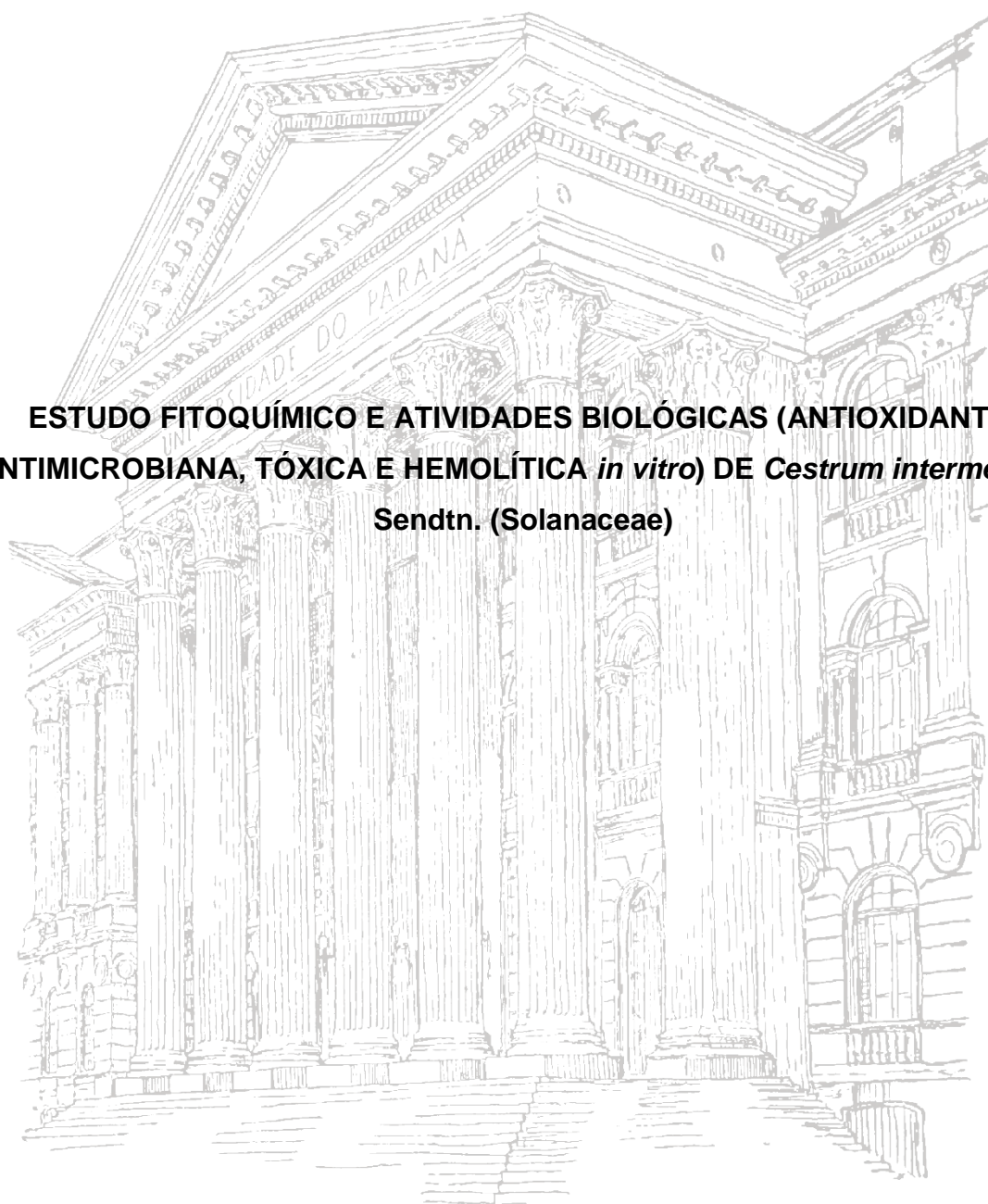


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELLIS MARINA SZABO

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS (ANTIOXIDANTE,
ANTIMICROBIANA, TÓXICA E HEMOLÍTICA *in vitro*) DE *Cestrum intermedium*
Sendtn. (Solanaceae)**



CURITIBA

2015

ELLIS MARINA SZABO

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS (ANTIOXIDANTE,
ANTIMICROBIANA, TÓXICA E HEMOLÍTICA *in vitro*) DE *Cestrum intermedium*
Sendtn. (Solanaceae)**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.
Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marilis Dallarmi Miguel

CURITIBA

2015

Szabo, Marina Ellis

Estudo fitoquímico e atividades biológicas (antioxidante, antimicrobiana, tóxica e hemolítica *in vitro*) de *Cestrum intermedium* Sendtn. (Solanaceae) / Marina Ellis Szabo - Curitiba, 2015.

108 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Professor Dr. Obdulio Gomes Miguel

Coorientadora: Professora Dra. Marilis Dallarmi Miguel

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. Coerana. 2. Ecotoxicidade. 3. Potencial hemolítico. 4. Perfil fitoquímico. 5. *Aedes aegypti*. I. Miguel, Obdulio Gomes. II. Miguel, Marilis Dallarmi. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 583.79

TERMO DE APROVAÇÃO

ELLIS MARINA SZABO

Título: **"ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS (ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA, TÓXICA E HEMOLÍTICA *in vitro*) DE *Cestrum intermedium* sendtn. (Solanaceae)"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.



Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel
Orientador



Prof. Dr. Ailton Rodrigues Pinto Junior
Pontifícia Universidade Católica do Paraná



Profª. Draª. Eliane Carneiro Gomes
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 24 de fevereiro de 2015.

Aos meus pais, Ademilde e Luiz.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, Ademilde e Luiz, por todo o amor, apoio e lições.

Ao meu parceiro de vida, Bruno, pelo amor, incentivo, compreensão e companhia diária.

Aos amigos, irmãos do coração, por tornar a jornada mais leve.

À Tita pelo carinho, preocupação e contribuição.

À parceira e vizinha, Isabel, por todos os momentos (construtivos ou distraídos) partilhados ao longo desta etapa.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

A CAPES pelo apoio financeiro.

À Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) pelos lotes de ovos de *Aedes aegypti*.

Aos orientadores, Obdulio Gomes Miguel e Marilis Dallarmi Miguel, pela confiança, paciência e orientação.

Aos Prof. Dr. Josiane Dias, Sandra Zanin e Victor Kerber pelo conhecimento compartilhado e contribuição no andamento do trabalho.

Aos Prof. Dr. Roberto Pontarolo, Railson Henneberg, Fábio Murakami, Anderson Barison e Dayane Alberton da Universidade Federal do Paraná pela estrutura cedida, auxílio e generosidade.

Aos colegas de bancada Juliana Danna Kulik, Mariana Saragioto Krause, Camila Freitas de Oliveira, Luciane Dalarmi, Angela Souza, Cristiane de Paula, Gislene Fujiwara, Maislian de Oliveira, Daniella Oliveira e Ranieri Campos.

Aos companheiros de laboratório Vinícius Benardczuk, Cristiane Bezerra, Francis Merino, Fernanda Ocampos, Beatriz Hirota e Ana Flávia Schvabe, pelo grande apoio, parceria e cortesia.

Às colegas da Universidade Federal do Paraná Andressa Veiga e Leticia Leonart pela disposição e auxílio.

Ao Prof. Dr. Márcio Coraiola pela literatura cedida, paciência, colaborações e conversas espirituosas e a sua família, pelo acolhimento, carinho e momentos maravilhosos.

Aos Prof. Dr. Adriane Martins de Freitas, Lucia R. R. Martins, Wanessa Ramsdorf, Marcus Liz e Thomaz Pagioro e à colega Thalita Copelli da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pela contribuição, auxílio e parceria.

Ao curador do Museu Botânico Municipal de Curitiba Osmar dos Santos Ribas, pela receptividade, identificação e depósito do material botânico.

Aos técnicos, Graça e Paulo, pelo auxílio e cordialidade.

Ao secretário, Jean Godoi, pela paciência e prestatividade.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta e não foram mencionados.

“There are some four million different kinds of animals and plants in the world. Four million different solutions to the problems of staying alive”

Sir David Attenborough

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil fitoquímico e atividades biológicas de *Cestrum intermedium*, uma espécie de solanácea nativa do Brasil, muito utilizada como ornamento por suas flores atraentes de odor agradável. É considerada a planta tóxica de maior importância em regiões do sul do país, desenvolvendo quadro hepatotóxico em gado bovino que ingere suas folhas, ocasionando morte na maioria dos casos. Os extratos brutos e frações de folhas e cascas da espécie foram avaliados quanto à toxicidade aguda em microcrustáceos e larvas de *Aedes aegypti*, quanto ao potencial hemolítico, antimicrobiano e antioxidante, além de traçar o perfil fitoquímico da espécie. Os bioensaios traçaram um perfil ecotoxicológico e de atividades biológicas preliminares da espécie, evidenciando ecotoxicidade aos organismos testados, potencial hemolítico, fraco potencial antimicrobiano contra *C. albicans*, *S. epidermidis* e *S. aureus*, moderada capacidade antioxidante comparável à rutina e butil-hidroxi-tolueno. Os resultados dos bioensaios foram avaliados juntamente com o perfil fitoquímico obtido pela realização de ensaio sistemático fitoquímico, possibilitando inferir quais classes de metabólitos secundários são os responsáveis pela atividade.

Palavras-chave: Coerana. Ecotoxicidade. Potencial hemolítico. Perfil fitoquímico. *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

This work presents as objective to evaluate *Cestrum intermedium*'s phytochemical profile and biological activities, a Brazil native Solanaceae species, broadly used as ornament for its attractive and pleasant odor releasing flowers. Some country's southern regions it's considered to be the most important toxic plant, for causing liver toxicity in cattle which ingest its leaves, resulting in death most of the times. Leaves' and barks' gross extracts and it's fractions were evaluated for acute toxicity in microcrustaceans and *Aedes aegypti* larvae, for hemolytic, antimicrobial and antioxidant potentials, besides outlining species' phytochemical profile. Bioassays outlined species' preliminary ecotoxicological and biological activities profile, showing toxicity for microcrustaceans tested, hemolytic potential, weak antimicrobial potential against *C. albicans*, *S. epidermidis* and *S. aureus*, comparable to rutin and butyl-hydroxy-toluen moderate antioxidant capacity. Bioassays' results were evaluated observing phytochemical essays' results, providing an active secondary metabolites panorama.

Key words: Coerana. Ecotoxicity. Hemolytical Potencial. Phytochemical profile. *Aedes aegypti*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	ESQUEMA DE ROTA BIOSINTÉTICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	20
FIGURA 2 -	RAMO DE <i>Cestrum intermedium</i> EM FLORAÇÃO (MAIO DE 2013).....	27
FIGURA 3 -	DISTRIBUIÇÃO DE <i>Cestrum intermedium</i> NO TERRITÓRIO BRASILEIRO.....	27
FIGURA 4 -	CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE <i>C. intermedium</i>	28
FIGURA 5 -	EXSICATA DE <i>C. intermedium</i> Sendtn.....	29
QUADRO 1 -	CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE <i>C. intermedium</i>	29
QUADRO 2 -	CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE <i>C. intermedium</i>	29
QUADRO 3 -	COMPARAÇÃO ENTRE TOXICOLOGIA CLÁSSICA E ECOTOXICOLOGIA.....	31
FIGURA 6 -	EXSICATA DE <i>Cestrum intermedium</i> DEPOSITADA NO HERBÁRIO DO MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL DE CURITIBA.....	37
FIGURA 7 -	1: FOLHAS SEGMENTADAS DOS CAULES; 2: LENHO; 3: CAULES E CASCAS (DENOMINADOS CASCAS).....	38
FIGURA 8 -	ESQUEMA DE OBTENÇÃO DE EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES E EXTRATOS AQUOSOS.....	43
FIGURA 9 -	MOLÉCULA DO ISOLADO EBCPPT (PALMITATO DE LUPEOL).....	70
FIGURA 10 -	ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DO ISOLADO EBCPPT (PALMITATO DE LUPEOL).....	71
FIGURA 11 -	ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DO ISOLADO EBCPPT (PALMITATO DE LUPEOL).....	72
FIGURA 12 -	ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EXTERNAS OBSERVADAS EM LARVAS EXPOSTAS AO EXTRATO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE <i>C. intermedium</i>	79
FIGURA 13 -	ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EXTERNAS OBSERVADAS EM LARVAS EXPOSTAS AO EXTRATO E FRAÇÕES DAS CASCAS DE <i>C. intermedium</i>	79
FIGURA 14 -	ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS INTERNAS OBSERVADAS EM LARVAS EXPOSTAS AO EXTRATO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE <i>C. intermedium</i>	81
FIGURA 15 -	ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS INTERNAS OBSERVADAS EM LARVAS EXPOSTAS AO EXTRATO E FRAÇÕES DAS CASCAS DE <i>C. intermedium</i>	82
GRÁFICO 1 -	CONTROLES DE AMOSTRAS DE <i>C. intermedium</i> COM ATIVIDADE HEMOLÍTICA SIGNIFICATIVA.....	84
GRAFICO 2 -	CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO.....	89
GRÁFICO 3 -	CAPACIDADE DE REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DOS CONTROLES E AMOSTRAS.....	91
GRÁFICO 4 -	CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA IC ₅₀	

	DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS.....	92
GRÁFICO 5 –	CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA IC ₅₀ DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DAS CASCAS.....	93
GRÁFICO 6 –	CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA IC ₅₀ DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS CASCAS.....	93

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	TEOR DE UMIDADE, CINZAS E DENSIDADE APARENTE DE FOLHAS E CASCAS DE <i>C. intermedium</i>	64
TABELA 2 -	TEOR DE SÓLIDOS DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E AQUOSO DE <i>C. intermedium</i>	65
TABELA 3 -	RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE FOLHAS E FRAÇÕES DE FOLHAS E CASCAS DE <i>C. intermedium</i>	66
TABELA 4 -	ANÁLISE SISTEMÁTICA FITOQUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS E CASCAS.....	67
TABELA 5 -	ANÁLISE SISTEMÁTICA FITOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS E CASCAS.....	67
TABELA 6 -	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ¹³ C DO ISOLADO EBCPPT (PALMITATO DE LUPEOL).....	73
TABELA 7 -	TOXICIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES EM <i>Artemia salina</i>	75
TABELA 8 -	TOXICIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES EM <i>Daphnia magna</i>	77
TABELA 9 -	TOXICIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES EM <i>Aedes aegypti</i>	77
TABELA 10 -	POTENCIAL HEMOLÍTICO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS E CASCAS DE <i>C. intermedium</i>	85
TABELA 11 -	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (µg/mL) PARA CEPAS SUCEPTÍVEIS AOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>C. intermedium</i>	88
TABELA 12 -	TEOR DE FENÓLICOS EM RELAÇÃO AO ÁCIDO GÁLICO.....	89
TABELA 13 -	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES EM RELAÇÃO À VITAMINA C.....	90
TABELA 14 -	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES EM RELAÇÃO À RUTINA.....	91
TABELA 15 -	IC ₅₀ DAS AMOSTRAS COM ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAIS LIVRES.....	92
TABELA 16 -	ÍNDICE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E BHT	94

LISTA DE SIGLAS

AA	Atividade Antioxidante
AAR	Atividade Antioxidante Relativa
ABAP	2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloreto
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AEC	Fração Acetato de Etila Cascas
AEF	Fração Acetato de Etila Folhas
APG III	Angiosperm Phylogeny Group III
ATCC	American Type Culture Selection
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
CC	Fração Clorofórmio Cascas
CE ₅₀	Concentração efetiva que afeta 50% dos indivíduos
CF	Fração Clorofórmio Folhas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida em Camada Delgada
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrihidrazila
EAG	Equivalentes em Ácido Gálico
EBC	Extrato Bruto Cascas
EBF	Extrato Bruto Folhas
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
°GL	Graus Gay Lussac
HC	Fração Hexano Cascas
HCl	Ácido Clorídrico
HF	Fração Hexano Folhas
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
IC ₅₀	Concentração Inibitória
IA	Índice Antioxidante
ISO	International Standard Organization
KOH	Hidróxido de Potássio
MDA	Malondialdeído
NaOH	Hidróxido de Sódio
NH ₄ OH	Amônio
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
PBS	Phosphate Buffer Saline
pH	Potencial Hidrogeniônico
RC	Fração Remanescente Cascas
RF	Fração Remanescente Folhas
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Tiobarbituric Acid Reactive Substances
TTC	2,3,5-trifeniltetrazólio
UV	Ultra Violeta
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 REVISÃO	19
3.1 A FAMÍLIA SOLANACEAE.....	19
3.2 O GÊNERO <i>Cestrum</i>	22
3.2.1 Exemplares investigados de <i>Cestrum</i> sp.....	24
3.2.1.1 <i>Cestrum nocturnum</i>	24
3.2.1.2 <i>Cestrum diurnum</i>	25
3.2.1.3 <i>Cestrum laevigatum</i>	25
3.2.1.4 <i>Cestrum sendtnerianum</i>	26
3.3 A ESPÉCIE <i>Cestrum intermedium</i>	26
3.4 TOXICOLOGIA.....	30
3.4.1 Ecotoxicologia.....	30
3.4.1.1 Ensaio Ecotoxicológicos.....	32
3.4.1.1.1 Ensaio de Toxicidade Aguda em <i>Artemia salina</i>	34
3.4.1.1.2 Ensaio de Toxicidade Aguda em <i>Daphnia magna</i>	35
3.4.1.1.3 Ensaio de Toxicidade Aguda em <i>Aedes aegypti</i>	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	37
4.2 TRATAMENTO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	38
4.3 ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS.....	39
4.3.1 Determinação da Perda por Dessecação.....	39
4.3.2 Determinação do Teor de Cinzas Totais.....	40
4.3.3 Determinação da Densidade Aparente.....	40
4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES.....	40
4.4.1 Obtenção dos Extratos Brutos.....	40
4.4.2 Determinação do Teor de Sólidos Totais.....	41
4.4.3 Reserva de Extrato Bruto Etanólico para Bioensaios.....	41
4.4.4 Obtenção das Frações dos Extratos Brutos.....	42
4.4.5 Rendimento dos Extratos Etanólicos e Frações.....	43
4.5 ENSAIOS FITOQUÍMICOS.....	44
4.5.1 Metabólitos Solúveis em Álcool.....	45
4.5.1.1 Pesquisa de Alcalóides.....	45
4.5.1.2 Pesquisa de Leucoantocianidinas.....	46
4.5.1.3 Pesquisa de Heterosídeo Flavônico.....	47
4.5.1.4 Pesquisa de Flavonóis.....	47
4.5.1.5 Pesquisa de Dihidroflavonóis.....	47
4.5.1.6 Pesquisa de Cumarinas.....	48
4.5.1.7 Pesquisa de Heterosídeos Antraquinônicos.....	49
4.5.1.8 Pesquisa de Esteroides e Triterpenos.....	49
4.5.2 Metabólitos Solúveis em Água.....	50
4.5.2.1 Pesquisa de Heterosídeos Antociânicos.....	50
4.5.2.2 Pesquisa de Heterosídeos Saponínicos.....	51

4.5.2.3 Pesquisa de Heterosídeos Cianogenéticos.....	51
4.5.2.4 Pesquisa de Taninos.....	51
4.6 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	52
4.7 BIOENSAIOS.....	53
4.7.1 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA TOXICIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULES.....	53
4.7.1.1 Avaliação da toxicidade aguda em <i>Artemia salina</i>	53
4.7.1.2 Avaliação da toxicidade aguda em <i>Daphnia magna</i>	54
4.7.1.3 Avaliação da toxicidade aguda em <i>Aedes aegypti</i>	55
4.7.1.3.1 Avaliação da morfologia das larvas de <i>Aedes aegypti</i>	56
4.7.1.4 Avaliação Hemolítica <i>in vitro</i>	57
4.7.2 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS <i>IN VITRO</i>	58
4.7.2.1 Avaliação do potencial de atividade antimicrobiana.....	58
4.7.2.1.1 Método da difusão em ágar.....	58
4.7.2.1.2 Determinação da concentração inibitória mínima.....	59
4.7.2.2 Avaliação da Atividade Antioxidante.....	60
4.7.2.2.1 Doseamento de polifenóis.....	60
4.7.2.2.2 Ensaio da Redução do Complexo Fosfomolibdênio.....	60
4.7.2.2.3 Avaliação da Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina).....	62
4.7.2.2.4 Ensaio de atividade antioxidante pelo método do ácido tiobarbiturico-espécies reativas (TBARS)	62
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1 ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS.....	64
5.1.1 Determinação dos teores de umidade, cinzas e densidade aparente das folhas e cascas de <i>Cestrum intermedium</i>	64
5.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS DOS EXTRATOS DAS FOLHAS E CASCAS DE <i>Cestrum intermedium</i>	65
5.3 RENDIMENTOS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS E FRAÇÕES.....	65
5.4 ENSAIO SISTEMÁTICO FITOQUÍMICO.....	66
5.5 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO.....	68
5.5.1 Cromatografia em coluna.....	68
5.5.2 Identificação por Ressonância Magnética Nuclear.....	69
5.6 BIOENSAIOS.....	74
5.6.1 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA TOXICIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULES.....	74
5.6.1.1 ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA EM <i>Artemia salina</i>	74
5.6.1.2 ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA EM <i>Daphnia magna</i>	76
5.6.1.3 ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA EM <i>Aedes aegypti</i>	77
5.6.1.3.1 Avaliação da morfologia larval de <i>Aedes aegypti</i>	78
5.6.1.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	83
5.6.2 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS <i>IN VITRO</i>	86
5.6.2.1 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO.....	86
5.6.2.1.1 Método da difusão em ágar.....	86
5.6.2.1.2 Microdiluição em caldo.....	86
5.6.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE.....	88
5.6.3.1 Doseamento de polifenóis.....	88
5.6.3.2 Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio.....	90
5.6.3.3 Avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina).....	91

5.6.3.4 Ensaio antioxidante pelo método do ácido tiobarbitúrico – espécies reativas (TBARS).....	94
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
REFERÊNCIAS	98

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas para fins medicinais é uma das maneiras mais antigas de prevenir, tratar e curar enfermidades. Certas comunidades em desenvolvimento dispõem de plantas como única forma de cuidados básicos de saúde (MACIEL *et al.*, 2002). Por estimativa do Ministério da Saúde (BRASIL, 2012), cerca de 70% a 90% da população de países em desenvolvimento (no Brasil, cerca de 82%) depende de plantas medicinais no que se refere à Atenção Primária à Saúde. Em países desenvolvidos como Canadá, França e Alemanha, a mesma parcela da população utiliza a medicina tradicional como complemento, alternativa ou tratamento não-convencional (BRASIL, 2012). Mesmo com a evolução dos tratamentos alopáticos no século XX, o acesso facilitado às plantas medicinais e a própria tradição de uso, perpetuam o hábito de recorrer às feiras, quintais e mercados populares (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005).

O Ministério do Meio Ambiente (BRASIL, 2014) afirma que, por ter proporções continentais, o Brasil apresenta diversos ecossistemas e biomas, estando na principal posição entre os países megadiversos, detendo a maior biodiversidade do planeta. Desta forma, é fundamental que pesquisas com espécies nativas sejam intensificadas, valorizando nossa biodiversidade local ainda pouco estudada, contribuindo para caracterização dos metabólitos presentes na flora nacional.

A prospecção aleatória da biodiversidade é uma forma de proceder à busca de desenvolvimento de novas medicações (COSTA-NETO, 2012). A substituição de medicamentos com efeitos colaterais, produção de sinergia entre fármacos tradicionais e a busca por alternativas enantiomericamente puras e seguras, são áreas de pesquisa que também efervescem (VAZ, 2008).

Diversos setores industriais buscam novas substâncias com propriedades interessantes às suas atividades (BRAZ FILHO, 2010). Procuram alternativas a produtos utilizados em nosso cotidiano, como agroquímicos, aditivos alimentares e medicamentos, a fim de reduzir efeitos danosos inerentes ao seu uso ou melhorar suas performances. Segundo Braz Filho (2010), estas alternativas são provenientes não somente de origens sintéticas, mas também de origens vegetais, uma vez que plantas são fontes significativas de novos compostos, sendo bastante investigadas para obtenção de inovações.

As propriedades de interesse a estes diversos setores da indústria geralmente são proporcionadas pelas substâncias naturais presentes nas plantas, denominadas metabólitos. Os metabólitos primários são substâncias essenciais ao funcionamento adequado do metabolismo básico da planta, tais como carboidratos e proteínas. Os metabólitos secundários, de maneira geral, são todos os outros. O conhecimento sobre identificação, complexidade e quantidade destes tem crescido geometricamente, evidenciando padrões entre o vasto compilado de dados arrecadado, inclusive sobre toxicidade (KINGSBURY, 1979; SANTOS, 2010).

Além da prospecção aleatória, a observação do comportamento de animais selvagens e domesticados em relação à automedicação praticada instintivamente, denominada automedicação animal, é muito útil na investigação de substâncias de diversos interesses. Muito da sabedoria medicinal, principalmente de comunidades indígenas, é espelhada no comportamento animal e evoluída de acordo com as necessidades (COSTA-NETO, 2012). Os animais também podem se intoxicar ao fazer uso de plantas como alimento ou medicamento. A ingestão de plantas tóxicas pode ocorrer por desconhecimento da planta pelo animal, palatabilidade agradável, fome (ingerindo também plantas de palatabilidade desagradável), sede (que interfere na seleção de paladar do animal), entre outros. A resposta tóxica animal pode variar entre espécies vegetais nas fases de crescimento, diferentes épocas do ano, diferentes variedades, tipo de solo e fertilização (HARAGUCHI, 2003).

