



Universidade
Estadual de Goiás



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CÂMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E
TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *Stricto sensu* EM
CIÊNCIAS MOLECULARES

***Odontadenia lutea* (Vell.) Markgr.
(APOCYNACEAE): fitoquímica, citotoxicidade e
ação inseticida das folhas**

WEBER MARTINS DA SILVA JUNIOR

ANÁPOLIS – GO
2018

WEBER MARTINS DA SILVA JUNIOR

***Odontadenia lutea* (Vell.) Markgr.
(APOCYNACEAE): fitoquímica, citotoxicidade e
ação inseticida das folhas**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Área de concentração: Química.

Orientador: Dr. Antônio Carlos Severo Menezes

Anápolis – GO
2018

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

SS1586o Silva Junior, Weber Martins da
Odontadenia lutea (Vell.) Markgr. (Apocynaceae): fitoquímica,
citotoxicidade e ação inseticida das folhas / Weber Martins da Silva
Junior; orientador Antônio Carlos Severo Menezes. -- Anápolis, 2018.
86 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação Mestrado
Acadêmico em Ciências Moleculares) -- Câmpus-Anápolis CET,
Universidade Estadual de Goiás, 2018.

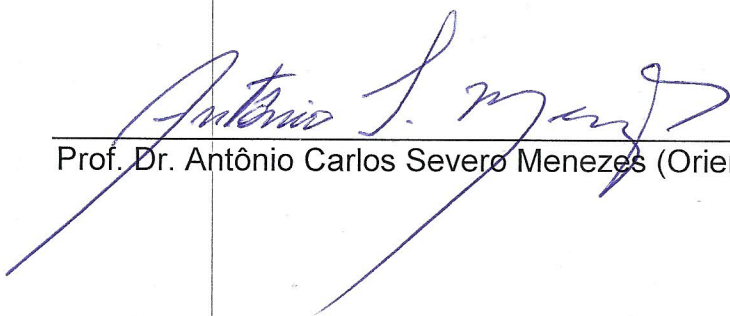
1. Atividade inseticida. 2. Formigas cortadeiras. 3. Células tumorais.
4. Fitoquímico. 5. Monogalactosilmonoacilglicerol. I. Menezes, Antônio
Carlos Severo, orient. II. Título.

***Odontadenia lutea* (VELL.) MARKGR. (APOCYNACEAE): FITOQUÍMICA,
CITOTOXICIDADE E AÇÃO INSETICIDA DAS FOLHAS**

WEBER MARTINS DA SILVA JUNIOR

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências Moleculares do Campus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo, da Universidade Estadual de Goiás, apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.


Aprovada em 27/03/2018 por:



Prof. Dr. Antônio Carlos Severo Menezes (Orientador/UEG)



Prof. Dra. Joëlma Abadia Marciano de Paula (UEG)



Prof. Dra. Maísa Borges Costa (UEG)

ANÁPOLIS – GO

Dedico este trabalho aos meus pais, meu irmão e minha namorada, pela confiança, apoio, estímulo, carinho e principalmente compreensão durante seu desenvolvimento.

AGRADECIMENTOS

- ✓ Primeiramente a Deus, pelas constantes lições e conquistas;
- ✓ Ao professor Dr. Antônio Carlos Severo Menezes pela oportunidade e orientação durante a realização da pesquisa;
- ✓ Aos professores da Universidade Estadual de Goiás pela solicitude e dedicação;
- ✓ À professora Dr^a. Mirley Luciene dos Santos pela identificação da espécie.
- ✓ Ao Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará e aos professores Dr. Manoel Odorico de Moraes, Dr^a. Cláudia do Ó Pessoa e a doutoranda Andréa Felinto Moura pela colaboração com a realização dos bioensaios de citotoxicidade;
- ✓ Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais da Universidade Estadual Paulista e ao professor Dr. Odair Correa Bueno pela colaboração com a realização dos bioensaios de toxicidade contra *Atta sexdens rubropilosa*;
- ✓ Ao Laboratório de RMN do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, pela colaboração na realização dos experimentos de RMN 1D e 2D;
- ✓ Ao Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de massas do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, pela colaboração na realização dos experimentos de EM-IES;
- ✓ Aos meus companheiros de laboratório pela parceria e auxílio na realização de várias etapas dessa pesquisa;
- ✓ Aos meus pais que sempre acreditaram, apoiaram e me incentivaram na busca e realização dos meus objetivos pessoais e profissionais;
- ✓ À minha namorada e meu irmão pela força, compreensão e contribuições para a escrita deste texto;
- ✓ A todos meus amigos e colegas que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho;
- ✓ À UEG e CAPES pelo apoio financeiro.

*Deus colocou as
melhores coisas da
vida do outro lado do
medo (Will Smith).*

RESUMO

A investigação de bioatividade de produtos naturais provenientes das plantas encontradas no Cerrado pode contribuir, significativamente, para a saúde pública do país. Este trabalho objetivou isolar e identificar os compostos bioativos das folhas de *Odontadenia lutea* (Vell.) Markgr., avaliar a atividade citotóxica *in vitro* do extrato, frações e compostos isolados em linhagens de células tumorais HL-60, PC-3 e HCT-116 e avaliar a atividade inseticida *in vitro* do extrato e frações em formigas operárias *Atta sexdens rubropilosa*. O isolamento dos constituintes químicos foi realizado por meio de técnicas cromatográficas e a elucidação estrutural por técnicas de IV, RMN 1D, 2D e EM-IES. O potencial citotóxico sobre as linhagens de células tumorais foi avaliado pelo método MTT. A atividade inseticida foi verificada através da porcentagem de mortalidade e a sobrevivência mediana das formigas após a ingestão diária dos compostos teste por 25 dias. A fração hexânica (OLFEH) forneceu a mistura T-1, na qual foram identificados α -amirina, β -amirina e lupeol. Rutina foi isolada a partir da fração metanólica e acetato-etílica. A fração metanólica ainda forneceu o 3-O-(9,12,15-octadecatrienoil)- β -D-galactopiranosil glicerol e os ácidos linolênico e palmítico. Os compostos testados foram atóxicos contra HCT-116 e HL-60. Sobre PC-3, o extrato bruto etanólico (OLFE), as frações diclorometânica (OLFED), acetato-etílica (OLFEA) e metanólica (OLFEM) à 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e a rutina à 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ exibiram baixa toxicidade, enquanto OLFEH à 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi moderadamente tóxico, exibiu porcentagem de inibição do crescimento celular igual a 52,08%. Na avaliação da atividade inseticida, somente houve mortalidade expressiva ao término dos tratamentos com OLFEH, os demais não exibiram 100% de mortalidade em nenhuma das concentrações testadas. OLFEH à 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ diminuiu a sobrevivência mediana das formigas de dezesseis para seis dias, houve mortalidade de 98% já no 14º dia e 100% ao término do experimento. As substâncias rutina, β -amirina, 3-O-(9,12,15-octadecatrienoil)- β -D-galactopiranosil glicerol, ácido linolênico e ácido palmítico são relatados pela primeira vez para o gênero *Odontadenia*. Sugere-se que T-1 contribua para a moderada atividade citotóxica de OLFEH sobre PC-3. Sugere-se que T-1 também contribua para a atividade inseticida de OLFEH em *A. sexdens rubropilosa*. A fração hexânica das folhas de *O. lutea* pode ser uma fonte em potencial para o isolamento de substâncias com atividade inseticida em *A. sexdens rubropilosa*.

Palavras-chave: Atividade inseticida, Formigas cortadeiras, Células tumorais, Fitoquímico, Monogalactosilmonoacilglicerol.

ABSTRACT

Bioactivity research on natural products from plants found in the Cerrado can contribute significantly to the country's public health. This work aimed to isolate and identify the bioactive compounds of the leaves of *Odontadenia lutea* (Vell.) Markgr., to evaluate the *in vitro* cytotoxic activity of the extract, fractions and isolated compounds in HL-60, PC-3 and HCT-116 tumor cell lines and to evaluate the *in vitro* insecticidal activity of the extract and fractions on worker ants *Atta sexdens rubropilosa*. The chemical constituents were isolated by chromatographic techniques and the structural elucidation by IR, 1D and 2D NMR and ESI-MS techniques. The cytotoxic potential on tumor cell lines was evaluated by the MTT method. The insecticidal activity was verified by the percentage of mortality and the median survival of the ants after the daily intake of the test compounds for 25 days. The hexane fraction (OLFEH) provided the T-1 mixture, in which α -amyrin, β -amyrin and lupeol were identified. Rutin was isolated from the methanolic and ethyl acetate fractions. The methanolic fraction still provided 3-O-(9,12,15-octadecatrienoyl)-glyceryl- β -D-galactopyranoside and linolenic and palmitic acids. The compounds tested were non-toxic against HCT-116 and HL-60. The crude ethanolic extract (OLFE), dichloromethane (OLFED), ethyl acetate (OLFEA) and methanolic (OLFEM) fractions at 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and rutin at 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ exhibited low toxicity on PC-3, while OLFEH at 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was moderately toxic, exhibited a percentage of cell growth inhibition of 52.08%. In the evaluation of the insecticidal activity, there was only significant mortality at the end of OLFEH treatments, the others did not show 100% mortality at any of the concentrations tested. OLFEH at 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ decreased the median survival of the ants from sixteen to six days, there was 98% mortality on day 14 and 100% at the end of the experiment. The substances rutin, β -amyrin, 3-O-(9,12,15-octadecatrienoyl)-glyceryl- β -D-galactopyranoside, linolenic acid and palmitic acid are reported for the first time for the genus *Odontadenia*. It is suggested that T-1 contributes to the moderate cytotoxic activity of OLFEH over PC-3. It is suggested that T-1 also contributes to the insecticidal activity of OLFEH in *A. sexdens rubropilosa*. The hexane fraction of *O. lutea* leaves may be a potential source for the isolation of substances with insecticidal activity in *A. sexdens rubropilosa*.

Key words: Insecticidal activity, Cutting ants, Tumor cells, Phytochemical, Monogalactosylmonoacylglycerol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Alcaloides de <i>Rauvolfia serpentina</i> e <i>Catharanthus roseus</i>	20
Figura 2:	Limonoide e triterpenos de <i>Odontadenia macrantha</i>	21
Figura 3:	Saponinas de <i>Odontadenia puncticulosa</i>	22
Figura 4:	<i>Odontadenia lutea</i> (Vell.) Markgr.....	23
Figura 5:	Alcaloides originados de <i>Camptotheca acuminata</i>	25
Figura 6:	Bioativos de <i>Spiranthera odoratissima</i> e <i>Viola sebifera</i>	26
Figura 7:	Obtenção e fracionamento do extrato bruto etanólico das folhas de <i>O. lutea</i>	31
Figura 8:	Fluxograma do Isolamento de F-1 a partir de OLFEA.....	32
Figura 9:	Fluxograma do Isolamento de T-1.....	33
Figura 10:	Fluxograma do Isolamento de F-1, M-AG-1 e AG-2 a partir de OLFEM.....	34
Figura 11:	Ensaio de Citotoxicidade <i>in vitro</i> pelo MTT.....	36
Figura 12:	Ensaio de atividade inseticida <i>in vitro</i> com <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	37
Figura 13:	Estrutura química do flavonoide rutina.....	40
Figura 14:	Espectro de IV (ATR) de F-1.....	42
Figura 15:	Espectro de RMN ¹ H de F-1 (MeOD, 500MHz).....	43
Figura 16:	Espectro de RMN ¹³ C de F-1 (MeOD, 125 MHz).....	44
Figura 17:	Espectro de HMBC de F-1 (MeOD, ¹ H 500 MHz; ¹³ C 125 MHz).....	45
Figura 18:	Estruturas químicas dos triterpenos da α -amirina, β -amirina e lupeol.....	47
Figura 19:	Espectro de IV (KBr) de T-1.....	49
Figura 20:	Espectro de RMN ¹ H de T-1 (CDCl ₃ , 500 MHz).....	50

Figura 21:	Espectro de RMN ¹³ C de T-1 (CDCl ₃ , 125 MHz).....	51
Figura 22:	Estrutura química do MGGM e do ácido palmítico.....	53
Figura 23:	Espectro de RMN ¹ H de M-AG-1 (MeOD, 500MHz).....	55
Figura 24:	Espectro de RMN ¹³ C de M-AG-1 (MeOD, 125 MHz).....	56
Figura 25:	Espectro de HSQC de M-AG-1 (MeOD, ¹ H 500 MHz; ¹³ C 125 MHz).....	57
Figura 26:	Espectro de HMBC de M-AG-1 (MeOD, ¹ H 500 MHz; ¹³ C 125 MHz).....	58
Figura 27:	Espectro EM-IES(-) de M-AG-1.....	59
Figura 28:	Espectro EM-IES(+) de M-AG-1.....	60
Figura 29:	Estrutura química dos ácidos linolênico e palmítico.....	63
Figura 30:	Espectro de RMN ¹ H de AG-2 (MeOD, 500MHz).....	65
Figura 31:	Espectro de RMN ¹³ C de AG-2 (MeOD, 125 MHz).....	66
Figura 32:	Espectro de HSQC de AG-2 (MeOD, ¹ H 500 MHz; ¹³ C 125 MHz).....	67
Figura 33:	Espectro de HMBC de AG-2 (MeOD, ¹ H 500 MHz; ¹³ C 125 MHz).....	68
Figura 34:	Espectro EM-IES(-) de AG-2.....	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1:	Materiais cromatográficos utilizados e respectivas marcas.....	28
Quadro 2:	Reagentes utilizados e respectivas marcas.....	28
Quadro 3:	Equipamentos utilizados e respectivas especificações.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Linhagens celulares e concentrações de plaqueamento para os ensaios de citotoxicidade.....	35
Tabela 2:	Rendimento (Rend.) dos extratos obtidos de <i>O. lutea</i>	39
Tabela 3:	Dados de RMN ¹ H (MeOD, 500 MHz) e ¹³ C (MeOD, 125 MHz) de F-1.....	46
Tabela 4:	Dados de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) de T-1.....	52
Tabela 5:	Dados de RMN ¹ H (MeOD, 500 MHz) e ¹³ C (MeOD, 125 MHz) do MGMT de M-AG-1.....	61
Tabela 6:	Dados RMN ¹ H (MeOD, 500 MHz) e ¹³ C (MeOD, 125 MHz) do ácido graxo de M-AG-1.....	62
Tabela 7:	Dados de RMN ¹ H (MeOD, 500 MHz) e ¹³ C (MeOD, 125 MHz) de AG-2.....	70
Tabela 8:	Percentual de Inibição do Crescimento tumoral (IC) <i>in vitro</i> do extrato e frações das folhas de <i>O. lutea</i> na concentração de 50 µg.mL ⁻¹ e 25 µg.mL ⁻¹ para F-1 (rutina), e Desvio Padrão (DP), frente à três linhagens de células tumorais. Determinação pelo método MTT com 72h de tratamento.....	71
Tabela 9:	Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio com dieta artificial acrescida com de extrato e frações de <i>O. lutea</i> nas concentrações 0,2; 1,0 e 2,0 mg.mL ⁻¹	75

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Categorias dos 246 fármacos anticancerígenos aprovados no período 1940-2014.....	24
Gráfico 2: Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com OLFE nas concentrações 0,2; 1,0 e 2,0 mg.mL ⁻¹	72
Gráfico 3: Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com OLFEH nas concentrações 0,2; 1,0 e 2,0 mg.mL ⁻¹	73
Gráfico 4: Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com OLFED nas concentrações 0,2; 1,0 e 2,0 mg.mL ⁻¹	73
Gráfico 5: Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com OLFEA nas concentrações 0,2; 1,0 e 2,0 mg.mL ⁻¹	74
Gráfico 6: Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com OLFEM nas concentrações 0,2; 1,0 e 2,0 mg.mL ⁻¹	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATR	<i>Attenuated total reflection</i>
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCET	Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas
CEIS	Centro de Estudos de Insetos Sociais
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
EM	Espectrometria de massas
F.E.	Fase estacionária
F.M.	Fase móvel
HCT-116	Linhagem celular de carcinoma colorretal
HL-60	Linhagem celular de leucemia promielocítica
HMBC	Correlação heteronuclear de quantum-múltiplo
HSQC	Correlação heteronuclear de quantum-simples
HUEG	Herbário da Universidade Estadual de Goiás
IC	Inibição do crescimento
IES	Ionização por <i>electrospray</i>
IQ-UFG	Instituto de Química - Universidade Federal de Goiás
IV-TF	Infravermelho - transformada de Fourier
LaCEM	Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas
LOE	Laboratório de Oncologia Experimental
Md	Sobrevivência mediana
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
MGMG	Monogalactosilmonoacilglicerol
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio
OLFE	<i>Odontadenia lutea</i> , folhas, etanol
OLFEH	<i>Odontadenia lutea</i> , folhas, etanol, hexano
OLFED	<i>Odontadenia lutea</i> , folhas, etanol, diclorometano

OLFEA	<i>Odontadenia lutea</i> , folhas, etanol, acetato de etila
OLFEM	<i>Odontadenia lutea</i> , folhas, etanol, metanol
F-1	Flavonoide 1 – Rutina
T-1	Mistura de triterpenos 1 – α -amirina, β -amirina e lupeol
M-AG-1	Mistura de monogalactosilmonoacilglicerol e ácido graxo 1 – 3-O-(9,12,15-octadecatrienoil)- β -D-galactopiranosil glicerol e ácido palmítico
AG-2	Mistura de ácidos graxos 2 – Ácidos linolênico e palmítico
PC-3	Linhagem celular de carcinoma de próstata
PN	Produtos naturais
ppm	Parte por milhão
ppt	Precipitado
Q-TOF	<i>Quadropole Time of Fligth</i>
PVC	<i>Polyvinyl chloride</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN 1D	Ressonância magnética nuclear em uma dimensão
RMN 2D	Ressonância magnética nuclear em duas dimensões
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio 1
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> – Meio de cultura celular
SFB	Soro fetal bovino
TMS	Tetrametilsilano
UEG	Universidade Estadual de Goiás
UFC	Universidade Federal do Ceará
UNESP	Universidade Estadual Paulista
US-NCI	<i>U. S. National Cancer Institute</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
m	Multipleteo
t	Tripleteo
Hz	Hertz
MHz	Megahertz
h	Altura da coluna
J	Constante de acoplamento
δ	Deslocamento químico em partes por milhão
Φ	Diâmetro
α	Alfa
β	Beta

SUMÁRIO

1	Introdução	18
2	Revisão Bibliográfica.....	19
2.1	A Família Apocynaceae	19
2.2	O Gênero <i>Odontadenia</i>	20
2.3	A Espécie <i>Odontadenia lutea</i> (Vell.) Markgr.	22
2.4	Produtos Naturais e Atividade Antitumoral.....	23
2.5	Produtos Naturais e Atividade Inseticida.....	25
3	Objetivos	27
3.1	Objetivo Geral	27
3.2	Objetivos Específicos	27
4	Material e Métodos.....	28
4.1	Procedimentos Experimentais Gerais	28
4.1.1	Material.....	28
4.1.2	Caracterização.....	29
4.1.2.1	Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho	29
4.1.2.2	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	29
4.1.2.3	Espectrometria de massas.....	30
4.2	Extração e Isolamento.....	30
4.2.1	Material Vegetal.....	30
4.2.2	Obtenção dos Extratos	30
4.2.3	Isolamento	31
4.2.3.1	Isolamento de F-1 a partir de OLFEA	31
4.2.3.2	Isolamento de T-1 a partir de OLFEH	32
4.2.3.3	Isolamento de F-1, M-AG-1 e AG-2 a partir de OLFEM	33

4.3	Bioensaios.....	34
4.3.1	Ensaio de Citotoxicidade <i>in vitro</i>	34
4.3.1.1	Manutenção das Linhagens Celulares	35
4.3.1.2	Avaliação do Efeito Citotóxico.....	35
4.3.2	Ensaio de Atividade Inseticida <i>in vitro</i>	37
4.3.2.1	Manutenção das Formigas Cortadeiras	37
4.3.2.2	Avaliação da Atividade Inseticida.....	37
5	Resultados e discussão	37
5.1	Rendimento dos Extratos	39
5.2	Identificação das Substâncias.....	39
5.2.1	Identificação de F-1	39
5.2.2	Identificação de T-1	47
5.2.3	Identificação de M-AG-1	53
5.2.4	Identificação de AG-2	63
5.3	Toxicidade.....	71
5.3.1	Citotoxicidade <i>in vitro</i>	71
5.3.2	Atividade Inseticida <i>in vitro</i>	72
6	Conclusão	77
7	Referências Bibliográficas.....	78

1 INTRODUÇÃO

Até a década de 1950, as plantas não entusiasmavam a indústria farmacêutica, no entanto, as pesquisas foram expandidas após o desenvolvimento de novos métodos de rastreio de bioatividade (PHILLIPSON, 2007). Em termos de descoberta de novas moléculas a partir de produtos naturais (PN), cerca de 44% é relacionada a mamíferos, 25% a plantas, 16% a bactérias e 12% a fungos (PATRIDGE et al., 2015).

Atualmente, os produtos naturais desempenham importante papel na saúde pública (ATANASOV et al., 2015; NEWMAN; CRAGG, 2016). Vários fármacos oriundos de produtos naturais foram inseridos para uso clínico nestes últimos 50 anos, como por exemplo, a vimblastina e vincristina de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Apocynaceae) (PHILLIPSON, 2007; KUMAR et al., 2016). Neste âmbito, o tratamento de câncer é um importante exemplo, dos 246 fármacos utilizados, cerca de 72% são PN ou foram baseadas em PN (NEWMAN; CRAGG, 2016).

A pesquisa de bioatividade em produtos naturais ainda pode coadjuvar com agricultura sustentável, de modo a contribuir para o desenvolvimento de agentes inseticidas mais seletivos e que substituam os sintéticos danosos ao meio ambiente e aos seres humanos (BAIARDI, 2013). Como exemplo de substâncias oriundas de plantas utilizadas no controle de pragas, pode-se destacar os alcaloides nicotina e normonicotina de *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) e o terpeno citronelal extraído de *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (Poaceae) (MACIEL et al., 2010).

Neste sentido, os estudos são privilegiados pela biodiversidade brasileira, visto que o país possui cerca de 13% de toda a biota mundial já estudada (LEWINSOHN; PRADO, 2005). O Cerrado brasileiro abriga cerca de 12070 espécies de plantas, dentre as quais, destaca-se Apocynaceae, táxon representado por 293 destas espécies (FORZZA, 2010; ZAPPI et al., 2015). Família sobre a qual há relatos de atividades cardioprotetora, hepatoprotetora, neuroprotetora, anti-inflamatória, anticancerígena, antimalárica, dentre outras (CHAN; WONG; CHAN, 2016).

A investigação de bioatividade de produtos naturais provenientes das plantas encontradas no Cerrado pode contribuir, substancialmente, para a saúde pública do país. Nesse sentido, este trabalho objetivou realizar o estudo fitoquímico, avaliar a citotoxicidade e a ação inseticida das folhas de *Odontadenia lutea* (Vell.) Markgr.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A FAMÍLIA Apocynaceae

Apocynaceae é constituída de árvores tropicais, arbustos e videiras, cujas plantas tem a produção de látex branco como característica marcante, geralmente possuem folhas opostas ou em espirais, flores grandes, coloridas e perfumadas com cinco lobos contorcidos e frutos em pares. Características estas que conferem os nomes populares pelos quais é chamada, ervas-de-leite e família das perobas ou cipós (CHAN; WONG; CHAN, 2016).

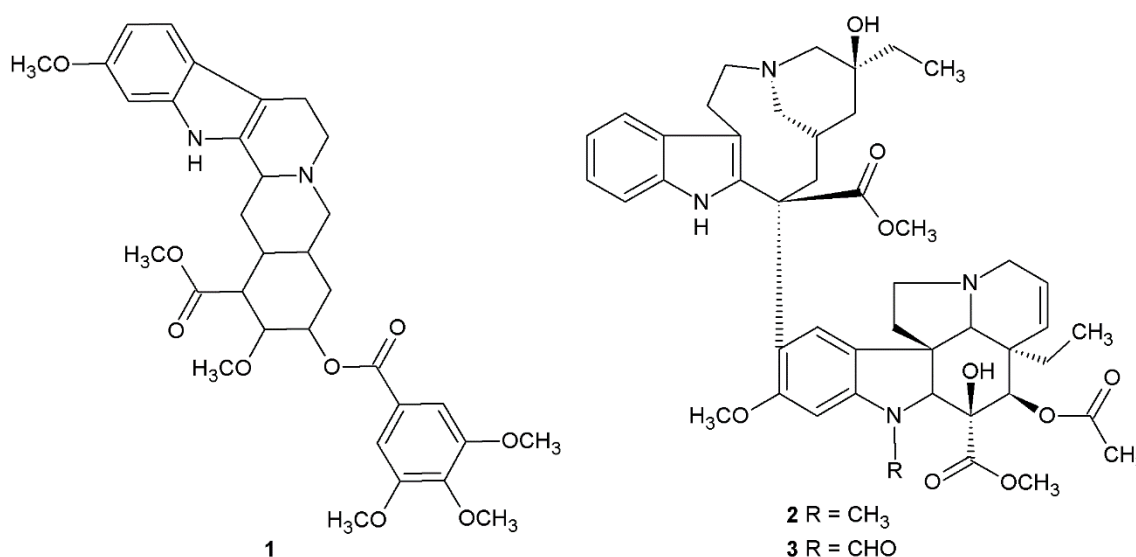
A família é composta por aproximadamente 5000 espécies dispostas em 366 gêneros que, geralmente, estão distribuídos pelas regiões de clima tropical do planeta e, eventualmente, nas regiões temperadas (MORALES, 2005; RAPINI, 2012; ENDRESS; LIEDE-SCHUMANN; MEVE, 2014). No território brasileiro são encontradas cerca de 760 espécies compreendidas em 75 gêneros, sendo que, destas, 293 são encontradas no Cerrado (FORZZA, 2010; ZAPPI et al., 2015).

Um interessante aspecto a ser ressaltado é apresentado no estudo etnobotânico de Santos et al. (2013), que aponta os usos medicinais e ornamentais como os mais expressivos dentre as classes observadas. Salienta ainda que a importância econômica e medicinal de determinadas espécies relaciona-se aos metabólitos presentes no látex, como hidrocarbonetos poliisoprênicos, triterpenos, ácidos graxos, fitoesteróis e alcaloides (MARINHO et al., 2011; LINHARES; PINHEIRO, 2013; SANTOS et al., 2013; DGHIM et al., 2015; WINK, 2016).

Apocynaceae apresenta ampla gama de atividades biológicas e farmacológicas, como cardioprotetoras, hepatoprotetoras, neuroprotetoras, anti-inflamatórias e anticancerígenas (CHAN; WONG; CHAN, 2016). Atividades estas, que são relacionadas aos compostos químicos produzidos pelo metabolismo secundário, dentre os quais, sobressaem-se os alcaloides (WILLAMAN; SCHUBERT, 1961; PATERNA et al., 2016; YAP et al., 2016), flavonoides (BADMUS et al., 2016; OKOYE; OKOYE, 2016), triterpenóides (ALI; HOUGHTON; SOUMYANATH, 2006; EL-KASHEF et al., 2015), cardenolídeos (ABE; YAMAUCHI; MINATO, 1996; WEN et al., 2016), pregnanos (OUNAISSIA et al., 2016) e iridoides (AKHTAR et al., 2013; FILHO et al., 2013).

Como exemplo, tem-se a reserpina (1), anti-hipertensivo extraído de *Rauvolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz (KUMAR et al., 2016). Como também os alcaloides vimblastina (2) e vincristina (3) (Figura 1) (KUMAR et al., 2016), recorrentemente citados ao se tratar de produtos naturais antimitóticos (LUCAS et al., 2010; KUMAR et al., 2013; ABDALLAH et al., 2015), originados da planta *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, a qual é amplamente estudada (GAVIRAJ; VEERESHAM, 2006; ASLAM et al., 2009; BRANDÃO et al., 2010; ASLAM; MUJIB; SHARMA, 2011; NEGI, 2011).

Figura 1: Alcaloides de *Rauvolfia serpentina* e *Catharanthus roseus*.



Fonte: Adaptado de Brandão et al. (2010); Kumar et al. (2016).

2.2 O GÊNERO *Odontadenia*

Odontadenia é um gênero de Apocynaceae cuja ocorrência é relatada, principalmente, para faixa territorial compreendida entre a Guatemala e o Brasil. A maioria das espécies é encontrada na região sudoeste da América do sul. Este táxon é composto por 20 espécies de lianas, das quais, 16 são encontradas no Brasil. Os indivíduos deste táxon possuem ramos volúveis, muito raramente sub-eretos, folhas opostas, cálices com cinco sépalas, os frutos são folículos apocárpicos tipicamente cilíndricos, e apresentam látex branco (MORALES, 1999; FORZZA, 2010).

