

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E FARMACOLÓGICA DE ESPÉCIES  
VEGETAIS DA AMAZÔNIA CONTRA A LEISHMANIA

Bolsista: Rosane dos Santos Bindá, CNPq

INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E FARMACOLÓGICA DE ESPÉCIES  
VEGETAIS DA AMAZÔNIA CONTRA A LEISHMANIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-E/0017/2011

INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E FARMACOLÓGICA DE ESPÉCIES  
VEGETAIS DA AMAZÔNIA CONTRA A LEISHMANIA

Bolsista: Rosane dos Santos Bindá, CNPq

Orientador: Prof. Jefferson Rocha de Andrade Silva

## Resumo

Sendo uma das doenças endêmicas dos trópicos, a *Leishmania* é alvo de pesquisas científicas nessas regiões. “A Organização Mundial de Saúde estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco, ela é considerada como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades.” Seu tratamento é promovido por drogas que promovem sérios efeitos colaterais no paciente. O presente projeto tem como objetivo geral a avaliação química e farmacológica de espécies vegetais, a princípio, do gênero *Mezilaurus* e *Endlicheria* amplamente distribuídas na região Amazônica, contra a *Leishmania*. *M. duckei* foi coletada em setembro de 2010 e a *E. bracteolata* em abril e maio de 2012 de duas localidades, Sítio São José e da Reserva Duque. Os extratos obtidos pelo processo de maceração foram avaliados por cromatografia. Os óleos essenciais foram obtidos a partir das folhas *M. duckei* e *E. bracteolata* por meio de hidrodestilação em sistema Clevenger. A análise dos óleos essenciais foi feita por CG-EM. A avaliação feita por cromatografia em camada delgada a partir da *M. duckei* indicou presença de terpenos e clorofila. Essas assertivas foram resultados das observações realizadas a partir da visualização da absorção das substâncias na radiação ultravioleta e revelação com vanilina sulfúrica. O perfil cromatográfico do óleo essencial de *M. duckei* indica uma alta concentração de sesquiterpenos.

O óleo essencial da *E. bracteolata* indicou a presença de terpenos, monoterpenos, hidrocarbonetos, sesquiterpenos, terpenóides e lamiaceais. O teste com *Artemia salina* deu indícios de moderada toxicidade. antioxidante não apresentou atividade.

**Palavras Chave:** *Endlicheria*; *leishmania*; *Mezilaurus*

## Abstract

As one of the endemic diseases of the tropics, Leishmania is a target of scientific research in these regions. "The World Health Organization estimates that 350 million people are at risk, it is considered one of the six most important infectious diseases, due to its high detection rate and ability to produce deformities. Your treatment is promoted by drugs which cause serious side effects in patients. This project aims to general chemical and pharmacological evaluation of plant species, the principle of gender *Mezilaurus* and *Endlicheria* widely distributed in the Amazon region, against Leishmania. *M. duckei* was collected in September 2010 and *E. bracteolata* in April and May 2012 at two locations, São José Site and Reserve Duque.

The extracts obtained by maceration process were assessed by chromatography. Essential oils have been obtained from the leaves *M. duckei* and *E. bracteolata* by hydrodistillation in a Clevenger system. The analysis of essential oils was performed by GC-MS. The assessment made by cromatografia thin layer starting from *M. duckei* indicated the presence of terpenes and chlorophyll. These statements were the result of observations made visualization of the starting substances in the absorption of ultraviolet radiation and revelation with vanillin sulfuric acid. The chromatographic profile of the essential oil of *M. duckei* indicates a high concentration of sesquiterpenes.

The essential oil of *E. bracteolata* indicated the presence of terpenes, monoterpene, hydrocarbons, sesquiterpenes, lamiaceals and terpenoids. The test with *Artemia salina* gave evidence of moderate toxicity. **Keywords:** *Endlicheria; leishmania; Mezilaurus*

## **Sumário**

Capa	1
Falsa folha de Rosto	2
Folha de rosto	3
Resumo do Relatório	4
Abstract	5
Sumário	7
1. Introdução	8/9
2. Revisão Bibliográfica	10
3. Métodos Utilizados	11/18
4. Resultados e Discursão	15/36
5. Conclusão	37/38
6. Referências Bibliográficas	39
Cronograma	40

## 1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das seis mais importantes doenças infecciosas existente, devido sua alta capacidade de produzir deformidades. Os medicamentos existentes para o tratamento são de alta toxicidade e o parasita tem apresentado resistência a esses medicamentos. A OMS estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano. Sendo uma das mais comuns doenças endêmicas nos trópicos, a *Leishmaniose* é alvo das pesquisas científicas nesses países, onde se é evidenciada a falta de recursos médicos capazes de suprir toda população.

Essa doença constitui um problema de saúde pública em 88 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia). (BRASIL, Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2ª Edição Atualizada, 2007).

A importância de melhor entendimento dessa doença consiste não somente no fato dela possuir ampla distribuição geográfica no país, mas também devido, a constatação de que formas essas lesões permanentes tendem a acarretar graves comprometimentos psicossociais no indivíduo afetado. Entendê-la globalmente é fundamental para adotar medidas que possam minimizar a sua incidência e, conseqüentemente o sofrimento daqueles que adquiriram essa doença. (Silva, N. S. , Viana, A. B. , Cordeiro, J. A. , Cavasini, C. E. Epidemiologia da LTA no estado do Acre, Amazônia brasileira, 2009).

Nesse contexto, o presente projeto tem como objetivo geral a avaliação química e farmacológica de espécies vegetais, a princípio, do gênero *M. duckei* e *E. bracteolata* amplamente distribuídas na região Amazônica, contra a *Leishmania*.

## 2. Revisão Bibliográfica

A utilização da natureza para fins terapêuticos é tão antiga quanto à civilização humana e, por muito tempo as plantas e foram fundamentais para a área da saúde. Historicamente, as plantas medicinais são importantes como fitoterápicos e também na descoberta de novos fármacos. (BRASIL, Ministério da Saúde. Caderno de Atenção Básica, Práticas integrativas e complementares, Plantas Medicinais e Fitoterápicos na Atenção Básica, 2012)

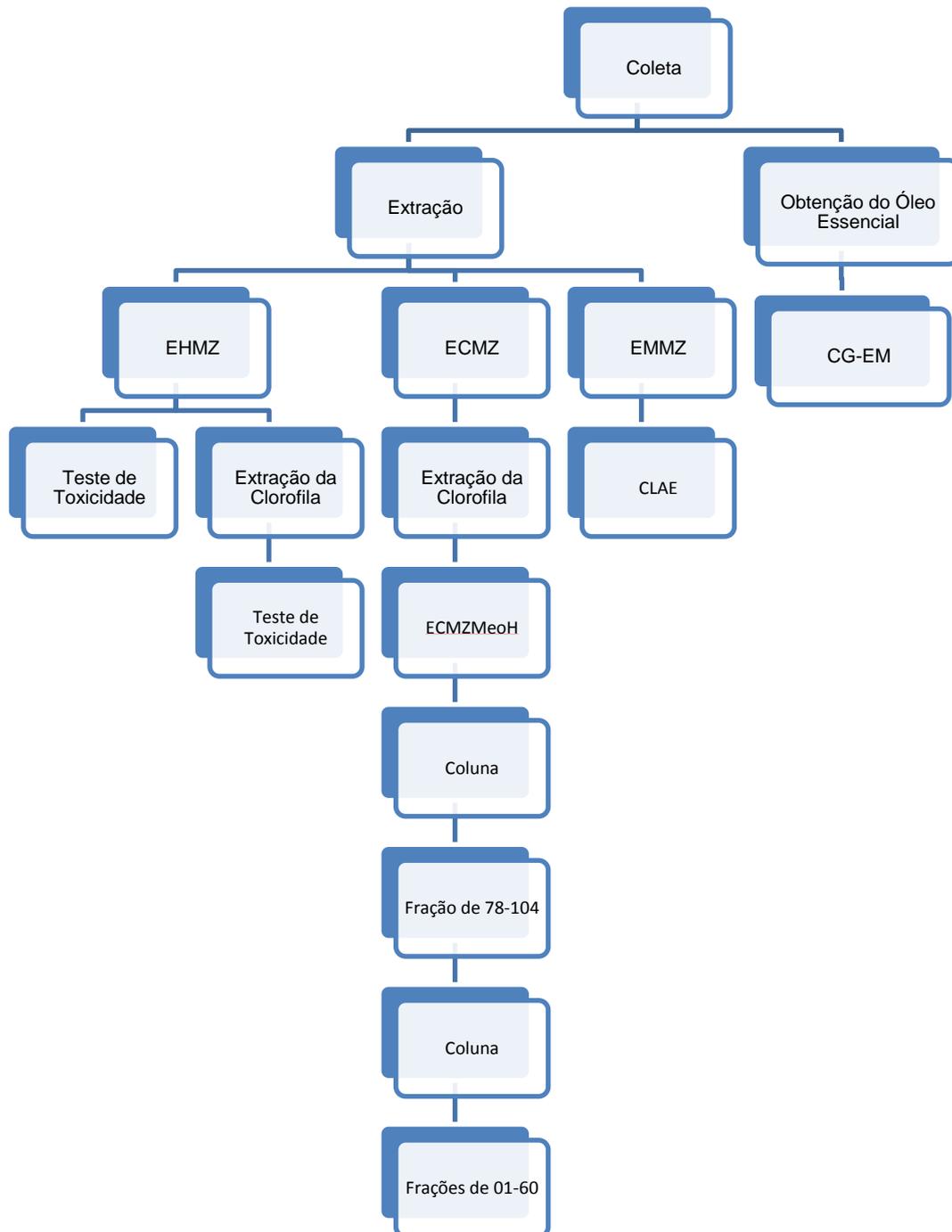
A seleção de espécie vegetais para um estudo farmacológico pode ser baseada no seu uso tradicional, no conteúdo químico e toxicidade, na seleção ao acaso ou pela combinação de vários outros tipos de critérios. Uma dessas estratégias mais comuns é o estudo da medicina tradicional e/ou popular em diferentes culturas conhecida como etnofarmacologia. (KINGHORN, 2005)

Nos últimos anos, tem havido um interesse crescente em terapias alternativas e à utilização de produtos naturais, devido à toxicidade, dos efeitos colaterais, das taxa de recaídas, dos custos dos medicamentos e da resistência que os parasitas ( *leishmania* ) mostram a esses medicamentos (MACHADO *et al.*, 2010).

