



INSTITUTO FEDERAL
GOIÁS
Câmpus Anápolis

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE GOIÁS
CÂMPUS ANÁPOLIS**

CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA EM *ARTEMIA SALINA* LEACH.
DE EXTRATOS DE DUAS ESPÉCIES DA FAMÍLIA
MELASTOMATACEAE**

LAYSSA APARECIDA DE OLIVEIRA MOREIRA

ORIENTADOR (A): Prof^ª. Ms. Gracielle Oliveira Sabbag Cunha

**ANÁPOLIS,
2013**

LAYSSA APARECIDA DE OLIVEIRA MOREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA EM *ARTEMIA*
SALINA LEACH. DE EXTRATOS DE DUAS ESPÉCIES DA
FAMÍLIA MELASTOMATACEAE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação de Licenciatura em Química do Instituto
Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás -
Câmpus Anápolis.

Orientadora: Prof^a. Ms. Gracielle Oliveira Sabbag Cunha

ANÁPOLIS, DEZEMBRO

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

O838a	<p>Moreira, Layssa Aparecida de Oliveira</p> <p>Avaliação da atividade tóxica em <i>Artemia salina</i> Leah. de extrato de duas espécies da família Melastomataceae./ Layssa Aparecida de Oliveira Moreira. - - Anápolis: IFG – Campus Anápolis/ Coordenação do curso de Química – Licenciatura em Química, 2013.</p> <p>Orientadora: Me. Gracielle Oliveira Sabbag Cunha. Bibliografias: f.43:il.</p> <p>1. Plantas medicinais. 2. <i>Miconia ferruginata</i>. 3. <i>Tibouchina granulosa</i>. 4. <i>Artemia salina</i>. I. Título II. Coordenação do curso de Química – Licenciatura em Química.</p> <p>CDD 615.9</p>
-------	---

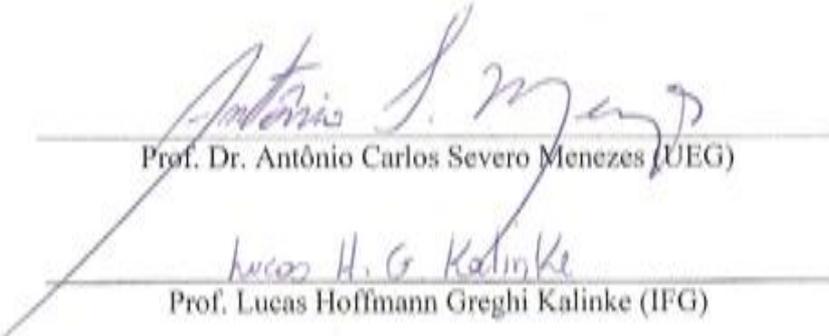
LAYSSA APARECIDA DE OLIVEIRA MOREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA EM *ARTEMIA*
SALINA LEACH. DE EXTRATOS DE DUAS ESPÉCIES DA
FAMÍLIA MELASTOMATACEAE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação de Licenciatura em Química do Instituto
Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás -
Câmpus Anápolis.

Orientadora: Prof^a. Ms. Gracielle Oliveira Sabbag Cunha

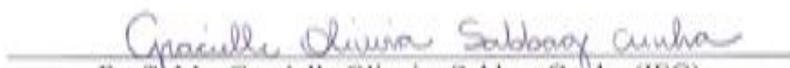
Aprovado em 06 / 12 / 13



Prof. Dr. Antônio Carlos Severo Menezes (UEG)



Prof. Lucas Hoffmann Greggi Kalinke (IFG)



Prof^a Ms. Gracielle Oliveira Sabbag Cunha (IFG)

ANÁPOLIS, DEZEMBRO

2013

AGRADECIMENTOS

Neste momento de pura alegria, bom é agradecer àqueles que me acompanham há tanto tempo:

A Deus, sempre! Pela conquista e pela oportunidade de viver momentos inesquecíveis.

À professora e orientadora Gracielle Oliveira Sabbag Cunha, que nesta longa caminhada esteve comigo, transmitindo valiosos conhecimentos, ensinando-me a direção a seguir, sempre com muita dedicação, compreensão e paciência. Muito obrigada!

Aos meus pais, Antenor e Nadir, pelo incentivo em continuar estudando e por me ensinarem a ser uma pessoa melhor a cada dia.

À minha irmã Lorryne, pela amizade, carinho e sorrisos, que com muita dificuldade compreendeu minha ausência.

À minha família, pela compreensão, onde muitas vezes mesmo estando perto estava tão longe, refletindo sobre o trabalho.

Agradeço a Luciana, amiga e companheira de curso pelo incentivo e apoio. Juntas compartilhamos muitas alegrias.

À amiga Mayuki, pela companhia, incentivo e agradável convivência.

À Jakeline Oliveira, pelo apoio e ajuda durante a realização do trabalho.

A todos do laboratório de Química, Yáskara, Marcus, Emilly e Laressa pela ajuda e convivência.

Aos colegas de curso, Amadeu, Carol, Carita, Ludimila, Nislaine e Priscilla pelo companheirismo.

RESUMO

As plantas medicinais sempre foram e são de fundamental importância para que o homem possa aumentar sua expectativa de vida na terra. Contudo, a busca por plantas que oferecem atividades biológicas, as quais se apresentem de forma mais ativa e com reações menos rigorosas no organismo, está cada vez maior. Na identificação destas plantas, estão sendo cada vez mais usadas técnicas rápidas, simples e baratas como é o caso do bioensaio com *Artemia salina* Leach. Diante disso, o presente trabalho apresenta um estudo biológico realizado com extratos e frações de duas espécies da família Melastomataceae: *Miconia ferruginata* e *Tibouchina granulosa*. No caso da espécie *Tibouchina granulosa*, das quatro amostras testadas duas apresentaram atividade tóxica com $DL_{50} < 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$: fração diclorometânica ($DL_{50} = 633,817 \mu\text{g mL}^{-1}$) e fração hidroalcoólica ($DL_{50} = 695,435 \mu\text{g mL}^{-1}$). Quanto à espécie *Miconia ferruginata*, tanto o extrato etanólico quanto as frações hexânica, diclorometânica e em acetato de etila se mostraram ativas frente ao microcrustáceo com $DL_{50} = 328,425 \mu\text{g mL}^{-1}$, $835,941 \mu\text{g mL}^{-1}$, $571,153 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $502,219 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Palavras-chave: *Miconia ferruginata*. *Tibouchina granulosa*. *Artemia salina*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Estruturas das moléculas de vimblastina e vincristina	15
Figura 2.2. Estrutura das moléculas de salicilina, saligenina, ácido salicílico e ácido acetilsalicílico	16
Figura 2.3. Estruturas químicas do ácido oleanólico e ursólico isolados de <i>Miconia Albicans</i>	17
Figura 2.4. Foto de <i>Miconia ferruginata</i>	18
Figura 2.5. Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>Miconia ferruginata</i>	19
Figura 2.6. Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>Miconia lepidota</i>	20
Figura 2.7. Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>Miconia rubiginosa</i>	21
Figura 2.8. Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>Miconia stenostachya</i>	22
Figura 2.9. Foto de <i>Tibouchina granulosa</i>	23
Figura 2.10. Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>Tibouchina candolleana</i>	24
Figura 2.11. Estrutura química das substâncias isoladas de <i>Tibouchina grandifolia</i>	25
Figura 2.12. Estrutura química da substância isolada de <i>Tibouchina pulchra</i>	25
Figura 2.13. Estruturas químicas das substâncias isoladas dos nobotaninos A, D e F isolados de <i>Tibouchina semidecandra</i> COGN	26
Figura 2.14. Estrutura química da casuaractina isolada de <i>Tibouchina semidecandra</i> COGN	27
Figura 2.15. Estrutura química do nobotanino B isolado de <i>Tibouchina semidecandra</i> COGN	28
Figura 2.16. Estrutura química do nobotanino E isolado de <i>Tibouchina semidecandra</i> COGN	29
Figura 2.17. Estruturas químicas dos nobotaninos L, M e N isolados de <i>Tibouchina semidecandra</i>	30
Figura 2.18. Estruturas químicas das substâncias isoladas <i>Tibouchina semidecandra</i> L	31
Figura 2.19. Estrutura química do nobotanino O isolado de <i>Tibouchina multiflora</i>	32

Figura 2.20. Estrutura química do nobotanino P isolado de <i>Tibouchina multiflora</i>	33
Figura 2.21. Ilustração do microcrustáceo de água salgada <i>Artemia salina</i>	34
Figura 3.1. Obtenção dos extratos de <i>Miconia ferruginata</i> e <i>Tibouchina granulosa</i>	36
Figura 3.2. Metodologia utilizada no fracionamento dos extratos	37
Figura 3.3. Esquema de preparação e execução do teste de Letalidade em <i>Artemia salina</i> Leach	38

LISTA DE TABELAS

- Tabela 4.1.** Massa de material vegetal e quantidade de extrato obtido das folhas *M. ferruginata* e *T. granulosa* 39
- Tabela 4.2.** Massas obtidas da partição líquido-líquido dos extratos brutos de *M. ferruginata* e *T. granulosa*. 40
- Tabela 4.3.** Avaliação da toxicidade em *A. salina* Leach (DL₅₀) de extratos e frações obtidos de *Miconia ferruginata* e seus respectivos intervalos de confiança de 95%. 40
- Tabela 4.4.** Porcentagem de inibição dos triterpenos nas formas ácida e metilada. 41
- Tabela 4.5.** Avaliação da toxicidade em *A. salina* Leach (DL₅₀) de extratos e frações obtidos de *Tibouchina granulosa* e seus respectivos intervalos de confiança de 95%. 42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOET Acetato de etila