Justifica-se o estudo de *Cestrum intermedium* Sendtn. (Solanaceae) para investigar substâncias com possíveis atividades biológicas, sejam estas tóxicas, de potencial terapêutico ou com aplicabilidade ambiental (como inseticida, por exemplo). Além disso, para a elucidação das substâncias responsáveis pelo quadro hepatotóxico ocasionado a bovinos e ovinos que ingerem folhas desta espécie, reportado por Furlan *et al.* (2008), Bandarra *et al.* (2009) e Wouters *et al.* (2013). Por pertencer a uma família muito rica em substâncias bioativas, potencialmente medicinais e não apresentar estudos aprofundados, torna-se necessário o estudo desta espécie.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudos preliminares do perfil fitoquímico e de atividades biológicas de *Cestrum intermedium* Sendtn.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os parâmetros físico-químicos das folhas e cascas.
- Realizar ensaios sistemáticos fitoquímicos nos extratos de folhas e cascas.
- Realizar o isolamento e identificação de compostos químicos presentes em *Cestrum intermedium*.
- Avaliar toxicidade aguda dos extratos e frações utilizando microcrustáceos.
- Avaliar atividade larvicida dos extratos e frações utilizando *Aedes aegypti*.
- Avaliar atividade hemolítica dos extratos e frações.
- Avaliar potencial de atividade antimicrobiana dos extratos e frações.
- Avaliar atividade antioxidante dos extratos e frações.

3 REVISÃO

3.1 A FAMÍLIA SOLANACEAE

Cerca de 96 gêneros compõem a família Solanaceae, uma das maiores e mais complexas dentre as Angiospermas, abrigando em torno de duas a três mil espécies. Está incluída na subclasse Asteridae, ordem Solanales de acordo com Cronquist (1981). Distribuída geograficamente de forma muito ampla, com centros de diversidade nas Américas e Oceania, possui representantes herbáceos, arbustivos, arbóreos, escandentes e epifíticos, desenvolvendo-se em grande variabilidade de ambientes, de florestas a campos, além de regiões antropizadas. São dispersas predominantemente por animais, principalmente morcegos e pássaros (VENDRUSCOLO, 2009). Diversos processos históricos como a migração de espécies, eventos geológicos e evoluções resultantes do isolamento geográfico e ecológico influenciam a distribuição geográfica, que nem sempre é uniforme, principalmente por fatores ambientais como ventos, temperatura, taxa de precipitação pluviométrica, altitude e tipo de solo (VENDRUSCOLO, 2009).

As solanáceas apresentam metabólitos secundários bioativos como alcaloides do tipo tropano, pirrol, piridínicos e esteroidais, witanolidas, ecdisteroides, sesquiterpenos, diterpenos, glicoalcaloides, flavonoides, esteroides, saponinas, sapogeninas esteroidais, glicosídeos esteroidais e antraquinonas (VAZ, 2008). Assim como determinadas tribos e gêneros, a família Solanaceae é caracterizada por seus metabólitos secundários, sendo que a ausência ou presença de determinado metabólito auxilia a classificação quimiotaxonômica dos membros da família (VAZ, 2008). A Figura 1 demonstra graficamente o esquema de uma rota metabólica de todos os metabólitos secundários.

É provável que os metabólitos secundários tenham aparecido como produtos finais de ciclos metabólicos incompletos ou não totalmente balanceados e que apresentassem potencial tóxico caso fossem acumulados em tecidos. As plantas, ao longo de seu curso evolutivo, desenvolveram a capacidade de tornar estas substâncias tóxicas em atóxicas, estocá-las em locais inativos metabolicamente e também empregá-las como defesa contra predadores. No grau da evolução em que as plantas se encontram, os metabólitos secundários, quaisquer que tenham sido os

motivos para seu surgimento, são fundamentais na questão de defesa contra herbívoros, micro-organismos, raios UV e atração de animais polinizadores ou dispersores de sementes (KINGSBURY, 1979; SANTOS, 2010).

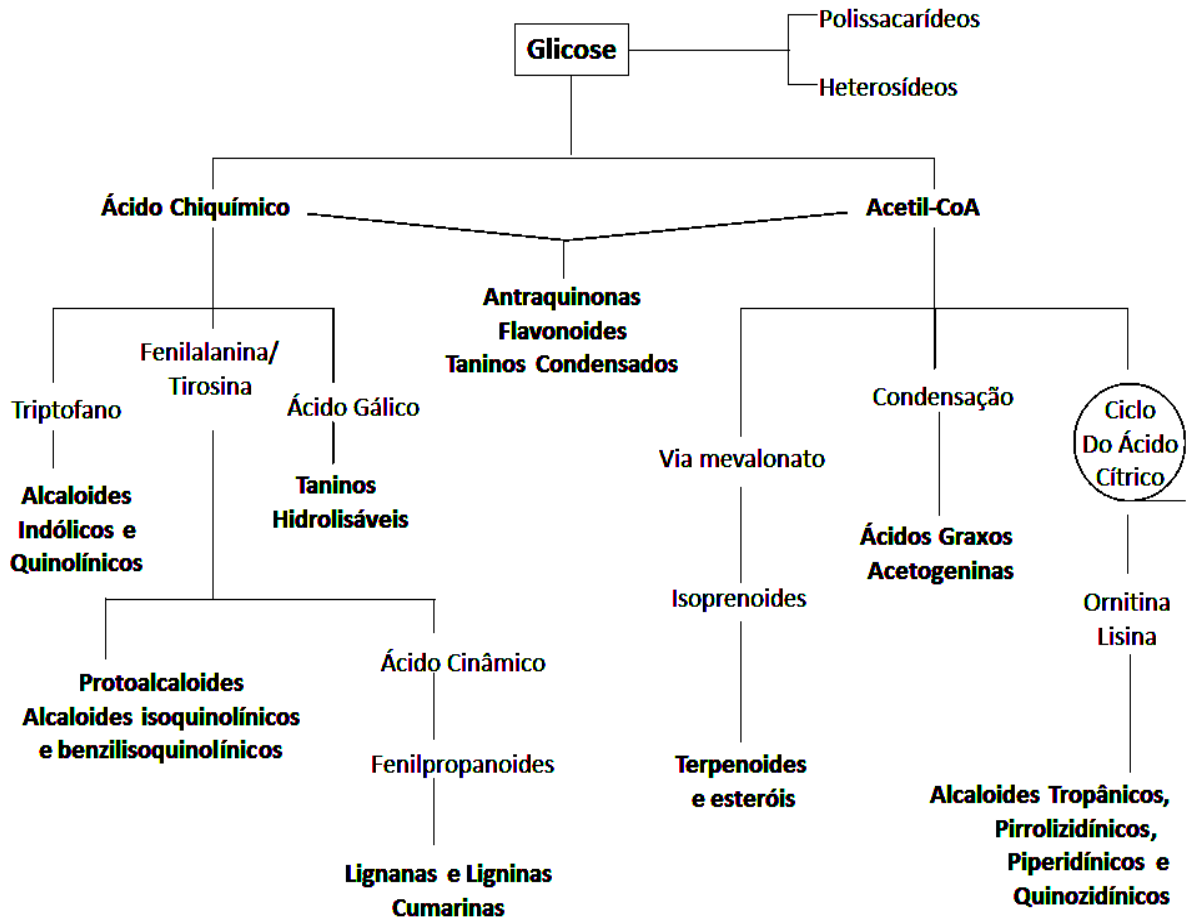


FIGURA 1: ESQUEMA DE ROTA BIOSSINTÉTICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

FONTE: ADAPTADO DE SANTOS (2010)

Para uma planta ser considerada efetivamente tóxica não basta a simples presença de metabólitos tóxicos em suas partes. Deve ser capaz de apresentá-lo em concentração suficiente para intoxicar o animal, além de driblar quaisquer mecanismos fisiológicos ou bioquímicos que o organismo que o receba possa desenvolver a fim de inativá-lo. Portanto, mesmo que uma planta apresente quantidades significativas de um metabólito tóxico, não se pode presumir que definitivamente tenha o poder de intoxicar um organismo (KINGSBURY, 1979).

A principal causa da toxicidade dominante desta família advém dos alcaloides, substâncias orgânicas cíclicas com nitrogênio em estado de oxidação negativa, com distribuição limitada entre os organismos vivos de diversos reinos (HENRIQUES *et al.*, 2002). Este grupo químico tem grande impacto na economia, medicina e até em setores sociais e políticos. Desde a execução de Sócrates com extrato de cicuta (contendo coníina), passando pelo uso do curare (contendo tubocurarina) nas pontas de flechas de índios, até o uso da atropina, extraída de *Datura stramonium* e *Atropa belladonna*, como antiespasmódico (HENRIQUES *et al.*, 2002).

Os alcaloides afastam predadores devido ao seu gosto amargo e suas propriedades tóxicas, apesar de inúmeros deles terem diversas aplicações na terapêutica (HENRIQUES *et al.*, 2002). A verificação da toxicidade depende de experimentos em animais, que nem sempre mimetizam a toxicidade em humanos. O principal interesse em plantas tóxicas reside no potencial de intoxicar seres humanos e animais, resultando em prejuízos significativos à saúde pública e pecuária (SCHENKEL *et al.*, 2002). Existem numerosas espécies vegetais de toxicidade variada, sendo as ornamentais de risco relativamente pequeno, apesar de existirem casos de efeitos mais lesivos. Algumas plantas ornamentais podem produzir efeitos irritantes, distúrbios cutâneos e até sistêmicos. Diversas solanáceas, quando ingeridas, ocasionam um quadro tóxico semelhante entre si, sobressaindo os gêneros *Datura*, *Cestrum* e *Solanum*. O efeito tóxico advém dos diversos alcaloides nelas presentes (SCHVARTSMAN, 2004).

São alguns membros da família Solanaceae: batata (*Solanum tuberosum*), berinjela (*Solanum melongena*), tomate (*Solanum lycopersicum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*) e beladona (*Atropa belladonna*), cada uma importante em diferentes aspectos nutricionais, econômicos, toxicológicos e medicinais (SILVA; AGRA, 2005; VAZ, 2008). Dentre os membros da família usados para cultivo ornamental, principalmente pelas flores, destacam-se: as trepadeiras de *Solanum* com flores roxas e frutos vermelhos, espécies de *Cestrum* com flores amarelo-ovo e inflorescência semelhante a um guarda-chuva, *Petunia* e *Salpiglossis*. Muitos indivíduos desta família são tóxicos, em destaque a *Atropa belladonna*, de onde se extrai a atropina, medicamento largamente utilizado na terapêutica (JOLY, 1985).

Evidências indicam que as solanáceas manifestam potencial terapêutico que deve ser investigado, sendo que diversos membros da família Solanaceae são

utilizados popularmente para tratamento de inúmeras moléstias. Por exemplo, a berinjela para eliminar cálculos de bexiga, a dama-da-noite para gastroenterite, o tabaco para sarna e escabiose e as folhas de tomate como cicatrizante (GRANDI *et al.*, 1989; PASTORE *et al.*, 2002). No entanto, algumas solanáceas têm propriedades tóxicas em determinadas dosagens, como a *Datura stramonium* L. (erva-do-diabo), *Nicotiana tabacum* L. (tabaco) e *Brunfelsia uniflora* (Pohl) D. Don (manacá-de-cheiro). Quando ingeridos em determinadas quantidades, os frutos verdes e folhas do tomate (*Solanum lycopersicum* L.) podem causar intoxicação extrema e levar à morte por falha respiratória (LORENZI; MATOS, 2008).

Algumas espécies de Solanaceae, como o tabaco (*Nicotiana tabacum*), têm aplicações ambientais. As folhas preparadas para a confecção de charutos e cigarros resultam em alto teor de nicotina e outros alcaloides. Soluções a 40% deste material preparado são utilizadas como inseticidas agrícolas, especialmente em horticultura e floricultura, sendo esta uma aplicação ambientalmente viável por utilizar substâncias naturais e biodegradáveis (LORENZI; MATOS, 2008).

3.2 O GÊNERO *Cestrum*

Embora seja considerado o segundo maior gênero da família Solanaceae, não há extensa investigação das espécies brasileiras de *Cestrum*, ocasionando que a identidade de muitas delas permaneça duvidosa. As relações intergenéricas, a estabilidade morfológica interespecífica e a variação morfológica intraespecífica comprometem a identificação dos táxons e a avaliação da magnitude do gênero, gerando opiniões divergentes quanto ao número de espécies e a circunscrição do gênero (SOARES *et al.*, 2007).

O gênero *Cestrum* (do grego: 'kestron', de 'kestros' = dardo) tem suas espécies difundidas nas zonas tropicais e subtropicais das Américas, abrigando cerca de 250 espécies. O Brasil é um dos maiores centros de diversidade de espécies, estimando que detenha em torno de 50 das aproximadas 200 espécies presentes na América. Pertencente à tribo Cestreae G. Don e à subfamília Cestroidae Schltldl., o gênero tem a maior diversidade de espécies e endemismo nos biomas de Mata Atlântica e Cerrado, ameaçados por desmatamento (KISSMANN; GROTH, 2000; SOARES, 2006; SOARES *et al.*, 2007).

Tipicamente americano, conta com espécies de valor ornamental (*C. diurnum* L., *C. nocturnum* L., entre outras), empregadas na medicina popular (*C. laevigatum* Schltl. como emoliente (RODRIGUES; GUEDES, 2006), *C. parqui* e *C. calycinum* para diarreias e *C. pseudoquina* e *C. amictum* como febrífugas (MENTZ *et al.*, 1997)) ou causadores de intoxicações e até morte em animais (*C. intermedium* Sendtn., *C. laevigatum* Schltl., entre outras) (KISSMANN; GROTH, 2000; SOARES, 2006; SOARES *et al.*, 2007). Ainda assim, não há levantamento aprofundado das espécies brasileiras, ocasionando que a identidade e propriedades de muitas delas não estejam descritas (KISSMANN; GROTH, 2000; SOARES, 2006; SOARES *et al.*, 2007).

Em território brasileiro, as espécies são conhecidas pelo nome vulgar 'coerana' (do tupí-guarani: 'cuí' = pimenta, e 'rana' semelhante, uma vez que seus frutos assemelham-se às bagas de pimenta). Algumas espécies de *Cestrum* são plantas ornamentais muito populares, como a coerana-amarela (*C. corymbosum* Schltl.), arbusto nativo do Brasil, cujas sementes servem de alimento para pássaros e a Dama-da-noite (*C. nocturnum* L.), arbusto com flores de marcante odor agradável (LORENZI; SOUZA, 2008).

Segundo Gallego (2011), com base nas características do cálice e da corola, as espécies de *Cestrum* foram classificadas por Dunal (1852) como *Habrothamnus* (Endl.) Schltl. e *Eucestrum*; posteriormente, Urban (1903) adicionou a seção *Pseudocestrum* com base em uma espécie das Antilhas. Gallego (2011) afirma que mais recentemente, o estudo filogenético de Montero-Castro *et al.* (2006), indica que não são monofiléticas as seções tradicionalmente propostas em *Cestrum*.

A taxonomia do gênero é muito complexa, pois tem grande semelhança morfológica com o gênero *Sessea* Ruiz *et* Pav., causando dificuldades de identificação. As características compartilhadas por *Cestrum* e *Sessea* são o porte arbustivo ou arbóreo, flores sempre articuladas na base, corola tubulosa, androceu com cinco estames inclusos no tubo, anteras dorsifixas, nectário anelar e frutos paucisseminados. Diferem-se pelo tipo de fruto e particularidades nas sementes, em *Cestrum* são angulosas, não aladas e alojadas no interior de bagas carnosas e em *Sessea* são compridas, aladas e contidas em cápsulas lenhosas (SOARES, 2006).

3.2.1 Exemplos investigados de *Cestrum* sp.

3.2.1.1 *Cestrum nocturnum*

A dama-da noite ou jasmim-noturno (*C. nocturnum* L.) é originária das Antilhas e utilizada como ornamental em diversos países: Haiti, República Dominicana, Cuba, Porto Rico, Antilhas Menores, México, Guatemala, Honduras, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Venezuela, Guianas, Brasil, Equador, Peru, Havaí, Estados Unidos da América, Espanha, França, Itália, Índia e China (SOARES *et al.*, 2007; CUARTAS; CASTAÑO, 2008; LORENZI; SOUZA, 2008). De acordo com Lorenzi e Souza (2008), as flores apresentam forte fragrância que pode causar alergias devido ao odor marcante. Há evidências de apresentar glicosídeos esteroidais, flavonoides glicosilados, saponinas esteroidais (GALLEGO, 2011).

Dentre seus metabólitos secundários de interesse estão as saponinas (gitogenina e digitogenina, utilizadas como bases para medicamentos tonificadores do músculo cardíaco, bradicárdacos e redutores de edema, dentre outras propriedades), que provocam hemólise e formam glicosídeos com açúcares, além de serem extremamente tóxicas; há uma significativa quantidade de alcaloides (principalmente nicotina, atropina, escopolamina e hiosciamina), que podem provocar alucinações e intoxicação (CUARTAS; CASTAÑO, 2008).

Em algumas comunidades, *C. nocturnum* é utilizada para combate de febres, realizar limpezas e aliviar diarreias (GRANDI *et al.*, 1989; GHENO-HEREDIA *et al.*, 2011). As folhas de dama-da-noite são utilizadas como substituto para a maconha em algumas regiões do Brasil, apesar de seus efeitos alucinógenos não estarem comprovados. Este uso pode ser justificado pelo fato das folhas conterem alto teor de nicotina (cerca de 45%). Suas folhas foram investigadas quanto aos efeitos analgésico, sedativo e antiepiléptico, inferindo possível aplicação farmacológica para tratamento de síndromes neurológicas (GALLEGO, 2011; CUARTAS; CASTAÑO, 2008).

3.2.1.2 *Cestrum diurnum*

Conhecida popularmente como jasmim-diurno, trata-se de um arbusto com flores de fragrância adocicada. Em ensaio sistemático fitoquímico, foram encontrados alcaloides, saponinas, e taninos (KHATUN *et al.*, 2014). Na África, seu óleo essencial é utilizado como repelente para o mosquito da malária (assim como *Cestrum nocturnum*) (AL-REZA *et al.*, 2010). O óleo essencial de *C. diurnum* mostrou atividade antibacteriana eficaz contra *P. aeruginosa* e *S. aureus* (BHATTACHARJEE *et al.*, 2005), além de promissora atividade larvicida contra *Culex quinquefasciatus* e *Anopheles stephensi* (PRASAD *et al.*, 2013). Baqai (1999) reporta que o jasmim-diurno apresenta o alcaloide nornicotina nas folhas, propriedades cardiotoxícas e cardiotônicas e pode provocar intoxicação devido à presença de saponinas.

3.2.1.3 *Cestrum laevigatum*

Segundo Vignoli-Silva (2009), *C. laevigatum* é considerada sinônimo de *C. axillare*, sendo uma das espécies do gênero mais fáceis de serem encontradas em pesquisas de campo. É concebida como uma das plantas tóxicas mais importantes no país, encontrada no Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste, responsável por mortes de até 80% dos bovinos, caprinos e ovinos que ingerem suas folhas, ocasionando um quadro hepatotóxico similar ao de *C. intermedium*: em doses equivalentes (cerca 25-50 g/kg) proporciona os mesmos sintomas descritos (ROSSETTI; CORSI, 2009). A toxicidade de *C. laevigatum* está relacionada às saponinas presentes na espécie: cestrumida, gitogenina e digitogenina (GALLO, 1979 *apud* AFONSO; SANTOS, 1995; HARAGUCHI, 2003; ROSSETTI; CORSI, 2009).

Devido ao potencial tóxico, não são aconselhadas práticas de uso interno para preparados de *C. laevigatum*. A espécie tem uso popular medicinal e cosmético: o sumo de folhas para problemas oftalmológicos (BORGES *et al.*, 1986) e como emoliente (RODRIGUES; GUEDES, 2006). Madureira *et al.* (2002) reporta moderada atividade antimalárica para extrato das folhas de *C. laevigatum*.

3.2.1.4 *Cestrum sendtnerianum*

Vignoli-Silva (2009) considera *C. sendtneriaum* um sinônimo de *C. mariquitense*, arbusto de 7 metros de altura encontrado no Brasil, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru, Bolívia, Paraguai, Argentina, Costa Rica e Panamá.

C. sendtneriaum provoca intoxicações em gado bovino como diversas espécies do gênero, porém não são relatados casos de morte e o quadro clínico é diferenciado. Observa-se diarreia nos animais intoxicados, não desenvolvendo manifestações nervosas ou relutância em caminhar (AFONSO; SANTOS, 1995). De acordo com Afonso e Santos (1995) *apud* Forsyth (1968) atribui-se que processos diarreicos são manifestações de intoxicação por saponinas. Em outras espécies de *Cestrum* que causam intoxicação em gado bovino observa-se ressecamento das fezes, o que pode ser atribuído à existência de princípios tóxicos não comuns a estas espécies e *Cestrum sendtnerianum*.

3.3 A ESPÉCIE *Cestrum intermedium*

Cestrum intermedium Sendtn. é uma espécie que ocorre tanto à beira de matas quanto em locais antropizados. Há indícios da floração (Figura 2) ocorrer de março a maio, assim como em dezembro e a frutificação em abril, maio, junho, agosto, dezembro e janeiro. É uma das espécies do gênero *Cestrum* responsáveis por intoxicações em rebanhos bovinos, levando a lesões hepáticas e consequentes danos à economia (SOARES *et al.*, 2007). Sua ocorrência no território brasileiro está ilustrada na Figura 3.

A espécie de porte arbustivo a arbóreo (até cinco metros de altura), popularmente chamada de 'mata-boi', 'coerana', 'peloteira ou piloteira preta' e 'erva-de-tinta' de acordo com Kissmann e Groth (2000), tem o nome de *C. intermedium* por ser considerada uma forma intermediária entre *C. parqui* e *C. cuspidatum* e como sinônimo *C. megalophyllum* Witasek. Sua variedade é *C. intermedium* var. *virgatum* Witasek, como ilustrado no recorte da página *online* 'The Plant List', na Figura 4.



FIGURA 2: RAMO DE *Cestrum intermedium* EM FLORAÇÃO (MAIO DE 2013)
FONTE: A AUTORA (2013)



FIGURA 3: DISTRIBUIÇÃO DE *Cestrum intermedium* NO TERRITÓRIO BRASILEIRO
FONTE: Adaptado de STEHMANN *et al.* (2014)

The Plant List → Angiosperms → Solanaceae → *Cestrum* → *Cestrum intermedium* Sendtn.

★★ *Cestrum intermedium* Sendtn. is an accepted name


This name is the **accepted** name of a species in the genus *Cestrum* (family *Solanaceae*).

The record derives from **WCSP (in review)** (data supplied on 2012-03-26) which reports it as an **accepted** name with original

Full publication details for this name can be found in IPNI: [urn:lsid:ipni.org:names:815080-1](http://www.ipni.org:names:815080-1).

Synonyms:

See "Status", "Confidence level", "Source" for definitions.

Sort the name records using the  buttons.






Name 	Status 	Confidence level 	Source 	Date supplied 
<i>Cestrum intermedium</i> var. <i>virgatum</i> Witassek	Synonym	★★★	WCSP (in review)	2012-03-26

FIGURA 4: CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE *Cestrum intermedium*

FONTE: The Plant List (2015).

Vignoli-Silva (2009) discute o fato da etimologia do epíteto *intermedium* estar baseado na alusão ao espaço ocupado entre as espécies *C. parqui* e *C. cuspidatum*, porém considera *C. cuspidatum* um sinônimo de *C. intermedium*. É considerada tóxica para gado bovino e experimentalmente denominada hepatotóxica (leva à insuficiência hepática aguda) em doses únicas de 25 g.kg⁻¹. Um quadro clínico semelhante ao causado por substâncias hepatotóxicas agudas é ocasionado pela ingestão de folhas de *Cestrum intermedium* (BANDARRA *et al.*, 2009; FURLAN *et al.*, 2008; WOUTERS *et al.*, 2013).

Trata-se de uma planta perene, higrófito e heliófito, disseminada por sementes (glabras, amarelo brilhantes, podendo apresentar fragmentos aderentes ao fruto), com tendência a se restabelecer após o corte. Apresenta tronco com ramos compridos e glabros, com raízes bem desenvolvidas. Suas folhas (Figura 5) são alternas, dispostas à volta dos ramos com curto distanciamento, apresentando pecíolos de até 15 mm. Os limbos são estreito-lanceolados, atenuados na base e de ápice subacuminado, com até 14 cm de comprimento, lisos, glabros e verdes. Inflorescências verde-amareladas, predominantemente axilares, em corimbos com até 15 flores, com brácteas pequenas. Os frutos tornam-se pretos quando maduros (KISSMANN; GROTH, 2000; VIGNOLI-SILVA, 2009). Sua taxonomia está descrita no Quadro 1 e 2, este de acordo com TROPICOS (2015), que utiliza APG III (2009) em sua classificação.



FIGURA 5: EXSICATA DE *Cestrum intermedium* Sendtn.

FONTE: STEHMANN *et al.*, (2014)

REINO	Plantae
FILO	Tracheophyta
CLASSE	Magnoliopsida
ORDEM	Solanales
FAMÍLIA	Solanaceae
GÊNERO	<i>Cestrum</i>
ESPÉCIE	<i>Cestrum intermedium</i> Sendtn.
SUBESPÉCIE/ SINÔNIMOS	<i>Cestrum intermedium</i> Witasek var. <i>virgatum</i> <i>Cestrum cuspidatum</i> Sendtn.

QUADRO 1: CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE *C. intermedium* Sendtn.

FONTE: STEHMANN *et al.* (2009); The Plant List (2012); Arctos (2013)

CLASSE	Equisetopsida C. Agardh
SUBCLASSE	Magnoliidae Novák ex Takht.
SUPERORDEM	Astereranae Takht.
ORDEM	Solanales Juss. Ex Bercht. & J. Presl
FAMÍLIA	Solanaceae Juss.
GÊNERO	<i>Cestrum</i> L.
ESPÉCIE	<i>Cestrum intermedium</i> Sendtn.
VARIEDADE	<i>Cestrum intermedium</i> var. <i>virgatum</i> Witasek

QUADRO 2: CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE *C. intermedium* Sendtn.

FONTE: Tropicos (2015)

No extremo oeste e noroeste de Santa Catarina, assim como no Sudoeste do Paraná, é considerada a planta tóxica de maior importância. Apresenta morbidade variável ao gado que a consumiu, mas ocorre em até 70% dos casos. Os compostos responsáveis ainda não são conhecidos (RIET-CORREA, MÉNDEZ e SCHILD, 1993); (KISSMANN; GROTH, 2000). Há espécimes presentes no Parque Municipal do Barigui (Curitiba-PR), contemplando a floresta ombrófila mista da região (KOZERA *et al.*, 2006).