Diante essas premissas, o presente projeto visa à avaliação química e farmacológica de espécies vegetais, a princípio, dos gêneros *Endlicheria* e *Mezilaurus* amplamente distribuídas na região amazônica, contra a leishmaniose.

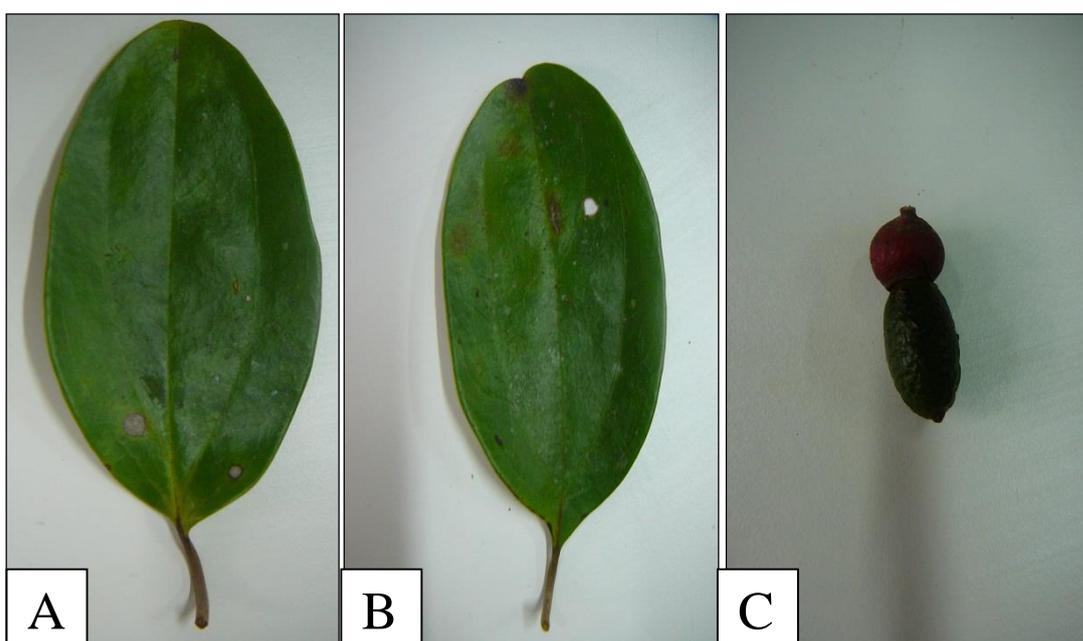
### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Sistema de trabalho (*M. duckei*)



### 3.2 Coleta e identificação do material vegetal (*E. bracteolata* e *M. duckei*)

As folhas frescas da espécie *Endlicheria bracteolata* (figura 1, 2 e 3) foram coletadas em abril de 2012. As coletas foram feitas na Reserva Florestal Adolpho Ducke localizada na rodovia Manaus-Itacoatiara – AM-010 e a outra no Sítio São José localizado na Av. Torquato Tapujós nº 576.



**Figura 1.** a) Folha da *E. bracteolata* da Reserva Duque. b) Folha da *E. bracteolata* do Sítio São José. c) Fruto da *E. bracteolata* do Sítio São José.

#### 3.2.1 Extração dos óleos essenciais

As folhas de *E. bracteolata* foram separadas manualmente e lavadas em água corrente. As folhas frescas de foram colocadas em um balão de fundo redondo de 5000 mL contendo água destilada (100g/1000mL). A

hidrodestilação foi realizada durante 4 horas a 100 °C no aparelho do tipo Clevenger (Figura 4).

Figura 4. Sistema de Hidrodestilação, Clevenger.



**Tabela 1.** Codificação e quantidade de folhas utilizada para extração de óleo essencial

<b>Sigla</b>	<b>Significado</b>	<b>Quantidade (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
OEESFr (Abr/12)	Óleo Essencial <i>Endlicheria</i> Folhas Frescas Abril de 2012	184g	1,08
OEERFr (Abr/12)	Óleo Essencial <i>Endlicheria</i> da Reserva Folhas Fresca Abril de 2012	186g	0,53
OEESSc (Abr/12)	Óleo Essencial <i>Endlicheria</i> da Sítio Folhas Secas Abril de 2012	123g	3,25
OEERSC (Abr/12)	Óleo Essencial <i>Endlicheria</i> da Reserva Folhas Secas Abril de 2012	174g	2,87

### **3.2.2. Identificação dos componentes**

Os óleos essenciais foram analisados no Laboratório de Farmanguinhos Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ, Brasil, por Cromatografia em Fase Gasosa acoplada Espectrômetro de Massas (CG-EM). A identificação dos componentes foi baseada na comparação entre os índices de retenção, análise do padrão de fragmentação observado no espectro de massas e com as informações da biblioteca do aparelho.

### **3.2.2 Obtenção dos extratos**

Para a obtenção de extratos hexanos, diclorometanos e metanol, utilizou-se 50g de folhas frescas de ambas localidades, essa etapa foi realizada por meio de maceração.

**Tabela 2.** Codificação e quantidade de folhas utilizada para obtenção dos extratos das folhas do Sítio e da Reserva

<b>Sigla</b>	<b>Significado</b>	<b>Quantidade de folhas utilizada (g)</b>	<b>Quantidade de amostra obtida (g)</b>
EHESFr (Abr/12)	Extrato Hexano <i>Endlicheria</i> do Sítio Fresca de Abril de 2012	50g	1,0959
EDCMESFr (Abr/12)	Extrato Diclorometano <i>Endlicheria</i> do Sítio Fresca de Abril de 2012	50g	8,3657
EMESFr (Abr/12)	Extrato Hexano <i>Endlicheria</i> da Sítio Fresca de Abril de 2012	50g	2,7119
EHERFr (Abr/12)	Extrato Hexano <i>Endlicheria</i> da Reserva Fresca de Abril de 2012	50g	1,3052
EDCMERFr (Abr/12)	Extrato Hexano <i>Endlicheria</i> da Reserva Fresca de Abril de 2012	50g	1,1912
EMERFr (Abr/12)	Extrato Hexano <i>Endlicheria</i> da Reserva Fresca de Abril de 2012	50g	0,4514

### 3.2.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises por Cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em cromatoplasmas de alumínio com gel de sílica. As placas foram reveladas com solução de vanilina sulfúrica.

### **3.2.4 Cromatografia em coluna**

O extrato hexano (1086g) obtido das folhas da *E. bracteolata* foi submetido ao fracionamento por meio de coluna cromatográfica ( 2,5 de diâmetro x 60 cm) em gel de sílica eluída com hexano. Esse procedimento gerou 50 frações. Estas frações foram reunidas em 16 novas frações, após análise por CCD.

### **3.2.5 Avaliação da toxicidade frente à *Artemia Salina***

O ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina*, segundo Meyer *et al.* (1982), é um ensaio biológico rápido, de baixo custo, não requer ambiente asséptico, utiliza um grande número de organismos para validação estatística, não requer equipamentos especiais e a quantidade de amostra é relativamente pequena (2-20mg) (MEYER *et al.*, 1982; DALL' STELLA, 2008).

*Artemia salina* é um microcrustáceo de água salgada utilizado como alimento vivo para peixes, facilmente encontrado em lojas especializadas em aquários, que pode ser utilizado para estimar a toxicidade através da concentração média letal (DL50) (MEYER *et al.*, 1982). Vários trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades antifúngica, viruscida, antimicrobiana, tripanossomicida e parasiticida.

Este bioensaio também tem sido citado na avaliação prévia de extratos de plantas com possível atividade antitumoral e está sendo utilizado para estudo biológico inicial de um grande número de amostras para detecção simultânea de toxicidade e fototoxicidade (MEYER *et al.*, 1982).

### 3.2.5.1 Procedimento

O ensaio foi realizado com água do mar artificial foi preparada com 37g de sal marinho e 100mL de água destilada.