CH₂Cl₂ Diclorometano

DMSO Dimetilsulfóxido

DL₅₀ Dose letal capaz de matar 50% dos animais testados

EtOH Etanol

µg mL⁻¹ Microgramas por mL

MMA Ministério do Meio Ambiente

OMS Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Produtos Naturais.....	13
2.2 Família Melastomataceae.....	16
2.3 Gênero <i>Miconia</i>	17
2.4 Gênero <i>Tibouchina</i>	22
2.5 Ensaio de Letalidade com <i>Artemia Salina</i> Leach.....	34
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	36
3.1 Coleta do material botânico.....	36
3.2 Obtenção dos extratos brutos	36
3.3 Fracionamento dos extratos e obtenção das frações.....	36
3.4 Preparação das amostras e ensaio de Letalidade com <i>Artemia salina</i> Leach.....	37
3.5 Cálculo dos Valores de DL ₅₀	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Resultados da extração.....	39
4.2 Resultados do fracionamento dos extratos brutos através da partição líquido - líquido.....	40
4.3 Avaliação da atividade tóxica de extratos e frações de <i>Miconia ferruginata</i>	40
4.4 Avaliação da atividade tóxica de extratos e frações de <i>Tibouchina granulosa</i>	42
5. CONCLUSÃO.....	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

1. INTRODUÇÃO

É inegável o quanto o reino vegetal tem contribuído para o desenvolvimento da humanidade. Uma das grandes contribuições deste reino para o homem está, sem dúvida, no uso plantas como fontes terapêuticas. Estas plantas são utilizadas como agentes naturais de fármacos e muitas vezes proporcionam a obtenção de novas substâncias devido à variedade de constituintes químicos que apresentam¹.

A aplicação de plantas na terapêutica é datada de milhares de anos e abrange desde o combate ao câncer até os micro-organismos patogênicos², sendo que a cada dia são relatadas na literatura novas moléculas. Estudos revelam que das 250 a 500 mil espécies de plantas existentes no planeta apenas 15% foi estudada do ponto de vista fitoquímico e uma porcentagem ainda menor sob aspectos biológicos³.

A maioria das drogas encontradas nos últimos 40 anos tem como foco principal a prevenção e o tratamento contra o câncer. Isso porque nos países desenvolvidos e nos países em desenvolvimento o câncer está entre as três causas mais comuns de morte e morbidade⁴.

Uma das grandes contribuições que as plantas medicinais, principalmente as ditas anticâncer vem proporcionando, é quanto à citotoxicidade apresentada, onde esta se apresenta baixa, diminuindo assim os sintomas colaterais⁵.

Diante disso e de uma procura cada vez maior por produtos naturais biologicamente ativos, estão sendo cada vez mais utilizados bioensaios simples e rápidos, os quais oferecem vantagens em relação à padronização e controle de qualidade dos produtos naturais⁶.

Estes bioensaios podem envolver desde organismos inferiores, como micro-organismos e microcrustáceos até ensaios bioquímicos, com enzimas e receptores e cultura de células animais e humanos. Deste modo, dentre os ensaios mais citados, estão os que utilizam organismos simples, como é o caso do microcrustáceo *Artemia salina* Leach. Este ensaio é considerado um teste que antecede o estudo de extratos e metabólitos com potencial atividade biológica⁷.

O Brasil é considerado o país da megadiversidade, já que apresenta a maior diversidade genética do mundo⁸. As plantas dos biomas que possui têm sido utilizadas como fármacos naturais pelas populações locais no tratamento de várias doenças tropicais, tais como: esquistossomose, leishmaniose, malária e infecções fúngicas e bacterianas⁹.

Neste contexto o presente trabalho tem como objetivo avaliar a toxicidade de extratos e frações de duas espécies da família Melastomataceae (*Miconia ferruginata* e *Tibouchina Granulosa*) frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Produtos Naturais

Desde tempos imemoriáveis, os recursos naturais - principalmente os de origem vegetal - vêm sendo utilizadas pelos homens tanto para melhorarem suas condições de vida quanto para aumentarem suas chances de sobrevivência: primeiro na forma de alimentos e mais tarde na confecção de roupas e ferramentas além de combustível para o fogo¹⁰. Através da experiência e observação da natureza descobriram que vegetais diferentes apresentavam efeitos diferentes e que quando ingeridos, muitas das vezes levaram ao sucesso ou ao fracasso, pois às vezes curavam, em outras matavam ou produziam efeitos colaterais severos¹¹.

Em relatos históricos sobre plantas medicinais, verifica-se que elas vêm sendo utilizadas em praticamente todas as civilizações e que foram os primeiros recursos terapêuticos utilizados pelos homens, antes mesmo do aparecimento da escrita. A primeira referência escrita sobre o uso de plantas como agentes terapêuticos é encontrada na obra chinesa *Pen Ts'ao* (“A Grande Fitoterapia”) escrita por volta de 2800 a.C. por Shen Nung¹².

No Egito, cerca de 2000 a.C. muitos médicos utilizavam as plantas como remédio⁴. No Papiro de Erbers, o qual é uma coleção egípcia que contém 811 prescrições e data de cerca de 1500 a.C. foram mencionadas cerca de 700 drogas diferentes, dentre elas: drogas vegetais, minerais e animais de várias procedências¹³.

Na Grécia antiga, o médico Hipócrates (460-377 a.C.) denominado o “Pai da Medicina” descreveu inúmeros medicamentos incluindo o uso de vegetais, vinhos e bolores para tratamento e cura de doenças genitais¹⁴. Dioscórides no começo da Era Cristã, ao acompanhar os exércitos romanos na Península Ibérica, no norte da África e na Síria coletou importantes informações sobre as plantas dessas regiões. Essas plantas, cerca de 600, foram catalogadas, ilustradas e posteriormente publicadas em sua obra “*De Matéria Médica*”¹⁵.

Galeno (129-199 a.C.), considerado o fundador da farmácia, prescrevia produtos de origem natural para dores de cabeça, epilepsia, asma, cólicas, febre e até mesmo para estados melancólicos¹⁶.

A literatura revela que foram as grandes navegações que trouxeram ao mundo moderno o grande arsenal terapêutico de origem vegetal até hoje indispensável à medicina, sendo que, o início do século XVIII foi um período importante para desenvolvimento dos

estudos sobre as plantas medicinais, já que nesta época houve o isolamento das primeiras substâncias puras do reino vegetal, como: morfina (1806), quinina e estriquinina (1820)¹⁷.

Em 2003, cerca de 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados eram originários de plantas e cerca de 120 compostos de origem natural, obtidos a partir de cerca de 90 espécies de plantas, são utilizados na terapia moderna⁴. Cerca de 49% das drogas desenvolvidas entre 1981 a 2002, foram obtidas a partir de produtos naturais, ou análogos semissintéticos ou ainda compostos sintéticos baseados em produtos naturais¹⁸.

Um dos grandes motivos que levam os consumidores a utilizarem plantas medicinais nos dias atuais vai além da procura por uma melhor qualidade de vida¹⁹, decorre também pelo fato dos medicamentos industrializados apresentarem custos elevados, onde devido à crise econômica e a falta de assistência médica e farmacêutica os consumidores procuram utilizar produtos naturais²⁰. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial não possuem acesso ao atendimento primário em saúde²¹. Na América Latina, 50% da população têm pouco ou nenhum acesso aos medicamentos²². No Brasil, por exemplo, ainda hoje nas regiões mais pobres e até mesmo nas grandes cidades do país, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais²³.

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (MMA), o Brasil apresenta a maior biodiversidade do planeta, a qual abrange as mais variadas espécies de flora, fauna e micro-organismos²⁴. Em relação à flora, o Brasil apresenta a Floresta Amazônica, a Caatinga o Pantanal a Floresta Atlântica e o Cerrado, sendo que os dois últimos estão entre os mais ricos e mais ameaçados reservatórios de vida animal e vegetal no planeta²⁵. Neste contexto, é fato que o Brasil se encontra em uma posição privilegiada, já que os diversos ecossistemas que apresenta produzem uma enorme variedade de estruturas químicas que podem ser utilizadas para diversos fins, representando uma das mais ricas fontes de novas substâncias bioativas²⁶.

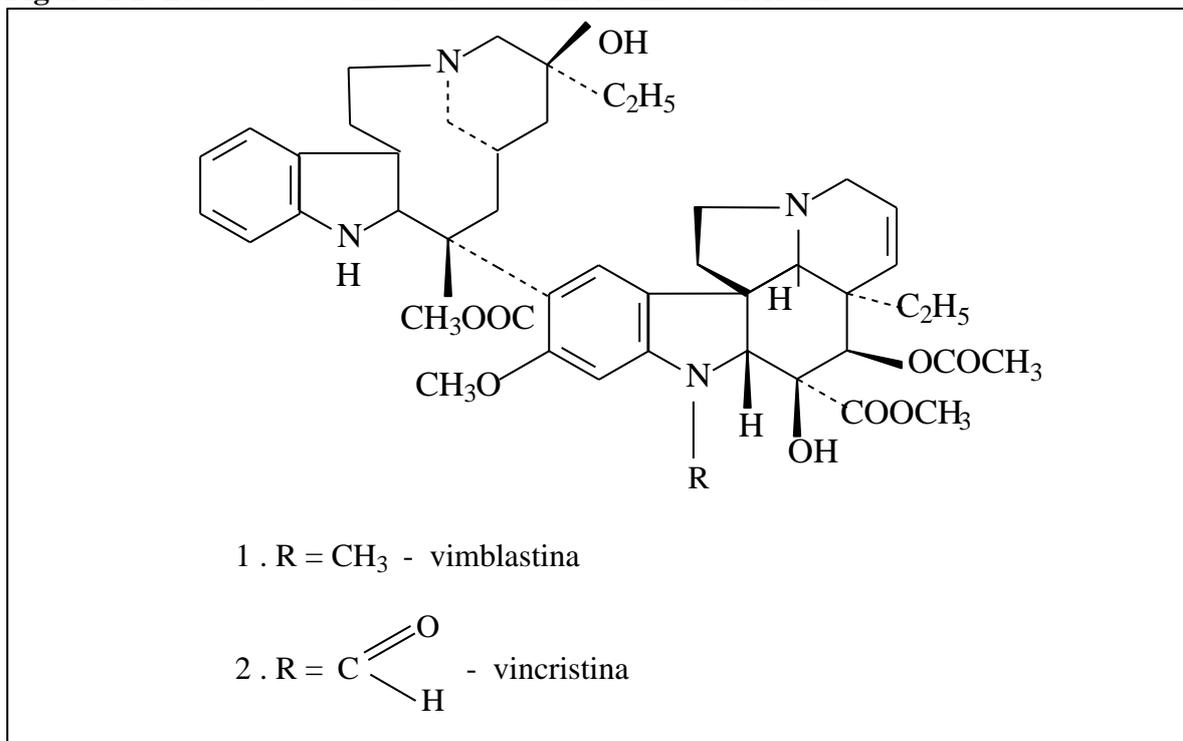
No entanto, diferente dos animais, as plantas não possuem mobilidade, não podendo fugir quando atacadas por insetos ou predadores e nem utilizar o sistema imunológico quando infectadas por bactérias, fungos e vírus²⁷. Por outro lado, a evolução dessas plantas resultou no desenvolvimento de diversas estratégias de sobrevivência incluindo a produção de substâncias químicas denominadas metabólitos secundários²⁸. Diferentemente dos metabólitos primários, os quais exercem função essencial para a manutenção da vida dos vegetais, ajudando na fotossíntese, respiração e no transporte de solutos, os metabólitos