Pouco se conhece sobre o potencial fitoquímico do gênero, no entanto, Rocha, Luz e Rodrigues (1982) afirmam que a subfamília Apocynoideae, a qual o gênero *Odontadenia* pertence, é quimiotaxonomicamente marcada pela presença de

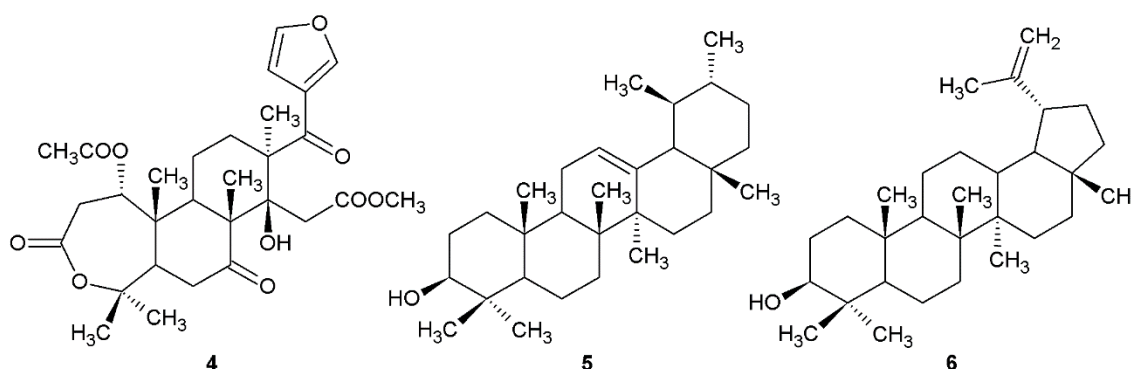
alcaloides esteroidais. Bisset (1958), apud Willaman e Schubert (1961) menciona a presença desta classe de metabólitos nas cascas de *Odontadenia macrantha* (Roem. & Schult.) Markgr.

Em contraste, testes fitoquímicos realizados com caule e folhas das espécies *Odontadenia funigera* Woods., *Odontadenia perrottetii* (DC.) Woods., *Odontadenia punctulosa* (A. Rich.) Pulle e *Odontadenia verrucosa* (Willd. ex Roem. & Schult.) K.Schum. ex Markgr. encontradas na Amazônia apresentaram resultados negativos para alcaloides (ROCHA; LUZ; RODRIGUES, 1982).

A revisão bibliográfica realizada aponta o uso tradicional do látex de *Odontadenia laxiflora* (Rusby) Woodson pela tribo boliviana Chácobo, como veneno na caça e na pesca (BUSSMANN; PANAIAGUA-ZAMBRANA, 2014). Como também o uso do pó das folhas secas de *O. verrucosa* por nativos do Rio Negro como repelente de pulgas e piolhos, e apesar de ter reputação de venenoso, o caule desta planta é utilizado na preparação de cataplasmas para dor no peito decorrente de tuberculose (SCHULTES, 1979).

Dentre as pesquisas de bioatividade relatadas para o táxon, destaca-se o estudo de *O. macrantha*. Planta tradicionalmente utilizada no tratamento de distúrbios gastrointestinais (BREITBACH et al., 2013), como repelente de insetos e anestésico (SCHULTES, 1979). O fracionamento biomonitorado do extrato metanólico das folhas desta planta quanto a citotoxicidade em células tumorais conduziu ao isolamento do limonoide *Odontadenin A* (**4**) (Figura 2), que apresentou atividade citotóxica na linhagem celular A2780, de câncer de ovário, com IC_{50} de $3,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, além do isolamento de dois triterpenoides já conhecidos, α -amirina (**5**) e lupeol (**6**) (Figura 2) (CHATURVEDULA et al., 2003).

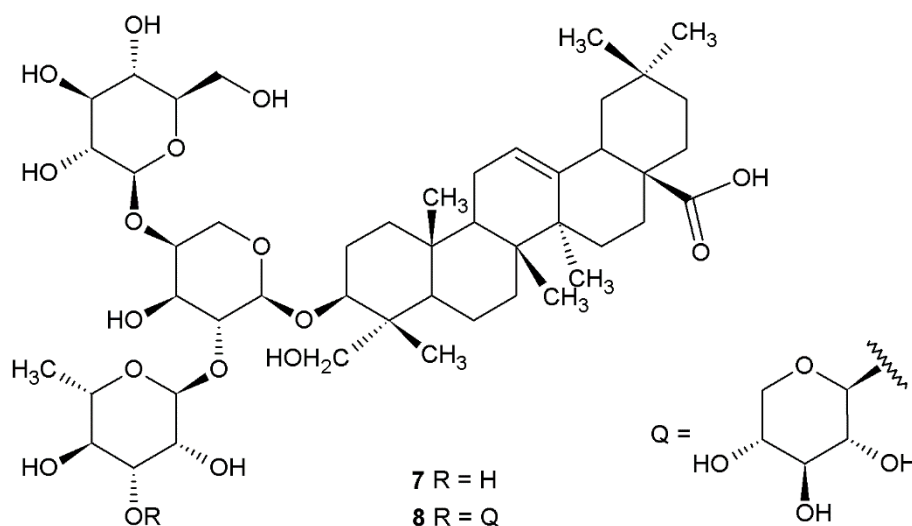
Figura 2: Limonoide e triterpenos de *Odontadenia macrantha*.



Fonte: Adaptado de Chaturvedula et al. (2003); El-Kashef et al. (2015).

Também pode-se citar o estudo de *O. punctulosa*. Planta tradicionalmente utilizada no tratamento de rubéola (GUPTA, 2013), distúrbios gastrointestinais (BREITBACH et al., 2013), afecções do baço e fígado (SANTOS et al., 2013) e picada de cobra (GIOVANNINI; HOWES, 2017). A triagem quanto à atividade antifúngica do extrato metanólico das folhas de *O. punctulosa* em *Candida albicans* direcionou o isolamento de duas saponinas, *pulsatilla D* (**7**) e *3β-O-[[β-D-xylopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-[β-D-glucopyranosyl-(1→4)]-α-L-arabinopyranosyl-hederagenin* (**8**) (Figura 3). As quais exibiram Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) iguais a 8 µg.mL⁻¹ e 16 µg.mL⁻¹, respectivamente (FAVRE-GODAL et al., 2017).

Figura 3: Saponinas de *Odontadenia punctulosa*.



Fonte: Adaptado de Favre-Godal et al. (2017).

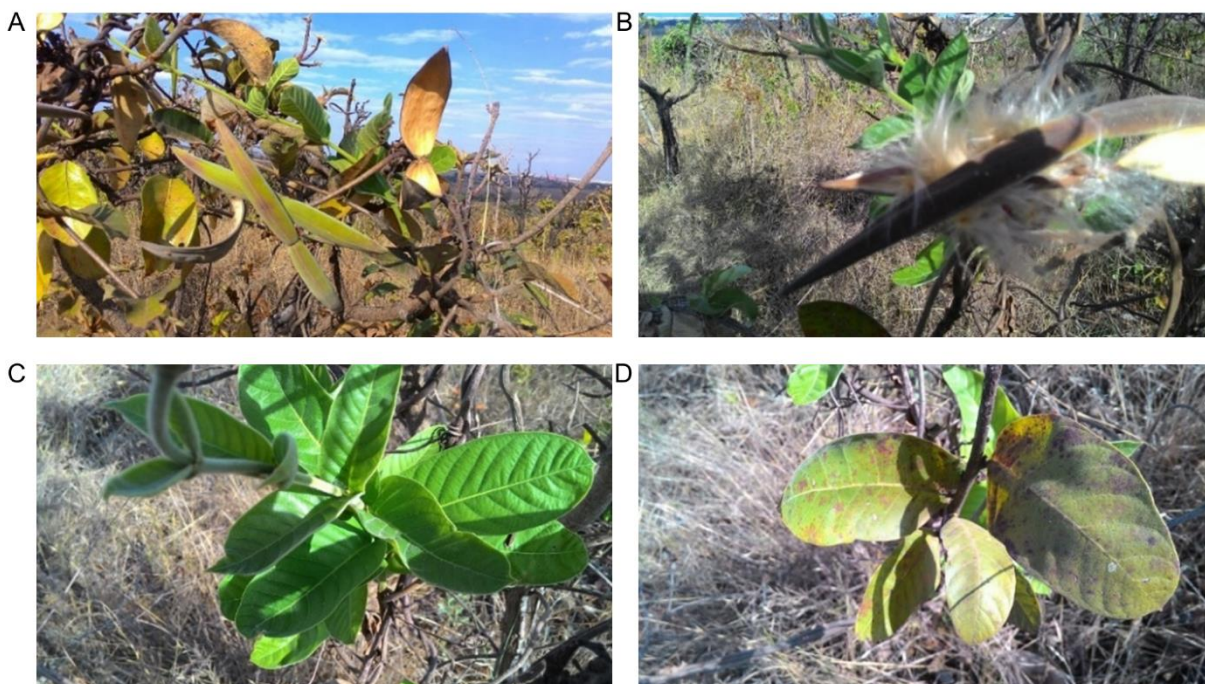
2.3 A ESPÉCIE *Odontadenia lutea* (Vell.) Markgr.

Odontadenia lutea (Vell.) Markgr. (Figura 4) é uma planta nativa, porém não endêmica no Brasil (FORZZA, 2010). Tem como habitat o cerradão, cerrado (*stricto sensu*), vereda, campo sujo, campo limpo, também é encontrada na Amazônia e Caatinga. Com distribuição no PA, AM, BA, MT, GO, DF, MG, SP, RJ. É uma trepadeira de caule volúvel com látex branco e flores brancas, com período de florescência entre fevereiro e julho e frutificação de abril à setembro, é encontrada com os nomes populares flor-de-veado e cipó-cururu (KINOSHITA, L.S. (coord.), 2005; CAVASSAN et al., 2009; MEDEIROS, 2011).

Suas características botânicas são apontadas por Kinoshita (2005):

Lianas; ramos cilíndricos, robustos, lenticelados, glabros a pubescentes. **Pecíolo** 3-10mm; lâmina cartácea a subcoriácea, 6,8-15x2,4-6,1cm, elíptica a oblongo-elíptica, ápice acuminado, base obtusa a ligeiramente cordada, margem inteira, concolor. **Tirso** axilar ou terminal, 5-30-flora; pedúnculo 7-33mm; brácteas 3-8,3x1-4mm, ovadas, glabras. **Flores** 45-90mm; pedicelo 7-25mm; lacínias do cálice 5-14x3-7mm, ovadas, puberulentas; corola infundibuliforme, branca com fauce amarelada, glabra, tubo inferior 19-24x3-5mm, tubo superior 13-26x 10-23mm, lobos 14-26x17-23mm; anteras 7-9mm, pilosas abaxialmente; ovário 3mm, oblongo-ovóide, cabeça do estilete 3mm, estilete 20-22mm. **Folículos** 7,5-11x0,5-1cm, divergentes, lenhosos, curvados no ápice; sementes 11-12,5x 1-2mm, coma 20-42mm.

Figura 4: *Odontadenia lutea* (Vell.) Markgr.

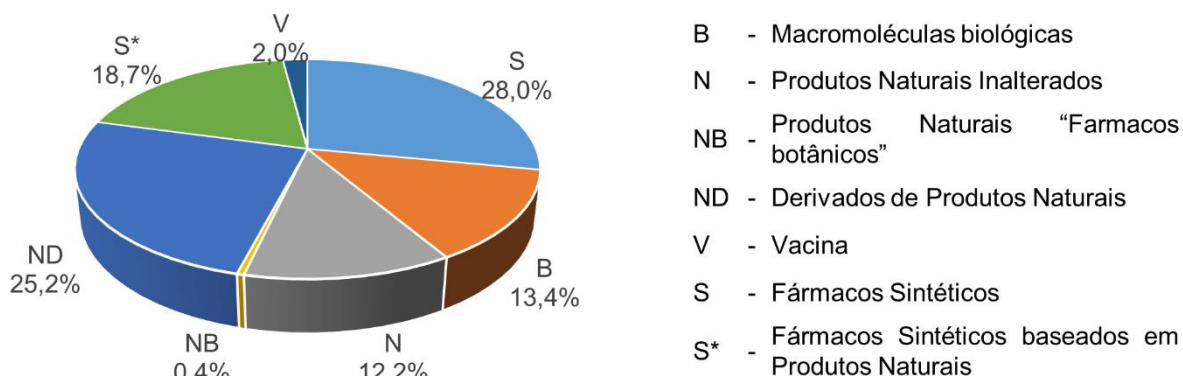


A – Caule, folhas e frutos; B – Frutos; C – Folhas jovens; D – Folhas maduras. Fonte: Próprio autor.

2.4 PRODUTOS NATURAIS E ATIVIDADE ANTITUMORAL

A citotoxicidade de compostos orgânicos é frequentemente explorada para o desenvolvimento de fármacos antineoplásicos, haja vista a deficiência de arsenais terapêuticos abrangentes e eficazes (DALLA VECHIA; GNOATTO; GOSMANN, 2009). Nesse contexto, salienta-se a expressiva contribuição das pesquisas em produtos naturais. De acordo com Newman e Gragg (2016), cerca de 58,6% dos 246 medicamentos aprovados no período de 1940-2014 correspondiam a moléculas naturais ou baseadas em produtos naturais e 13,4% a macromoléculas biológicas, enquanto apenas 28% correspondiam a fármacos completamente sintéticos. Os dados citados são mostrados no Gráfico 1.

Gráfico 1: Categorias dos 246 fármacos anticancerígenos aprovados no período 1940-2014.

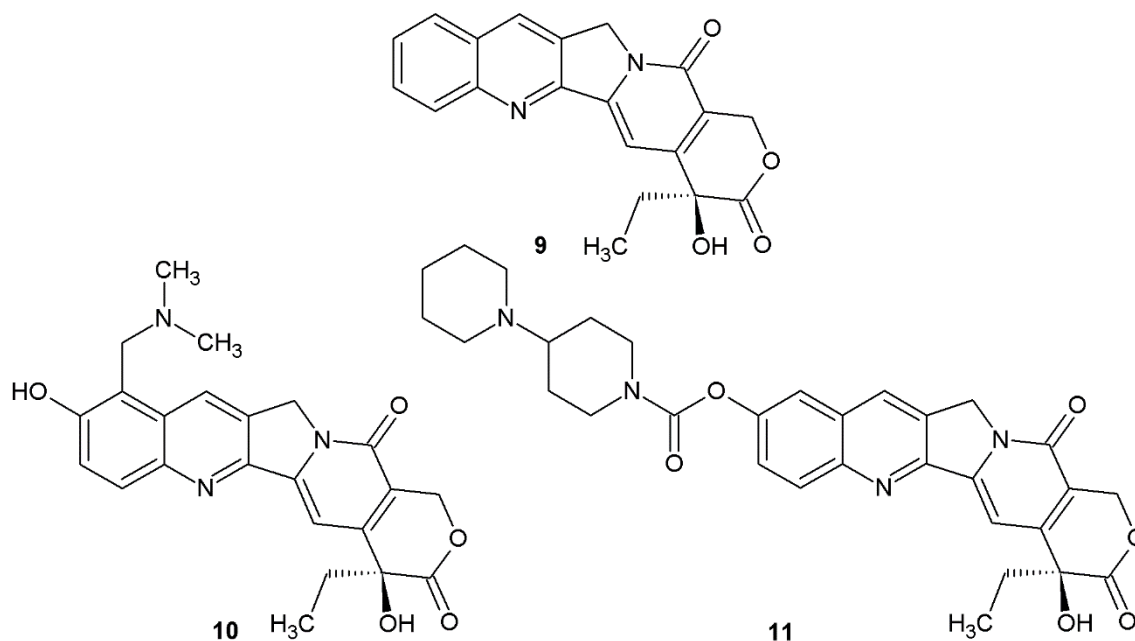


Fonte: Adaptado de Newman, Cragg (2016).

Neste seguimento tem-se os alcaloides (RABBANI-CHADEGANI; CHAMANI; HAJIHASSAN, 2009), lignanas (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009), flavonoides (SINGH; KAUR; SILAKARI, 2014), estilbenos (BARBOSA et al., 2009), taxanos (ALVAREZ et al., 2009) e quinonas (PARAMASIVAM et al., 2012) como os constituintes químicos vegetais mais reportados como potenciais agentes quimioterápicos (MUÑOZ CENDALES; CUCA SUÁREZ, 2016).

Como exemplo, destaca-se o alcaloide camptotecina (**9**) extraído de *Camptotheca acuminata* Decne. (Cornaceae). Substância da qual obtém-se os derivados topotecano (**10**) e irinotecano (**11**) (Figura 5), comercializados como *Hycamtin* e *Campostar* pelas companhias farmacêuticas GlaxoSmithKline e Pfizer para o tratamento de câncer de cólon e ovário (HOUGHTON et al., 1995; MUÑOZ CENDALES; CUCA SUÁREZ, 2016).

Figura 5: Alcaloides originados de *Camptotheca acuminata*.



Fonte: Adaptado de Muñoz Cendales, Cuca Suárez (2016).

Tratando-se de investigação farmacológica experimental, a avaliação da viabilidade celular e citotoxicidade de compostos ou extratos é realizada, recorrentemente, pela medição da atividade mitocondrial através da redução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (BONCLER et al., 2014). Neste sentido, tem-se como exemplo o estudo da citotoxicidade dos isolados de *Bauhinia kockiana* Korth. (Leguminosae) em linhagens celulares MCF-7, PC-3, LNCaP, DU145 e HCT-116 (CHEW et al., 2014).

2.5 PRODUTOS NATURAIS E ATIVIDADE INSETICIDA

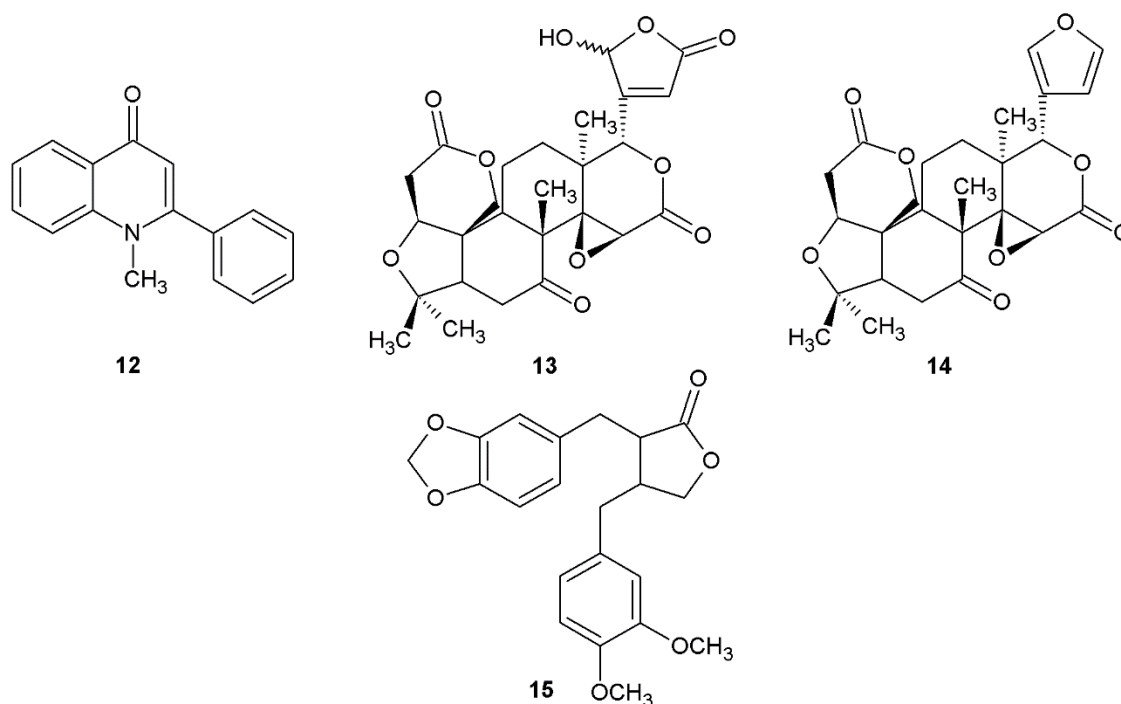
As formigas cortadeiras constituem um sério problema a muitos agroecossistemas (FERNANDES et al., 2002). As formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são consideradas as principais pragas no sistema agroflorestal da Região Neotropical (DORNELAS et al., 2016).

Para o controle destas e de outras pragas, atualmente, os métodos químicos tem sido estratégia frequentemente utilizada. Nos quais, utiliza-se, principalmente, inseticidas de origem sintética (LOECK; GRUTZMACHER; COIMBRA, 2003; RODRÍGUEZ et al., 2015). Várias vezes, estes insumos apresentam alta toxicidade e pouca seletividade (LOECK; GRUTZMACHER; COIMBRA, 2003; BAIARDI, 2013).

O desenvolvimento de agentes inseticidas mais seletivos e que substituam os sintéticos danosos ao meio ambiente e aos seres humanos é de grande valia para a agricultura. Os produtos naturais podem atuar como um método alternativo para o controle desses insetos. Bioensaios visando detectar efeitos tóxicos de plantas em colônias de formigas cortadeiras são o primeiro passo na determinação de seu potencial inseticida (HEBLING et al., 2000).

Vários trabalhos foram desenvolvidos com este objetivo, dentre os quais, pode-se citar os estudos das atividades inseticidas das plantas *Spiranthera odoratissima* St. Hil. (Rutaceae) e *Virola sebifera* Aubl. (Myristicaceae) frente a formiga *Atta sexdens rubropilosa*. Da primeira planta foram identificados 1-metil-2-fenilquinolin-4-ona (**12**), ácido limonéxico (**13**) e limonina (**14**) como bioativos, e da segunda (-)-*kusunokinin* (**15**) (Figura 6) (TEREZAN et al., 2010; BICALHO et al., 2012).

Figura 6: Bioativos de *Spiranthera odoratissima* e *Virola sebifera*.



Fonte: Adaptado de Terezan et al. (2010); Bicalho et al. (2012).

Assim também, a avaliação dos extratos de *Ageratum conyzoides* (L.) L. (Compositae) frente as formigas *Atta laevigata* e *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (ARAUJO et al., 2008). E ainda o estudo do efeito do óleo essencial da planta *Drimys angustifolia* Miers (Winteraceae) sobre formigas do gênero *Acromyrmex* spp. (MENEGHETTI; REBELO; VITORINO, 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Realizar o estudo fitoquímico, avaliar a citotoxicidade e a ação inseticida das folhas de *Odontadenia lutea* (Vell.) Markgr.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o extrato etanólico e as frações hexânica, diclorometânica, acetato-etílica e metanólica das folhas de *O. lutea*;
- Isolar e identificar os compostos bioativos das folhas de *O. lutea*;
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* do extrato, frações e compostos isolados das folhas de *O. lutea* frente as linhagens de células tumorais HL-60, PC-3 e HCT-116;
- Avaliar a atividade inseticida *in vitro* do extrato e frações das folhas de *O. lutea* em formigas operárias *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS

4.1.1 Material

Os quadros a seguir mostram os materiais cromatográficos (Quadro 1), solventes (Quadro 2) e equipamentos (Quadro 3) utilizados.

Quadro 1: Materiais cromatográficos utilizados e respectivas marcas

MATERIAL	MARCA
Celulose microcristalina D	Synth
Sílica gel 230-400 <i>mesh</i>	Macherey-Nagel
Diaion HP20	Sigma-Aldrich
Sephadex LH20	Sigma-Aldrich
Cromatofolhas de alumínio sílica gel 60 F ₂₅₄	Macherey-Nagel
Secador serigráfico	Skil 1800 W
Lâmpada UV (254 e 365 nm)	-

Quadro 2: Reagentes utilizados e respectivas marcas.

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

Quadro 3: Equipamentos utilizados e respectivas especificações.

EQUIPAMENTOS	MARCA/MODELO
Estufa com circulação de ar	Marconi/ MA035
Moinho de facas tipos cróton	Marconi/ MA-580
Evaporador rotativo	TECNAL/ TE120 e Quimis/ Q344B
Balança analítica	Mettler/ P163
Espectrômetro de RMN	Bruker/ Advanced III - 500 MHz/11,75 Tesla
Espectrofotômetro de IV	Perkinelmer/ Spectrum Frontier
Espectrômetro de massas	Bruker/ micrOTOF-Q III

4.1.2 Caracterização

4.1.2.1 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho

Os espectros vibracionais de absorção na região do Infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) foram adquiridos em espectrofotômetro PerkinElmer Spectrum Frontier do Laboratório de Análise Instrumental do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas – Henrique Santillo (CCET) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). Operando na região de 4000 a 400 cm^{-1} para amostras dispersas em pastilhas de KBr. E quando equipado com dispositivo de Refletância Total Atenuada (ATR), de 4000 a 700 cm^{-1} .

4.1.2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram adquiridos em aparelho Bruker Avance III (11,75 T) do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (IQ-UFG), Goiânia-GO. Utilizou-se *broadband probehead* de 5 mm com gradiente de campo em z à 25°C. Operando na frequência de 500,13 MHz para ^1H e 125,75 MHz para ^{13}C . Eventualmente, foram realizados experimentos para observar correlação heteronuclear de quantum-simples (HSQC) e correlação heteronuclear de quantum-múltiplo (HMBC). Utilizou-se CDCl_3 e MeOD como solventes e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os experimentos foram realizados em tubos de 5 mm de

diâmetro e coletados usando o software Topspin 3.5 desenvolvido pela Bruker BioSpin.

4.1.2.3 Espectrometria de massas

A Espectrometria de Massas (EM) foi realizada em aparelho Bruker micrOTOF-Q III do Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LaCEM) do IQ-UFG, Goiânia- GO. A ionização por *electrospray* (IES) foi operada nos modos negativo e positivo. Foi utilizado nitrogênio de alta pureza (> 98%) como nebulizador de desolvatação (200° C; 4 L.min⁻¹) e gás de colisão. A pressão do nebulizador foi mantida em 0,4 bar e a tensão capilar ajustada em 4500 V. As condições do analisador de massas quadrupolar (Q-TOF) foram: Deslocamento final de placa: -500 V; Funil 1: 200 Vpp; Funil 2: 200 Vpp; Hexapolo RF: 200 Vpp; Colisão RF: 200 Vpp; Tempo de transferência: 85 µs para o modo negativo e 70 µs para o positivo; Pré-pulso de armazenamento: 7 µs para o modo negativo e 5 µs para o positivo; Energia iônica do quadrupolo: 5eV. Os espectros de massa foram adquiridos e processados usando o software Bruker Compass DataAnalysis (Bruker Daltonik, GmbH).

4.2 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO

4.2.1 Material Vegetal

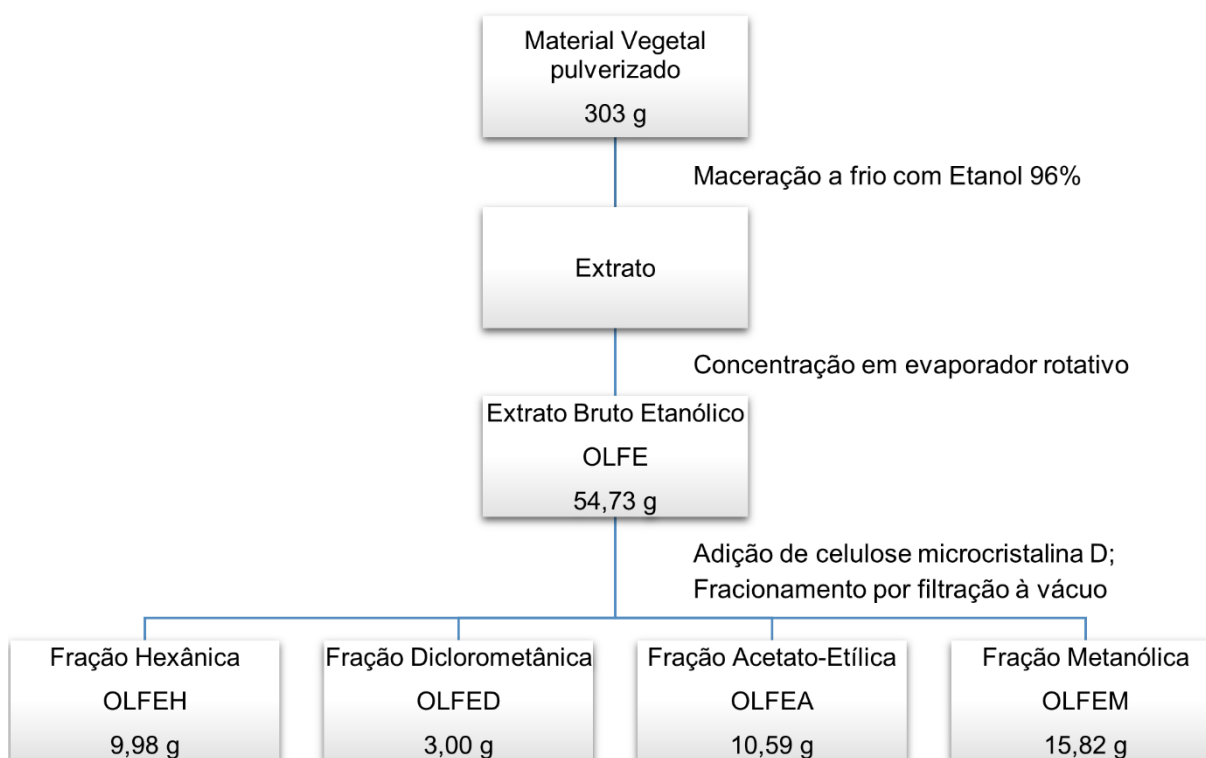
As folhas de *O. lutea* foram coletadas no CCET-UEG, nas coordenadas geográficas: latitude 16°22'50.5" sul, longitude 48°56'40.9" oeste e 1148 m de altitude. Foi identificada pela Prof^a. Dr^a. Mirley Luciene dos Santos e a exsicata depositada no Herbário da Universidade Estadual de Goiás (HUEG) sob o registro 11.381.