Os ovos de *Artemia salina* (200mg/400ml) foram colocados na água salgada para eclodir por 48 horas sob aeração contínua e expostos a luz diurna. A temperatura foi controlada entre 28 e 30°.

Foram pesadas 10mg de amostra e adicionado solvente em quantidade suficiente para obter a concentração inicial da solução de 10mg/mL.

Após a eclosão dos ovos, 10 larvas de *Artemia salina* foram transferidas para cada recipientes pequenos de vidro. Foram feitos os controles negativos, e como controle positivo foi utilizou-se DMSO. O volume de todos os recipientes foram ajustado com água do mar artificial para 5 mL.

Após 24 horas, foi realizada a contagem das larvas mortas e vivas com auxílio de lupa e iluminação incandescente.

Os dados foram analisados com o método estatístico Probitos e determinados os valores de DL<sub>50</sub> e 95% de intervalos de confiança. As frações foram consideradas ativas quando DL<sub>50</sub> foi menor que 1000 ppm (MEYER *et al.*,1982).

### 3.2.6 DPPH

O método DPPH baseia-se na redução dos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH<sup>\*</sup>) através da doação de um átomo de hidrogênio do composto em estudo (polifenol) à molécula do radical (ARUOMA *et al.*, 1997).

Para esse teste utilizou-se uma solução alcoólica de DPPH, que absorve no comprimento de onda próximo de 517nm, e à medida que seu elétron deixa de ser desemparelhado, a absorção decresce e ocorre a mudança de coloração frente às moléculas antioxidantes testadas (DI MAMBRO *et al.*, 2005).

Inicialmente preparou-se uma solução etanólica de DPPH (2mg/12 mL, p/v). Em uma placa de 96 poços de fundo chato adicionou-se 270 µL da solução metanólica de DPPH mais 30µL de metanol. Esta solução foi monitorada pela leitura em 492 nm no leitor de microplaca (THERMOPLATE) até obter-se absorbância aproximadamente 1,00 ( $\pm 0,1$ ). Em seguida, o ensaio consistiu-se de 270 µL da solução metanólica de DPPH mais 30 µL dos extratos hexano, metanol e diclorometano de ambas localidades nas concentrações de 100; 50; 25; 12; 5; 6,25 e 3,125 µg/mL.

A reação foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente e na ausência de luz. Após a incubação fez-se a leitura em 492 nm. Para expressar a atividade antioxidante calculou-se a  $CI_{50}$ , ou seja, a concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% o DPPH inicial da reação. Como padrão desse ensaio utilizou-se como antioxidantes de referência a quercetina.

A atividade antioxidante será calculada pela fórmula:

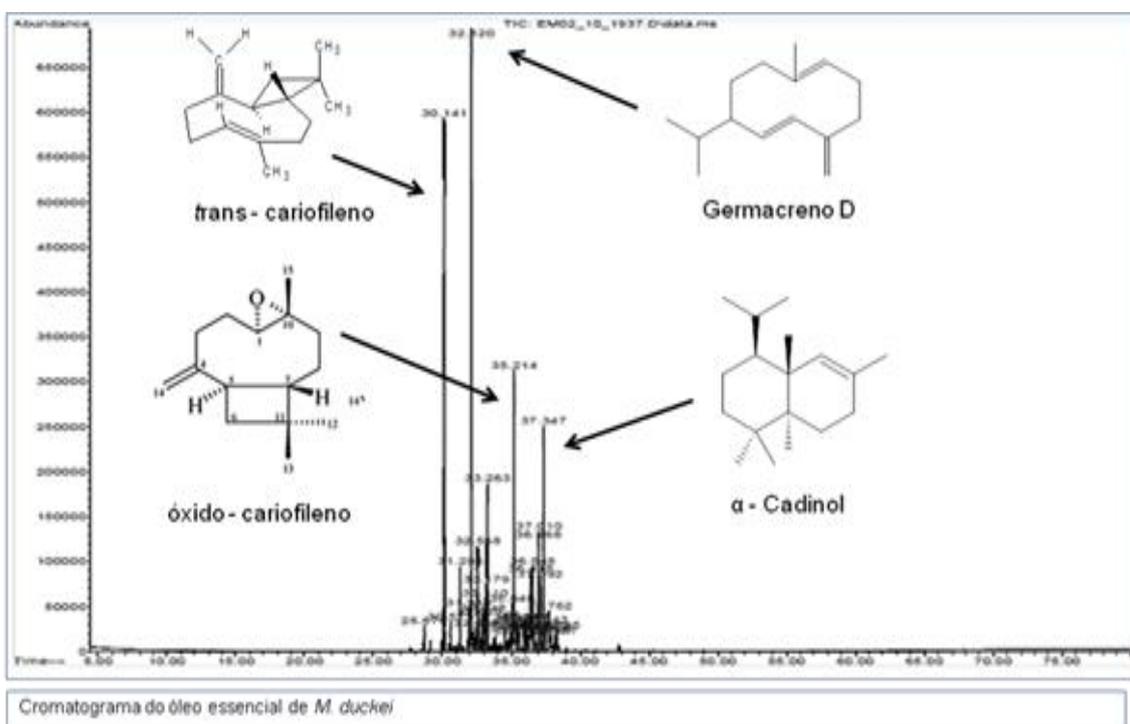
$$\% \text{ inibição} = 100 - (\text{abs amostra} / \text{abs controle}) \times 100$$

## 4 Resultados e discussão

### 4.1 Resultados *M. Duckei*

O óleo essencial obtido de *M. duckei* (rendimento de 0,38 ml), foi avaliado por CG-EM. O perfil cromatográfico para o óleo essencial de *M. duckei* apresentou 5 sinais (**Figura**) principais relativos a sesquiterpenos, conforme o padrão de fragmentação observado nos espectros de massas.

**Figura 3.** Cromatograma dos íons totais presentes na *M. duckei*.



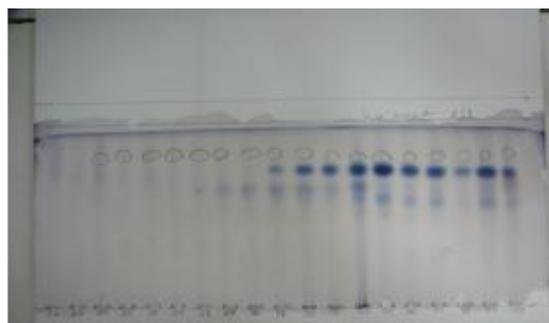
A avaliação por CCD dos extratos hexano e clorofórmio obtidos das folhas de *M. duckei*, indicou a presença de substâncias de baixa e média polaridade, respectivamente. A presença da clorofila foi evidenciada tanto pela cor verde muito marcante, quanto pela absorção no UV, na cor vermelha característica para essa substância.

A fração MeOH obtida a partir do extrato clorofórmio (ECMZMeoh) apresentou menor quantidade de clorofila, e após fracionamentos sucessivos

por coluna cromatográfica, foram obtidas diversas frações, que após reunião conforme perfil observado por CCD (Figura 4 e 5), serão submetidas a novos processos de fracionamento de forma a isolar as substancia presentes nessa amostra. Nesse aspecto, foram observados dos diterpenos importantes do ponto de vista químicos.

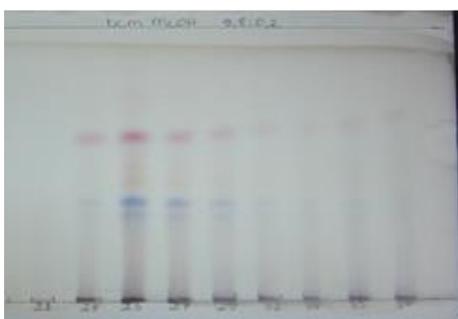


**Figura 4.** Perfil cromatográfico das frações obtidas de ECMZMeoh.

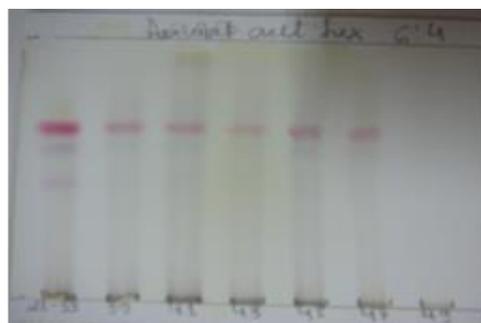


**Figura 5.** Perfil cromatográfico das frações obtidas de ECMZMeoh, após a revelação com vanilina sulfúrica.

Após o refracionamento destas frações foi obtido o seguinte perfil cromatográfico (figura ).