secundários atuam em defesa das plantas. Além disso, podem ser utilizados como importantes fontes terapêuticas para o tratamento de várias doenças²⁶.

Vale ressaltar que as taxas de produção desses metabólitos podem ser alteradas de acordo com o ambiente em que a planta se encontra. Alguns dos fatores que alteram a produção desses metabólitos são: desenvolvimento e sazonalidade, índice pluviométrico, temperatura, nutrientes, radiação ultravioleta e poluição atmosférica²⁹.

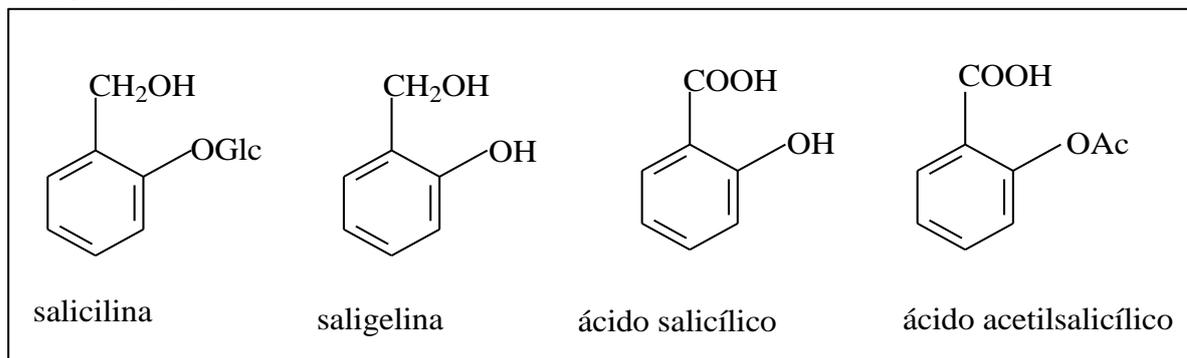
Dentre alguns casos de plantas com metabólitos secundários empregados na terapêutica, podem ser citadas a vimblastina (1) e a vincristina (2) cujas estruturas estão representadas na Figura 2.1. Extraídas da *Catharanthus roseus* no final dos anos 60, são considerados moléculas importantes para o tratamento da leucemia³⁰.

Figura 2.1. Estruturas das moléculas de vimblastina e vincristina



Outras importantes substâncias extraídas de plantas são a salicilina e a saligenina (Figura 2.2), isoladas das cascas de *Salix alba* e *Filipendula ulmaria*, respectivamente. Estas substâncias apresentam propriedades anti-inflamatórias e analgésicas reconhecidas, o que levou à descoberta da aspirina, (ácido acetilsalicílico)³⁰.

Figura 2.2. Estrutura das moléculas de salicilina, saligenina, ácido salicílico e ácido acetilsalicílico



Diante dos dados apresentados anteriormente, observa-se que a natureza, através das plantas representa uma farmácia a céu aberto e que nos últimos séculos vem trazendo à humanidade enormes contribuições.

2.2. Família Melastomataceae

Considerada umas das maiores representantes da flora neotropical, a família Melastomataceae, pertencente à ordem Myrtales, é formada por aproximadamente 166 gêneros que incluem 4200-4500 espécies³¹. Na América tropical, a família está representada por aproximadamente 3000 espécies, distribuídas em 100 gêneros, sendo *Miconia* o maior gênero da família, com cerca de 1000 espécies³².

No Brasil, essa família pode ser encontrada desde a região Amazônica até o Rio Grande do Sul. Grande diversidade de hábitos, desde herbáceo até arbustivo, ocorrendo muito comumente espécies arbóreas, e mais raramente trepadeiras e epífitas, que permitem a ocupação de ambientes distintos e diversificados. A família encontra-se bem representada nas formações rupestres do Brasil com alguns gêneros restritos a determinadas regiões. Os seus representantes são prontamente reconhecidos, principalmente, pelas folhas decussadas com nervação acródroma, estames geralmente falciformes e anteras poricidas³³. Quimicamente, a família Melastomataceae se destaca pela presença de ácidos graxos, triterpenóides, flavonóides e taninos³⁴.

Dentre o uso terapêutico desta família encontra-se, principalmente: ação contra erisipela, vermes intestinais, leucorréia, ulcerações, palpitações, males dos rins e bexiga, escabiose, dermatoses, eupepsia, reumatismo, resfriado, febre, infecções vaginais, hematuria, insônia, dores de garganta, dores de cabeça³⁵, dor de dente³⁶ e também indicada como

cicatrizante e antiséptica³⁷. *In vitro* foram observadas as atividades: antibacteriana³⁸, efeito antinociceptivo³⁹, tripanocidal e analgésica⁴⁰, antiviral e citotóxica⁴¹, anticolinesterásica⁴², anti-inflamatória⁴³, mutagênica⁴⁴, protetora da mucosa gástrica⁴⁵.

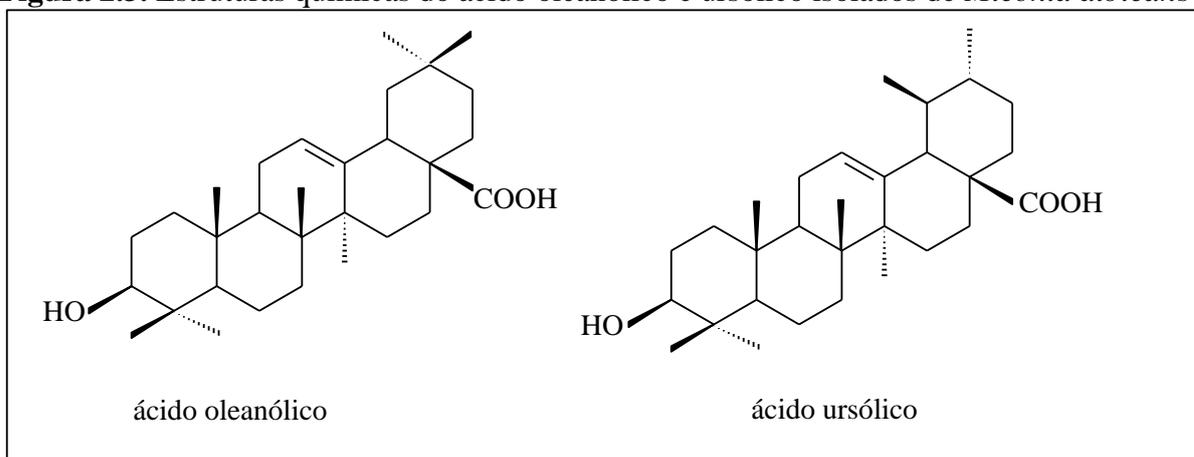
2.3. Gênero *Miconia*

O gênero *Miconia* é um dos maiores representantes da família Melastomataceae, contando com aproximadamente 1000 espécies, as quais se distribuem ao longo da América tropical. No Brasil este gênero é representado por cerca de 250 espécies⁴⁶.

Apesar do gênero ainda ser pouco conhecido em relação ao seu potencial químico, estudos mostram que suas espécies apresentam possibilidades para o isolamento de substâncias com potencial biológico.

Estudos realizados com *Miconia albicans* permitiram o isolamento e a identificação estrutural de dois triterpenos: ácido ursólico e oleanólico (Figura 2.3), os quais estavam presentes no extrato bruto. Estes dois triterpenos apresentaram atividade biológica contra as formas de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*⁴⁷.

Figura 2.3. Estruturas químicas do ácido oleanólico e ursólico isolados de *Miconia albicans*



Estudos realizados com o ácido ursólico relatam que este triterpeno tem apresentado atividades antioxidantes⁴⁸.

Na China, em 1995, foi realizado um estudo acerca do emprego do ácido oleanólico para o tratamento de doenças hepáticas, incluindo hepatite aguda e crônica, dentre outras. O estudo revelou que este ácido apresentou atividade hepatoprotetora, diminuindo a

necrose de células parenquimatosas do fígado, fibrose, prevenção da cirrose crônica e intensificação da regeneração do fígado⁴⁹.

Também foram descritas atividades antiparasitárias contra espécies de *Plasmodium falciparum*⁵⁰, *Trypanosoma sp*⁴⁰, *Leishmania*⁵¹, atividade biológica contra *Mycobacterium tuberculosis*⁵² potencial atividade antiviral contra HIV⁵³ e antifertilidade⁵⁴.