4.2.2 Obtenção dos Extratos

O material botânico (1,2 Kg) foi seco em estufa com circulação de ar a 45°C por 48 horas. Em seguida, foi triturado em moinho de facas. O material pulverizado (303 g) foi submetido à extração por maceração a frio com etanol 96% (10 L) durante 20 dias, filtrado e concentrado em evaporador rotativo a 35 °C e 19 rpm (MATOS, 2009).

O produto obtido foi denominado extrato bruto etanólico (OLFE) e então fracionado por filtração a vácuo após a incorporação em celulose microcristalina D. Para tanto, utilizou-se hexano (5 L), diclorometano (5 L), acetato de etila (5 L) e metanol (5 L) como eluentes. Os quais foram concentrados em evaporador rotativo. Obteve-se as frações hexânica (OLFEH), diclorometânica (OLFED), acetato-etílica (OLFEA) e metanólica (OLFEM). O processo descrito é ilustrado na Figura 7.

Figura 7: Obtenção e fracionamento do extrato bruto etanólico das folhas de *O. lutea*.



“OLFE” – Extrato Bruto Etanólico das Folhas de *O. lutea*; “OLFEH” – Fração Hexânica das Folhas de *O. lutea*; “OLFED” – Fração Diclorometânica das Folhas de *O. lutea*; “OLFEA” – Fração Acetato-etílica das Folhas de *O. lutea*; “OLFEM” – Fração Metanólica das Folhas de *O. lutea*.

4.2.3 Isolamento

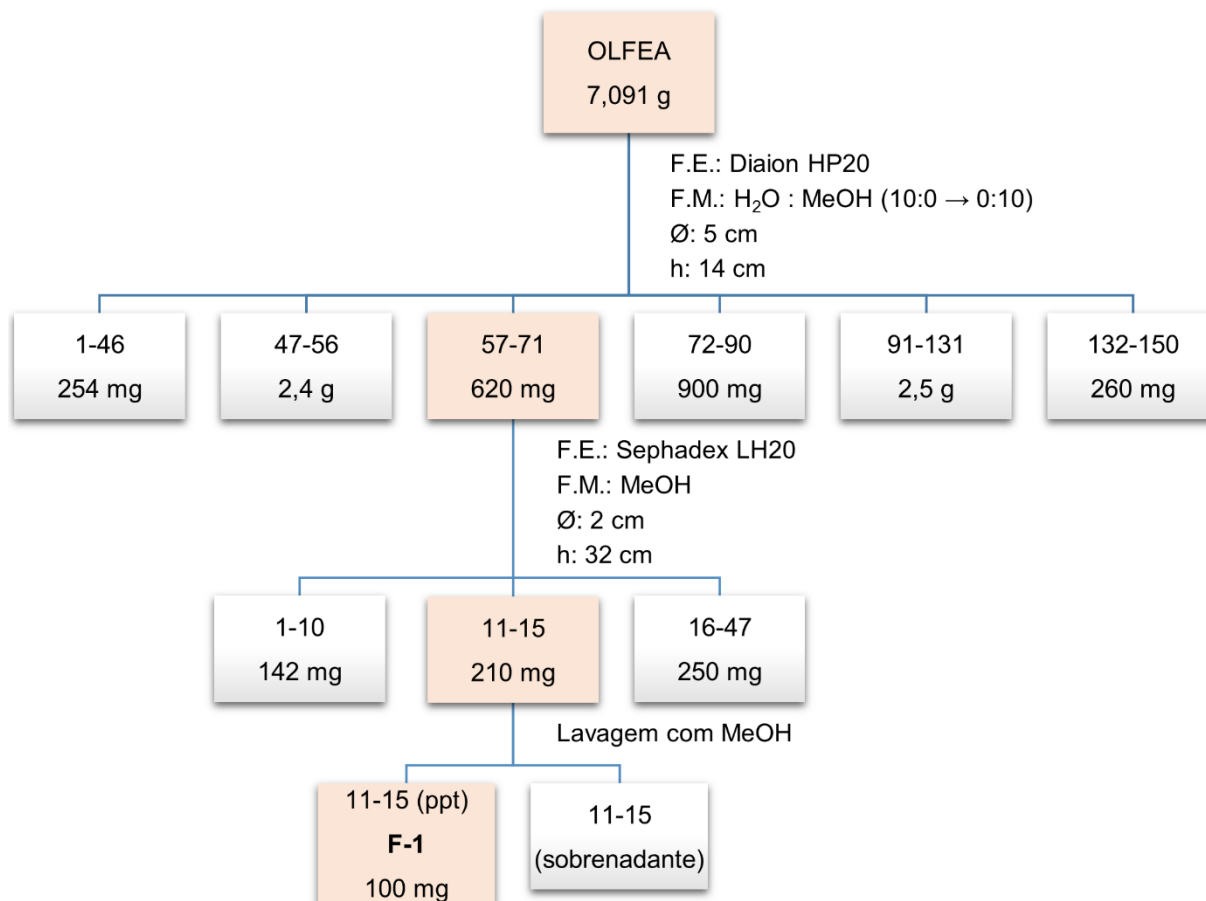
4.2.3.1 Isolamento de F-1 a partir de OLFEA

A fração OLFEA (7,091 g) foi fracionada por cromatografia em coluna (CC) de Diaion HP-20 ($\Phi = 5$ cm e $h = 14$ cm) eluída com gradientes de H_2O e MeOH (10:0 \rightarrow 0:10). As frações foram coletadas em 150 frascos de 15 mL. Das quais, a fração 57-71 (620 mg) foi refracionada por cromatografia de permeação em gel em coluna de

Sephadex LH-20 ($\Phi = 2,0$ cm e $h = 32$ cm) eluída com MeOH, obteve-se 47 frações. Houve a formação de precipitado (ppt) na fração 11-15 (210 mg), o qual foi lavado sucessivamente com MeOH (Figura 8).

Do respectivo ppt (100 mg), denominado **F-1**, foram feitas análises de IV (ATR) e RMN 1D e 2D ^1H (MeOD, 500 MHz), ^{13}C (MeOD, 125 MHz), e HMBC.

Figura 8: Fluxograma do Isolamento de F-1 a partir de OLFEA.



“OLFEA” – Fração Acetato-etílica das Folhas de *O. lutea*; “F.E.” – Fase estacionária; “F.M.” – Fase móvel; “Ø” – Diâmetro da Coluna; “h” – Altura da coluna.

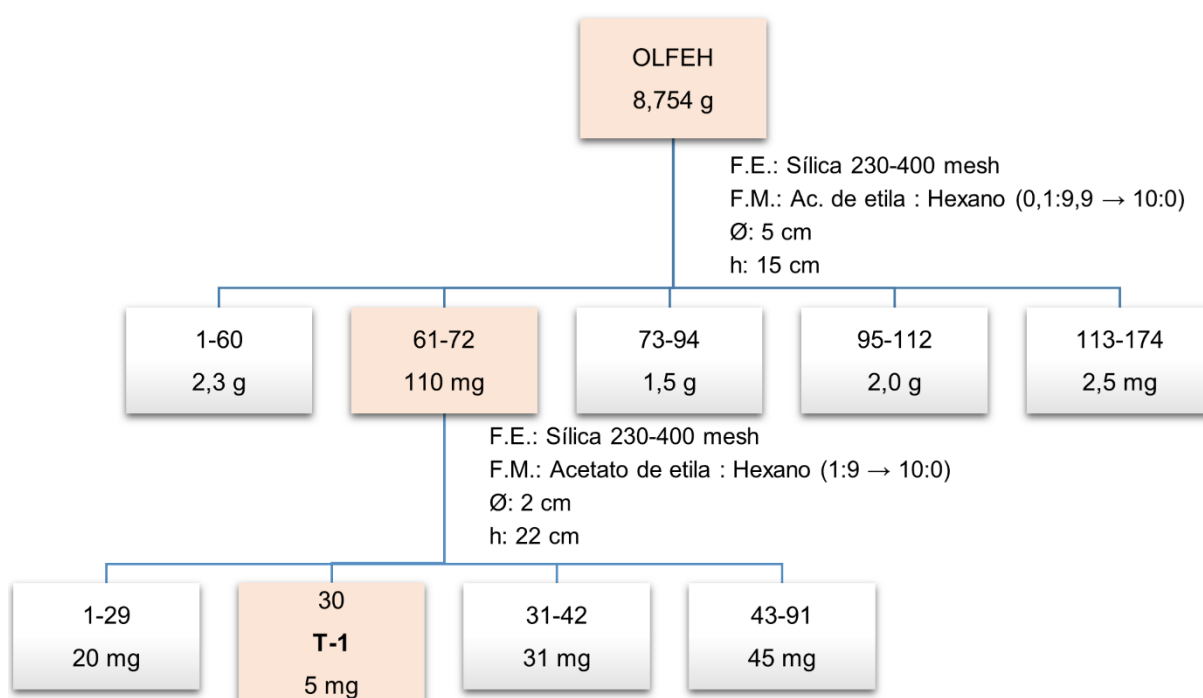
4.2.3.2 Isolamento de T-1 a partir de OLFEH

A fração OLFEH (8,754 g) foi fracionada por cromatografia de adsorção em coluna de Sílica 230-400 mesh ($\Phi = 5$ cm e $h = 15$ cm) eluída com gradientes de acetato de etila e hexano (0,1:9,9 → 10:0). Obteve-se 174 frações. As quais foram analisadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) reveladas com vanilina ácida.

A fração 61-72 (110 mg) foi refractionada em coluna de sílica 230-400 mesh ($\Phi = 2,0$ cm e $h = 22$ cm) eluída com gradientes de acetato de etila e hexano (1:9 \rightarrow 10:0). Obteve-se 91 frações. As referidas frações foram analisadas por CCDA reveladas com vanilina ácida, onde indícios de pureza foram observados na fração 30 (5 mg). A qual foi denominada **T-1**. O procedimento descrito é mostrado na Figura 9.

De T-1 foram feitas análises de IV (KBr) e RMN 1D ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz).

Figura 9: Fluxograma do Isolamento de T-1.



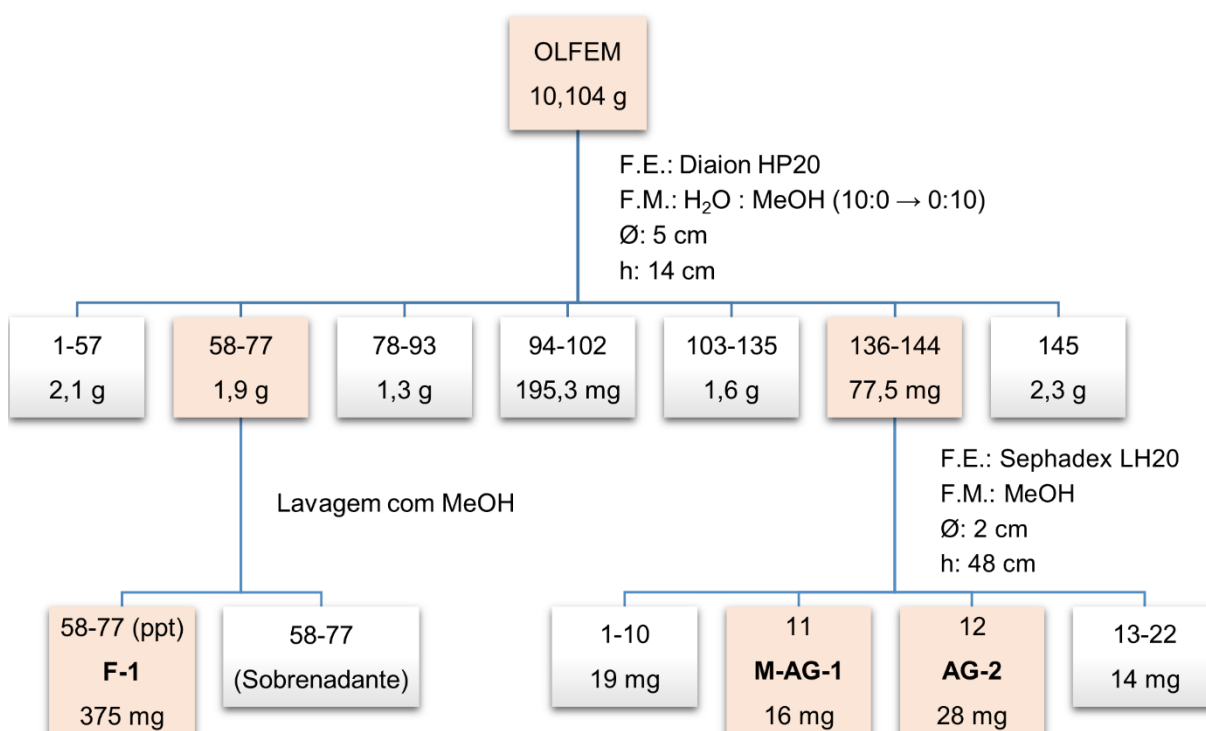
“OLFEH” – Fração Hexânica das Folhas de *O. lutea*; “F.E.” – Fase estacionária; “F.M.” – Fase móvel;
 “Ø” – Diâmetro da Coluna; “h” – Altura da coluna.

4.2.3.3 Isolamento de F-1, M-AG-1 e AG-2 a partir de OLFEM

A fração OLFEM (10,104 g) foi fracionada por CC de Diaion HP-20 ($\Phi = 5$ cm e $h = 14$ cm) eluída com gradientes de H_2O e MeOH (10:0 \rightarrow 0:10). Obteve-se 145 frações. Das quais, houve a formação de precipitado na fração 58-77 (1,9 g), o qual foi lavado sucessivamente com MeOH. Do respectivo ppt (375 mg), denominado **F-1** (Figura 10), foram feitas análises de RMN 1D ^1H (MeOD, 500 MHz) e ^{13}C (MeOD, 125 MHz).

A fração 136-144 (77,5 mg) foi refracionada por cromatografia de permeação em gel em coluna de Sephadex LH-20 ($\Phi = 2,0$ cm e $h = 48$ cm) eluída com MeOH. Obteve-se 22 frações. As frações 11 (16 mg) e 12 (28 mg) (Figura 10), foram denominadas **M-AG-1** e **AG-2**, respectivamente. Das quais foram feitas análises de RMN 1D e 2D ^1H (MeOD, 500 MHz), ^{13}C (MeOD, 125 MHz), HSQC e HMBC, como também EM-IES.

Figura 10: Fluxograma do Isolamento de F-1, M-AG-1 e AG-2 a partir de OLFEM.



“OLFEM” – Fração Metanólica das Folhas de *O. lutea*; “F.E.” – Fase estacionária; “F.M.” – Fase móvel; “Ø” – Diâmetro da Coluna; “h” – Altura da coluna.

4.3 BIOENSAIOS

4.3.1 Ensaio de Citotoxicidade *in vitro*

O extrato, frações e o isolado F-1 de *O. lutea* foram submetidos à ensaios de citotoxicidade em células tumorais. Os quais foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) da Universidade Federal do Ceará (UFC) por meio da redução do MTT, método descrito inicialmente por Mosmann (1983).

4.3.1.1 Manutenção das Linhagens Celulares

As linhagens tumorais utilizadas para a avaliação da atividade antiproliferativa foram doadas pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (US-NCI). As células e suas respectivas concentrações de plaqueamento para o teste do MTT são listadas na Tabela 1.

Tabela 1: Linhagens celulares e concentrações de plaqueamento para os ensaios de citotoxicidade.

Linhagem Celular	Tipo Histológico	Origem	Concentração de Plaqueamento
HCT-116	Carcinoma de cólon	Humana	7×10^4 céls.mL ⁻¹
PC-3	Adenocarcinoma de próstata	Humana	1×10^5 céls.mL ⁻¹
HL-60	Leucemia promielocítica	Humana	3×10^5 céls.mL ⁻¹

O procedimento adotado e padronizado pelo grupo de pesquisa do LOE tem por finalidade realizar apenas a triagem dos compostos (PINHEIRO et al., 2016; SOUZA et al., 2017). Desta forma, os compostos promissores são testados novamente em ensaios que incluam controles positivos e negativos, assim como células normais (CASTRO et al., 2016).

As linhagens celulares foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco), suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) e 1 % de antibióticos (penicilina/estreptomicina), e mantidas em incubadora (NUAIRE, modelo TS Autoflow a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂).

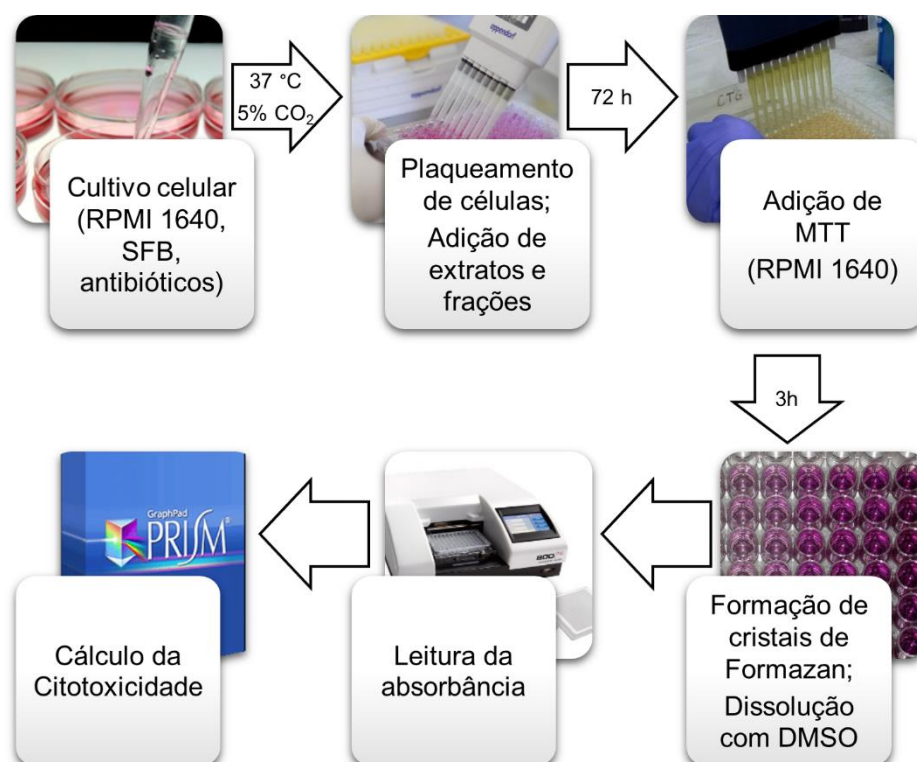
4.3.1.2 Avaliação do Efeito Citotóxico

O referido ensaio é um método colorimétrico que objetiva quantificar a atividade mitocondrial por meio da redução do sal brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) de cor amarela, resultando na formação de cristais de formazan, de cor púrpura, em células metabolicamente ativas. Sendo a quantificação realizada por absorbância em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983). O processo é descrito a seguir e ilustrado na Figura 11.

Ao passo em que células foram plaqueadas em multiplacas de 96 poços, cuja concentração de plaqueamento utilizada é mostrada na Tabela 1, o extrato OLFE e as frações OLFEH, OLFED, OLFEA, OLFEM foram diluídas em DMSO puro estéril na concentração de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e a substância pura F-1 diluída à $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C a $5\% \text{CO}_2$, os compostos-teste foram adicionados e as células foram incubadas por 72 horas. As placas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Foi adicionado $150 \mu\text{L}$ de solução de MTT a 1% diluído em meio RPMI 1640 em cada poço e as placas foram reincubadas por 3 horas. Posteriormente foram acrescentados $150 \mu\text{L}$ de DMSO puro a cada poço, para a dissolução dos cristais de formazan. A absorbância foi lida em espectrofotômetro de placa a 595nm . Os experimentos foram analisados segundo a média \pm desvio padrão da média (DP) da porcentagem de Inibição do Crescimento celular (IC), usando o programa *GraphPad Prism*.

Figura 11: Ensaio de Citotoxicidade *in vitro* pelo MTT.



“RPMI 1640” – Meio de cultura; “SFB” – Soro fetal bovino; “MTT” – brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil tetrazólio; “DMSO” – Dimetilsulfóxido.

4.3.2 Ensaio de Atividade Inseticida *in vitro*

O extrato e frações de *O. lutea* foram submetidos à bioensaios de toxicidade em formigas *Atta sexdens rubropilosa*. Os ensaios foram realizados no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) baseados na metodologia de Bueno et al. (1997).

4.3.2.1 Manutenção das Formigas Cortadeiras

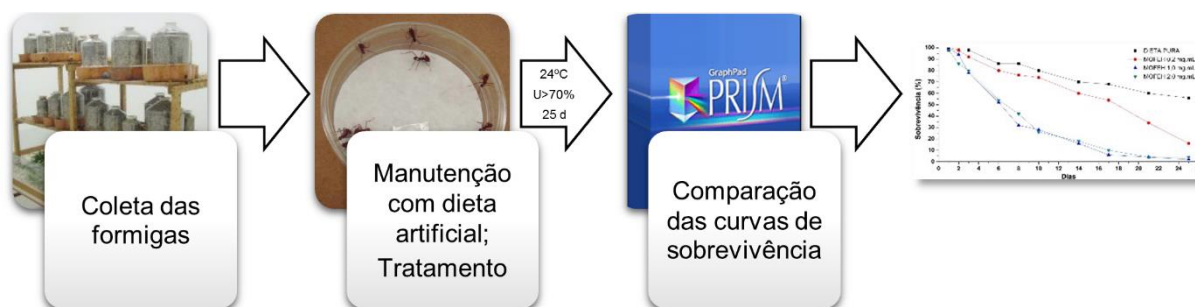
As operárias de *A. sexdens rubropilosa* foram coletadas de formigueiros mantidos em laboratório com folhas de *Eucalyptus* sp., flocos de aveia e, ocasionalmente, *Hibiscus* sp., *Ligustrum* sp. ou folhas e pétalas de roseiras.

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

4.3.2.2 Avaliação da Atividade Inseticida

O método consiste em verificar a porcentagem de mortalidade e a sobrevivência mediana de formigas operárias (*A. sexdens rubropilosa*), mantidas com dieta artificial, após a ingestão diária de compostos teste em três concentrações distintas por um período de 25 dias (BUENO et al., 1997) (Figura 12).

Figura 12: Ensaio de atividade inseticida *in vitro* com *Atta sexdens rubropilosa*.



“U” – Umidade relativa.

A atividade inseticida sobre as formigas foi verificada pela ingestão do extrato e frações das folhas de *O. lutea* incorporados à dieta artificial sólida em três concentrações (0,2; 1,0 e 2,0 mg.mL⁻¹). Primeiramente, foram incorporados à glicose e aos demais ingredientes secos da dieta e, posteriormente, à água destilada. Em seguida, a mistura obtida foi solubilizada em forno micro-ondas, esterilizada e armazenada como dieta controle.

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

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS

A partir de 303 g de folhas pulverizadas obteve-se 54,73 g de OLFE. O fracionamento resultou em 9,98 g de OLFEH, 3,0 g de OLFED, 10,59 g de OLFEA e 15,82 g de OLFEM. O rendimento em porcentagem de massa é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Rendimento (Rend.) dos extratos obtidos de *O. lutea*.

Material de Partida		Extração			Fracionamento		
<i>O. lutea</i>	Massa (g)	Identificação	Massa (g)	Rend. (%)	Identificação	Massa (g)	Rend. (%)
Folhas secas	303	OLFE	54,73	18,06	OLFEH	9,98	18,23
					OLFED	3,0	5,48
					OLFEA	10,59	19,34
					OLFEM	15,82	28,90
		Resíduo	248,27	81,94	15,34	28,05	
Total			303,00	100	54,73		100

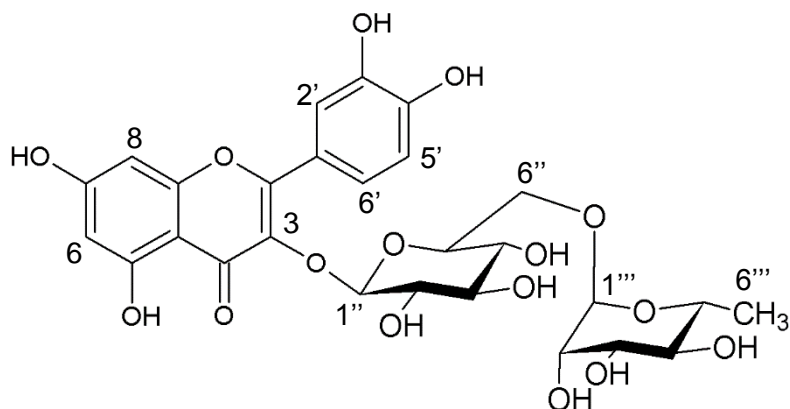
“OLFE” – Extrato Bruto Etanólico das Folhas de *O. lutea*; “OLFEH” – Fração Hexânica das Folhas de *O. lutea*; “OLFED” – Fração Diclorometânica das Folhas de *O. lutea*; “OLFEA” – Fração Acetato-etílica das Folhas de *O. lutea*; “OLFEM” – Fração Metanólica das Folhas de *O. lutea*.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

5.2.1 Identificação de F-1

O fracionamento de OLFEA e OLFEM forneceram a substância **F-1**, que se apresentou como sólido amorfo amarelo. A qual foi submetida a análises de IV, RMN 1D e 2D. A estrutura química do flavonoide identificado é mostrada na Figura 13.

Figura 13: Estrutura química do flavonoide rutina.



As bandas de absorção em 3377 e 1653 cm^{-1} no espectro de IV (Figura 14) indicam a presença de grupos hidroxila e carbonila, respectivamente. São notados também estiramentos C=C de núcleos aromáticos em torno de $1597\text{-}1362\text{ cm}^{-1}$.

No espectro de RMN ^1H (Figura 15) observa-se sinais cujas multiplicidades sugerem um sistema de substituição 3',4' no anel aromático B do núcleo quercentina (OKOYE; OKOYE, 2016). São eles, um duplo duplete em $\delta_{\text{H}} 7,65$ referente ao hidrogênio H-6' ($J = 8,4$ e $2,2$ Hz), um duplete em $\delta_{\text{H}} 7,68$ referente ao hidrogênio H-2' ($J = 2,2$ Hz) e um duplete em $\delta_{\text{H}} 6,89$ referente ao hidrogênio H-5' ($J = 8,4$ Hz). Observa-se também dois dupletos, um em $\delta_{\text{H}} 6,42$ ($J = 2,1$ Hz) e outro em $\delta_{\text{H}} 6,23$ ($J = 2,1$ Hz) atribuídos a H-8 e H-6, respectivamente, do anel A.

O espectro de RMN ^1H ainda apresenta multipletos relativos a hidrogênios carbinólicos na região entre $\delta_{\text{H}} 3,0$ e $4,0$ e de hidrogênios anoméricos entre $\delta_{\text{H}} 4,5$ e $5,5$, que sugerem a ligação de unidades de açúcares a este flavonoide. Há um duplete absorvendo em $\delta_{\text{H}} 5,13$ ($J = 7,6$ Hz), atribuído ao hidrogênio H-1'', cujo deslocamento e multiplicidade são característicos do β -D-glicosídeo. Como também um duplete em $\delta_{\text{H}} 4,54$ ($J = 1,1$ Hz), atribuído ao hidrogênio H-1''', além de um duplete, integrando para três hidrogênios, em $\delta_{\text{H}} 1,14$ ($J = 6,3$ Hz), que indicam a presença de uma unidade α -L-raminose (MOURA; VILEGA; SANTOS, 2011; OKOYE; OKOYE, 2016).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 16) apresenta um sinal com deslocamento químico de $\delta_{\text{C}} 178,0$ atribuída ao carbono C-4, uma vez que é um sinal típico de carbonilas queladas em flavonoides. E a ocorrência de dez sinais na região entre $\delta_{\text{C}} 77,0$ e $16,0$ e dois sinais, um em $\delta_{\text{C}} 103,2$ e outro em $\delta_{\text{C}} 101,0$, referentes aos

carbonos anoméricos C-1'' e C-1''', respectivamente, vem confirmar a existência das duas unidades de açúcares.

O espectro de HMBC (Figura 17) mostra a correlação do hidrogênio anomérico H-1'' (δ_H 70,8) da unidade de glicose com o carbono C-3 (δ_C 134,2) do flavonoide. Como também a correlação do hidrogênio H-1''' da unidade de ramnose com os carbonos C-2''' (δ_C 70,8) e C-5''' (δ_C 68,3) desse mesmo açúcar, e com C-6'' (δ_C 67,15) da glicose. Além da correlação do hidrogênio H-6''' (δ_H 1,14) com os carbonos C-4''' (δ_C 72,5) e C-5''' (δ_C 68,3). As principais correlações que confirmam a proposição são evidenciadas na Figura 17.

As análises dos espectros de IV, RMN 1H , ^{13}C , HMBC e posterior comparação com dados descritos na literatura (Tabela 3) resultaram na identificação do flavonoide rutina ($C_{27}H_{30}O_{16}$ - quercetina-3-O- β -D-glicose-6''-O- α -L-raminosil).

Rutina foi isolada de diversas espécies de Apocynaceae, dentre as quais destaca-se *Hancornia speciosa* Gomes e *Alstonia boonei* De Wild, as quais exibiram atividade anti-inflamatória (TORRES-RÊGO et al., 2016), antioxidante e antimicrobiana (OKOYE; OKOYE, 2016). O flavonoide apresenta também atividade anticarcinogênica (BECHO; MACHADO; GUERRA, 2009).

Figura 14: Espectro de IV (ATR) de F-1.