**Figura 6.** Perfil cromatográfico, após refracionamento.

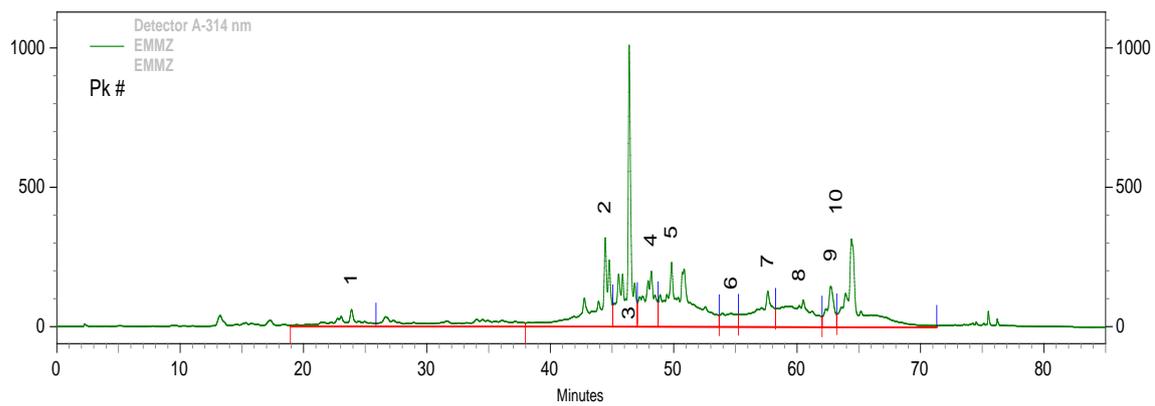


**Figura 7.** Perfil cromatográfico após refracionamento, revelado com vanilina sulfúrica.

Apartir destas frações serão realizadas outras técnicas cromatográficas para melhor separação das substancias existentes nas frações.

O extrato MeOH avaliado por CLAE apresentou um perfil constituído principalmente por fenóis, conforme o perfil observado no UV (Figura ).

**Figura 8.** Perfil cromatográfico do extrato MeOH.

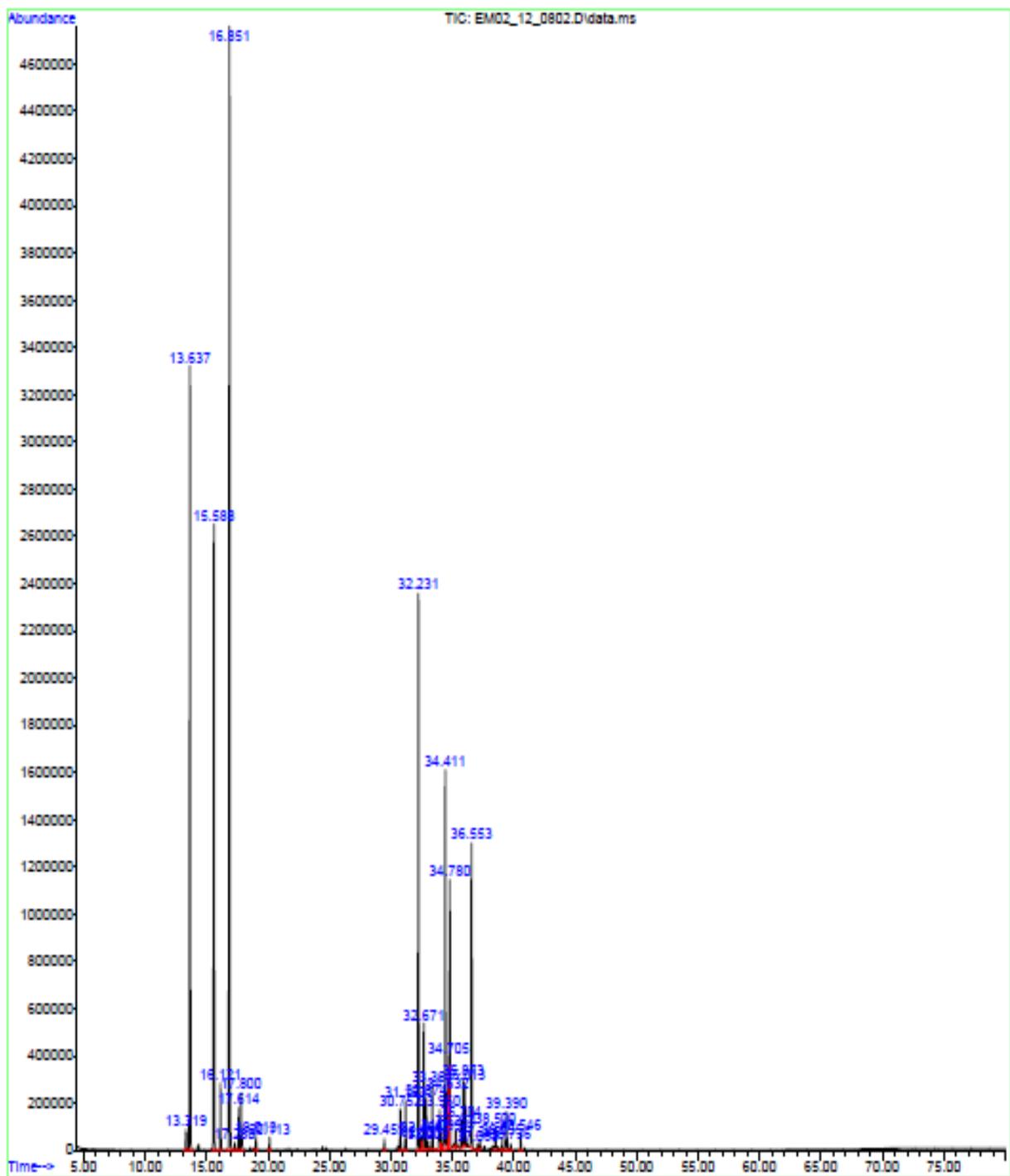


## **4.2 Resultados *E. bracteolata***

### **4.2.1 Resultado óleo essencial**

Os óleo essenciais ESFr( Figura 15 ), ERFr ( Figura 16 ) e ESSc (Figura17 ) obtidos da *E. bracteolata* foi avaliados por CG-EM. Os perfis cromatográficos apresentaram sinais relativos a sesquiterpenos, alfa pineno, beta pineno, trans beta cariofileno, filandreno, beta chamigreno, germancreno e alfa azuleno, conforme o padrão de fragmentação observado nos espectros de massas.

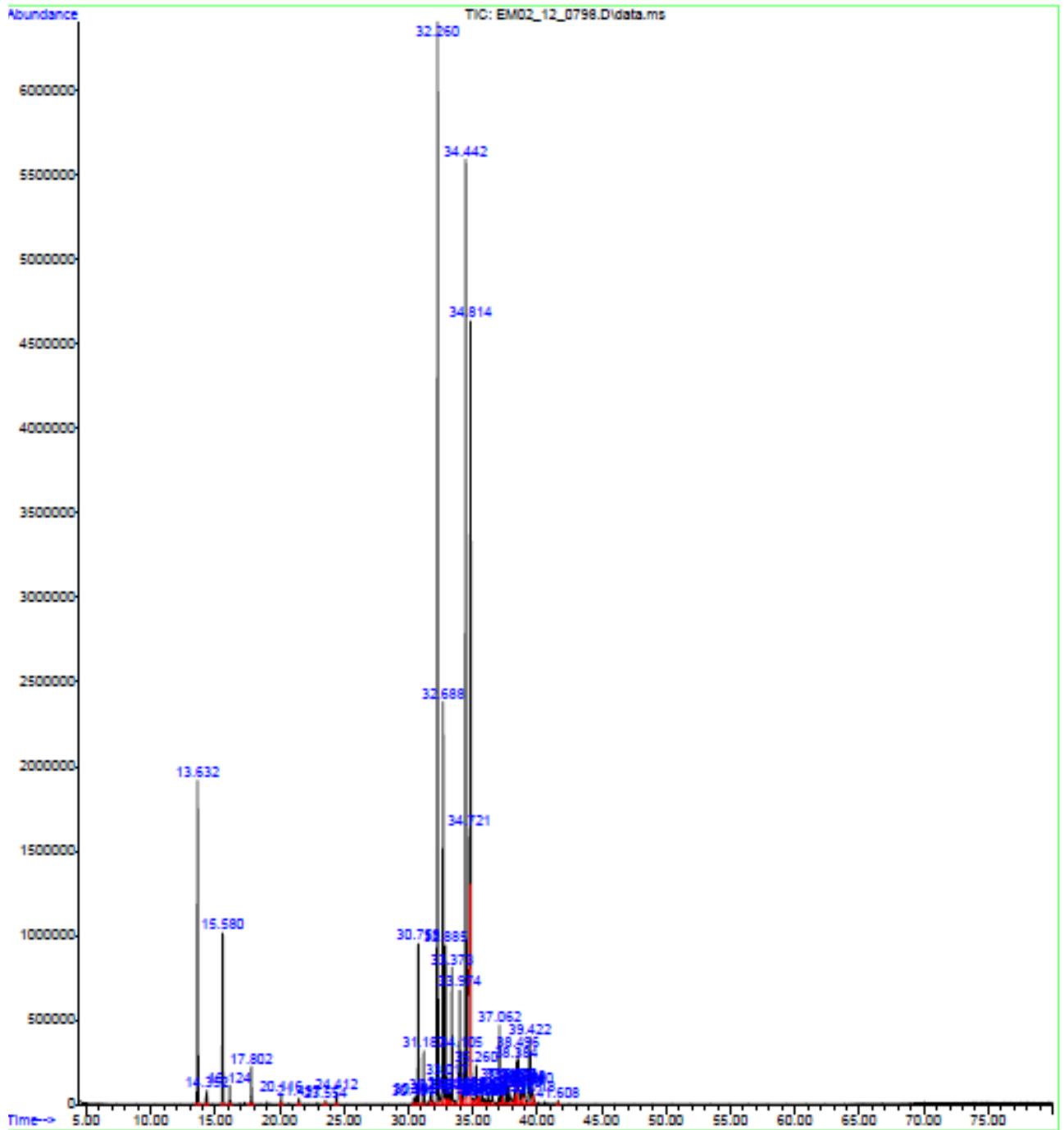
**Figura 9**, Cromatograma dos íons totais presentes no *OEESFr*.



