apresentados por SMG02 no espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) em comparação com os dados da literatura

<i>Estigmasterol</i>	^1H (δ)	β -sitosterol	^1H (δ)	<i>SMG02</i>	^1H (δ)
H-3 (1H,m)	3,52 m	H-3 (1H,m)	3,52	H-3 (1H,m)	3,52
H-6 (1H)	5,35 m	H-6(1H, br s)	5,35	H-6(1H, br s)	5,35
H-22 (1H,dd)	5,15 dd	-	-	H-22 (1H,dd)	5,10 dd
H-23 (1H,dd)	5,01 dd	-	-	H-23 (1H,dd)	5,02 dd
		H-18 (3H, s)	0,68	H-18 (3H, s)	0,68
		H-19 (3H, s)	1,01	H-19 (3H, s)	1,01
		H-21 (3H,d)	0,92	H-21 (3H,d)	0,9
		H-26 (3H,d)	0,83	H-26 (3H,d)	0,83
		H-27 (3H,d)	0,81	H-27 (3H,d)	0,81
		H-29 (3H,d)	0,84	H-29 (3H,d)	0,84

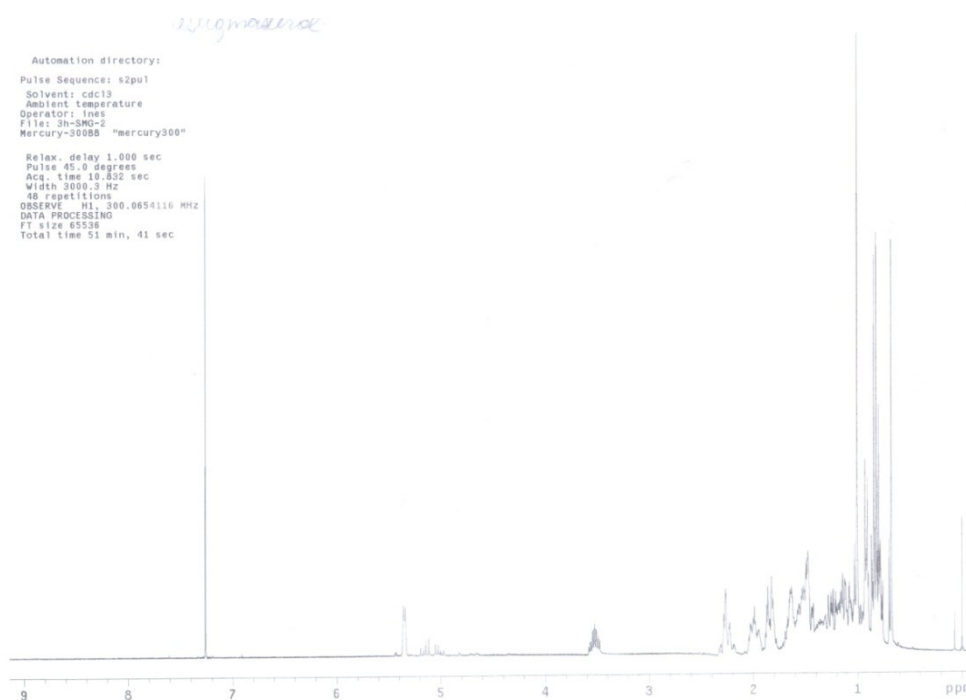


Figura 11 – Espectro de RMN de ^1H de SMG02 – geral (300 MHz, CDCl_3)

3h-SMG-2
Stephanie
Farmacia-UnB

Automation directory:
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: cdcl3
Ambient temperature
Operator: Ines
File: 3h-SMG-2
Mercury-3000B "mercury300"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 10.825 sec
Width 3000.3 Hz
48 repetitions
OBSERVE H1, 300.0654116 MHz
DATA PROCESSING
FT size 65536
Total time 51 min, 41 sec

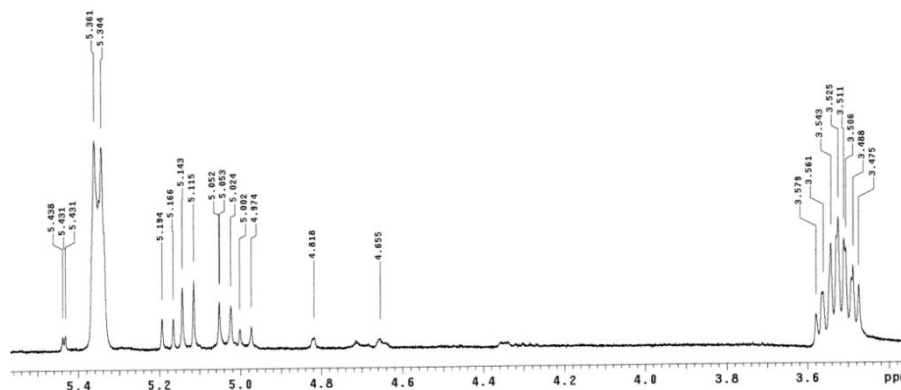


Figura 12 – Espectro de RMN de ^1H de SMG02 – Expansão da região entre δ 3,4 a δ 5,4 (300 MHz, CDCl_3)

4.2 IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS NA FRAÇÃO ALCALOÍDICA

Algumas substâncias presentes na fração alcaloídica foram identificadas em cromatógrafo gasoso por comparação dos espectros de massas obtidos com a base de dados da NIST 2.0 e dados da literatura (127) (Tabela 9). As substâncias identificadas foram: isovoacangina (**A1d**) [m/z 368 (100); 184 (20); 160 (25); 136 (50); 122 (24)]; voacangina (**A1a**) [m/z 368 (100); 184 (20); 160 (31); 136 (50); 122 (24)]; catarantina (**A5**) [m/z 336 (100); 277 (70)]; 3-hidroxicoronaridina (**A1e**) [m/z 354 (10); 338 (20); 337 (09); 336 (100); 169 (24)]; e coronaridina (**A1b**) [m/z 338 (100); 323 (19); 136 (50); 124 (34); 122 (18)].

Tabela 9 – Tempo de retenção obtido dos alcaloides de *Tabernaemontana solanifolia* A.DC. identificado por cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas (CG-EM)

Amostras	Substância	Massa molecular	Tempo de retenção (min.)
FA ²	3-hidroxicoronaridina	354	10,04
FA ^{1,2}	Coronaridina	338	11,16
FA ^{1,2}	Voacangina	368	13,93
FA ²	Isovoacangina	368	14,91

FA: fração alcaloídica; ¹ coleta em março de 2007; ² Coleta em abril de 2009;

4.3 IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS NO EXTRATO AQUOSO E ETANÓLICO

As frações obtidas dos extratos etanólico e aquoso (2ª coleta) foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector DAD (Tabela 10).

As análises dos cromatogramas, observando os valores de tempo de retenção com os respectivos espectros de UV em comparação com os padrões comerciais sugeriram a presença de rutina, derivado de ácido clorogênico e ácido cafeico, dentre outros compostos (Figuras 13, 14 e 15). Já a análise dos cromatogramas possibilitou a identificação dos seguintes compostos: derivado do ácido clorogênico, rutina, isoquercitrina, derivado do ácido cafeico e quercetina (Tabela 10). Os cromatogramas são apresentados nas Figuras 13 a 16.

Tabela 10 - Tempo de retenção das substâncias identificadas do extrato etanólico de *Tabernaemontana solanifolia* A.DC. obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Amostras		Substância	Tempo de retenção (min.)
1ª coleta	2ª coleta		
AqFr IFET	AqE INET IFET SET	Derivado do ácido clorogênico	14,16
AqFr IFET	AqE IFET	Rutina	27,17
IFET AqFr	INET IFET	Isoquercitrina	29,06
AqFr	AqE INET	Derivado do ácido cafeico	17,94
IFET	IFET	Derivado de quercetina	26,77
	IFET	quercetina	47,23

AqE: Extrato aquoso; AqFr: Fração aquosa da partição bifásica do extrato etanólico; IFET: fração inferior da partição trifásica do extrato etanólico, INET: fração intermediária da partição trifásica do extrato etanólico; SET: fração superior da partição trifásica do extrato etanólico; ¹ coleta em março de 2007; ² Coleta em abril de 2009;

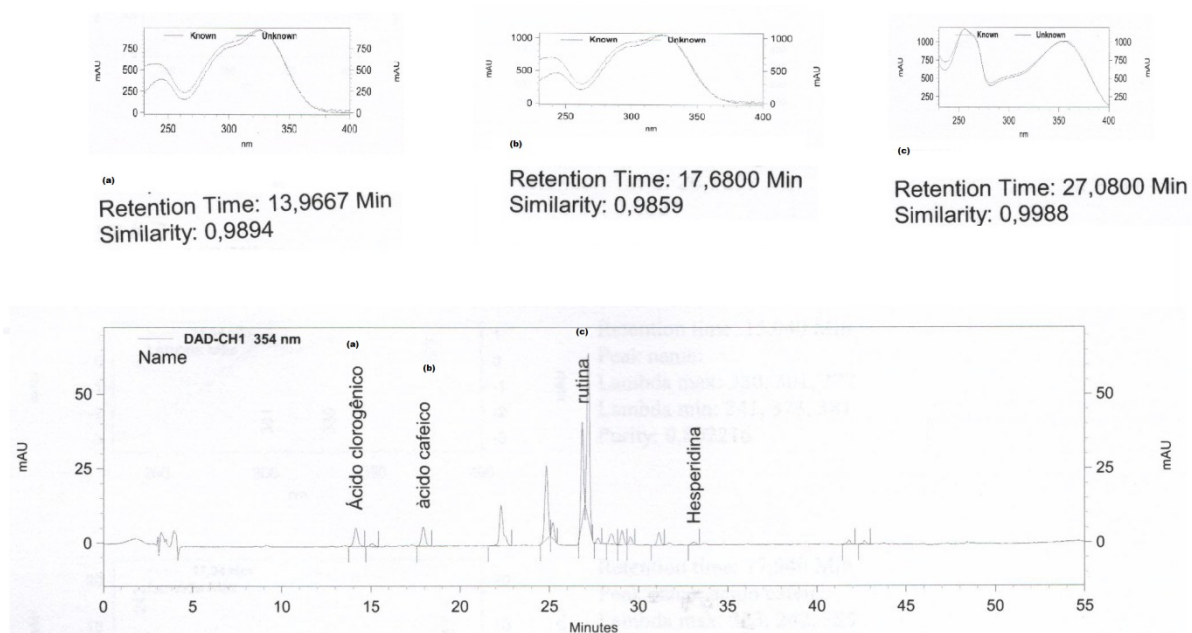


Figura 13 - Cromatograma do extrato aquoso em 354 nm e espectro no ultravioleta dos compostos ácido clorogênico, ácido cafeico e rutina referentes aos picos $Tr = 14,16$ min., $Tr = 17,94$ min. e $Tr = 27,17$ min., respectivamente.

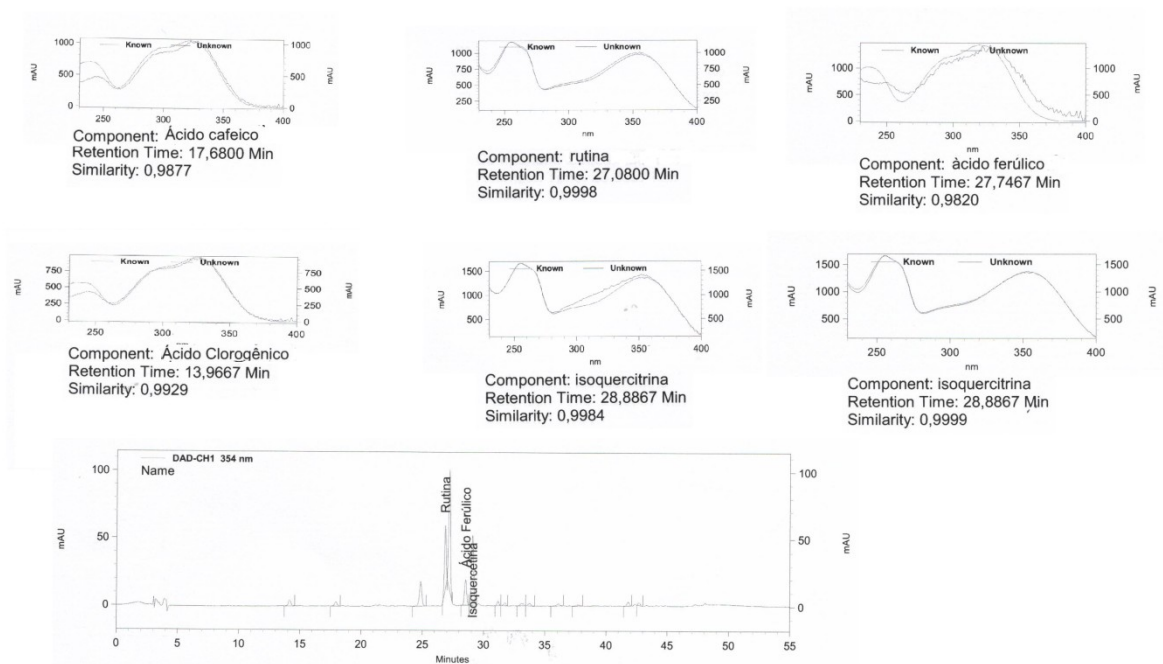


Figura 14 - Cromatograma da fração aquosa da partição bifásica do extrato etanólico em 354 nm e espectro no ultravioleta dos compostos ácido ferúlico, isoquercitrina e isoquercetina referentes aos picos $Tr= 14,16$ min., $Tr= 29,06$ min e $Tr= 26,77$ respectivamente.

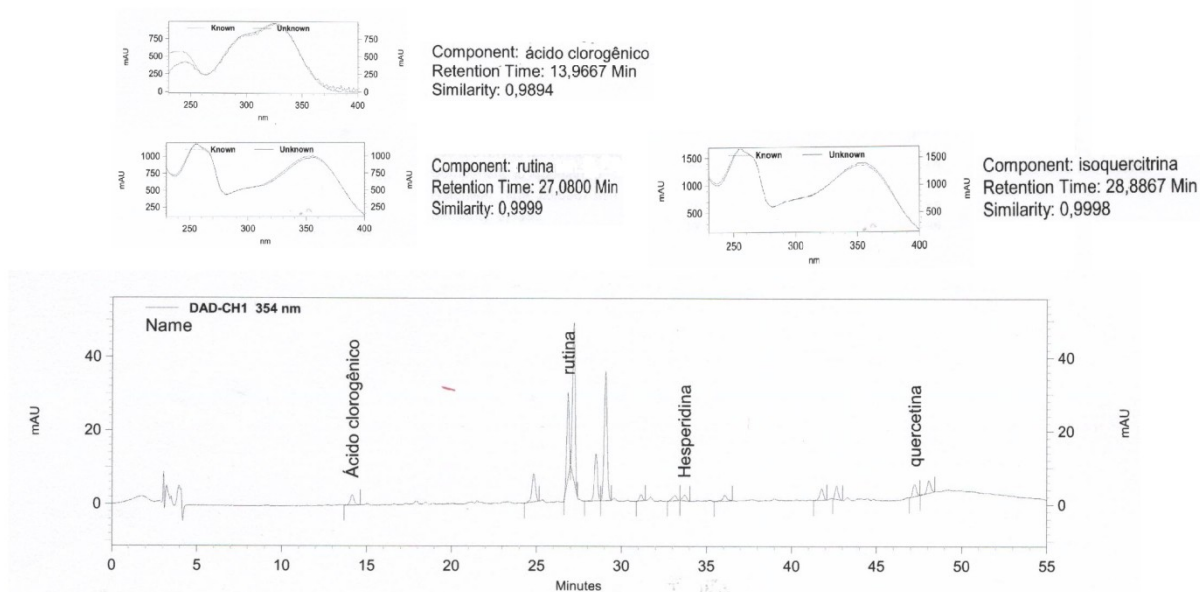


Figura 15 - Cromatograma da fração inferior da partição trifásica (1^a coleta) do extrato etanólico em 354 nm e espectro no ultravioleta dos compostos ácido clorogênico, rutina e isoquercitrina, referentes aos picos Tr= 14,16 min., Tr= 27,17 min. e Tr= 29,06, respectivamente.

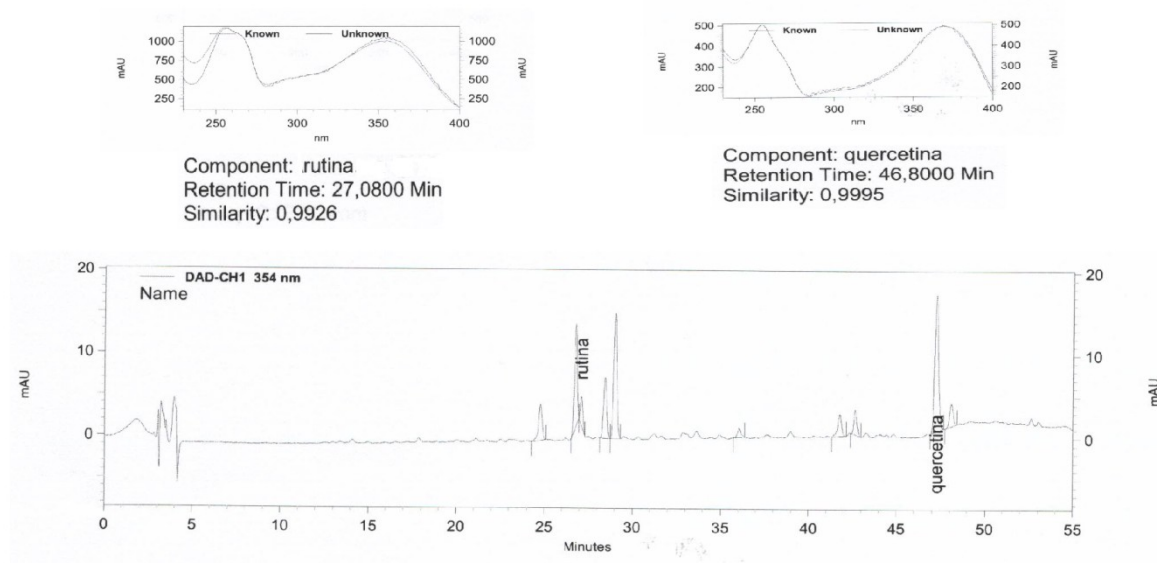


Figura 16 - Cromatograma da fração inferior da partição trifásica (2^a coleta) do extrato etanólico em 354 nm e espectro no ultravioleta dos compostos rutina e quercetina referentes aos picos Tr= 27,17 min. e Tr= 7,23 min., respectivamente.

4.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS

Os compostos fenólicos constituem uma classe importante de metabólitos secundários e sua quantificação tem sido extensivamente realizada a fim de ser estabelecida uma correção com a capacidade antioxidante de compostos advindos de plantas (128); entretanto, outros parâmetros devem ser determinados para que se possam realizar inferências com o potencial antioxidante de extratos de plantas (129).

A concentração dos compostos fenólicos totais nos extratos de *T. solanifolia* A. DC. foi determinada por espectrofotometria, através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu segundo a metodologia de Djeridane e colaboradores (2006) (130).

Os resultados foram obtidos a partir dos parâmetros de regressão linear da curva analítica do padrão de ácido gálico ($y = 0,02443 + 0,01266 x$, $r = 0,99941$) e expressos em equivalentes de ácido gálico pela massa do extrato (mg/g).

O teor de compostos fenólicos variou de 19,02 a 141,51 mg/g de acordo com o extrato testado, sendo a maior concentração evidenciada no extrato aquoso (Tabela 11, Figura 17).

É importante mencionar que a determinação dos compostos fenólicos pelo método colorimétrico com o reagente de Folin-Ciocalteu trata-se de um método inespecífico e, uma das suas limitações é devido ao fato de que alguns compostos, mesmo não sendo fenólicos, podem reagir, o que forneceria teores superestimados (131).

Tabela 11 – Teor de fenóis totais dos extratos obtidos das folhas de *Tabernaemontana solanifolia* A.DC.

Amostras	Sigla	Fenóis totais (mg/g) ^a	Desvio padrão
Extrato aquoso	AqE ²	141,51	0,66
Extrato hexânico	HE ¹	11,41	6,47
	HE ²	19,02	3,18
Extrato etanólico	EE ¹	87,86	7,17
	EE ²	108,97	1,53

¹ - coleta em março de 2007; ² - coleta em abril de 2009; ^afenóis totais, AqE – extrato aquoso, HE – extrato hexânico, EE – extrato etanólico. Valores expressos em equivalente de ácido gálico

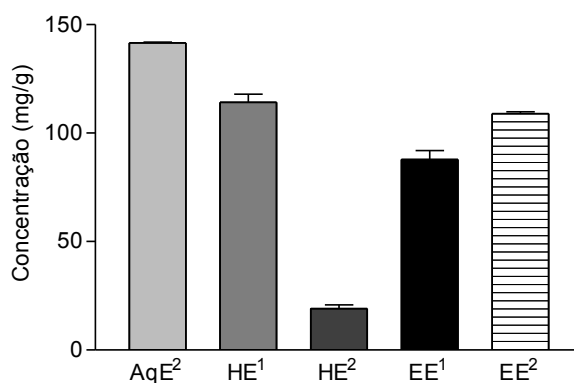


Figura 17 – Constituintes fenólicos (mg/g) em diferentes tipos de extratos obtidos das folhas de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. Os valores (média de n= 3) foram expressos como equivalente ao ácido gálico (mg/g) para o extrato seco ± desvio padrão da media . Amostras: extrato hexânico (HE), extrato etanólico (EE) e extrato aquoso obtido por infusão (AqE); ¹ (coleta em março/2007) e ² (coleta em abril/2009).