Os sintomas de intoxicação por *Cestrum intermedium* são de anorexia, tremores musculares, andar cambaleante, pelos arrepiados, focinho seco e abundante salivação. As fezes apresentam-se secas, com presença de muco e estrias de sangue ou pastosas e escuras. Os animais apoiam a cabeça contra obstáculos ou permanecem deitados. Pode-se observar agressividade, gemidos, decúbito esternal e lateral com movimentos da pelagem, salivação e morte (FURLAN *et al.*, 2008; BANDARRA *et al.*, 2009; WOUTERS *et al.*, 2013).

O óbito pode ocorrer entre um e três dias após a ingestão de partes da planta devido a lesões no fígado. Recomenda-se remover as plantas em áreas de pastagem, tomando o cuidado de retirar as partes cortadas do alcance dos animais, pois os componentes tóxicos as folhas cortadas e murchas são ingeridas com maior facilidade (RIET-CORREA; MÉNDEZ; SCHILD, 1993; KISSMANN; GROTH, 2000; FURLAN *et al.*, 2008; BANDARRA *et al.*, 2009; WOUTERS *et al.*, 2013).

3.4 TOXICOLOGIA

3.4.1 Ecotoxicologia

Em 2008, Zagatto apresenta a definição de ecotoxicologia, elaborada pelo *Committee of the International Council of Scientific Unions (ISCU)*:

Ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado. (Zagatto, 2008, p. 6)

A ecotoxicologia exige conhecimentos de diversas áreas, pois avalia os danos ocorridos em ecossistemas após a contaminação e previsão de impactos futuros. Ecologia, Toxicologia, Biologia, Bioquímica, Estatística, Limnologia e diversas outras disciplinas se enquadram na aplicação de Ecotoxicologia (ZAGATTO, 2008).

Toda a substância tem potencial tóxico de ação. Frente à capacidade dos seres vivos desencadearem mecanismos de proteção, geralmente metabólicos, substâncias tóxicas podem ter seu efeito mensurado em bioensaios. Efeitos estes que podem apresentar-se no DNA, transporte de elétrons, sistemas enzimáticos, compartimentos celulares e até gerar formações celulares. Nem sempre estes efeitos são facilmente visualizados, tornando viável o uso de biotestes para avaliar resultados sem discriminar a causa fisiológica de um dano, como por exemplo “morto” e “não-morto” (KNIE; LOPES, 2004).

A ecotoxicologia difere-se da toxicologia clássica especialmente em seu objeto de estudo (espécies de ecossistemas e homem). No Quadro 3, estão as diferenças básicas entre Toxicologia Clássica e Ecotoxicologia ressaltadas por Zagatto (2008):

Toxicologia Clássica (mamíferos)	Ecotoxicologia
Objetiva proteger o homem	Objetiva proteger populações e comunidades (aves, peixes, mamíferos e outros organismos aquáticos e terrestres)
Utiliza ratos, camundongos, coelhos, cobaias, etc.	Podem ser utilizados os próprios animais que se almeja proteger
Como a espécie de interesse é o homem, há menor grau de incerteza na extrapolação	A extrapolação dos dados é mais difícil devido às variações de fatores ambientais (pH, temperatura, dureza das águas, etc.)
A dose do agente químico é calculada e injetada diretamente no indivíduo	A concentração do agente químico no meio (ar, água, solo, alimento) é mais variável
Maior ênfase em elucidar o mecanismo de ação	Maior ênfase à medida da concentração do agente químico no meio, com vistas às necessidades reguladoras, mecanismos de ação e relação estrutura/atividade
Metodologias bem desenvolvidas, sendo suas limitações e utilização bem conhecidas	Metodologias mais novas, algumas padronizadas, outras em desenvolvimento

QUADRO 3 - COMPARAÇÃO ENTRE TOXICOLOGIA CLÁSSICA E ECOTOXICOLOGIA
 FONTE: ZAGATTO (2008)

Organismos vivos são expostos a agentes ambientais capazes de induzir modificações químicas em nível celular e molecular, ocasionadas por agentes

químicos, físicos ou biológicos. A bioatividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas tem sido frequentemente incorporada ao processo de identificação e monitoramento de substâncias potencialmente tóxicas. Para tanto, são utilizados ensaios biológicos, a fim de avaliar os efeitos diversos e outras propriedades lesivas (SOUZA, 2005).

Análises químicas de substâncias identificam e quantificam compostos, enquanto análises biológicas qualificam os efeitos causados por eles. Entre as análises biológicas, estão as ecotoxicológicas, revelando efeitos agudos ou crônicos causados por substâncias na matéria viva, com a grande vantagem de, muitas vezes, evidenciarem reação para concentrações inferiores às detectáveis por análises químicas.

A principal finalidade da ecotoxicologia é verificar se, e em que proporção, determinada substância (pura ou em mistura) é nociva, além de que maneira e em que local ocorrem estes efeitos. Os sistemas vivos (organismos inteiros ou apenas parte deles) respondem de forma específica a perturbações diretas ou indiretas promovidas por compostos nocivos. Em alguns casos, a resposta é tão visível e mensurável, que podem ser considerados sensores biológicos de medição de efeitos (KNIE; LOPES, 2004; GUARANTINI *et al.*, 2004).

3.4.1.1 Ensaios Ecotoxicológicos

A aplicação de ensaios ecotoxicológicos é muito vasta, desde avaliar o risco potencial de substâncias químicas ao meio ambiente, monitorar a qualidade de águas e solos, controle da eficiência e fiscalização de Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs), passando pela identificação de substâncias poluidoras, determinação de biodegradabilidade de substâncias, chegando à investigação de sinergismo e antagonismo entre substâncias e seu potencial bioacumulativo (KNIE; LOPES, 2004).

De acordo com Knie e Lopes (2004) as reações de plantas e animais ocasionadas a partir do contato com contaminantes da natureza levaram à consideração o emprego de organismos como indicadores de impactos ambientais. Ao longo dos anos, diversos procedimentos foram desenvolvidos e aperfeiçoados, visando garantir a uniformidade entre ensaios. Hoje, em essência, as metodologias

aplicadas são as mesmas aprimoradas outrora, porém, com adaptações que agregam descobertas posteriores a suas consagrações na comunidade científica. Os ensaios são padronizados internacionalmente pela *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) e pela *International Standard Organization* (ISO), garantindo a comparabilidade de resultados entre laboratórios (KNIE; LOPES, 2004). A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) padroniza os ensaios ecotoxicológicos no Brasil.

A maioria dos biotestes tem o objetivo de encontrar agentes capazes de afetar a níveis fisiológicos e moleculares o organismo exposto. É valioso utilizar organismos sensíveis a substâncias presentes em mais de um ambiente (aquático, terrestre e atmosférico) e que permitam a detecção de muitas classes de danos em diversos tipos de células (SOUZA, 2005).

De acordo com Knie e Lopes (2004), independentemente do objetivo da análise ecotoxicológica, alguns critérios devem ser obedecidos nos biotestes. São eles:

- O cultivo ou manutenção dos organismos-teste, mantendo sempre o sistema de teste disponível;
- Escolha de organismo-teste de sensibilidade equilibrada, a fim de evitar falsos-positivos ou falsos-negativos;
- Padronização das condições de teste, garantindo a reprodutibilidade e a validade estatística do resultado;
- Realização dos testes de maneira que racionalize o tempo, espaço físico, recursos, materiais e organismos-teste, principalmente para testes de rotina;
- O tempo entre o primeiro contato do organismo-teste e a amostra até o surgimento de reações visíveis ou mensuráveis, denominado rapidez, deve ser o mais curto possível. Principalmente por ter um importante papel no *screening* de substâncias, atendimento de acidentes ou como sistema de alerta em forma de biomonitores.

Para diferentes objetivos, opta-se por diferentes princípios de análise. Os testes agudos detectam efeitos imediatos e, geralmente, irreparáveis. Os efeitos agudos são causados geralmente por altas concentrações. Os testes crônicos ou subletais evidenciam danos causados por longas exposições a baixas concentrações (KNIE; LOPES, 2004; GUARANTINI *et al.*, 2008). Em bioensaios com

organismos aquáticos como microcrustáceos, o efeito tóxico frequentemente avaliado é a imobilidade porque, devido ao pequeno tamanho desses organismos, é difícil avaliar se estão mortos (COSTA *et al.*, 2008).

A verificação da toxicidade depende de experimentos em animais, que nem sempre mimetizam a toxicidade em humanos. O principal interesse em plantas tóxicas reside no potencial em intoxicar seres humanos e animais, resultando em prejuízos significativos à saúde pública, às atividades pecuárias e ao ambiente. Porém, algumas substâncias tóxicas podem gerar danos ao ecossistema, sem apresentar toxicidade aos humanos (SCHENKEL *et al.*, 2002; GUARANTINI *et al.*, 2004). A relevância em avaliar o potencial ecotoxicológico de *Cestrum intermedium* fica evidente, principalmente por já estar comprovada sua toxicidade em bovinos, como relatado em Furlan *et al.*, (2008), Bandarra *et al.* (2009) e Wouters *et al.* (2013).

3.4.1.1.1 Ensaio de Toxicidade Aguda em *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade em *Artemia salina*, um microcrustáceo de água salobra/salgada, é largamente utilizado em pesquisas de produtos naturais. Seus cistos liofilizados são comercializados como alimento para peixes de aquário e são eclodidos de maneira prática. Trata-se de um experimento simples (fácil domínio, sem necessidade de assepsia, rápido e acessível economicamente) e suas aplicações incluem investigação de fontes de toxicidade de amostras ambientais e misturas químicas, detecção de toxinas naturais em alimentos e produtos farmacêuticos, além de parâmetros de citotoxicidade (MEYER *et al.*, 1982; PERSOONE; WELLS, 1987).

O objetivo do método concentra-se em avaliar preliminarmente se existem compostos bioativos e se há necessidade de submeter as amostras a ensaios mais específicos. Desde a introdução por Meyer *et al.* (1982), verificando a toxicidade aguda de extratos de diversas espécies vegetais, este método vem sendo utilizado no isolamento de agentes antitumorais ativos *in vivo* e pesticidas produzidos por plantas (GHISALBERTI, 2008). Obtém-se uma boa correlação entre o bioensaio prévio realizado em *Artemia salina* e os testes em culturas celulares tumorais. Diversos estudos procuram correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com

atividades como: antifúngica, viruscida, antimicrobiana, parasiticida e tripanossomicida (SIQUEIRA *et al.*, 1998).

3.4.1.1.2 Ensaio de Toxicidade Aguda em *Daphnia magna*

As dafnias são microcrustáceos planctônicos (3 mm) de água doce que atuam como consumidores primários da cadeia alimentar aquática, alimentando-se com filtração do material orgânico em suspensão. Trata-se de um organismo-teste fácil de cultivar, de manuseio muito simples, que reage sensivelmente a diversos agentes nocivos e produzem descendentes geneticamente idênticos por partenogênese, assegurando uniformidade de resposta aos ensaios. (KNIE; LOPES, 2004). É um organismo largamente utilizado devido ao seu tamanho pequeno, ciclo de vida curto e facilidade de estabelecer cultura em laboratório (TONKOPII; IOFINA, 2007).

São organismos muito sensíveis a diversas substâncias químicas e fáceis de manipular, sendo a espécie recomendada para testes de toxicidade aguda de novos compostos químicos, produtos farmacêuticos, metais pesados e abordagens ecotoxicogenômicas (juntamente com teste de toxicidade aguda em peixes, sensíveis a menor espectro de substâncias) (TAYLOR, 2010). Neste trabalho, *Daphnia magna* e *Artemia salina* foram empregadas em ensaios preliminares de toxicidade, enriquecendo o perfil ecotoxicológico do objeto de estudo com diferentes níveis tróficos e habitats.

3.4.1.1.3 Ensaio de Toxicidade Aguda em *Aedes aegypti*

O ensaio de toxicidade aguda em *Aedes aegypti* verifica o efeito biológico de compostos complexos ou isolados sobre larvas, buscando alternativas para o controle da proliferação do mosquito de maior dispersão em áreas urbanas no mundo. O controle de proliferação tem relevância para a saúde pública, uma vez que o *Aedes aegypti* tem capacidade de vetorizar os quatro sorotipos de dengue e vírus da febre amarela (SILVA, 2004).

Há populações de *Aedes aegypti* resistentes aos inseticidas convencionais empregados, levando à tentativas mal sucedidas de controle dos vetores da dengue. Portanto, a busca por alternativas eficientes no combate das larvas ou do próprio mosquito, além de apresentarem baixa toxicidade ao meio ambiente, enquadra extratos vegetais e substâncias naturais como alvo de pesquisas para controle do desenvolvimento de *Aedes aegypti* (HEMINGWAY; RANSON, 2000). No caso do uso de plantas para controle dos vetores da dengue e febre amarela, há a possibilidade de utilizar macerados de folhas em águas paradas, enquadrando como uso popular de espécies vegetais. Esta aplicabilidade de utilidade pública seria extremamente bem empregada em assentamentos, por exemplo.

Após a obtenção dos ovos de *Aedes aegypti*, trata-se de um ensaio rápido e de fácil execução. É um importante ensaio preliminar de toxicidade e pode evidenciar possibilidades relevantes para controle do vetor da dengue, problema de saúde pública em nosso país, devendo ser analisado com ensaios toxicológicos mais aprofundados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

Para a obtenção do material botânico *Cestrum intermedium* foi avaliado um possível exemplar da planta, presente no bairro Campo Comprido em Curitiba (25°26'46.3"S 49°20'50.5"W). A identificação foi realizada por Osmar dos Santos Ribas, curador do Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba, comparando às exsicatas arquivadas no herbário. O depósito da exsicata do material identificado ocorreu nesta instituição, sob o registro MBM384025 (Figura 6). Após o processo de identificação e depósito de exsicata, ramos do exemplar foram coletados no mês de abril de 2013.

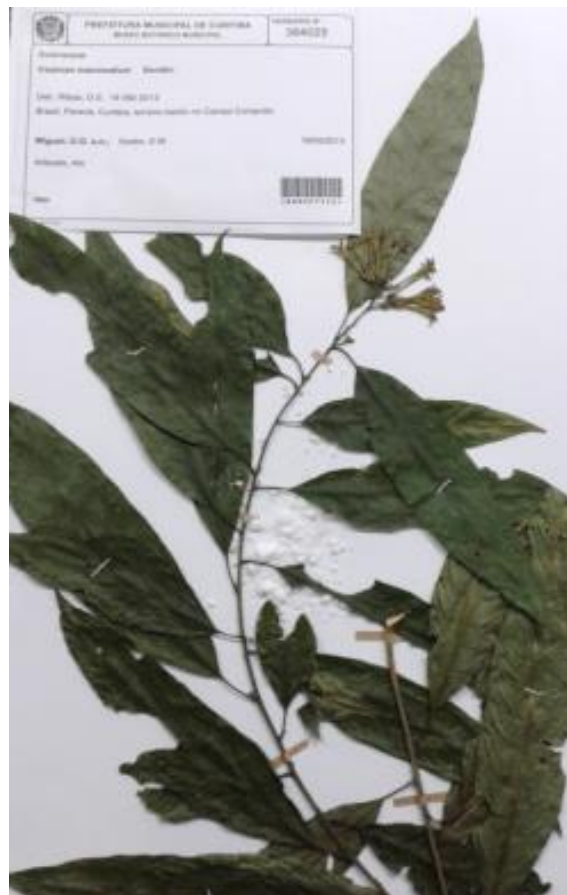


FIGURA 6 - EXSICATA DE *Cestrum intermedium* DEPOSITADA NO HERBÁRIO DO MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL DE CURITIBA

FONTE: A AUTORA (2013)

4.2 TRATAMENTO DO MATERIAL BOTÂNICO

Após a coleta, iniciou-se o preparo do material botânico para subsequente obtenção dos extratos de folhas e cascas. Para tanto, as folhas foram separadas dos ramos, gerando dois objetos de estudo. Os ramos mais espessos foram descascados com auxílio de facão (inutilizando o lenho). As cascas foram reunidas aos ramos menos espessos previamente segmentados com auxílio de tesouras de jardinagem, como mostra a Figura 7. Para o presente trabalho, o material resultante da união dos ramos segmentados e cascas dos ramos mais espessos foi denominado cascas de *Cestrum intermedium*.



FIGURA 7: 1: FOLHAS SEGMENTADAS DOS CAULES; 2: LENHO; 3: CAULES E CASCAS (DENOMINADOS CASCAS)

FONTE: A AUTORA (2013)

As folhas e cascas foram processadas separadamente. Primeiramente, foram secas em estufa com circulação de ar a 60° C por 12 horas, a fim de estabilizar processos enzimáticos e de degradação, garantindo integridade do material botânico, de acordo com o método descrito na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). Em seguida, foram trituradas em moinho de martelos e facas

(marca TRAPP modelo TR40), facilitando o manuseio do material e otimizando a percolação de solventes para a extração de seus componentes. No fim deste processo, obteve-se cerca de 990 g de folhas e 1850 g de cascas, em fragmentos menores que 3 mm. O armazenamento do material seco, estabilizado e triturado ocorreu em local fresco, de baixa umidade e ao abrigo de luz.

4.3 ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Os ensaios físico-químicos são importantes parâmetros a se estabelecer, pois definem/confirmam padrões de controle de qualidade para determinada espécie, uma vez que denunciam adulterações ou falsificações de materiais. No caso de *Cestrum intermedium*, foram estabelecidos pela primeira vez, agregando dados inéditos ao compilado da espécie.

4.3.1 Determinação da Perda por Dessecação

O procedimento foi executado em sextuplicata através do método gravimétrico, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). Utilizando material seco, triturado e estabilizado, foi pesado 1 g de amostra em cadinho de porcelana previamente seco, padronizado e identificado. O conjunto foi levado à estufa de circulação forçada de ar a 100-105°C, por cinco horas. Os cadinhos foram depositados em dessecador até resfriamento completo (permanecendo livres de variação de massa por absorção de umidade do ar) e procedeu-se à pesagem novamente. O teor de umidade pode ser determinado a partir da diferença (em massa) entre a umidade do material estabilizado e a umidade do material seco em estufa em relação ao material estabilizado, caracterizando a perda por dessecação (em U%, porcentagem de umidade), como demonstrado na Equação 1:

(1)

$$U\% = \frac{(\text{Massa Cadinho Material Estabilizado} - \text{Massa Cadinho Material Seco em Estufa}) \times 100}{\text{Massa Cadinho Material Estabilizado} - \text{Massa Cadinho}}$$

4.3.2 Determinação do Teor de Cinzas Totais

Utilizando o mesmo material avaliado na Determinação do Teor de Umidade em sequência foi realizada a Determinação do Teor de Cinzas Totais de acordo com a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). Os cadinhos recém-pesados (sextuplicata) na etapa final da Determinação do Teor de Umidade foram inseridos em mufla, com aumento de temperatura gradativo até $600\pm 25^\circ\text{C}$, até que todo o material fosse incinerado, tornando-se cinzas. Os cadinhos foram colocados em dessecador para resfriamento sem variação de massa por absorção de umidade do ar, para então proceder-se à pesagem. O Teor de Cinzas Totais foi calculado em relação material estabilizado, de acordo com a Equação 2:

(2)

$$\text{Cinzas\%} = \frac{(\text{Massa Cadinho Cinzas} - \text{Massa Cadinho}) \times 100}{\text{Massa Cadinho Material Estabilizado} - \text{Massa Cadinho}}$$

4.3.3 Determinação da Densidade Aparente

A determinação da densidade aparente do material foi realizada de acordo com a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). A partir do material seco, estabilizado e triturado foi determinada a densidade aparente das folhas e cascas em sextuplicata, verificando o volume que o material compactado de massa conhecida ocupa em proveta de plástico após um número padronizado de batidas.

4.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES

4.4.1 Obtenção dos Extratos Brutos

Os extratos brutos etanólicos das folhas e cascas secas e estabilizadas foram obtidos em aparelho de Soxhlet com etanol 95° GL ao longo de oito horas. Os

extratos foram filtrados em funil de Buchner acoplado a Kitassato. Utilizando uma pequena alíquota dos extratos filtrados, foi realizada parte do Ensaio Sistemático Fitoquímico e a Determinação do Teor de Sólidos Totais.

Os extratos brutos aquosos de folhas e cascas secas e estabilizadas foram obtidos em água destilada a 20% (p/v) em banho-maria (70° C) ao longo de uma hora. Os resíduos vegetais foram filtrados e lavados com água quente destilada, até completar para 100% o volume dos extratos. Estes extratos foram utilizados somente em parte do Ensaio Sistemático Fitoquímico e na determinação do Teor de Sólidos Totais, imediatamente após a obtenção, a fim de evitar proliferação microbiológica e provável degradação dos extratos.

4.4.2 Determinação do Teor de Sólidos Totais

Utilizando placas de Petri de massa conhecida, foi determinado o Teor de Sólidos de alíquotas de extratos brutos etanólicos, assim como dos extratos brutos aquosos, em triplicata. As alíquotas de 10 mL foram levadas à secura total em estufa a 60° C e o Teor de Sólidos Totais (g/mL) foi determinado pela verificação da massa dos extratos secos nas placas de Petri, após resfriamento em dessecador, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010).

4.4.3 Reserva de Extrato Bruto Etanólico para Bioensaios

Para contemplar os objetivos propostos, foi necessária a obtenção de frações dos extratos brutos das folhas e cascas, procedendo ao particionamento com solventes em escala de polaridade crescente. Porém, havia a necessidade de empregar os próprios extratos brutos, além de suas frações, nos testes preconizados. Portanto, previamente ao particionamento, foram reservados volumes equivalentes a 5 g dos extratos brutos secos das folhas e cascas. A partir da Determinação de Teor de Sólidos, foi possível verificar o volume (mL) dos extratos brutos de folhas e cascas equivalente à quantidade pré-estabelecida (g) de extratos brutos secos das folhas e cascas.

As amostras de extratos brutos das folhas e cascas que não foram consumidas no Ensaio Sistemático Fitoquímico, Ensaio de Teor de Sólidos ou reservadas para avaliação nos bioensaios, foram concentradas em rotaevaporador, recuperando o etanol, para então proceder-se ao fracionamento com solventes em escala de polaridade crescente. As alíquotas reservadas foram levadas à secura em banho-maria. Em todos os cálculos em relação aos extratos e frações foi considerada a retirada da alíquota para bioensaios.

4.4.4 Obtenção das Frações dos Extratos Brutos

O fracionamento dos extratos brutos em escala de polaridade é realizado para auxiliar a identificação das possíveis classes de metabólitos com atividades nos bioensaios, por segmentar em quatro frações distintas as classes reunidas no extrato. Além de facilitar a identificação, a possibilidade de isolamento destes metabólitos interessantes é muito maior desta forma, se comparada às tentativas baseadas apenas no extrato bruto. Os extratos brutos não são fracionados em totalidade, pois é importante avaliá-los íntegros nos ensaios biológicos, uma vez que as classes metabólicas reunidas podem apresentar efeitos distintos às classes isoladas, através de mecanismos de sinergismo ou antagonismo.

Após a realização do Ensaio Sistemático Fitoquímico e reservada a alíquota de extratos brutos etanólicos necessária aos procedimentos de bioensaios, o restante dos extratos brutos das folhas e cascas (EBF e EBC) foi fracionado por extração líquido-líquido em aparelho de Soxhlet modificado, em etapas sequenciais com hexano, clorofórmio e acetato de etila (em escala crescente de polaridade). O produto remanescente da última etapa de fracionamento desta cascata foi denominado como fração etanólica ou remanescente. Por fim, foram obtidas oito frações (quatro de folhas e quatro de cascas: hexânica (HF e HC), clorofórmica (CF e CC), acetato de etila (AEF e AEC) e remanescente (RF e RC)) correspondendo a quatro polaridades. Estas frações foram avaliadas nos bioensaios e demais testes juntamente com os próprios extratos brutos, totalizando dez amostras analisadas. Os extratos e frações foram armazenados em geladeira a fim de evitar possível degradação ao longo do período de realização deste trabalho. O diagrama de obtenção e fracionamento dos extratos está detalhado na Figura 8.

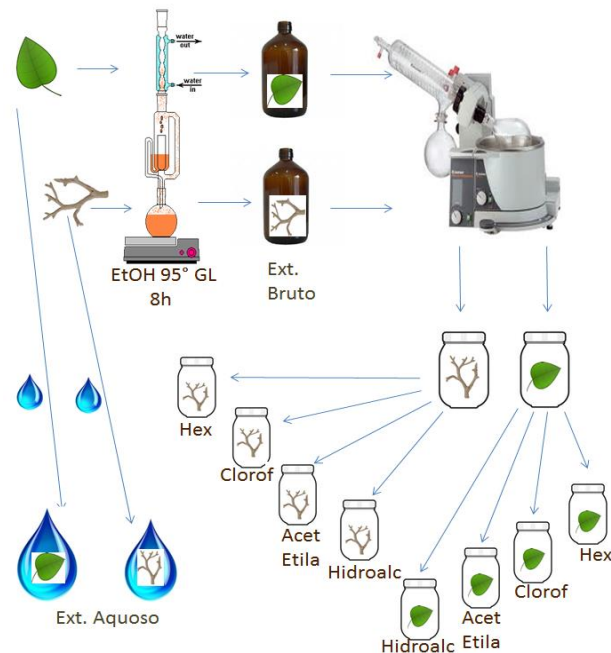


FIGURA 8 – ESQUEMA DE OBTENÇÃO DE EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES E EXTRATO AQUOSO

FONTE: A AUTORA (2013)

4.4.5 Rendimento dos Extratos Etanólicos e Frações

A partir da Determinação do Teor de Sólidos Totais foi possível verificar o rendimento dos extratos brutos e frações, uma vez que o volume de extratos obtidos é conhecido, assim como a quantidade (g) de material botânico seco utilizado em sua obtenção. Esta informação nos permite rastrear a quantidade de material botânico seco e estabilizado é necessária para provocar os efeitos observados nos organismos ou testes *in vitro* a partir das concentrações de extratos e frações estabelecidas. Correlacionando volumes dos extratos e massas dos extratos secos, o resultado é expresso em g/mL e, a partir da quantidade de material seco e estabilizado utilizado para obtenção do extrato, pode-se obter o resultado em porcentagem (rendimento) para os extratos brutos, como mostra a Equação 3.