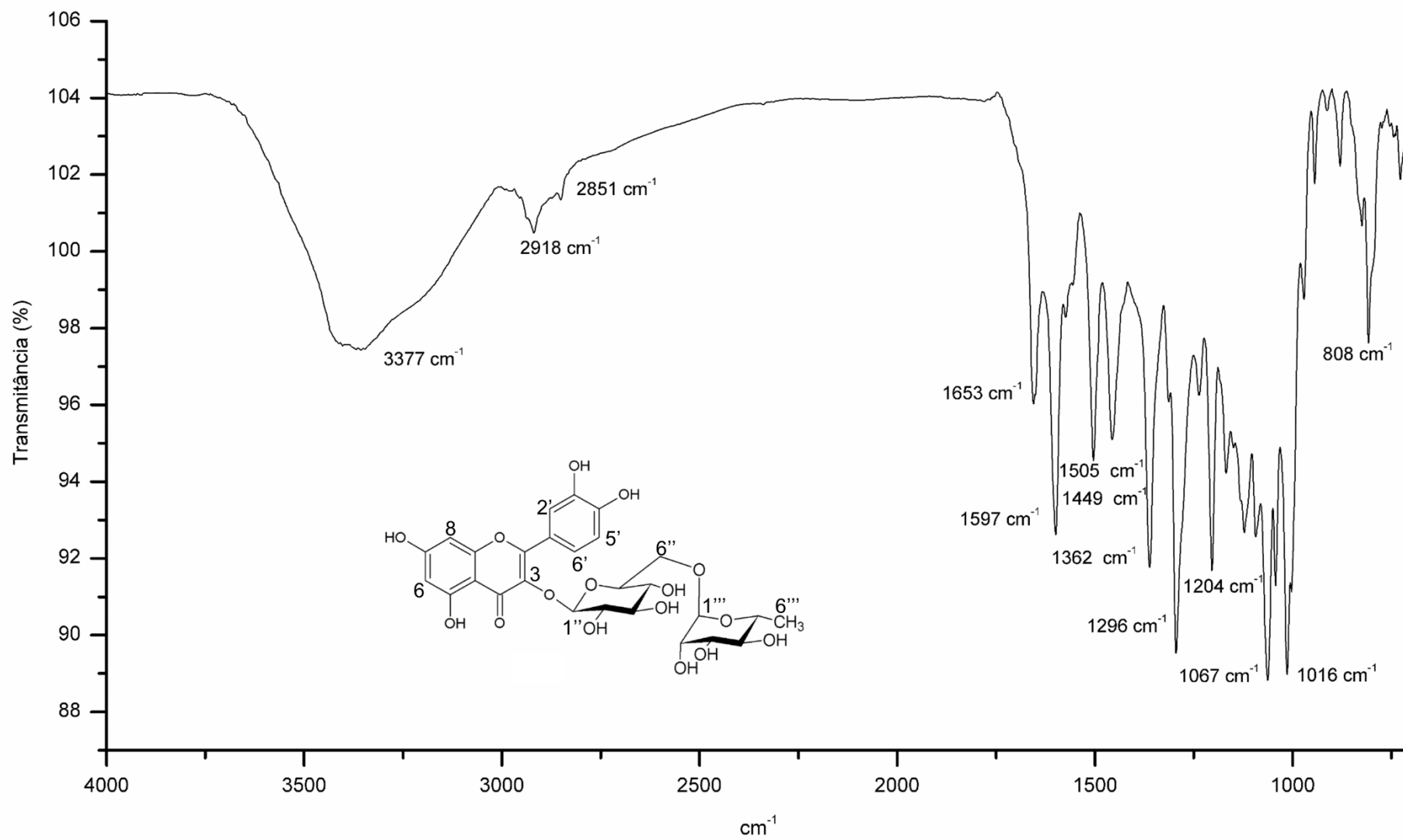
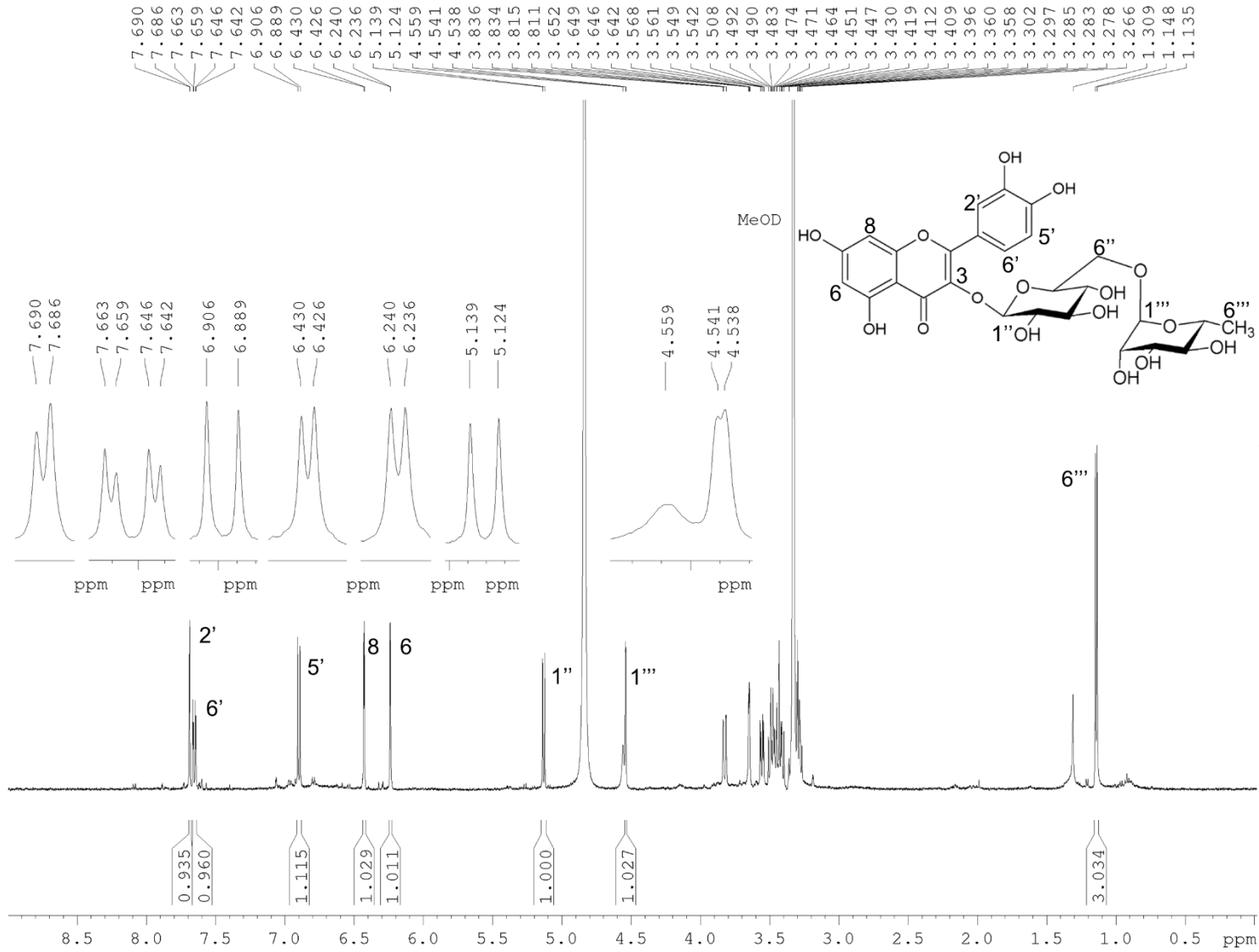


Figura 15: Espectro de RMN ¹H de F-1 (MeOD, 500MHz).



Current Data Parameters
 NAME F-1
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20170403
 Time 14.47
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm BBO BB-1H
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT MeOD
 NS 16
 DS 2
 SWH 10000.000 Hz
 FIDRES 0.152588 Hz
 AQ 3.2767999 sec
 RG 203
 DW 50.000 usec
 DE 6.50 usec
 TE 298.0 K
 D1 1.00000000 sec
 TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
 SFO1 500.1330885 MHz
 NUC1 1H
 P1 12.00 usec
 PLW1 22.00000000 W

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 500.1300000 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

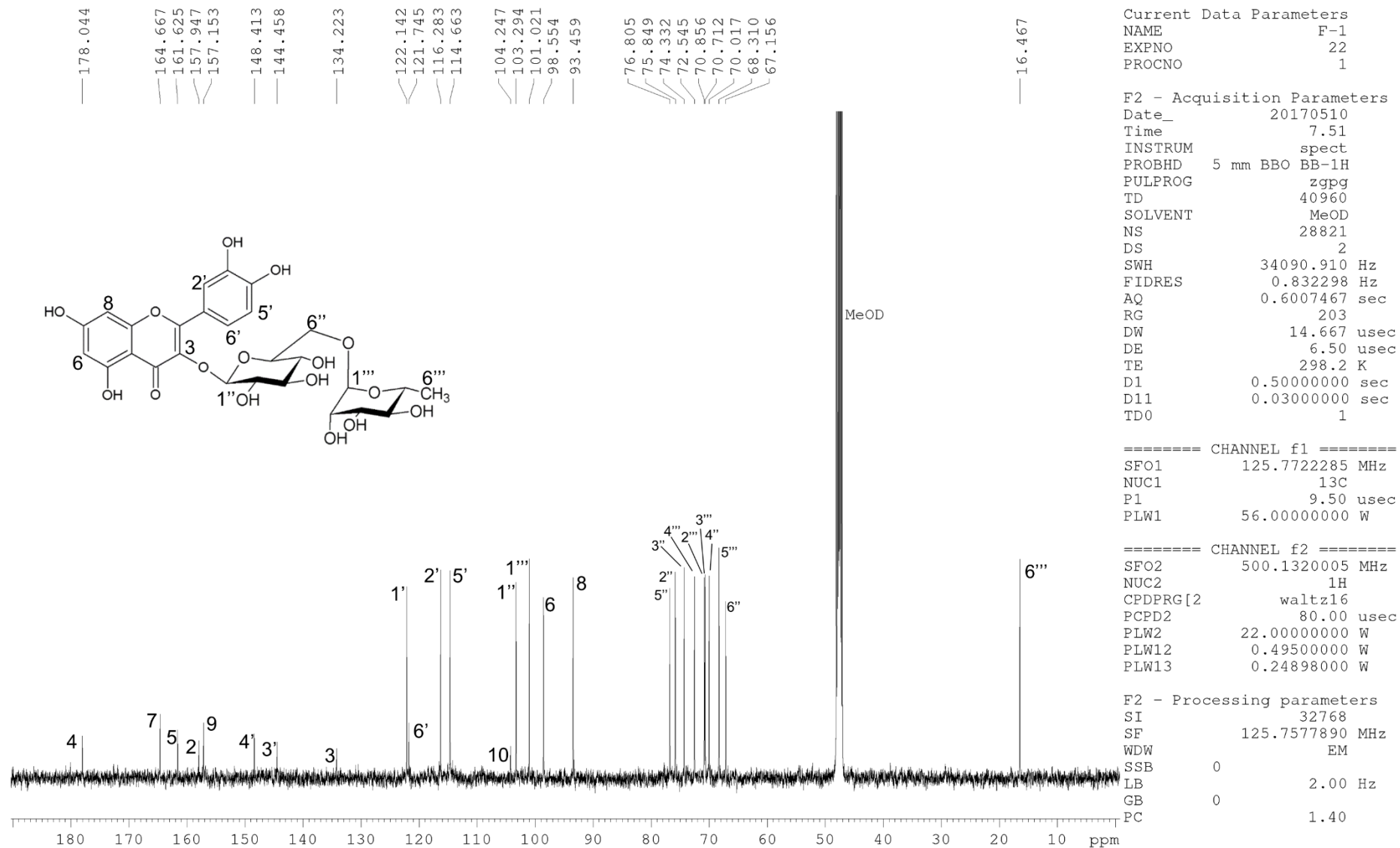
Figura 16: Espectro de RMN ¹³C de F-1 (MeOD, 125 MHz).

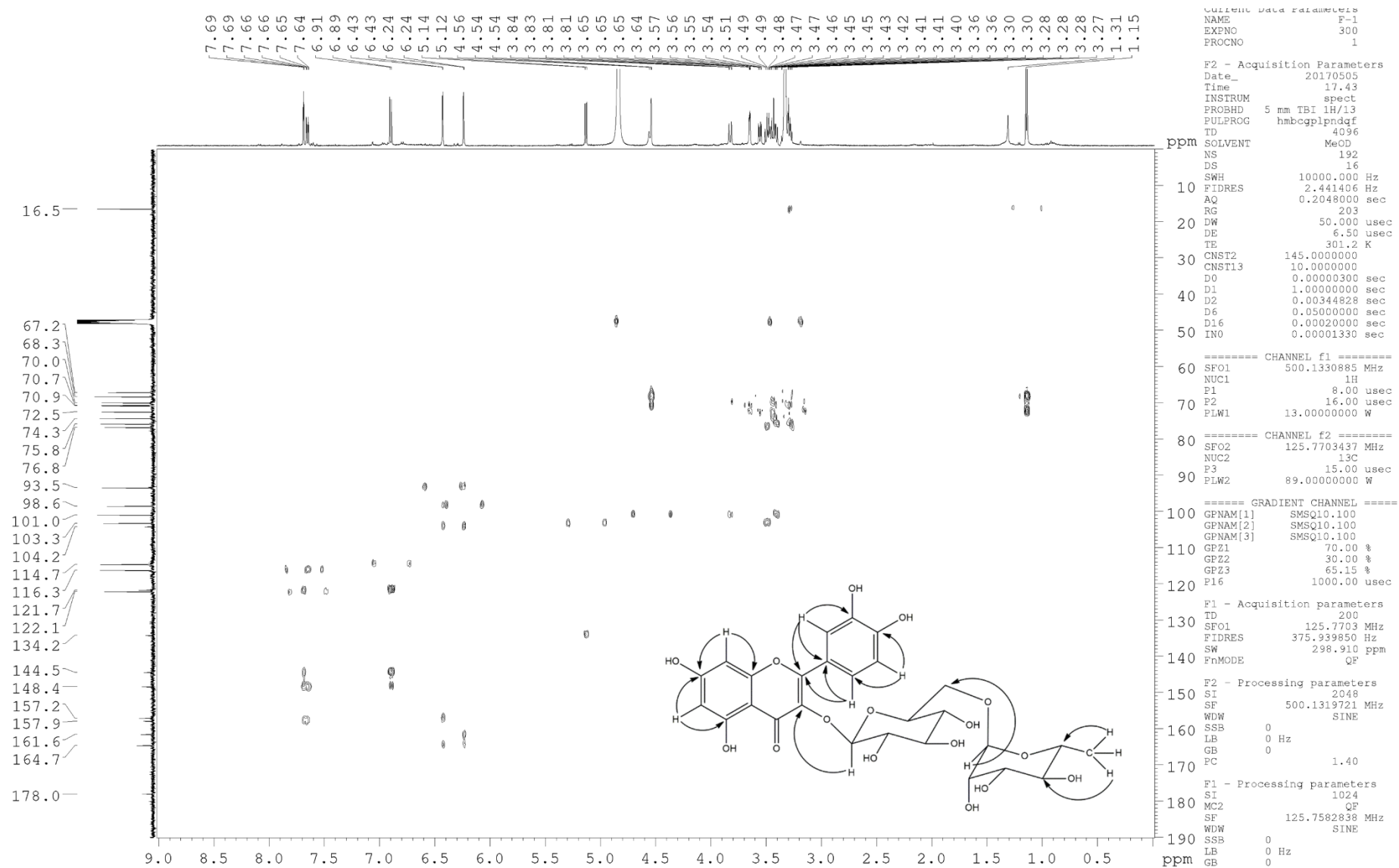
Figura 17: Espectro de HMBC de F-1 (MeOD, ^1H 500 MHz; ^{13}C 125 MHz).

Tabela 3: Dados de RMN ^1H (MeOD, 500 MHz) e ^{13}C (MeOD, 125 MHz) de F-1.

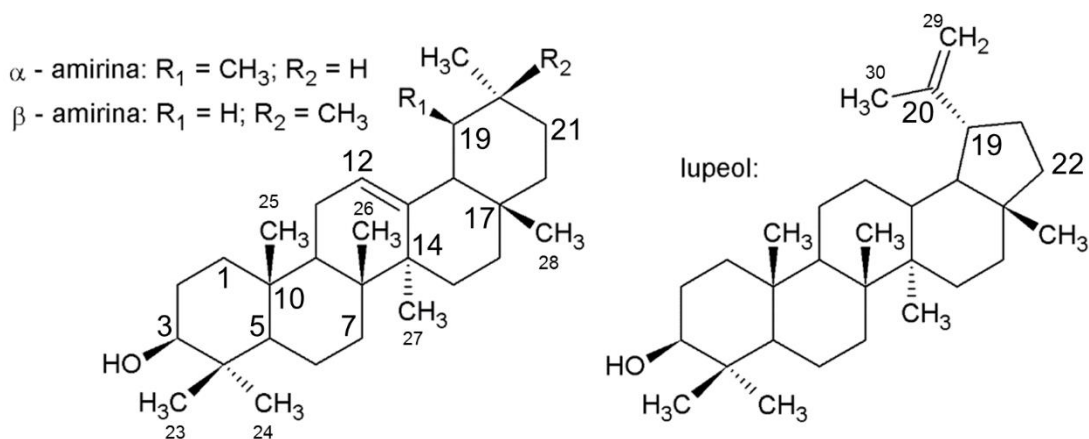
Posição	δ_{H} (ppm), J (Hz)		δ_{C} (ppm)	
	Rotina			
	F-1	Moura, Vilega, Santos (2011)	F-1	Moura, Vilega, Santos (2011)
2	-	-	157,9	156,5
3	-	-	134,2	133,2
4	-	-	178,0	177,3
5	-	-	161,6	161,2
6	6,23 (<i>d</i> , $J = 2,1$)	6,20 (<i>d</i> , $J = 2,1$)	98,5	98,7
7	-	-	164,6	164,5
8	6,42 (<i>d</i> , $J = 2,1$)	6,40 (<i>d</i> , $J = 2,1$)	93,4	93,6
9	-	-	157,2	156,4
10	-	-	104,2	103,7
1'	-	-	122,1	121,5
2'	7,68 (<i>d</i> , $J = 2,1$)	7,53 (<i>d</i> , $J = 2,0$)	116,2	116,2
3'	-	-	144,4	115,2
4'	-	-	148,4	148,5
5'	6,89 (<i>d</i> , $J = 8,4$)	6,83 (<i>d</i> , $J = 9,0$)	114,6	115,2
6'	7,65 (<i>dd</i> , $J = 8,4$ e $2,1$)	7,75 (<i>dd</i> , $J = 7,8$ e $2,4$)	121,7	121,0
1''	5,13 (<i>d</i> , $J = 7,6$)	5,44 (<i>d</i> , $J = 7,2$)	103,2	101,2
2''	-	-	75,8	75,8
3''	-	-	74,3	74,0
4''	-	-	70,0	69,9
5''	-	-	76,8	76,4
6''	-	-	67,5	66,9
1'''	4,54 (<i>d</i> , $J = 1,1$)	4,38 (<i>d</i> , $J = 1,0$)	101,0	100,7
2'''	-	-	70,8	70,5
3'''	-	-	70,7	70,3
4'''	-	-	72,5	71,8
5'''	-	-	68,3	68,2
6'''	1,14 (<i>d</i> , $J = 6,3$)	0,99 (<i>d</i> , $J = 6,0$)	16,4	17,6

" δ_{H} " – Deslocamento químico de Hidrogênio; " δ_{C} " – Deslocamento químico de Carbono; " J " – Constante de acoplamento; "*d*" – Duplete; "*dd*" – Duplo duplete.

5.2.2 Identificação de T-1

O fracionamento de OLFEH forneceu a mistura **T-1**, que se apresentou como sólido amorfo branco, a qual foi submetida a análises de IV, RMN 1D. As fórmulas estruturais dos triterpenos identificados são mostradas na Figura 18.

Figura 18: Estruturas químicas dos triterpenos da α -amirina, β -amirina e lupeol.



A banda de absorção na região de 3368 cm^{-1} no espectro de IV (Figura 19) indica a presença de grupos hidroxila em T-1. Os estiramentos em $2942\text{-}2920 \text{ cm}^{-1}$ são atribuídos às ligações $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$, enquanto $2869\text{-}2858 \text{ cm}^{-1}$ às $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$. Os estiramentos em 1463 , 1455 e 1378 cm^{-1} sugerem a presença de ligações do tipo $\text{C}=\text{C}$. São percebidos também os estiramentos C-O em 1050 , 1037 e 955 cm^{-1} .

Na região característica de hidrogênios olefínicos ($\delta_{\text{H}} 4,5\text{-}7,5$) do espectro de RMN ^1H (Figura 20) observa-se dois tripletos, um em $\delta_{\text{H}} 5,12$ ($J = 3,6 \text{ Hz}$) e outro em $\delta_{\text{H}} 5,18$ ($J = 3,7 \text{ Hz}$) próprios dos hidrogênios H-12 dos triterpenos α -amirina, β -amirina, respectivamente. Nesta região ainda observa-se um multipletto em $\delta_{\text{H}} 4,56$ e um dupletto em $\delta_{\text{H}} 4,68$ ($J = 2,0 \text{ Hz}$) característicos dos dois hidrogênios $\text{H}_{\text{a/b-}29}$ do lupeol (SOUZA et al., 2001). Hidrogênios os quais, $\text{H-}12_{\alpha\text{-amirina}}$, $\text{H-}12_{\beta\text{-amirina}}$, e $\text{H}_{\text{a/b-}29_{\text{lupeol}}}$, encontram-se integrados na proporção de 3:1:3, o que pode inferir o minoritarismo de β -amirina na mistura.

O espectro de RMN ^1H ainda apresenta multipletos em torno de $\delta_{\text{H}} 3,20$ atribuídos aos H-3 α de ambas as substâncias. O que é confirmado pelo espectro de RMN ^{13}C (Figura 21) que apresenta três sinais em $\delta_{\text{C}} 79,0$, sinais estes característicos da ligação de grupos álcoois na posição C-3 β (OLEA; ROQUE, 1990).

A observação do espectro de RMN ^{13}C vem confirmar as indicações, visto que os deslocamentos químicos dos carbonos sp^2 são bastante característicos de cada esqueleto. O espectro de RMN ^{13}C apresentou sinais em δ_{C} 139,6 e 124,4 próprios dos carbonos C-13 e C-12 da α -amirina. Bem como os sinais em δ_{C} 150,9 e 109,3, próprios dos carbonos C-20 e C-29 do lupeol. No entanto, quanto aos deslocamentos característicos dos carbonos olefinicos de β -amirina, observa-se apenas o sinal δ_{C} 121,7 atribuído ao carbono C-12 (OLEA; ROQUE, 1990). A não percepção do sinal em δ_{C} 145,1 do C-13 de β -amirina pode-se apoiar na minotirariedade da substância na mistura, como observado nas integrais do espectro de RMN ^1H .

As análises dos espectros de IV, RMN ^1H , ^{13}C e posterior comparação com dados descritos na literatura (Tabela 4) resultaram na identificação dos triterpenos α -amirina ($\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ - 3 β -hidroxi-urs-12-en-3-ol), β -amirina ($\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ - 3 β -hidroxi-olean-12-en-3-ol) e lupeol ($\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ - Lup-20(29)-en-3 β -ol).

Os três triterpenos foram amplamente isolados de Apocynaceae (ASSIS JUNIOR et al., 2013; EL-KASHEF et al., 2015). Inclusive, α -amirina e lupeol de *O. macrantha* (CHATURVEDULA et al., 2003). Como também em plantas do gênero *Hoya* (EBAJO JR.; SHEN; RAGASA, 2015) e *Mandevilla* (CORDEIRO et al., 2011). Por serem, geralmente, encontrados em mistura (OLEA; ROQUE, 1990), a literatura aponta métodos para sua separação (DIAS; HAMERSKI; PINTO, 2011). Para os três triterpenos são relatadas atividades antioxidante e anti-inflamatória (MELO et al., 2010; PEDERNERA et al., 2010) assim como atividade citotóxica (KEAWSA-ARD; LIAWRUANGRATH; KONGTAWHEELERT, 2015).

Figura 19: Espectro de IV (KBr) de T-1.

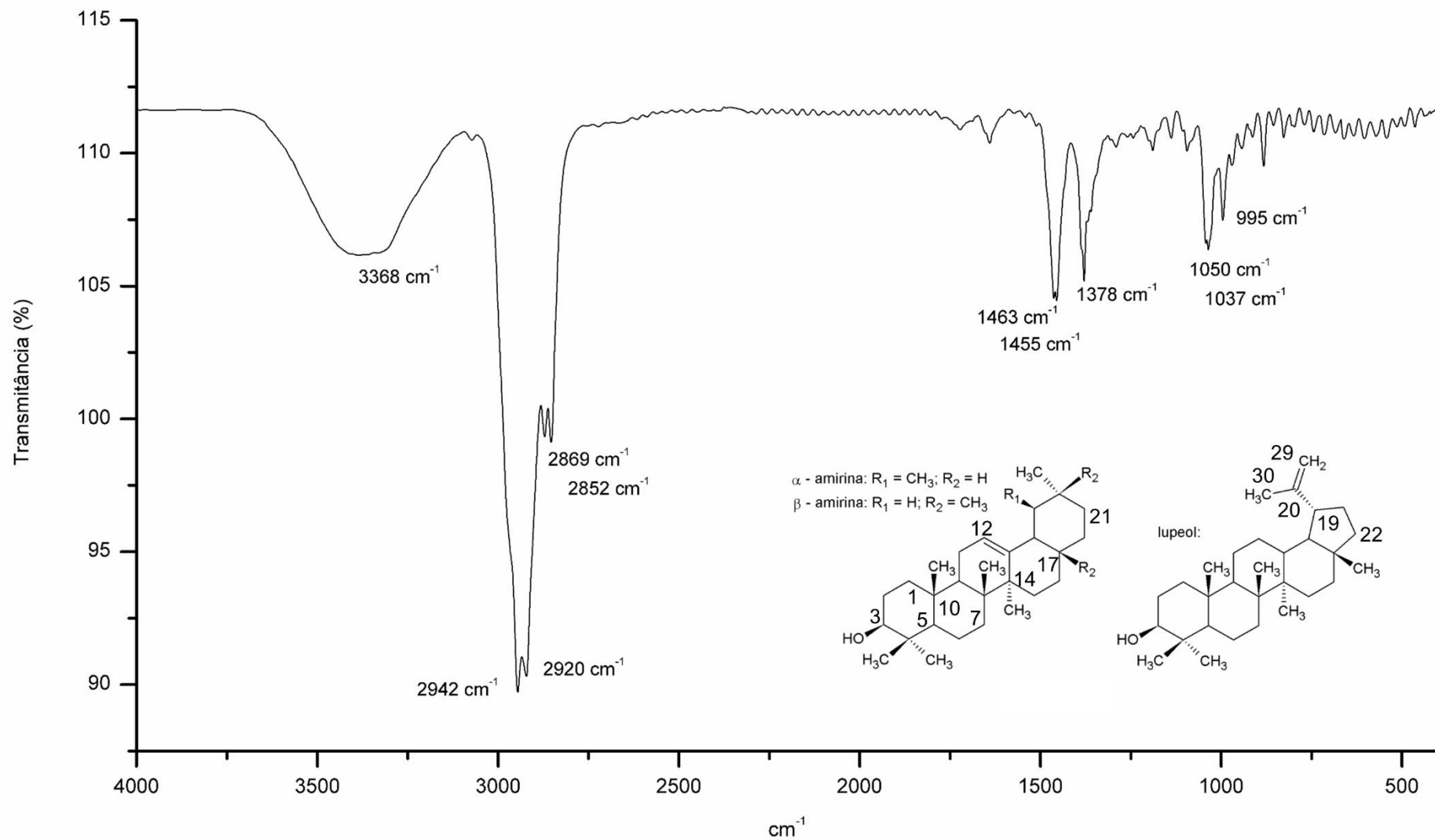


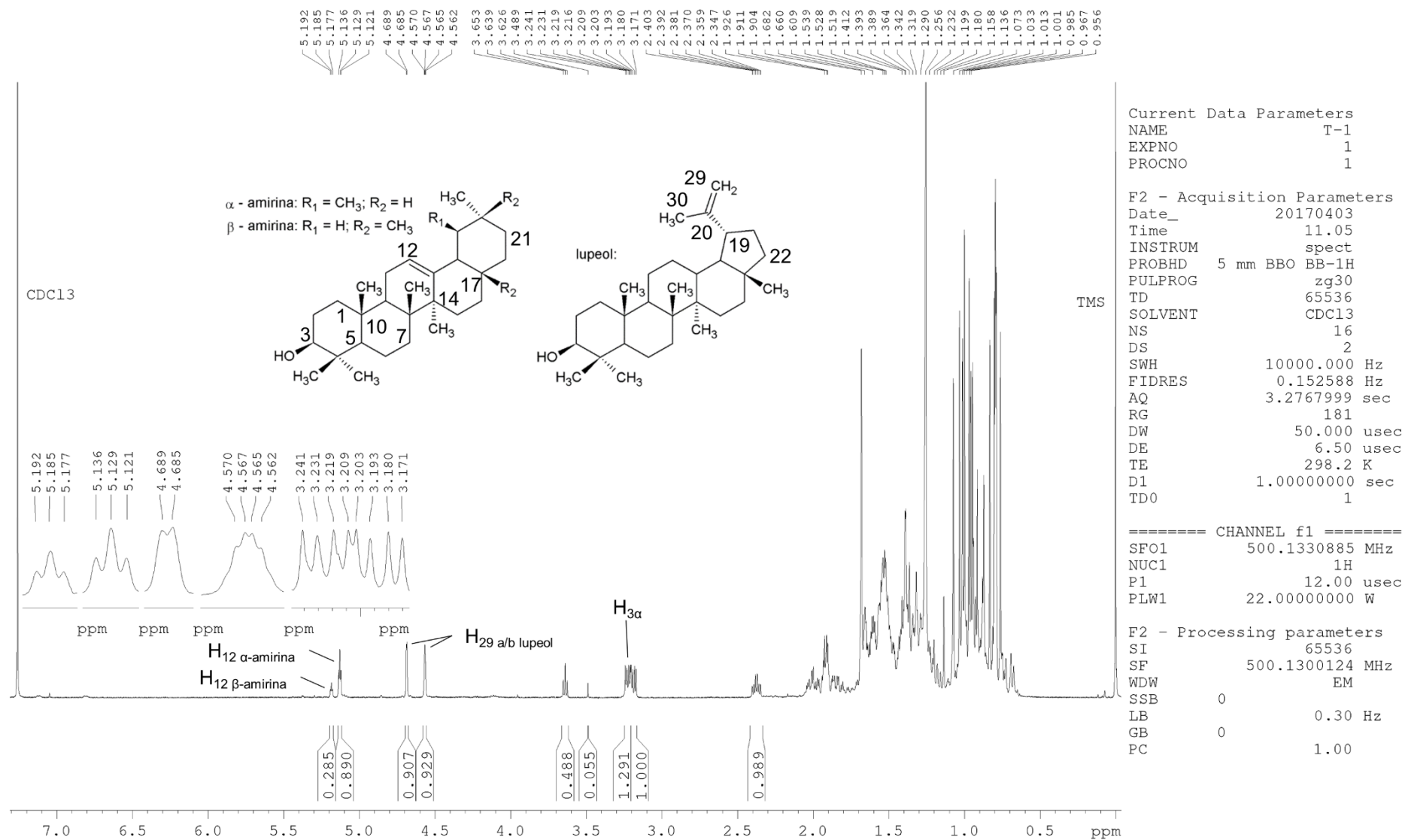
Figura 20: Espectro de RMN ¹H de T-1 (CDCl₃, 500 MHz).