A Tabela 12 mostra que quando o extrato etanólico foi fracionado, o teor de fenóis totais foi maior na fração aquosa (167,38 mg/g) seguida da fração intermediária (137,36 mg/g). Os dados encontrados podem ser relacionados à polaridade dos compostos fenólicos (Figura 18).

Tabela 12 – Teor de fenóis totais das frações aquosa (AqF), intermediária (IF), hexânica (HF) e alcaloídica (AF) do extrato etanólico (EE) das folhas de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC., coletadas em março de 2007, em Brasília, DF

Amostras	Sigla	Fenóis totais (mg/g) ^a	Desvio padrão
Extrato etanólico	EE	87,86	7,17
Fração aquosa	AqF	167,38	6,47
Fração intermediária	IF	137,36	6,72
Fração hexânica	HF	82,33	5,47
Fração alcaloídica	FA	115,59	1,88

^a Fenóis totais, valores expressos em equivalente de ácido gálico, AqF – fração aquosa, EE – extrato etanólico, IF – fração intermediária, HF – fração hexânica, FA – fração alcaloídica

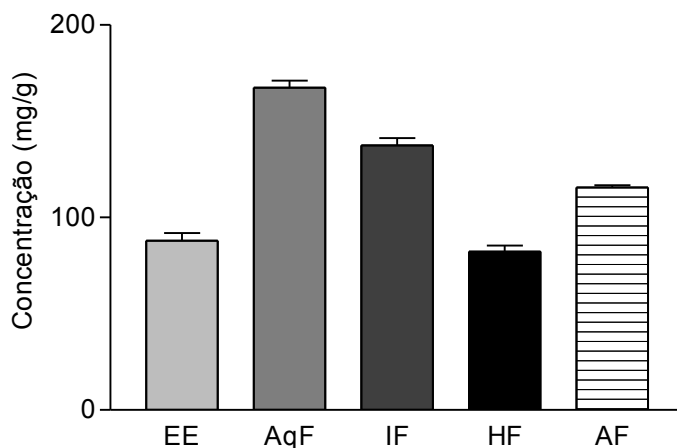


Figura 18 – Constituintes fenólicos (mg/g) nas frações do extrato etanólico de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. coletada em março de 2007, Brasília, DF. Os valores foram expressos como equivalente ao ácido gálico (mg/g). Fração aquosa (AqF), Fração intermediária (IF) e fração hexânica (HF).

4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES

Os flavonoides apresentam diversas ações biológicas, dentre elas, atividade antioxidante, anti-proliferativa e antiinflamatória. Assim como os fenóis totais, a determinação dos flavonoides também tem sido realizada em estudos que visam determinar o potencial antioxidante de plantas (106).

A determinação do teor de flavonoides das amostras foi realizada a partir dos parâmetros de regressão linear da curva analítica do padrão de quercetina ($y = 0,01048 + 0,00246 x$, $r = 0,999975$), sendo os resultados expressos em equivalentes de quercetina (mg) por peso de extrato ou fração (g).

O extrato aquoso apresentou maior teor de flavonoides totais (121,80 mg/g) seguido do extrato etanólico. Os resultados observados para o extrato hexânico e para a fração alcaloídica parecem ser devido a reações inespecíficas do reagente com compostos contendo grupos hidroxila ou amino presentes (Tabela 13, Figura 19).

Tabela 13 – Teor de flavonoides nos extratos das folhas de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC.

Amostras	Sigla	Flavonoides (mg/g) ^b	Desvio padrão
Extrato aquoso	AqE	121,80	4,38
Extrato etanólico	EE ¹	52,55	0,44
	EE ²	68,99	3,60
Extrato hexânico	HE ¹	36,10	0,86
	HE ²	10,66	3,64

¹coleta em março de 2007; ²coleta em abril de 2009; ^b Flavonoides totais; AqE – extrato aquoso ; EE – extrato etanólico ; HE - extrato hexânico; valores expressos como equivalente de quercetina (mg/g).

Dentro do extrato etanólico, a fração intermediária (Tabela 14) mostrou concentrar o maior teor de flavonoides (140,68 mg/g), sendo superior à fração aquosa. A determinação colorimétrica de flavonoides totais também possui algumas limitações, como o tempo de armazenamento da planta e a concentração da amostra utilizada no teste que poderiam interferir nos resultados fornecendo teores

não correspondentes à concentração real de flavonoides na amostra pesquisada (132). Entretanto, destaca-se seu baixo custo e facilidade de execução, o que justificaria a realização dessas análises visando estabelecer parâmetros preliminares de flavonoides totais nas amostras pesquisadas.

Tabela 14 – Teor de flavonoides das frações aquosa (AqF), intermediária (IF), hexânica (HF) e alcaloídica (FA) obtidas do extrato etanólico (EE) das folhas de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC., coletadas em março de 2007, em Brasília, DF

Amostras	Sigla	Flavonoides (mg/g) ^b	Desvio padrão
Extrato etanólico	EE	52,55	0,44
Fração hexânica	HF	65,17	0,54
Fração intermediária	IF	140,68	0,79
Fração aquosa	AqF	71,91	0,86
Fração alcaloídica	FA	8,34	0,66

Os valores são referentes às medias das triplicatas;^b Quantidade de flavonoides totais = valores expressos como equivalente de quercetina/ extrato seco (mg/g);

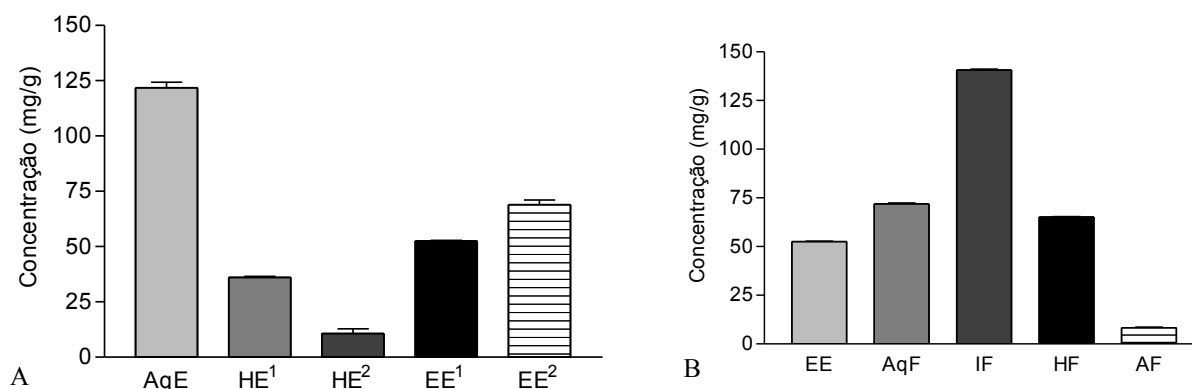


Figura 19 – Determinação do teor de Flavonoides (mg/g) das folhas de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. Valores expressos como equivalente de quercetina (mg/g) (média \pm erro padrão). (A) extratos brutos; (B) frações obtidas do extrato etanólico; ¹(coleta em março/2007); ²(coleta em abril/2009); AqE (extrato aquoso); HE (extrato hexânico); EE (extrato etanólico); AqF (fração aquosa do extrato etanólico); IF (fração intermediária do extrato etanólico), HF (fração hexânica do extrato etanólico) e (AF) fração alcaloídica do extrato etanólico.

A investigação da propriedade antioxidante de *T. solanifolia* A. DC. foi realizada pelos métodos de sequestro de radical livre utilizando o 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH), o método de redução do complexo de fosfomolibdênio e o método de β -caroteno/ácido linoleico. Considerando as limitações dos testes químicos que não conseguem determinar a interação com sistemas biológicos (133) foi empregado um modelo *ex vivo* como forma de reforçar seu potencial como antioxidante frente a eritrócitos humanos. Apesar de não se tratar de um teste *in vivo*, trata-se de um sistema biológico importante para investigar a interação de extratos vegetais em eritrócitos humanos.

4.6 DETERMINAÇÃO DE PROPRIEDADES ANTIOXIDANTE

4.6.1 Avaliação do efeito de “sequestro” de radical empregando o radical livre 2,2- difenil-1-picrilidrazila (DPPH[•]) (C₁₈H₁₂N₅O₆)

O radical 2,2- difenil-1-picrilidrazila (DPPH[•]) apresenta cor púrpura e quando sofre ação de uma substância com propriedade antioxidante é reduzido formando o 2,2-difenil-picrilidrazina (DPPH – H), de cor amarela (Figura 20), e essa reação pode ser monitorada pelo decréscimo de absorbância, tanto para substâncias puras quanto para misturas complexas, destacando seu uso para triagem de produtos naturais com atividade antioxidante (19, 26, 30, 99, 134-135).

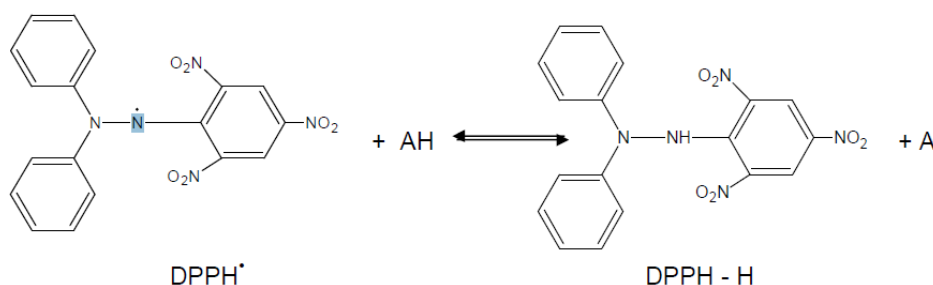


Figura 20 – Esquema da reação entre a substância antioxidante (AH) e o radical DPPH[•] (133)

Desta forma, a ação antioxidante de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. foi analisada pela capacidade das substâncias presentes na amostra captarem o radical livre DPPH (1,1-difenil-1-picrilidrazila) e quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra maior sua atividade antioxidante.

O extrato aquoso das folhas de *T. solanifolia* A. DC. mostrou melhor ação antioxidante (EC_{50} 37,31 $\mu\text{g/mL}$) quando comparado com os extratos etanólico e hexânico (Tabela 15). O extrato etanólico e aquoso de *T. divaricata* Linn. também mostraram melhores resultados de atividade antioxidante inibindo 58,7 % e 54,9 % respectivamente, quando comparado ao extrato com derivado de éter de petróleo (136).

Tabela 15 - Inibição radicalar (%) pelo Método de DPPH dos extratos das folhas de *Tabernaemontana solanifolia* A.DC. em comparação com os controles

Tratamentos	Siglas	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Atividade máxima	
			% \pm DP	$\mu\text{g/mL}$
Ácido ascórbico	Vit C	4,8	95,2 \pm 0,9	10
Butil-hidroxiltolueno	BHT	12,26	93,9 \pm 1,2	500
Extrato aquoso	AqE	37,31	94,7 \pm 0,3	500
Extrato etanólico	EE ₁	98,03	89,0 \pm 3,0	500
	EE ₂	197,5	95,8 \pm 1,5	1000
Extrato hexânico	HE ₁	nd	9,7 \pm 2,8	1000
	HE ₂	nd	34,1 \pm 2,9	1000
Acetato de β -amirina	SMG01	nd	22,8 \pm 1,6	500

¹ - coleta em março de 2007; ² - coleta em abril de 2009; DP- desvio padrão da média (n = 3); Vit C – Ácido ascórbico; BHT – butil-idroxitolueno; AqE – extrato aquoso; EE – extrato etanólico; HE – extrato hexânico; SMG01 - acetato de β -amirina.

Os resultados obtidos com o método de DPPH permitem reforçar que *T. solanifolia* A. DC. é rica em compostos com atividade antioxidante capazes de inibir a formação de radicais livres *in vitro*. De acordo com os estudos preliminares por CCD, juntamente com a quantificação de compostos fenólicos, pode ser sugerido que essas substâncias fenólicas, especialmente os flavonoides, possam estar envolvidas com esta ação.

Em relação à época de coleta houve uma diferença de atividade entre o extrato etanólico obtido das folhas coletadas em março de 2007 quando comparada com as folhas coletadas em abril de 2009. Entretanto, a forma de preparo da amostra de 2009 foi realizada em microescala e, portanto, pode ter ocorrido interferência da interação da planta com o solvente.

4.6.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio

O ensaio da redução do complexo fosfomolibdênico baseia-se na redução do molibdênio (VI) (coloração amarela) para molibdênio (V), na presença de substâncias com capacidade antioxidante, formando um complexo fosfato-molibdênio (V) com coloração verde, em pH ácido, o que pode ser mensurado espectrofotometricamente a 695 nm. Trata-se, portanto, de um método espectrofotométrico útil na triagem de compostos com propriedades antioxidantes de compostos vegetais (107).

O potencial antioxidante dos extratos (hexânico e etanólico) de *T. solanifolia* A. DC. foi expresso em equivalentes de quercetina. Para isso foi construída uma curva-padrão de quercetina e a média das absorbâncias apresentadas por cada amostra (no comprimento de onda de 695 nm) foi aplicada à equação da reta ($y = 2,304 x + 0,070$; $r = 0,9901$), sendo obtida então a concentração relativa aos controles (Tabela 16). A equivalência foi obtida dividindo a concentração obtida para o padrão (quercetina) pela concentração usada para as amostras. O coeficiente de variação nas análises foi inferior a 5%.

A análise dos dados mostrou que a atividade antioxidante de 1 mg/mL do extrato hexânico (HE) equivale à atividade antioxidante de 0,1399 mg/mL de quercetina e que a mesma concentração do extrato etanólico (EE) equivale a 0,4870 mg/mL. Dessa forma, para exercer a mesma atividade antioxidante que a quercetina é necessária uma concentração aproximadamente 7 vezes maior de extrato hexânico e 2 vezes maior para o extrato etanólico. Todos os extratos testados por esta técnica (EE¹, HE¹) apresentaram potencial antioxidante pelo método de redução do complexo de fosfomolibdênio, entretanto, em menor proporção do que quando comparado com o composto de referência, quercetina.

Tabela 16 – Atividade redutora de extratos brutos de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. com relação a quercetina (mg/mL) pelo método de fosfomolibdênio

Amostras	Siglas	Concentração (mg/mL)	Equivalente em quercetina (mg/mL)
Extrato hexânico	HE ¹	1,0	0,1399
Extrato etanólico	EE ¹	1,0	0,4870

¹ - coleta em março de 2007; HE – extrato hexânico; EE – extrato etanólico.

4.6.3 Avaliação da inibição da peroxidação lipídica empregando o método β -caroteno/ ácido linoleico

O sistema β -caroteno/ácido linoleico é constituído por uma emulsão simulando a oxidação dos componentes celulares da membrana lipídica em presença de antioxidantes, assim como, a capacidade de radicais peróxidos a partir da oxidação do ácido linoleico. Nesse método, a atividade antioxidante é avaliada pela capacidade de um extrato ou composto em inibir o processo de oxidação do β -caroteno assim como a peroxidação do ácido linoleico, em um período de 2 horas, que pode ser monitorado pela manutenção da coloração alaranjada do β -caroteno na presença de substâncias antioxidantes e descoloração na sua ausência. Entretanto, diferente do que ocorre no método do DPPH (30 min), as substâncias com propriedades antioxidantes devem apresentar maior estabilidade para garantir atividade antioxidante nesse período de realização do teste. Os ensaios com β -caroteno foram realizados para o extrato etanólico (EE) e para o extrato hexânico, em triplicata e as análises mostraram coeficiente de variação < 5 (Tabela 17).

Tabela 17 – Perfil antioxidante de extratos e frações de *Tabernaemontana solanifolia* A.DC. pelo método de β -caroteno/ácido linoleico

Amostras	Siglas	Inibição (%)						EC ₅₀ (mg/mL)
		0,05	0,10	0,15	0,25	0,30	0,50	
Extrato etanólico (mg/mL)	EE	7,82	12,89	20,0	54,17	63,34	81,24	0,24
Extrato hexânico (mg/mL)	HE	2,01	4,34	5,00	6,80	7,03	7,90	ND

*dados obtidos da media (n=3), Coeficiente de variação < 5, EC₅₀: concentração eficiente para decrescer a concentração do radical em 50%.

De acordo com a EC₅₀ obtida, o extrato etanólico apresentou ação antioxidante pelas duas técnicas utilizadas (método de DPPH e método utilizando o β -caroteno e ácido linoleico). Contudo, os melhores resultados de ação antioxidante para esse extrato foram evidenciados pelo método de DPPH. Foi observado, portanto, que há uma probabilidade das substâncias com potencial antioxidante

responderem um pouco melhor nos ensaios de DPPH quando comparado com o de β -caroteno/ácido linoleico.

4.6.4 Atividade antioxidante *ex vivo* utilizando eritrócitos humanos

O uso do AAPH foi inicialmente empregado por Wagner e cols. (1985) (137) para determinação da capacidade antioxidante total em plasmas sanguíneos com intuito de investigar a interferência da dieta na capacidade antioxidante do organismo.

O AAPH induz uma oxidação das proteínas de membrana, bem como a diminuição do ATP dos eritrócitos. Estas mudanças geram anormalidades nos eritrócitos que podem resultar numa fragilidade e, portanto, ocorrência de hemólise.

O emprego de AAPH em eritrócitos tem sido considerado um sistema *ex vivo* importante para investigação de compostos com propriedades antioxidantes e anti-hemólise. O AAPH proporciona a geração de radicais peroxila (RO_2^{\cdot}) decorrente da decomposição térmica de azoiniciadores, com velocidade controlada quando a temperatura é controlada (37 °C).

Foi construída uma curva dose resposta do AAPH utilizando diversas concentrações (0,7 mg/mL; 1,4 mg/mL e 2,7 mg/mL) na presença de uma solução de eritrócitos (1 %) em tampão fosfato de potássio monobásico (PBS) (pH 7,4 \pm 0,1) em cloreto de sódio (0,9 %). A hemólise ocasionada pela geração de radicais livres mostrou-se dependente do tempo e da concentração do AAPH (Figura 21), concordando com os dados da literatura (12). Desta forma, a concentração de AAPH (0,7 mg/mL) foi escolhida para a realização dos testes de atividade anti-hemolítica dos extratos e frações de *T. solanifolia* A. DC. por apresentar hemólise acentuada a partir da 3^a hora.

A vitamina C foi utilizada como controle positivo por se tratar de um antioxidante importante em sistemas biológicos. A concentração empregada nos testes foi obtido em uma curva dose-resposta utilizando as mesmas condições do testes (0,059; 0,120 e 0,240 mg/mL). Como as concentrações de 0,12 mg/mL e 0,24 mg/mL mostraram atividade anti-hemolítica semelhantes, foi utilizada a menor

concentração (0, 12 mg/mL) para efeito de comparação com o extrato e frações a serem testadas (Figura 22).

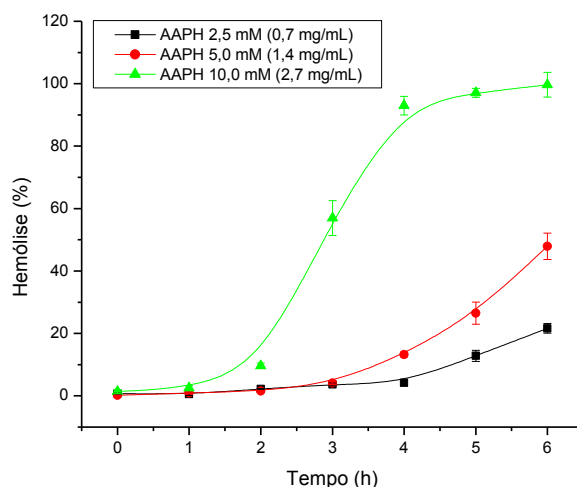


Figura 21 - Curva de hemólise de eritrócitos submetidos a estresse oxidativo por AAPH. A suspensão de eritrócitos (1%) em PBS foi incubada com AAPH em diferentes concentrações por até 6 horas em banho-maria a 37°C, ao abrigo da luz e com agitação constante (75 rpm). Os resultados foram expressos como média de hemólise \pm erro padrão (n = 3).