**Tabela 3.** Substâncias encontradas no óleo essencial *ESFr*.

<b>Substância</b>	<b>Íon Molecular (m/z)</b>	<b>TR (min)</b>	<b>Área (%)</b>
$\alpha$ -thujene	136	13.316	0.32%
$\alpha$ -pineno	136	13.628	16.60%
$\beta$ -pineno	136	15.582	13.51%
$\beta$ -mirceno	136	16.124	1.11%
Felandreno	136	16.837	20.28%
Benzeno	134	17.617	0.77%
Limoneno	136	17.803	1.25%
$\gamma$ -terpineno	136	19.021	0.23%
$\alpha$ -terpinoleno	136	20.113	0.23%
$\alpha$ -copaeno	204	30.751	0.80%
$\beta$ -elemeno	204	31.182	0.93%
trans-cariofileno	204	32.222	11.59%
$\gamma$ -elemeno	204	32.467	0.52%
$\alpha$ -guaieno	204	32.675	1.79%
$\alpha$ -humuleno	204	33.366	1.18%
Naftaleno	204	33.953	1.12%
Ledeno	204	34.101	0.31%
$\alpha$ -selineno	204	34.636	1.44%
Azuleno	204	34.777	4.06%
$\Delta$ -cadineno	204	35.253	0.41%
$\beta$ -guaieno	204	35.349	0.17%
$\Delta$ -selineno	204	35.706	0.87%
$\beta$ -panasinseno	204	35.877	2.56%
Germangreno-B	204	36.553	6.37%

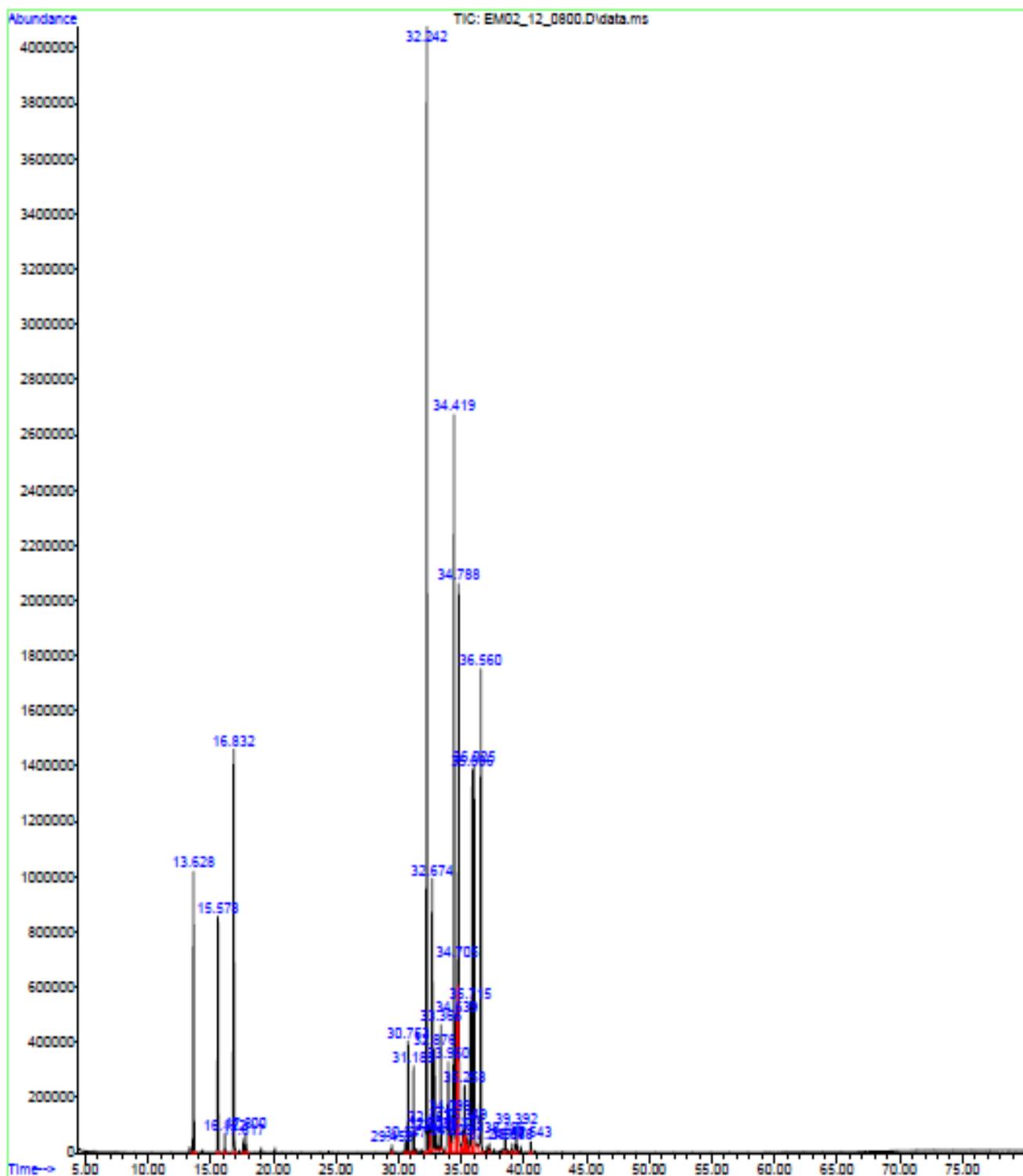
**Figura 10.** Cromatograma dos íons totais presentes no *OEERFr*.



**Tabela 4.** Substâncias encontradas no óleo essencial *ERFr*.

<b>Substância</b>	<b>Íon Molecular (m/z)</b>	<b>TR (min)</b>	<b>Área (%)</b>
$\alpha$ -pineno	136	13.636	5.39%
Canfeno	136	14.349	0.34%
$\beta$ -pineno	136	15.582	2.82%
$\beta$ -mirceno	136	16.124	0.28%
dl-limonene	136	17.803	0.63%
$\alpha$ -terpinoleno	136	20.113	0.14%
1-borneol	139	23.553	0.06%
3-ciclohexano	136	24.414	0.19%
Ciclohexano	204	30.543	0.14%
$\alpha$ -copaeno	204	30.759	2.54%
$\beta$ -elemeno	204	31.189	0.82%
Doecanal	204	31.813	0.12%
Trans-cariofileno	204	32.259	19.66%
$\alpha$ -guaieno	204	32.690	6.54%
3,7-guaidieno	204	32.883	2.59%
$\beta$ -selineno	204	33.017	0.54%
Aromadendreno	204	33.158	0.24%
$\alpha$ -humuleno	204	33.373	2.30%
Isoledeno	204	34.243	0.20%
$\beta$ -chamigreno	204	434.443	17.42%
Azuleno	204	34.815	14.07%
$\Delta$ -cadineno	204	35.260	0.72%
Naftaleno	204	36.011	0.09%
Oxido carifileno	220	37.244	0.43%
Germancreno-B	222	37.333	0.13%
1-cicloheptano	204	41.612	41.612