(3)

$$\text{Rendimento(\%)} = \frac{\text{Teor de Sólidos Totais} \times 100}{\text{Material Seco e Estabilizado}}$$

Para determinar o rendimento das frações dos extratos brutos etanólicos, faz-se uma relação entre o teor de sólidos do extrato bruto e o teor de sólidos de cada fração, como mostra a Equação 4:

(4)

$$\text{Rendimento(\%)} = \frac{\text{Teor de Sólidos Totais da Fração} \times 100}{\text{Teor de Sólidos Totais do Extrato Bruto}}$$

4.5 ENSAIOS FITOQUÍMICOS

A análise fitoquímica preliminar é realizada para obter informações qualitativas acerca dos principais grupos de metabólitos presentes na amostra. Utilizando o método apresentado por Moreira (1979) adaptado por Miguel (2003), foi realizada a avaliação fitoquímica preliminar dos extratos de cascas e folhas de *Cestrum intermedium*, buscando verificar as classes de metabólitos solúveis em álcool (etanol) e em água, utilizando então os extratos brutos etanólicos e aquosos. O Ensaio Sistemático Fitoquímico utiliza diversas reações específicas que indicam qualitativamente a presença de determinados metabólitos, seja por mudança de coloração, precipitação, formação de gás ou fluorescência, às vezes utilizando mais de um método.

Devido ao caráter qualitativo da avaliação e relativamente subjetivo, prefere-se avaliar os metabólitos solúveis em água em extratos aquosos, neste trabalho obtidos unicamente para este propósito. Os metabólitos solúveis em água estão presentes nos extratos brutos etanólicos obtidos (uma vez que foi utilizado etanol 95°GL para a extração), porém em conjunto com diversos outros metabólitos, o que pode dificultar a visualização dos resultados. Os extratos aquosos carregam apenas metabólitos solúveis em água, o que os torna mais concentrados nestas substâncias

quando comparados aos extratos brutos, facilitando a detecção qualitativa destes metabólitos secundários.

Em relação às técnicas mais avançadas para detecção e identificação de grupos metabólicos, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o Ensaio Sistemático Fitoquímico é um clássico menos refinado, porém ainda é uma opção válida. Principalmente por se basear em métodos simples que exigem poucos recursos, não requerer conhecimento técnico para o uso de equipamentos sofisticados ou habilidade para avaliação dos resultados por estes expressos, não implicar em etapas de purificação, muitas vezes inevitáveis quando se elege outros métodos, devido à natureza complexa das matrizes a serem analisadas. Seu objetivo é a avaliação preliminar, utilizando matrizes muito complexas que, após processamento direcionado, podem ser avaliadas de maneira mais aprofundada, empregando então as técnicas mais modernas de identificação.

4.5.1 Metabólitos Solúveis em Álcool

Foram analisadas alíquotas dos extratos brutos etanólicos das folhas e caules de *Cestrum intermedium*.

4.5.1.1 Pesquisa de Alcaloides

Os alcaloides são compostos biológicos de caráter básico variável, devido à disponibilidade do par de elétrons do nitrogênio (podendo ser ácido quando o nitrogênio é quaternário), facilmente atraídos por densidades eletrônicas negativas, como no cloro, presente no clorofórmio. Portanto, há chances de isolamento de alcaloides na fração clorofórmio e assim como na fração remanescente. Sua solubilidade varia de acordo com o pH, sendo que na forma básica são solúveis em solventes orgânicos e na forma de sal são solúveis em solventes aquosos. O princípio deste ensaio é a capacidade dos alcaloides em estado de sal combinarem-se com iodo e metais pesados.

A pesquisa qualitativa de alcaloides foi realizada com os reativos gerais para alcaloides: Reativo de Mayer, Reativo de Dragendorff, Reativo de Bouchardat e

Reativo de Bertrand. Uma alíquota dos extratos brutos das folhas e cascas foi evaporada em banho-maria a 50° C e os resíduos ressuspensos em 1 mL de etanol absoluto e então diluídos em 5 mL de HCl 1%. A acidificação torna os alcaloides em sais solúveis em água, capazes de complexar com iodo e metais pesados. A solução clorídrica dos extratos foi disposta em cinco tubos de ensaio sendo um deles o controle negativo (somente com a solução clorídrica) e o restante para os reativos gerais de alcaloides (um tubo para cada reativo). Foram adicionadas duas gotas de cada reativo geral para alcaloides e a reação é considerada positiva quando as seguintes características se desenvolveram para cada reativo:

- Mayer (mercúrio tetra-iodeto de potássio): formação de precipitado branco ou leve turvação branca
- Dragendorff (tetra-iodeto bismuto de potássio): formação de precipitado de coloração tijolo
- Bouchardat (iodo/iodeto de potássio): formação de precipitado de coloração alaranjada
- Bertrand (ácido sílico-túngico): formação de precipitado branco ou leve turvação branca

Podem ocorrer reações falso-positivas em contato com substâncias de alta densidade eletrônica (em Dragendorff e Bouchardat, o precipitado torna-se preto) ou pela precipitação de resinas (Bertrand), desformando o complexo após alguns instantes, desfazendo o precipitado.

4.5.1.2 Pesquisa de Leucoantocianidinas

A redução de leucoantocianidinas (flavonoides monoméricos 3,4-dióis ou 4-óis) a antocianidinas, em meio ácido, promove um deslocamento batocrômico na banda I (aumento de comprimento de onda (λ)), permitindo a observação da mudança de coloração de amarelo para vermelho. Para a realização da pesquisa de leucoantocianidinas, os extratos brutos das folhas e cascas foram levados à secura em cápsulas de porcelana e os resíduos dissolvidos em 5 mL de álcool etílico absoluto e em seguida, foram adicionadas cinco gotas de HCl concentrado, sob aquecimento até ebulição. A reação é considerada positiva com o desenvolvimento de coloração vermelha.

4.5.1.3 Pesquisa de Heterosídeo Flavônico

Os flavonoides se caracterizam por esqueleto de 15 carbonos e um anel cromona (benzopirona). Alíquotas dos extratos brutos foram levadas à secura em cápsulas de porcelana e os resíduos foram dissolvidos em 10 mL de etanol absoluto. Em tubo de ensaio, foi adicionado lentamente à solução etanólica limalhas de magnésio e HCl fumegante. A reação se observa pelo deslocamento batocrômico da banda I dos derivados flavônicos e redução da função cetona a monoméricos 3,4-dióis ou 4-óis, desenvolvendo as cores conforme as estruturas químicas: flavonas desenvolvem amarelo-vermelho, flavonol e diidroflavonol desenvolvem vermelho-vermelho sangue, derivados antociânicos desenvolvem vermelho que clareia para rosa, chalconas, auronas, diidrochalconas, isoflavonas e flavononas não desenvolvem coloração.

4.5.1.4 Pesquisa de Flavonóis

Alíquotas dos extratos brutos foram levadas à secura em cápsulas de porcelana e em seguida foi realizado o teste do Oxálico Bórico (Teste de Taubock). Ao resíduo foram adicionadas cinco gotas de acetona, 30 mg da mistura de ácido bórico e ácido oxálico (1:1) e levado novamente à secura. Ao resíduo é adicionado 5 mL de éter etílico. A reação é considerada positiva quando são formados quelatos que ocasionam deslocamentos ipsocrômicos da banda I dos derivados do ácido borínico, observando em ultravioleta longo (200-400 nm) fluorescência amarelo-esverdeada para flavononoides, sendo que flavonas e isoflavonas não apresentam essa propriedade. Antociânicos coram-se, mas não produzem fluorescência. Podem ser observadas fluorescências de outras cores como laranja ou azul, sendo provenientes de clorofila e cumarinas, respectivamente.

4.5.1.5 Pesquisa de Dihidroflavonois

A pesquisa de dihidroflavonois foi realizadas por dois métodos:

- Ensaio de Pacheco

Em cápsulas de porcelana os extratos brutos foram levados à secura e o resíduo foi aquecido em bico de Bunsen com cristais de acetato de sódio e 0,1 mL de anidrido acético. Em seguida foi adicionado 0,1 mL de HCl fumegante. O desenvolvimento de coloração roxa, produzida pelo deslocamento batocrômico das bandas I e II, indica resultado positivo para diidroflavonois. Chalconas, auronas, flavonóis e flavonas apresentam resposta negativa.

- Ensaio com Zinco em Ácido Clorídrico

Alíquotas dos extratos brutos foram levadas à secura em cápsulas de porcelana e em seguida dissolvidas em 10 mL de etanol absoluto. Transferiu-se a solução para tubos de ensaio com pastilhas de zinco e HCl fumegante foi adicionado lentamente. O resultado é considerado positivo se visualizada coloração roxa, produzida somente por diidroflavonois (flavononas e flavanol não produzem coloração).

4.5.1.6 Pesquisa de Cumarinas

A dissolução de cumarinas em álcali cáustico seguida de clivagem do anel pirrólico conseqüentemente formam o ácido hidroxicinâmico e sais de seu ânion. A formação do sal alcalino fluorescente do ácido hidroxicinâmico é verificada sob luz UV, que desloca suas ligações ocasionando fluorescência.

Alíquotas dos extratos brutos foram levadas à secura em cápsulas de porcelana a 50° C e os resíduos recuperados com 5 mL de acetato de etila, com ajuste de pH até 1 por adição de HCl 2N. A mistura foi resfriada e transferida para um funil de separação para extração com éter etílico, concentrando em banho-maria até 5 mL.

Destas frações, foram transferidos 3 mL para tubos de ensaio e adicionados 2 mL de NaOH 2N. Os tubos foram submetidos à luz ultravioleta longo (366 nm) durante 15 minutos. A reação é positiva pela observação de fluorescência azul/verde amarelada, deslocando a ligação de *cis* para *trans* do ânion cumarínico.

4.5.1.7 Pesquisa de Heterosídeos Antraquinônicos

Antraquinonas e naftoquinonas são polifenóis que, em pH elevado, formam fenolatos hidrossolúveis de coloração rósea devido à ionização de hidroxilas fenólicas.

Em balões de fundo chato foram transferidos 30 mL dos extratos brutos juntamente com 5 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico a 10%. A mistura é levada a refluxo por uma hora e posteriormente filtrada, adicionando em seguida 30 mL de água. A mistura foi transferida para um funil de separação e procedeu-se à extração com éter etílico (2 x 10 mL). As frações obtidas foram reunidas e concentradas em banho-maria, até um volume de 5 mL. Em seguida, foram adicionados 5 mL de NH_4OH (Reação de Borntraeger). A reação é considerada positiva com observação de coloração vermelha na solução alcalina, devido à ionização das hidroxilas fenólicas, indicando a presença de naftoquinonas e/ou antraquinonas.

4.5.1.8 Pesquisa de Esteroides e Triterpenos

Alíquotas dos extratos das folhas e cascas foram levadas à secura em cápsulas de porcelana e, em seguida, os resíduos redissolvidos em 5 mL de clorofórmio e filtrados em algodão. Cada uma das amostras foi transferida em alíquotas de 0,1, 0,5 e 1,0 mL para tubos de ensaio e o volume foi completado para 2 mL com clorofórmio.

- Reação de Liberman-Bouchard

Para esta reação foram adicionados aos tubos de ensaio 1 mL de anidrido acético e lentamente 2 mL de H_2SO_4 concentrado. As colorações indicam:

- Rósea ou azul: presença de função carbonila na posição 3 e duplo enlace nas posições 5 e 6 ou 7 e 8.

- Verde: função hidroxila em 3 e dupla ligação entre 5 e 6 ou 7 e 8.

- Amarela: grupamento metila no carbono 14.

- Reação de Keller Kelliani

Foram levados à secura 2 mL dos extratos clorofórmicos preparados anteriormente e os resíduos foram dissolvidos com 2 mL de ácido acético glacial e 0,2 mL de solução aquosa de cloreto férrico 1%. As misturas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 2 mL de H₂SO₄. O desenvolvimento de coloração azul ou verde na zona de contato entre as duas fases indica a presença de desoxiaçúcares, sendo que azul indica esteroides e verde indica triterpenos.

4.5.2 Metabólitos Solúveis em Água

Foram utilizados os extratos brutos aquosos de folhas e cascas de *C. intermedium* imediatamente após obtenção.

4.5.2.1 Pesquisa de Heterosídeos Antociânicos

Antocianidinas são pigmentos hidrossolúveis presentes nas plantas e sua coloração varia de acordo com o pH: vermelho quando ácido e azul quando básico. Para a determinação de presença de heterosídeos antociânicos, foram colocados 5 mL de cada extrato bruto em três tubos de ensaio. Em um dos tubos, foi colocado HCl 1% até pH 4, sendo considerada reação positiva a que desenvolveu tons avermelhados. Outro dos tubos foi alcalinizado com NaOH até pH 10, sendo considerada positiva a reação que desenvolveu tons azulados. O último tubo foi neutralizado a pH 7, sendo considerada positiva a reação que desenvolveu tons violáceos.

A determinação de presença de antocianidina foi realizada a partir da extração de 10 mL dos extratos brutos em álcool butílico por duas vezes seguidas em funil de separação. As frações obtidas são concentradas até 5 mL em cápsulas de porcelana em banho-maria. O desenvolvimento de coloração vermelha ao adicionar cinco gotas de HCl concentrado, aquecendo até ebulição, indica reação positiva para presença de antocianidinas.

4.5.2.2 Pesquisa de Heterosídeos Saponínicos

As saponinas são substâncias de caráter anfótero, reduzindo a tensão superficial dos compostos em solução aquosa, promovendo formação de espuma mediante agitação. Para determinação da pesquisa de heterosídeos saponínicos foram utilizados três tubos de ensaio para cada amostra com a mesma quantidade de cada extrato bruto. Estes foram agitados energicamente por cinco minutos e a altura da espuma formada foi medida. Após repouso de 30 minutos, a presença de saponinas é confirmada pela persistência de espuma com altura superior a um centímetro (1 cm).

4.5.2.3 Pesquisa de Heterosídeos Cianogênicos

Para determinar a presença de heterosídeos cianogênicos foram adicionados 5 mL dos extratos brutos e 1 mL de H₂SO₄ 10% ou 1 N, sem umedecer as paredes dos tubo de ensaio. Foi suspendida tira de papel picro-sódico, sem encostá-la nas paredes, com o auxílio de uma rolha de cortiça, mantendo em banho-maria (60° C) por 30 minutos. O resultado positivo para heterosídeos cianogênicos foi considerado com desenvolvimento de coloração marrom a vermelha no papel picro-sódico.

4.5.2.4 Pesquisa de Taninos

Os taninos são divididos entre hidrolisáveis e condensados de acordo com os núcleos fenólicos existentes e a união destes. Os taninos hidrolisáveis apresentam ácido gálico ou ácido hexaidroxidifênico com derivados esterificados de glicose, sendo facilmente hidrolisados em ácidos fenólicos e açúcares. Os taninos condensados contêm núcleos fenólicos que geralmente estão ligados a carboidratos ou proteínas.

Para a determinação da presença de taninos foi transferido 1 mL dos extratos brutos para cinco tubos de ensaio e os seguintes reagentes foram adicionados:

- Tubo 1: 3 gotas de cloreto férrico. Considerando coloração azul ou verde, com formação ou não de precipitado como resultado positivo.
- Tubo 2: 1 a 3 gotas de sulfato amoniacal. Considerando coloração azul ou verde como resultado positivo.
- Tubo 3: 1 a 3 gotas de cloridrato de emetina. Considerando a formação de precipitado como resultado positivo.
- Tubo 4: 5 mL de ácido acético (gota a gota) e 5 mL de acetato de chumbo. Considerando a formação de precipitado como resultado positivo.
- Tubo 5: 3 gotas de dicromato de potássio 1%. Considerando a formação de precipitado como resultado positivo.

Para a pesquisa de taninos condensados e hidrolisáveis foram transferidos 30 mL do extrato para um balão de fundo chato junto com 6 mL de formaldeído 40% e 4 mL de ácido clorídrico 37%. Esta mistura foi aquecida em refluxo por uma hora e depois de resfriada foi filtrada. O resíduo do papel de filtro foi lavado com solução de álcool 50% e então adicionado algumas gotas de KOH a 5%. A coloração verde indica a presença de taninos condensados. Ao filtrado foi adicionado excesso de acetato de sódio e gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1%, a coloração azul indica a presença de taninos hidrolisáveis.

4.6 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Levando em conta o direcionamento proporcionado pelo ensaio sistemático fitoquímico, buscou-se isolar metabólitos presentes para proceder à identificação dos mesmos. Para tanto, recorreu-se à cromatografia líquida em coluna, realizada em coluna de vidro utilizando como fase estacionária sílica gel 60 (0,063-0,2 mm Merck®). As frações de escolha foram solubilizadas em metanol e incorporadas proporcionalmente a duas partes de sílica-gel para cada parte de amostra em gral adequado. A mistura foi constantemente triturada com auxílio de pistilo, promovendo a evaporação total do solvente até a formação da pastilha, sendo esta submetida à cromatografia líquida em coluna.

A coluna foi empacotada com sílica-gel na proporção de cinco partes em relação à pastilha, sendo que esta foi isolada entre camadas de papel de filtro, a fim

de minimizar possíveis perturbações na coluna. Como fase móvel foram utilizados solventes combinados em gradiente crescente de polaridade. Para a fração clorofórmio das folhas, iniciou-se com 100% hexano em volume de 100 mL, tendo clorofórmio e metanol como gradiente de polaridade, com variação de 5% em 5%, até 100% de metanol. Foram coletadas subfrações de aproximadamente 15 mL em frascos de vidro em sequência. O mesmo procedimento foi realizado com a fração acetato de etila das folhas, utilizando gradiente de polaridade de hexano 70%-acetato de etila-metanol-água-ácido acético 5%, com variação de 5% em 5%.

Dentre as análises para elucidação dos compostos isolados dos extratos e frações semipurificadas de *C. intermedium* foram utilizadas técnicas espectroscópicas como RMN de H^1 , C^{13} , DEPT, e correlações HSQC e HMBC, além de espectrometria na região do Infravermelho.

4.7 BIOENSAIOS

4.7.1 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA TOXICIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULES

4.7.1.1 Avaliação da toxicidade aguda em *Artemia salina*

Para a avaliação de toxicidade aguda dos extratos e frações de *Cestrum intermedium* no microcrustáceo de água salobra/salina *Artemia salina* foi utilizado o método descrito por Meyer *et al.* (1982) com adaptações de Petrobrás (1996), que determina a CE_{50} em $\mu\text{g/mL}$ de compostos ativos e extratos no meio. Foi utilizada solução salina de sal marinho artificial em água destilada (30 g/L) como meio de eclosão e cultivo dos microcrustáceos. O pH foi ajustado para 9,0 com carbonato de sódio, para viabilizar a sobrevivência dos náuplios, uma vez que valores de pH superiores a 6,0 são ideais para o desenvolvimento de *Artemia salina*, não devendo ultrapassar valores de 10,5.

Os cistos de *Artemia salina* adquiridos em loja de aquários foram colocados em funil de separação com solução salina (200 mg/L) por 24 horas para eclodirem, sob aeração contínua, em ausência de luz (viabilizada por papel alumínio ao redor do funil), com controle de temperatura (27-30° C) e pH (8-9). Ao fim das 24 horas, o

papel alumínio foi aberto na parte inferior, próximo à torneira e foi posicionada iluminação artificial (lâmpada fria). Devido ao fototropismo dos náuplios, a coleta foi facilitada com o uso da torneira do funil. Os cistos não eclodidos foram descartados, o funil foi reabastecido com nova salina e os náuplios reinsertos, novamente sob aeração e ausência de luz por mais 24 horas. Ao fim destas 24 horas, os náuplios de 48 horas de vida foram coletados e em seguida inseridos nos meios-teste e controles.

As soluções de extratos brutos e frações das folhas e cascas nas concentrações de 10, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL de DMSO 1% em solução salina foram testadas em quadruplicata, acondicionadas em placas-teste de cultura celular de 24 poços (Marca Prolab). As amostras dos extratos foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) 1% em salina para melhor solubilização e garantia da concentração efetiva das amostras. Portanto, além do controle negativo (salina), os náuplios foram avaliados frente ao solvente (DMSO 1% em salina). Como controle positivo foi utilizado dodecilsulfato de sódio (SDS) nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL de solução salina. Todos os controles também foram realizados em quadruplicata.

Em cada poço foram colocados 10 náuplios e cerca de 2,5 mL de amostra-teste. As placas foram incubadas em estufa (27-30° C) ao longo de 24 horas e após este período o número de náuplios imóveis foi contabilizado com auxílio de iluminação artificial e lupa. As placas foram incubadas novamente e avaliadas após outras 24 horas (completando 48 horas de exposição). Os dados foram analisados pelo método Probit com o objetivo de estimar a concentração efetiva a 50% dos indivíduos (CE₅₀) com 95% de confiabilidade. Foram consideradas amostras ativas as que CE₅₀ for menor que 1000 ppm (1000 µg/mL), de acordo com Meyer (1982).

4.7.1.2 Avaliação da toxicidade aguda em *Daphnia magna*

O ensaio de toxicidade aguda em *Daphnia magna* foi realizado de acordo com a ABNT NBR 12713:2009. O cultivo de dafnias reproduzidas por partenogênese foi realizado em água de diluição em pH de 7,6 a 8, com dureza de 175 a 225 mg/L de carbonato de cálcio. Os organismos foram mantidos em lotes com menos de 25 adultos por litro, com luz difusa entre 12 e 16 horas e 18-22° C, sendo alimentados

com algas verdes unicelulares cultivadas. Os lotes são limpos diariamente, sendo retirados os filhotes novos.

Os extratos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) 1% em água de diluição, para viabilizar a solubilização e garantir da concentração efetiva das amostras. Portanto, além do controle negativo (água de diluição), os filhotes também foram avaliados frente ao solvente (DMSO 1% em água de diluição). Como controle positivo foi utilizado dicromato de potássio nas concentrações de 0,38 a 1,86 µg/mL (devendo a sensibilidade aceitável dos filhotes variar entre 0,6 e 0,9 µg/mL). As soluções de extratos brutos e frações de folhas e cascas foram testadas nas concentrações de 10, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL em triplicata, assim como todos os controles. Todas as soluções-teste foram preparadas no momento da transferência dos organismos (20 por replicata).

O teste ocorreu em ambiente escuro, com temperatura de 18-22° C, sem alimentação dos organismos, sendo verificado o número de organismos imóveis no período de 48 horas de exposição. Os dados foram analisados pelo método Probit com o objetivo de estimar a concentração efetiva a 50% dos indivíduos (CE₅₀) com 95% de confiabilidade. Foram consideradas amostras ativas as que CE₅₀ for menor que 1000 ppm (1000 µg/mL).

4.7.1.3 Avaliação da toxicidade aguda em *Aedes aegypti*

A atividade larvicida dos extratos brutos e frações de *Cestrum intermedium* em *Aedes aegypti* foi verificada segundo a metodologia de World Health Organization (WHO) (1981a) com modificações. Os ovos de *Aedes aegypti* da linhagem Rockefeller (utilizada como padrão de susceptibilidade a inseticidas para a espécie *Aedes aegypti*) foram fornecidos pela Fundação Oswaldo Cruz – RJ. Para a eclosão dos ovos, foram adicionados 500 mL de água mineral em Becker de plástico e levados à estufa BOD (marca Novatecnica modelo NT 704) em temperatura de 27±2° C e umidade relativa de 80±5%.

A dieta das larvas no período de eclosão até o 3° estágio larval (aproximadamente 48 horas de idade) consistiu em ração de peixe (Aldon Basic, MEP 200 Complex). Larvas no 3° estágio de desenvolvimento foram utilizadas para os ensaios, por apresentarem tecidos mais desenvolvidos. As larvas de 4° estágio

podem virar pupa e evoluir a mosquito rapidamente, por isso evita-se utilizar larvas neste estágio, apesar da semelhança anatômica. Devido a esta semelhança anatômica, pode-se inferir que larvas sensíveis no 3º estágio serão sensíveis no 4º estágio. As larvas em 1º e 2º estágios são imaturas anatomicamente, com sistema vascular pouco desenvolvido, tornando-se sensíveis em demasia para avaliações de toxicidade. A triagem para selecionar o 3º estágio consistiu em verificar o desenvolvimento de papilas anais (formação completa), a distinção nítida entre papila anal e sifão respiratório.

Foram testadas as soluções de concentração de 10, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL dos extratos e frações de folhas e cascas, solubilizando as amostras com 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) em água mineral. O ensaio foi realizado em triplicata, utilizando 10 organismos por replicata. Como controle negativo foi utilizada a solução DMSO 0,5% em água mineral e o inseticida utilizado como controle positivo foi o Temefós grau técnico 90% lote 005/2011 (marca Fersol Mairinque), em concentração 0,060 mg/mL (o dobro concentração letal que causa imobilidade de 99% de uma cepa susceptível), como definido pela WHO (1981 a,b). A cepa utilizada no teste é resistente à dose usual de Temefós, organofosforado biodegradável que não acumula em tecidos, agindo por contato ou ingestão.

A atividade larvicida foi avaliada após 24 e 48 horas por meio da contagem do número de larvas mortas em cada amostra. Larvas moribundas, incapazes de atingir a superfície da água quando tocadas, foram consideradas como mortas (WHO, 1981a). Os dados foram analisados pelo método Probit com o objetivo de estimar a concentração efetiva a 50% dos indivíduos (CE₅₀) com 95% de confiabilidade. Foram consideradas amostras ativas as que CE₅₀ for menor que 1000 ppm (1000 µg/mL).

4.7.1.3.1 Avaliação da morfologia das larvas de *Aedes aegypti*

Após o término de 48 horas, nas maiores concentrações em que as larvas foram consideradas vivas, sua morfologia anatômica interna e externa foram avaliadas. As larvas coletadas foram fotografadas com Camera digital Sony (morfologia externa), conectada a um microscópio Olympus CX 41 aumento de 4x (100 µm) (morfologia interna) (VIEIRA et al., 2012).