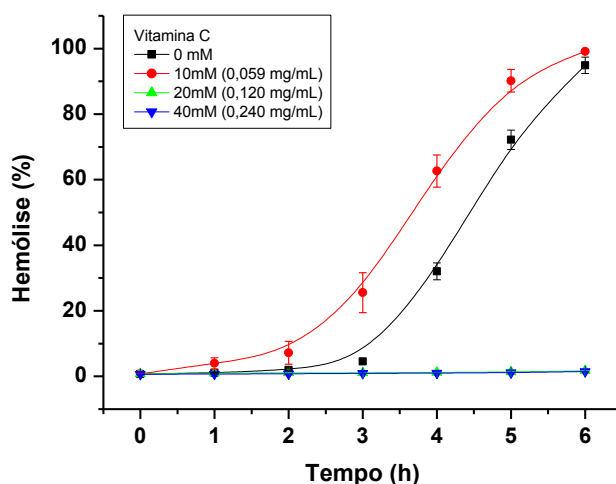


Figura 22 - Curva da atividade anti-hemolítica da Vitamina C em diferentes concentrações frente a suspensão de eritrócitos (1%) em PBS submetidos à presença de AAPH (10mM) por até 6 horas em banho-maria a 37°C, ao abrigo da luz e com agitação constante (75 rpm). Os resultados foram expressos como média de hemólise \pm erro padrão (n = 3) * p < 0,01 comparado ao controle (0 mM de Vitamina C).

O extrato aquoso (AqE) de *T. solanifolia* A. DC (liofilizado), quando acrescido na solução de eritrócitos humanos em solução de PBS (1%) na presença de AAPH (10 mM), apresentou resultados promissores de atividade anti-hemolítica nas diversas concentrações testadas (0,026; 0,066; 0,33 e 0,66 mg/mL) (Figura 23).

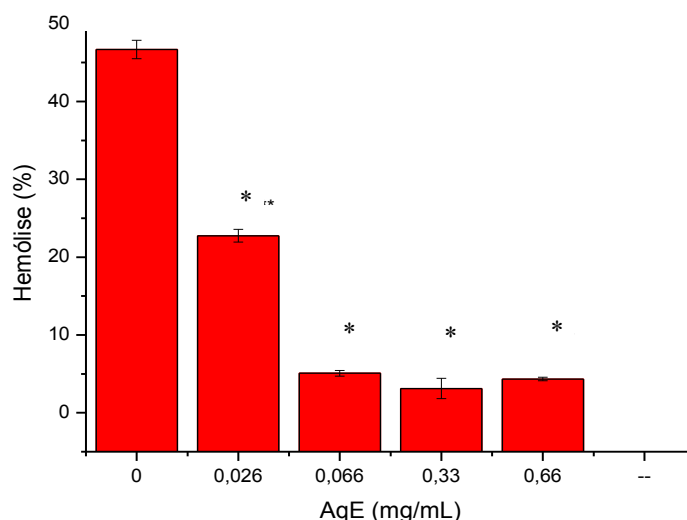


Figura 23 – Curva da atividade anti-hemolítica do extrato aquoso em diferentes concentrações frente a suspensão de eritrócitos (1%) em PBS submetidos à presença de AAPH (10mM) por até 6 horas em banho-maria a 37°C, ao abrigo da luz e com agitação constante (75 rpm). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. * $p < 0,01$ comparado ao controle e nenhuma diferença significativa quando comparado com Vitamina C (0,12 mg/mL).

A Figura 24 mostra a atividade anti-hemolítica do AqE em diferentes concentrações durante seis horas, sendo a concentração de 0,026 mg/mL capaz de inibir 77,3 % de hemólise. As concentrações mais elevadas (0,066; 0,33 e 0,66 mg/mL) mostraram atividade inibitória de hemólise em 94 % dos eritrócitos em suspensão (1 %) na presença de AAPH (10 mM). Entretanto, a atividade das concentrações mais elevadas não mostrou diferença significativa entre si ($p < 0,05$). Esses dados reforçam o potencial antioxidante *ex vivo* do extrato aquoso de *T. solanifolia* utilizando eritrócitos humanos.

Nenhum outro estudo com esta planta foi encontrado relatando a pesquisa de atividade anti-hemolítica com eritrócitos humanos na presença de AAPH.

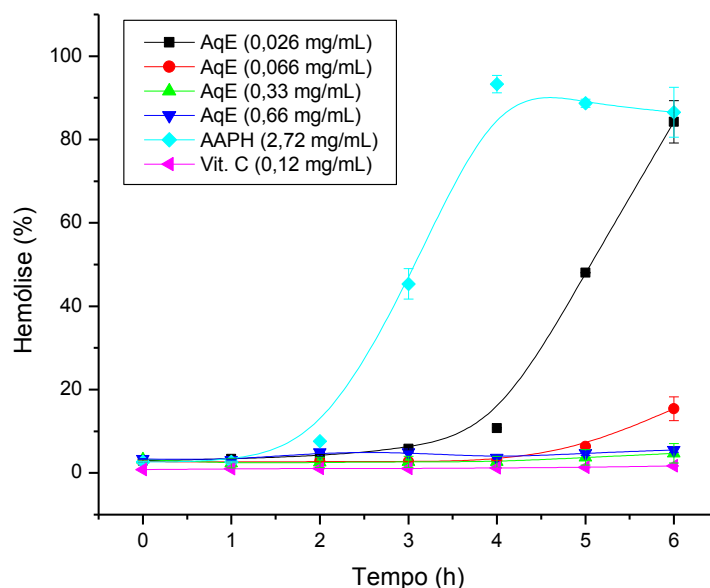


Figura 24 - Curva dose resposta da atividade anti-hemolítica do extrato aquoso (AqE) de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. em solução de eritrócitos em PBS (1%) submetidos à presença de AAPH (10 mM) por até 6 horas em banho-maria a 37°C, ao abrigo da luz e com agitação constante (75 rpm). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão.

O extrato aquoso de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. mostrou ser um potente inibidor da hemólise oxidativa gerada pela presença de AAPH, pois na concentração de 0,066 mg/mL foi capaz de inibir a hemólise em mais de 90 % até a sexta hora. A concentração menor (0,026 mg/mL) foi eficiente em inibir 80 % de hemólise até a terceira hora (Figuras 25 e 26).

Os mesmos resultados não foram observados com o extrato etanólico bruto de *T. solanifolia* nas diversas concentrações testadas (0,033; 0,066; 0,266 e 0,33 mg/mL), não diferindo estatisticamente do controle (0 mg de EE) quando comparada a média de hemólise durante as 6 horas. Isso porque, apesar da concentração de 0,33 mg/mL ter inibido pelo menos 50 % de hemólise até a 4ª hora, após esse tempo, a hemólise elevou-se rapidamente chegando a 73 %.

Quando analisadas as frações do extrato etanólico separadamente, os resultados não foram diferentes, conforme mostrado na Figura 26.

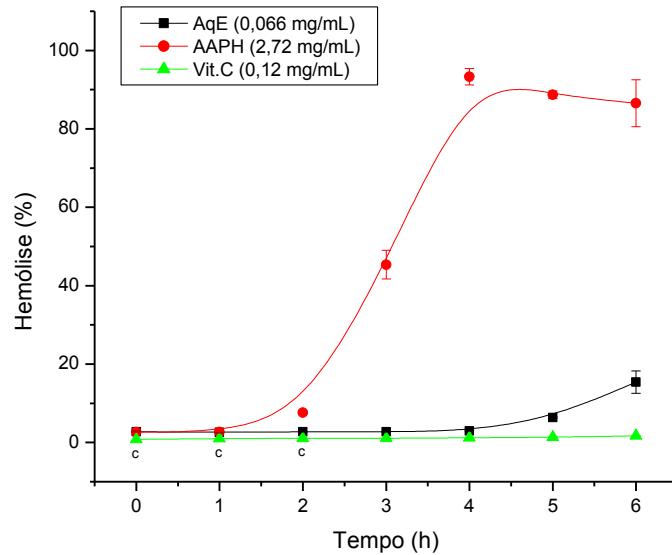


Figura 25 - Curva dose resposta da atividade anti-hemolítica do extrato aquoso (AqE) de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. em solução de eritrócitos em PBS (1%) submetidos à presença de AAPH (10 mM) por até 6 horas em banho-maria a 37°C, ao abrigo da luz e com agitação constante (75 rpm). Os resultados foram expressos como média de hemólise \pm erro padrão (n=3).

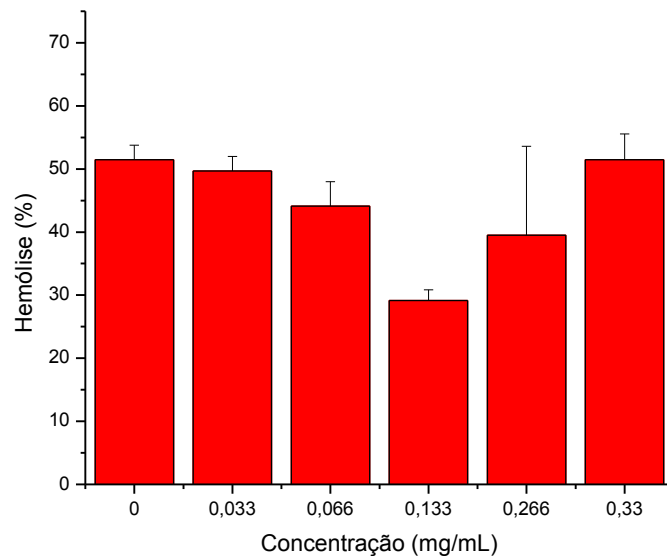


Figura 26 - Atividade anti-hemolítica do EE de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. em suspensão de eritrócitos em PBS (1 %) submetidos à presença de AAPH. A suspensão de eritrócitos a 1 % foi submetida à AAPH (10 mM) por 6 horas e com diferentes concentrações de EE. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão (n = 3). Não houve diferença estatística entre as diferentes concentrações quando comparado ao controle ($p > 0,05$).

4.7 ENSAIOS DE TOXICIDADE

Os ensaios voltados a avaliar o potencial tóxico ou de letalidade de substâncias e extratos têm sido realizado por diversos modelos experimentais. Dentre eles, os modelos *in vitro* tem sido uma excelente opção para triagem de substâncias devido a sua praticidade, baixo custo e princípios éticos defendidos pelas sociedades protetoras de animais. Contudo, os testes *in vivo* são internacionalmente aceitos para fins de registro pelas agências reguladoras para aprovação do uso de novas substâncias.

A triagem de atividade citotóxica de *T. solanifolia* foi realizada com náuplios de *Artemia salina* e, posteriormete, confirmada *in vivo* empregando o método de classes estabelecido pelo Guia 423 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) (111) que apresenta reprodutibilidade, utiliza poucos animais e é aceito por organismos internacionais.

4.7.1 Teste de citotoxicidade a náuplios de *Artemia salina* L.

A pesquisa de compostos com potencial tóxico tem sido realizada no modelo de toxicidade com náuplios do microcrustáceo *Artemia salina* por se tratar de um método de fácil execução com correlação à citotoxicidade frente a células cancerígenas P338. A classificação utilizada também foi a adotada por Meyer e cols. (1982) (112), onde compostos com a dose suficiente para matar 50% dos animais (DL₅₀) menor que 1000 ppm (1 mg/mL) para o teste com *Artemia salina* poderiam ser considerados potencialmente tóxicos.

O extrato aquoso de *T. solanifolia* mostrou DL₅₀ > 1000 µg/mL (1 mg/mL); portanto pode ser considerado não tóxico ou de baixa toxicidade nas condições empregadas. Entretanto, a fração alcaloídica mostrou toxicidade mais pronunciada (DL₅₀ = 103 µg/mL) quando comparada com os extratos brutos (hexânico e etanólico) (Tabela 18).

Os resultados encontrados são semelhantes àqueles obtidos para os extratos das folhas e da casca do caule de *T. catharinensis*, com $DL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ para o extrato aquoso e $DL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ para o extrato hidroetanólico (35).

Tabela 18 – Toxicidade dos extratos brutos (etanólico, aquoso e hexânico) e da fração alcaloídica de *Tabernaemontana solanifolia* A.DC. frente aos náuplios de *Artemia salina*

Amostras	Siglas	DL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Extrato aquoso	AqE	> 1000,0
Extrato etanólico	EE ₁	304,0
Extrato hexânico	HE ₁	250,0
Fração alcaloídica	FA	103,0

DL_{50} Concentração letal média par 50%; AqE – extrato aquoso; EE – extrato etanólico; HE – extrato hexânico e FA – fração alcaloídica.

4.7.2 Toxicidade aguda oral

O protocolo 423 da OECD (111) trata-se de um método que avalia a toxicidade aguda por classes. O ensaio possibilita identificar a menor dose responsável pela mortalidade dos animais, pois prevê doses fixas de 5, 50, 300 e 2000 mg/Kg utilizando 3 animais por dose. Caso não ocorra óbito de mais que um animal ao ser administrada a dose de 2000 mg/Kg, o valor da DL_{50} pode ser estimado como sendo maior que 2000 mg/Kg e menor que 5000 mg/Kg de massa corpórea e a amostra testada é categorizada na classe 5. Além da letalidade ou mortalidade, o protocolo 423 da OECD possibilita avaliar outros parâmetros de toxicidade aguda sistêmica para identificar o potencial tóxico em órgãos específicos (138). Nesse sentido, o “screening” hipocrático é um ensaio bastante útil e comumente usado para este fim.

A dose de 2000 mg/Kg (*p.o.*) (Tabela 24) dos extratos brutos (hexânico, etanólico e aquoso) de *Tabernaemontana solanifolia* não ocasionou a morte de qualquer animal no período de 14 dias. Desta forma, foi observado que a toxicidade oral dos extratos brutos é maior que 2000 mg/Kg e pode ser classificada na categoria 5.

Pelo “screening” hipocrático foi observada estereotipia para os grupos tratados com o extrato aquoso, bem como naqueles que receberam o extrato etanólico. A

piloereção esteve presente apenas no grupo tratado com extrato aquoso, ambos durante a primeira hora.

Tabela 19 - Protocolo de diluição e administração dos extratos de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. em ratos (n= 3) para determinar a toxicidade aguda

Grupos	Dose (mg/Kg)	Concentração (mg)	Peso médio (Kg) dos ratos		Volume administrado* (mL)	
			1º dia	2º dia	1º dia	2º dia
Extrato etanólico	2000	4000	0,34	0,35	1,70	1,75
Extrato hexânico	2000	4000	0,35	0,38	1,77	1,90
Extrato aquoso	2000	4000	0,35	0,34	1,72	1,70
Salina + 2,5 % Tween 80	0	0	0,35	0,34	1,74	1,70

* os valores representam o cálculo do volume do extrato diluído a ser administrado em função da média do peso corporal dos ratos.

Os animais do grupo tratado com extrato hexânico não apresentaram diferenças significativas de comportamento quando avaliados pelo método de “screening” hipocrático, mantendo consciência, estado de alerta, tônus muscular e coordenação motora.

Considerando que o protocolo de toxicidade por classes prevê que quando um ensaio de toxicidade não leva ao óbito mais que um animal, ao ser administrada a dose de 2000 mg/Kg, o valor da DL_{50} pode ser estimado como sendo maior que 2000 mg/Kg e menor que 5000 mg/Kg de massa corpórea, somado a ausência de sinais clínicos relevantes no “screening” hipocrático, os extratos brutos de *T. solanifolia* foram classificados como de baixa toxicidade em curto prazo.

4.7.2.1 Análises bioquímicas

Sabendo-se que algumas enzimas podem ser utilizadas como indicadoras de dano hepático, especialmente em fases iniciais das lesões, duas delas foram dosadas: alanina-aminotransferase (ALT) e aspartato-aminotransferase (AST). Houve alteração significativa na dosagem da ALT para os grupos de animais tratados com os extratos (etanólico, aquoso e hexânico) quando comparados ao grupo controle.

Para as alterações relacionadas à função renal foi utilizada a dosagem de creatinina e uréia. A diminuição da filtração glomerular, de forma geral, leva ao aumento das concentrações plasmáticas de creatinina e uréia. Em ratos, níveis plasmáticos alterados para uréia não são bons indicadores de lesão renal, mas alterações na creatinina podem ser um indicador confiável para avaliar a presença da lesão, pois seu nível sérico não é influenciado pela dieta, idade ou sexo.

Para os parâmetros bioquímicos, nenhuma alteração significativa ocorreu nas dosagens de creatinina e uréia, o que indica que os extratos não interferiram na função renal. Contudo, com relação ao dano hepático, uma alteração significativa na dosagem de ALT para o grupo tratado com os extratos etanólico e hexânico foi observada (Tabela 25).

Tabela 20 - Efeito dos extratos de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. (2000 mg/Kg) administrados por via oral sobre os parâmetros bioquímicos do sangue em ratos submetidos a pesquisa de toxicidade pelo Protocolo 423 da OECD (111)

Parâmetros	Controle	Extratos		
		Aquoso	Hexânico	Etanólico
AST (U/L)	88,87 ± 14,62	101,65 ± 10,99	91,07 ± 10,89	149,93 ± 33,79
ALT (U/L)	12,49 ± 5,36	23,87 ± 7,72	25,48 * ± 2,02	24,97* ± 4,29
Creatinina (mg/dL)	0,770 ± 0,06	0,87 ± 0,07	0,75 ± 0,03	0,63 ± 0,04
Uréia (mg/dL)	34,92 ± 5,56	37,70 ± 4,07	32,02 ± 1,42	34,83 ± 2,3

Os valores representam a média ± erro padrão (n = 6); AST - aspartato aminotransferase; ALT – alanina aminotransferase ; *estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de teste Tukey, p < 0,05).

4.7.2.2 Análises histopatológicas

A análise macroscópica dos órgãos alvo não mostrou qualquer alteração em vista desarmada. O índice hepatossomático foi calculado pela relação do peso do fígado com o peso total do animal e não mostrou diferença significativa entre os animais do grupo tratado (etanólico, aquoso e hexânico) quando comparado ao grupo de animais pertencentes ao grupo controle (Figura 28).

A análise microscópica dos cortes histológicos das vísceras dos animais tratados com diferentes extratos de *T. solanifolia* mostrou alterações discretas. O fígado desses animais apresentou distribuição cordonal dos hepatócitos e os

sinusóides apresentaram-se revestidos com células endoteliais. Os hepatócitos apresentavam citoplasma claro com núcleo central e formato arredondado e, em algumas regiões, deslocado para a periferia da célula (Figura 27).

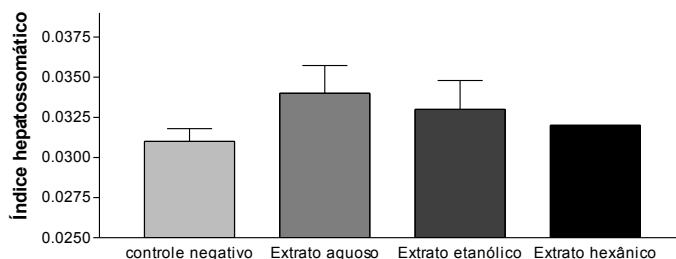


Figura 27 - Índice hepatossomático de ratos Wistar machos tratados com diferentes extratos de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC.

Algumas alterações pouco significativas foram observadas para os animais tratados com extrato hexânico e etanólico (Figuras 28C e D). O fígado dos animais tratados com os extratos hexânico e etanólico apresentou arquitetura lobular com veias hepáticas terminais de paredes finas, regularmente distribuídas, chamando a atenção à presença de moderada congestão venular associada a fenômenos de dilatação e congestão sinusoidais (Figura 28C). Os ratos tratados com extrato hexânico apresentaram grau moderado de lipidose (Figura 28D).

A necrose ocorrida nos hepatócitos, associada com o aumento da permeabilidade da membrana plasmática, pode ser confirmada bioquimicamente pelas dosagens de AST e ALT.

Os extratos brutos de *T. solanifolia* mostraram baixa toxicidade aguda, evidenciada pela ausência de sinais clínicos relevantes no “screening” hipocrático, bem como ausência de morte durante todo o período de observação com a dose de 2000 mg/Kg. Pelo método de classes, os extratos enquadram-se na Classe 5 (substância com DL_{50} superior a 2000 mg/Kg e menor que 5000 mg/Kg), sendo considerados de baixa toxicidade. Partindo do princípio que apenas em casos excepcionais a dose máxima de 5000 mg/Kg deve ser testada somado ao fato de que a solubilização dos extratos é dificultada em solução aquosa, foi adotada a opção por não testar a dose máxima. Outro dado importante, é que a dose inicial (2000 mg/Kg) foi escolhida considerando não haver estudos prévios, somado ao fato

de ser a dose comum ao método teste de dose fixa (139) e pelo teste “Up and Down” que objetiva estimar o valor da DL_{50} testando sequencialmente animais individuais, com dose para cada animal sendo ajustada para cima ou para baixo, dependendo do resultado prévio do animal anterior (140).