Estes dois triterpenos ácidos podem atuar em vários estágios no desenvolvimento de tumores, sendo: inibição da tumorigênese, inibição na produção do tumor e indução da diferenciação da célula tumoral, inibição efetiva da invasão de células tumorais e metástase⁵³. Podem induzir a apoptose em células tumorais além de prevenirem a transformação maligna das células normais⁵⁵.

Além das inúmeras atividades biológicas citadas anteriormente, um estudo realizado com o ácido ursólico demonstrou ainda que este triterpeno contribui de forma significativa para a formação do tecido ósseo. Isso ocorre porque este ácido possui potencial anabólico, o que acaba por estimular a diferenciação de osteoblastos, contribuindo assim para a formação óssea⁵⁶.

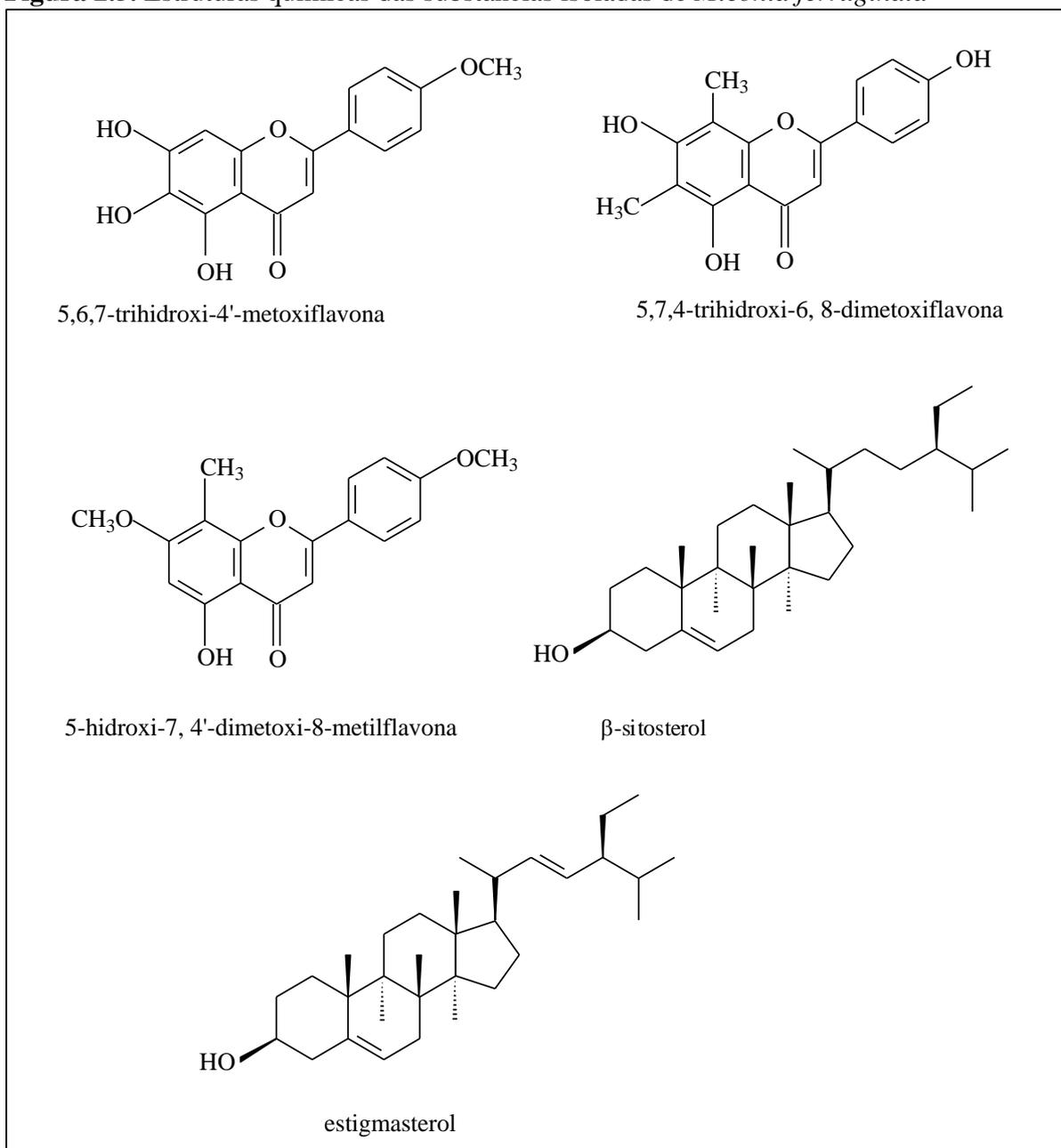
Recentemente, um estudo fitoquímico realizado com *Miconia ferruginata* (Figura 2.4) levou ao isolamento e identificação de sete metabólitos secundários.

Figura 2.4. Foto de *Miconia Ferruginata*



Das substâncias encontradas nesta espécie, dois são triterpenos: ácido ursólico e ácido oleanólico (Figura 2.3), dois esteróides (β -sitosterol e estigmasterol) e três flavonóides (5,7,4'-trihidroxi-6,8-dimetilflavona, 5,6,7'-trihidroxi-4'-metoxiflavona e 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-8-metilflavona) (Figura 2.5)⁵⁷

Figura 2.5. Estruturas químicas das substâncias isoladas de *Miconia ferruginata*

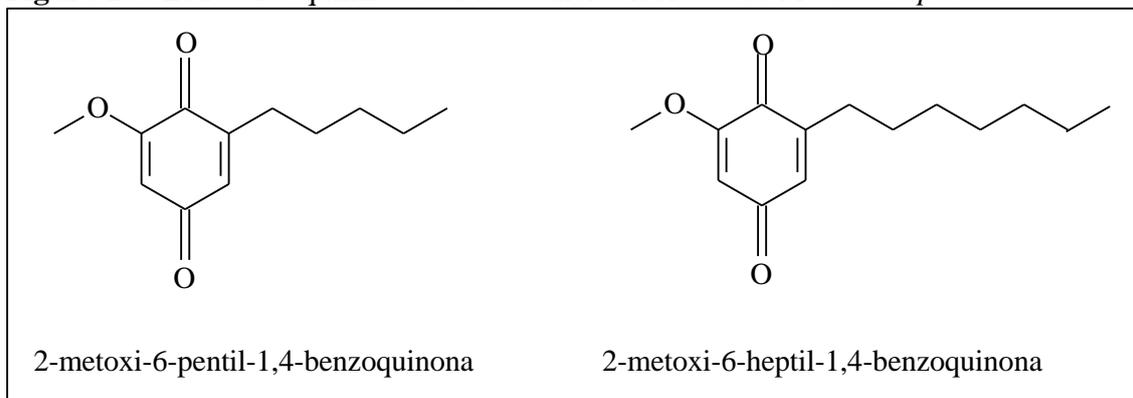


Algumas das substâncias isoladas de *Miconia ferruginata* foram testadas frente às catepsinas B e K. Também foram realizados testes de citotoxicidade *in vitro* frente a três linhagens cancerígenas: MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (côlon) e SF-295 (SNC). Quanto

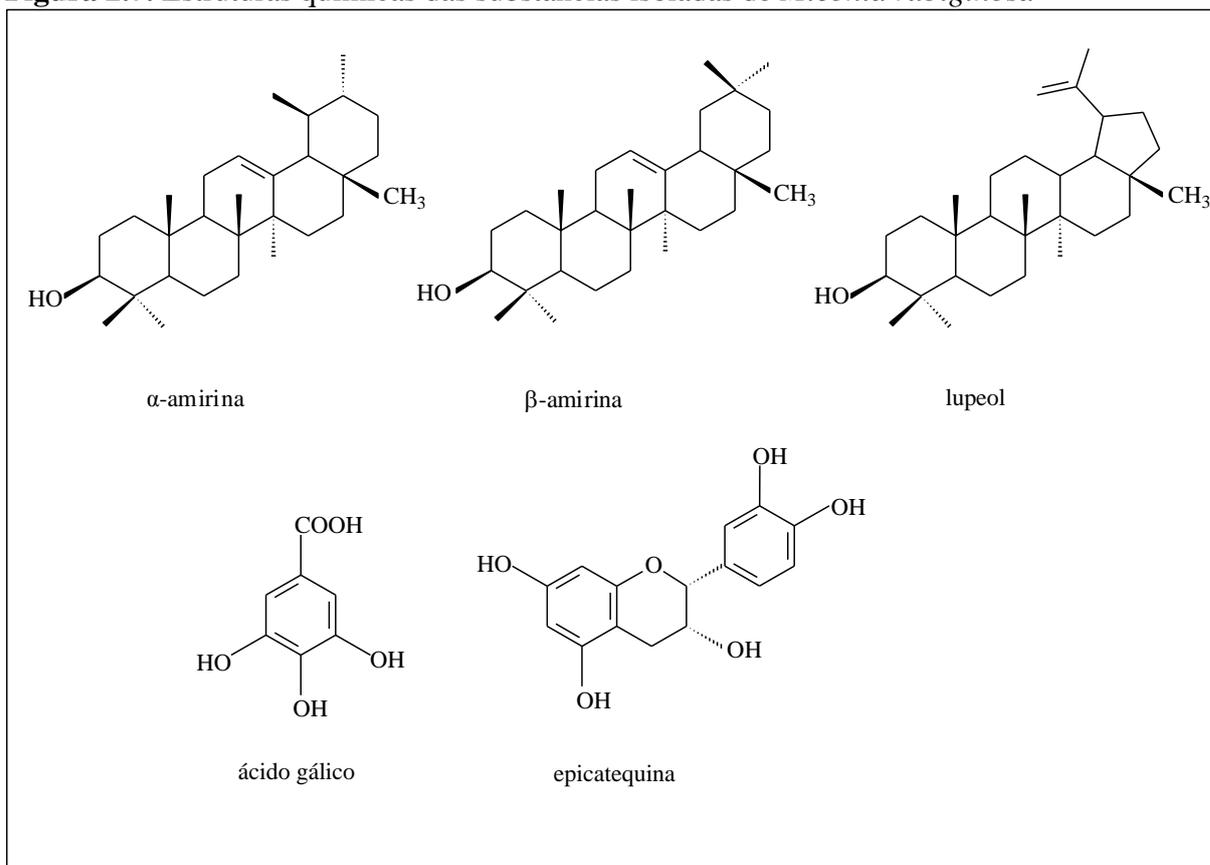
às catepsinas B e K, estas estão relacionadas aos processos cancerígenos e às doenças ósseas, respectivamente⁵⁷.