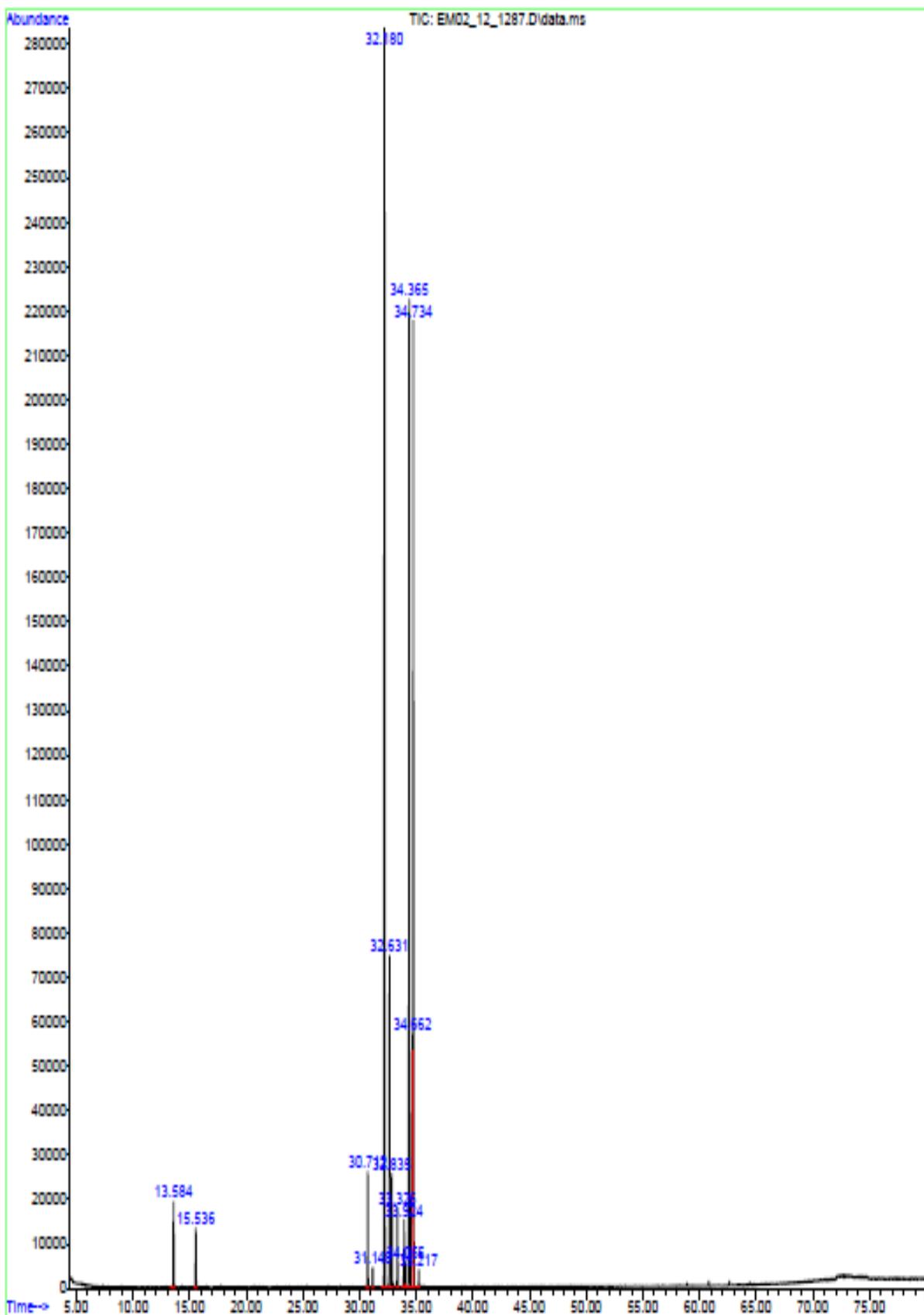
**Figura 11.** Cromatograma dos íons totais presentes no *OEESSc*.



**Tabela 5.** Substâncias encontradas no óleo essencial *ESSc*.

<b>Substância</b>	<b>Íon Molecular (m/z)</b>	<b>TR (min)</b>	<b>Área (%)</b>
$\alpha$ -pineno	136	13.682	4.29%
$\beta$ -pineno	136	15.574	3.57%
$\beta$ -mirceno	136	16.124	0.27%
l-felandreno	136	16.830	6.05%
Benzeno	134	17.617	0.20%
dl-limoneno	136	17.803	0.35%
ylangeno	204	30.543	0.22%
$\alpha$ -cubebeno	204	30.751	1.59%
$\beta$ -elemeno	204	31.182	1.20%
Trans-cariofileno	204	32.244	17.65%
$\gamma$ -elemeno	204	32.527	0.44%
$\beta$ -cubebeno	204	32.527	0.24%
$\alpha$ -guaieno	204	32.675	3.93%
3,7-guaidieno	204	32.876	1.69%
$\beta$ -panasinseno	204	33.009	0.26%
$\alpha$ -humuleno	204	33.366	1.85%
Valenceno-1	204	33.960	2.49%
(-)-Isoledeno	204	34.228	0.21%
$\beta$ -chamigreno	204	34.421	12.44%
$\alpha$ -selineno	204	34.636	2.21%
$\Delta$ -cadineno	204	35.260	1.10%
$\Delta$ -selineno	204	35.713	2.45%
Copaeno	204	39.056	0.16%

**Figura 11.** Cromatograma dos íons totais presentes no *OEERSc*.



**Tabela 6.** Substâncias encontradas no óleo essencial *ESFr*.

<b>Substância</b>	<b>Íon Molecular (m/z)</b>	<b>TR (min)</b>	<b>Área (%)</b>
$\alpha$ -pineno	136	13.583	2.03%
$\beta$ -pineno	136	15.537	1.29%
$\alpha$ -copaeno	204	30.714	2.29%
Trans-Caryophyleno	204	32.177	27.63%
$\alpha$ -Guaieno	204	32.630	6.98%
$\alpha$ -humuleno	204	33.329	1.69%
$\beta$ -Chamigreno	204	34.369	23.14%
$\beta$ -Selineno	204	30.751	1.59%
Azuleno	204	34.733	22.29 %

#### 4.2.2 Avaliação de toxicidade sobre *Artemia salina*

**Tabela 7.** Comparação dos  $CL_{50}$  com o intervalo de confiança do resultado da *Artemia Salina*

Extratos	CL <sub>50</sub>	Intervalo de Confiança (limite inferior)	Intervalo de confiança (limite superior)
EHRFr	93.04753 µg/ml	61.08699	141.7297
EDRFr	344.0867 µg/ml	281.9465	419.9221
EMRFr	8.16232 µg/ml	286.9465	419.9221
EHSFr	308.5545 µg/ml	213.0551	408.8607
EDSFr	517.0426 µg/ml	459.5111	581.71774
EMSFr	66.91367 µg/ml	11.37715	393.5469

Para o cálculo da  $DL_{50}$  os resultados das amostras testadas, foram submetidos ao teste estatístico Probitos e estão apresentados na tabela 7.

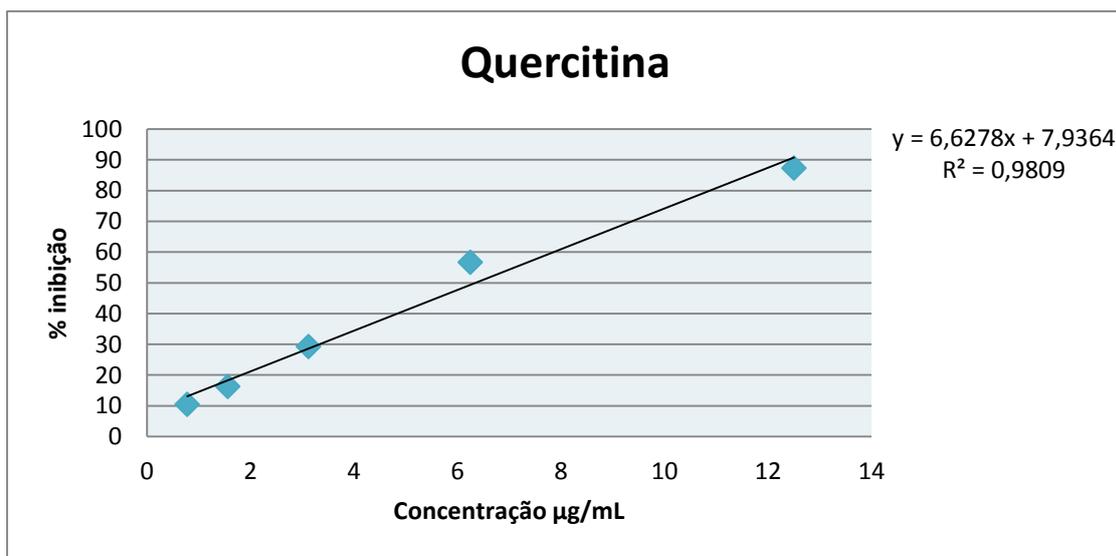
Observando os dados é possível perceber que algumas das amostras se mostraram ativa contra o micro crustáceo *Artemia salina*, pois todas apresentaram um resultado de  $CL_{50}$  inferior a  $1000\mu\text{g/mL}$ . O controle negativo (DMSO e água) não apresentou influência sobre os resultados, pois nenhuma larva morreu na presença dos mesmos. Do mesmo modo que o controle realizado com água salgada. Dessa maneira pode-se dizer que os extratos da *E. bracteolata* possuem moderada toxicidade frente ao teste realizado.

### 4.2.3 DPPH

A molécula do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila, radical livre e estável devido a localização de um elétron sobressalente ao longo da molécula como um todo, o qual não dimeriza, o que normalmente ocorre com os demais radicais livres, apresenta uma cor violeta intensa, e quando esta solução entra em contato com uma substância que pode doar um átomo de hidrogênio o radical passa à sua forma reduzida, perdendo a coloração violeta se tornando amarelo (MOLYNEUX, 2004).