4.7.1.4 Avaliação Hemolítica *in vitro*

Para o ensaio de atividade hemolítica *in vitro* foi utilizada a técnica proposta por Banerjee (2008) adaptada por Henneberg (2013), empregando solução de hemácias de carneiro em tampão fosfato (papa de eritrócitos 2% em PBS). A papa de eritrócitos foi obtida a partir de sangue de carneiro homogeneizado (Newprov®), lavado com tampão fosfato gelado e centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos, por no mínimo três vezes. O centrifugado livre de sobrenadante (papa de eritrócitos) foi diluído a 2% em PBS (phosphate buffer saline).

Os extratos e frações foram testados em concentrações de 100, 250, 500 e 1000 µg/mL, em triplicata. Em eppendorfs foram colocados 200 µL dos extratos diluídos em PBS e 200 µl de solução de eritrócitos a 2%. Para a realização dos controles, as amostras foram substituídas por PBS para o controle negativo (hemólise basal) e por água destilada para o controle positivo (hemólise total), respectivamente. As amostras foram incubadas em estufa por 3 horas a 37° C. Após incubação, os eppendorfs foram centrifugados por 5 minutos a 3000 rpm. Os sobrenadantes foram observados para verificação da ocorrência ou não da formação de hemólise total (solução límpida, vermelha e sem depósito de eritrócitos).

Para a quantificação da hemólise, os sobrenadantes foram pipetados para uma placa de ELISA e a absorbância lida em 540 nm (Multiskan FC – Thermo Scientific). A hemólise foi calculada com base nos valores de absorbância do tubo de hemólise total, cujo valor é considerado 100%. Os dados obtidos foram submetidos à análise variância (ANOVA) ($\alpha=0,05$) e quando necessário ao teste de Tukey com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$) para comparação de médias. A taxa de hemólise foi calculada da seguinte maneira (Equação 5):

(5)

$$\text{Hemólise (\%)} = \frac{\text{Absorbância Amostra} - \text{Absorbância Basal}}{\text{Absorbância Total} - \text{Absorbância Basal}} \times 100$$

4.7.2. AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS *IN VITRO*

4.7.2.1 Avaliação do potencial de atividade antimicrobiana

A avaliação do potencial de atividade antimicrobiana foi realizada através das técnicas de difusão em ágar e de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima. Foram utilizados os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Candida albicans* (ATCC 10231).

4.7.2.1.1 Método da difusão em ágar

A metodologia de difusão em ágar utilizando discos de papel de filtro impregnados com as amostras foi realizada conforme metodologia descrita por Bauer *et al.* (1966) com adaptações. As amostras dos extratos brutos e frações de *Cestrum intermedium* foram testadas em duplicatas impregnadas em discos de papel na concentração de 1000 µg.

As colônias isoladas dos micro-organismos teste com crescimento em ágar de 18-22horas foram transferidas para um tubo de solução salina a 0,49% e, após homogeneização, as suspensões dos micro-organismos teste foram ajustadas para aproximadamente 10^8 células/mL, compatível com a escala 0,5 de McFarland (por comparação de turbidez). Os inóculos microbianos foram espalhados sobre a superfície de ágar Müeller-Hinton (bactérias) e sobre ágar Sabouraud (levedura) com o auxílio de swab estéril.

Discos de papel foram impregnados com 10 µL das amostras (100 mg/mL) e deixados secar a temperatura ambiente. Os discos impregnados foram colocados sobre as placas inoculadas com os micro-organismos teste com o auxílio de pinça estéril. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica (por 48 horas em 26° C quando leveduras e 24 horas em 35° C quando bactérias). O teste foi realizado em duplicada para cada amostra. Todo procedimento foi realizado dentro de câmara de

fluxo laminar com material previamente esterilizado em autoclave a 120° C por 15 minutos. Amostras padrões dos controles positivos, fungicida Cetoconazol (50 µg/disco) e do bactericida Cloranfenicol (30 µg/disco), foram utilizadas para comparação de resultados entre os ensaios. Os diâmetros dos halos formados pelos controles serviram de comparação para a capacidade de inibição do crescimento dos micro-organismos pelos extratos.

4.7.2.1.2 Determinação da concentração inibitória mínima

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada utilizando-se a metodologia descrita pelo Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2012), com modificações. Foram preparadas soluções-mãe na concentração de 2000 µg/mL a partir dos extratos brutos e frações de folhas e cascas, empregando metanol (25%) em água como solvente.

Para o teste com bactérias foi utilizado o caldo de Mueller-Hinton e para o ensaio com a levedura foi utilizado o caldo Sabouraud Dextrose. Foram processadas diluições seriadas, para resultar em concentrações entre 1000 e 7,8 µg/mL das amostras em estudo, distribuídos em 100 µL em cada orifício da microplaca estéril com 96 poços em 'U'. Em seguida, foram adicionados 10 µL dos inóculos contendo aproximadamente 10⁸ UFC/mL e as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C±1°C por 24 horas quando bactérias e por 48 horas quando levedura. Cada amostra foi avaliada em duplicata, sendo que as cepas não foram misturadas nas placas, a fim de evitar contaminações.

Após o período de incubação de 20-23 horas adicionaram-se 20 µL de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) (0,5% p/v) em água, à cada cavidade das microplacas utilizadas, que foram novamente levadas à temperatura de incubação durante uma hora para verificar a presença de organismos viáveis, indicado pelo desenvolvimento de coloração vermelha. Os testes foram realizados em duplicata, utilizando Cloranfenicol, a 30 µg/mL e Cetoconazol a 50 µg/mL como padrão.

4.7.2.2 Avaliação da Atividade Antioxidante

Para avaliar o potencial antioxidante das folhas e caules da espécie *Cestrum intermedium* foram utilizados três métodos: Redução do complexo fosfomolibdênio, sequestro de radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

4.7.2.2.1 Doseamento de polifenóis

O teste de Folin-Ciocalteu é um dos métodos mais antigos para determinar o conteúdo de fenólicos totais. O reagente de Folin-Ciocalteu é composto por ânions heteopoli-fosfotungstato-molibdato que reagem com compostos fenólicos em meio básico, formando um complexo molibdênio-tungstênio de coloração azul intensa, detectada espectrofotometricamente (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; ROGINSKY; LISSI, 2005).

A determinação do teor de fenólicos totais seguiu o método descrito por Singleton *et al.* (1999) com adaptações. Utilizando o ácido gálico como controle, construiu-se uma curva de calibração (2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5 e 20 µg/mL) para interpolar as absorbâncias das amostras. Amostras (320 µL) dos extratos brutos e frações de *Cestrum intermedium* diluídas em metanol (80 µg/mL) foram reunidas a água destilada (quantidade suficiente para completar 4 mL). A seguir, foi adicionado 0,2 mL de reativo de Folin-Ciocalteu e, após repouso de 10 minutos, 0,4 mL de carbonato de sódio a 10%. Após 30 minutos de repouso em temperatura ambiente, foram realizadas as leituras espectrofotométricas em 760 nm.

Os teores de fenólicos totais foram determinados em miligramas de extrato bruto equivalentes de ácido gálico por grama (mg/ g EAG), utilizando curva de calibração.

4.7.2.2.2 Ensaio da Redução do Complexo Fosfomolibdênio

Esta análise se baseia na técnica descrita por Prieto *et al.*, (1999) e apresenta a vantagem de avaliar a capacidade antioxidante pela redução de

complexos tanto de componentes lipofílicos e hidrofílicos. Através da redução do molibdênio VI a molibdênio V, promovida pela amostra analisada, ocorre a obtenção do complexo fosfato-molibdênio V de coloração verde, determinado espectrometricamente. O reativo fosfomolibdênio é formado pela reação da solução de fosfato de sódio tribásico (28 mL de 0,1 mol/L) com solução de molibdato de amônio tetraidratado (12 mL de 0,03 mol/L) e solução de H₂SO₄ (20 mL de 3 mol/L), em meio aquoso, sendo o volume final ajustado com água destilada para 100 mL.

Os extratos e frações foram solubilizados em metanol com concentração final de 200 µg/mL. Destas, alíquotas de 0,3 mL foram adicionados a 3 mL de solução reagente do complexo fosfomolibdênio. Os tubos foram incubados em banho-maria a 95° C por 90 minutos. Foi utilizado 0,3 mL de metanol com 3 mL do reagente como branco e como padrões utilizou-se a vitamina C e a rutina, nas mesmas concentrações das amostras. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata. Após resfriamento, realizou-se a leitura a 695 nm em espectrofotômetro UV-1601 Shimadzu® para obtenção das absorvâncias.

A capacidade antioxidante das amostras foi expressa em atividade antioxidante relativa (AAR%), em relação à rutina (200 µg/mL) e vitamina C (200 µg/mL), usadas como padrão. Os dados obtidos foram submetidos à análise variância (ANOVA) ($\alpha=0,05$) e quando necessário ao teste de Tukey com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$) para comparação de médias. Os resultados foram calculados da seguinte maneira (Equação 6 e 7):

(6)

$$\text{AAR\% Vit C} = \frac{\text{Absorbância Teste} - \text{Absorbância Branco}}{\text{Absorbância Vitamina C} - \text{Absorbância Branco}} \cdot 100$$

(7)

$$\text{AAR\% Rutina} = \frac{\text{Absorbância Teste} - \text{Absorbância Branco}}{\text{Absorbância Rutina} - \text{Absorbância Branco}} \cdot 100$$

4.7.2.2.3 Avaliação da Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina)

O potencial de redução do radical DPPH foi determinado segundo o método descrito por Mensor *et al.* (2001), utilizando a vitamina C e a rutina como padrões. Este ensaio consiste na avaliação da atividade sequestradora do radical livre 2,2 - difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), de coloração púrpura. Por ação de um antioxidante ou espécie radicalar, o DPPH é reduzido, formando difenil-picril-hidrazina, tornando-se amarelo. O conseqüente desaparecimento da absorção pode ser monitorado pelo decréscimo da absorbância em UV visível. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres.

Foram preparadas soluções metanólicas das amostras em concentrações variando de 5 µg/mL a 500 µg/mL e dos padrões variando entre 1,6 e 8 µg/mL para a vitamina C e 2,0 a 12 µg/mL para a rutina para construção de curva de calibração. Foram adicionadas alíquotas de 2,5 mL a 1 mL de uma solução metanólica de DPPH na concentração de 0,03 mmol/mL (preparada minutos antes da utilização). Como controle negativo utilizou-se 2,5 mL de metanol em 1 mL de DPPH. Após trinta minutos de reação, em temperatura ambiente, foi realizada leitura em 518 nm em espectrofotômetro, utilizando o metanol como branco. Foram calculados os valores da concentração necessária para reduzir 50% do DPPH disponível (IC₅₀) em curva de calibração. Os dados obtidos foram submetidos à análise variância (ANOVA) ($\alpha=0,05$) e quando necessário ao teste de Tukey com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$) para comparação de médias.

4.7.2.2.4 Ensaio de Atividade Antioxidante pelo Método do Ácido Tiobarbiturico-Espécies Reativas (TBARS)

O método aplicado de acordo com Kishida *et al.* (1993) e Morais *et al.* (2006) com adaptações envolve a peroxidação lipídica da gema de ovo por meio da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

A peroxidação lipídica é um mecanismo de dano celular e tecidual muito estudado, sendo um processo que indica estresse oxidativo em células e tecidos em plantas e animais. Os lipoperóxidos são instáveis e se decompõe formando diversos

compostos complexos, inclusive o malondialdeído (MDA) (CAYMAN CHEMICAL, 2014). A reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (meio ácido e elevada temperatura) forma um cromóforo róseo, facilmente identificado por espectroscopia, tornando possível a mensuração da peroxidação lipídica. A fonte lipídica utilizada foi solução de gema de ovo (5%) em dodecilsulfato de sódio (SDS) 0,55%.

Em cinco tubos de ensaio de tampa de rosca para cada amostra, foram adicionados 0,5 mL de solução de gema de ovo, 0,1 mL de amostra em metanol (3 mg/mL) e o volume foi completado com água destilada para 1 mL. O mesmo procedimento foi realizado com o controle positivo (butilhidroxitolueno – BHT) em metanol (3 mg/mL). Em seguida, foi acrescentado a cada um dos tubos de ensaio 0,05 mL de solução de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (ABAP) 0,035%, 1,5 mL de solução de ácido acético 20% e 1,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,4%. Nos brancos da amostra, o ABAP foi substituído por água e no controle negativo foi utilizado metanol no lugar das amostras. Os tubos de ensaio tampados foram imersos em banho-maria (95° C) por 1 hora.

Após resfriamento, foram acrescentados 5 mL de n-butanol a cada tubo, sendo submetidos à agitação lenta seguida de repouso de 10 minutos. Os tubos foram então centrifugados por 10 minutos (5000 rpm). Os sobrenadantes foram lidos em espectrofotômetro zerado por n-butanol, em 532 nm. Os dados obtidos foram submetidos à análise variância (ANOVA) ($\alpha=0,05$) e quando necessário ao teste de Tukey com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$) para comparação de médias. O índice antioxidante foi calculado pela Equação 8:

(8)

$$IA\% = \left[1 - \frac{(\text{Absorbância Amostra} - \text{Absorbância Branco Amostra})}{\text{Absorbância Controle Negativo}} \right] \cdot 100$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Segundo Farias (2010), o teor de umidade máximo para vegetais estabilizados determinado por diversas farmacopeias varia entre 8 e 14%, intervalo que garante a inibição de enzimas que acarretariam a degradação de constituintes químicos, da degradação por hidrólise e do desenvolvimento microbiano. A determinação do teor de cinzas quantifica substâncias inorgânicas não-voláteis (minerais) e pode ser aplicada, assim como o teor de umidade e densidade aparente, como parâmetro de controle de qualidade, evitando falsificações ou adulterações (FARIAS, 2010). A combinação destes parâmetros físico-químicos é exclusiva de cada espécie, sendo considerada como identidade da planta. Neste trabalho, os parâmetros físico-químicos de *C. intermedium* foram determinados pela primeira vez, sendo ainda necessárias diversas repetições para estabelecer padrões de intervalos aceitáveis, garantindo a repetibilidade dos ensaios.

5.1.1 Determinação dos teores de umidade, cinzas e densidade aparente das folhas e cascas de *Cestrum intermedium*

A partir das metodologias descritas, foram obtidos os resultados de Teor de Umidade (%), Teor de Cinzas Totais (%) e Densidade Aparente (g/mL) para as folhas e cascas secas, estabilizadas e trituradas, sendo apresentados os valores médios na Tabela 1. Os resultados médios obtidos são coerentes, pois se enquadram em valores preconizados por farmacopeias de vários países (FARIAS, 2010).

TABELA 1: TEOR DE UMIDADE, CINZAS E DENSIDADE APARENTE DE FOLHAS E CASCAS DE *C. intermedium*

Amostra	U%	Cinzas%	Densidade Aparente (g/mL)
Folhas	8,76±0,07	11,82±0,13	0,25±0,01
Cascas	3,30±0,13	6,40±0,20	0,27±0,02

5.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS DOS EXTRATOS DAS FOLHAS E CASCAS DE *Cestrum intermedium*

Assim como os teores de umidade, cinzas e densidade aparente, o teor de sólidos de extratos das folhas e cascas pode ser aplicado como parâmetro de controle de qualidade dos extratos. Não há padrão estabelecido para valores aceitáveis de teor de sólidos de extratos de *Cestrum intermedium*, pois também é uma determinação inédita para a espécie. A partir da metodologia descrita, foram obtidos os seguintes resultados de Teor de Sólidos Totais (g/mL) para os extratos brutos etanólicos e aquosos das folhas e cascas (Tabela 2):

TABELA 2: TEOR DE SÓLIDOS DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E AQUOSO DE *C. intermedium*

Amostra	Teor de Sólidos (g/mL)	
	Ext. Bruto Etanólico	Ext. Bruto Aquoso
Folhas	0,0080±0,06	0,0209±0,05
Cascas	0,0499±0,13	0,0133±0,11

5.3 RENDIMENTOS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS E FRAÇÕES

Pode-se calcular o teor de sólidos totais passíveis de ser extraídos das partes utilizadas, uma vez que são conhecidos o volume de extrato obtido e a quantidade de material utilizada. Ou seja, determina-se a porcentagem de massa extraída das partes da planta, o rendimento da extração.

Para obter 95,31 g de extrato bruto seco de folhas foram necessários 652,58 g de folhas secas e estabilizadas. Considerando que o material seco e estabilizado seja 100%, temos que o teor de sólidos extraíveis está em torno de 14,86%. Utilizando do mesmo raciocínio, temos que a partir dos 754,54 g de cascas secas e estabilizadas obtivemos 87,7536 g de extrato bruto seco de cascas, portanto, cerca de 10,97% de teor de sólidos extraíveis.

Já para determinar o rendimento das frações, consideramos que 100% seja o extrato bruto seco (g) e que a fração seca (g) nos apresenta o rendimento. Os rendimentos de extratos brutos e frações das folhas e cascas estão na Tabela 3.

TABELA 3: RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE FOLHAS E CASCAS DE *C. intermedium*

Amostra	Rendimento (%)
Ext. Bruto Folha	14,86
Hexano Folha	27,24
Clorofórmio Folha	4,20
Acet. Etila Folha	2,78
Remanesc. Folha	39,24
Ext. Bruto Casca	10,97
Hexano Casca	22,28
Clorofórmio Casca	8,13
Acet. Etila Casca	3,36
Remanesc. Casca	57,15

Esta relação estabelece a possibilidade de extrapolar os efeitos biológicos além do extrato em si, já que se pode determinar quanto de planta seca e estabilizada há na concentração escolhida para teste, facilitando a determinação de dose em alguns casos de toxicidade, como a intoxicação do gado bovino.

5.4 ENSAIO SISTEMÁTICO FITOQUÍMICO

O ensaio sistemático fitoquímico delinea o perfil químico dos extratos, direciona o estudo do vegetal e auxilia a prever suas possíveis atividades, identificando grupos químicos ou classes de metabólitos solúveis em etanol e solúveis em água que possam estar presentes no material botânico. Portanto, para determinadas pesquisas de grupos, fez-se necessária a obtenção de extrato aquoso das folhas e cascas, sendo este o único momento em que foram utilizados. Os metabólitos solúveis em álcool (utilizando os extratos brutos etanólicos) investigados foram alcaloides, flavonoides, cumarinas, heterosídeos antraquinônicos, esteroides e triterpenos. Nos extratos brutos aquosos recém-obtidos foi investigada a presença de heterosídeos antociânicos, heterosídeos saponínicos, heterosídeos cianogênicos e taninos.

Os resultados são informações qualitativas acerca dos principais grupos de metabólitos, utilizados como roteiro para o isolamento de substâncias, sendo eles: alcaloides, heterosídeos flavônicos, flavonóis e heterosídeos saponínicos (presentes em folhas e cascas), cumarinas, esteroides e triterpenos (presentes somente nas cascas). Os resultados do ensaio sistemático fitoquímico evidenciam os metabólitos

solúveis em etanol (Tabela 4) e em água (Tabela 5), que especificam quais reagentes/reações foram escolhidas para realizar cada pesquisa.

Os metabólitos detectados em *Cestrum intermedium* estão de acordo com os metabólitos secundários mais comuns no gênero, que é conhecido por apresentar saponinas (gitogenina e digitogenina), significativa quantidade de alcaloides como nicotina, nornicotina e atropina, flavonóis e terpenoides (GALLO, 1979 *apud* AFONSO; SANTOS, 1995; HARAGUCHI, 2003; CUARTAS; CASTAÑO, 2008; ROSSETTI; CORSI, 2009; YIN *et al.*, 2012; KHATUN *et al.*, 2014), sendo estas classes metabólicas também constatadas em *Cestrum intermedium*, consideradas marcadores quimiotaxonômicos do gênero e família, respectivamente.

TABELA 4: ANÁLISE SISTEMÁTICA FITOQUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS E CASCAS DE *C. intermedium*

ANÁLISES		FOLHAS	CASCAS
Alcaloides	Meyer	+	+
	Dragendorff	+	+
	Bouchardat	+	+
	Bertrand	+	+
Flavonoides	Leucoantocianidinas	-	-
	Heterosídeos flavônicos	+	+
	Flavonois	+	+
	Dihidroflavonois	-	-
Cumarinas	-	-	+
Heterosídeos antraquinônicos	-	-	-
Esteroides/Triterpenos	R.de Liberman - Bouchard	-	-
	R. de Keller - Kelliani	+	+

TABELA 5: ANÁLISE SISTEMÁTICA FITOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS E CASCAS DE *C. intermedium*

ANÁLISES		FOLHAS	CASCAS
Heterosídeos Antociânicos	pH 4	-	-
	pH 7	-	-
	pH 10	-	-
	Antocianidina	-	-
Heterosídeos saponínicos		+	+
Heterosídeos cianogênicos		-	-
Taninos	Cloreto férrico	-	-
	Sulfato amoniacal	-	-
	Cloridrato de emetina	-	-
	Ácido acético e acetato de chumbo	-	-
	Dicromato de potássio	-	-
	Hidrolisáveis	-	-
	Condensados	-	-

5.5 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

A partir das indicações obtidas através do ensaio sistemático fitoquímico, procedeu-se às tentativas de isolamento para identificação de metabólitos secundários presentes. Optou-se por iniciar com as frações das folhas, mais especificamente fração clorofórmica (em busca dos alcaloides) e acetato de etila (em busca de flavonoides). Algumas amostras isoladas diretamente dos extratos brutos foram enviadas para identificação após tentativas de purificação, porém muitas não puderam ser avaliadas por dificuldade de isolamento devido ao baixo rendimento e presença de impurezas. Apenas uma tinha as características necessárias para finalizar as análises (EBCPPT).

5.5.1 Cromatografia em coluna

O particionamento da fração clorofórmica das folhas em coluna cromatográfica com gradiente de solventes entre hexano-clorofórmio-metanol resultou em 152 frascos de 15 mL de capacidade, distribuindo grupos de substâncias por polaridade. Na região de 30/70 e 20/80 (mL de hexano/mL de clorofórmio), apresentou-se um precipitado branco e uniforme, solúvel em clorofórmio. Foi coletada uma alíquota denominada CF88 para análise em ressonância magnética nuclear.

O particionamento da fração acetato de etila das folhas em coluna cromatográfica com gradiente de solventes entre hexano-acetato de etila-metanol-água-ácido acético resultou em 159 frascos, sendo os 100% água e 5% ácido acético coletados em frascos de 500 mL. Na região 85/15 e 80/20 (mL acetato de etila/mL de metanol), formaram-se cristais brancos em formato de estrela, solúveis em DMSO que, após purificados, foram analisados em ressonância magnética nuclear com a denominação AEF100CRT, assim como o sobrenadante amarelo resultante da purificação destes cristais com a denominação de AEF100SBD. Também resultante da fração acetato de etila das folhas, na região de ácido acético 5% formaram-se cristais com formato de ráfides solúveis em DMSO, analisados em ressonância magnética nuclear com a denominação de AEF159CRT.

5.5.2 Identificação por Ressonância Magnética Nuclear

Foram encaminhadas para obtenção de espectros de ^1H (200,12 MHz) e ^{13}C (50,56 MHz) em espectrômetro de ressonância magnética nuclear no espectrômetro (Bruker modelo DPX 200 MHz em 4.7 Tesla) amostras precipitadas no processo de extração do extrato bruto etanólico das cascas (seis amostras) e folhas (uma amostra), assim como alíquotas das subfrações das colunas da fração clorofórmio (uma) e acetato de etila das folhas (três). Devido à pequena quantidade (resultando em baixíssimas concentrações), impurezas e misturas, principalmente nas amostras de extratos brutos, não foi possível proceder ao isolamento em algumas amostras. Portanto, poucas amostras eram elegíveis para a identificação através dos espectros obtidos por ressonância magnética nuclear.

Diretamente do extrato bruto etanólico das cascas, foi possível identificar um triterpeno associado a hidrocarboneto denominado Balanophorin B (palmitato de lupeol) (XI-KUI *et al.*, 1998), que precipitou ao longo do resfriamento (amostra EBCPPT). Com auxílio da ferramenta SCIFINDER, foram verificados os diversos sinônimos da molécula: Lup-20(29)-en-3-ol, hexadecanoato, (3 β), Lup-20(29)-en-3 β -ol, palmitato, 3-Palmitoilupeol, Balanophorin B, Docosanoillupeol, Lupenil palmitato, palmitato de lupeol, Lupeil palmitato, Sambuculin A.

Hodges *et al.* (2003), o palmitato de lupeol é derivado do triterpenoide pentacíclico denominado lupeol. Apresentando uma ligação ao ácido graxo de cadeia longa, assim como o lupeol e seus outros derivados, o palmitato de lupeol possui atividade anti-inflamatória, sendo um de seus usos contra artrite reumatoide (HODGES *et al.*, 2003; CHAKRABORTY; RANGARI, 2011).

A Figura 9 representa graficamente a molécula do isolado EBCPPT (palmitato de lupeol). Na Figura 10 está representado o espectro de RMN de ^1H do isolado EBCPPT, onde pode-se observar os deslocamentos químicos característicos do esqueleto lup-20(29)-eno, sendo as marcações em verde (singletos 1,03, 0,94, 0,90, 0,88, 0,84 e 0,79 que representam os hidrogênios das metilas 23-28 e 30), em vermelho (singlete 1,68 do hidrogênio da metila na posição 23) e em amarelo (4,68 e 4,57 que representam os hidrogênios da dupla exocíclica), característicos para o lupeol. Em azul (2,28 do hidrogênio característico do carbono 2'), em roxo (1,33 o hidrogênio do carbono 15') e em laranja (o pico dos hidrogênios dos carbonos de 4'-14'), característicos do palmitato.

Na Figura 11 está representado o espectro de RMN de ^{13}C do isolado EBCPPT, apresentando os sinais em lilás (150, e 109,4 representando a dupla entre os carbonos 20 e 29) e em verde (80,7) característicos de triterpeno com esqueleto lup-20(29)-eno e em rosa (173,3 referente ao carbono 1' da carboxila) e laranja (29,7 referente aos carbonos 4'-13') característicos do ácido graxo de cadeia longa denominado palmitato. A Tabela 6 compara os deslocamentos químicos determinados experimentalmente com os relatados na literatura XI-KUI *et al.* (1998).