De *Miconia lepidota* foram isolados duas benzoquinonas⁵⁸ (Figura 2.6).

Figura 2.6. Estruturas químicas das substâncias isoladas de *Miconia lepidota*



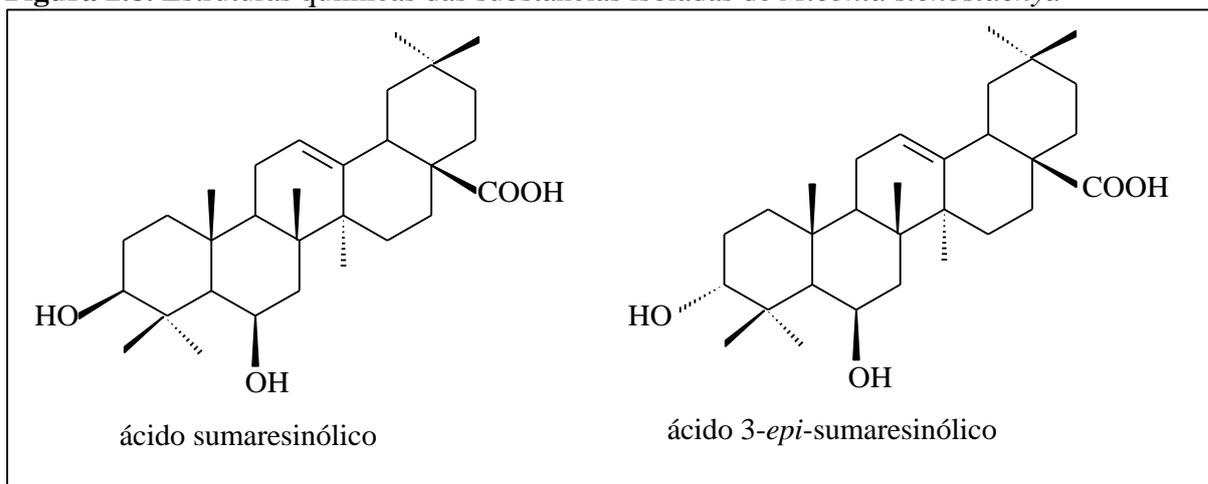
A partir da espécie de *Miconia rubiginosa* foram isolados quatro triterpenos: o ácido oleanólico e o ácido ursólico, os quais estão representados na Figura 2.3, a α -amirina e a β -amirina representados na Figura 2.7. Também foram isoladas a epicatequina, o ácido gálico, o lupeol (Figura 2.7) e o β -sitosterol⁵⁹ representado na (Figura 2.5). Desta espécie isolou-se também seis flavonóides glicosilados: quercetina-3-O- α -ramnopiranosídeo, quercetina-3-O- α -arabinopiranosídeo, quercetina-3-O- α -arabinopiranosídeo, quercetina-3-O- β -arabinopiranosídeo, quercetina-3-O- β -galactopiranosídeo e quercetina-3-O- α -ramnopiranosídeo-(1 \rightarrow 4)-O- β -galactopiranosídeo⁶⁰.

Figura 2.7. Estruturas químicas das substâncias isoladas de *Miconia rubiginosa*

Os extratos hexânico, diclorometânico e etanólico desta espécie mostraram efeitos analgésicos significativos. Além disso, a avaliação da atividade antimicrobiana utilizando a técnica de difusão de poço realizada frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* e *Candida albicans* mostrou que os extratos etanólicos foram os mais ativos³⁴. O fracionamento do extrato diclorometânico levou ao isolamento dos ácidos ursólico e oleanólico (Figura 2.3) como componentes majoritários.

De *Miconia stenostachya* foram isolados dois triterpenos⁶¹, cujas estruturas químicas estão representadas na Figura 2.8. Os extratos hexânico, diclorometânico e etanólico de *Miconia stenostachya* também foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* e *Candida albicans*. No entanto, os extratos demonstraram atividade apenas frente ao micro-organismo *Candida albicans*³⁴.

Figura 2.8. Estruturas químicas das substâncias isoladas de *Miconia stenostachya*



2.4. Gênero *Tibouchina*

O gênero *Tibouchina* está distribuído em regiões tropicais e subtropicais das Américas e conta com cerca de 350 espécies⁶². É um gênero neotropical concentrado especialmente no sudeste do Brasil estendendo-se desde o México e as Antilhas até o norte da Argentina⁶³. Apresenta espécies arbóreas e arbustivas que são popularmente conhecidas como quaresmeiras ou manacás e geralmente apresentam como único recurso para seus visitantes, o pólen⁶⁴. Algumas espécies, no entanto, produzem néctar⁶⁵ sendo visitados por abelhas, pássaros, morcegos e roedores⁶⁶.

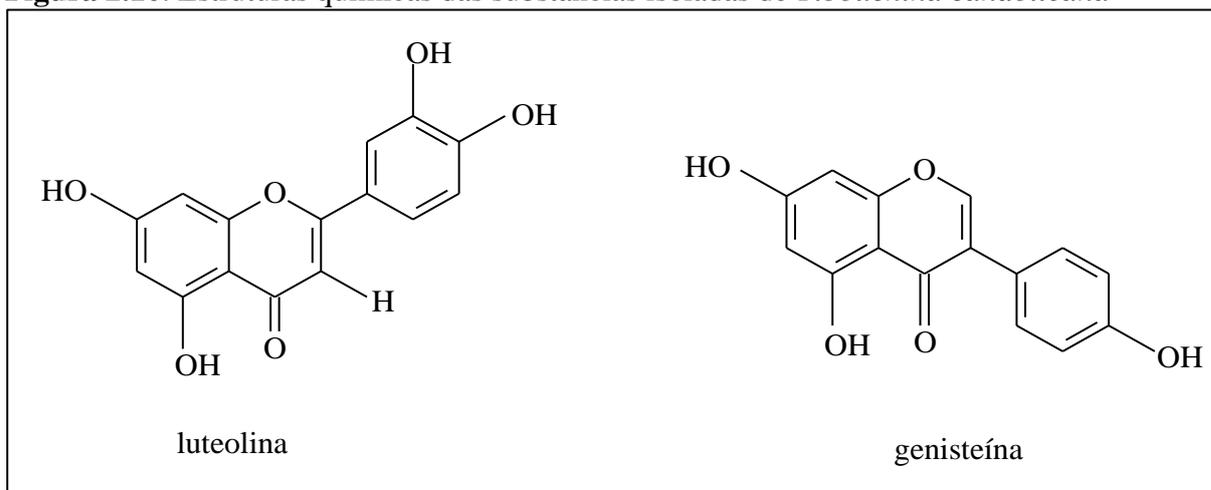
O gênero *Tibouchina* apresenta valor econômico já que suas espécies possuem flores elegantes e com colorações chamativas, podendo ser utilizadas na ornamentação de praças e parques. A Figura 2.9 apresenta a foto de uma espécie pertencente ao gênero *Tibouchina*.

Figura 2.9. Foto de *Tibouchina granulosa*



Os poucos estudos realizados com as algumas espécies de *Tibouchina* mostram que já foi possível isolar algumas substâncias. Estes estudos evidenciam a presença de taninos^{67, 68, 69}, flavonóides^{70, 71}, benzoquinonas⁷², e de antocianinas^{73, 74}. Além disso, os compostos isolados dos extratos brutos de *Tibouchina* têm apresentado atividade antifúngica⁷¹, antioxidante^{75, 76} e antimicrobiana^{70, 77}.

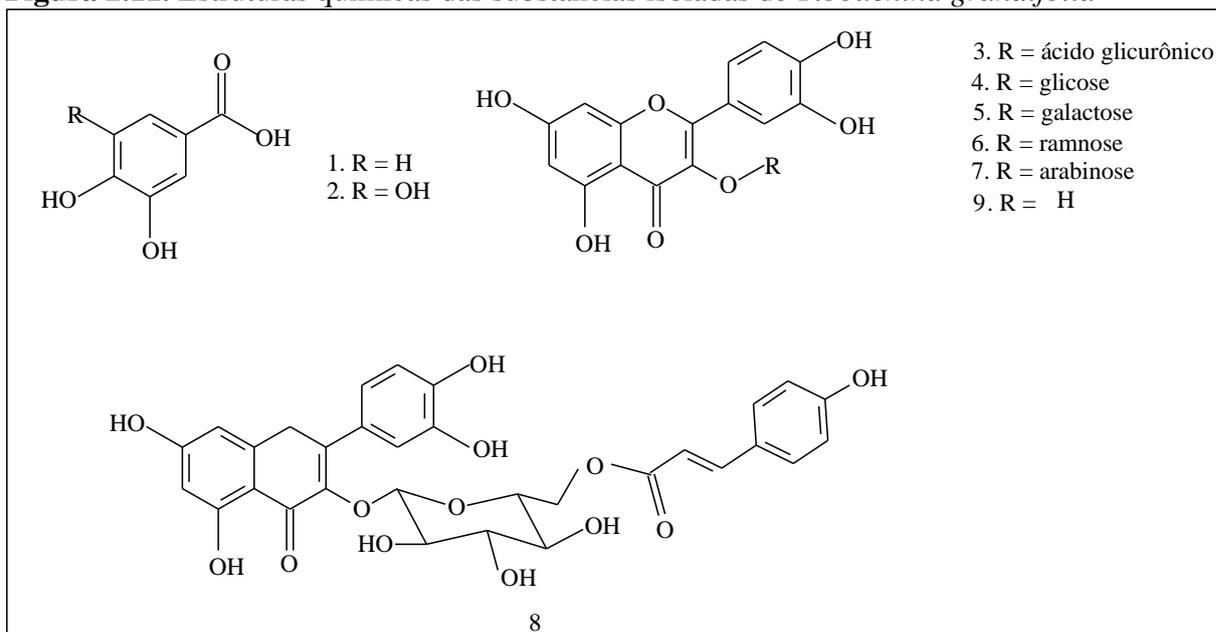
Em 2011, um estudo fitoquímico realizado pela primeira vez com *Tibouchina candolleana* permitiu a identificação de sete substâncias, das quais apenas quatro foram isoladas. Do extrato n-hexânico foi possível identificar três substâncias: β -sistosterol (Figura 2.5), β -amirina e α -amirina (Figura 2.7). O fracionamento do extrato etanólico levou ao isolamento e identificação de dois flavonóides: a luteolina e a genistéina (Figura 2.10). O extrato em cloreto de metileno revelou a presença de uma mistura entre dois ácidos: ácido ursólico e ácido oleanólico (Figura 2.3). Posteriormente, as substâncias isoladas e os extratos n-hexânico, cloreto de metileno e etanólico foram submetidos a testes antimicrobianos utilizando bactérias endodônticas. Os ácidos ursólico e oleanólico foram os que mostraram maior atividade frente às bactérias⁷⁰.