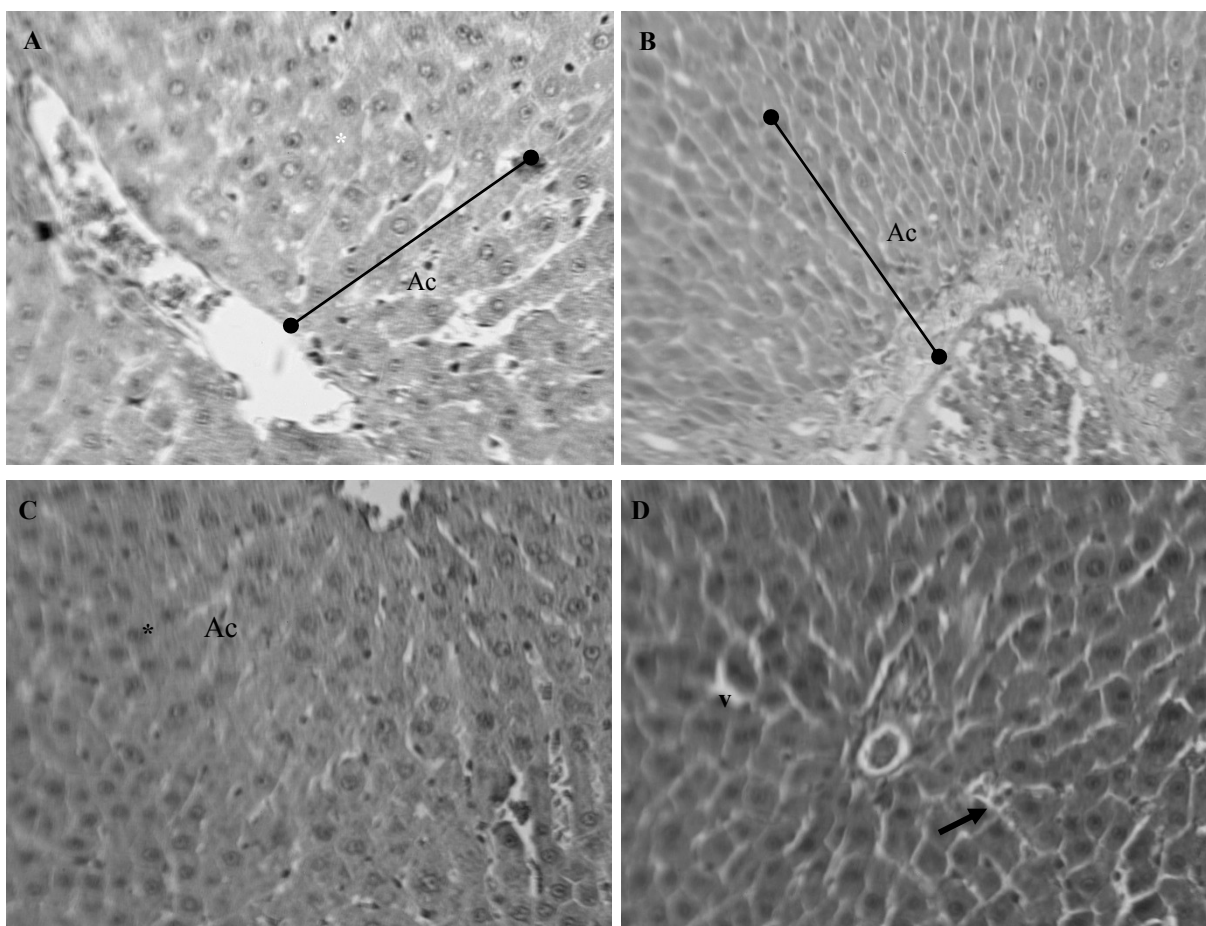


Figura 28 - Micrografia de fígado de ratos Wistar machos tratados com diferentes extratos de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. (X 400). (A) controle, (B) extrato aquoso, (C) extrato etanólico (D) extrato hexanólico com presença de congestão sanguínea; (Ac): arranjo cordonal; (*) núcleo centralizado (v): presença de vacúolo de lipídeo.

Apesar do aparecimento de algumas alterações discretas no exame histopatológico associado a dosagens bioquímicas, a administração de uma única dose dos extratos mostrou que os efeitos tóxicos não são letais. Os dados foram semelhantes à toxicidade de outros extratos de outras espécies de

Tabernaemontana, como os dados obtidos com o extrato etanólico da casca do caule de *T. catharinensis* para o qual a DL_{50} foi maior que 2000 mg/kg em camundongos (32); com o extrato hidroalcolico da casca do caule de *T. crassa* Benth com DL_{50} maior que 6000 mg/Kg em ratos Wistar (141); e o extrato aquoso da casca do caule de *T. pachysiphon* que não provocou a morte de qualquer animal submetido a dose de 5000 mg/kg (142).

As alterações como congestão sinusoidal também foram descritas para ratos submetidos a doses crescentes de extrato de copaíba demonstrando um quadro de insuficiência hepática (143).

Essas alterações histológicas no fígado também foram observadas na utilização de folha de mandioca (144) e cianeto (145), administrados aos ratos.

Mariz e cols. (2008) (146) em um estudo com tratamento agudo com o extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* observaram respostas inflamatórias no fígado dos ratos.

Considerando que a toxicidade de uma substância depende de vários fatores como duração de exposição e quantidade total de substância, estudos com a exposição repetida a baixas doses são necessários para determinar a toxicidade subaguda de *T. solanifolia*.

4.8 PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS

Os testes de difusão em disco (114), juntamente com a difusão em cavidade são utilizados como “screening” de substâncias com atividade antimicrobiana. Ambos os testes baseiam-se na difusão das substâncias, que pode ser evidenciada pelo aparecimento de um halo de inibição. Alguns trabalhos padronizam o diâmetro de inibição como um modo de avaliar substâncias quanto ao potencial antimicrobiano; entretanto, outros consideram apenas a presença do halo com o fator para futuros testes. De acordo com Valgas e cols. (2007) (116) a técnica de difusão em poço ou cavidade mostra-se melhor diante de compostos que não conseguem difundir tão facilmente no Agar comparado a técnica de difusão em disco; contudo, as duas técnicas têm sido amplamente descritas em análises preliminares de atividade antimicrobiana.

Desta forma, as propriedades antimicrobianas de *T. solanifolia* foram investigadas por duas técnicas, sendo primeiramente realizado um “screening” utilizando a técnica de difusão em meio sólido por meio do disco e por cavidade e, posteriormente, utilizando o método de microdiluição para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) ou Concentração Fungicida Mínima (CFM).

4.8.1 Método de difusão em disco

Todos os extratos das folhas de *T. solanifolia* mostraram propriedades antimicrobianas pela técnica de difusão em disco, bem como a substância SMG01 (acetato de β -amirina) isolada do extrato hexânico. Destes, o extrato aquoso foi o que formou os maiores halos de inibição frente às cepas bacterianas e para *Candida krusei*, mas sua ação não foi tão expressiva frente a outras cepas de *Candida*. Diferente do extrato aquoso, a substância SMG01 inibiu em maior proporção as cepas fúngicas comparado as cepas bacterianas (Tabelas 18 e 19). Já o extrato hexânico apresentou inibição para ambos os microorganismos.

Tabela 21- Atividade antibacteriana dos extratos de *Tabernaemontana solanifolia* A DC. e do acetato de β -amirina pelo método de difusão em disco

Amostras	Sigla	Concentração (mg)	Halos de inibição (mm)			
			<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC)		
				25923	8739	9522
Extrato Aquoso	AqE ²	4	24,0 ± 2,5	24,0 ± 2,1	17,0 ± 1,8	28,0 ± 2,0
Extrato etanólico	EE ¹	4	13,0 ± 0,9	15,0 ± 2,7	18,0 ± 2,1	19,0 ± 2,7
	EE ²	4	19,0 ± 2,2	12,0 ± 0,5	18,0 ± 3,0	12,0 ± 1,1
Extrato hexânico	HE ¹	4	18,0 ± 2,7	11,0 ± 0,7	13,0 ± 1,3	18,0 ± 0,9
	HE ²	4	16,0 ± 2,3	21,0 ± 2,1	13,0 ± 1,3	13,0 ± 1,2
Acet. de β -amirina	SMG01	1	13,0 ± 0,5	13,0 ± 1,8	13,0 ± 0,4	15,0 ± 1,6
Tetraciclina	CP	2	40,0 ± 2,5	33,0 ± 3,0	36,0 ± 2,8	35,0 ± 1,7

¹ coleta em abril/ 2007; ² coleta em março/ 2009; AqE – extrato aquoso; EE – extrato etanólico; HE – extrato hexânico, SMG01 - Acet. de β -amirina; CP – controle positivo.

Tabela 22- Atividade antifúngica dos extratos de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. e do acetato de β -amirina pelo método de difusão em disco

Amostras	Sigla	Concentração (mg)	Halos de inibição (mm)			
			<i>Candida krusei</i> ATTC 2419	<i>Candida albicans</i>		
				ATCC 36801	ATCC 10231	ATCC 2219
Extrato Aquoso	AqE ²	4	26,0 ± 0,7	10,0 ± 0,7	10,0 ± 0,5	10,0 ± 0,7
Extrato etanólico	EE ¹	4	21,0 ± 0,7	18,0 ± 2,7	11,0 ± 0,6	14,0 ± 1,5
	EE ²	4	18,0 ± 0,7	12,0 ± 1,2	13,0 ± 0,5	20,0 ± 2,8
Extrato hexânico	HE ¹	4	12,0 ± 0,0	11,0 ± 1,3	12,0 ± 1,1	12,0 ± 1,4
	HE ²	4	10,0 ± 0,0	11,0 ± 0,8	10,0 ± 0,5	12,0 ± 0,0
Acet. de β-amirina	SMG01	1	20,0 ± 0,5	33,0 ± 1,5	12,0 ± 0,8	24,0 ± 3,0
Anfotericina B	CP	2	27,0 ± 0,0	21,0 ± 2,9	28,0 ± 1,2	24,0 ± 2,4
Cetoconazol	CP	2	11,0 ± 0,5	40,0 ± 2,5	36,0 ± 2,8	40,0 ± 2,8

¹ coleta em abril/ 2007; ² coleta em março/ 2009; AqE – extrato aquoso; EE – extrato etanólico; HE – extrato hexânico, SMG01 - Acet. de β -amirina; CP – controle positivo.

4.8.2 Método de difusão em cavidade

Da mesma forma, pelo método de difusão em cavidade ou poço, assim como no método de difusão em disco, todos os extratos brutos de *T. solanifolia* A.DC. mostraram propriedades antimicrobianas (Tabelas 20 e 21, Figura 29). Entretanto, o extrato aquoso mostrou maior atividade antibacteriana do que antifúngica.

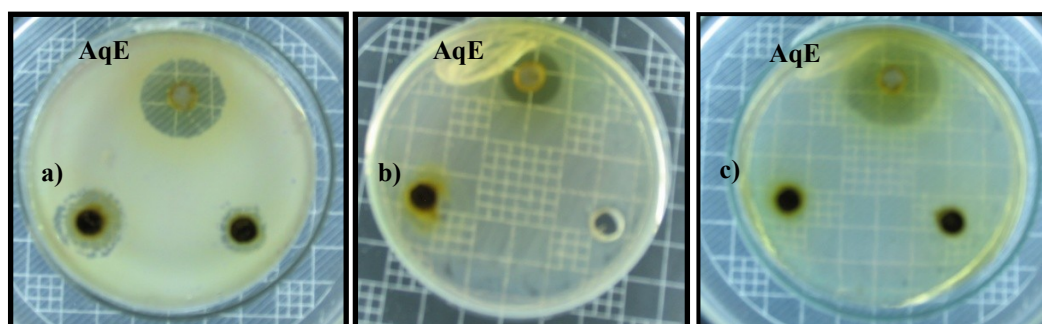


Figura 29 – Pesquisa de propriedades antimicrobianas do extrato aquoso de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. pelo método de difusão em cavidade: (a) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), (b) *Echerichia coli* (ATCC 8739) e (c) *Echerichia coli* (ATCC 35218).

Tabela 23 – Atividade antibacteriana dos extratos de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. e do acetato de β -amirina pelo método de difusão em cavidade

Amostras	Sigla	Concentração (mg)	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
			ATCC 25923	ATCC 8739	ATCC 9522	ATCC 35218
Extrato Aquoso	AqE ²	4	21,3 ± 0,3	22,6 ± 1,3	16,6 ± 0,3	17,3 ± 0,3
Extrato etanólico	EE ¹	4	11,0 ± 0,2	9,3 ± 0,3	10,3 ± 0,3	10,6 ± 0,6
	EE ²	4	17,3 ± 0,6	10,0 ± 0,5	11,3 ± 0,6	10,6 ± 0,6
Extrato hexânico	HE ¹	4	10,0 ± 0,5	10,5 ± 0,5	12,6 ± 0,3	12,0 ± 0,0
	HE ²	4	14,6 ± 0,3	19,5 ± 1,5	10,3 ± 0,3	11,6 ± 0,3
Acet. de β -amirina	SMG01	1	12,0 ± 0,5	11,6 ± 0,8	12,0 ± 0,2	12,6 ± 0,3
Tetraciclina	CP	2	40,0 ± 0,0	35,0 ± 1,0	40,0 ± 0,0	39,3 ± 0,6

¹ coleta em abril/ 2007; ² coleta em março/ 2009

Alguns alcaloides, isovoacangina (**A1d**), coronaridina (**A1b**), voacanginahidroxiindolenina (**A2a**), heineanina (**A1g**), voachalotina (**A8a**) e 12-metoxi-N_b-metilvoachalotina (**A27b**) isolados do extrato metanólico de *T. campestris* [*P. campestris* (Rizz.) Rizz.; *P. solanifolia* var *fallax* (Muell. Arg)], coletada em 1983 em Brasília, também mostraram atividade frente a *Candida albicans* na concentração de 1 mg/mL (8). Como os alcalóides isovoacangina (**A1d**) e coronaridina (**A1b**) também estão presentes em *T. solanifolia*, tal ocorrência pode justificar, ao menos em parte, a atividade observada.

Tabela 24 – Atividade antifúngica dos extratos de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. e do acetato de β -amirina pelo método de difusão em cavidade

Amostras	Siglas	Concentração (mg)	<i>Candida krusei</i>		<i>Candida albicans</i>	
			ATCC 2419	ATCC 36801	ATCC 10231	ATCC 2219
Extrato Aquoso	AqE ²	4	25,5 ± 0,7	9,3 ± 0,3	9,5 ± 0,5	9,5 ± 0,5
Extrato etanólico	EE ¹	4	12,0 ± 1,4	16,0 ± 1,1	10,0 ± 0,0	12,3 ± 0,8
	EE ²	4	17,5 ± 0,7	9,6 ± 0,3	12,3 ± 0,3	17,3 ± 1,3
Extrato hexânico	HE ¹	4	12,0 ± 0,0	10,6 ± 0,3	10,6 ± 0,6	11,0 ± 1,0
	HE ²	4	10,0 ± 0,0	10,6 ± 0,3	9,6 ± 0,3	12,0 ± 0,0
Acet. β -amirina	SMG01	1	ND	31,6 ± 0,8	10,0 ± 0,0	21,3 ± 1,7
Anfotericina B	CP	2	27,0 ± 0,0	28,5 ± 0,7	10,2 ± 1,0	24,0 ± 0,0
Cetoconazol	CP	2	11,0 ± 0,5	44,0 ± 1,1	38,0 ± 2,0	42,0 ± 2,0

¹ coleta em abril/ 2007; ² coleta em março/ 2009; ND - não determinado; AqE – extrato aquoso; EE – extrato etanólico; HE – extrato hexânico; SMG01 - Acet. β -amirina; CP – controle positivo.

Diante dos resultados encontrados nos testes de difusão, elegeu-se um representante de bactéria Gram-positiva, Gram-negativa e de fungo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos.

4.8.3 Método de microdiluição

Os extratos que apresentaram maior atividade foram submetidos a testes para determinação da concentração bactericida mínima (CBM) para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, que para todos os extratos brutos de *T. solanifolia* foi ≥ 1 mg/mL e para o acetato de β -amirina foi $\geq 0,5$ mg/mL. Para a espécie fúngica, *Candida albicans* o valor da concentração fungicida mínima para os extratos brutos foi ≥ 2 mg/mL, mas permaneceu a mesma para o acetato de β -amirina $\geq 0,5$ mg/mL (Tabela 22).

Tabela 25 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)/ Concentração fungicida mínima (CFM) dos extratos e do acetato de β - amirina isolado de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC.

Amostras	Siglas	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)		<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)		<i>E. coli</i> (ATCC 8739)	
		CIM*	CBM *	CIM*	CFM*	CIM*	CBM*
Extrato aquoso	AqE	$\leq 0,5$	$\geq 1,0$	$\geq 1,0$	$\geq 2,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1,0$
Extrato etanólico	EE ¹	$\leq 0,5$	$\geq 1,0$	$\geq 1,0$	$\geq 2,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1,0$
	EE ²	$\leq 0,5$	$\geq 1,0$	$\geq 1,0$	$\geq 2,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1,0$
Extrato hexânico	HE ¹	$\leq 0,5$	$\geq 1,0$	$\geq 2,0$	$>2,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1,0$
	HE ²	$\leq 0,5$	$\geq 1,0$	$\geq 2,0$	$>2,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1,0$
Acetato de β -amirina	SMG01	$\leq 0,5$	$>0,5$	$\geq 0,5$	$>0,5$	$\leq 0,5$	$>0,5$

¹ coleta em abril/ 2007; ² coleta em março/ 2009; * mg/mL; CIM: Concentração inibitória mínima; CBM: Concentração bactericida mínima; CFM: fungicida mínima;

4.9 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

Dentre os modelos experimentais disponíveis para ansiedade, o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) tem sido um dos mais utilizados. O teste foi inicialmente empregado por Montgomery (1955) (147) e, posteriormente, por Handley e Mithani

(1984) (148). Após algumas alterações, o teste foi validado para experimentação em ratos (149) e camundongos (150). A exploração dos braços abertos é um dos parâmetros evidenciados na atividade ansiolítica (tempo e frequência), enquanto a exploração do braço fechado é indicativo de ação ansiogênica. Apesar dos parâmetros clássicos serem o tempo e frequência de entrada nos braços, os parâmetros etológicos tem sido adotado como avaliação de risco geral visando aumentar a sensibilidade e utilidade do labirinto em cruz elevado (151).

Nas condições empregadas no teste, os extratos etanólico (EE) (1 g/kg) e hexânico (HE) (1 g/kg) de *T. solanifolia* não mostraram atividade ansiolítica quando comparados ao controle (salina) (Tabelas 26 e 27). Como era esperado, diazepam, fármaco de escolha para o controle positivo nos modelos experimentais para ansiedade, mostrou aumento significativo de entradas e permanência nos braços abertos quando comparados ao grupo controle (salina).

Tabela 26 – Efeito dos extratos e do acetato de β -amirina isolado de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. (Apocynaceae) em ratos Wistar submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado (300 segundos)

Tratamento	siglas	Dose (via) (g/Kg)	Frequência de entradas*		Tempo *	
			(n)		(segundos)	
			BA	BF	BA	BF
Solvente	CN	0,0 (p.o.)	1,8 ± 0,2	4,1 ± 0,7	37,9 ± 3,3	240,8 ± 8,0
Diazepam	CP	2,0 (i.p.)	3,3 ± 0,4	1,8 ± 0,2**	185,0 ± 22,5***	103,0 ± 21,9***
Extrato aquoso	AqE ²	1,0 (p.o.)	2,9 ± 0,5	3,5 ± 0,6	60,1 ± 9,0	223,8 ± 13,2
Extrato etanólico	EE ¹	1,0 (p.o.)	3,6 ± 0,5	3,6 ± 0,3	49,4 ± 8,9	232,0 ± 10,5
Extrato hexânico	HE ¹	1,0 (p.o.)	3,2 ± 0,6	4,5 ± 0,7	56,0 ± 17,4	230,3 ± 16,8
Acet. de β -amirina	SMG01	0,21 (p.o.)	2,0 ± 0,6	3,1 ± 0,6	45,5 ± 11,5	249,5 ± 11,8

CN = controle negativo (0,9% NaCl + 8% Tween 80); CP = controle positivo; BA = braços abertos, BF = braços fechados; Valores expressos como média ± erro padrão da média (SEM); **p < 0,05 e *** p < 0,001, para análise de variância seguido do teste de Tukey; p.o - via oral; i.p - via intraperitoneal; AqE – extrato aquoso; EE – extrato etanólico; HE – extrato hexânico; SMG01 - Acetato de β -amirina.

Outros parâmetros comportamentais foram investigados, como o número de vezes que o animal realizou imersões com a cabeça ou *head-dipping* (HD), número de vezes que fez comportamento de levantar-se ou de *rearing* (REA) e o número de vezes que o animal realizou a auto-limpeza ou *grooming* (GRO) foram monitorados, juntamente, com o número de *bolos fecais* (BF) que indica um parâmetro de emocionalidade (Tabela 27).