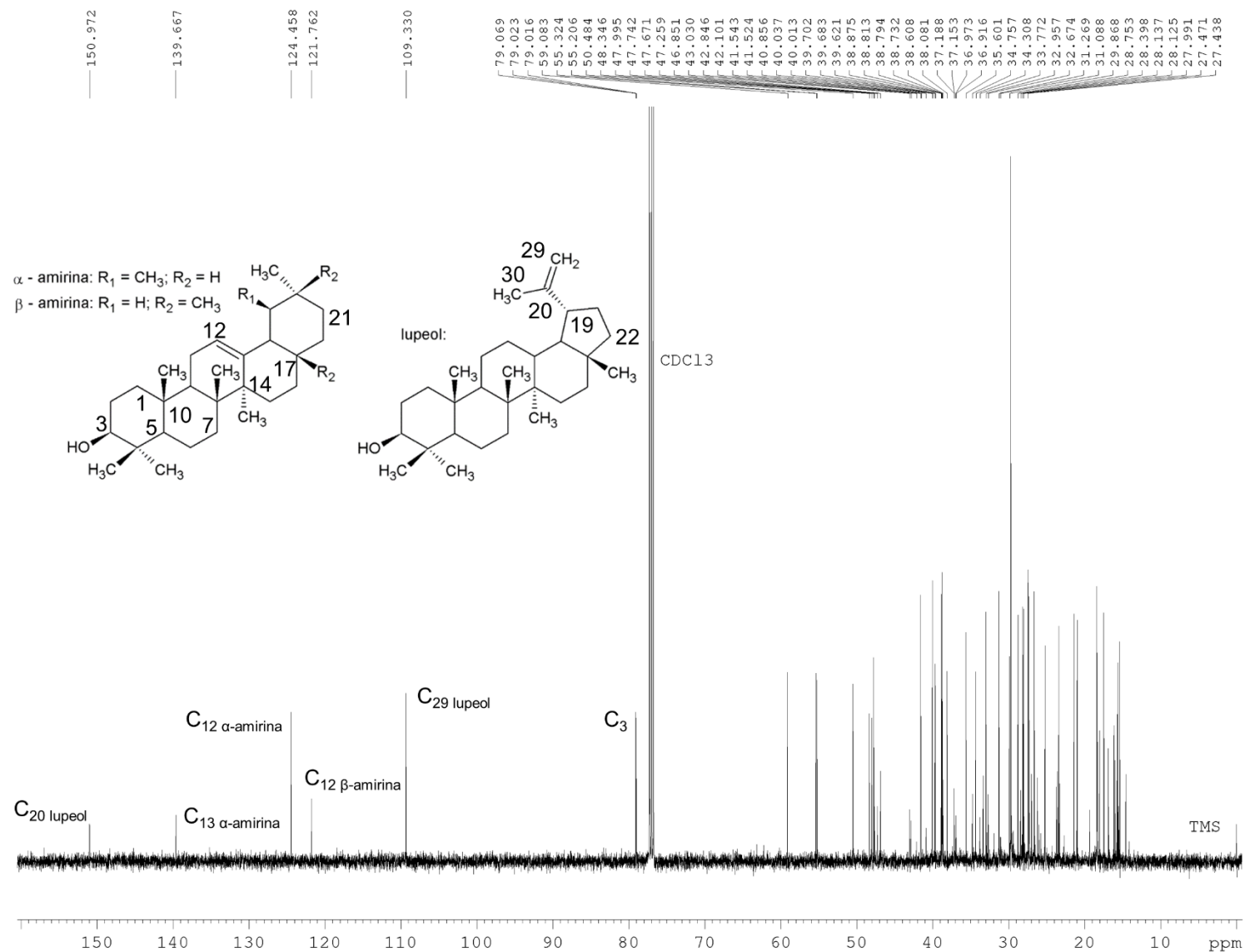
Figura 21: Espectro de RMN ^{13}C de T-1 (CDCl_3 , 125 MHz).

Tabela 4: Dados de RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz) de T-1.

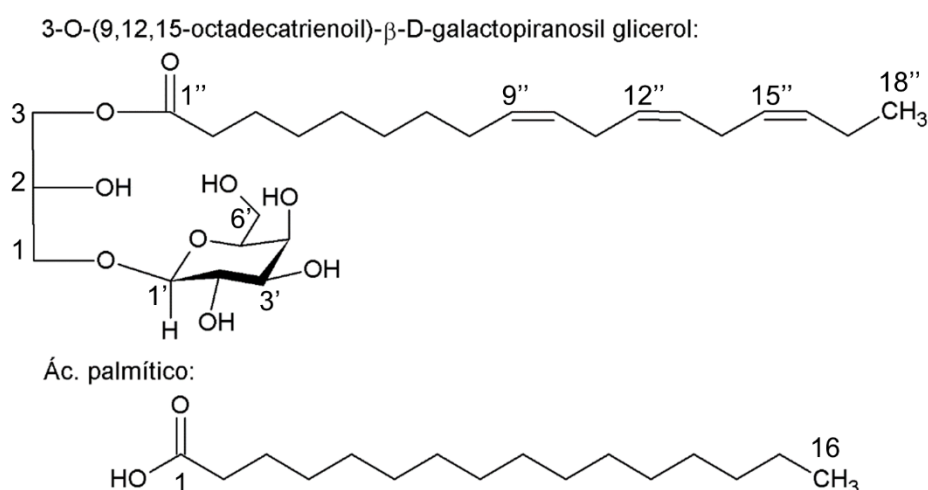
Posição	δ_c (ppm)					
	α -amirina		β -amirina		Lupeol	
	T-1	Dias, Hamerski, Pinto (2011)	T-1	Dias, Hamerski, Pinto (2011)	T-1	Assis Junior et al. (2013)
C-1	38,7	38,7	38,7	38,7	38,8	38,7
C-2	28,7	28,7	27,2	27,2	27,4	27,4
C-3	79,0	79,6	79,0	79,3	79,0	79,0
C-4	38,7	38,7	38,6	38,5	38,8	38,8
C-5	55,2	55,1	55,2	55,1	55,3	55,3
C-6	18,3	18,4	18,3	18,6	18,3	18,3
C-7	32,9	32,2	32,6	32,4	34,3	34,3
C-8	40,0	40,0	39,7	39,8	40,8	40,8
C-9	47,7	47,7	47,7	47,6	50,4	50,4
C-10	36,9	36,9	36,9	36,9	37,1	37,2
C-11	23,3	23,3	23,3	23,6	20,9	20,9
C-12	124,4	124,4	121,7	121,7	25,1	25,2
C-13	139,6	139,5	-	145,2	38,0	38,1
C-14	42,1	42,0	41,5	41,7	42,8	42,8
C-15	27,2	27,2	26,6	26,2	27,4	27,4
C-16	26,6	26,6	26,6	26,1	35,6	35,6
C-17	33,7	33,7	32,6	32,6	43,0	43,0
C-18	59,0	59,0	47,2	47,2	48,3	48,3
C-19	39,6	39,6	46,8	46,8	47,9	48,0
C-20	39,6	39,6	31,0	31,0	150,9	150,9
C-21	31,2	31,2	34,7	34,7	29,8	29,9
C-22	41,5	41,5	37,1	37,1	40,0	40,0
C-23	28,1	28,1	27,9	28,0	28,1	28,0
C-24	15,6	15,6	15,3	15,4	15,3	15,4
C-25	15,6	15,6	15,3	15,4	16,1	16,1
C-26	16,8	16,8	16,8	16,8	15,9	16,0
C-27	23,2	23,2	26,1	25,9	14,5	14,5
C-28	28,1	28,1	28,4	28,4	18,0	18,0
C-29	17,4	17,4	33,7	33,8	109,3	109,3
C-30	21,4	21,4	23,7	23,7	19,3	19,3

"δ_c" – Deslocamento químico de Carbono.

5.2.3 Identificação de M-AG-1

O fracionamento de OLFEM forneceu **M-AG-1**, que se apresentou como precipitado branco em meio à óleo amarelo. A qual foi submetida a análises de RMN 1D, 2D e EM-IES. A Figura 22 mostra o monogalactosilmonoacilglicerol (MGMG) e o ácido graxo identificados.

Figura 22: Estrutura química do MGMT e do ácido palmítico.



No espectro de RMN ^1H (Figura 23) observa-se prótons da porção glicerol do MGMT, H-1 (m, δ_{H} 3,56) H-2 (m, δ_{H} 3,67) e H-3_{a/b} (dd, δ_{H} 4,09 e 4,17). Hidrogênios carbinólicos em δ_{H} 3,47-4,01. E um duplete em δ_{H} 4,24 ($J = 7,8$ Hz, 1H) atribuído ao hidrogênio anomérico H-1', cuja multiplicidade caracteriza um β -D-glicosídeo.

Para a porção ácida do MGMT, atribui-se os hidrogênios olefínicos H-9'', H-10'', H-12'', H-13'', H-15'' e H-16'' aos multipletos em δ_{H} 5,3-5,4 (6H). O tripleto em δ_{H} 2,83 ($J = 6,0$ Hz, 4H) aos hidrogênios metilênicos H-11'' e H-14''. Enquanto o tripleto em δ_{H} 2,37 ($J = 7,6$ Hz, 2H) é atribuído ao próton metilênico H-2''. E o tripleto em δ_{H} 0,99 ($J = 7,5$ Hz, 3H) aos hidrogênios H-18'' da metila terminal.

O tripleto em δ_{H} 0,92 ($J = 6,9$ Hz, 6H) é atribuído aos hidrogênios H-16 da metila terminal do ácido graxo livre. A razão entre as integrais das metilas, $\cong 1:2$, fornece a proporção das espécies químicas na mistura, MGMT e ác. graxo livre. Desta forma, o tripleto em δ_{H} 2,27 ($J = 7,4$ Hz, 4H) é atribuído aos hidrogênios H-2 do ácido.

Devido à semelhança entre as porções ácidas dos dois compostos, o espectro é caracterizado pela sobreposição de sinais. O multiplete em δ_{H} 1,63 é atribuído aos

prótons metilênicos H-3'' e H-3. Enquanto os multipletos na região δ_H 1,31-1,35 são atribuídos aos hidrogênios H-4''-7'' do MGMG e H-4-15 do ácido graxo.

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 24) observa-se sinais de carbonilas em δ_C 177,0 e δ_C 174,0. Os sinais em δ_C 131,3; 129,6; 127,8; 127,4; 127,4 e 126,8 são atribuídos às ligações duplas no MGMG. Os sinais em δ_C 69,7; 65,0 e 62,6 são atribuídos aos carbonos C-2, C-3 e C-1, respectivamente, da porção glicerol do MGMG. Em δ_C 103,9 o carbono C-1' do glicosídeo. Carbonos metilenos na região δ_C 34,1-20,0. Além de dois sinais de metilas terminais, ambos em δ_C 13,0.

O espectro de HSQC (Figura 25) permitiu as correlações apresentadas nas Tabelas 5 e 6. O espectro HMBC (Figura 26) confirma a carbonila em δ_C 177,0 para o ácido graxo livre, uma vez que não há correlações com a porção glicerol. Inclusive demonstra as substituições na porção glicerol. O hidrogênio anomérico H-1' (δ_H 4,24) do glicosídeo correlaciona-se com o carbono C-2 (δ_C 69,7) do glicerol. O hidrogênio H-1 (δ_H 3,56) do glicerol com o carbono C-1' (δ_C 103,9) do glicosídeo. Tanto o hidrogênio H-2 (δ_H 3,67) quanto H-3_{a/b} (δ_H 4,09 e 4,17) do glicerol correlacionam-se com a carbonila em δ_C 174,0, a qual é atribuída à porção linolênica do MGMG.

A fórmula molecular $C_{16}H_{32}O_2$, ácido palmítico, foi determinada por EM-IES(-) (Figura 27) como m/z 255,2347 [M-H]⁻. Observa-se resíduo de ácido linolênico ($C_{18}H_{30}O_2$) como m/z 277,2122 [M-H]⁻. A EM-IES no modo positivo (Figura 28) confirma a fórmula molecular $C_{27}H_{46}O_9$ do MGMG como m/z 537,3068 [M+Na]⁺.

As análises dos espectros de RMN 1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, EM-IES e posterior comparação com dados descritos na literatura (Tabelas 5 e 6) resultaram na identificação do ácido palmítico ($C_{16}H_{32}O_2$ - ácido hexadecanóico) e do 3-O-(9,12,15-octadecatrienoil)- β -D-galactopiranosil glicerol ($C_{27}H_{46}O_9$).

Apesar de gliceroglicolipídeos como MGMGs serem indicados como os constituintes principais de *Picralima nitida* (Stapf) T.Durand & H.Durand (ADEBOWALE; ADEWUYI; ADEBOWALE, 2012), não são bem descritos para Apocynaceae. Os quais são amplamente relatados em Euphorbiaceae e Caesalpinaeae (CATENI; FALSONE; ZILIC, 2003; SASHIDHARA et al., 2012). O 3-O-(9,12,15-octadecatrienoil)- β -D-galactopiranosil glicerol, por exemplo, exibe expressiva atividade anti-inflamatória (CATENI; FALSONE; ZILIC, 2003; CATENI et al., 2004).

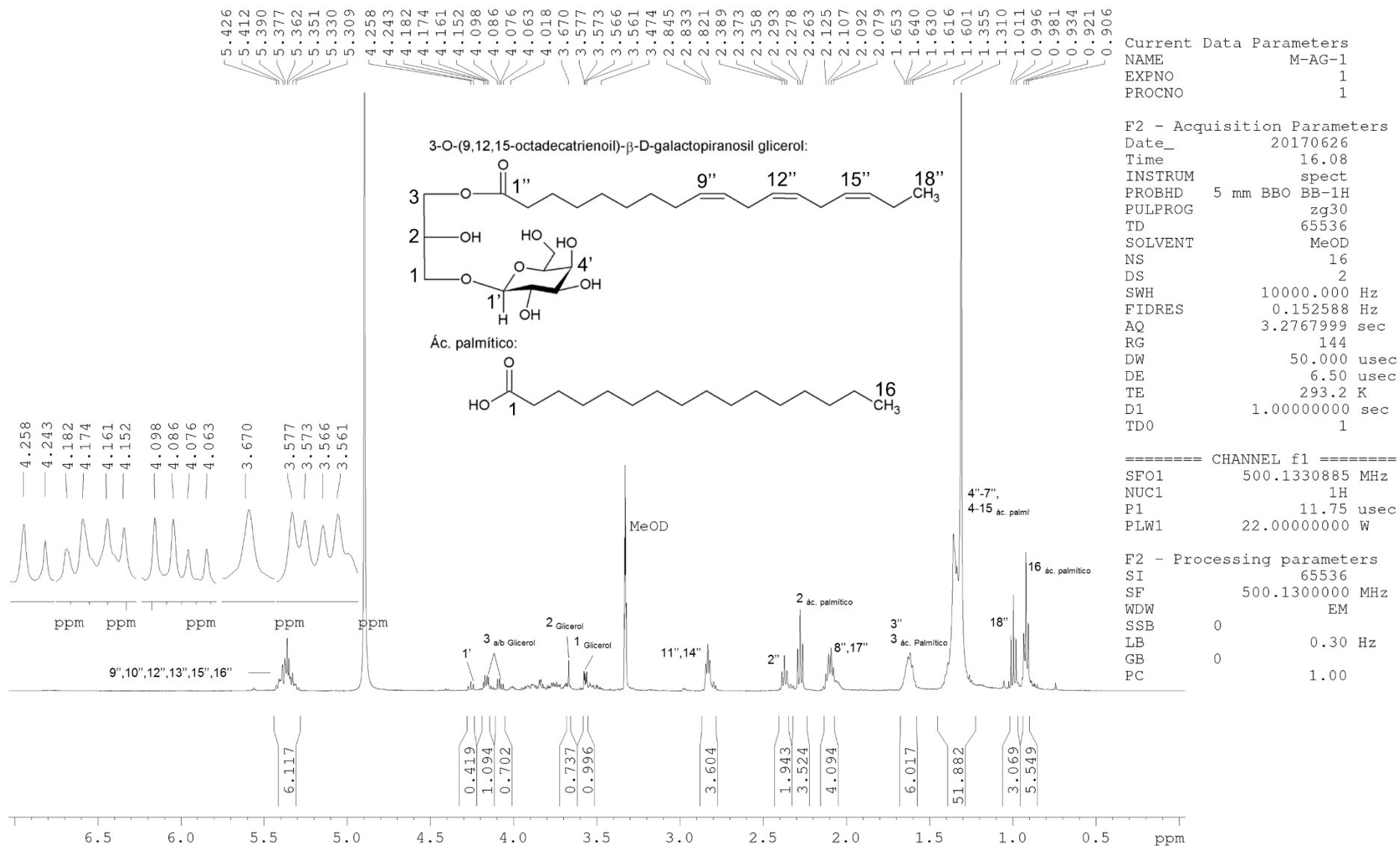
Figura 23: Espectro de RMN ¹H de M-AG-1 (MeOD, 500MHz).

Figura 24: Espectro de RMN ¹³C de M-AG-1 (MeOD, 125 MHz).

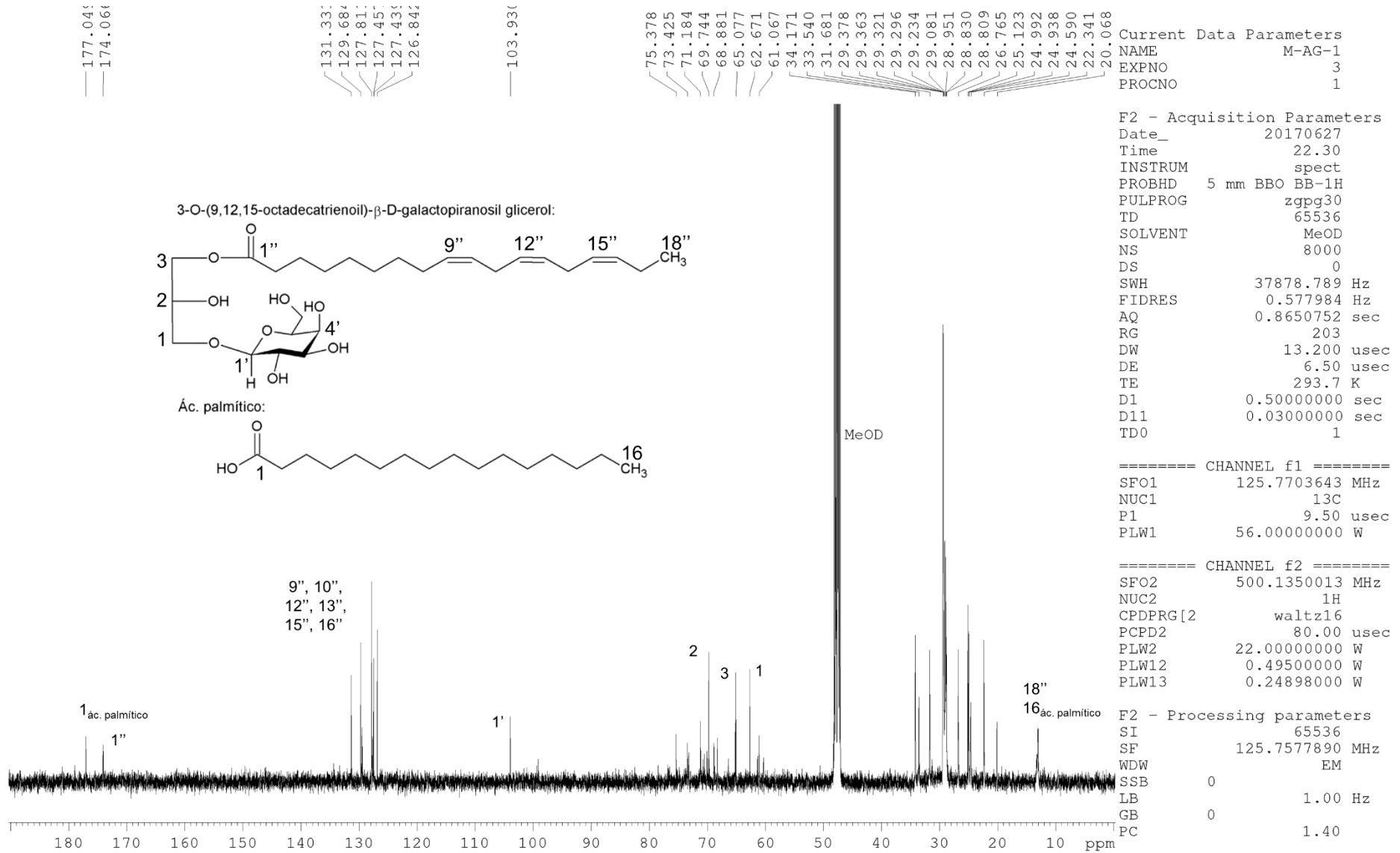


Figura 25: Espectro de HSQC de M-AG-1 (MeOD, ¹H 500 MHz; ¹³C 125 MHz).

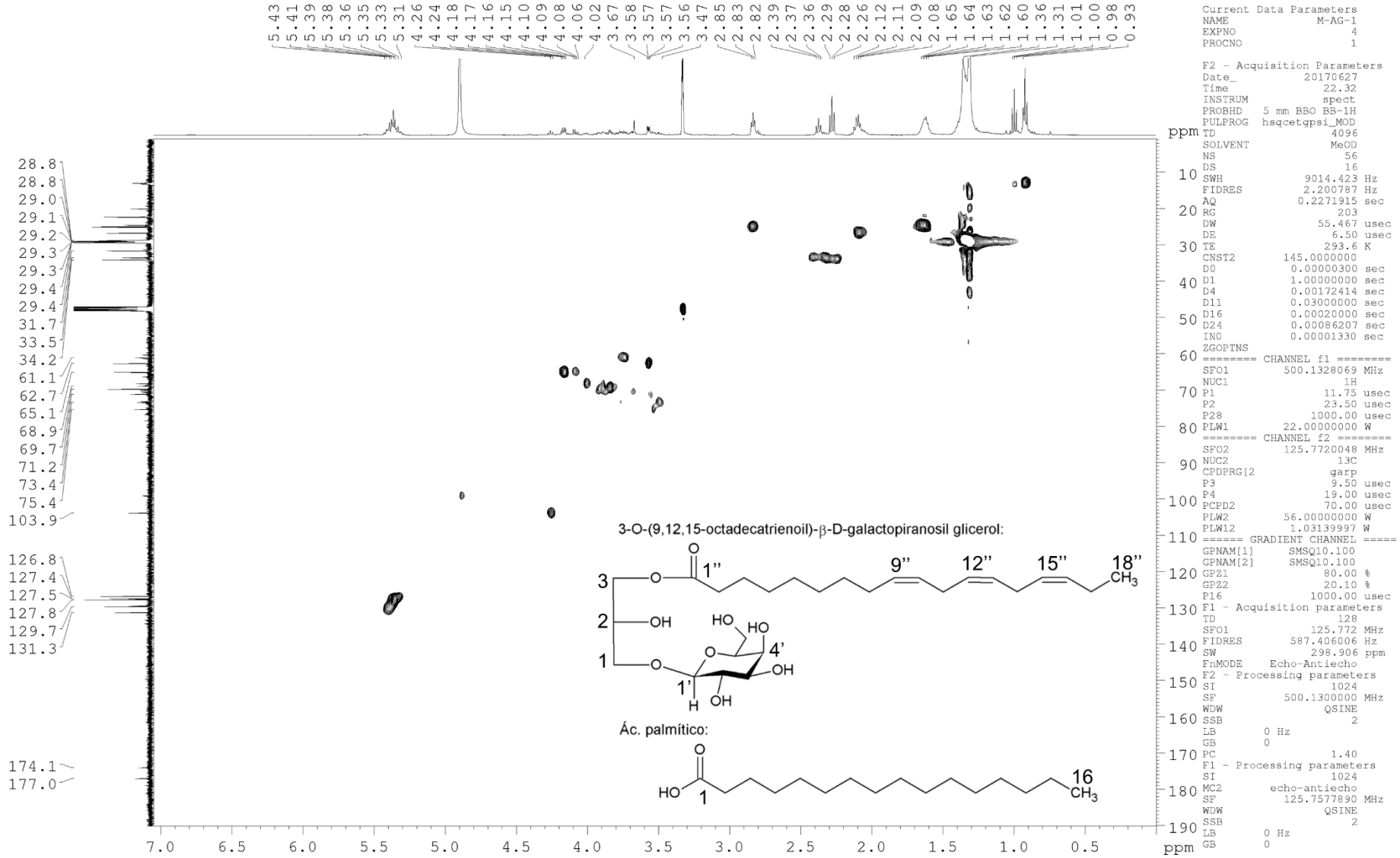


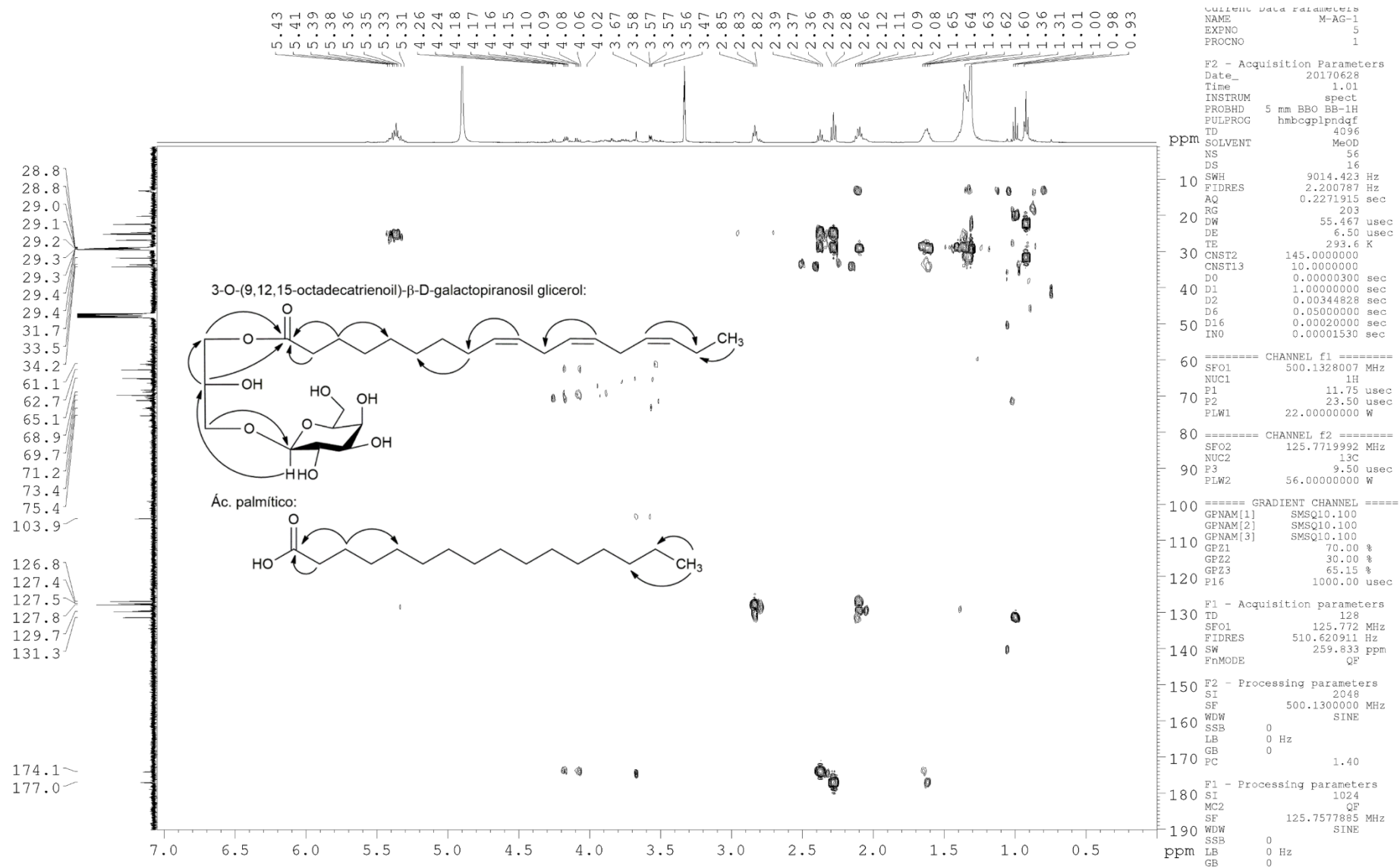
Figura 26: Espectro de HMBC de M-AG-1 (MeOD, ^1H 500 MHz; ^{13}C 125 MHz).