Figura 2.10. Estruturas químicas das substâncias isoladas de *Tibouchina candolleana*

Os extratos n-hexânico, diclorometânico e etanólico da espécie vegetal *Tibouchina stenoscarpa* foram avaliados quanto à atividades antimicrobianas frente a alguns micro-organismos bucais. Os micro-organismos utilizados no estudo da atividade antimicrobiana foram: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus salivarius* (ATCC 25975), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478), *Enterococcus faecalis* (ATCC 4082) e *Lactobacillus casei* (ATCC 11578). O extrato em diclorometano foi o que demonstrou maior inibição frente aos micro-organismos testados⁷⁷.

Um estudo realizado com *Tibouchina grandifolia*, a qual é popularmente conhecida como “orelha de onça” e cujo chá é usado para a cicatrização de feridas, levou ao isolamento de nove substâncias (Figura 2.11). As substâncias isoladas foram: (1) ácido protocatéurico, (2) ácido gálico, (3) quercetina-3-O-β-D-glicuronídeo, (4) quercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo, (5) quercetina-3-O-β-D-galactopiranosídeo, (6) quercetina-3-O-α-L-ramnopiranosídeo, (7) quercetina-3-O-β-L-arapiranosídeo, (8) quercetina-3-O-β-D-(6''-E-p-cumaroil)-glicopiranosídeo e a quercetina (9)⁷¹.

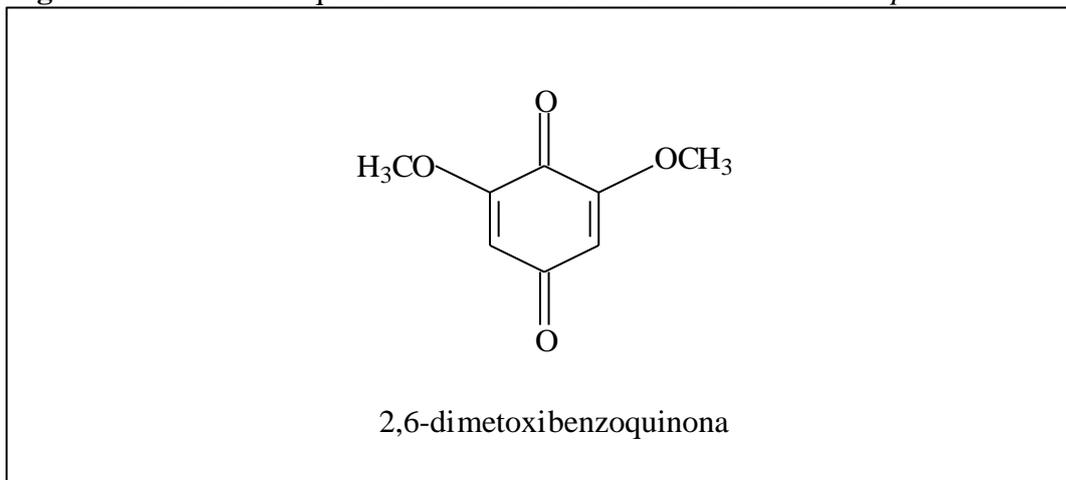
Figura 2.11. Estruturas químicas das substâncias isoladas de *Tibouchina grandifolia*



As substâncias isoladas foram investigadas quanto à atividade antifúngica frente ao fungo *Cladosporium cucumerinum*. O bioensaio demonstrou que as substâncias 6 e 8 se mostraram ativas em concentrações de 100 μ g e 50 μ g⁷¹.

Na busca por agentes anticancerígenos naturais, foi identificado, no tronco de *Tibouchina pulchra* a 2,6-dimetoxibenzoquinona⁷² cuja estrutura esta demonstrada na Figura 2.12.

Figura 2.12. Estrutura química da substância isolada de *Tibouchina pulchra*



Tibouchina semidecandra é um arbusto que apresenta flores roxas escuras e cresce em áreas geladas ao redor do mundo. Esta espécie apresenta potencial para extração de corantes naturais e é tradicionalmente usada tanto para fins medicinais quanto para fins alimentares⁷⁴. O principal pigmento da flor é a antocianina, que é solúvel em água e não tóxica. Há relatos que evidenciam o uso seguro dessa substância como suplementos alimentares⁷⁸.

Esta espécie é rica em taninos, principalmente em taninos oligoméricos hidrolisáveis. Um estudo fotoquímico realizado com folhas de *Tibouchina semidecandra* COGN levou à elucidação da estrutura e ao isolamento de alguns taninos hidrolisáveis. Foram isolados os dímeros nobotaninos A e F, o monômero nobotanino D e a casuarictina, cujas estruturas estão representadas nas figuras 2.13 e 2.14, respectivamente⁶⁹.

Figura 2.13. Estruturas químicas dos nobotaninos A, D e F isolados de *Tibouchina semidecandra* COGN

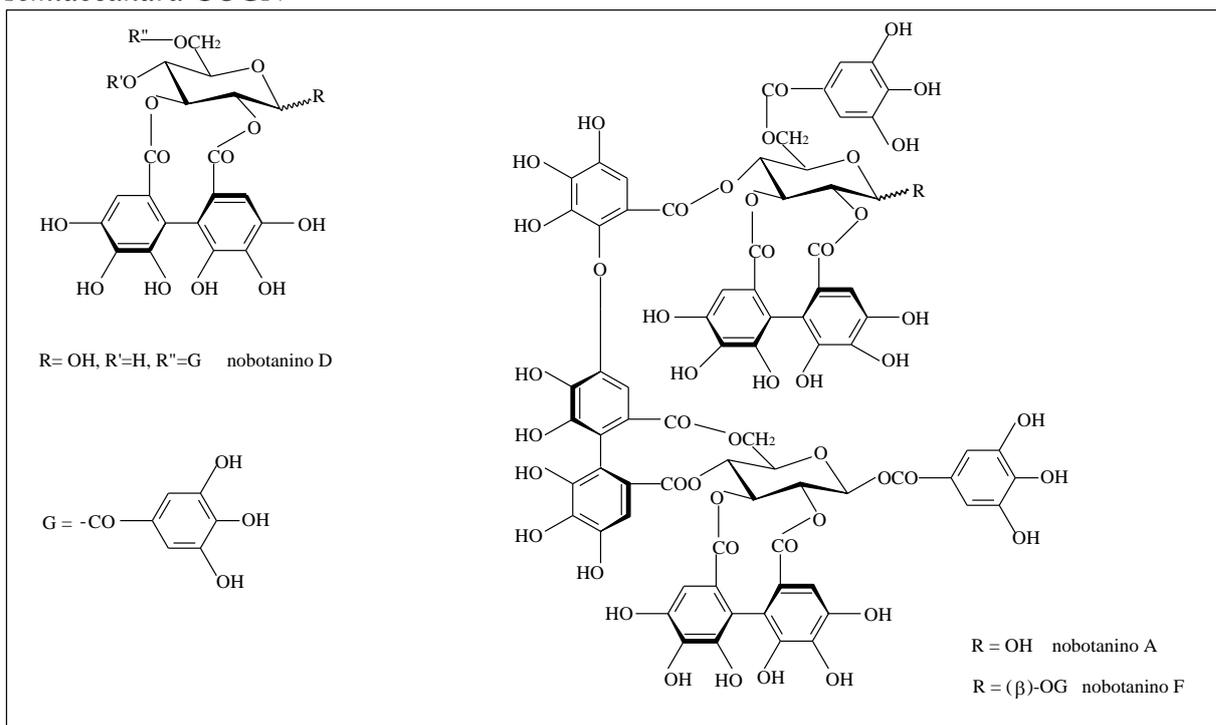
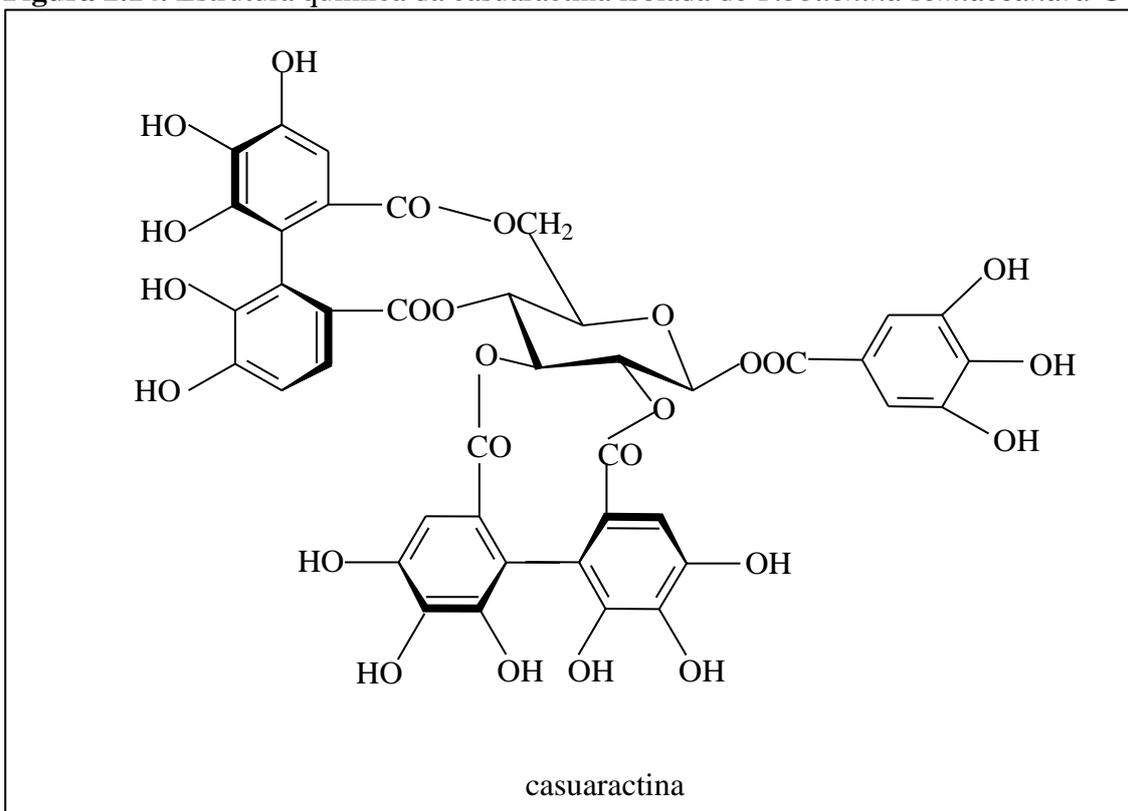