Tabela 27 – Efeito dos extratos e do acetato de β -amirina isolado de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. (Apocynaceae) nos parâmetros etológicos em ratos Wistars submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado (300 segundos)

Tratamentos	Siglas	Dose (g/Kg)	Bolos fecais	Rearing	Head dipping
Solvente	CN	0,0	1.6 \pm 0.4	14.7 \pm 1.3	3.5 \pm 0.8
Diazepam	CP	2,0	0.3 \pm 0.2	3.0 \pm 1.7*	7.6 \pm 0.8
Extrato aquoso	AqE ²	1,0	1.0 \pm 0.3	8.2 \pm 0.9**	4.8 \pm 1.0
Extrato etanólico	EE ¹	1,0	1.5 \pm 0.6	8.0 \pm 1.7**	2.3 \pm 0.4
Extrato hexânico	HE ¹	1,0	0.5 \pm 0.3	4.6 \pm 1.7	2.4 \pm 0.6
Acet. β -amirina	SMG01	0,021	1.1 \pm 0.5	18.0 \pm 2.0	4.7 \pm 1.5

Valores expressos como média \pm erro padrão (SEM); CN – controle negativo (0,9% NaCl + 8% Tween 80); CP - controle positivo; *p < 0,001 e **p < 0,05 comparado ao controle; AqE – extrato aquoso; EE – extrato etanólico; HE – extrato hexânico; SMG01 - Acetato de β -amirina.

O extrato hexânico das inflorescências de *Tilia americana* var *mexicana* (Tiliaceae) mostrou ação ansiolítica quando administrado intraperitonealmente nas concentrações de 10 a 30 mg/Kg. Da mesma forma, o β -sitosterol, identificado com um dos constituintes majoritários desse extrato, quando testado isoladamente apresentou ação semelhante nas concentrações de 1 a 10 mg/Kg (152). Dentre outros constituintes responsáveis pela ação ansiolítica de compostos isolados de extratos vegetais, a administração de triterpenos (10 mg/Kg) (α e β -amirina) isolados de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. (Burseraceae) também provocou ação ansiolítica proeminente no modelo de LCE, além de outras atividades testadas (nado forçado, campo aberto e convulsão induzida pelo pentilenotetrazol) (149).

Dados como estes reforçam a importância de estudos complementares serem realizados com concentrações superiores dos extratos de *T. solanifolia* A.DC. ou em tratamento crônico, bem como a fração alcaloídica em outros modelos de experimentação animal. Outro fator discutido por outros autores é que o grupo deveria ser constituído com um número maior de animais, entre 10 a 20 para não ocorrer falsos negativos. Desta forma, acredita-se que estudos adicionais possam ser realizados com substâncias isoladas dos extratos.

Na revisão realizada por Hogg (1996) (153) a linhagem do animal utilizado, o manipulador dos animais, bem como as condições do ambiente são itens importantes e podem interferir nos resultados. O autor argumentou que a padronização dos critérios estabelecidos para a leitura dos resultados tem sido um dos pontos críticos de muitos trabalhos, pois segundo o método de Peloow (1985) (120) deve-se considerar entrada e tempo no braço aberto quando o animal adentrar

este espaço com as 4 patas; entretanto, alguns trabalhos não tem adotado este critério, o que poderia justificar diferença entre resultados com compostos semelhantes.

4.10 TESTES DE FITOTOXICIDADE

Alelopatia em plantas pode ser definida como a interferência de substâncias químicas na germinação, no crescimento ou desenvolvimento de plantas de outras espécies (154). Os ensaios visando demonstrar essa propriedade têm sido realizados experimentalmente por meio da aplicação de extratos de uma planta a sementes ou plântulas de outras espécies visando observar a inibição ou estímulo da germinação de sementes ou no desenvolvimento da plântula. Dentre as plantas mais utilizadas, a alface (*Lactuca sativa* L.) é a mais utilizada por se tratar de uma espécie sensível aos aleloquímicos.

Ensaio de alelopatia vêm sendo realizados na busca de obtenção de novas moléculas ou aleloquímicos de importância na agricultura.

A germinação consiste no rompimento do tegumento, seguido pelo curvamento feotrópico da radícula, aparecendo uma raiz jovem. Trata-se de um fenômeno discreto que acontece para cada semente de forma positiva ou negativa (118).

De acordo com Ferreira e Áquila (2000) (154) o processo de germinação é menos sensível aos aleloquímicos que o crescimento da plântula, entretanto, na prática os testes de germinação são mais fáceis de serem executados e acompanhados.

A triagem de propriedades alelopáticas para os extratos de *T. solanifolia* foi realizada para *Lactuca sativa* L. (alface) e também com *Glycine max* L. (soja). A escolha das duas espécies ocorreu devido a primeira ser clássica nos experimentos de fitotoxicidade e a segunda por ter grande importância na economia e na agricultura, sendo um dos cultivares mais expressivos de área produzida no Brasil.

4.10.1 Fitotoxicidade para *Lactuca sativa* L.

O extrato hexânico (1000 ppm) foi capaz de estimular o crescimento das radículas de *Lactuca sativa* L. (Figura 30), entretanto, nenhum efeito foi notado no crescimento médio do hipocótilo.

O extrato etanólico conseguiu interferir no crescimento das radículas na concentração de 500 µg/mL, bem como para os hipocótilos (Figura 31). Desta forma, o extrato etanólico foi fracionado (ver página 83) e a HF mostrou ação semelhante, sugerindo que os compostos presentes nesta fração podem ser os responsáveis pelo efeito alelopático positivo para o crescimento das radículas e dos hipocótilos de *Lactuca sativa* L.

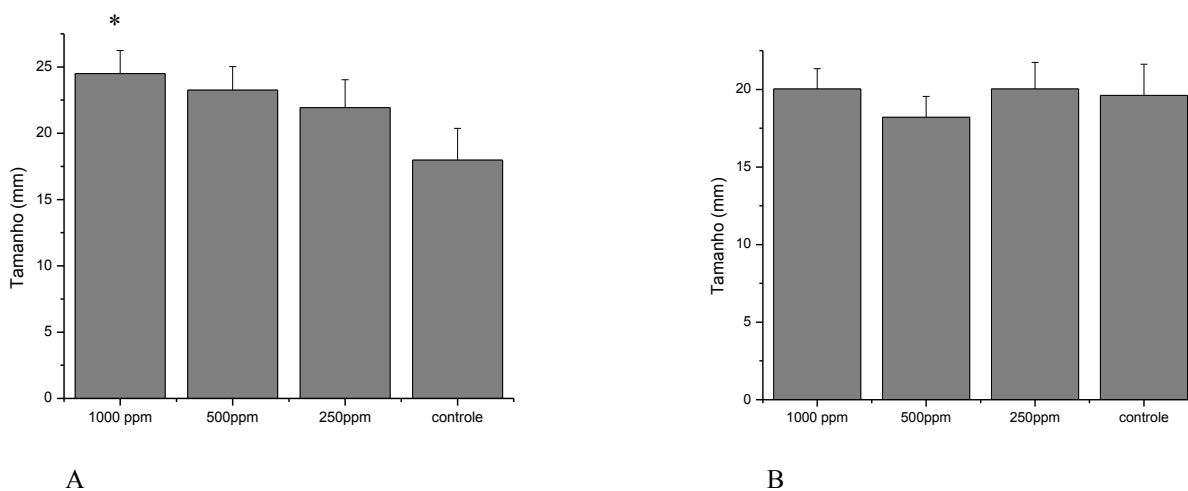


Figura 30 – Tamanho médio da radícula (A) e hipocótilo (B) de *Lactuca sativa* L. após 5 dias de avaliação frente ao extrato hexânico de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. em diferentes concentrações. * p < 0,05 vs controle. As análises foram feitas utilizando o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

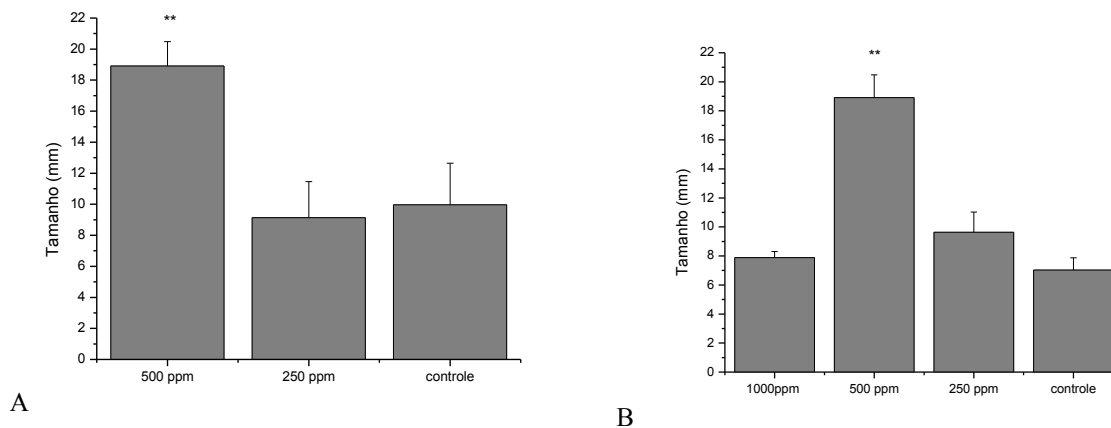


Figura 31 – Tamanho médio da radícula (A) e do hipocótilo (B) de *Lactuca sativa* L. após 5 dias de avaliação frente ao extrato etanólico de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. em diferentes concentrações. * $p < 0,01$. As análises foram feitas utilizando o teste de Tukey com 5% de probabilidade.

O composto isolado SMG01 mostrou efeito inibitório para o crescimento do hipocótilo na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 32).

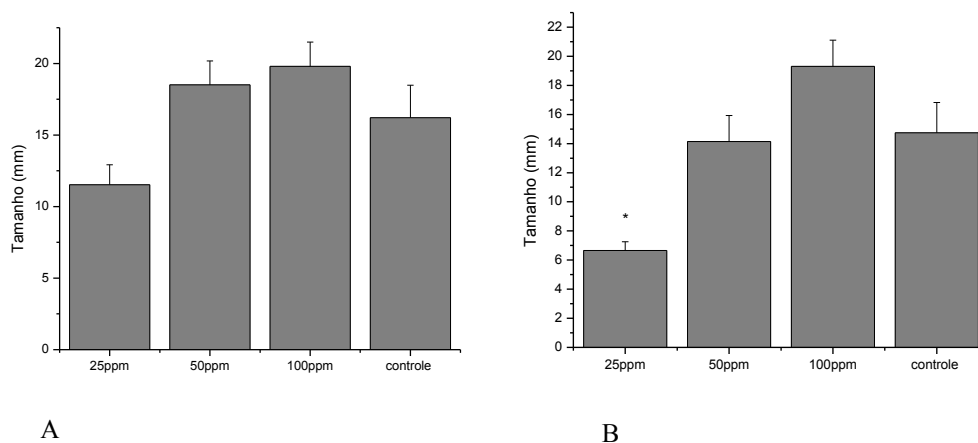


Figura 32- Tamanho médio do hipocótilo (A) e das radículas (B) de *Lactuca sativa* L. após 5 dias de avaliação frente ao acetato de β - amirina (SMG01). ** $p < 0,01$ vs controle. As análises foram feitas utilizando o teste de Tukey com 5% de probabilidade.

Quanto ao processo de germinação, nem o extrato etanólico nem o hexânico quando administrados nas concentrações de 500, 1000, 2000 e 4000 µg/mL interferiram no processo de germinação. O mesmo aconteceu com SMG01 (acetato de β-amirina) nas concentrações de 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL.

De acordo com Ferreira e Áquila (2000) (154) o processo de germinação é menos sensível aos aleloquímicos que o crescimento da plântula, entretanto, na prática os testes de germinação são mais fáceis de serem executados e acompanhados.

4.10.2 Fitotoxicidade para *Glycine max* L. (soja)

Nos ensaios de alelopatia para sementes da soja (*Glycine max* L.), o crescimento das radículas foi estimulado na presença do extrato hexânico e extrato aquoso a partir da concentração de 250 µg/mL e do extrato etanólico a partir da concentração de 500 µg/mL. Contudo, o crescimento dos hipocótilos foi inibido pelo extrato aquoso e inibido pelo extrato hexânico (Tabela 28, Figuras 33 e 34).

Tabela 28 – Tamanho médio do crescimento do hipocótilo e da radícula de *Glycine max* L. submetidas a diversas concentrações dos extratos de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC.

Amostra	Sigla	Dose (ppm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)
Extrato aquoso	AqE	250	46,0 ± 2,4*	44,0 ± 1,9*
		500	57,7 ± 0,8*	42,8 ± 1,0*
		1000	64,0 ± 2,6*	58,0 ± 1,3*
Extrato etanólico	EE1	250	89,5 ± 1,1	28,1 ± 1,3
		500	96,0 ± 1,6	57,8 ± 1,0*
		1000	99,0 ± 1,0	54,3 ± 3,1*
	EE2	250	95,0 ± 2,8	26,1 ± 2,3
		500	93,7 ± 5,3	95,7 ± 7,1*
		1000	91,8 ± 2,9	69,2 ± 4,9*
Extrato hexânico	HE1	250	147,5 ± 0,8 *	108,3 ± 0,8*
		500	148,5 ± 0,7 *	107,8 ± 1,0*
		1000	148,0 ± 1,1 *	108,3 ± 1,0*
	HE2	250	148,0 ± 0,8*	108,5 ± 0,7*
		500	148,0 ± 0,8*	107,0 ± 0,9*
		1000	147,5 ± 1,1*	107,85 ± 1,0*
Controle de crescimento	CC	0	90,0 ± 1,6	23,0 ± 0,8

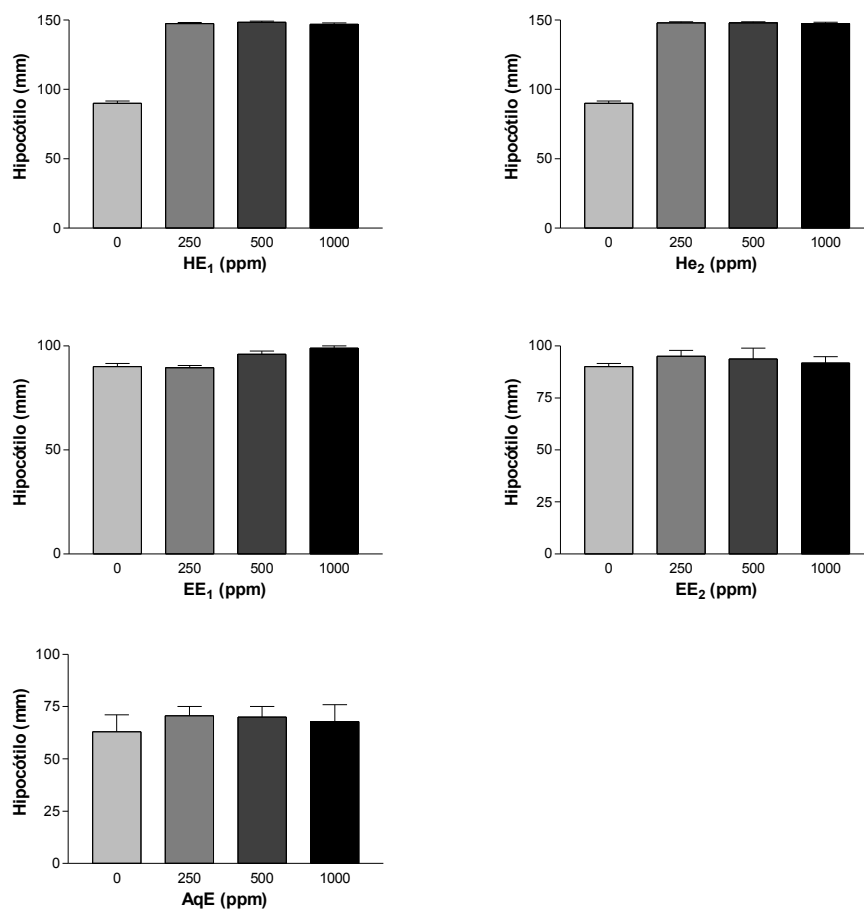


Figura 33 - Tamanho médio de crescimento dos hipocótilos de *Glycine max* L. 5 dias após o tratamento com extratos obtidos a partir das folhas de *T. solanifolia* A. DC. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão e as análises foram realizados por ANOVA seguido de teste de Tukey. EE: extrato etanólico, 1: 1^a coleta, 2: 2^a coleta, HE: extrato hexânico, AqE, extrato aquoso.

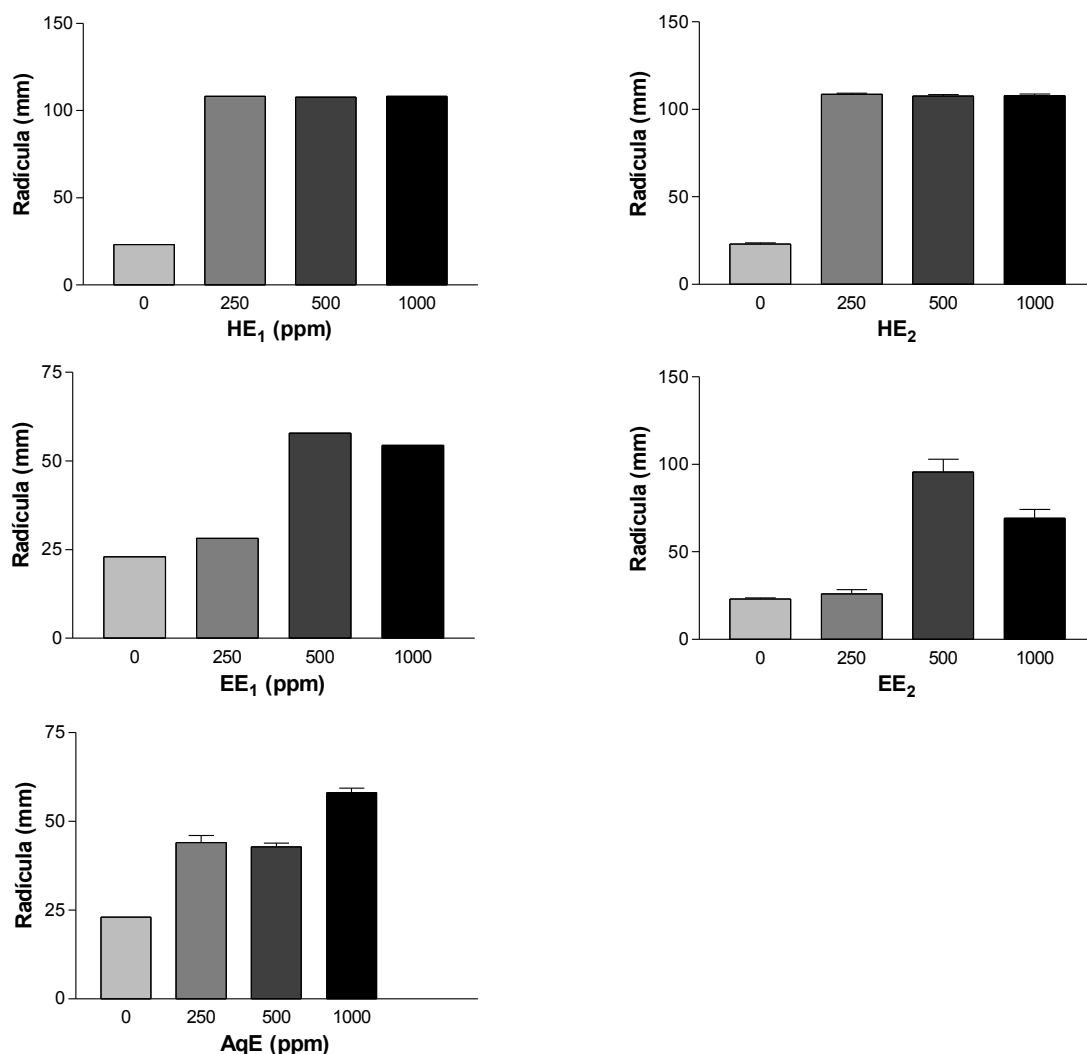


Figura 34 - Tamanho médio de crescimento das radículas de *Glycine max* 5 dias após o tratamento com extratos obtidos a partir das folhas de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão e as análises foram realizados por ANOVA seguido de teste de Tukey. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle. EE: extrato etanólico, 1: 1^a coleta, 2: 2^a coleta, HE: extrato hexânico, AqE, extrato aquoso.

Segundo Pires e Oliveira (2011) (155) as radículas seriam mais sensíveis à ação dos aleloquímicos do que os hipocótilos. Por outro lado, existe a possibilidade de diferentes mecanismos de ação serem acionados pelos aleloquímicos, o que de certa forma poderia explicar ação que determinados compostos possuem somente após estágios mais avançados de desenvolvimento da plântula.