Figura 27: Espectro EM-IES(-) de M-AG-1.

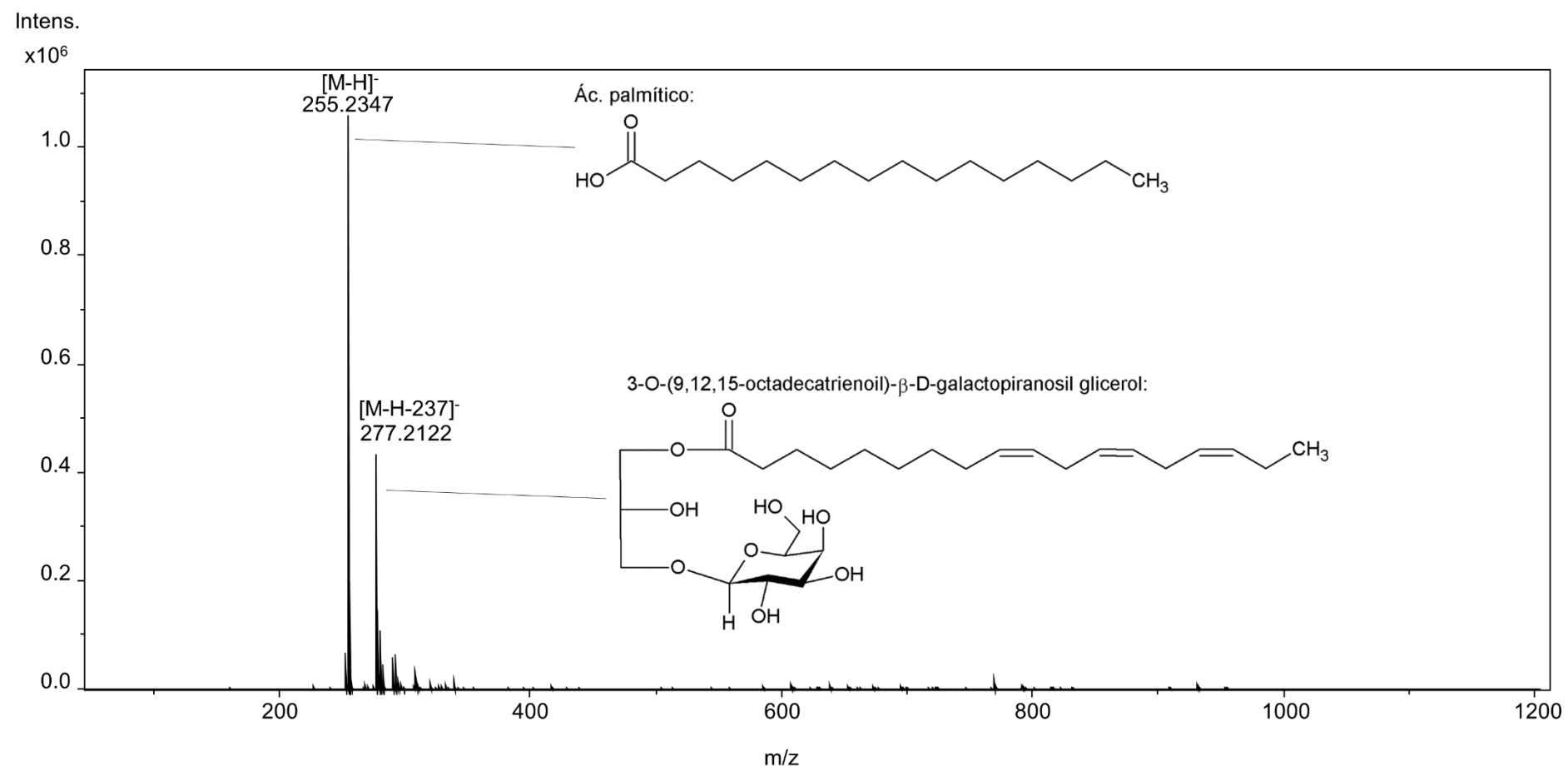


Figura 28: Espectro EM-IES(+) de M-AG-1.

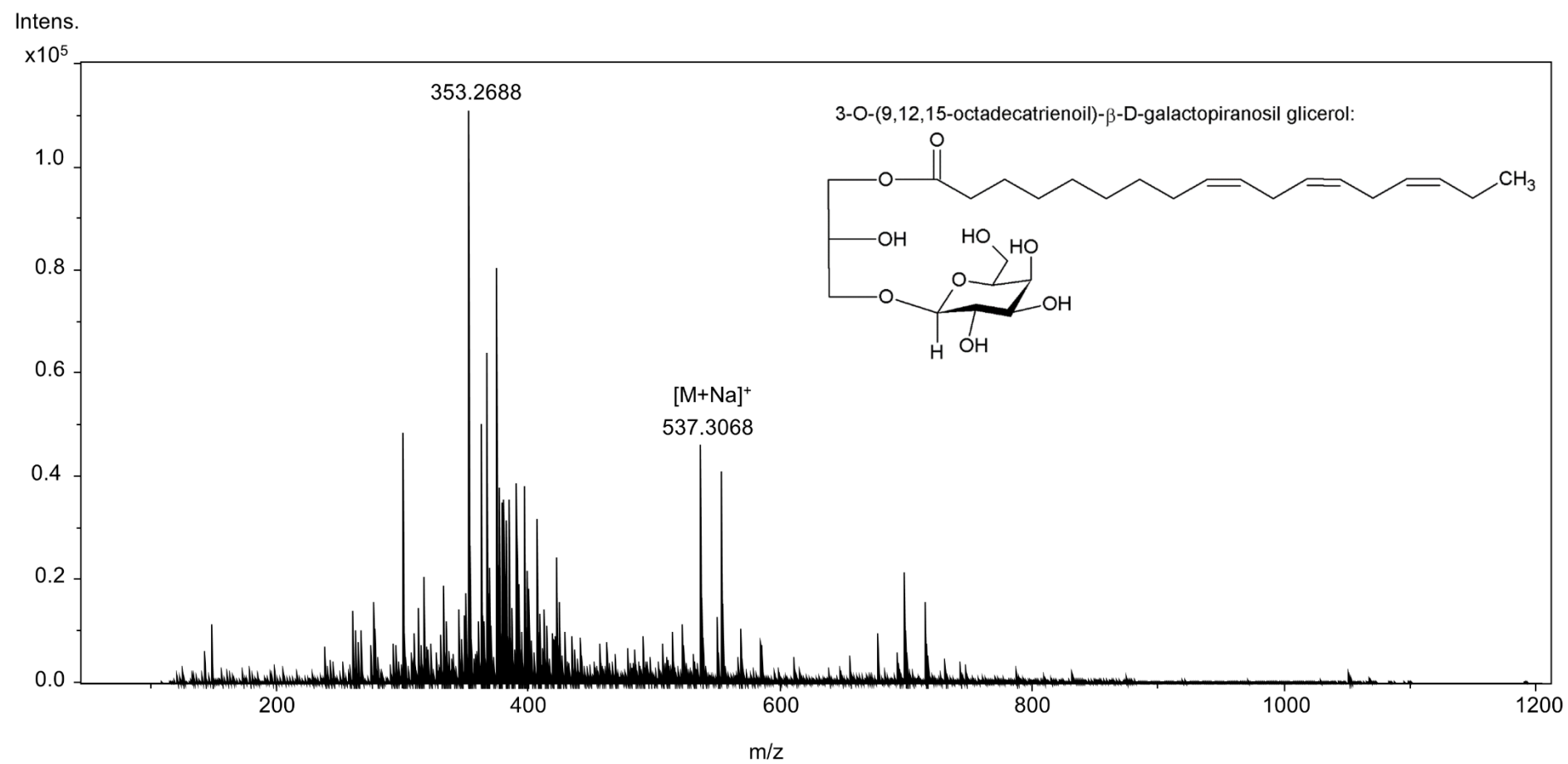


Tabela 5: Dados de RMN ¹H (MeOD, 500 MHz) e ¹³C (MeOD, 125 MHz) do MGMG de M-AG-1.

POSIÇÃO	δ_H (ppm), J (Hz)		δ_C (ppm)	
	3-O-(9,12,15-octadecatrienoil)- β -D-galactopiranosil glicerol			
	M-AG-1	Cateni et al. (2004)	M-AG-1	Cateni et al. (2004)
1	3,56 (<i>m</i>)	4,57 (<i>m</i>)	62,6	66,8
2	3,67 (<i>m</i>)	4,62 (<i>m</i>)	69,7	70,2
3	4,09 (<i>dd</i> , $J = 11,3$ e $6,2$)	4,09 (<i>dd</i> , $J = 10,4$ e $5,1$)	65,0	72,2
	4,17 (<i>dd</i> , $J = 11,9$ e $4,5$)	4,34 (<i>dd</i> , $J = 10,4$ e $5,2$)		
1'	4,24 (<i>d</i> , $J = 7,8$)	4,85 (<i>d</i> , $J = 7,9$)	103,9	105,8
2'	3,47-4,01	4,39 (<i>m</i>)	71,1	72,7
3'	3,47-4,01	4,11 (<i>dd</i> , $J = 9,6$ e $3,4$)	75,3	77,2
4'	3,47-4,01	4,19 (<i>d</i> , $J = 3,4$)	68,8	69,1
5'	3,47-4,01	4,15 (<i>dd</i> , $J = 7,5$ e $5,3$)	73,4	75,4
6'	3,47-4,01	4,52 (<i>m</i>)	61,0	62,4
1''	-	-	174,0	173,7
2''	2,37 (<i>t</i> , $J = 7,6$)	2,35 (<i>t</i> , $J = 7,1$)	33,5	34,4
3''	1,63 (<i>m</i>)	1,60 (<i>m</i>)	24,5	25,4
4''	1,31-1,35 (<i>m</i>)	1,25 (<i>m</i>)	29,3	29,1
5''	1,31-1,35 (<i>m</i>)	1,25 (<i>m</i>)	29,3	29,1
6''	1,31-1,35 (<i>m</i>)	1,25 (<i>m</i>)	29,2	29,1
7''	1,31-1,35 (<i>m</i>)	1,30 (<i>m</i>)	29,2	29,6
8''	2,10 (<i>m</i>)	2,05 (<i>m</i>)	26,7	27,7
9''	5,30-5,39 (<i>m</i>)	5,50-5,55 (<i>m</i>)	127,8	127,7
10''	5,30-5,39 (<i>m</i>)	5,50-5,55 (<i>m</i>)	126-8	130,7
11''	2,83 (<i>t</i> , $J = 6,0$)	2,95 (<i>dd</i> , $J = 7,4$ e $5,4$)	25,1	26,0
12''	5,30-5,39 (<i>m</i>)	5,50-5,55 (<i>m</i>)	127,4	128,4
13''	5,30-5,39 (<i>m</i>)	5,50-5,55 (<i>m</i>)	127,4	132,1
14''	2,83 (<i>t</i> , $J = 6,0$)	2,95 (<i>dd</i> , $J = 7,4$ e $5,4$)	29,4	26,2
15''	5,30-5,39 (<i>m</i>)	5,50-5,55 (<i>m</i>)	129,6	132,1
16''	5,30-5,39 (<i>m</i>)	5,50-5,55 (<i>m</i>)	131,3	128,9
17''	2,10 (<i>m</i>)	2,02 (<i>m</i>)	26,7	20,8
18''	0,99 (<i>t</i> , $J = 7,5$)	0,94 (<i>t</i> , $J = 7,5$)	13,0	14,5

"MGMG" – Monogalactosilmonoacilglicerol; " δ_H " – Deslocamento químico de Hidrogênio; " δ_C " – Deslocamento químico de Carbono; " J " – Constante de acoplamento; "*d*" – Duplete; "*dd*" – Duplo duplete; "*t*" – Tripleto; "*m*" – Multiplete.

Tabela 6: Dados RMN ^1H (MeOD, 500 MHz) e ^{13}C (MeOD, 125 MHz) do ácido graxo de M-AG-1.

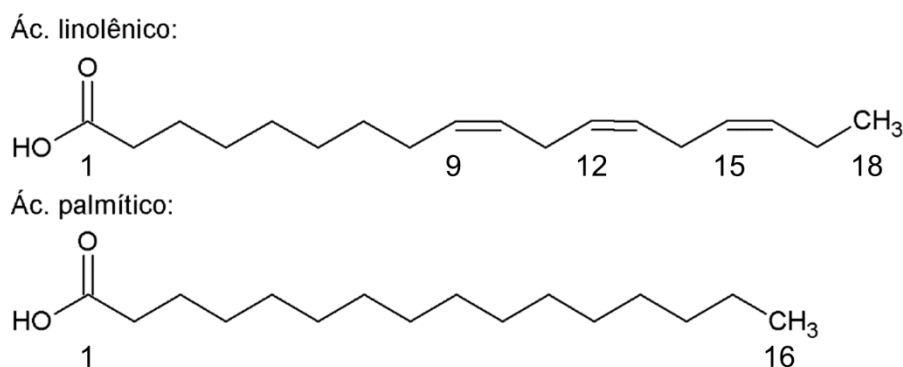
POSIÇÃO	δ_{H} (ppm), J (hz)	δ_{C} (ppm)	
	Ácido palmítico		
	M-AG-1	Sashidhara et al., 2012	
1	-	177,4	175,0
2	2,27 (<i>t</i> , $J = 7,4$)	34,1	35,1
3	1,63 (<i>m</i>)	24,9	26,0
4	1,31-1,35 (<i>m</i>)	28,8	30,2
5	1,31-1,35 (<i>m</i>)	28,8	30,2
6	1,31-1,35 (<i>m</i>)	28,9	30,2
7	1,31-1,35 (<i>m</i>)	28,8	30,8
8	1,31-1,35 (<i>m</i>)	29,0	30,8
9	1,31-1,35 (<i>m</i>)	29,2	30,8
10	1,31-1,35 (<i>m</i>)	29,2	30,8
11	1,31-1,35 (<i>m</i>)	29,3	30,8
12	1,31-1,35 (<i>m</i>)	29,3	30,8
13	1,31-1,35 (<i>m</i>)	29,3	30,8
14	1,31-1,35 (<i>m</i>)	29,3	33,1
15	1,31-1,35 (<i>m</i>)	24,5	23,8
16	0,99 (<i>t</i> , $J = 6,9$)	13,0	14,5

“ δ_{H} ” – Deslocamento químico de Hidrogênio; “ δ_{C} ” – Deslocamento químico de Carbono; “ J ” – Constante de acoplamento; “*t*” – Tripleto; “*m*” – Multiplete; A comparação para o ácido palmítico partiu da porção ácida correspondente do glicerol (2S)-1-O-oleoil-2-O-palmitoil-3-O- α -galactopiranosil-(1/6)-O- β -galactopiranosil em Sashidhara et al., 2012.

5.2.4 Identificação de AG-2

O fracionamento de OLFEM forneceu a mistura **AG-2**, que se apresentou como precipitado branco em meio à óleo amarelo. A qual foi submetida a análises de RMN 1D, 2D e EM-IES. As fórmulas estruturais dos ácidos identificados são mostradas na Figura 29.

Figura 29: Estrutura química dos ácidos linolênico e palmítico.



Na região característica de hidrogênios olefínicos do espectro de RMN ^1H (Figura 30) observa-se multipletos, δ_{H} 4,3-5,3 (6H), atribuídos à H-9, H-10, H-12, H-13, H-15 e H-16 do ácido linolênico. Um tripleto em δ_{H} 2,83 ($J = 5,8$ Hz, 4H) atribuído à hidrogênios metilênicos localizados entre duplas ligações, H-11 e H-14. Em δ_{H} 2,10 ($J = 7,9$ Hz, 4H) encontra-se os sinais dos hidrogênios metilênicos, H-8 e H-17, vizinhos às duplas ligações. Observa-se sinais de metilas em δ_{H} 0,99 ($J = 7,6$ Hz, 3H, H-18) e δ_{H} 0,92 ($J = 7,0$ Hz, 3H, H-16), dos ác. linolênico e palmítico, respectivamente.

Devido à semelhança estrutural entre os ácidos, o espectro de RMN ^1H é caracterizado pela sobreposição de sinais. Onde a razão entre as integrais das metilas, $\cong 4:3$, fornece a proporção das espécies químicas na mistura, ác. linolênico e ác. palmítico, respectivamente. O tripleto em δ_{H} 2,28 ($J = 7,4$ Hz, 4H) e o multipletos em δ_{H} 1,61 (4H) são atribuídos aos prótons metilênicos, H-2 e H-3, de ambos os ácidos. Enquanto os multipletos na região δ_{H} 1,31-1,35 (26H) são atribuídos aos hidrogênios H-4-7 do ác. linolênico, e H-4-15 do ác. palmítico.

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 31) observa-se sinais característicos de carbonilas de ácidos carboxílicos, um em δ_{C} 176,89 e outro em δ_{C} 176,85. Seis sinais, δ_{C} 131,3; 129,6; 127,8; 127,7; 127,4 e 126,8, atribuídos aos carbonos das três ligações duplas do ác. linolênico. Além de dois sinais de metilas terminais, um em δ_{C} 13,2 e outro em δ_{C} 13,0. Como também de carbonos metilenos na região δ_{C} 20,0-34,0.

A análise do espectro de HSQC (Figura 32) permitiu as correlações apresentadas na Tabela 7. A leitura do espectro HMBC mostra a correlação da metila em δ_H 0,99 com o carbono em δ_C 131,3, o que confirma a proposição de que esta pertença ao ác. linolênico. Esta como as demais correlações que confirmam a proposição são evidenciadas na Figura 33. A fórmula molecular $C_{18}H_{30}O_2$ foi determinada por EM-IES(-) como m/z 277,2191 $[M-H]^-$ e $C_{16}H_{32}O_2$ como m/z 255,2342 $[M-H]^-$ (Figura 34).

As análises dos espectros de RMN 1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, EM-IES e posterior comparação com dados descritos na literatura (Tabela 7) resultaram na identificação do ácido linolênico ($C_{18}H_{30}O_2$ - ácido (9Z, 12Z, 15Z)-octadeca-9,12,15-trienóico) e ácido palmítico ($C_{16}H_{32}O_2$ - ácido hexadecanóico).

Os ácidos linolênico e palmítico são dois dos quatro ácidos graxos principais encontrados no óleo de *Calotropis procera* (Aiton) Dryand. (Apocynaceae) (BARBOSA et al., 2014). Em Apocynaceae o ácido palmítico foi identificado em *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (BRUN et al., 2001) e em espécies do gênero *Plumeria* (TOHAR et al., 2006). Há, inclusive, relatos de sua síntese (SANDRI; VIALA, 1995). Estudos mostram que ácidos graxos, como o ác. linolênico, apresentam atividade sobre vários microorganismos, como bacterias *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Helicobacter pylori*, vírus como o da hepatite C (HCV) e fungos *Rhizoctonia solani* e *Crinipellis perniciosus* (MASOKO; MABUSA; HOWARD, 2016).

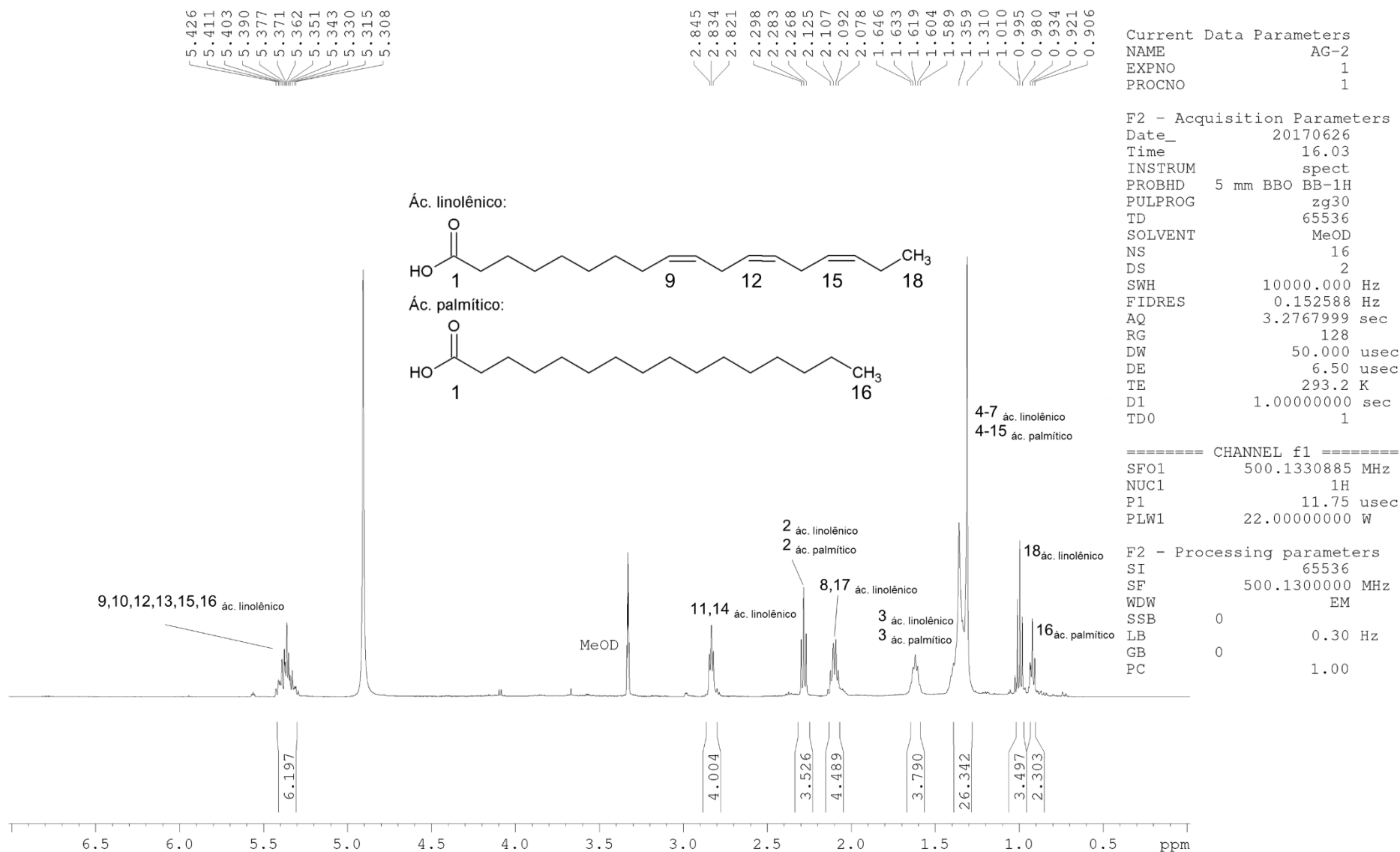
Figura 30: Espectro de RMN ¹H de AG-2 (MeOD, 500MHz).

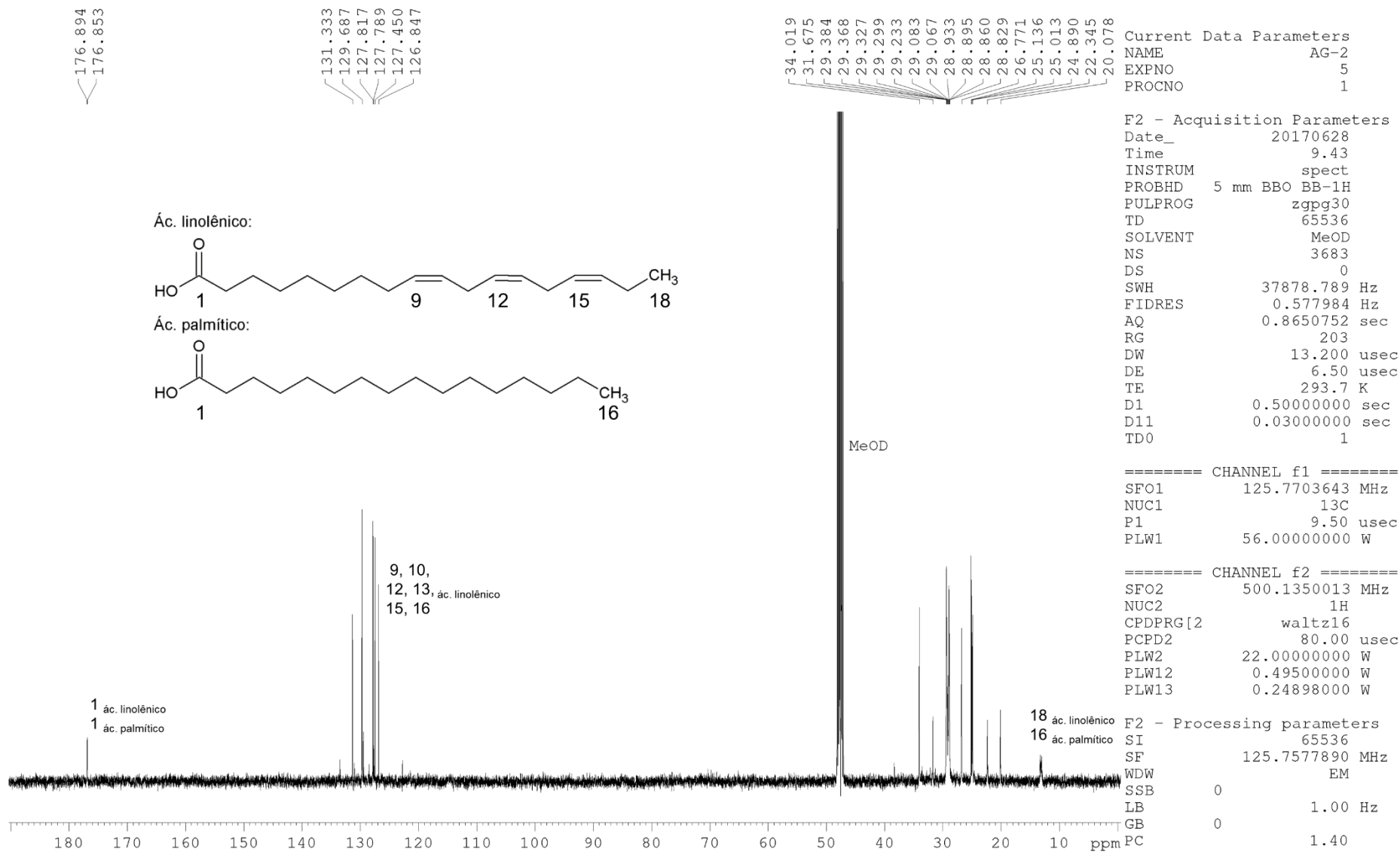
Figura 31: Espectro de RMN ¹³C de AG-2 (MeOD, 125 MHz).