Figura 2.14. Estrutura química da casuaractina isolada de *Tibouchina semidecandra* COGN



Uma análise mais aprofundada do extrato das folhas desta planta resultou no isolamento de um dímero chamado de nobotanino B (Figura 2.15) e de um trímero de estrutura relacionada, o nobotanino E⁶⁹ o qual está representado na Figura 2.16.

Figura 2.15. Estrutura química do nobotanino B isolado de *Tibouchina semidecandra* COGN

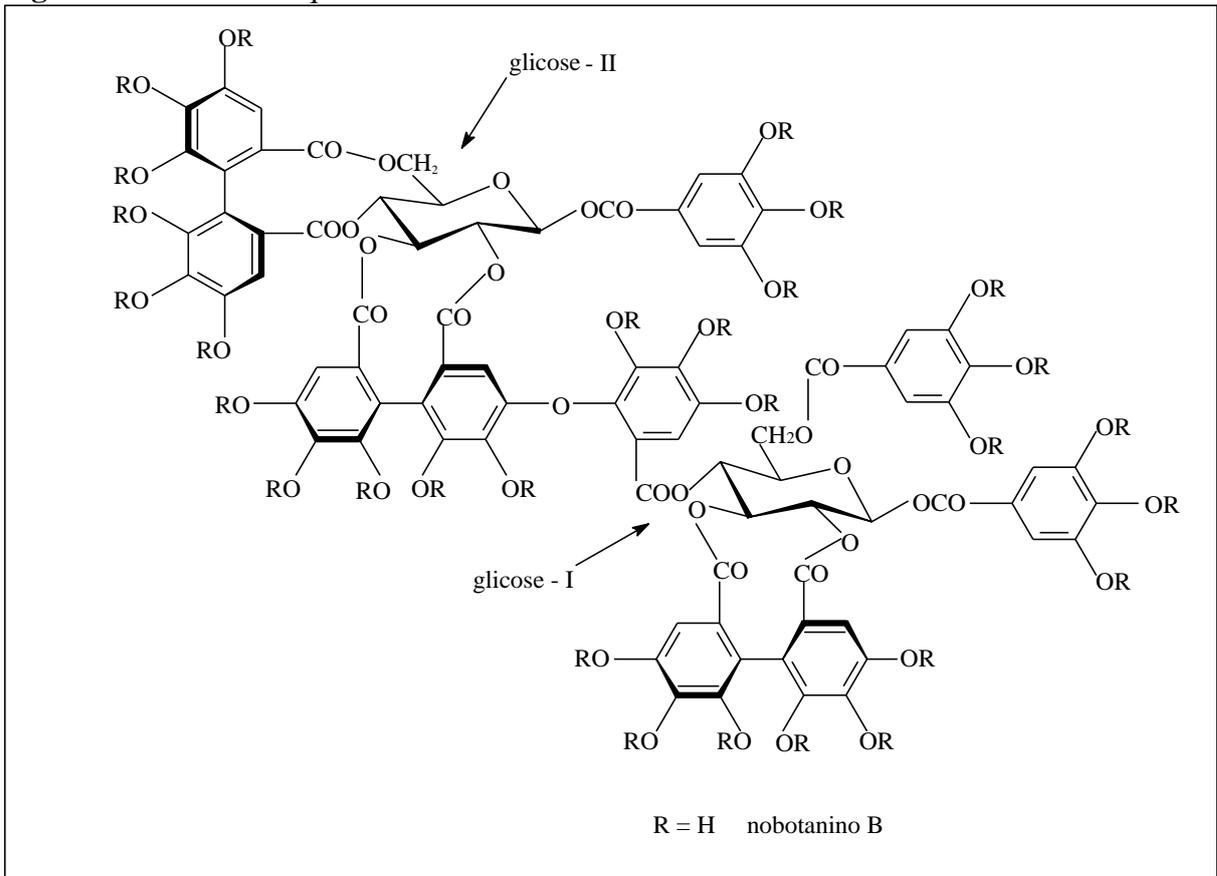
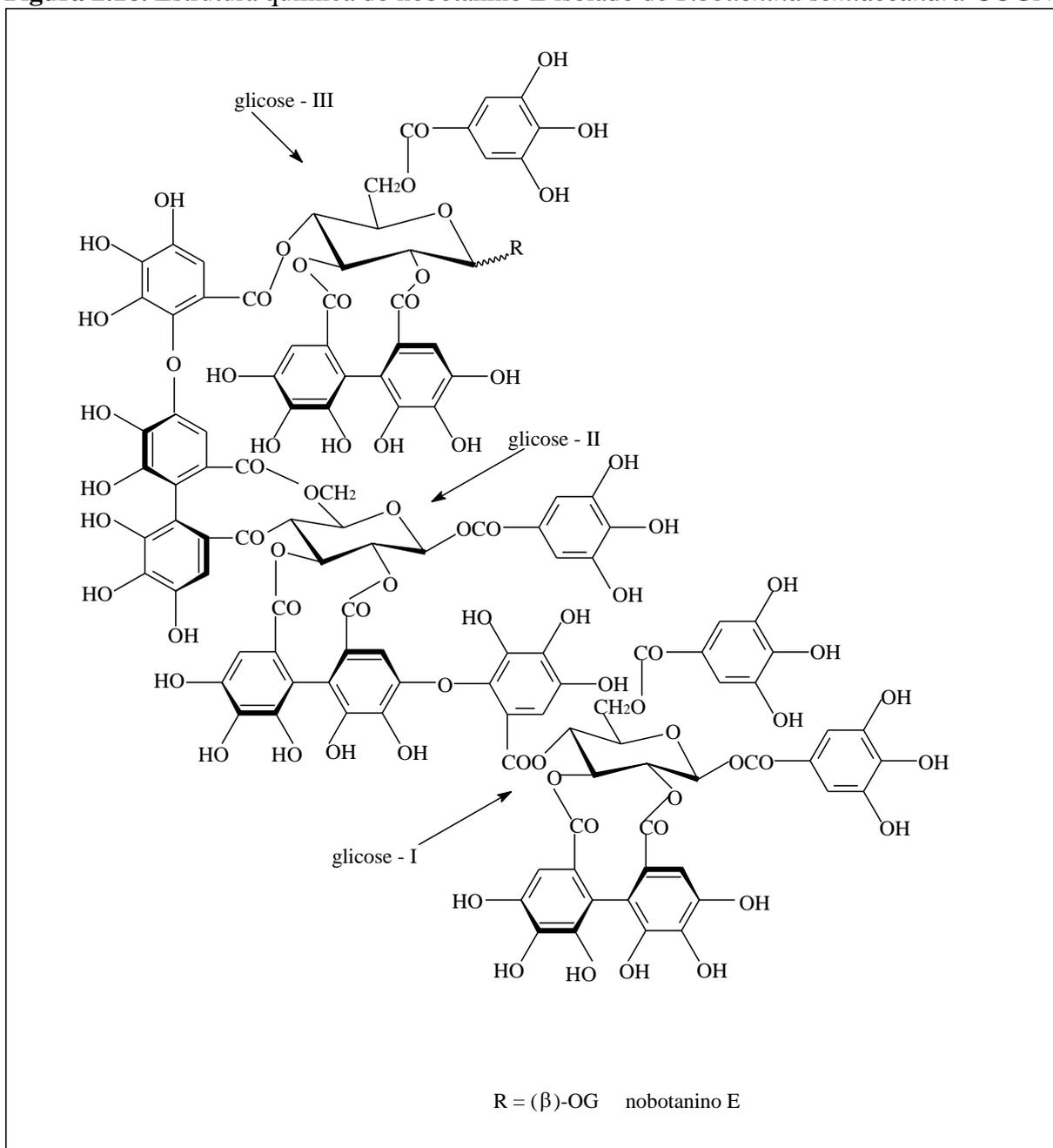
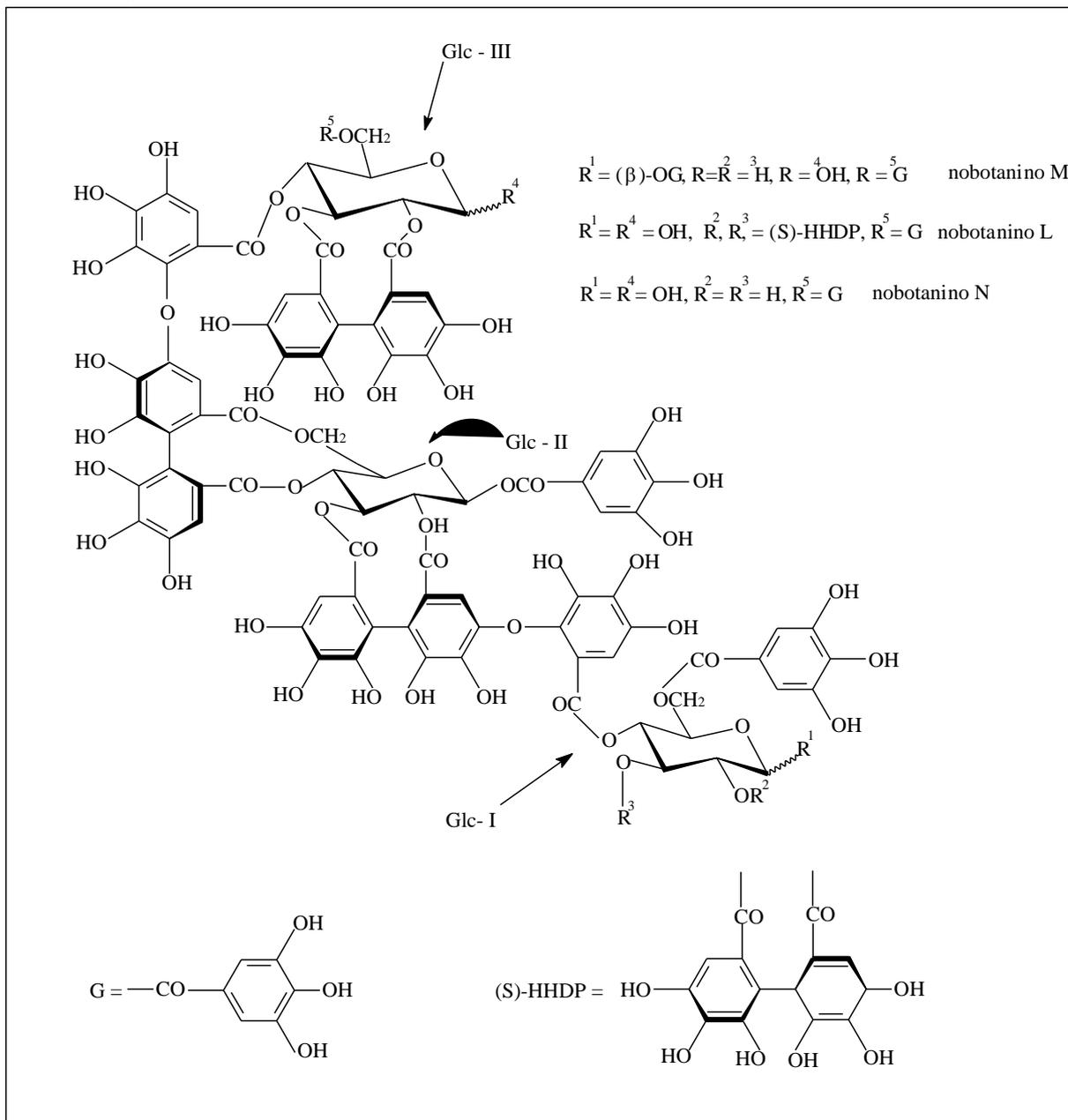