Assim como os resultados obtidos no ensaio de germinação para sementes de alface, nas condições avaliadas, nenhum extrato interferiu no processo de germinação das sementes da soja.

4.11 ATIVIDADE INSETICIDA

A pesquisa de compostos naturais com propriedade inseticida tem crescido nos últimos anos não somente na área de entomologia agrícola, mas também na entomologia médica. Tradicionalmente, o controle de insetos tem sido realizado por inúmeros compostos químicos de origem sintética, contudo, o uso de fitoinseticidas para o controle alternativo e complementar ao convencional tem sido viável visando redução de custos, de danos ao ambiente, à saúde animal e humana. Desta forma, os fitocomplexos têm despertado o interesse da indústria agroquímica também pela diversidade de famílias com potencial inseticida (Apocynaceae, Solanaceae, Flacuortiaceae, Liliaceae, Asteraceae, Meliaceae e Fabaceae) (156).

Dentre as metodologias descritas para investigar propriedades inseticidas estão os ensaios de consumo foliar, onde as folhas utilizadas como alimento para o inseto em estudo recebem os extratos de plantas por meio de borrifação ou submersão em determinado tempo (157) e os ensaios que utilizam o preparo de dietas artificiais acrescidas dos compostos a serem investigados (158). Independente da técnica utilizada, os bioensaios procuram avaliar o efeito dos extratos ou produtos oriundos de outras plantas sobre o inseto. Desta forma, consegue indiretamente monitorar a interferência dos extratos quanto ao consumo alimentar, ao desenvolvimento (Figura 35), alterações e mortalidade do inseto (159).

O extrato aquoso e hexânico não interferiram no consumo alimentar de *A. gemmatalis*, ou seja, não inibiram o inseto de iniciar sua alimentação (Tabelas 29 e 30). Contudo, ambos extratos reduziram a capacidade dos quarto e quintos estágios larvais conseguirem empupar. Por outro lado, apenas o extrato hexânico (500 ppm) alterou o período larval, o tamanho da pupa formada e, ainda, a capacidade dessas pupas conseguirem emergir como adultos viáveis (viabilidade pupal).



Figura 35 – Fases de desenvolvimento de *Anticarsia gemmatallis* H.: a) Fase de larva; b) Fase de pupa e c) Fase adulta.

Tabela 29 – Parâmetros de atividade inseticida do extrato aquoso de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. em *Anticarsia gemmatallis* H. mantidas em dieta artificial (Dourados - MS, 2011)

Parâmetros	Extrato aquoso (ppm)				Controle
	0	250	500	1000	
Número de pupas	7,0 ± 1,5	10,0 ± 0,0	4,0 ± 1,6*	5,0 ± 1,6	10,0 ± 0,0
Consumo	1,8 ± 0,4	1,5 ± 0,5	0,8 ± 0,4	1,3 ± 0,4	2,3 ± 0,4
Balanço	1,4 ± 0,3	1,2 ± 0,4	0,6 ± 0,3	1,0 ± 0,3	1,9 ± 0,4
Peso da Pupa (g)	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,4	0,07 ± 0,03	0,1 ± 0,03	0,06 ± 0,03
Comprimento pupa (mm)	11,5 ± 2,5	8,5 ± 2,8	5,0 ± 2,5	8,7 ± 2,9	14,8 ± 1,6
Viabilidade	7,0 ± 1,5	5,0 ± 1,6	3,0 ± 1,5	5,0 ± 1,6	9,0 ± 1,0
Período larval	6,4 ± 1,4	4,0 ± 1,4	2,7 ± 1,3	4,5 ± 1,5	8,6 ± 1,1
Mortalidade diária	1,0 ± 0,5	2,4 ± 1,0	4,9 ± 1,1	2,6 ± 0,9	0,6 ± 0,6

(*) p < 0,05; (**) p < 0,01, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey comparado ao controle; *médias oriundas de 10 repetições(n=10).

Tabela 30 – Parâmetros de atividade inseticida do extrato hexânico de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. em *Anticarsia gemmatallis* H. mantidas em dieta artificial (Dourados-MS, 2011)

Parâmetros	Extrato hexânico (ppm)				Controle
	0	250	500	1000	
Número de pupas	8,0 ± 1,3	5,0 ± 1,6	1,0 ± 1,0**	3,0 ± 1,5*	10,0 ± 0,0
Consumo	3,1 ± 0,5	1,4 ± 0,4	0,3 ± 0,3	1,06 ± 0,5	2,3 ± 0,4
Balanço	2,8 ± 0,5	1,2 ± 0,4	0,3 ± 0,2	0,7 ± 0,3	1,9 ± 0,4
Peso da Pupa	0,1 ± 0,04	0,1 ± 0,03	0,1 ± 0,03	0,02 ± 0,02	0,06 ± 0,03
Comprimento pupa (mm)	13,1 ± 2,2	8,3 ± 2,7	1,6 ± 1,6**	4,8 ± 2,4	14,8 ± 1,6
Viabilidade	8,0 ± 1,3	5,0 ± 1,6	1,0 ± 1,0**	3,0 ± 1,5	9,0 ± 1,0
Fase Larval (dias)	7,0 ± 1,2	4,4 ± 1,4	0,8 ± 0,8**	2,9 ± 1,4	8,6 ± 1,1
Morte	0,8 ± 0,5	2,3 ± 0,8	3,9 ± 1,3	2,9 ± 1,1	0,6 ± 0,6

(*) p < 0,05; (**) p < 0,01, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey comparado ao controle; *Médias oriundas de 10 repetições (n=10).

Propriedades inseticidas para *A. gemmatallis* foram evidenciadas em rutina e quercetina acrescidas em dieta artificial. A quercetina afetou na mortalidade das pupas, bem como no seu peso (160) enquanto a rutina (1,3 %) também inibiu o

crescimento do inseto, não somente pela inibição alimentar, mas também na conversão do alimento ingerido em biomassa e assimilação de alimentos. Especificamente dentro desse gênero, o extrato etanólico da casca do caule de *T. catharinensis* A. DC. mostrou ação sobre a emergência dos imagos de *Zaprionus indianus* (Díptera: Drosophilidae) (Gupta, 1970) emergidas em dieta artificial (36), apesar de não interferir na sobrevivência das moscas adultas. *Tabernaemontana divaricata* [sinonímia *Ervatamia coronaria* Stapf.] mostrou ação inseticida frente a *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* em concentrações superiores a 25 mg/mL (161-162).

4.12 ANATOMIA FOLIAR

As características morfológicas e anatômicas são importantes na caracterização e na identificação das famílias, gêneros e espécies vegetais, contribuindo para as áreas de controle de qualidade e autenticidade dessas espécies (163). A descrição dos aspectos anatômicos de *T. solanifolia* ainda não foi documentada anteriormente.

4.12.1 Pecíolo

O pecíolo seccionado transversalmente é arredondado na face abaxial e plano na face adaxial (Figura 36.1). A epiderme é unisseriada, com superfície bulada e células acentuadamente desuniformes quanto ao tamanho (Figuras 36.3 e 36.4). O colênquima subepidérmico é do tipo angular (Figura 36.3), composto de cerca de seis camadas de células. Laticíferos são encontrados na região subepidérmica (Figura 36.2). O sistema vascular é representado por um feixe bicolateral em forma de arco, e por feixes anficrivais menores dispersos no parênquima cortical (Figuras 36.7-8). Nas células parenquimáticas corticais e medulares, idioblastos contendo cristais do tipo drusa são muito abundantes (Figura 36.2), ocorrendo cristais prismáticos em menor quantidade (Figura 36.5).

A folha possui nervuras pouco lignificadas. Não foram constatadas fibras associadas ao floema no pecíolo, nem na nervura central.

4.12.2 Limbo

O feixe da nervura central é bicolateral em forma de arco (Figura 37.9 e 37.15). A região cortical e medular da nervura central é ocupada por parênquima com cristais abundantes (Fig. 37.15).

Duas a três camadas de colênquima angular subepidérmico ocorrem em ambas as faces da nervura central (Figura 37.10 - 37.12), com abundantes idioblastos contendo cristais prismáticos e do tipo drusa (Figura 37.14). O parênquima paliçádico da lâmina foliar se estende até a nervura central, ocupando cerca de 1/4 da largura da mesma, nos dois lados (Figura 37.11).

Cristais do tipo drusa estão dispersos no parênquima clorofiliano e lacunoso (Figuras 37.12, 37.14 e 38.20).

Pequenos feixes vasculares do tipo colateral, que estão imersos no mesofilo, são circundados por uma bainha parenquimática. O parênquima lacunoso possui cerca de 14 - 16 camadas de células poliédricas, de formato irregular e tamanho variado (Figuras 38.17 – 38.22) às vezes braciiformes (Figura 38.19). A lâmina foliar de *T. solanifolia* possui epiderme uniestratificada, destituída de tricomas, com células comuns cerca de duas vezes mais altas na face adaxial do que na abaxial, tendo uma espessa camada de cutícula-parede periclinal externa. O mesofilo é heterogêneo e dorsiventral. O parênquima paliçádico ocupa cerca de 1/5 da espessura do mesofilo, é constituído por 2-3 camadas de células 4-5 vezes mais altas que largas (Figuras 38.21 e 38.22). A folha é hipoestomática. Na superfície abaxial, observam-se estômatos do tipo anomocítico, que são raros na região da nervura central. Suas células-guarda possuem cristas (Figura 38. 24).

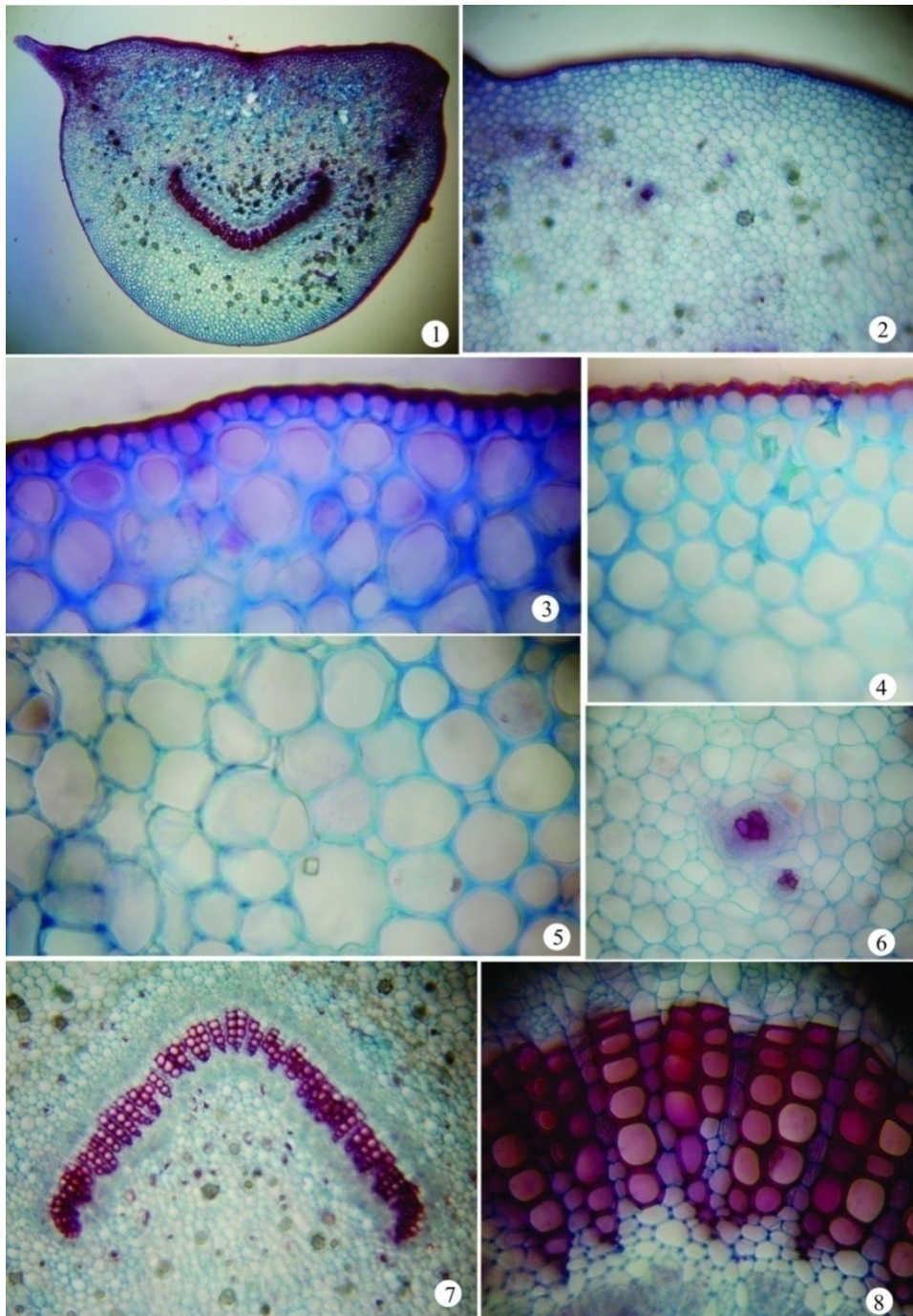


Figura 36 (1 a 8) - Secção transversal do pecíolo de *Tabernaemontana solanifolia* A.DC.: 1) Aspecto geral do pecíolo; 2) Detalhe do meristema fundamental parenquimático; 3) Detalhe da célula epidérmica e do colênquima angular; 4) Detalhe do colênquima e parênquima; 5) Detalhe de um cristal prismático no parênquima; 6) Detalhe de dois feixes corticais menor calibre; 7) Detalhe do cilindro em forma de ferradura; 8) Detalhe da disposição do feixe de maior calibre (ep; epiderme, ca: câmbio, co: colênquima, cr: cristal, cu: cutícula, fv: feixe vascular, la: laticífero, mf: meristema fundamental).

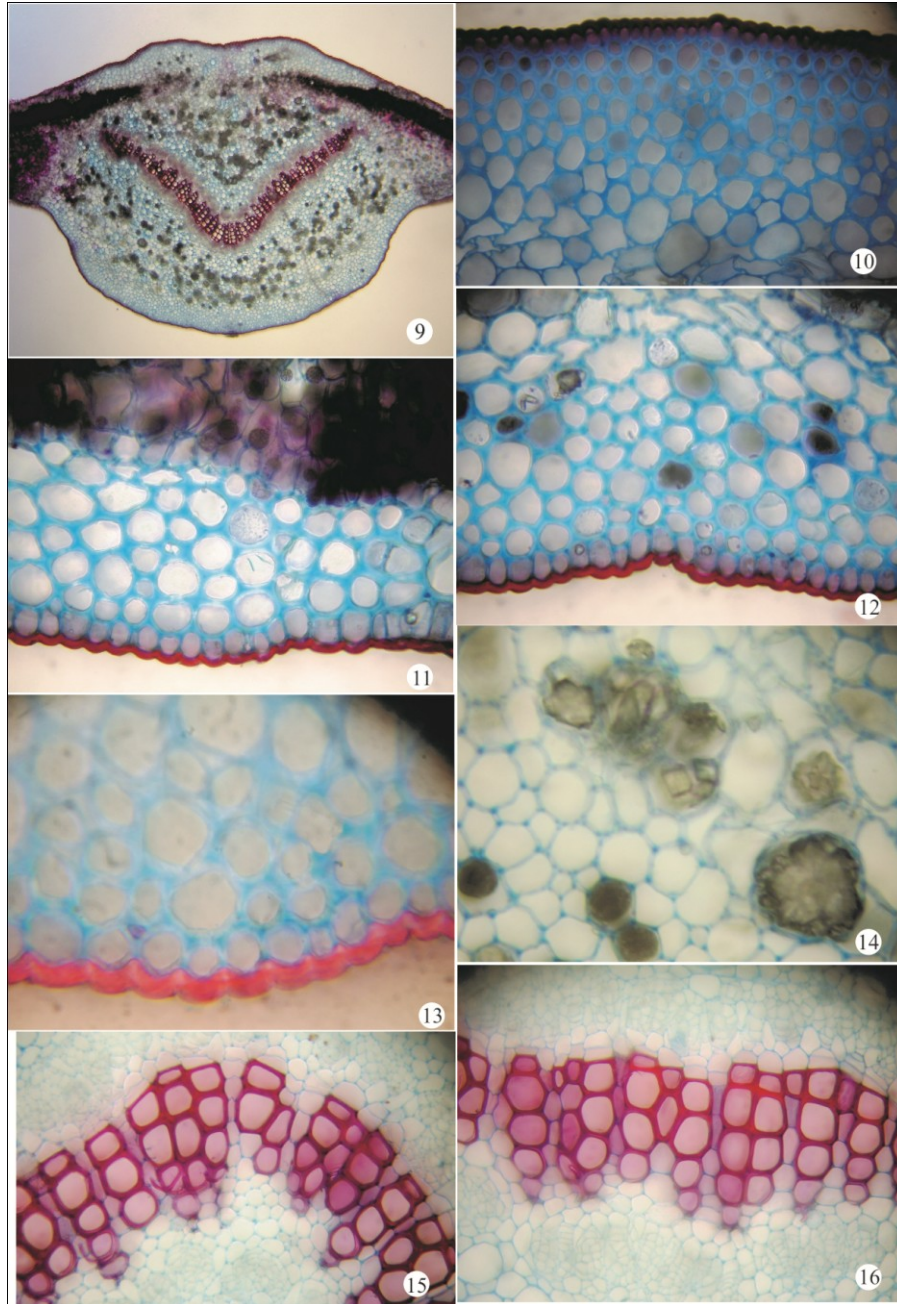


Figura 37 (9-16) - Secção transversal do limbo de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC.: 9) Aspecto geral da região vascular do limbo; 10) Detalhe do colênquima angular na região abaxial; 11) Detalhe do colênquima na região adaxial e do parênquima paliçádico; 12) Detalhe da reentrância na região adaxial; 13) Detalhe da epiderme e cutícula espessa; 14) Detalhe das drusas; 15) Detalhe do feixe bicolateral aberto na região superior; 16) Detalhe da região inferior do feixe bicolateral aberto. (co: colênquia, dr: drusas, ep: epiderme, fl: floema, pl: parênquima lacunoso, pp: parênquima paliçádico, xi: xilema).

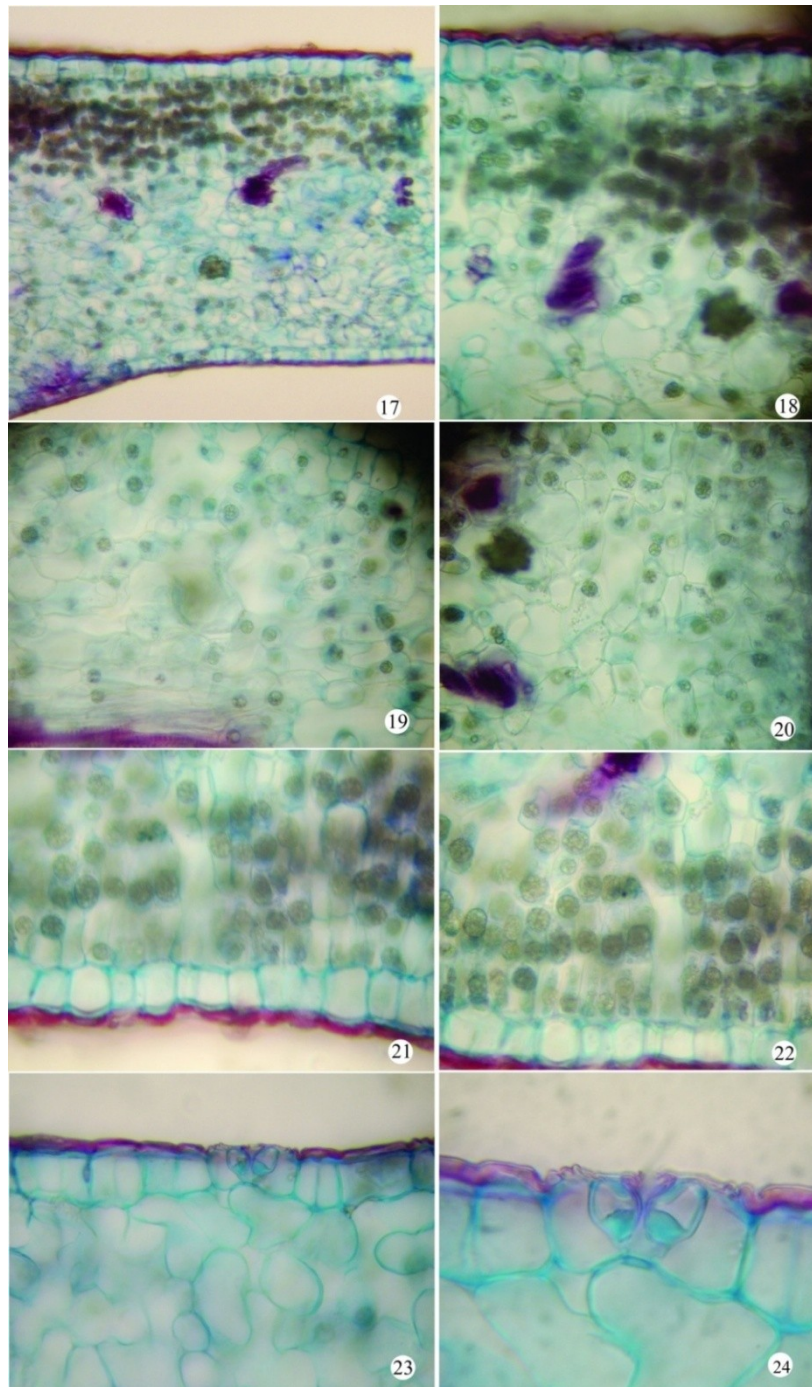


Figura 38 (17-24) - Secção transversal do limbo de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. 17) Aspecto do mesofilo. 18) Detalhe da região do mesofilo paliçádico. 19) Detalhe do mesofilo lacunoso. 20) Detalhe das células com do parênquima paliçádico com conteúdo. 21) Detalhe da epiderme unisseriada. 22) Detalhe das camadas do parênquima paliçádico. 23) Detalhe do estômato. 24) Detalhe do estômato.