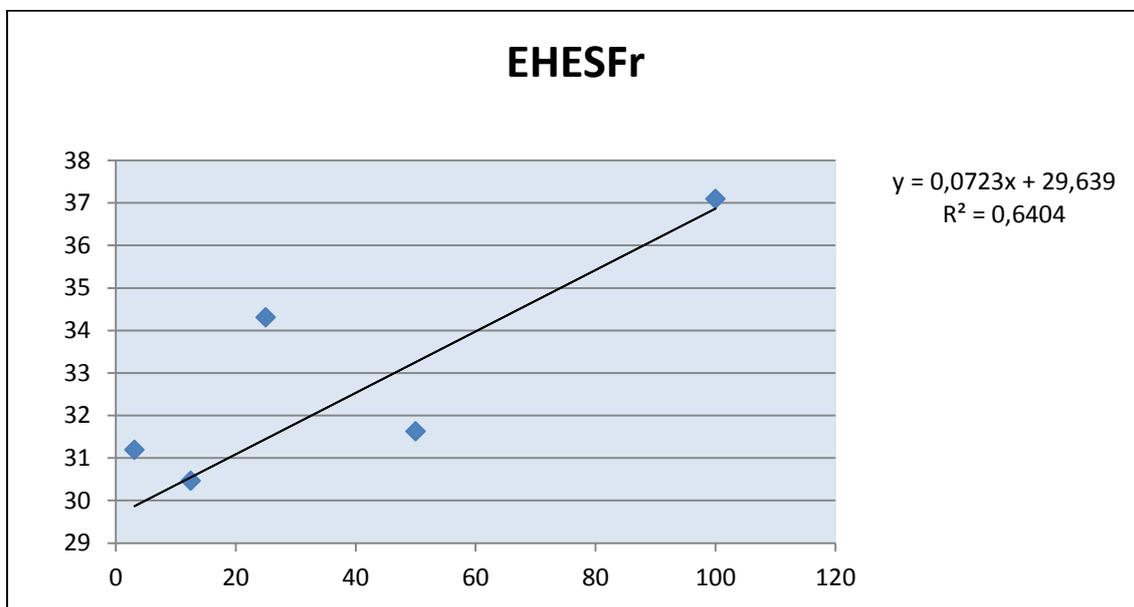
Para cada amostra testada (EHESFr, EMESFr, EDESFr, EHERFr, EMERFr e EDERFr) foi calculada a porcentagem de inibição do DPPH e por regressão linear foi possível calcular o IC<sub>50</sub>, ou seja, a concentração da amostra que reduz 50% da concentração inicial de DPPH. Cada amostra foi comparada com o padrão da quercetina. Os gráficos 6 gráficos a seguir apresentam as retas médias obtidas para cada teste.

**Gráfico 1.** Curva da Quercetina pela redução de DPPH.

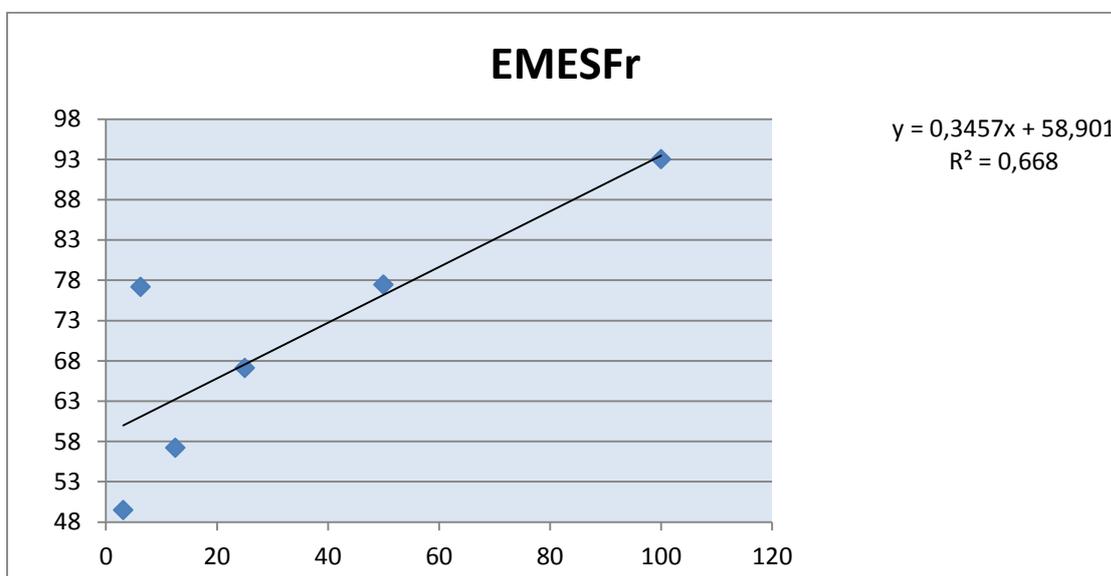


## Extratos do Sítio São José

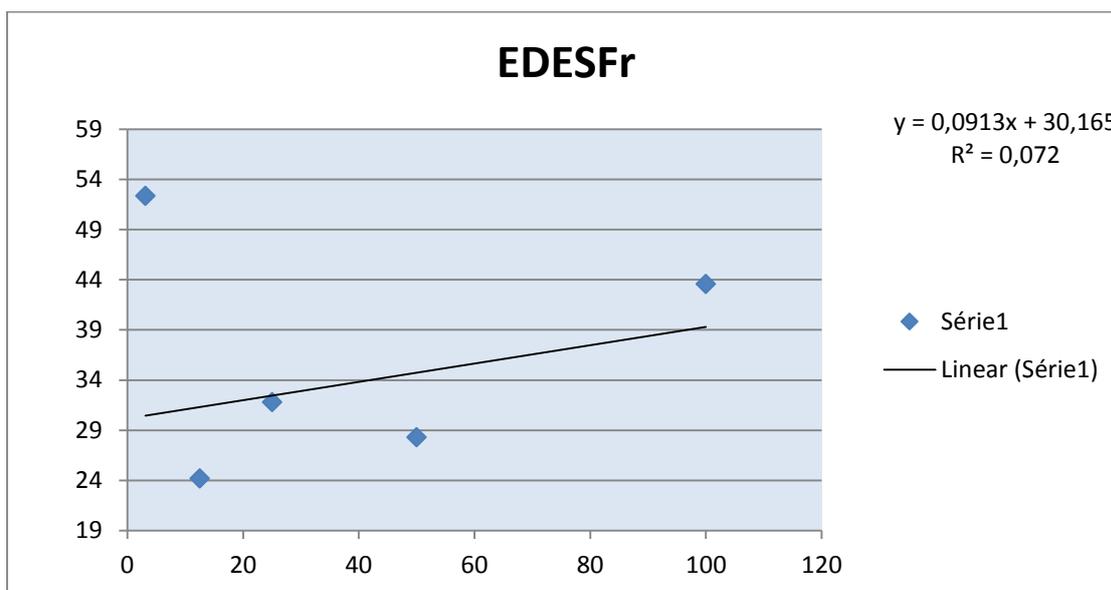
**Gráfico 2.** Curva do EHESFr pela redução do DPPH.