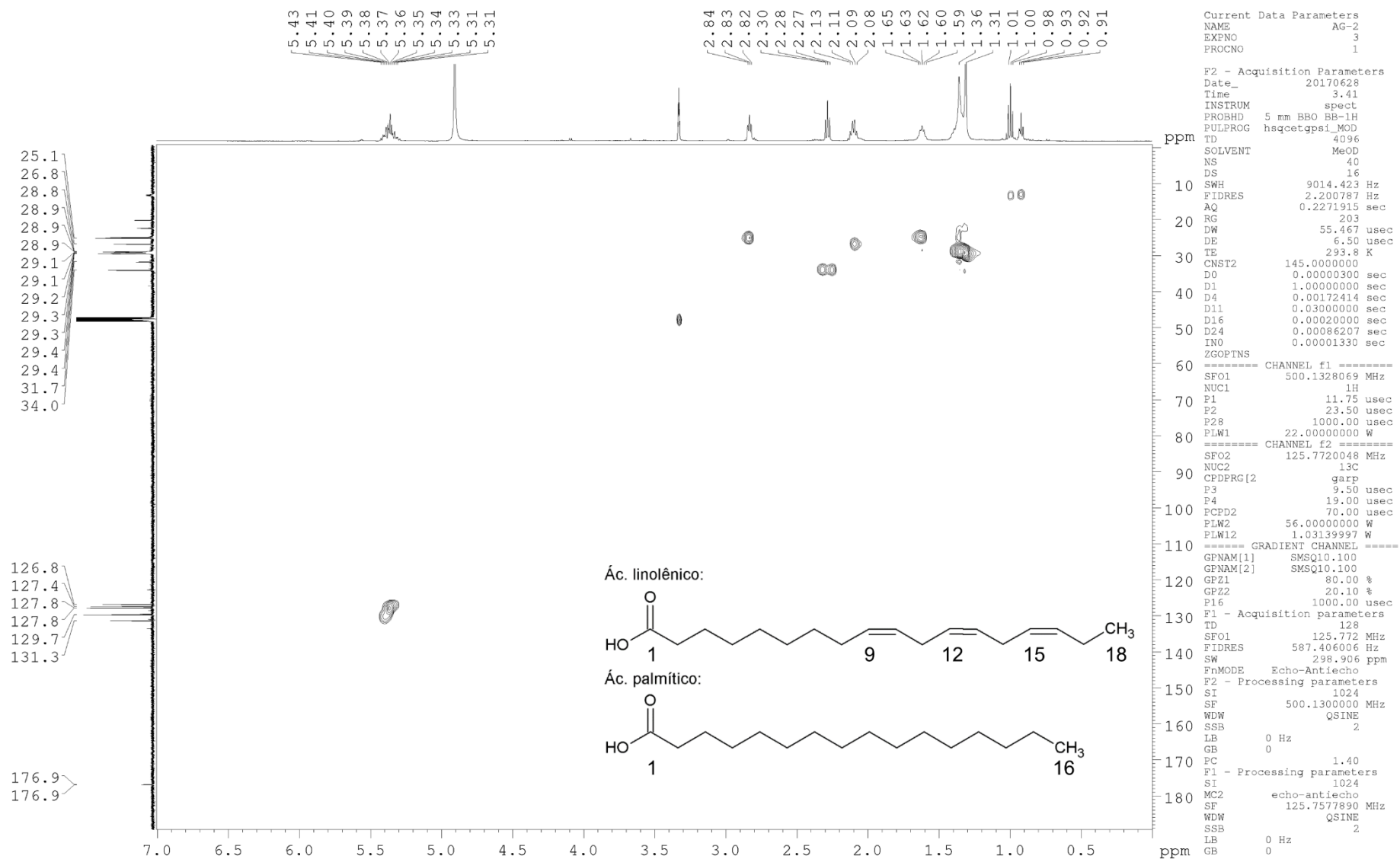
Figura 32: Espectro de HSQC de AG-2 (MeOD, ^1H 500 MHz; ^{13}C 125 MHz).

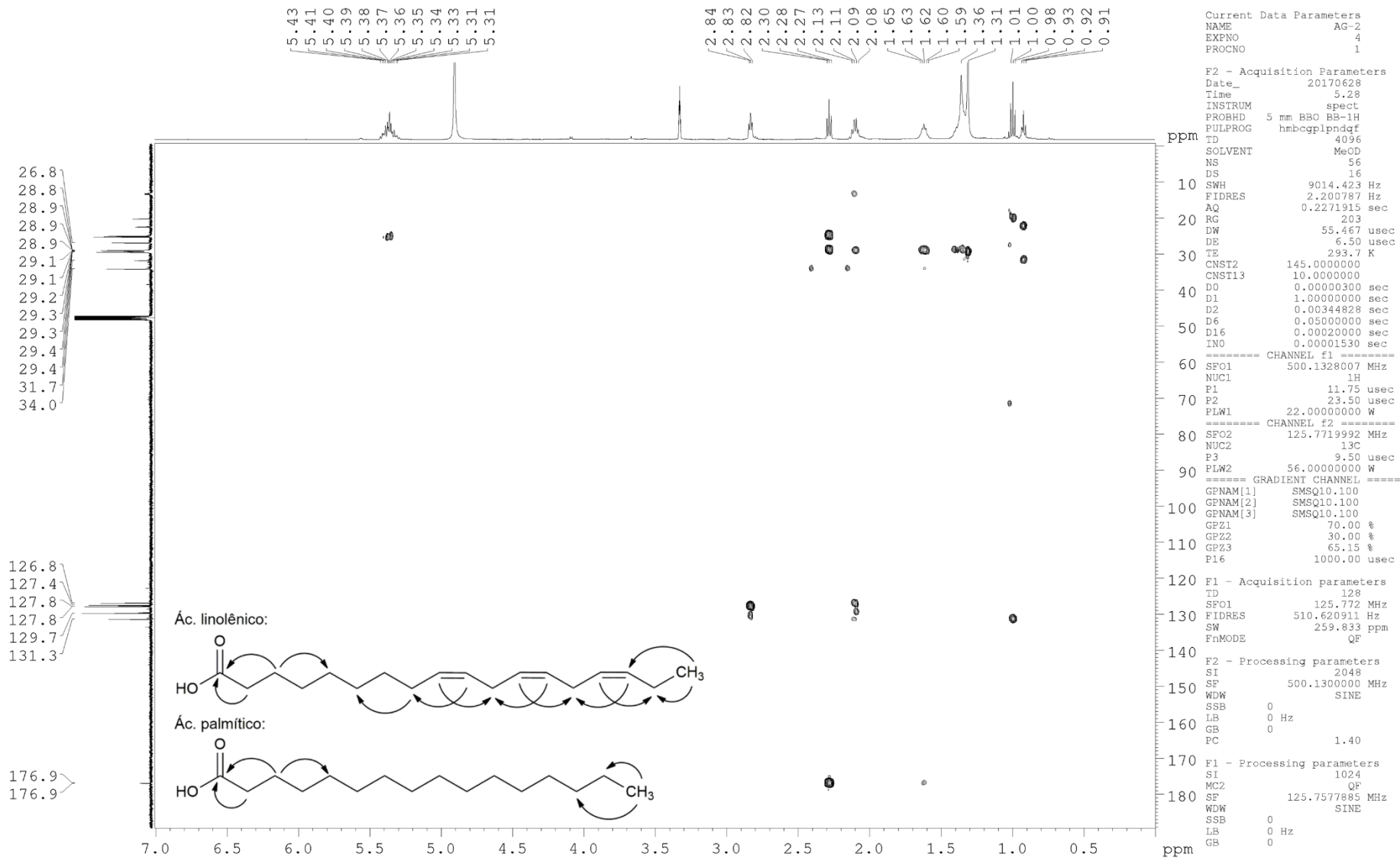
Figura 33: Espectro de HMBC de AG-2 (MeOD, ^1H 500 MHz; ^{13}C 125 MHz).

Figura 34: Espectro EM-IES(-) de AG-2.

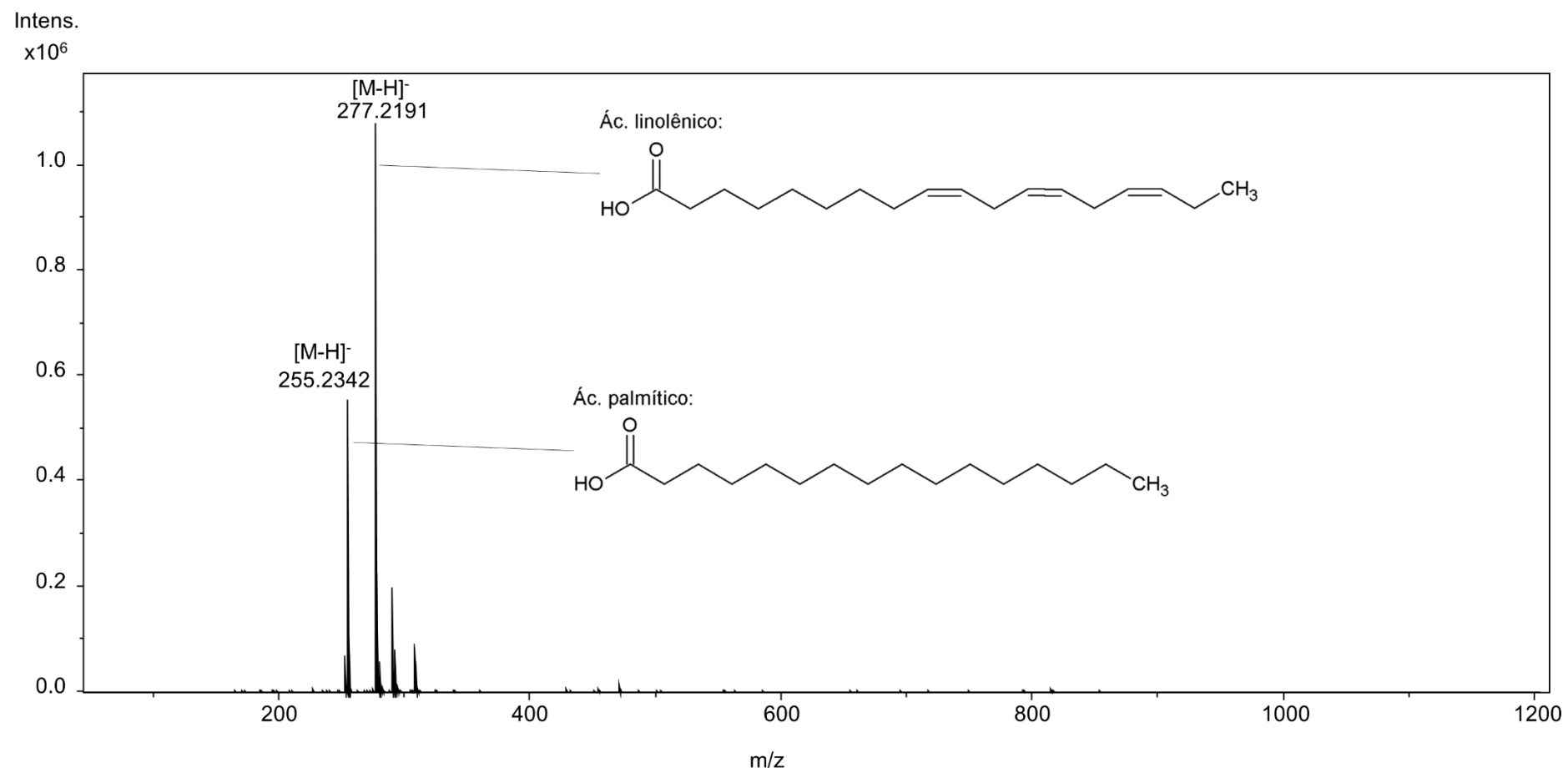


Tabela 7: Dados de RMN ¹H (MeOD, 500 MHz) e ¹³C (MeOD, 125 MHz) de AG-2.

POSIÇÃO	δ_H (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ_C (ppm)		
	Ácido linolênico		Ácido palmítico			
	AG-2	Sandri, Viala (1995)	AG-2	Sashidhara et al., 2012		
1	-	176,8	179,9	-	176,9	175,0
2	2,28 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,4)	34,0	34,1	2,28 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,4)	34,0	35,1
3	1,61 (<i>m</i>)	24,8	24,7	1,61 (<i>m</i>)	24,8	26,0
4	1,31-1,35 (<i>m</i>)	28,9	29,6	1,31-1,35 (<i>m</i>)	29,0	30,2
5	1,31-1,35 (<i>m</i>)	28,8	29,2	1,31-1,35 (<i>m</i>)	29,0	30,2
6	1,31-1,35 (<i>m</i>)	28,9	29,1	1,31-1,35 (<i>m</i>)	29,0	30,2
7	1,31-1,35 (<i>m</i>)	28,8	29,1	1,31-1,35 (<i>m</i>)	29,2	30,8
8	2,10 (<i>m</i>)	26,7	27,2	1,31-1,35 (<i>m</i>)	29,2	30,8
9	5,30-5,39 (<i>m</i>)	127,8	128,3	1,31-1,35 (<i>m</i>)	29,2	30,8
10	5,30-5,39 (<i>m</i>)	126,8	127,1	1,31-1,35 (<i>m</i>)	29,3	30,8
11	2,83 (<i>t</i> , <i>J</i> = 5,8)	25,0	25,6	1,31-1,35 (<i>m</i>)	29,3	30,8
12	5,30-5,39 (<i>m</i>)	127,4	127,7	1,31-1,35 (<i>m</i>)	29,3	30,8
13	5,30-5,39 (<i>m</i>)	127,7	128,2	1,31-1,35 (<i>m</i>)	29,3	30,8
14	2,83 (<i>t</i> , <i>J</i> = 5,8)	25,0	25,5	1,31-1,35 (<i>m</i>)	29,3	33,1
15	5,30-5,39 (<i>m</i>)	129,6	130,2	1,31-1,35 (<i>m</i>)	22,3	23,8
16	5,30-5,39 (<i>m</i>)	131,3	131,9	0,92 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,0)	13,0	14,5
17	2,10 (<i>m</i>)	20,0	20,5	-	-	
18	0,99 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,6)	13,2	14,2	-	-	

“ δ_H ” – Deslocamento químico de Hidrogênio; “ δ_C ” – Deslocamento químico de Carbono; “*J*” – Constante de acoplamento; “*t*” – Tripleto; “*m*” – Multiplete; A comparação para o ácido palmítico partiu da porção ácida correspondente do glicerol (2S)-1-O-oleoil-2-O-palmitoil-3-O- α -galactopiranosil-(1/6)-O- β -galactopiranosil em Sashidhara et al., 2012.

5.3 TOXICIDADE

5.3.1 Citotoxicidade *in vitro*

O extrato OLFE, as frações OLFEH, OLFED, OLFEA, OLFEM e a substância F-1 (rutina) foram testados a fim de verificar a citotoxicidade frente as linhagens de células tumorais HCT-116, PC-3 e HL-60 (Tabela 8).

Tabela 8: Percentual de Inibição do Crescimento tumoral (IC) *in vitro* do extrato e frações das folhas de *O. lutea* na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para F-1 (rutina), e Desvio Padrão (DP), frente à três linhagens de células tumorais. Determinação pelo método MTT com 72h de tratamento.

Amostras	HCT-116		PC-3		HL-60	
	IC (%)	DP (%)	IC (%)	DP (%)	IC (%)	DP (%)
OLFE	0,0	0,0	32,78	1,63	0,0	0,0
OLFEH	0,0	0,0	52,08	4,81	0,0	0,0
OLFED	0,0	0,0	31,94	1,00	0,0	0,0
OLFEA	0,0	0,0	28,67	0,91	0,0	0,0
OLFEM	0,30	2,94	33,80	0,36	0,0	0,0
F-1	0,0	0,0	33,87	1,54	0,0	0,0

“OLFE” – Extrato Bruto Etanólico das Folhas de *O. lutea*; “OLFEH” – Fração Hexânica das Folhas de *O. lutea*; “OLFED” – Fração Diclorometânica das Folhas de *O. lutea*; “OLFEA” – Fração Acetato-etílica das Folhas de *O. lutea*; “OLFEM” – Fração Metanólica das Folhas de *O. lutea*.

Considerou-se IC entre 1-50% como baixa toxicidade, entre 51-75% como moderada toxicidade e IC acima de 75% como alta toxicidade (PINHEIRO et al., 2016; SOUZA et al., 2017). Foram atóxicos contra HCT-116 e HL-60. À 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, o extrato OLFE, as frações OLFED, OLFEA, OLFEM e a substância F-1 a 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ exibiram baixa toxicidade sobre PC-3, enquanto OLFEH foi moderadamente tóxico.

Em OLFEH foram identificados os triterpenos α -amirina, β -amirina e lupeol (T-1, p. 47). A literatura relata a citotoxicidade do lupeol frente à PC-3 (GALLO; SARACHINE, 2009). Como também do lupeol e da mistura α -amirina e β -amirina contra MCF-7 (KEAWSA-ARD; LIAWRUANGRATH; KONGTAWHEELERT, 2015). Inclusive, a atoxicidade dos três triterpenos contra HCT-116 (RAGASA; CORNELIO, 2013), assim como exibido por OLFEH. Em vista disso, sugere-se que T-1 contribua para a moderada atividade inibitória de OLFEH sobre PC-3 (52,08% a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

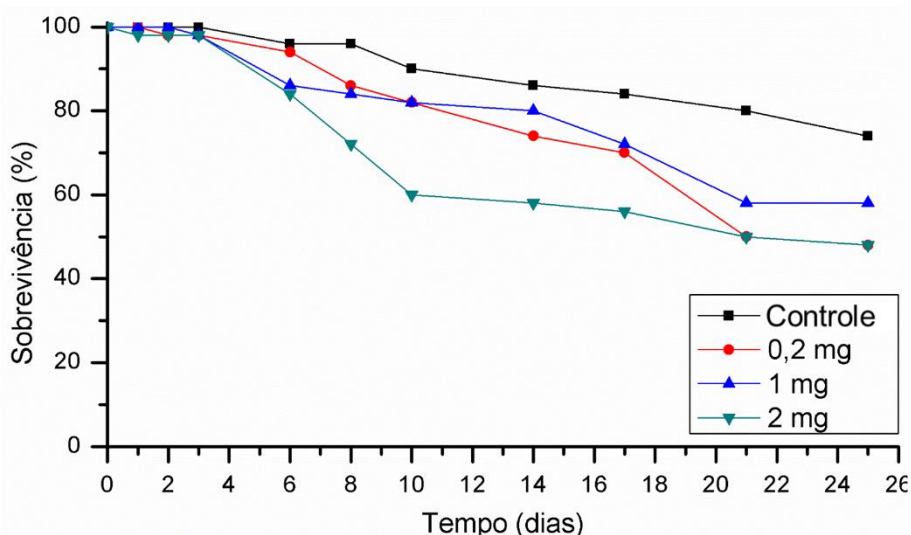
5.3.2 Atividade Inseticida *in vitro*

O extrato OLFE e as frações OLFEH, OLFED, OLFEA e OLFEM foram testados nas concentrações 0,2; 1,0 e 2,0 mg.mL⁻¹ a fim de verificar o potencial tóxico em formigas *Atta sexdens rubropilosa* através da incorporação à dieta artificial por 25 dias. A avaliação dos bioensaios através da porcentagem acumulada de mortalidade e curvas de sobrevivência por dia são mostradas a seguir.

A mortalidade acumulada por dia aumentou gradativamente durante todos os bioensaios. Somente houve mortalidade expressiva ao término dos tratamentos com OLFEH (Gráfico 3), diferentemente dos tratamentos com OLFE (Gráfico 2), OLFED (Gráfico 4), OLFEA (Gráfico 5) e OLFEM (Gráfico 6), os quais não exibiram 100% de mortalidade em nenhuma das concentrações testadas.

A sobrevivência mediana (Md) nos tratamentos com OLFE à 0,2 e 2,0 mg.mL⁻¹ foi de 22 e 20 dias, respectivamente, enquanto o controle e OLFE à 1,0 mg.mL⁻¹ exibiram Md superior a 25 dias (Gráfico 2).

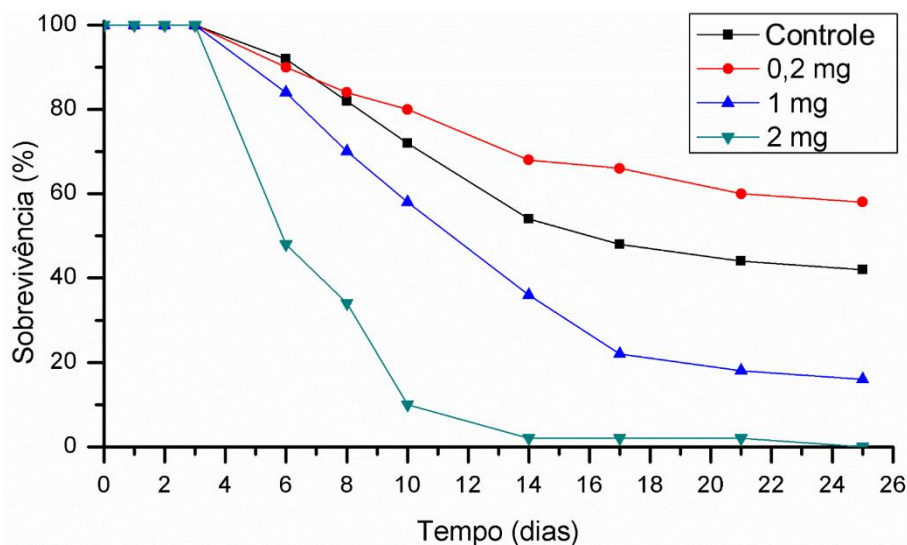
Gráfico 2: Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com OLFE nas concentrações 0,2; 1,0 e 2,0 mg.mL⁻¹.



“OLFE” – Extrato Bruto Etanólico das Folhas de *O. lutea*.

Para OLFEH, houve 100 % de mortalidade ao término do experimento com o extrato na concentração 2,0 mg.mL⁻¹. A Md nos tratamentos com OLFEH à 1,0 e 2,0 mg.mL⁻¹ foi de 12 e 6 dias, respectivamente, enquanto o controle exibiu Md igual a 16 dias, e OLFE à 0,2 mg.mL⁻¹ exibiu Md superior a 25 dias (Gráfico 3).

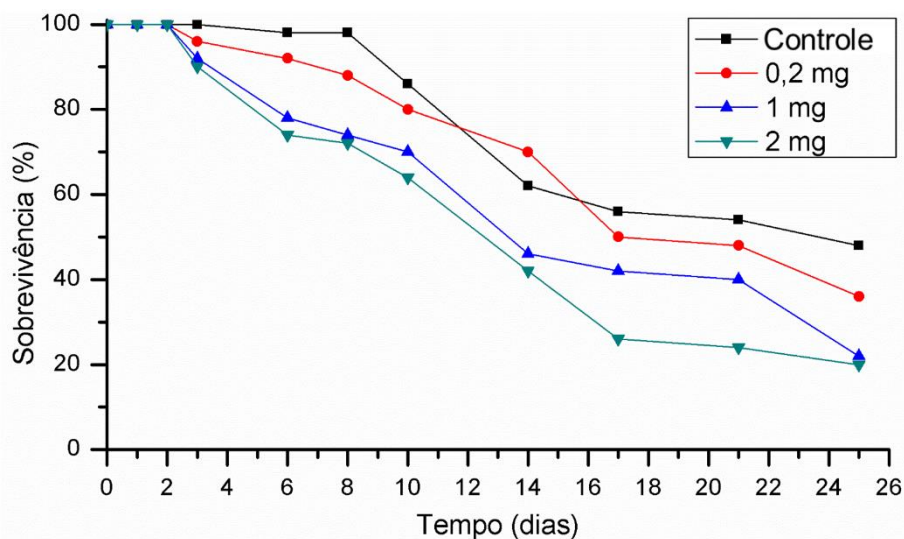
Gráfico 3: Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com OLFEH nas concentrações 0,2; 1,0 e 2,0 mg.mL⁻¹.



“OLFEH” – Fração Hexânica das Folhas de *O. lutea*.

A Md nos tratamentos com OLFEH à 0,2; 1,0 e 2,0 mg.mL⁻¹ foi de 17, 14 e 13 dias, respectivamente, enquanto o controle exibiu Md igual a 24 dias (Gráfico 4).

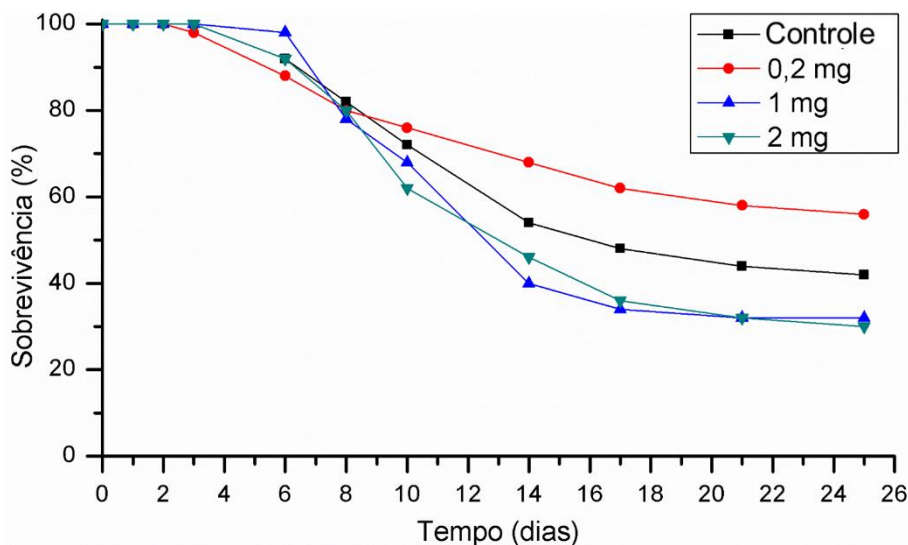
Gráfico 4: Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com OLFEH nas concentrações 0,2; 1,0 e 2,0 mg.mL⁻¹.



“OLFEH” – Fração Diclorometânica das Folhas de *O. lutea*.

A Md nos tratamentos com OLFEH à 1,0 e 2,0 mg.mL⁻¹ foi de 14 e 13 dias, respectivamente, enquanto o controle exibiu Md igual a 16 dias, e OLFEH à 0,2 mg.mL⁻¹ exibiu Md superior a 25 dias (Gráfico 5).

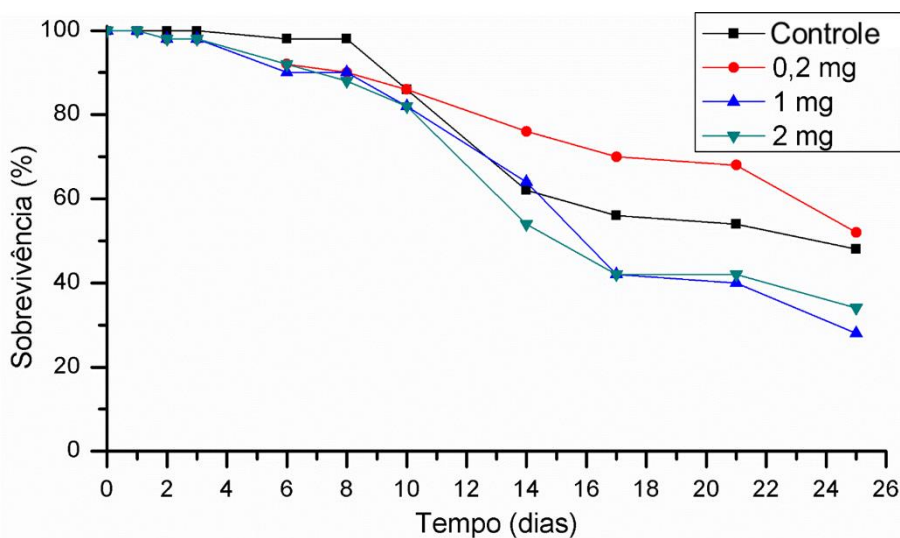
Gráfico 5: Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com OLFEA nas concentrações 0,2; 1,0 e 2,0 mg.mL⁻¹.



“OLFEA” – Fração Acetato-etílica das Folhas de *O. lutea*

OLFEM à 1,0 e 2,0 mg.mL⁻¹ exibiram Md iguais a 15 dias. O controle exibiu Md igual a 24 dias, e OLFEM à 0,2 mg.mL⁻¹ exibiu Md superior a 25 dias (Gráfico 6).

Gráfico 6: Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com OLFEM nas concentrações 0,2; 1,0 e 2,0 mg.mL⁻¹.



“OLFEM” – Fração Metanólica das Folhas de *O. lutea*.

A Tabela 9 resume a porcentagem acumulada de mortalidade diária e o tempo de sobrevivência mediana (Md) das operárias mantidas com a dieta controle e acrescida dos compostos teste. Através da qual, observa-se que OLFE à 0,2 e 2,0 mg.mL⁻¹, OLFEH à 1,0 e 2,0 mg.mL⁻¹, OLFED à 1,0 e 2,0 mg.mL⁻¹ e OLFEA à 1,0 e 2,0 mg.mL⁻¹ apresentaram diferença significativa em relação à dieta controle.

Tabela 9: Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio com dieta artificial acrescida com de extrato e frações de *O. lutea* nas concentrações 0,2; 1,0 e 2,0 mg.mL⁻¹.

	Tratamento (mg.mL ⁻¹)	% acumulada de mortalidade por dia										Md * (dias)
		1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
OLFE	Dieta Controle	0	0	0	4	4	10	14	16	20	26	>25a
	0,2	0	2	2	6	14	18	26	30	50	52	22b
	1,0	0	0	2	14	16	18	20	28	42	42	>25a
	2,0	2	2	2	16	28	40	42	44	50	52	20b
OLFEH	Dieta Controle	0	0	0	8	18	28	46	52	56	58	16a
	0,2	0	0	0	10	16	20	32	34	40	42	>25a
	1,0	0	0	0	16	30	42	64	78	82	84	12b
	2,0	0	0	0	52	66	90	98	98	98	100	6b
OLFED	Dieta Controle	0	0	0	2	2	14	38	44	46	52	24a
	0,2	0	0	4	8	12	20	30	50	52	64	17a
	1,0	0	0	8	22	26	30	54	58	60	78	14b
	2,0	0	0	10	26	28	36	58	74	76	80	13b
OLFEA	Dieta Controle	0	0	0	8	18	28	46	52	56	58	16a
	0,2	0	0	2	12	20	24	32	38	42	44	>25a
	1,0	0	0	0	2	22	32	60	66	68	68	14b
	2,0	0	0	0	8	20	38	54	64	68	70	13b
OLFEM	Dieta Controle	0	0	0	2	2	14	38	44	46	52	24a
	0,2	0	2	2	8	10	14	24	30	32	48	>25a
	1,0	0	2	2	10	10	18	36	58	60	72	15a
	2,0	0	2	2	8	12	18	46	58	58	66	15a

“Md” – Sobrevivência mediana; “ * ” – Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste “log rank” (p< 0,05); “OLFE” – Extrato Bruto Etanólico das Folhas de *O. lutea*; “OLFEH” – Fração Hexânica das Folhas de *O. lutea*; “OLFED” – Fração Diclorometânica das Folhas de *O. lutea*; “OLFEA” – Fração Acetato-etílica das Folhas de *O. lutea*; “OLFEM” – Fração Metanólica das Folhas de *O. lutea*.