5 CONCLUSÃO

O estudo químico de folhas de *T. solanifolia* A. DC. possibilitou o isolamento de acetato de β -amirina e de uma mistura de sitosterol e estigmasterol. Também foram identificados, por CG-EM, os alcaloides indólicos isovoacangina, voacangina, catarantina, 3-hidroxicoronaridina e coronaridina. O extrato aquoso bruto mostrou teor em compostos fenólicos de 141,51 mg/g e de flavonoides de 121,80 mg/g. O extrato etanólico bruto mostrou teor médio em compostos fenólicos de 98,41 mg/g e de flavonoides de 98,96 mg/g. A análise por CLAE permitiu a detecção de rutina, isoquercitrina, quercetina e derivados do ácido cafeico e ácido clorogênico.

Os extratos aquoso, etanólico e hexânico apresentaram atividade biológica. Os extratos aquoso, etanólico e hexânico de *T. solanifolia* possuem atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (CIM \geq 1 mg/mL) e *Candida albicans* (CIM \geq 2 mg/mL), da mesma forma que a substância isolada, acetato de β -amirina (CIM \geq 0,5 mg/mL). Também mostraram pronunciado potencial antioxidante, sendo o extrato aquoso pelos métodos de DPPH e AAPH, enquanto o extrato etanólico apresentou essa ação confirmada pelos métodos de DPPH, fosfomolibdênio, β -caroteno/ ácido linoleico e por AAPH.

Os extratos aquoso, etanólico e hexânico mostraram efeito alelopático positivo sobre o crescimento das radículas de *Lactuca sativa* L. e de *Glycine max* L., enquanto apenas o extrato hexânico mostrou a mesma ação frente ao crescimento dos hipocótilos. Foi observado ainda que os três extratos não foram capazes de interferir na germinação das sementes das duas espécies avaliadas.

Os extratos brutos de *T. solanifolia* não mostraram ação ansiolítica em ratos wistar submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado (LCE) na concentração de 1 mg/mL.

No teste de atividade antialimentar frente à *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) mantidas em dieta artificial, os extratos aquoso e hexânico não se mostraram ativos.

Quanto à avaliação da toxicidade, foram utilizados dois modelos. O extrato aquoso não foi considerado tóxico de acordo com o protocolo de toxicidade frente

aos náutiplos de *Artemia salina*; entretanto, os extratos etanólico e hexânico, bem como a fração alcaloídica apresentaram toxicidade com DL₅₀ igual a 304, 250 e 103 µ/mL, respectivamente.

Na avaliação de toxicidade aguda *in vivo*, os extratos aquoso, etanólico e hexânico de *T. solanifolia* mostraram baixa toxicidade aguda, evidenciada pela ausência de sinais clínicos relevantes no “screening” hipocrático, bem como ausência de morte durante todo o período de observação com a dose de 2000 mg/Kg.

Após levantamento bibliográfico foi detectado que é a primeira vez que é relatada a presença dos compostos isolados e/ou identificados nos extratos de folhas de *T. solanifolia*, com exceção de isovoacangina. Voacangina foi isolada previamente de raízes, mas é pela primeira vez relatada a sua presença em folhas dessa espécie. Da mesma forma, até onde vai nosso conhecimento, é a primeira vez que é relatada as atividades antioxidante, antimicrobiana e alelopática para essa espécie.

Apesar de os extratos avaliados não mostrarem atividade nos testes aqui utilizados, também é a primeira vez que estudos de atividade farmacológica e antialimentar são relatados para essa espécie, bem como as avaliações de toxicidade.

Considerando que as folhas de *T. solanifolia* mostraram-se com baixa toxicidade e que o teor em compostos fenólicos mostrou-se significativo, os resultados encontrados sugerem que essa espécie, endêmica no Brasil, pode ser interessante para o desenvolvimento de um produto para uso terapêutico ou cosmético.

6 PERSPECTIVAS

Esta tese investigou propriedades químicas dos extratos aquoso, etanólico e hexânico de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. e sua ação frente a algumas propriedades biológicas e toxicológicas. Os extratos brutos estudados apresentaram ação antioxidante, antimicrobiana *in vitro*, ação ansiogênica e efeito alelopático frente ao crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Glicine max* L. Desta forma, *T. solanifolia* A. DC. foi identificada como objeto para investigações fitoquímicas com propriedades biológicas.

Nesse sentido, trabalhos ainda devem ser realizados para investigar a toxicidade subaguda e crônica dos extratos brutos, ação ansiogênica pelo labirinto em cruz elevado aplicando doses repetidas, bem como para outros modelos comportamentais como o teste de campo aberto e nado forçado.

ANEXO 1- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS UNIGRAN

Dourados, 30 de março de 2009

Prezada Pesquisadora:

Adriana Mestriner Felipe de Melo

O Projeto de vossa autoria 136/09 “**Pesquisa de atividade antioxidante de plantas medicinais com eritrócitos humanos**” foi integralmente APROVADO pelo CEP-UNIGRAN e poderá ser conduzido. Pois o acadêmico atendeu as recomendações dos relatores.

Ressalto que os relatórios semestrais devem ser apresentados ao Comitê para acompanhamento e que alterações em seu projeto devem ser avisadas previamente a coordenação.

Respeitosamente,

Prof. M.Sc. Georgia Cristian Borges
Secretária CEP-UNIGRAN

ANEXO 2 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA PARA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

COMITÊ DE ÉTICA PARA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Dourados, 08 de setembro de 2009.

Prezado Pesquisadora

Adriana Mary Mestriner Felipe de Melo

O Projeto de vossa autoria, com protocolo **171/09**, intitulado: “**Atividade biológica e farmacológica de extratos de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. isolados do cerrado Brisleiro, Distrito Federal, Brasil**” foi integralmente **APROVADO** pelo CEP-UNIGRAN, e poderá ser conduzido. A acadêmica atendeu as recomendações dos relatores.

Ressalto que os relatórios semestrais devem ser apresentados ao Comitê para acompanhamento e que alterações em seu projeto devem ser avisadas previamente a coordenação.

Respeitosamente,



Georgia Cristian Borges
Coordenadora do CEP-UNIGRAN

Georgia Cristian Borges
Coordenadora CEP-UNIGRAN

Comitê de Ética para Experimentação Animal
Centro Universitário da Grande Dourados
R: Balbina de Matos, 2121 – Fone: (67) 3411-4254 / Fax: 3411-4167 – CEP: 79824-900 – Dourados – MS
E-mail: comitedeetica@unigran.br

REFERÊNCIAS

1. Van Beek TA, Verpoorte R, Svendsen AB, Leeuwenberg AJM, Bisset NG. *Tabernaemontana* L.(Apocynaceae): A review of its taxonomy, phytochemistry, ethnobotany and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 1984; 10(1):1-156.
2. Endress ME, Bruyns PV. A revised classification of the Apocynaceae s.l. *The Botanical Review*. 2000; 66(1):1-56.
3. The International Plant Name Index (<http://www.ipni.org/>) [database on the Internet]. The Royal Botanic Gardens, Kew; The Harvard University Herbaria; Australian National Herbarium. 2012.
4. Koch I, Rapini A, Simões AO, Spina AP. Apocynaceae. Lista de Espécies da Flora do Brasil (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012>). 2012.
5. Tropicos(R) [database on the Internet]. Missouri Botanical Garden (<http://www.tropicos.org>). 2012 [cited 08/13/2012].
6. Souza V. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. São Paulo: Instituto Plantarum; 2005.
7. Leeuwenberg AJM. A revision of *Tabernaemontana*: 2. The New World species and *Stemmadenia*. Kew: Royal Botanic Gardens; 1994.
8. Gower AE, Pereira BDS, Marsaioli AJ. Indole alkaloids from *Peschiera campestris*. *Phytochemistry*. 1986; 25(12):2908-10.
9. Potgieter K, Albert VA. Phylogenetic relationships within Apocynaceae s.l based on trnL intron and trnL-F spacer sequences and propagule characters. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 2001; 88(4):523-49.
10. Vinckier S, Smets E. Morphological and Ultrastructural Diversity of Orbicules in Relation to Evolutionary Tendencies in Apocynaceae s.l. *Annals of Botany*. 2002; 90(5):647-62.
11. Sennblad B, Bremer B. Classification of Apocynaceae s. 1. According to a New Approach Combining Linnaean and Phylogenetic Taxonomy. *Systematic Biology*. 2002; 51(3):389-409.
12. Suffredini IB, Bacchi EM, Sakuda TMK, Ohara MT, Younes RN, Varella AD. Antibacterial activity of Apocynaceae extracts and MIC of *Tabernaemontana angulata* stem organic extract. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2002; 38(1):89-94.
13. Zocoler MA, Oliveira AJBD, Sarragiotto MH, Grzesiuk VLV, G. J. Qualitative determination of indole alkaloids of *Tabernaemontana fuchsiaefolia* (Apocynaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2005; 16:1372-7.

14. Souza JJ, Mathias L, Braz-Filho R, Vieira IJC. Two New Indole Alkaloids from *Tabernaemontana hystrix* Steud. (Apocynaceae). *Helvetica Chimica Acta*. 2010; 93(3):422-9.
15. Monnerat CS, Souza JJ, Mathias L, Braz-Filho R, Vieira IJC. A new indole alkaloid isolated from *Tabernaemontana hystrix* Steud (Apocynaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2005; 16(6B):1331-5.
16. Figueiredo ER, Vieira IJC, Souza JJ, Braz-Filho R, Mathias L, Kanashiro MM, et al. Isolamento, identificação e avaliação da atividade antileucêmica de alcaloides indólicos monoterpênicos de *Tabernaemontana salzmannii* (A. DC.), Apocynaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2010; 20(1):75-81.
17. Medeiros WLB, Vieira IJC, Mathias L, Braz-Filho R, Schripsema J. A new natural quaternary indole alkaloid isolated from *Tabernaemontana laeta* Mart.(Apocynaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2001; 12(3):368-72.
18. Cava MP, Tjoa SS, Ahmed QA, Rocha AI. Alkaloids of *Tabernaemontana riedelii* and *T. rigida*. *The Journal of Organic Chemistry*. 1968; 33(3):1055-9.
19. Veronese ELG, Esmeraldino LE, Trombone APF, Santana AE, Bechara GH, Kettelhut I, et al. Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops jararacussu* venom and its two major myotoxins, BthTX-I and BthTX-II, by the aqueous extract of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC.(Apocynaceae). *Phytomedicine*. 2005; 12(1):123-30.
20. Soares DC, Pereira CG, Meireles MAA, Saraiva EM. Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. *Parasitology International*. 2007; 56(2):135-9.
21. Pereira PS. Estudo fitoquímico e biotecnológico de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC.(Apocynaceae). Ribeirão Preto: Universidade do Estado de São Paulo (USP); 1999.
22. Pereira CG, Rosa PTV, Meireles MAA. Extraction and isolation of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* A. DC: Technical and economical analysis. *The Journal of supercritical fluids*. 2007; 40(2):232-8.
23. Pereira PS, de C. Franca S, de Oliveira PVA, de S. Breves C, Pereira SIV, Sampaio SV, et al. Chemical constituents from *Tabernaemontana catharinensis* root bark: a brief NMR review of indole alkaloids and in vitro cytotoxicity. *Química Nova*. 2008; 31(1):20.
24. Pereira CG, Leal PF, Sato DN, Meireles MAA, editors. SFE of pharmacological compounds from *Tabernaemontana catharinensis*: analysis of the antioxidant and antimycobacterial activities. 6th International Symposium on Supercritical Fluids; 2003; Versailles: International Society for Advancement of Supercritical Fluids.
25. Moreira FF, Mendonça CB, Pereira JF, Gonçalves-Esteves V. Palinotaxonomia de espécies de Apocynaceae ocorrentes na restinga de Carapebus, Carapebus, RJ, Brasil. *Acta Botanica brasileira*. 2004; 18(4):711-21.

26. Pereira CG, Leal PF, Sato DN, Meireles MAA. Antioxidant and antimycobacterial activities of *Tabernaemontana catharinensis* extracts obtained by supercritical CO₂ + cosolvent. *Journal of medicinal food*. 2005; 8(4):533-8.
27. Medeiros M, Prado L, Fernandes V, Figueiredo S, Coppede J, Martins J, et al. Antimicrobial activities of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis*. *Natural product communications*. 2011; 6(2):193.
28. Piana M, Frohlich JK, Boligon AA, Brum TF, Zandra M, Froeder ALF, et al., editors. Doseamento de flavonóides nos frutos de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. Xv Simpósio de Ensino, Pesquisa e Extensão: Educação e Ciência na era digital; 2011; São Paulo: Universidade São Francisco.
29. Janning D, Albuquerque CAC, Barauna SC. Avaliação preliminar do extrato hidroalcoólico de *Tabernaemontana catharinensis* no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos (*Rattus norvegicus*). *Revista Eletrônica de Farmácia*. 2011; 8(3):53-64.
30. Guida A, Battista G, Bargardi S. The antibacterial activity of alkaloids obtained from *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. *Ars Pharmaceutica*. 2003; 44(2):167-73.
31. Gonçalves DM, Araújo JH, Francisco MS, Coelho MA, Franco JM. Evaluation of in vitro antimicrobial activity of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. extract. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2011; 13(2):197-202.
32. GOMES RC, NETO AC, MELO VL, FERNANDES VC, DAGRAVA G, SANTOS WS, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Tabernaemontana catharinensis*. *Pharmaceutical Biology*. 2009; 47(4):372-6.
33. Almeida L, Cintra ACO, Veronese ELG, Nomizo A, Franco JJ, Arantes EC, et al. Anticrotalic and antitumoral activities of gel filtration fractions of aqueous extract from *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2004; 137(1):19-27.
34. Castro KNC. Avaliação funcional e estrutural hepática e comportamental de ratos inoculados com o veneno da cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) e/ou tratados com o extrato do leiteiro (*Tabernaemontana catharinensis*). Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista; 1999.
35. Boligon AA, Schwanz TG, Piana M, Bandeira RV, Frohlich JK, Brum TF, et al. Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. leaves. *Natural Products Research*. 2012:1-4 iFirst.
36. Bélo M, Barbosa J, Pereira P, Bertoni B, Zingaretti S, Belebony R. Evaluation of insecticidal effects of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC.(Apocynaceae) and *Zeyheria montana* Mart.(Bignoniaceae) extracts against the fly *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae)(Gupta, 1970). *Revista Brasileira de Biociências*. 2009; 7(3):235-9.
37. ASDM Sonoran Desert Digital Library (www.desertmuseumdigitallibrary.org/) [database on the Internet]. Arizona-Sonora Desert Museum 2012.

38. Roman AL, Santos JUM. The importance of medicinal plants for the Algodual fishing community. *Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi Ciencias Naturais*. 2006; 1(1):69-80.
39. Mascarenhas REB, Modesto Junior MS, Dutra S, Souza Filho APS, Teixeira Neto JF. Plantas daninhas de uma pastagem cultivada de baixa produtividade no Nordeste Paraense. *Planta Daninha*. 1999; 17(3):399-418.
40. Rates SMK, Cauduro AD, Salazar V, Moreno PRH, Henriques AT. Alcalóides indólicos em *Peschiera australis* (Muell.Arg.) Miers var. *australis*. *Caderno de Farmácia*. 1988; 4(1/2):51-62.
41. Moro MF, Castro ASF, Araujo FS. Floristic composition and phytosociological structure of an urban savannic vegetation fragment in the pre-litorean plains of Fortaleza, Ceara. *Rodriguesia*. 2011; 62(2):407-23.
42. Pinto Sobrinho FA, Christo AG, Guedes-Bruni RR. Fitossociologia do componente arbóreo num remanescente de floresta ombrófila densa submontana limítrofe à Reserva biológica do Tinguá, Rio de Janeiro. *Floresta*. 2010; 40(1):111-24.
43. Nascimento MT, Souza TP. III Relatório Mensal sobre as entrevistas com produtores sobre o uso das plantas na microbacia de Sata Maria (São José de Ubá) e avaliação da flora nas áreas de intervenção. Campos: Rio Rural/GEF2010.
44. Ingkaninan K, Changwijit K, Suwanborirux K. Vobasinyl-iboga bisindole alkaloids, potent acetylcholinesterase inhibitors from *Tabernaemontana divaricata* root. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2006; 58(6):847-52.
45. Perera P, Sandberg F, Van Beek TA, Verpoorte R. Alkaloids of stem and rootbark of *Tabernaemontana dichotoma*. *Phytochemistry*. 1985; 24(9):2097-104.
46. Taesotikul T, Panthong A, Kanjanapothi D, Verpoorte R, Scheffer J. Cardiovascular activity of the crude alkaloidal fraction from *Tabernaemontana pandacaqui* in the rat. *Journal of Ethnopharmacology*. 1998; 59(3):131-7.
47. Muñoz V, Moretti C, Sauvain M, Caron C, Porzel A, Massiot G, et al. Isolation of Bis-Indole Alkaloids with Antileishmanial and Anti-bacterial Activities from *Perschiera van heurkii* (Syn. *Tabernaemontana van heurkii*). *Planta medica*. 1994; 60(5):455-9.
48. Cardoso CAL, Vilegas W. Droplet counter-current chromatography of indole alkaloids from *Tabernaemontana hilariana*. *Phytochemical Analysis*. 1999; 10(2):60-3.
49. Cardoso CAL, Vilegas W, Honda NK. Qualitative determination of indole alkaloids, triterpenoids and steroids of *Tabernaemontana hilariana*. *Journal of Chromatography A*. 1998; 808(1-2):264-8.
50. Cardoso CAL, Vilegas W, Pozetti G. Gas Chromatographic analysis of indole alkaloids from *Tabernaemontana hilariana*. *Journal of Chromatography A*. 1997; 788:204-6.

51. Rates SMK, Schapoval EES, Souza L, Henriques AT. Chemical constituents and pharmacological activities of *Peschiera australis*. *Pharmaceutical Biology*. 1993; 31(4):288-94.
52. Spitzer V, Rates SMK, Henriques AT, Marx F. The fatty acid composition of the seed oil of *Peschiera australis* (Apocynaceae). *Lipid/Fett*. 1995; 97(9):334-5.
53. Lemos TLG, Andrade CHS, Guimarães AM, Wolter-Filho W, Braz-Filho R. 19-Epivoacristine, an iboga alkaloid isolated from *Peschiera affinis*. *J BrazChem Soc*. 1996; 7(2):123-6.
54. Santos AK, Machado LL, Bizerra AM, Monte FJ, Santiago GM, Braz-Filho R, et al. New indole alkaloid from *Peschiera affinis* (Apocynaceae). *Natural product communications*. 2012; 7(6):729.
55. Wolter Filho W, Andrade CHS, Braz Filho R, Abreu Matos FJ. Alkaloids de *Peschiera affinis* (Muell.Arg.) Miers (Apocynaceae). *ACTA AMAZÔNICA*. 1985; 15(1-2):193-7.
56. Pereira PS, Castro França S, Oliveira PVA, Souza Breves CM, Pereira SIV, Sampaio SV, et al. Chemical constituents from *Tabernaemontana catharinensis* root bark: a brief NMR review of indole alkaloids and in vitro cytotoxicity. *Quím Nova*. 2008; 31(1):20-4.
57. Batina MFC, Cintra ACO, Veronese ELG, Lavrador MAS, Giglio JR, Pereira PS, et al. Inhibition of the lethal and myotoxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom by *Tabernaemontana catharinensis*: Identification of one of the active components. *Planta Medica*. 2000; 66(5):424-8.
58. Andrade MT, Lima JA, Pinto AC, Rezende CM, Carvalho MP, Epifanio RA. Indole alkaloids from *Tabernaemontana australis* (Müell. Arg) Miers that inhibit acetylcholinesterase enzyme. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2005; 13(12):4092-5.
59. Assis CM, Moreno PRH, Young MCM, Campos IP, Suffredini IB. Isolation and evaluation of the biological activity related to the major alkaloids in *Tabernaemontana angulata* Mart. ex Müll. Arg., Apocynaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2009; 19(2B):626-31.
60. Van Beek TA, Lankhorst PP, Verpoorte R, Massiot G, Fokkens R, Erkelens C, et al. Monogagine, a novel dimeric indole alkaloid from *Tabernaemontana chippii* and *Tabernaemontana dichotoma*. *Zeitschrift für Naturforschung Teil b, Anorganische Chemie, organische Chemie*. 1985; 40(5):693-701.
61. Achenbach H. 10-oxo-cylindrocarpidin, a new alkaloid from *Tabernaemontana amygdalifolia*. *Tetrahedron letters*. 1967; 19:1793-7.
62. Perera P, Sandberg F, Van Beek TA, Verpoorte R. Tertiary indole alkaloids from fruits of *Tabernaemontana dichotoma*. *Planta medica*. 1984; 50(03):251-3.
63. Zaima K, Koga I, Iwasawa N, Hosoya T, Hirasawa Y, Kaneda T, et al. Vasorelaxant activity of indole alkaloids from *Tabernaemontana dichotoma*. *Journal of Natural Medicines*. 2012; 67(1):9 - 16.