**Gráfico 3.** Curva do EMESFr pela redução do DPPH.

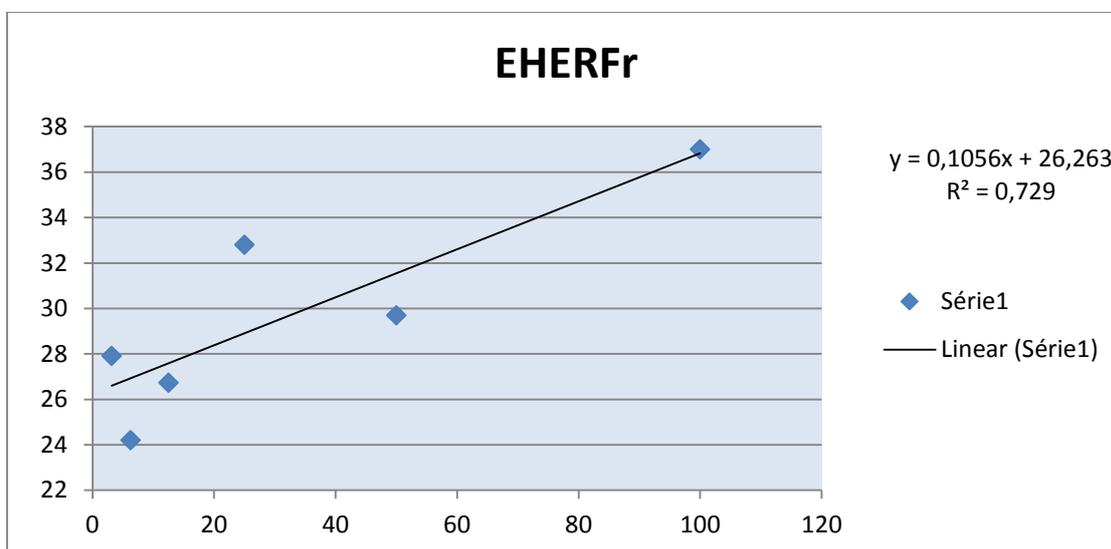


**Gráfico 4.** Curva do EDESFr pela redução do DPPH.

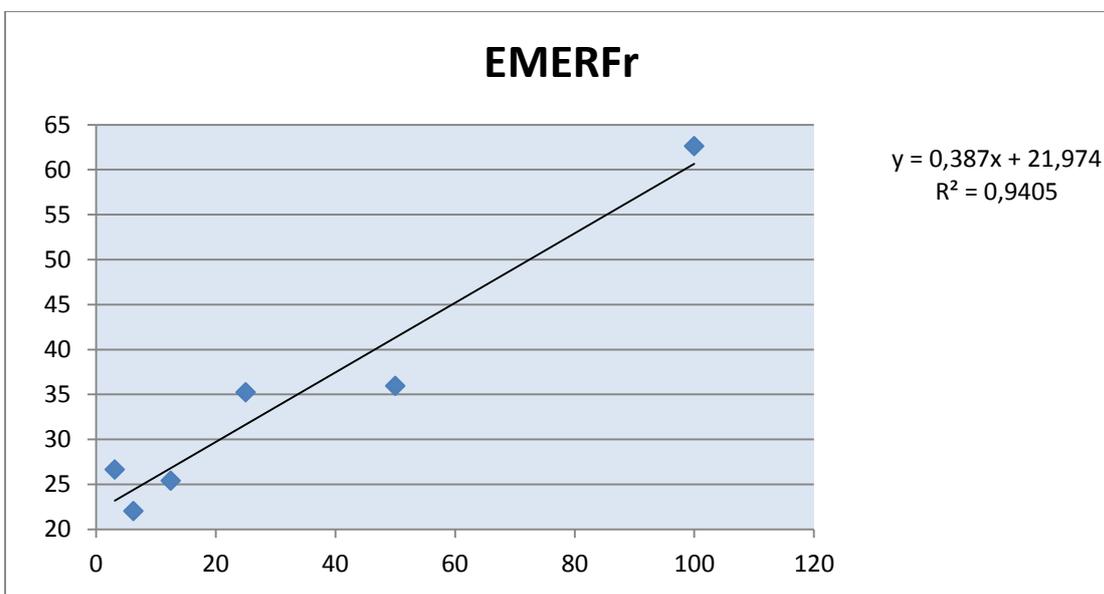


### Extratos da Reserva Duque

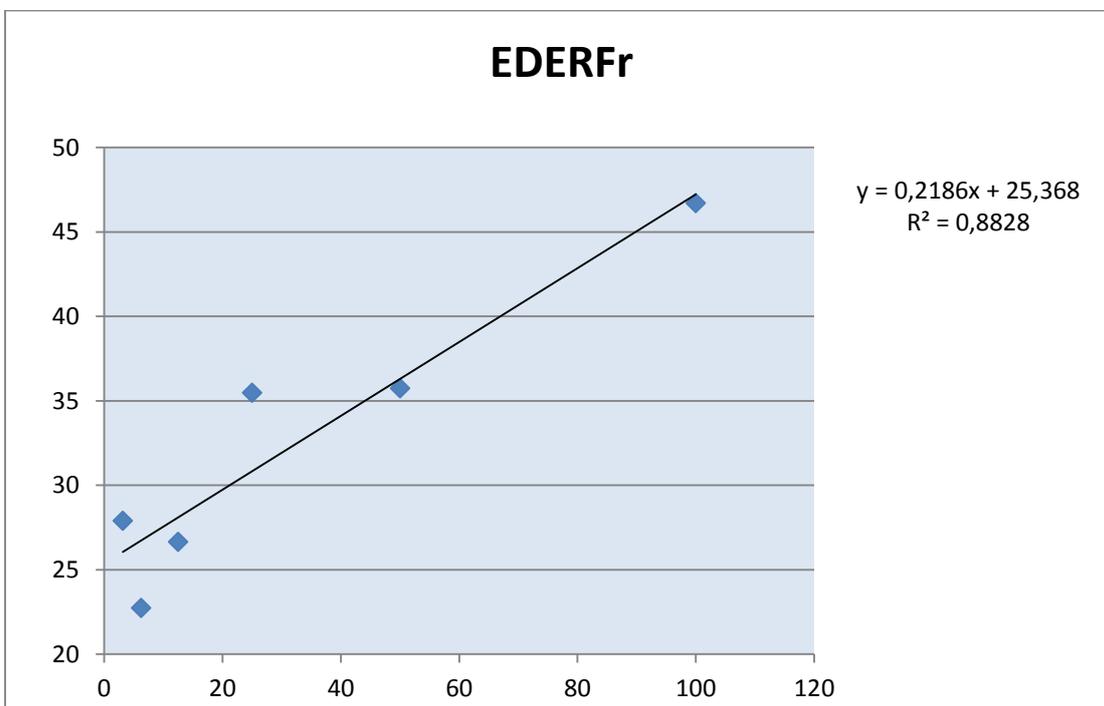
**Gráfico 5.** Curva do EHERFr pela redução do DPPH.



**Gráfico 6.** Curva do EMERFr pela redução do DPPH.



**Gráfico 7.** Curva do EDERFr pela redução do DPPH.



Os resultados de IC<sub>50</sub> são apresentados na tabela 8, estes correspondem às médias de três repetições ± desvio padrão

**Tabela 8.** IC<sub>50</sub> dos extratos em comparação com o padrão da *Quercertina*.

<b>Extratos</b>	<b>CI<sub>50</sub></b>
EHESFr	281,61 ± = = 0,07
EMESFr	-25,74 ± 0,34
EDESFr	217,25 ± 0,091
, EHERFr	224,78 ± 0,10
EMERFr	72,41 ± 0,38
EDERFr	112,68 ± 0,21
QUERCERTINA	3,333 ±

Levando em consideração a análise estatística dos dados verificou-se que os extratos apresentaram valores com IC<sub>50</sub> superiores ao padrão (Quercetina). Este resultado indica que as essas extratos são menos ativos do que os padrão analisado, pois é preciso uma quantidade maior destas amostras para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH.

## 5. Conclusão

O presente trabalho analisou a composição química dos óleos essenciais das folhas de duas espécies vegetais *M. duckei* e *E. bracteolata*.

Os resultados obtidos para *M. duckei* indicam uma alta concentração de sesquiterpenos no óleo essencial. Foram encontrados diterpenos na fração metanol obtida a partir do extrato clorofórmio. Com base nos resultados do teste de toxicidade frente a *Artemia Salina*, com o extrato hexano essa toxicidade foi considerada moderada. No entanto ainda será necessário o uso de outras técnicas para separação das substâncias encontradas nos extratos estudados da *M. duckei*.

Os resultados obtidos para *E. bracteolata* indicou uma presença vasta de terpenos, monoterpenos, hidrocarbonetos, sesquiterpenos e terpenóides nos três óleos essenciais obtidos. Sabe-se que substâncias voláteis vegetais atuam como atrativos de insetos, podendo agir como inseticidas. Dessa forma muitos terpenos tem recebido atenção especial por parte dos pesquisadores.

O teste com *Artemia salina* deu indícios de moderada toxicidade, pois o índice de mortalidade dos microcrustáceos foi considerado grande pela concentração de amostra utilizada. O CL<sub>50</sub> para os extratos EHRFr, EDRFr, EMRFr, EHSFr, EDSFr e EMSFr respectivamente, segundo os resultados do programa Probitos. Dessa forma podemos dizer que o EHERFr, EDCMERFr e Fração 3 EHERFr teve atividade considerável frente a esse teste.

A atividade antioxidante, (redução do radical DPPH) não foi bem expressiva. Os extratos testados, não apresentaram atividade antioxidante, pois os valores de CI<sub>50</sub> foram superiores a capacidade antioxidante da quercetina (padrão utilizado para fins de comparação).

As atividades antileishmania dos óleos essenciais não foram significativas, porém em concentrações que não justificam sua seleção para o desenvolvimento de novos fármacos, levando-se em conta também que os rendimentos dos óleos obtidos foram baixos.

O presente trabalho contribuiu para ampliar o conhecimento da composição química dos óleos da espécies *E. bracteolata* presentes na Região Amazônica. Pois há poucos estudos sobre esta espécie.

## 6. Referências

- \* (BRASIL, Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2ª Edição Atualizada, 2007)
- \* (Silva, N. S. , Viana, A. B. , Cordeiro, J. A. , Cavasini, C. E. Epidemiologia da LTA no estado do Acre, Amazônia brasileira, 2009)
- \*(BRASIL, Ministério da Saúde. Caderno de Atenção Básica, Práticas integrativas e complementares, Plantas Medicinais e Fitoterápicas na Atenção Básica, 2012)
- \* (KINGHORN, 2005)
- \*(MACHADO *et al.*, 2010).
- \*GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects of Medicine, v.7, p. 1-93, 2006.
- \*L. Nitric oxide synthase (NOS) characterization in *Leishmania amazonensis* axenic amastigotes. Arch Med Res, v.37, p.328-333, 2006.
- \*(Metcalf, R. L.; *Crit. Rev. Plant. Sci.* **1987**, 5, 251
- Alcaraz, M. J.; Rios, J. L. Em *Ecological Chemistry and Biochemistry of*
- Plants*; Harborne, J.; Tomas-Barberan, F. A., ed.; Clarendon Press: Oxford, U.K., 1991, p. 230-263
- \* MOLYNEUX, 2004.
- \*MEYER *et al.*, 1982;
- \* DALL'STELLA, 2008
- \*ARUOMA *et al.*, 1997
- \*DI MAMBRO *et al.*, 2005

Nº	Descrição	Ago 2011	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2012	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Seleção e coleta das espécies vegetais	R					NR						
2	Produção de extratos e frações	R	R	R			NR	NR	R				
3	Análises Químicas		R	R	R	NR	NR	NR	R	R			
4	Avaliação Farmacológica - Antioxidante					NR	NR	NR			R		
5	Avaliação Farmacológica - citotoxicidade					NR					NR		
6	Participação em eventos						NR						
7	Elaboração do Resumo e Relatório Final										R	R	
	Preparação da Apresentação Final para o Congresso												R

## 7. Cronograma