A maior disparidade entre as curvas de sobrevivência é percebida no tratamento com OLFEH na concentração 2 mg.mL⁻¹ (Gráfico 3). Em que houve

mortalidade de 98% já no 14^o dia e 100% ao término do experimento (Tabela 9). Isto, enquanto o tratamento com a dieta controle alcançou 58% de mortalidade no 25^o dia. OLFEH à 2 mg.mL⁻¹ diminuiu a sobrevivência mediana das formigas de dezesseis para seis dias.

Em OLFEH identificou-se os triterpenos α -amirina, β -amirina e lupeol (T-1, p. 47). A literatura aponta o lupeol como agente inibidor do corte das folhas de *Didymopanax vinosum* E. March. (Araliaceae) por formigas *A. sexdens rubropilosa* (SALATINO et al., 1998). β -amirina e lupeol isolados de *Inula japonica* Thunb. (Asteraceae) exibiram atividade acaricida para *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acari: Tetranychidae) (DUAN et al., 2011). Extratos de *Senecio salignus* DC. (Asteraceae) contendo β -amirina e lupeol demonstraram atividade inseticida para a lagarta *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (ROMO-ASUNCIÓN et al., 2016). Em vista disso, sugere-se que T-1 contribua para a atividade inseticida de OLFEH contra *A. sexdens rubropilosa*.

6 CONCLUSÃO

- O fracionamento do extrato das folhas de *O. lutea* resultou no isolamento e identificação do flavonoide rutina, dos triterpenos α -amirina, β -amirina e lupeol, do monogalactosilmonoacilglicerol 3-O-(9,12,15-octadecatrienoil)- β -D-galactopiranosil glicerol e dos ácidos linolênico e palmítico.
- As substâncias rutina, β -amirina, 3-O-(9,12,15-octadecatrienoil)- β -D-galactopiranosil glicerol, ácido linolênico e ácido palmítico são relatados pela primeira vez para o gênero *Odontadenia*.
- O extrato e frações das folhas de *O. lutea* à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e a substância rutina (F-1) à 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram atóxicos para as linhagens HL-60 e HCT-116.
- OLFE, OLFED, OLFEA, OLFEM e a rutina (F-1) exibiram baixa toxicidade sobre PC-3, a inibição do crescimento celular variou entre 28-34%.
- Sugere-se que T-1, α -amirina, β -amirina e lupeol, contribua para a moderada atividade citotóxica de OLFEH à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sobre PC-3 (IC = 52,08%).
- OLFE, OLFED, OLFEA, OLFEM à 0,2; 1,0 e 2,0 mg.mL^{-1} não exibiram atividade inseticida expressiva em *A. sexdens rubropilosa*.
- Sugere-se que T-1 contribua para a atividade inseticida de OLFEH à 2 mg.mL^{-1} em *A. sexdens rubropilosa*.
- A fração hexânica das folhas de *O. lutea* pode ser uma fonte em potencial para o isolamento de substâncias com atividade inseticida em *A. sexdens rubropilosa*.
- Pesquisas adicionais que visem a identificação dos demais compostos bioativos a partir *O. lutea* devem ser realizados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLAH, H. M.; AL-ABD, A. M.; EL-DINE, R. S.; EL-HALAWANY, A. M. P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 1, p. 45–62, 2015.
- ABE, F.; YAMAUCHI, T.; MINATO, K. Presence of Cardenolides and Ursolic Acid from oleander leaves in Larvae and Frass of *Daphnis nerh*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 1, p. 45–49, 1996.
- ADEBOWALE, Y. A.; ADEWUYI, A.; ADEBOWALE, K. O. Lipid composition and molecular speciation of the triacylglycerol of the oil of *Picralima nitida*. **GIDA**, v. 37, n. 1, p. 1–7, 2012.
- AKHTAR, N.; SALEEM, M.; RIAZ, N.; ALI, M. S.; YAQOOB, A.; NASIM, F.; JABBAR, A. Isolation and characterization of the chemical constituents from *Plumeria rubra*. **Phytochemistry Letters**, v. 6, n. 2, p. 291–298, 2013.
- ALI, H.; HOUGHTON, P. J.; SOUMYANATH, A. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 3, p. 449–455, 2006.
- ALVAREZ, E. A.; WOLFSON, A. H.; PEARSON, J. M.; CRISP, M. P.; MENDEZ, L. E.; LAMBROU, N. C.; LUCCI, J. A. A phase I study of docetaxel as a radio-sensitizer for locally advanced squamous cell cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 113, n. 2, p. 195–199, 2009.
- ARAUJO, M. S.; LUCIA, T. M. C. D.; MOREIRA, M. D.; PICANÇO, M. C. Toxicidade de extratos hexânicos de plantas às operárias de *Atta laevigata* e *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Formicidae: Attini). **Current Agricultural Science and Technology**, v. 14, n. 3, p. 106–114, 2008.
- ASLAM, J.; MUJIB, A.; NASIM, S. A.; SHARMA, M. P. Screening of vincristine yield *in ex vitro* and *in vitro* somatic embryos derived plantlets of *Catharanthus roseus* L. (G) Don. **Scientia Horticulturae**, v. 119, n. 3, p. 325–329, 2009.
- ASLAM, J.; MUJIB, A.; SHARMA, M. P. Influence of freezing and non-freezing temperature on somatic embryogenesis and vinblastine production in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 2, p. 473–480, 2011.
- ASSIS JUNIOR, L. R.; GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; GUTERRES, Z. R. Pregnos e outros constituintes das raízes de *Macrosiphonia petraea* (A. St.-Hil.) Kuntze (Apocynaceae). **Química Nova**, v. 36, n. 4, p. 519–523, 2013.
- ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E.; LINDER, T.; WAWROSCH, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, 2015.
- BADMUS, J. A.; EKPO, O. E.; RAUTENBACH, F.; MARNEWICK, J. L.; HUSSEIN, A. A.; HISS, D. C. Isolation and antioxidant activity of flavonoids from *Holarrhena floribunda* (G.don) leaves. **Acta Biochimica Polonica**, v. 63, n. 2, p. 353–358, 2016.
- BAIARDI, A. Agroecologia: as coisas em seu lugar (A agronomia brasileira visita a

terra dos duendes). **Revista do Desenvolvimento Regional**, v. 10, n. 2, p. 201–208, 2013.

BARBOSA, E. G.; BEGA, L. A. S.; BEATRIZ, A.; SARKAR, T.; HAMEL, E.; AMARAL, M. S.; LIMA, D. P. A diaryl sulfide, sulfoxide, and sulfone bearing structural similarities to combretastatin A-4. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 2685–2688, 2009.

BARBOSA, M. O.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S.; SILVA, S. I.; OLIVEIRA, A. F. M. Seed Oil Content and Fatty Acid Composition from Different Populations of *Calotropis procera* (Aiton) W. T. Aiton (Apocynaceae). **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 8, p. 1433–1441, 2014.

BECHO, J. R. M.; MACHADO, H.; GUERRA, M. O. Rutina – Estrutura, Metabolismo e Potencial Farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 1, n. 1, p. 21–25, 2009.

BICALHO, K. U.; TEREZAN, A. P.; MARTINS, D. C.; FREITAS, T. G.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C. Evaluation of the Toxicity of *Virola sebifera* Crude Extracts, Fractions and Isolated Compounds on the Nest of Leaf-Cutting Ants. **Psyche: A Journal of Entomology**, v. 2012, p. 1–7, 2012.

BONCLER, M.; RÓŻALSKI, M.; KRAJEWSKA, U.; PODSEDEK, A.; WATALA, C. Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 69, n. 1, p. 9–16, 2014.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010.

BREITBACH, U. B.; NIEHUES, M.; LOPES, N. P.; FARIA, J. E. Q.; BRANDÃO, M. G. L. Amazonian Brazilian medicinal plants described by C.F.P. von Martius in the 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 1, p. 180–189, 2013.

BRUN, G.; BESSIÈRE, J.; DIJOUX-FRANCA, M.; DAVID, B.; MARIOTTE, A. Volatile Components of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Apocynaceae). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 16, n. 2, p. 116–119, 2001.

BUENO, O. C.; MORINI, M. S. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A.; SILVA, O. A. Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) isoladas do formigueiro e alimentadas com dietas artificiais. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26, n. 1, p. 107–113, abr. 1997.

BUSSMANN, R. W.; PANAIAGUA-ZAMBRANA, N. Y. Traditional knowledge of biodiversity – plant use of the Chácobo in Bolivia. **Gaia Scientia**, v. Especial P, p. 93–109, 2014.

CASTRO, M. R. C.; ARAGÃO, Â. Q.; SILVA, C. C.; PEREZ, C. N.; QUEIROZ, D. P. K.; QUEIROZ JÚNIOR, L. H. K.; BARRETO, S.; MORAES, M. O.; MARTINS, F. T. Conformational Variability in Sulfonamide Chalcone Hybrids: Crystal Structure and Cytotoxicity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 5, p. 884–898, 2016.

CATENI, F.; FALSONE, G.; ZILIC, J. Terpenoids and Glycolipids from Euphorbiaceae. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 5, p. 425–437, 1 ago. 2003.

- CATENI, F.; FALSONE, G.; ZILIC, J.; BONIVENTO, P.; ZACCHIGNA, M.; ZIGON, D.; SOSA, S.; ALTINIER, G. Glyceroglycolipids from *Euphorbia nicaeensis* All. with antiinflammatory activity. **Arkivoc**, v. 2004, n. 5, p. 54–65, 2004.
- CAVASSAN, O.; CALDEIRA, A. M. A.; WEISER, V. L.; BRANDO, F. R. **Conhecendo Botânica e Ecologia no Cerrado**. Bauru: Joarte Grafica e Editora, 2009.
- CHAN, E. W. C.; WONG, S. K.; CHAN, H. T. Apocynaceae species with antiproliferative and/or antiplasmodial properties: a review of ten genera. **Journal of integrative medicine**, v. 14, n. 4, p. 269–284, 2016.
- CHATURVEDULA, V. S. P.; SCHILLING, J. K.; WISSE, J. H.; MILLER, J. S.; EVANS, R.; KINGSTON, D. G. I. A new cytotoxic limonoid from *Odontadenia macrantha* from the Suriname rainforest. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 41, n. 2, p. 139–142, 2003.
- CHEW, Y. L.; LIM, Y. Y.; STANSLAS, J.; EE, G. C. L.; GOH, J. K. Bioactivity-guided isolation of anticancer agents from *Bauhinia kockiana* Korth. **African journal of traditional, complementary, and alternative medicines**, v. 11, n. 3, p. 291–299, 2014.
- CORDEIRO, S. Z.; SIMAS, N. K.; ARRUDA, R. C. O.; SATO, A. Composition of epicuticular wax layer of two species of *Mandevilla* (Apocynoideae, Apocynaceae) from Rio de Janeiro, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, n. 3, p. 198–202, 2011.
- CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 7, p. 3012–3043, 2009.
- DALLA VECHIA, L.; GNOATTO, S. C. B.; GOSMANN, G. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1245–1252, 2009.
- DGHIM, F.; BOUAZIZ, M.; MEZGHANI, I.; BOUKHRIS, M.; NEFFATI, M. Laticifers identification and natural rubber characterization from the latex of *Periploca angustifolia* Labill. (Apocynaceae). **Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 217, n. November 2015, p. 90–98, 2015.
- DIAS, M. O.; HAMERSKI, L.; PINTO, A. C. Separação semipreparativa de α e β -amirina por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 704–706, 2011.
- DORNELAS, A. S. P.; SARMENTO, R. A.; SANTOS, G. R.; NASCIMENTO, M. O.; SOUZA, D. J. Fungos Filamentosos Associados às Espécies *Atta sexdens* (Linnaeus) e *Atta laevigata* (F. Smith) (Hymenoptera: Formicidae). **EntomoBrasilis**, v. 9, n. 1, p. 26–30, 2016.
- DUAN, D. D.; BU, C. Y.; CHENG, J.; WANG, Y. N.; SHI, G. L. Isolation and Identification of Acaricidal Compounds in *Inula japonica* (Asteraceae). **Journal of Economic Entomology**, v. 104, n. 2, p. 375–378, 2011.
- EBAJO JR., V. D.; SHEN, C.; RAGASA, C. Y. Terpenoids and Sterols from *Hoya multiflora* Blume. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 5, n. 4, p. 33–39, 2015.
- EL-KASHEF, D. F.; HAMED, A. N. E.; KHALIL, H. E.; KAMEL, M. S. Triterpenes and

sterols of family Apocynaceae (2013-1955), A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 4, n. 2, p. 21–39, 2015.

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

ENDRESS, M. E.; LIEDE-SCHUMANN, S.; MEVE, U. An updated classification for Apocynaceae. **Phytotaxa**, v. 159, n. 3, p. 175–194, 2014.

FAVRE-GODAL, Q.; DORSAZ, S.; MARCOURT, M.; BERTINI, V.; DORMIA, E.; MICHELLOD, E.; VOINESCO, F.; GUPTA, M.; GINDRO, K.; SANGIARD, D.; QUEIROZ, E. F.; WOLFENDER, J. Identification of Triterpenoids from *Schefflera systyla*, *Odontadenia puncticulosa* and *Conostegia speciosa* and In Depth Investigation of Their in vitro and in vivo Antifungal Activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 3, p. 443–454, 2017.

FERNANDES, J. B.; DAVID, V.; FACCHINI, P. H.; SILVA, M. F. G. F.; RODRIGUES FILHO, E.; VIEIRA, P. C.; GALHIANE, M. S.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J.; VICTOR, S. R.; SANTOS, A. M. R. Extrações de óleos de sementes de citros e suas atividades sobre a formiga cortadeira *Atta sexdens* e seu fungo simbionte. **Química Nova**, v. 25, n. 6b, p. 1091–1095, 2002.

FILHO, V. C.; MEYRE-SILVA, C.; NIERO, R.; BOLDA MARIANO, L. N.; GOMES DO NASCIMENTO, F.; VICENTE FARIAS, I.; GAZONI, V. F.; SANTOS SILVA, B.; GIMÉNEZ, A.; GUTIERREZ-YAPU, D.; SALAMANCA, E.; MALHEIROS, A. Evaluation of antileishmanial activity of selected brazilian plants and identification of the active principles. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2013, p. 1–7, 2013.

FORZZA, R. C. (ORG). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.

GALLO, M. B. C.; SARACHINE, M. J. Biological Activities of Lupeol. **International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 46–66, 2009.

GAVIRAJ, E. N.; VEERESHAM, C. Effect of Precursors and Organic Compounds on Alkaloid Production in Transformed Root Cultures of *Catharanthus roseus* var. nirmal. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, n. 5, p. 371–377, 2006.

GIOVANNINI, P.; HOWES, M. R. Medicinal plants used to treat snakebite in Central America: Review and assessment of scientific evidence. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 199, n. Março, p. 240–256, 2017.

GUPTA, M. P. Cuatro Décadas de Investigaciones Farmacognósticas sobre la Flora Panameña. **Tecnociencia**, v. 15, n. 2, p. 119–163, 2013.

HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; DA SILVA, O. A.; MAROTI, P. S. Toxic effects of *Canavalia ensiformis* L. (Leguminosae) on laboratory colonies of *Atta sexdens* L. (Hym., Formicidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 124, n. 1, p. 33–35, 2000.

HOUGHTON, P. J.; CHESHIRE, P. J.; HALLMAN II, J. D.; LUTZ, L.; FRIEDMAN, H. S.; DANKS, M. K.; HOUGHTON, J. A. Efficacy of topoisomerase I inhibitors, topotecan and irinotecan, administered at low dose levels in protracted schedules to mice bearing xenografts of human tumors. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 36, n. 5, p. 393–403, 1995.

- KEAWSA-ARD, S.; LIAWRUANGRATH, B.; KONGTAWHEELERT, S. Bioactive compounds from *Mesua ferrea* stems. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 42, n. 1, p. 186–196, 2015.
- KINOSHITA, L.S. (COORD.). Apocynaceae In: Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J., Melhem, T.S., Martins, S.E., Kirizawa, M., Giuliatti, A.M. (eds.) **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2005. vol. 4, p. 35-92.
- KUMAR, A.; PATIL, D.; RAJAMOCHANAN, P. R.; AHMAD, A. Isolation, Purification and Characterization of Vinblastine and Vincristine from Endophytic Fungus *Fusarium oxysporum* Isolated from *Catharanthus roseus*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–10, 2013.
- KUMAR, S.; SINGH, A.; BAJPAI, V.; KUMAR, B. Identification, characterization and distribution of monoterpene indole alkaloids in *Rauwolfia* species by Orbitrap Velos Pro mass spectrometer. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 118, n. Janeiro, p. 183–194, 2016.
- LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. How Many Species Are There in Brazil? **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 619–624, 2005.
- LINHARES, J. F. P.; PINHEIRO, C. U. B. Caracterização do sistema de extração de látex de janaúba (*Himatanthus* Willd. ex Schult. - Apocynaceae), no Município de Alcântara, Estado do Maranhão, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 4, n. 1, p. 23–31, 2013.
- LOECK, A. E.; GRUTZMACHER, D.; COIMBRA, S. Ocorrência de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* nas principais regiões agropecuárias do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, n. 2, p. 129–133, 2003.
- LUCAS, D. M.; STILL, P. C.; PÉREZ, L. B.; GREVER, M. R.; KINGHORN, A. D. Potential of plant-derived natural products in the treatment of leukemia and lymphoma. **Current drug targets**, v. 11, n. 7, p. 812–22, 2010.
- MACIEL, M. V.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; AMÓRA, S. S. A. Extratos vegetais usados no controle de dípteros vetores de zoonoses. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 105–112, 2010.
- MARINHO, D. G.; ALVIANO, D. S.; MATHEUS, M. E.; ALVIANO, C. S.; FERNANDES, P. D. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 2, p. 530–537, 2011.
- MASOKO, P.; MABUSA, I. H.; HOWARD, R. L. Isolation of alpha-linolenic acid from *Sutherlandia frutescens* and its inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* shikimate kinase enzyme. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1–8, 2016.
- MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 3. ed. Fortaleza: UFC, 2009.
- MEDEIROS, J. D. **Guia de campo: vegetação do Cerrado 500 espécies**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 2011.
- MELO, C. M.; CARVALHO, K. M. M. B.; NEVES, J. C. S.; MORAIS, T. C.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A.; BRITO, G. A. C.; CHAVES, M. H. α,β -amyrin, a natural triterpenoid ameliorates L-arginine-induced acute pancreatitis in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 34, p. 4272–4280, 2010.
- MENEGHETTI, C.; REBELO, R. A.; VITORINO, M. D. Efeito do óleo essencial das

folhas de *Drimys angustifolia* em colônias de *Acromyrmex* spp. em plantio de *Pinus taeda*. **FLORESTA**, v. 45, n. 4, p. 755–768, 2015.

MORALES, J. F. A Synopsis of the Genus *Odontadenia* Series of Revisions of Apocynaceae XLV. **Bulletin du Jardin botanique national de Belgique / Bulletin van de National Plantentuin van België**, v. 67, p. 381–478, 1999.

MORALES, J. F. Estudios en las Apocynaceae Neotropicales XIX: la familia Apocynaceae (Apocynoideae, Rauvolfioideae) en Costa Rica. **Darwiniana**, v. 43, n. 1–4, p. 90–191, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOURA, A. C. S.; VILEGA, W.; SANTOS, L. C. Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* Linn. (Fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1136–1140, 2011.

MUÑOZ CENDALES, D. R.; CUCA SUÁREZ, L. E. Compuestos citotóxicos de origen vegetal y su relación con proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP). **Revista Colombiana de Cancerología**, v. 20, n. 3, p. 124–134, 2016.

NEGI, R. S. Fast In-Vitro Callus Induction in *Catharanthus roseus* - A Medicinally Important Plant Used in Cancer Therapy. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 2, n. 4, p. 597–603, 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

OKOYE, N. N.; OKOYE, C. O. B. Anti-oxidant and Antimicrobial Flavonoid Glycosides from *Alstonia boonei* De Wild Leaves. **British Journal of Pharmaceutical Research Brazil**, v. 10, n. 6, p. 1–9, 2016.

OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F. Análise de Misturas de Triterpenos por RMN de ¹³C. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 278–281, 1990.

OUNAÏSSIA, K.; PERTUIT, D.; MITAINE-OFFER, A.; MIYAMOTO, T.; TANAKA, C.; DELEMASURE, S.; DUTARTRE, P.; SMATI, D.; LACAÏLLE-DUBOIS, M. New pregnane and phenolic glycosides from *Solenostemma argel*. **Fitoterapia**, v. 114, n. Outubro, p. 98–104, 2016.

PARAMASIVAM, A.; SAMBANTHAM, S.; SHABNAM, J.; RAGHUNANDHAKUMAR, S.; ANANDAN, B.; RAJIV, R.; VIJAYASHREE PRIYADHARSINI, J.; JAYARAMAN, G. Anti-cancer effects of thymoquinone in mouse neuroblastoma (Neuro-2a) cells through caspase-3 activation with down-regulation of XIAP. **Toxicology Letters**, v. 213, n. 2, p. 151–159, 2012.

PATERNA, A.; GOMES, S. E.; BORRALHO, P. M.; MULHOVO, S.; RODRIGUES, C. M. P.; FERREIRA, M. U. (3'R)-hydroxytabernaegantine C: A bisindole alkaloid with potent apoptosis inducing activity in colon (HCT116, SW620) and liver (HepG2) cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, n. Dezembro, p. 236–244, 2016.

PATRIDGE, E.; GAREISS, P.; KINCH, M. S.; HOYER, D. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 2, p. 204–207, 2015.

PEDERNERA, A. M.; GUARDIA, T.; GUARDIA CALDERÓN, C. E.; ROTELLI, A. E.; ROCHA, N. E.; SAAD, J. R.; LOPEZ VERRILLI, M. A.; GARCIA ASEFF, S.; PELZER, L. E. Anti-inflammatory effect of *Acacia visco* extracts in animal models. **Inflammopharmacology**, v. 18, n. 5, p. 253–260, out. 2010.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and pharmacognosy. **Phytochemistry**, v. 68, n. November–December 2007, p. 2960–2972, 2007.

PINHEIRO, R. S.; RABELO, S. V.; OLIVEIRA, A. P.; GUIMARÃES, A. L.; MORAES-FILHO, M. O.; COSTA, M. P.; PESSOA, C. Ó.; LÚCIO, A. S. S. C.; ALMEIDA, J. R. G. S. Phytochemical screening and evaluation of cytotoxicity of stem bark extracts of *Anaxagorea dolichocarpa* and *Duguetia chrysocarpa* (Annonaceae). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 4, p. 793–798, 2016.

RABBANI-CHADEGANI, A.; CHAMANI, E.; HAJIHASSAN, Z. The effect of vinca alkaloid anticancer drug, vinorelbine, on chromatin and histone proteins in solution. **European Journal of Pharmacology**, v. 613, n. 1–3, p. 34–38, 2009.

RAGASA, C. Y.; CORNELIO, K. B. Triterpenes from *Euphorbia hirta* and their cytotoxicity. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, n. 5, p. 528–533, 2013.

RAPINI, A. Taxonomy “under construction”: Advances in the systematics of Apocynaceae, with emphasis on the Brazilian Asclepiadoideae. **Rodriguesia**, v. 63, n. 1, p. 75–88, 2012.

ROCHA, A. I.; LUZ, A. I. R.; RODRIGUES, W. A. A presença de alcalóides em espécies botânicas da Amazônia. VII - Apocynaceae. **Acta Amazonica**, v. 12, n. 2, p. 381–387, 1982.

RODRÍGUEZ, Y. A.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO, J.; BUENO, O. C.; MALASPINA, O.; FERREIRA, R. A. C.; FONTANETTI, C. S. *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* bioassays to evaluate effects of the insecticide imidacloprid. **Chemosphere**, v. 120, n. Fevereiro, p. 438–442, 2015.

ROMO-ASUNCIÓN, D.; ÁVILA-CALDERÓN, M. A.; RAMOS-LÓPEZ, M. A.; BARRANCO-FLORIDO, J. E.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, S.; ROMERO-GOMEZ, S.; ALDECO-PÉREZ, E. J.; PACHECO-AGUILAR, J. R.; RICO-RODRÍGUEZ, M. A. Juvenomimetic and Insecticidal Activities of *Senecio salignus* (Asteraceae) and *Salvia microphylla* (Lamiaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, v. 99, n. 3, p. 345–351, set. 2016.

SALATINO, A.; SUGAYAMA, R. L.; NEGRI, G.; VILEGAS, W. Effect of constituents of the foliar wax of *Didymopanax vinosum* on the foraging activity of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 86, n. 3, p. 261–266, 1998.

SANDRI, J.; VIALA, J. Direct Preparation of (Z,Z)-1,4-Dienic Units with a New C6 Homologating Agent: Synthesis of α -Linolenic Acid. **Synthesis**, n. 3, p. 271–275, 1995.

SANTOS, A. C. B.; SILVA, M. A. P.; SANTOS, M. A. F.; LEITE, T. R. Levantamento etnobotânico, químico e farmacológico de espécies de Apocynaceae Juss. ocorrentes no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 3, p. 442–458, 2013.

SASHIDHARA, K. V.; SINGH, S. P.; MISRA, S.; GUPTA, J.; MISRA-BHATTACHARYA, S. Galactolipids from *Bauhinia racemosa* as a new class of antifilarial agents against human lymphatic filarial parasite, *Brugia malayi*. **European**

Journal of Medicinal Chemistry, v. 50, p. 230–235, 2012.

SCHULTE, A. E.; DURÁN, E. M. L.; HEIJDEN, R.; VERPOORTE, R. Mevalonate kinase activity in *Catharanthus roseus* plants and suspension cultured cells. **Plant Science**, v. 150, n. 1, p. 59–69, 2000.

SCHULTES, R. E. De plantis toxicariis e mundo novo tropicale commentationes. XIX. Biodynamic apocynaceous plants of the northwest amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 1, n. 2, p. 165–192, 1979.

SINGH, M.; KAUR, M.; SILAKARI, O. Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 84, n. Setembro, p. 206–239, 2014.

SOUZA, A. D. L.; ROCHA, A. F. I.; PINHEIRO, M. L. B.; ANDRADE, C. H. S.; GALOTTA, A. L. A. Q.; SANTOS, M. P. S. S. Constituintes químicos de *Gustavia augusta* L. (Lecythidaceae). **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 439–442, 2001.

SOUZA, G. R.; OLIVEIRA-JUNIOR, R. G.; DINIZ, T. C.; BRANCO, A.; LIMA-SARAIVA, S. R. G.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, A. P.; PACHECO, A. G. M.; SILVA, M. G.; MORAES-FILHO, M. O.; COSTA, M. P.; PESSOA, C. Ó.; ALMEIDA, J. R. G. S. Assessment of the antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Morus nigra* L. (Moraceae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 14, p. 1–7, 2017.

TEREZAN, A. P.; ROSSI, R. A.; ALMEIDA, R. N. A.; FREITAS, T. G.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; PIRANI, J. R. Activities of extracts and compounds from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. (Rutaceae) in leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 5, p. 882–886, 2010.

TOHAR, N.; AWANG, K.; MOHD, M. A.; JANTAN, I. Chemical Composition of the Essential Oils of Four *Plumeria* Species Grown on Peninsular Malaysia. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, n. 6, p. 613–617, 2006.

TORRES-RÊGO, M.; FURTADO, A. A.; BITENCOURT, M. A. O.; LIMA, M. C. J. S.; ANDRADE, R. C. L. C.; AZEVEDO, E. P.; SOARES, T. C.; TOMAZ, J. C.; LOPES, N. P.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; ZUCOLOTTO, S. M.; FERNANDES-PEDROSA, M. F. Anti-inflammatory activity of aqueous extract and bioactive compounds identified from the fruits of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 275, 2016.

WEN, S.; CHEN, Y.; LU, Y.; WANG, Y.; DING, L.; JIANG, M. Cardenolides from the Apocynaceae family and their anticancer activity. **Fitoterapia**, v. 112, n. Julho, p. 74–84, 2016.

WILLAMAN, J. J.; SCHUBERT, B. G. **Alkaloid-bearing plants and their contained alkaloids**. Washington: U.S. Department of Agriculture, 1961.

WINK, M. Secondary Metabolites, the Role in Plant Diversification of. **Encyclopedia of Evolutionary Biology**, v. 4, p. 1–9, 2016.

YAP, W.; GAN, C.; SIM, K.; LIM, S.; LOW, Y.; KAM, T. Aspidofractinine and Eburnane Alkaloids from a North Borneo *Kopsia*. Ring-Contracted, Additional Ring-Fused, and Paucidactine-Type Aspidofractinine Alkaloids from *K. pauciflora*. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 1, p. 230–239, 2016.

ZAPPI, D. C.; RANZATO FILARDI, F. L.; LEITMAN, P.; SOUZA, V. C.; WALTER, B. M. T.; PIRANI, J. R.; MORIM, M. P.; QUEIROZ, L. P.; CAVALCANTI, T. B.;

MANSANO, V. F.; FORZZA, R. C. Growing knowledge: An overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguesia**, v. 66, n. 4, p. 1085–1113, 2015.