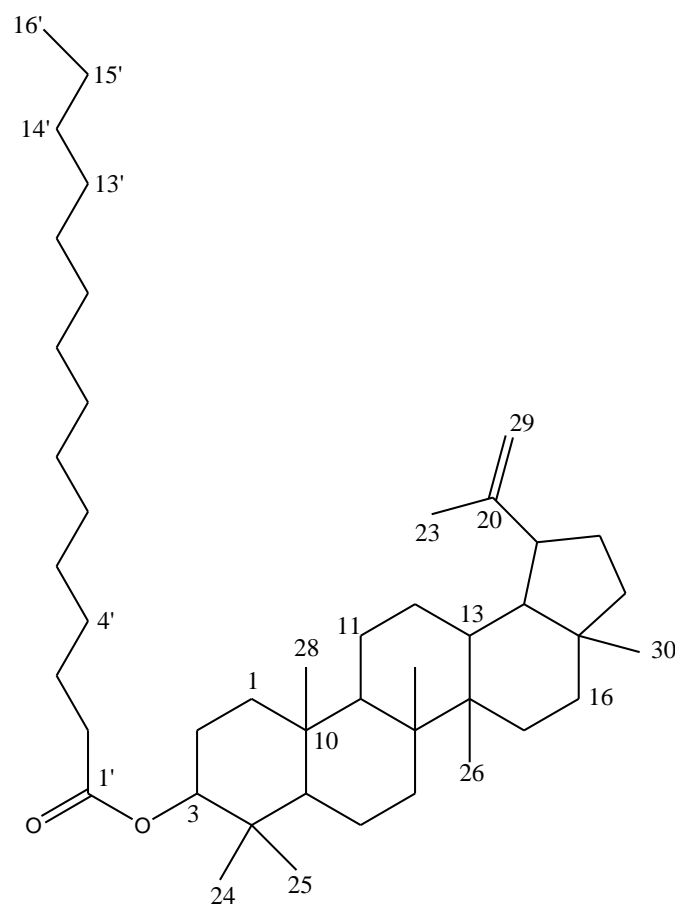


FIGURA 9: MOLÉCULA DO ISOLADO EBCPPT (PALMITATO DE LUPEOL)

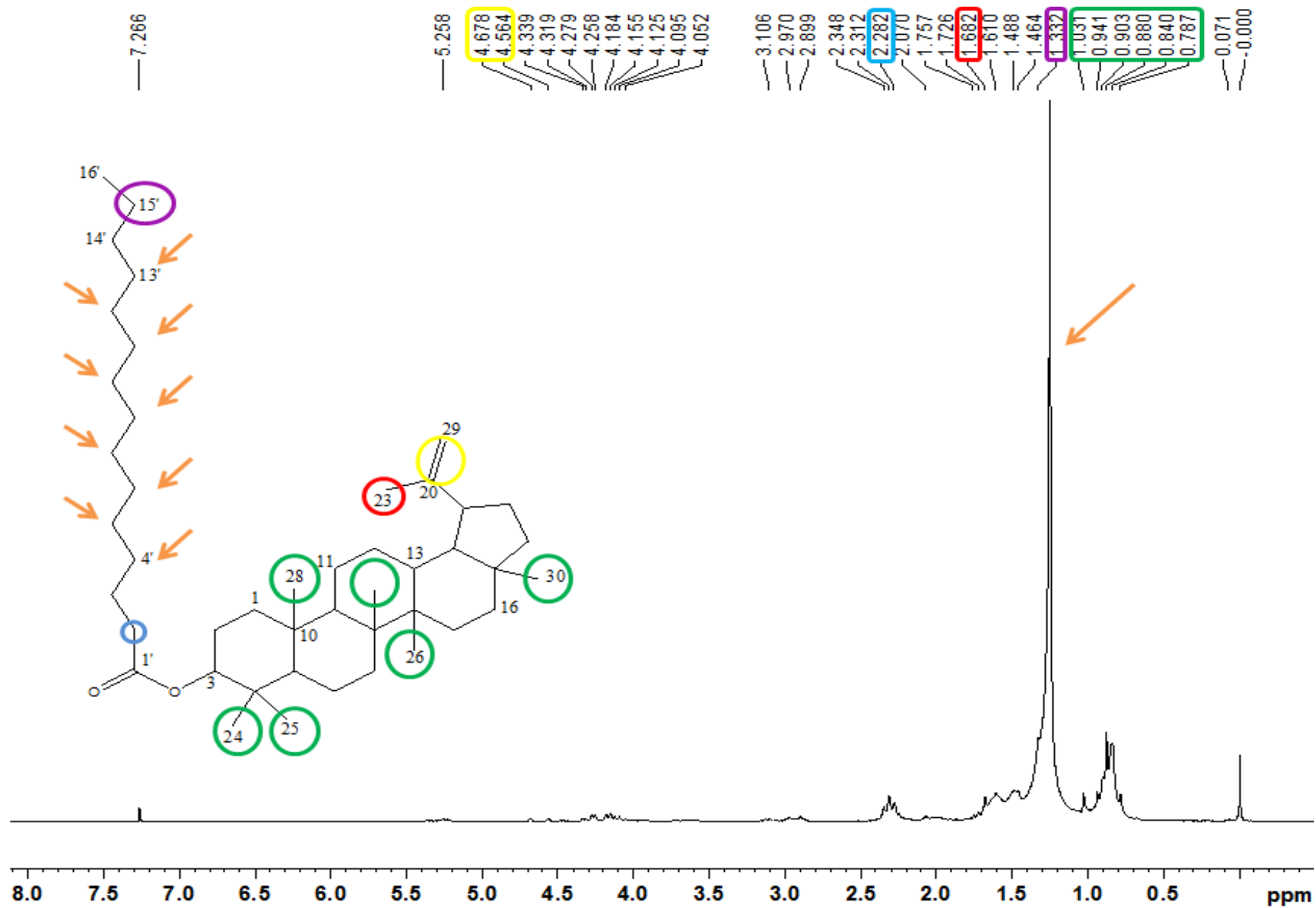


FIGURA 10: ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO ISOLADO EBCPPT (PALMITATO DE LUPEOL)

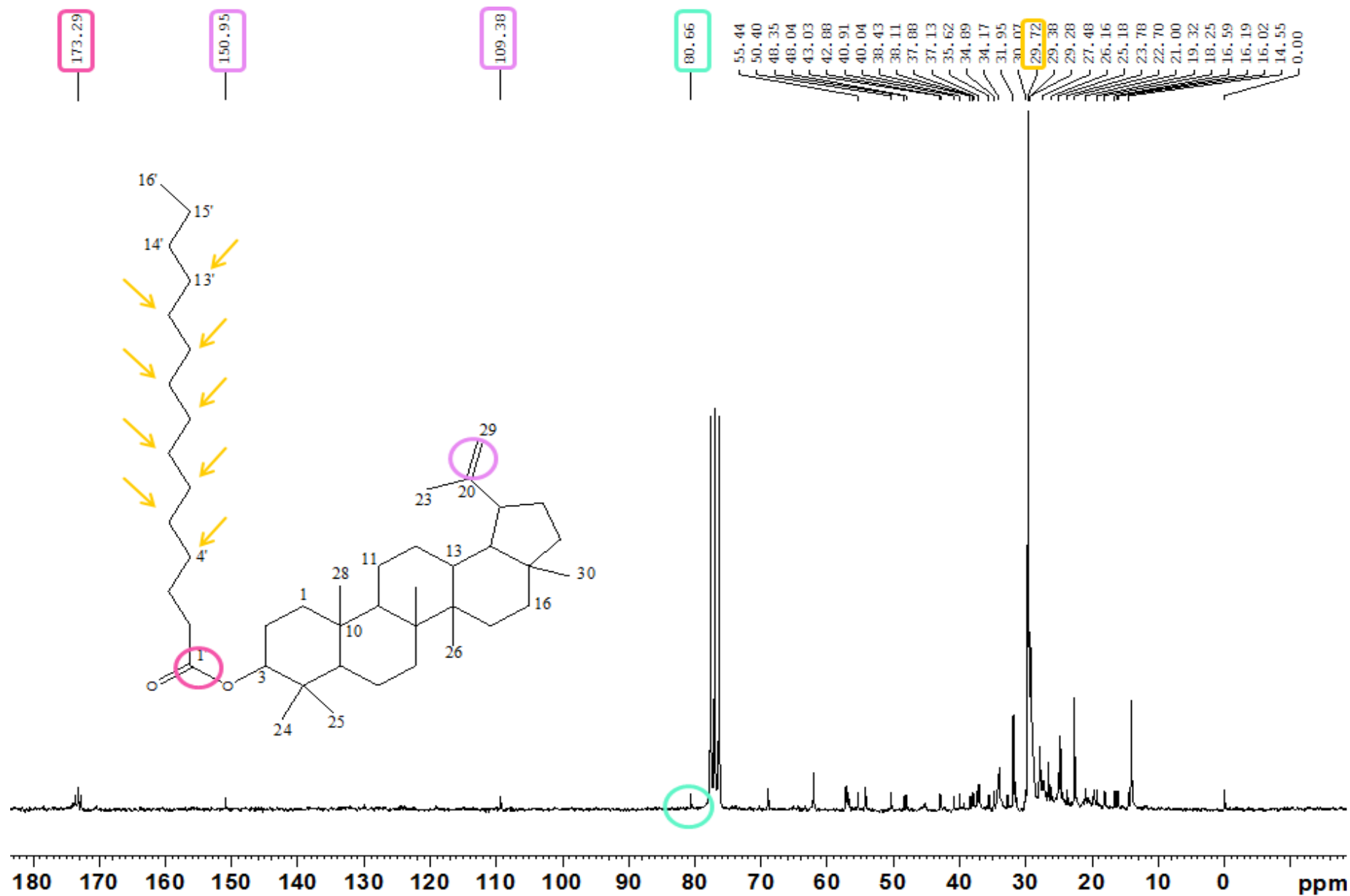


FIGURA 11: ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO ISOLADO EBCPPT (PALMITATO DE LUPEOL)

TABELA 6: DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^{13}C DO ISOLADO EBCPPT (PALMITATO DE LUPEOL)

C	Literatura	Experimental
1	37,8	37,8
2	23,4	23,7
3	80,7	80,6
4	38,54	38,4
5	55,5	55,4
6	18,3	18,2
7	34,3	34,1
8	40,9	40,9
9	50,4	50,3
10	38,1	38,1
11	21,0	20,9
12	25,2	25,1
13	37,2	37,1
14	42,7	42,8
15	27,5	27,5
16	35,6	35,6
17	43,0	43,0
18	48,4	48,4
19	48,0	48,0
20	150,8	150,8
21	29,4	29,3
22	40,0	40,0
23	27,5	27,4
24	16,3	16,1
25	16,3	16,0
26	16,3	16,5
27	14,5	14,5
28	18,3	18,3
29	109,4	109,3
30	19,4	19,4
1'	173,5	173,2
2'	34,8	34,8
3'	25,2	25,1
4'	29,3	29,7
⋮	⋮	⋮
⋮	⋮	⋮
13'	30,8	30,1
14'	31,9	31,9
15'	22,7	22,7
16'	14,5	14,5

Uma das amostras, isolada diretamente do extrato bruto das cascas, não indicou presença de carbonos (mostrando ser de natureza inorgânica), sendo então encaminhada para análise em espectro de infra-vermelho. A elucidação da estrutura permanece em andamento.

A partir dos espectros de carbono e hidrogênio em RMN da amostra retirada da cromatografia em coluna da fração clorofórmio (CF88), avaliamos a possibilidade da presença de triterpeno diferente do encontrado no extrato bruto das cascas, sendo a elucidação da estrutura permanece em andamento.

As amostras obtidas a partir da cromatografia em coluna da fração acetato de etila das folhas foram avaliadas, mas apenas os cristais (AEF100CRT) puderam ser analisados, pois o sobrenadante da purificação dos cristais (AEF100SBD) da região 85/15 e 80/20 (mL acetato de etila/mL de metanol) tratava-se de mistura muito complexa para identificação a partir dos espectros gerados por RMN de ^1H e ^{13}C . A partir da amostra retirada da cromatografia em coluna da fração acetato de etila (AEF100CRT), avaliamos a possibilidade da presença de alcaloide nicotínico. A elucidação da estrutura permanece em andamento.

A amostra AEF159CRT não concedeu espectro de ^{13}C satisfatório mesmo quando analisada em sonda direta (BBO), sendo então encaminhada para análise em espectrômetro de massas, ainda em andamento.

5.6 BIOENSAIOS

5.6.1 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA TOXICIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULES

5.6.1.1 ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA EM *Artemia salina*

Como demonstrado em Petrobrás (1996), a concentração efetiva (CE_{50}) do dodecilsulfato de sódio (SDS) está em torno de $13 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, o que foi verificado nos resultados obtidos: $\text{CE}_{50 \text{ SDS } 24\text{h}} = 13,88 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ e $\text{CE}_{50 \text{ SDS } 48\text{h}} =$

13,57 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Esta constatação demonstra que os náuplios estão com a sensibilidade padronizada, evitando resultados falsamente exacerbados ou atenuados. Os resultados para toxicidade aguda em *Artemia salina* servem como parâmetro para a espécie, uma vez que ensaios ecotoxicológicos nunca haviam sido realizados para se estabelecer comparações.

Em Khatun *et al.* (2014), extratos metanólicos de *Cestrum diurnum* foram avaliados em *Artemia salina*, apresentando $\text{CE}_{50} = 0,074 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em apenas duas horas de ensaio, sendo a toxicidade atribuída pelos autores aos alcaloides, esteroides e taninos presentes. Apesar de não reproduzir as condições (período de análise) do teste apresentado no presente trabalho, os resultados de Khatun *et al.* (2014) mostraram-se mais significativos em relação aos obtidos com *Cestrum intermedium*, uma vez que em curto período de tempo apresentaram CE_{50} muito inferiores.

Em *Cestrum intermedium* a atividade tóxica ocorreu nas frações clorofórmio, acetato de etila e remanescente das folhas e cascas, sendo que os resultados mais expressivos foram em acetato de etila das cascas. Esta fração foi a mais tóxica para *Artemia salina*, com $\text{CE}_{50} = 68,38 \mu\text{g}/\text{mL}$ (em 48 horas de exposição), cerca de cinco vezes menos tóxica que o controle positivo utilizado (SDS).

Os resultados do teste de toxicidade analisados pelo método Probit em *Artemia salina* estão apresentados na Tabela 7.

TABELA 7: TOXICIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES EM *Artemia salina*

AMOSTRA	CE_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Ext. Bruto Folhas	> 1000	> 1000	-	-
Hexano Folhas	> 1000	> 1000	-	-
Clorofórmio Folhas	801,07	715,32	715,32-897,09	676,26-756,64
Acetato de Etila Folhas	508,05	355,76	440,26-586,27	291,32-434,44
Remanescente Folhas	> 1000	884,87	-	715,49-1094,33
Extrato Bruto Cascas	> 1000	> 1000	-	-
Hexano Cascas	> 1000	> 1000	-	-
Clorofórmio Cascas	770,01	626,24	716,88-827,08	555,05-707,45
Acetato de Etila Cascas	116,48	068,38	95,40-142,21	51,96-90,00
Remanescente Cascas	> 1000	818,20	-	696,95-960,54

*controle positivo SDS: $\text{CE}_{50\ 24\text{h}} = 13,88 \mu\text{g}/\text{mL}$ $\text{CE}_{50\ 48\text{h}} = 13,57 \mu\text{g}/\text{mL}$

Baseando-se em Meyer *et al.* (1982), podemos considerar tóxicas amostras que demonstram $CE_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$. Porém, em Amarante *et al.* (2011), foi estabelecida uma nova relação entre o grau de toxicidade e CE_{50} :

- baixa toxicidade: $CE_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$
- moderada toxicidade: $100 \mu\text{g/mL} < CE_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$
- alta toxicidade: $CE_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$

Portanto, os extratos brutos e as frações hexânicas de folhas e cascas são consideradas não tóxicas, frações clorofórmicas e remanescentes das folhas e cascas são consideradas amostras de baixa toxicidade, a fração acetato de etila folhas é considerada de moderada toxicidade e a fração acetato de etila cascas é considerada de alta toxicidade.

Além das causas sugeridas por Khatun *et al.* (2014), há possibilidade de heterosídeos saponínicos, possivelmente presentes entre as frações acetato de etila e remanescente, serem os responsáveis pela atividade tóxica observada. Há saponinas com atividade tóxica, porém, há chances de as saponinas interferirem na solubilidade de oxigênio do meio e prejudicar o desenvolvimento dos náuplios por anoxia.

5.6.1.2 ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA EM *Daphnia magna*

Os ensaios com *Daphnia magna* respeitaram os limites de sensibilidade, utilizando filhotes que apresentaram morte a 50% dos indivíduos entre 0,78 e 0,81 $\mu\text{g/mL}$, assegurando a confiabilidade do experimento. Foi verificado potencial tóxico aos filhotes de microcrustáceo *Daphnia magna*, com exceção aos expostos aos extratos brutos das folhas, fração hexânica das folhas, fração remanescente das folhas e fração remanescente das cascas. Os resultados do teste de toxicidade analisados pelo método Probit em *Daphnia magna* estão apresentados na Tabela 8.

Após exposição de 48 horas, verificou-se similaridade ao bioensaio realizado com *Artemia salina*, porém os organismos tem sensibilidades distintas, ou seja, as CE_{50} diferem entre organismos. *Daphnia magna* mostrou mais sensível aos extratos e frações de *Cestrum intermedium*, uma vez que CE_{50} foram menores e mais amostras mostram-se efetivas.

TABELA 8: TOXICIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES EM *Daphnia magna*

AMOSTRA	CE ₅₀ (µg/mL)		INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Extrato Bruto Folhas	> 1000	> 1000	-	-
Hexano Folhas	> 1000	> 1000	-	-
Clorofórmio Folhas	302,62	> 1000	265,76-344,59	-
Acetato de Etila Folhas	344,20	> 1000	326,51-362,84	-
Remanescente Folhas	> 1000	> 1000	-	-
Extrato Bruto Cascas	344,20	> 1000	326,51-362,84	-
Hexano Cascas	~31,62	> 1000	-	-
Clorofórmio Cascas	542,33	> 1000	470,31-625,37	-
Acetato de Etila Cascas	< 10	> 1000	-	-
Remanescente Cascas	> 1000	> 1000	-	-

*controle positivo Dicromato de Potássio: 0,78-0,81 µg/mL.

5.6.1.3 ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA EM *Aedes aegypti*

Embora Jawale *et al.* (2010) tenham observado potencial larvicida a *Aedes aegypti* com *Cestrum nocturnum*, este efeito não é evidenciado para a espécie *Cestrum intermedium*. Não houve letalidade expressiva nas primeiras 24 horas de exposição às concentrações testadas nas larvas. A única fração que apresentou toxicidade foi a hexânica de cascas, em 48 horas com atividade tóxica moderada (CE₅₀= 521,23 µg/mL), possivelmente pela presença de triterpenos com potencial tóxico (diferentemente de Jawale *et al.* (2010), em que a fração hexânica de *C. nocturnum* não apresentou toxicidade). Chandrashekhar *et al.* (2011) também determinaram alta atividade larvicida para extratos de *C. nocturnum*. Os resultados do teste de toxicidade analisados pelo método Probit em *Aedes aegypti* estão apresentados na Tabela 9.

TABELA 9: TOXICIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES EM *Aedes aegypti*

AMOSTRA	CE ₅₀ (µg/mL)		INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Extrato Bruto Folha	> 1000	> 1000	-	-
Hexano Folha	> 1000	> 1000	-	-
Clorofórmio Folha	> 1000	> 1000	-	-
Acetato de Etila Folha	> 1000	> 1000	-	-
Remanescente Folha	> 1000	> 1000	-	-
Extrato Bruto Casca	> 1000	> 1000	-	-
Hexano Casca	> 1000	521,23	-	225,67-1203,87
Clorofórmio Casca	> 1000	> 1000	-	-
Acetato de Etila Casca	> 1000	> 1000	-	-
Remanescente Cascas	> 1000	> 1000	-	-

*controle positivo Temefós: 30 µg/mL.

Apesar dos extratos e frações da espécie não provocarem atividade larvicida no período de 24 horas, ao fim de 48 horas foi observada letalidade das larvas na fração hexano das cascas. Desta forma, infere-se que o tempo de exposição das larvas à fração hexânica das cascas pode estar relacionado a esta taxa de mortalidade. Viera *et al.* (2012) demonstrou em seus estudos que o potencial larvicida da espécie *Indigofera suffruticosa* aumenta em função do tempo de exposição e que uma mortalidade de 100% das larvas é observada após 72 horas de exposição. Há possibilidade de que um maior tempo de exposição acarretaria em atividades larvicidas mais expressivas.

5.6.1.3.1 Avaliação da morfologia larval de *Aedes aegypti*

Alterações morfológicas internas e externas que inviabilizam a evolução da larva ao estágio de mosquito foram observadas ao fim de 48 horas de exposição aos extratos e frações das folhas e cascas de *C. intermedium*, definindo que há toxicidade com potencial letal às larvas. A seguir, sequência de fotos que evidencia as alterações morfológicas incompatíveis com a sobrevivência e evolução das larvas ao estágio de mosquito.

Na Figura 12, em relação às larvas expostas ao controle negativo, observa-se extrusão da membrana peritrófica nas larvas expostas ao extrato bruto das folhas e fração clorofórmio, nas quais também foi observado alongamento da cérvice. Nas larvas expostas à fração acetato de etila, observou-se compressão da cérvice e alongamento entre o tórax e abdômen. Nas larvas expostas às frações hexânica e remanescente das folhas não foram observadas alterações morfológicas que trouxessem risco ao desenvolvimento das larvas. O alongamento da cérvice foi descrito por Phophiro (2008) como uma alteração em larvas de *Aedes aegypti*, causada por intoxicação ao óleo de *Carapa guianensis* (andiroba) e *Copaifera* sp. (copaíba) após 24 horas de exposição.

Na Figura 13, larvas expostas à fração clorofórmio das cascas apresentam extrusão da membrana peritrófica e aspecto vermiforme. Nas larvas expostas à fração remanescente das cascas nota-se uma nítida diminuição na gordura que recobre os segmentos e reentrâncias nos

segmentos que dão aspecto de ruptura da camada de gordura. O extrato bruto e frações hexano e acetato de etila das cascas não ocasionaram alterações morfológicas visíveis. Alguns destes sintomas foram observados pelo uso do inseticida novarulon, que causa danos na cutícula e provoca alterações na camada de gordura, prejudicando o desenvolvimento e locomoção das larvas (FARNESI *et al.*, 2012).

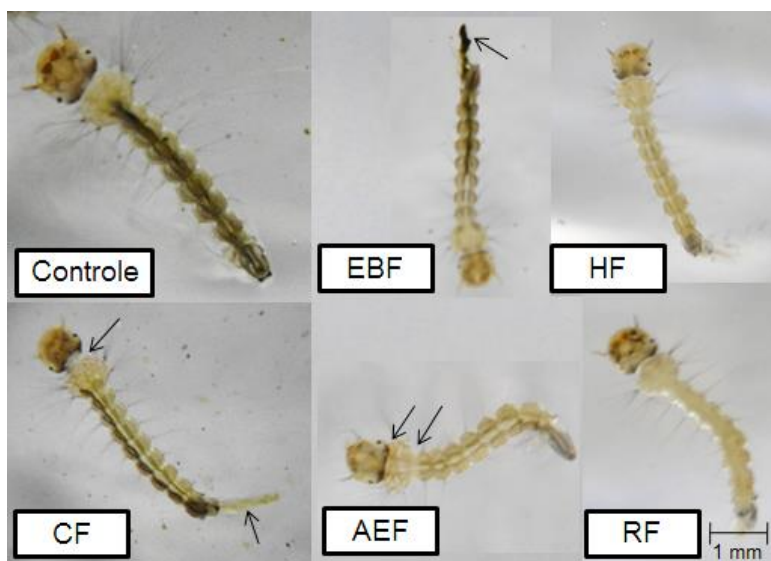


FIGURA 12: ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EXTERNAS OBSERVADAS EM LARVAS EXPOSTAS AO EXTRATO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *C. intermedium*



FIGURA 13: ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EXTERNAS OBSERVADAS EM LARVAS EXPOSTAS AO EXTRATO E FRAÇÕES DAS CASCAS DE *C. intermedium*

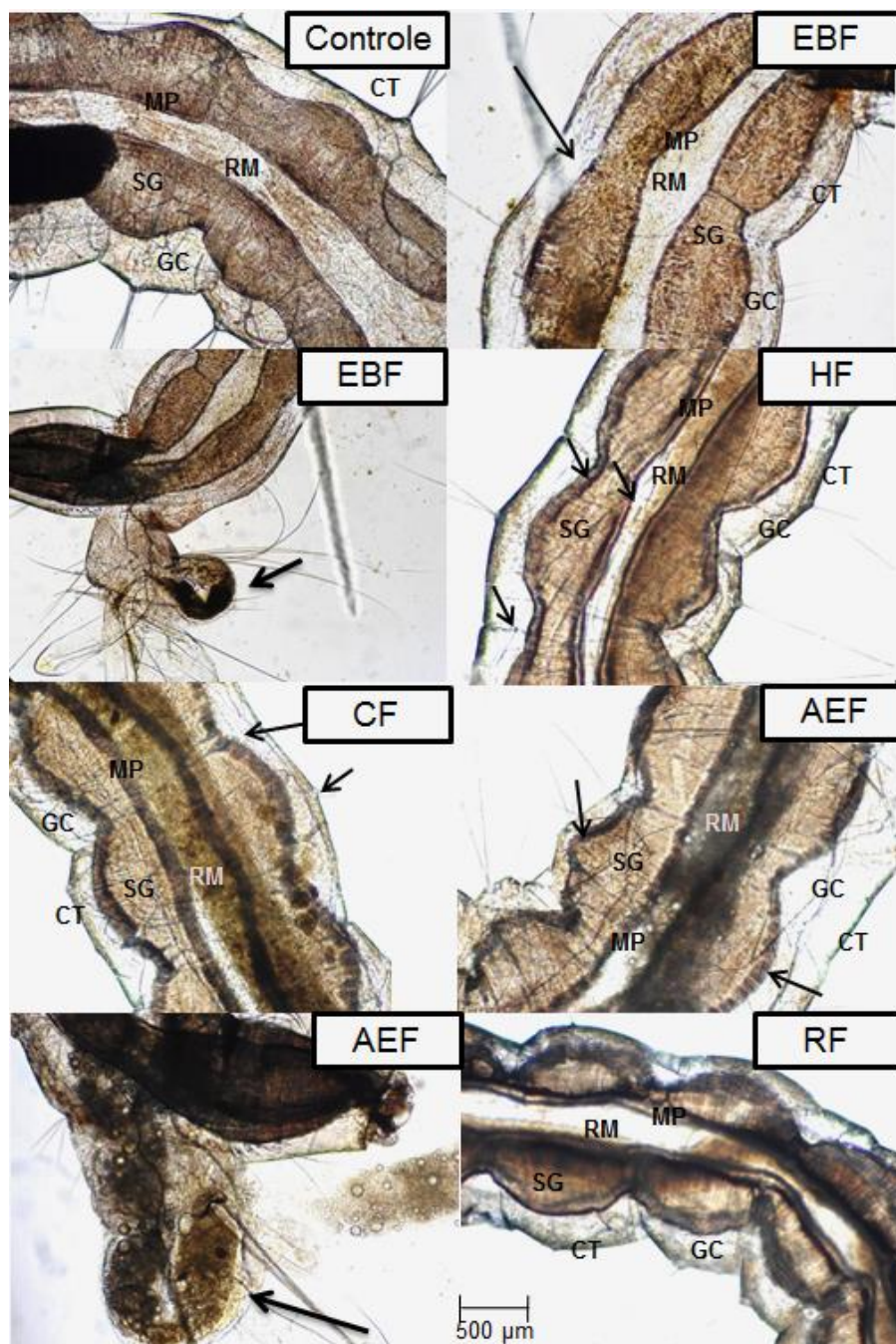
Na Figura 14, as alterações morfológicas internas observadas em relação às larvas expostas ao controle são diversas. As larvas expostas ao extrato bruto das folhas apresentam segmentos mais alongados, gordura corporal com pontos mais claros, indicando rompimento da camada de gordura e membrana peritrófica evidenciada após extrusão do alimento. As larvas expostas à fração hexânica das folhas apresentaram dobras entre a cutícula e camada de gordura, o epitélio que recobre o segmento apresenta-se mais espesso tanto na região anterior quanto na posterior, há espessamento na membrana peritrófica e a gordura corporal está menos espessa em relação ao controle.