64. Hwang B, Weisbach B, Douglas B, Raffaut R. The alkaloids of *Peschiera lundii* (D.C.) Miers. Isolation and structure elucidation of voacristine, pseudoindoxyl and iboxygaine hydroxyindolenine. *The Journal of Organic Chemistry*. 1969; 34(2):412-5.
65. Achenbach H, Benirschke M, Torrenegra R. Alkaloids and other compounds from seeds of *Tabernaemontana cymosa*. *Phytochemistry*. 1997; 45(2):325-35.
66. Azoug M, Loukaci A, Richard B, Nuzillard JM, Moreti C, Zèches-Hanrot M, et al. Alkaloids from stem bark and leaves of *Peschiera buchtieni*. *Phytochemistry*. 1995; 39(5):1223-8.
67. Burnell RH, Medina JD. Alkaloids of *Tabernaemontana psychotrifolia* HBK. *Canadian Journal of Chemistry*. 1971; 49(2):307-16.
68. You M, Ma X, Mukherjee R, Farnsworth N, Cordell GA, Kinghorn D, et al. Indole alkaloids from *Peschiera laeta* that enhance vinblastine-mediated cytotoxicity with multidrug-resistant cells. *Journal of Natural Products*. 1994; 57(11):1517-22.
69. Votický Z, Jahodář L, Cava MP. Alkaloids from *Peschiera laeta* Mart. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 1977; 42(4):1403-6.
70. Vieira IJC, Medeiros WLB, Monnerat CS, Souza JJ, Mathias L, Braz-Filho R, et al. Two fast screening methods (GC-MS and TLC-ChEI assay) for rapid evaluation of potential anticholinesterasic indole alkaloids in complex mixtures. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2008; 80(3):419-26.
71. Damak M, Ahond A, Doucerain H, Riche C. Bonafousine, a novel dimeric indole alkaloid: X-ray crystal structure. *J Chem Soc, Chem Commun*. 1976; (13):510-1.
72. Kan C, Husson HP, Jacquemin H, Kan SK, Lounasmaa M. Structural determination by NMR of ¹H at 400 MHz: alkaloids of *Tabernaemontana albiflora*. *Tetrahedron Letters*. 1980; 21(1):55-8.
73. Kan C, Husson HP, Kan SK, Lounasmaa M. Détermination de Structures par RMN du H à 400 MHz: Albifloranine, un Nouvel Alcaloïde de *Tabernaemontana albiflora*. *Planta Med*. 1981; 41(1):72-4.
74. Patel MB, Thompson L, Miet C, Poisson J. Alcaloïdes de *Tabernaemontana brachyantha*. *Phytochemistry*. 1973; 12(2):451-6.
75. Niemann C, Kessel JW. The Isolation of Rupicoline and Montanine, Two Pseudoindoxyl Alkaloids of *Tabernaemontana rupicola* Benth. 1a. *The Journal of Organic Chemistry*. 1966; 31(7):2265-9.
76. Kessel JW. I. The isolation and structure of two alkaloids from *Tabernaemontana rupicola*. II. The structure of necrosamine: California Institute of Technology; 1963.
77. Achenbach H, Schaller E. Alkaloide in *Tabernaemontana*-Arten, V. Accedin und N-(a)-Methyl-epi-affinin, zwei neue Alkaloide aus *Tabernaemontana accedens*. *Chemische Berichte*. 1975; 108(12):3842-54.

78. Torrenegra R, Pedrozo JAP, Achenbach H, Bauereifl P. Alkaloids of *Stemmadenia grandiflora*. *Phytochemistry*. 1988; 27(6):1843-8.
79. Nielsen HB, Hazell A, Hazell R, Ghia F, Torrsell KBG. Indole alkaloids and terpenoids from *Tabernaemontana markgrafiana*. *Phytochemistry*. 1994; 37(6):1729-35.
80. Bruneton J, Cave A, Moretti C. Etude de deux esphces de *Tabernaemontana* de la Guyane. *Fitoterapia*. 1979; 3(2):123-6.
81. Cardoso CAL, Vilegas W, Pozetti GL. Gas chromatographic analysis of indole alkaloids from *Tabernaemontana hilariana*. *Journal of Chromatography A*. 1997; 788(1-2):204-6.
82. Santos AKL, Magalhães TS, Monte FJQ, Mattos MCd, Oliveira MCFd, Almeida MMB, et al. Alcaloides iboga de *Peschiera affinis* (Apocynaceae) - Atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono: atividade antioxidante. *Química Nova*. 2009; 32:1834-8.
83. De las Heras B, Slowing K, Benedí J, Carretero E, Ortega T, Toledo C, et al. Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*. 1998; 61(2):161-6.
84. Alves LL, Oliveira PVA, França SC, Alves PLC, Pereira PS. Atividade alelopática de extratos aquosos de plantas medicinais na germinação de *Lactuca sativa* L. e *Bidens pilosa* L. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2011; 13(3):328-36.
85. Weniger B, Robledo S, Arango GJ, Deharo E, Aragón R, Munoz V, et al. Antiprotozoal activities of Colombian plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001; 78:193-200.
86. Delorenzi JC, Freire-de-Lima L, Gattass CR, Andrade Costa D, He L, Kuehne ME, et al. In vitro activities of iboga alkaloid congeners coronaridine and 18-methoxycoronaridine against *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*. 2002; 46(7):2111-5.
87. Girardot M, Deregnaucourt C, Deville A, Dubost L, Joyeau R, Allorge L, et al. New vobasinyl-iboga bisindole alkaloids with antiparasitic activities from *Muntauara sessilifolia*. *Planta medica*. 2011; 77(12):PL55.
88. Gunasekera SP, Cordell G, Farnsworth NR. Anticancer indole alkaloids of *Ervatamia heyneana*. *Phytochemistry*. 1980; 19(6):1213-8.
89. Meschini S, Marra M, Calcabrini A, Federici E, Galeffi C, Arancia G. Voacamine, a bisindolic alkaloid from *Peschiera fuchsiaefolia*, enhances the cytotoxic effect of doxorubicin on multidrug-resistant tumor cells. *International journal of oncology*. 2003; 23(6):1505-13.
90. Meschini S, Condello M, Calcabrini A, Marra M, Formisano G, Lista P, et al. The plant alkaloid voacamine induces apoptosis-independent autophagic cell death on both sensitive and multidrug resistant human osteisarcoma cells. *Autophagy*. 2008; 4(8):1020-33.

91. Kim Y, Jung HJ, Kwon HJ. A natural small molecule voacangine inhibits angiogenesis both in vitro and in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011; 417(1):330-4.
92. Ramos DF, Leitão GG, Costa FN, Abreu L, Villarreal JV, Leitão SG, et al. Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the Brazilian Atlantic Forest. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2008; 44(4):669-74.
93. Zacchino S, Santecchia C, López S, Gattuso S, Muñoz JD, Cruaños A, et al. In vitro antifungal evaluation and studies on mode of action of eight selected species from the Argentine flora. *Phytomedicine*. 1998; 5(5):389-95.
94. Perera P, Kanjanapothi D, Sandberg F, Verpoorte R. Screening for biological activity of different plant parts of *Tabernaemontana dichotoma*, known as divi kaduru in Sri Lanka. *Journal of Ethnopharmacology*. 1984; 11(2):233-41.
95. Van Beek TA, Verpoorte R, Svendsen AB, Fokkens R. Antimicrobially active alkaloids from *Tabernaemontana chippii*. *Journal of Natural Products*. 1985; 48(3):400-23.
96. Fonseca TL, Von Groll A, Leitão GG, Scaini CJ, Ramos DF, Silva PEA. Atividade antimicobacteriana de extratos vegetais frente a *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium malmoense*. *Vitalle*. 2008; 20(1):65-71.
97. Andrade MT, Lima JA, Pinto AC, Rezende CM, Carvalho MP, Epifanio RA. Indole alkaloids from *Tabernaemontana australis* (Muell. Arg) Miens that inhibit acetylcholinesterase enzyme. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2005; 13(12):4092-5.
98. Alper K, Reith MEA, Sershen H. Ibogaine and the inhibition of acetylcholinesterase. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012; 139(3):879-82.
99. Batina MF, Cintra AC, Veronese EL, Lavrador MA, Giglio JR, Pereira PS, et al. Inhibition of the lethal and myotoxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom by *Tabernaemontana catharinensis*: identification of one of the active components. *Planta Medica*. 2000; 66(5):424-8.
100. Boni AP, Zeni ALP, Albuquerque CAC. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Tabernaemontana catharinensis* em camundongos inoculados experimentalmente com veneno botrópico. *Brazilian Journal of Pharmacy*. 2011; 92(3):176-85.
101. Perera P, Kanjanapothi D, Sandberg F, Verpoorte R. Muscle relaxant activity and hypotensive activity of some *Tabernaemontana* alkaloids. *Journal of Ethnopharmacology*. 1985; 13(2):165-73.
102. Morelos CSM, Carrascal MM, Pájaro GY, Gómez EH. Actividad larvívica de extractos etanólicos de *Tabernaemontana cymosa* y *Trichilia hirta* sobre larvas de estadio III y IV de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2012; 17(3):256-67.
103. Wagner H, Bladt S. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas.*: Springer; 1996.

104. Duarte DS, Dolabela MF, Salas CE, Raslan DS, Oliveiras AB, Nenninger A, et al. Chemical Characterization and Biological Activity of *Macfadyena unguis-cati* (Bignoniaceae). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2000; 52(3):347-52.
105. Lin JY, Tang CY. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*. 2007; 101(1):140-7.
106. Aquino DD, Silva RBLD, Gomes VF, Araújo ECD. Nível de conhecimento sobre riscos e benefícios do uso de plantas medicinais e fitoterápicos de uma comunidade do Recife-PE. *Revista de Enfermagem da UFPE On Line*. 2007; 1(1):107-10.
107. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E1. *Analytical Biochemistry*. 1999; 269:337-41.
108. Tepes B, Sokmen M, Akpulat HA, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A. Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. *Journal of Food Engineering*. 2005; 66:447-54.
109. Duarte-Almeida JM, Santos RJ, Fenovese MI, Lajolo FM. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema B-caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. *Ciencia Tecnologia Alimentar*. 2006; 26(2):446-52.
110. Lenfant F, Lahet JJ, Vergely C, Volot F, Freysz M, Rochette L. Lidocaine inhibits potassium efflux and hemolysis in erythrocytes during oxidative stress in vitro. *General Pharmacology*. 2000; 34(3):193-9.
111. (OECD) Ofecad. Guideline for Testing of Chemicals: OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Guideline 423. Paris: Organization for economic cooperation and development (OECD); 2001.
112. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*. 1982; 45(5):31-4.
113. Junqueira L, Junqueira L, editors. Técnicas básicas de citologia e histologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1993.
114. NCCLS, editor. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved Standard (NCCLS document M2-A8). 8 ed: Wayne; 2003.
115. NCCLS, Institute) CaLS, editors. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standart. NCCLS document M7-A6. Pennsylvania: Wayne; 2003.
116. Valgas C, Souza SMd, Smânia EFA, Smânia JR A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2007; 38:269-80.

117. Brasileiro BG, Pizziolol VR, Raslanll DS, Jamall CM, Silveira D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 2006; 42(2).
118. Ferreira GA, Borghetti F. Germinação: do básico ao aplicado. Ferreira A, Borghetti F, editors. Porto Alegre: Artmed; 2004.
119. Greene GL, Leppla NC, Dickerson WA. Velvetbean Caterpillar: A Rearing Procedure and Artificial Medium. Journal of Economic Entomology. 1976; 69(4):487-8.
120. Pellow S, Chopin P, File S, Briley M. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat journal of Neuroscience Methods. 1985; 14(3):149-67.
121. Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, Defence and the Elevated Plus-maze. Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 1997; 21(6):801-10.
122. Kraus JE, Arduin M, editors. Manual Básico de métodos em morfologia vegetal. Rio de Janeiro: Edur; 1997.
123. Dop P, Gautié A, editors. Manuel de technique botanique. 2 ed. Paris: Lamare; 1928.
124. Silverstein R, Bassler C, Morril T. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Rio de janeiro: Guanabara 2000.
125. Balestrin L. Estudo Fitoquímico e Avaliação das atividades alelopática, antibacteriana e antioxidante de *Dorstenia multiformis* MIQUEL (Moraceae). . Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2006.
126. Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. Analytica Chimica Acta. 2008; 613(1):1-19.
127. Van Der Heijden R, Verpoorte R. Studies in Natural Products Chemistry — Structure Elucidation (Part B). Atta-Ur-Rahman, editor. Amsterdam: Elsevier; 1989.
128. Liu X, Ardo S, Marisa B, John P, Zhou K, Stushnoff C, et al. Total phenolic content and DPPHd radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Colorado. LWT - Food Science and Technology. 2007; 40(3):552-7.
129. Kahkonen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha J-P, Pihlaja K, Kujala TS, et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1999; 47(10):3954-62.
130. Djeridane A, Yousfi M, Nadjeml B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chemistry. 2006; 97(4):654-60.
131. Angelo PM, Jorge N. Phenolic compounds in foods – A brief review. Revista do Instituto Adolfo Lutz. 2007; 66(1):232-40.

132. Soares LAL, Bassani VL, Ortega GG, Petrovick PR. Total Flavonoid Determination for the Quality Control of Aqueous Extractives from *Phyllanthus niruri* L. Latin American Journal of Pharmacy. 2003; 22(3):203-7.
133. Huang D, Ou B, Prior RL. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005; 53(6):1841-56.
134. Delorenzi JC, Attias M, Gattass CR, Andrade M, Rezende C, Cunha Pinto A, et al. Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2001; 45(5):1349-54.
135. Andrade CA, Peitz C, Cúnico M, Carvalho JLS, Abrahão WM, Miguel OG, et al. Avaliação da atividade antibacteriana e triagem fitoquímica das flores de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don Leguminosae- Mimosoideae. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2005; 15(1):13-5.
136. Jain S, Jain A, Jain N, Jain D, Balekar N. Phytochemical investigation and evaluation of in vitro free radical scavenging activity of *Tabernaemontana divaricata* Linn. Natural Products Research. 2010; 24(3):300-4.
137. Wagner DDM, Burton GW, Ingold KU. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum Clinical Chemistry. 1985; 44:1309-15.
138. Valadares MC. Avaliação de Toxicidade aguda: estratégias após a "era do teste de DL50". REvista BRasileira de Farmácia. 2006; 3(2):93 - 8.
139. (OECD) OfECaD. Guideline for Testing of Chemicals: OECD 420. Acute Oral Toxicity-Fixed dose procedure. In: development Ofeca, editor. Paris: Organization for economic cooperation and development; 2001.
140. (OECD) OfECaD. Guideline for Testing of Chemicals: OECD 425. Acute Oral Toxicity-Modified Up and Down Procedure. . In: Development OfECa, editor. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development; 2001.
141. Kuete V, Manfouo R, Beng V. Toxicological evaluation of the hydroethanol extract of *Tabernaemontana crassa* (Apocynaceae) stem bark. Journal of Ethnopharmacology. 2010; 130(3):470 - 6.
142. Uwumarongie H, Onwukaeme D. Pharmacognostic and toxicity evaluation of the stem bark of *Tabernaemontana pachysiphon* Stapf. (Apocynaceae). Nigerian Journal of Pharmaceutical Research. 2011; 91(1):63 - 71.
143. Brito M, Oliveira R, Silveira E, Reis J, Noguchi A, Epaminondas W, et al. Aspectos microscópicos do fígado de ratos após administração do óleo de copaíba. Acta Cirurgica Brasileira. 2000; 15(2):29 - 93.
144. Melo DSd, Corrêa AD, Marcos FCA, Sousa RVd, Abreu CMPd, Santos CDd. Efeitos da farinha de folhas de mandioca sobre a atividade das enzimas AST, ALT, FA e lipídios hepáticos de ratos Wistar. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2008; 28:32-7.

145. Sousa A, Soto-Blanco B, Guerra J, ET K, SL G. Does prolonged oral exposure to cyanide promote hepatotoxicity and nephrotoxicity? *Toxicology*. 2002; 174(2):87 - 95.
146. Mariz S, Araújo N, Cerqueira G, Araújo W, Duarte J, Melo Diniz M, et al. Avaliação histopatológica em ratos após tratamento agudo com o extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. . *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008; 18(2):213 - 6.
147. Montgomery KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *Journal of Comparative Physiology and Psychology*. 1955; 48:254-60.
148. Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoreceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of "fear " -motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1984; 327:1-5.
149. Aragão GF, Carneiro LM, Junior AP, Vieira LC, Bandeira PN, Lemos TL, et al. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2006; 85(4):827-34.
150. Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse *Psychopharmacology*. 1987; 92(2):180-5.
151. Rauppa IM, Serenikia A, Virtuoso S, Ghislandia C, Cavalcanti; Silva EL, Trebiend HA, et al. Anxiolytic-like effect of chronic treatment with *Erythrina velutina* extract in the elevated plus-maze test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008; 118:295-9.
152. Aguirre-Hernández E, Rosas-Acevedo H, Soto-Hernández M, Martínez AL, Moreno J, Gonzáles-Trujano ME. Bioactivity-guided isolation of beta-sitosterol and some fatty acids as active compounds in the anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* var. mexicana. *Planta Medica*. 2007; 73(11):1148 - 55.
153. Hogg S. A Review of the Validity and Variability of the Elevated Plus-Maze as an Animal Model of Anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1996; 54(1):21-30.
154. Ferreira A, Aquila MED. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 2000; 12:175-204.
155. Pires NM, Oliveira VR. Alelopatia. In: Oliveira Junior RS, Constantin J, Inoue MH, editors. *Biologia e manejo de plantas daninhas*. Curitiba: Omnipax; 2011.
156. Aguiar Menezes EL, editor. *Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia; 2005.
157. Roel AR, Vendramim JD, Frighetto RTS, Frighetto N. Efeito do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivência da lagarta-do-cartucho. *Bragantia*. 2000; 59(1):53 - 8.
158. Pasini A, Parra JRP, Lopes JM. Dieta artificial para criação de *Doru luteipes* (Scudder) (Dermaptera: Forficulidae), predador da lagarta-do-cartucho do milho,

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepdoptera: Noctuidae). Neotropical Entomology. 2007; 36(2):308 - 11.

159. Gallo D, Nakano O, Silveira NETO S, Carvalho RPL, Baptista GC, Berti Filho E, et al. Entomologia agrícola. Pircicaba: FEALQ; 2002.

160. Gazzoni DL, Hulsmeyer A, Hoffmannn-Campo CB. Efeito de diferentes doses de rutina e de quercetina na biologia de *Anticarsia gemmatalis*. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 1997; 32(7):673 - 81

161. Mathivanan T, Govindarajan M, Elumalai K, Krishnappa K, Ananthan A. Mosquito larvicidal and phytochemical properties of *Ervatamia coronaria* Stapf. (Family: Apocynaceae). Journal of Vetor Borne Diseases. 2010; 47(3):178 - 80.

162. Govindarajan M, Mathivanan T, Elumalai K, Krishnappa K, Anandan A. Mosquito larvicidal, ovicidal and repellent properties of botanical extracts against *Anoplheles stephensi*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: culicidae) Parasitology Research. 2011; 109(2):353-67.

163. Schripsema J, Dagnino D, Gosmann G. Alcalóides indólicos. Farmacognosia: da planta ao medicamento Porto Alegre: UFRGS; 2003. p. 819-46.