As larvas expostas à fração clorofórmio das folhas (Figura 14) mostraram espessamento das células que recobrem o epitélio, grânulos e bordas nas células do epitélio, espessamento de cutícula em alguns pontos e gordura corporal menos espessa. A fração acetato de etila das folhas (Figura 14) ocasionou às larvas expostas aspecto irregular e escurecido do epitélio externo que recobre o segmento e extrusão da membrana peritrófica com presença de alimento. As larvas expostas à fração remanescente das folhas apresentaram segmentos com aspecto mais escuro, diminuição na camada de gordura corporal, espessamento do epitélio que recobre os segmentos e escurecimento na cutícula (Figura 14).

O escurecimento de larvas no 3º estágio também foi observado por Salvador (2002), que evidenciou em larvas de *Aedes aegypti* expostas ao temefós uma redução de cerca de 50% no comprimento dos segmentos abdominais e escurecimento causado pela sobreposição das cutículas sobre estes. Borges *et al.* (2004), utilizando o inibidor de crescimento diflubenzuron em larvas de *Aedes aegypti*, encontraram menor tamanho e aspecto alterado em razão do acúmulo de mudas incompletas.

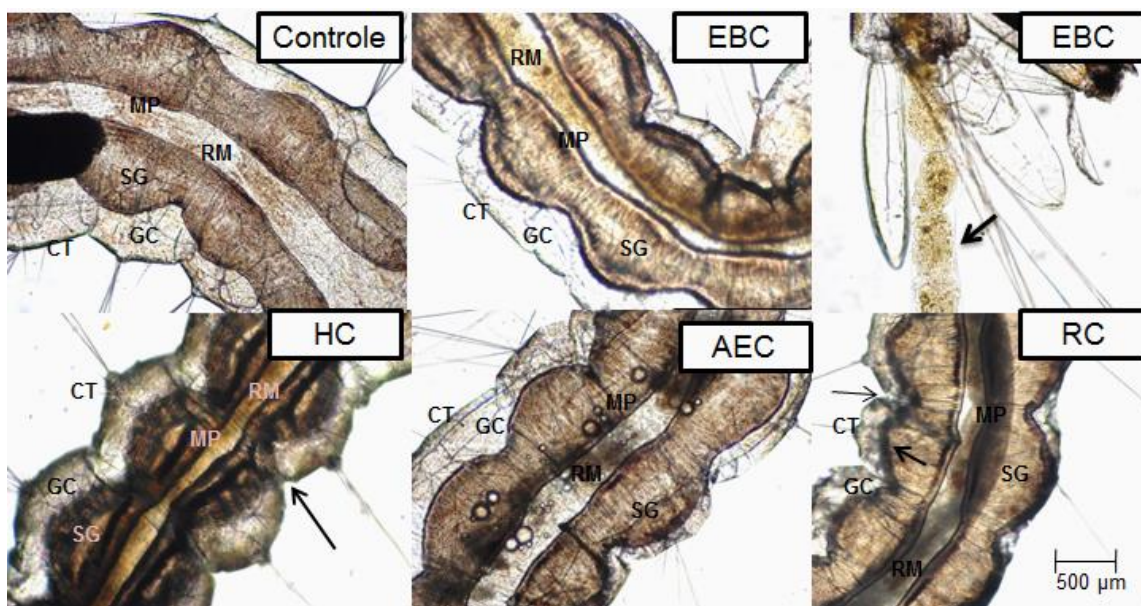
Na Figura 15, pode-se observar espessamento do epitélio e extrusão da membrana peritrófica nas larvas expostas ao extrato bruto das cascas. Nas larvas expostas à fração hexânica a cutícula adquiriu aspecto mais escuro e bordas indicando rompimento da estrutura cuticular, houve diminuição da camada de gordura corporal, espessamento das células do epitélio do segmento, escurecimento do epitélio. A fração acetato de etila causou às larvas o desenvolvimento de segmentos com aspectos menos turgidos, apresentando

dobras ao longo de todo o segmento e epitélio de desenvolvimento mais escuro. As larvas expostas à fração remanescente apresentaram bordas na cutícula, esta mais espessa e com aspecto enrugado, diminuição da gordura corporal e espessamento no epitélio que recobre o segmento.



Legenda: CT = cutícula; GC = gordura corporal; MP = membrana peritrófica; SG = segmento; RM = região do mesentério (intestino médio)

FIGURA 14: ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS INTERNAS OBSERVADAS EM LARVAS EXPOSTAS AO EXTRATO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *C. intermedium*



Legenda: CT = cutícula; GC = gordura corporal; MP = membrana peritrófica; SG = segmento; RM = região do mesentério (intestino médio)

FIGURA 15: ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS INTERNAS OBSERVADAS EM LARVAS EXPOSTAS AO EXTRATO E FRAÇÕES DAS CASCAS DE *C. intermedium*

Os resultados agregam informações ao perfil ecotoxicológico de *Cestrum intermedium*, considerando as alterações morfoanatômicas nas larvas. Os efeitos observados demonstram comprovar os resultados de *Artemia salina* e *Daphnia magna*, uma vez que foi verificada toxicidade a todos os organismos-teste empregados. Os extratos e frações da espécie apresentam importante potencial para controle do vetor da dengue, mesmo não ocasionando letalidade às larvas dentro do período de 48 horas de exposição, principalmente por inviabilizar o desenvolvimento da fase de mosquito, na qual ocorre transmissão da dengue. De acordo com Al-Reza *et al.* (2010) e Rashed (2013), o óleo essencial de *C. nocturnum* é utilizado como repelente para o mosquito da malária em regiões africanas.

Neste caso, os efeitos foram verificados em ambos os extratos brutos, ou seja, em caso de utilização direta das folhas (ou folhas e cascas concomitantemente), seriam observados os efeitos esperados (impedimento da evolução a mosquito), sem haver a necessidade de obter extratos específicos (análogos às frações). A informação do teor de sólidos e rendimentos dos extratos promove a possibilidade de determinar aproximadamente quanto do

material vegetal seco de *C. intermedium* é capaz de provocar estas relevantes alterações nas larvas.

Portanto, podemos inferir que se o material de escolha para utilização fosse folhas secas de *C. intermedium*, seria necessário o suficiente para suprir 1 g de extrato bruto/ L (1000 µg/mL). A utilização de folhas frescas dificulta a relação com os extratos, principalmente pelo alto teor de umidade, devendo-se então utilizar folhas secas para melhor padronização.

O rendimento do extrato bruto das folhas é de cerca de 14,86%, ou seja, a cada 100 g de folhas secas pode-se obter 14,86 g de extrato bruto seco. Para cada litro de água parada passível de proliferar larvas de *Aedes aegypti*, faz-se necessário 1 g de extrato bruto seco, ou seja, 6,73 g de folhas secas de *Cestrum intermedium* para inviabilizar a proliferação de mosquitos. Há ressalvas nesta afirmação, uma vez que o extrato bruto foi obtido com álcool etílico 95° GL e não com água impura. Possivelmente o poder extrator da água parada na qual as larvas desenvolvem-se é diferente do álcool utilizado, portanto a quantidade de folhas provavelmente seria maior.

A confirmação será verificada assim que novos lotes de ovos forem cedidos pela Fiocruz, utilizando extrato aquoso de rendimento determinado obtido com água mineral. Este procedimento traria informação mais precisa em relação ao uso informal (uso direto das folhas) com objetivo de controlar o desenvolvimento do vetor da dengue.

5.6.1.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

A hemólise consiste na lise dos eritrócitos, ocasionando a liberação de hemoglobina no plasma, situação esta que pode gerar danos aos rins (nefrotoxicidade) e ao coração (efeito vasomotor). Processos hemolíticos liberam íons potássio no meio extracelular (sendo que a detecção destes no plasma serve como marcador bioquímico de hemólise) e um rápido aumento de K^+ pode levar à parada cardíaca e morte (CARVALHO *et al*, 2007). Assim sendo, torna-se importante verificar o potencial de desenvolvimento de processos hemolíticos.

Foi observada atividade hemolítica ocasionada pelos extratos e frações de *C. intermedium* em graus variados, sem evidenciar relação dose-dependência, uma vez que não foi verificada relação diretamente ou inversamente proporcional entre aumento de concentrações e intensidade de hemólise. Proporcionalmente, considerando que a hemólise total (provocada pela água destilada) seja 100%, pode-se inferir que a hemólise basal (aquela ocorrida naturalmente em solução tampão) foi de cerca de 7,6%. Tendo este raciocínio como base, há amostras que ocasionaram hemólise superior à basal (ou seja apresentam hemólise significativa) a partir de 10,86% até 95,27%. No Gráfico 1 estão dispostas as atividades hemolíticas (%) das amostras que apresentaram atividades hemolíticas significativas (maiores que o controle negativo) e os controles positivo (100%) e negativo (basal). Na Tabela 10 seguem os resultados encontrados pelo teste de Tukey.

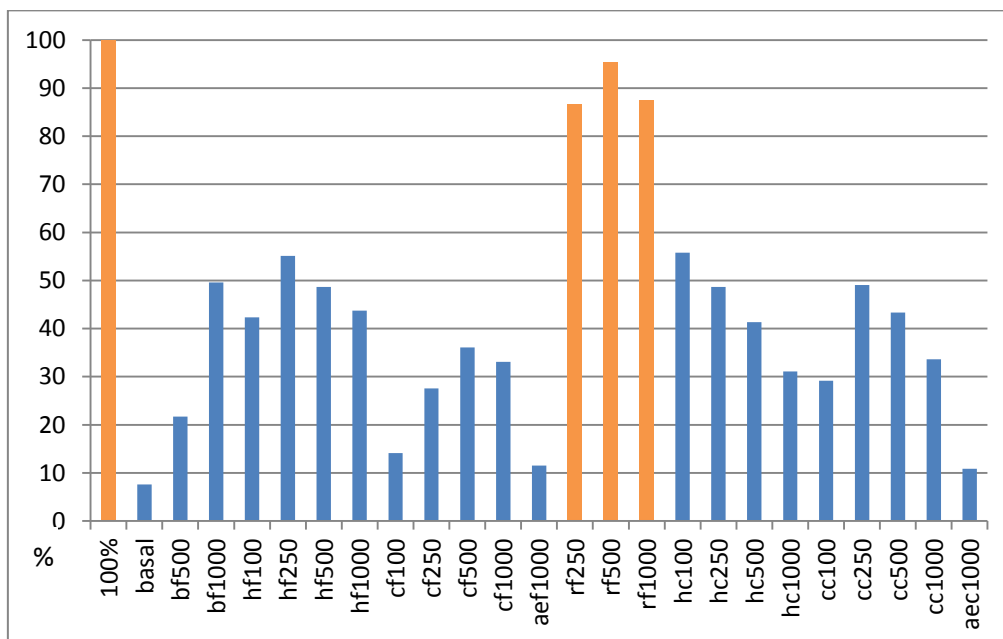


GRÁFICO 1: CONTROLES E AMOSTRAS DE *C. intermedium* COM ATIVIDADE HEMOLÍTICA SIGNIFICATIVA

TABELA 10: POTENCIAL HEMOLÍTICO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS E CASCAS DE *C. intermedium*

Amostra (µg/mL)	Hemólise (%)	Classificação do Teste de Tukey		
EBC 100-1000	0,00	a1		
AEC 100-500	0,00	a1		
RC 100-500	0,03	a1		
EBF 100-250	0,00	a1		
AEF 100	0,00	a1		
AEF 250	0,03	a1		
AEF 500	0,03	a1		
RF 100	1,08	a1	a2	
RC 1000	3,14	a1	a2	
AEC 1000	10,86	a1	a2	a3
AEF 1000	11,51		a2	a3
CF 100	14,15		a3	
EBF 500	21,69		a3	a4
CF 250	27,55		a4	a5
CC 100	29,13		a4	a5
HC 1000	31,07		a4	a5 a6
CF 1000	33,08			a5 a6 a7
CC 1000	33,64			a5 a6 a7
CF 500	36,07			a5 a6 a7
HC 500	41,33			a6 a7 a8
HF 100	42,31			a7 a8
CC 500	43,34			a7 a8
HF 1000	43,77			a7 a8
HF 500	48,64			a8 a9
HC 250	48,69			a8 a9
CC 250	49,04			a8 a9
EBF 1000	49,60			a8 a9
HF 250	55,10			a9
HC 100	55,76			a9
RF 250	86,60			a10
RF 1000	87,33			a10
RF 500	95,27			a10 a11
Água	100,00			a11

*amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente

As maiores capacidades de hemólise foram na fração remanescente das folhas (86,60%, 87,33% e 95,27%, em laranja no Gráfico 1), muito similares ao controle positivo (onde observa-se 100% de hemólise, também em laranja no gráfico). Em sequência, as hexânicas (55,76% para as folhas e 55,10% para as cascas). As frações hexânicas, devido à baixa polaridade, podem interagir com a membrana lipídica dos eritrócitos e ocasionar hemólise. Cuartas e Castaño (2008) relacionam a atividade hemolítica à presença de saponinas nos extratos de *C. nocturnum*.

5.6.2 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS *IN VITRO*

5.6.2.1 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO

5.6.2.1.1 Método da difusão em ágar

Após a exposição ao longo de 24 horas (bactérias) e 48 horas (levedura) nas condições ideais, foram comparados os halos produzidos pelos controles às respostas promovidas pelos extratos e frações de *Cestrum intermedium*. Não foram observados halos provocados pelos extratos e frações, apenas pelos controles, demonstrando não haver sensibilidade das cepas às amostras-teste neste método.

Pode-se sugerir que, devido ao caráter lipofílico ou elevada massa molecular de substâncias de diversas frações, a difusão das amostras no ágar pode ter sido prejudicada, resultando num possível falso-negativo promovido pela não-difusão os princípios de potencial atividade.

5.6.2.1.2 Microdiluição em caldo

Após a exposição ao longo de 24 horas (bactérias) e 48 horas (levedura) nas condições ideais, foi avaliado o desenvolvimento microbiano das cepas inoculadas em extratos e frações de *Cestrum intermedium* pela adição da solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) e re-incubação por uma hora. O desenvolvimento de coloração rósea-púrpura indica crescimento microbiano, inferindo incapacidade da substância em inibir o desenvolvimento das cepas. Houve verificação de potencial antimicrobiano, diferentemente do método avaliado anteriormente, possivelmente por haver contato direto dos extratos e frações com as cepas, eliminando a necessidade de difusão para gerar efeito.

O crescimento microbiano pode ser evidenciado ao longo das diluições, ou seja, pode-se verificar inibição em concentrações superiores, que se dissipa ao longo da diminuição de concentração de amostra no meio. As concentrações dispostas na placa iniciam em 1000 µg e seguem até 7,8 µg, reduzindo à metade a cada poço. Foi observado crescimento de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis* em todos os extratos e frações de *C. intermedium*, demonstrando não acarretarem inibição destas cepas nem mesmo na maior concentração testada (1000 µg/mL). Porém, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *C. albicans* foram inibidas por diferentes frações e extratos.

A cepa mais sensível aos extratos e frações de *C. intermedium* foi *S. epidermidis*, sendo que o extrato bruto e fração clorofórmica das cascas ocasionaram inibição em 1000 µg/mL, extrato bruto e clorofórmica das folhas e hexânica das cascas obtiveram concentração inibitória mínima de 500 µg/mL e a fração hexânica das folhas inibiu o crescimento desta cepa até 250 µg/mL (o resultado mais promissor de todo o teste).

S. aureus foi a segunda cepa mais inibida pelos extratos e frações, sendo que o extrato bruto das folhas, clorofórmica das folha e cascas e acetato de etila das folhas ocasionaram inibição em 1000 µg/mL e as frações hexânicas das folhas e cascas tiveram concentração inibitória mínima de 500 µg/mL.

A cepa menos inibida dentre as cepas que mostraram-se sensíveis aos extratos e frações de *C. intermedium* foi *C. albicans*, apresentando sensibilidade à fração hexânica e acetato de etila das folhas na concentração de 1000 µg/mL e à fração hexano das cascas em 500 µg/mL. Em Bhattacharjee *et al.* (2005), o óleo essencial de *C. diurnum* mostrou forte atividade antibacteriana contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Rhased (2013) reporta atividade bactericida de *C. nocturnum*. Khan *et al.* (2011) demonstraram atividade antimicrobiana de *C. nocturnum* contra *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Shigella flexenari*, *Candida* sp. e *Microsporium canis*. Prasad *et al.* (2013) demonstraram atividade antimicrobiana de *C.aurantiacum*, *C. nocturnum* e *C. diurnum* contra *S. typhi*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Trichoderma* sp e *Aspergillus* sp.

As frações hexano das folhas e cascas foram as únicas a promover atividade antimicrobiana nas três cepas que se demonstraram susceptíveis aos

extratos e frações de *C. intermedium*. Porém, Rios *et al.* (1988) consideram que extratos vegetais com CIM de 100 µg/mL tem bom potencial antimicrobiano e que substâncias puras com atividade superior a 100 µg/mL não apresentam aplicação clínica. Na Tabela 11, estão apresentadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos extratos e frações com atividade antimicrobiana, sendo que as concentrações superiores às expressas compartilham do poder inibitório.

TABELA 11: CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (µg/mL) PARA CEPAS SUCEPTÍVEIS AOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *C. intermedium*.

Amostra	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Extrato Bruto Folha	>1000	1000	500
Hexano Folha	1000	500	250
Clorofórmio Folha	>1000	1000	500
Acetato de Etila Folha	1000	1000	>1000
Remanescente Folha	>1000	>1000	>1000
Extrato Bruto Casca	>1000	>1000	1000
Hexano Casca	500	500	500
Clorofórmio Casca	>1000	1000	1000
Acetato de Etila Casca	>1000	>1000	>1000
Remanescente Casca	>1000	>1000	>1000

5.6.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE

5.6.3.1 Doseamento de polifenóis

A partir do método Folin-Ciocalteu foi determinado o teor de polifenóis (grupo de grande polaridade, muito reativo e susceptível à ação de enzimas composto por fenóis simples, cumarinas, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos e ligninas) dos extratos brutos e frações de *C. intermedium*. Sousa *et al.* (2007) afirmam que este ensaio permite a determinação do teor de substâncias redutoras presentes não necessariamente de natureza fenólica. Portanto, não obrigatoriamente atividades antioxidantes verificadas estariam relacionadas a elevado teor de fenólicos.

As frações hexânicas não foram avaliadas, pois devido à baixa polaridade turvam e precipitam compostos no meio reacional, prejudicando a

leitura em espectrofotômetro. Portanto, apenas os extratos brutos e frações clorofórmicas, em acetato de etila e remanescentes tiveram seus teores fenólicos determinados.

Os resultados são expressos em mg/g EAG (mg de fenólicos por g de equivalente ao ácido gálico. De acordo com Chew *et al.* (2011), a quantidade de fenóis totais de espécies vegetais podem ser divididas em quatro classes: alta (> 50 mg EAG/g), média-alta (entre 30 e 50 mg EAG/g), média baixa (entre 10 e 30 mg EAG/g) e baixa (inferior a 10 mg EAG/g). As frações clorofórmicas das folhas e cascas e acetato de etila das folhas e cascas são consideradas amostras com alto teor de polifenóis, extrato bruto e remanescentes das folhas e cascas são consideradas amostras de médio-alto teor de polifenóis. O Gráfico 2 mostra a curva de calibração do ácido gálico utilizada para interpolar as absorbâncias das amostras e a Tabela 12 evidencia as relações em mg/ g EAG das amostras.

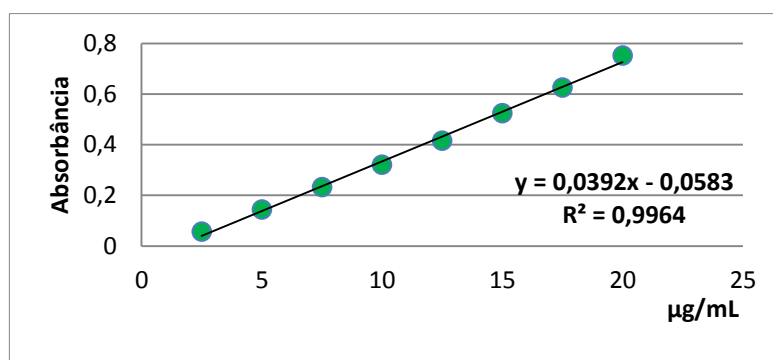


GRAFICO 2: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO

TABELA 12: TEOR DE FENÓLICOS EM RELAÇÃO AO ÁCIDO GÁLICO

AMOSTRA	mg/g EAG
EBF	39,00
CF	59,83
AEF	56,31
RF	34,64
EBC	46,86
CC	126,69
AEC	66,74
RC	36,02

5.6.3.2 Ensaio da Redução do Complexo Fosfomolibdênio

As atividades antioxidantes relativas (AAR%) dos extratos brutos e frações foram determinadas em relação aos controles positivos vitamina C e rutina, que apresentam cinéticas de mecanismo antioxidante distintas. Na Tabela 13 e 14 seguem os resultados encontrados pelo teste de Tukey em relação à vitamina C e rutina, respectivamente.

As amostras demonstraram atividade antioxidante inferior a 40% em relação à vitamina C, porém em relação à rutina as amostras apresentam maior poder antioxidante, como esperado (devido a rutina, em relação à vitamina C, ter uma atividade antioxidante relativa de 44,98%). Além disso, a rutina é um flavonóide, o que embasa a atividade similar, pois estruturalmente se aproxima mais das amostras testadas do que a vitamina C (ácido ascórbico). O Gráfico 3 evidencia os potenciais redutores das amostras e rutina em relação à vitamina C.

TABELA 13: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES EM RELAÇÃO À VITAMINA C.

Amostra	AAR% Vit. C	Classificação do Teste de Tukey
RF	7,05	a1
HF	9,05	a1 a2
AEF	10,23	a1 a2 a3
AEC	11,33	a1 a2 a3 a4
RC	13,77	a2 a3 a4
EBF	15,63	a3 a4
EBC	17,04	a4
CF	27,19	a5
CC	37,39	a6
HC	37,86	a6
Rutina	44,98	a7
Vit. C	100,00	a8

*amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente

O alto teor de fenólicos encontrados na fração clorofórmio das folhas é evidenciado com o poder redutor que apresenta (60,45% em relação à atividade da rutina). A fração remanescente das folhas apresentou o menor teor de fenólicos dentre as amostras analisadas, embasando o baixo potencial redutor encontrado (15,92% em relação à atividade da rutina). A fração

clorofórmica das cascas, que apresentou o maior teor de fenólicos, mostrou-se uma das amostras de melhor atividade redutora (82,33% em relação à atividade da rutina).

TABELA 14: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES EM RELAÇÃO À RUTINA

Amostra	AAR% Rutina	Classificação do Teste de Tukey
RF	15,92	a1
HF	20,12	a1 a2
AEF	23,01	a1 a2 a3
AEC	23,88	a1 a2 a3
RC	30,62	a2 a3 a4
EBF	34,73	a3 a4
EBC	38,16	a4
CF	60,45	a5
CC	82,33	a6
HC	83,11	a6
Rutina	100,00	a7

*amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente

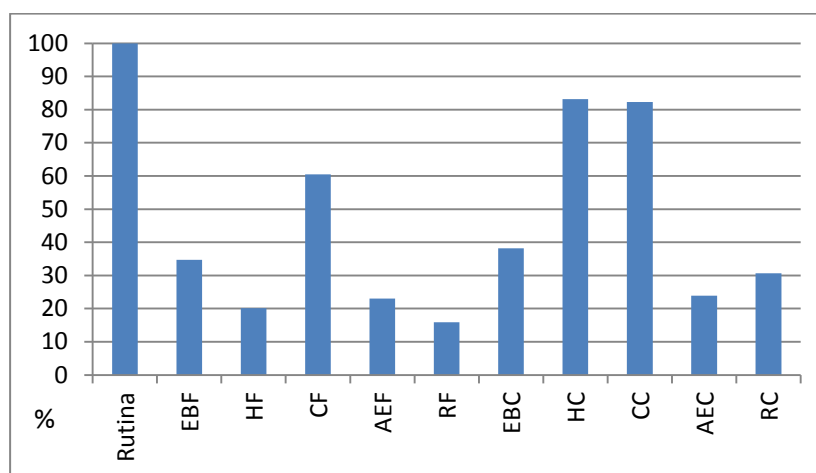


GRÁFICO 3: CAPACIDADE DE REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DOS CONTROLES E AMOSTRAS

5.6.3.3 Avaliação da Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina)

A avaliação do potencial antioxidante pela capacidade de sequestro de radicais DPPH é determinada em amostras que demonstraram ter capacidade

de reduzir 50% do DPPH presente, determinando por regressão linear. Amostras de concentração inibitória (IC_{50}) maior de 500 $\mu\text{g/mL}$ foram consideradas inativas, não apresentando potencial sequestrador de radicais livres. Fora deste grupo, foram determinadas apenas três amostras: as frações acetato de etila das folhas e cascas e a fração clorofórmica das cascas. A Tabela 15 seguem os resultados encontrados pelo teste de Tukey.

TABELA 15: IC_{50} DAS AMOSTRAS COM ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAIS LIVRES

Amostra	IC_{50}	Classificação do Teste de Tukey
Vitamina C	5,99	a1
Rutina	6,78	a1
AEF	65,98	a2
CC	186,99	a3
AEC	266,63	a4

A fração acetato de etila das folhas apresenta alto teor de fenólicos que não resultaram em atividade redutora marcante, porém evidenciam a razão da capacidade sequestradora de radicais livres. O ensaio de capacidade de sequestro de DPPH evidenciou a melhor atividade dentre as amostra ativas com um IC_{50} de 65,98 $\mu\text{g/mL}$, atividade cerca de 10 vezes menor que os controles vitamina C (5,99 $\mu\text{g/mL}$) e rutina (6,70 $\mu\text{g/mL}$). O Gráfico 4 mostra a curva de calibração utilizada para a determinação da IC_{50} da fração acetato de etila das folhas.

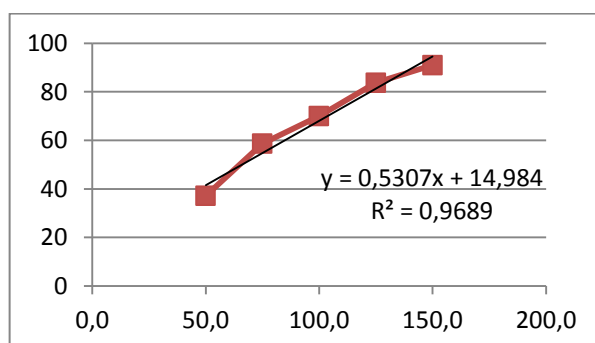


GRÁFICO 4: CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA IC_{50} DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS

A fração clorofórmio das cascas é amostra de maior teor de fenólicos, o que foi evidenciado na avaliação da capacidade redutora. Porém, não apresenta capacidade sequestradora tão marcante quando comparada à fração acetato de etila das folhas (de teor de fenólicos cerca de 50% menor). A IC_{50} da fração clorofórmica das cascas foi de 186,98 $\mu\text{g/mL}$, em torno de 30 vezes menos ativa que os controles vitamina C e rutina. O Gráfico 5 mostra a curva de calibração utilizada para a determinação da IC_{50} da fração clorofórmio das cascas.

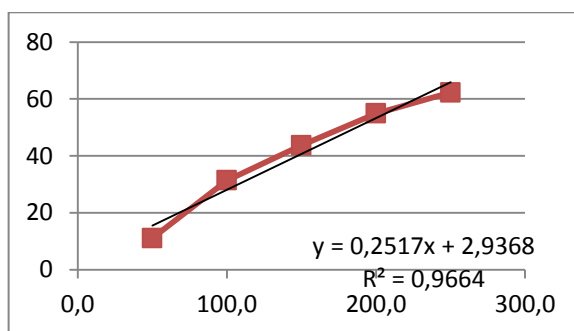


GRÁFICO 5: CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA IC_{50} DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DAS CASCAS

A fração acetato de etila das cascas apresentou alto teor de fenólicos sem demonstrar atividade redutora ou atividade sequestradora satisfatória, com IC_{50} de 226,70 $\mu\text{g/mL}$, quase 40 vezes menos ativa que os controles vitamina C e rutina. O Gráfico 6 mostra a curva de calibração utilizada para a determinação da IC_{50} da fração acetato de etila das cascas.

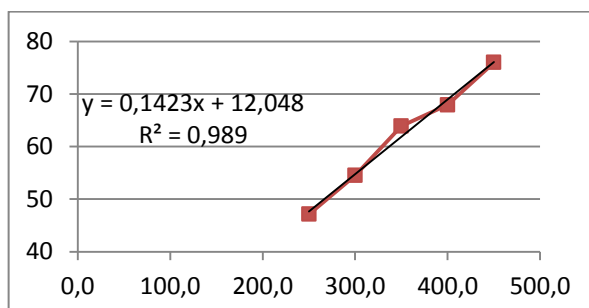


GRÁFICO 6: CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA IC_{50} DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS CASCAS

5.6.3.4 Ensaio de Atividade Antioxidante pelo Método do Ácido Tiobarbiturico-Espécies Reativas (TBARS)

O método de TBARS é um importante meio de verificação de processo oxidativo, detectando a presença de malondialdeído através de sua reação com o ácido tiobarbitúrico, que resulta em composto róseo identificado espectrofotometricamente, neste caso formado pela oxidação lipídica da gema do ovo. Porém, trata-se de um teste que conta com diversos interferentes como a não-especificidade do ácido tiobarbitúrico, podendo este reagir com outras substâncias presentes na amostra (como proteínas e carboidratos), além da formação *in vitro* de aldeídos, devido às condições experimentais (meio ácido e temperatura elevada) (ANTUNES *et al.*, 2008).

Em comparação ao controle butil-hidroxi-tolueno (BHT), os extratos e frações de *C. intermedium* apresentam atividade muito similar ou superior, resultando em índice antioxidante (IA%) 36,48% e 63,96%. Apesar da diferença entre a menor (36,48% fração hexânica das folhas) e maior atividade (fração hexânica das folhas 63,96%), o teste de Tukey não diferenciou nenhuma das amostras em grupos distintos (Tabela 16). Mesmo superior, o $F_{\text{calculado}}$ era muito próximo ao F_{tabelado} , o que trouxe à consideração verificar os dados com ANOVA com $\alpha=0,01$, nesta ocasião, não indicando diferença significativa entre as amostras, uma vez que o $F_{\text{calculado}}$ era menor que o F_{tabelado} .

TABELA 16: ÍNDICE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E BHT

Amostra	IA%	Classificação do Teste de Tukey
HC	36,48	a1
RF	36,98	a1
CF	37,23	a1
CC	41,54	a1
BHT	41,58	a1
EBC	45,31	a1
AEF	49,88	a1
AEC	52,36	a1
EBF	52,60	a1
RC	62,35	a1
HF	63,96	a1

*amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente

A grande variabilidade ocasionada pelos interferentes do ensaio, a forma que a gema de ovo oxida e o próprio teor lipídico da gema podem ter ocasionado que atividades antioxidantes tão distintas tenham sido classificadas como estatisticamente semelhantes, uma vez que naturalmente há grande variação entre as replicatas de cada amostra, inclusive do controle.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho contribuiu com o compilado de informações em relação à espécie *Cestrum intermedium*. Pode-se caracterizá-lo como inédito, uma vez que não haviam sido encontrados estudos em relação ao perfil fitoquímico ou atividades biológicas, além da toxicidade ao gado bovino em estudos veterinários sem determinação das substâncias responsáveis pelos efeitos observados.

Foi delineado um perfil físico-químico da espécie vegetal, o que pode vir a ser utilizado como parâmetro para controle de qualidade para futuras comparações. O ensaio sistemático fitoquímico evidenciou os grupos metabólicos presentes na espécie, o que foi confirmado por revisão de literatura do gênero e família, identificando diversos marcadores taxonômicos. Foram encontrados alcaloides, flavonoides, cumarinas, esteroides, triterpenos e saponinas. Os alcaloides podem ser encontrados nas frações clorofórmicas e remanescentes. Os heterosídeos saponínicos, como foram determinados a partir do extrato aquoso, estariam presentes nas frações mais polares, como acetato de etila e remanescente.

Foi possível delinear quais classes de metabólitos podem ser as responsáveis pelo quadro toxicológico em bovinos que ingerem folhas de *Cestrum intermedium*: a ação tóxica pode ocorrer pela presença de alcaloides e/ou heterosídeos saponínicos, ambas classes com exemplares conhecidamente tóxicos e presentes na família e no gênero, respectivamente. Os ensaios em microcrustáceos demonstraram coerência com esta suposição, sendo estes sensíveis às frações clorofórmicas e em acetato de etila, assim como as larvas de *Aedes aegypti* que desenvolveram alterações em contato com estas frações. O potencial hemolítico foi mais expressivo na fração remanescente, também apoiando a suposição em relação ao potencial tóxico.

Os bioensaios demonstraram potencial tóxico aos microcrustáceos e às larvas de *Aedes aegypti*, propriedade esta interessante em relação à aplicabilidade ambiental como inseticida, além de útil em relação à saúde pública. O grande potencial de atividade hemolítica *in vitro* de algumas frações confirma a toxicidade verificada nos ensaios *in vivo*. Não foi verificado potencial

antimicrobiano de uso clínico, devido a concentração inibitória mínima dos extratos e frações nas cepas sensíveis testadas ser elevada. O potencial antioxidante observado é moderado, utilizando como comparação a vitamina C, rutina e butil-hidroxi-tolueno.

Foi isolada e identificada uma substância denominada palmitato de lupeol, conhecida pela propriedade anti-inflamatória. As demais substâncias avaliadas ainda estão em processo de identificação com auxílio de técnicas de ressonância magnética nuclear, espectroscopia na região do infravermelho e espectroscopia de massas. Além destas, há possibilidade de isolar e identificar diversas outras substâncias das colunas cromatográficas realizadas, inclusive realizando novas colunas com as frações ainda não trabalhadas. Eventualmente, pretende-se empregar estes isolados nos ensaios biológicos *in vivo* e *in vitro* já realizados e em outros.

É essencial prosseguir com os estudos utilizando *Cestrum intermedium* investigando aplicações, propriedades e seus metabólitos secundários. Há promissora atividade tóxica que deve ser avaliada em relação a células tumorais, a organismos-alvo além de *Aedes aegypti* (como pragas agrícolas, por exemplo), ao potencial alelopático, entre outras utilizações de interesse, contribuindo com estudos inéditos adicionais.

REFERÊNCIAS

AFONSO, E. e SANTOS, H. L. dos. Intoxicação experimental por coreana Mart. Ex. Sendt. (Solanaceae) em Bovinos. **Pesq. Agropec. Bras.** v.30, n.6, p. 875-883, jun. 1995.

AL-REZA, S. M. *et al.* Inhibition of plant pathogens *in vitro* and *in vivo* with essencial oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. **Pesticide Biochemistry and Physiology.** 96 (2010) 86-92.

AMARANTE, Cristine Bastos *et al.* Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardialinifera*). **Acta Amazonica**, vol. 41(3): 431 – 434, 2011.

ANTUNES, M. V. *et al.* Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** v. 44. n. 2. 2008.

ARCTOS, **Taxonomy results.** Disponível em: <<http://arctos.database.museum/TaxonomyResults.cfm>>. Acesso em: 15/01/2015.

BANDARRA, P. M. *et al.* Intoxicação natural por *Cestrum intermedium* em bovinos no Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural.** Vol 39, nº 1. Santa Maria, 2009.

BANERJEE, A. *et al.* Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chem Biol Interact.** v. 174, n.2, p. 134-9. 2008.

BAQAI, F. T. **Phytochemical studies of *Cestrum* species (family Solanaceae).** Tese (288f). Doutorado em Filosofia. International Centre for Chemical Sciences, University of Karachi, 1999.

BAUER, A. W. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology.** v.45. p.493-496, 1966.

BHATTACHARJEE, I. *et al.* Antimicrobial activity of the essential oil of *Cestrum dirunum* (L.) (Solanales: Solanaceae). **African Journal of Biotechnology**. Vol. 4 (4), p. 371-374. 2005.

BORGES, K. N. *et al.* Contribuição ao estudo da flora medicinal da microrregião de Feira de Santana (BA) I. **Sitientibus**, 3(5): 101-116-jan.-jun./1986. Feira de Santa, 1986.

BORGES R. A. *et al.* Mortalidade e alterações morfológicas provocadas pela ação inibidora do diflubenzuron na ecdise de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Rev Patol Trop** 33: 91-104, 2004.

BRASIL, **FB 5 – Farmacopeia Brasileira**. 5 ed. v. 1. Brasília, 2010.

BRASIL, 2012. Práticas integrativas e complementares – Plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica. **Ministério da Saúde**. Brasília, 2012.

BRASIL, 2014. Biodiversidade Brasileira. **Ministério do Meio Ambiente**. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira> >. Acesso em: 23/05/2014.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química nova**. Vol 33, nº 1. 2010.

CARVALHO *et al.* Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. V.29, n. 2. 149-152, 2007.

CAYMAN CHEMICAL, **TBARS KIT BOOKLET**. Disponível em: < <https://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/10009055> >. Acesso: 20/03/2014.

CHAKRABORTY, A. K e RANGARI, V. D. Semisynthetic modification and immunomodulatory activity studies of 19 α -H lupeol esters. **Pelagia research Library – Der Pharmacia Sinica**. 2 (2): 198-211. 2011.

CHANDRASHEKHAR, D P. *et al.* Bioefficacy of *Plumbago zeylanica* (Plumbaginaceae) and *Cestrum nocturnum* (Solanaceae) plant extracts against *Aedes aegypti* (diptera: Culicidae) and nontarget fish *Poecilia reticulata*. **Parasitol. Res.** 108:1253-1263. 2011.

CHEW, Y. L. *et al.* Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 11:12. 2011.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**; approved standard—ninth edition. M07-A9. Vol. 32 n. 2. 2012.

COSTA, C.R. *et al.* A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**. vol. 31, n. 7. p. 1820-1830. 2008.

COSTA-NETO, E. M. Zoopharmacognosy, the self-medication behavior of animals. **Interfaces Científicas – Saúde e Ambiente**. Vol. 33, nº 1. p.61-72. Aracaju, 2012.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: University Press, 1981.

CUARTAS, Yamileth e CASTAÑO, Elmer. **Descripción bontánica y fitoquímica del jazmín de noche (*Cestrum nocturnum* L.)**. Boletín científico do museo de história natural. Vol. 12. Manizales, 2008.

FARIAS, Marení R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Capítulo 12, Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. Editora UFSC e UFRGS, 6ª edição. Florianópolis e Porto Alegre, 2010.

FARNESI, L.C., *et al.* Physiological and morphological aspects of *Aedes aegypti* developing larvae: effects of the chitin synthesis inhibitor novaluron. **PLoS One**. 7, e30363. 2012.

FURLAN, F. H. *et al.* **Intoxicação por *Cestrum intermedium* (Solanaceae) em bovinos no Estado de Santa Catarina**. *Acta Scientiae Veterinariae*. 36(3): 281-284, 2008.

GALLEGO, D. C. ***Cestrum* de Colombia (Solanaceae): estudio taxonómico de las especies de tricomas simples**. 67f. (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Nacional da Colômbia. Bogotá, 2011.

GHENO-HEREDIA, Y. A. *et al.* Las plantas medicinales de la organización e parteras y médicos indígenas tradicionales de Ixhuatlancillo, Veracruz, México y su significancia cultural. **Polibotánica**, núm. 31, marzo, 2011, pp. 199-251. Distrito Federal, México.

GHISALBERTI, E. L. Detection and isolation of Bioactive Natural Products. In COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. **Bioactive natural products. Determination, Isolation, and structural determination.** CRC Press, NW, 2 ed., 2008, p. 13-15.

GRANDI, Telma Sueli Mesquita. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. **Acta Bot. Bras. v.3. n. 2 supl.1.** Feira de Santana, 1989.

GUARANTINI, T. **Fundamentos de Toxicologia.** Capítulo 2.1, Toxicologia Ambiental. Editora Atheneu, 3ª edição. São Paulo, 2004.

HARAGUCHI, M. **Plantas tóxicas de interesse na pecuária.** (Palestra). Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal. São Paulo, 2003.

HEMINGWAY J. e RANSON H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual Review Entomology.** 45: 371-391, 2000.

HENNEBERG, R. **Estudo do efeito antioxidante de polifenóis em eritrócitos de pacientes de hemoglobina S.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). 183 f. Universidade Federal do Paraná, 2013.

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A. e MORENO, P. R. H. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Capítulo 29, Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. Editora UFSC e UFRGS, 4ª edição. Florianópolis e Porto Alegre, 2002.

HODGES, L. D. *et al.* Antiprotease effect of anti-inflammatory lupeol esters. **Molecular and Cellular Biochemistry.** 252:97-101, 2003.

JAWALE, C. *et al.* Larvicidal activity of *Cestrum nocturnum* on *Aedes aegypti*. **Bangladesh J. Pharmacol.**, 5:39-40, 2010.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal.** Companhia Editora Nacional, 7ª edição. São Paulo, 1985.

KHAN, M. A. *et al.* Antimicrobial activities of the whole plant of *Cestrum nocturnum* against pathogenic microorganisms. **African Journal of Microbiology Research**. v.5(6). p. 612-616. 2011.

KHATUN, A. *et al.* Cytotoxic and thrombolytic activity of the aerial part of *Cestrum diurnum* L. (Solanaceae). **Pharmacology Online**. v. 1. p. 109-113. 2014.

KINGSBURY, J. M. **Toxic plants**. Capítulo 1, The problem of poisonous plants. Columbia University press. New York, 1979.

KISHIDA, E. *et al.* Re-avaluation of malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactive substances as índices of autoxidation bases on the oxygen consumption. **J. Agric. Food Chem.** 1993; 41:1-4.

KISSMANN, K. G. e GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. Editora BASF, 2ª edição. 2000.

KNIE, J. L. W. e LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Editora FATMA, 1ª edição. Florianópolis, 2004.

KOZERA, C. *et al.* **Composição florística da floresta ombrófila mista montana do parque municipal do Barigüi, Curitiba, PR**. Disponível em: <<http://www.florestaombrofilamista.com.br/sidol/downloads/16.pdf>>. Acesso em: 24/05/2013.

LORENZI, H. e MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2ª edição. São Paulo, 2008.

LORENZI, H. e SOUZA, H. M. de. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 4ª edição. São Paulo, 2008.

MACIEL, M. A. M. *et al.* Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. Vol. 25, Nº 3, p. 429-438, 2002.

MADUREIRA, M. do C. de *et al.* Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S. Tomé and Príncipe Islands. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 81. p. 23-29. 2002.

MENSOR, L., *et al.* Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoterapy Research** 2001;15:127-130.

MENTZ, L.A. *et al.* Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: notas sobre a obra de D'Ávila (1910). **Caderno de Farmácia**. v. 13, n. 1, p. 25-48, 1997.

MEYER, B.N., *et al.* Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**. 1982; 45:31-34.

MIGUEL, Obdulio. G. **Ensaio sistemático de análise em fitoquímica**. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2003

MORAIS, S. M. de M. *et al.* Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de Croton do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n.5, p. 907-910, 2006.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna Farmacêutica**, v.47, n.1, p.1-19, 1979.

PASTORE, G. *et al.* Usos populares de espécies de *Lauraceae*, *Rosaceae*, *Curcubitaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae*, *Chenopodiaceae*, *Malvaceae*, *Pedaliaceae*. **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**. Vol 6, 2002.

PERSOONE, G. e WELLS, P. G. **Artemia in aquatic toxicology: a review**. Universa Press, Volume 1. Belgium, 1987.

PETROBRAS. **Normas técnicas. Norma técnica N-2588**. Determinação da toxicidade aguda de agentes tóxicos em relação à *Artemia sp.* 1996.

PROPHIRO, J.S. **Susceptibilidade de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) a organofosforado e atividade inseticida de produtos de origem botânica**. Curitiba/PR, Universidade Federal do Paraná. Dissertação de Mestrado - Pós Graduação em Ciências Biológicas: 122, 2008.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

PRASAD, M.P. *et al.*, Phytochemical screening, anti-oxidant potential and antimicrobial activities in three species of cestrum plants. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**. 4(2): (B) 673-678. 2013.

PRIETO, P., *et al.* Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry** 1999; 269:337-341.

RASHED, K. N. Z. Investigation of antioxidante activity from *Cestrum nocturnum* L. stems and phytochemical content. **Reviews of Progress**. v.1. 2321-3485. 2013.

RIET-CORREA, F., MÉNDEZ, M. D. C. e SCHILD, A. L. **Intoxicações por plantas e micotoxícoses em animais domésticos**. Editorial agropecuária hemisferio sur S.R.L. Montevideo, 1993.

RIOS, J. L. *et al.* A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.23, p.127-149, 1988.

RODRIGUES, A. C. C. e GUEDES, M. L. S. Utilização de plantas medicinais no povoado de Sapucaia, Cruz das Almas – Bahia. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.8, n.2, p.1-7, 2006.

ROGINSKY, V.,LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food chemistry**. v. 92, n. 2, p. 235-254, 2005.

ROSSETTI, A.C.P.A e CORSI, M. Plantas tóxicas de interesse pecuário. **Projeto CAPIM – Pesquisa e Extensão ESALQ-USP**, 2009.

SALVADOR Z. L. **Avaliação morfohistológica de larvas de Aedes aegypti submetidas ao Temephos**. 2002. Dissertação (Mestrado) - Mestrado em Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2002.

SANTOS, Rosana Isabel dos. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Capítulo 16, Metabolismo básico e origem de metabólitos secundários. Editora UFSC e UFRGS, 6ª edição. Florianópolis e Porto Alegre, 2010.

SCHENKEL, E. P. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Capítulo 35, Plantas tóxicas. Editora UFSC e UFRGS, 4ª edição. Florianópolis e Porto Alegre, 2002.

SCHVATSMAN, S. **Fundamentos de Toxicologia.** Capítulo 2.3, Domissanitários e Plantas Ornamentais. Editora Atheneu, 3ª edição. São Paulo, 2004.

SINGLETON, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. **Methods Enzymol.** 29, 152–178. 1999.

SILVA, H.H.G. *et al.* Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil.(Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 37(5): 396-399, 2004.

SILVA, K. N. e AGRA, M. F. Estudo farmacobotânico comparativo entre *Nicandra physalodes* e *Physalis angulata* (Solanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia.** Vol 15, nº 4. 2005.

SIQUEIRA, João Máximo *et al.* Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *artemia salina* leach. **Química Nova**, 21(5), 1998.

STEHMANN, J.R.; MENTZ, L.A.; AGRA, M.F.; VIGNOLI-SILVA, M.; GIACOMIN, L.; RODRIGUES, I.M.C. *Solanaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2009. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14644>>. Acesso em: 15 Jan. 2015

SOARES, E. L. de C. *et al.* **O gênero *Cestrum* L. (Solanaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil.** 2007. Disponível em: <<http://www.anchietano.unisinos.br/publicacoes/botanica/botanica58/artigo10.pdf>>. Acesso em: 23/05/2013.

SOARES, E. L. de C. **Estudos taxonômicos em Solanaceae lenhosas no Rio Grande do Sul, Brasil.** 230f. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2006.

SOUSA, C. M. de M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova.** v. 30. n. 2. 2007.

SOUZA, Sérgio A. M. **Biotestes na avaliação da fitotoxicidade de extratos aquosos de plantas medicinais nativas do Rio Grande do Sul**. Monografia (Universidade Federal de Pelotas). Pelotas, 2005.

TAYLOR, Nadine Suzanne. **Novel approaches to toxicity testing in *Daphnia magna***. 222f. Tese (Doutorado em Biociências), Universidade de Birmingham. Reino Unido, 2010.

THE PLANT LIST. **Classificação taxonômica de *Cestrum intermedium***. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2713545>>. Acesso em: 18/01/2015.

TONKOPII, Valerii e IOFINA, Irina. **The usage of *Daphnia magna* as alternative bioobject in ecotoxicology**. AATEX 14, Special Issue, 565-567. Japão, 2007.

TROPICOS, Missouri Botanical Garden. **Classificação taxonômica de *Cestrum intermedium* Sendtn.** Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/29600541>>. Acesso em: 20/01/2015.

WHO. 1981a. **Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides**. Geneva.

WHO. 1981b. **Criteria and Meaning of Tests for Determining the Susceptibility or Resistance of Insects to Insecticides**. Geneva.

WOUTERS, A.T.B. *et al.* **Intoxicação espontânea por *Cestrum intermedium* em bovinos no Sudoeste do Estado do Paraná**. Pesq. Vet. Bras. 33(1):47-51, 2013.

VAZ, N. P. **Alcalóides Esteroidais dos Frutos Maduros de *Solanum caavurana* Vell.** 101f. Dissertação (Mestrado em Química) - Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

VEIGA JUNIOR, V. F. *et al.* **Plantas medicinais: cura segura?** **Química Nova** Vol. 28, nº 3, 519-528, 2005.

VENDRUSCOLO, G. V. **Diversidade e distribuição de Solanaceae em formações vegetais altomontanas no sul do Brasil**. 165f. Tese (Doutorado em Botânica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

VIEIRA, J. R. C. *et al.* Oviposition and Embryotoxicity of *Indigofera suffruticosa* on Early Development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, p. 1-5, 2012.

VIGNOLI-SILVA, M. **O Gênero *Cestrum* L. (Solanaceae) no Brasil extra-amazônico.** 323f. Tese (Doutorado em Botânica). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

XI-KUI, L. *et al.* Triterpene constituents from *Balanophora indica*. **Acta Botanica Yunnanica**. 20 (3): 369-373. 1998.

YIN, H. C *et al.* Phenolic compounds from *Cestrum aurantiacum*. **Asian Journal of Chemistry**. v.24 n.7. 2012.

ZAGATTO, Pedro. A. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações.** Capítulo 1: ecotoxicologia. Editora Rima, 2ª edição. São Carlos, 2008.