Figura 2.16. Estrutura química do nobotanino E isolado de *Tibouchina semidecandra* COGN



Em outro estudo, realizado como extrato aquoso acetônico das folhas de *Tibouchina semidecandra*, novos taninos chamados de nobotanino L, M e N (Figura 2.17) foram isolados⁶⁷.

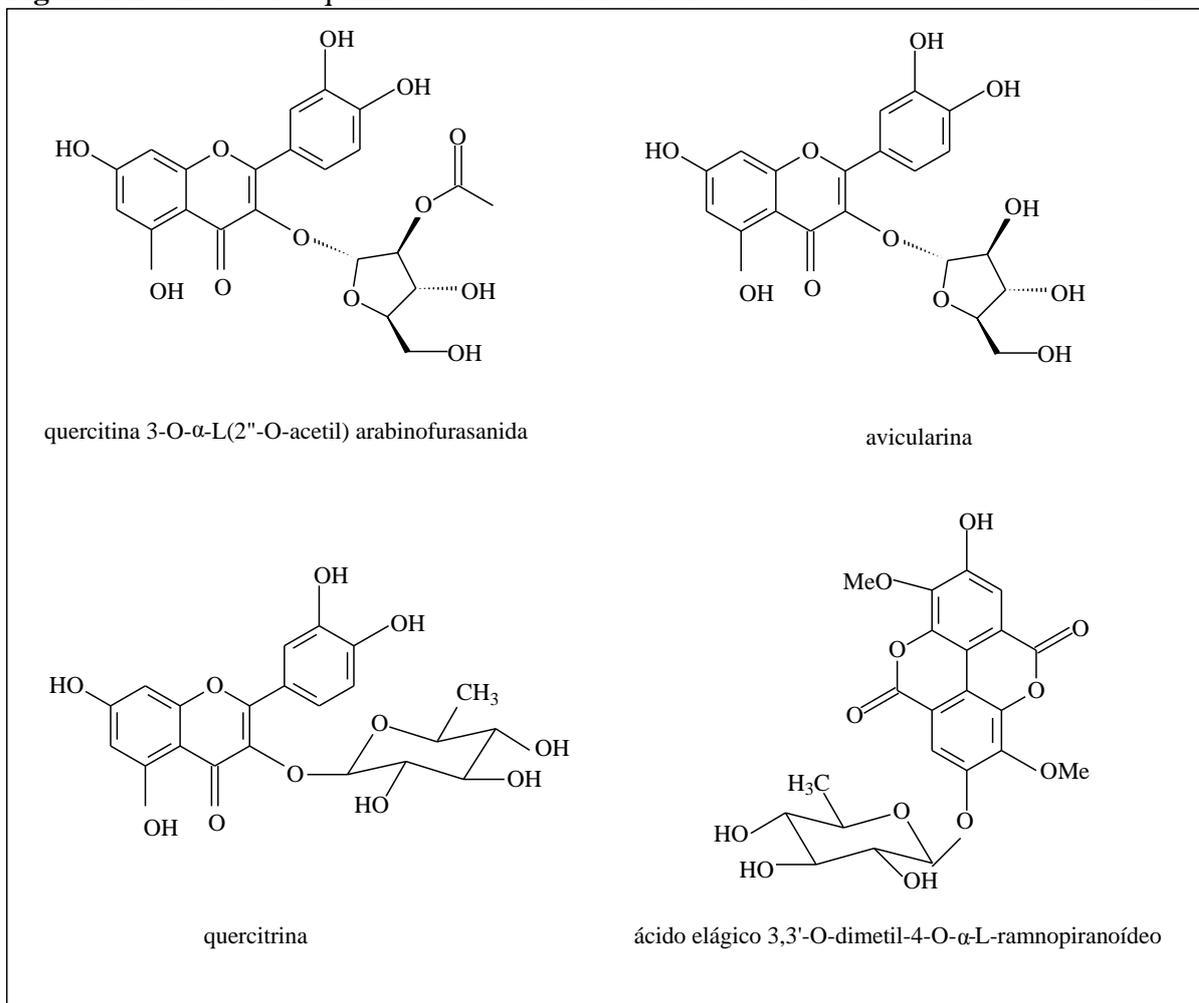
Figura 2.17. Estruturas químicas dos nobotaninos L, M e N isolados de *Tibouchina semidecandra*



Em 2010 foi realizado estudo fitoquímico com as folhas secas e as cascas do caule de *Tibouchina semidecandra* L e pela primeira vez avaliou-se a bioatividade desta planta. A partir do extrato em acetato de etila das folhas foi possível identificar quatro flavonóides: a quercetina, a qual já foi identificada nos extratos de *Tibouchina grandifolia* (Figura 2.11), aquercetina3-O- α -L-(2''-O-acetil) arabinofuranosida, aviculariana e a quercitrina (Figura 2.18). Dos extratos da casca do caule foi isolado o ácido elágico3,3'-O-dimetil-4-O- α -L-ramnopiranosídeo (Figura 2.18)⁶⁹. Sendo que este último, juntamente com quercetina 3-O- α -

L-(2''-O-acetil) arabinofuranosida e a quercitrina foram isolados pela vez a partir desta espécie⁷⁵.

Figura 2.18. Estruturas químicas das substâncias isoladas de *Tibouchina semidecandra* L



Os ensaios biológicos mostraram que os polifenóis isolados e o extrato de acetato de etila possuem fortes capacidades antioxidantes, indicando que a quercetina foi a que apresentou maior capacidade antioxidante⁷⁵.

De *Tibouchina multiflora* foram isolados dois taninos hidrolisáveis: o nobotanino O e o nobotanino P⁶⁸, os quais estão representados nas Figuras 2.19 e 2.20, respectivamente.

Figura 2.19. Estrutura química do nobotanino O isolado de *Tibouchina multiflora*

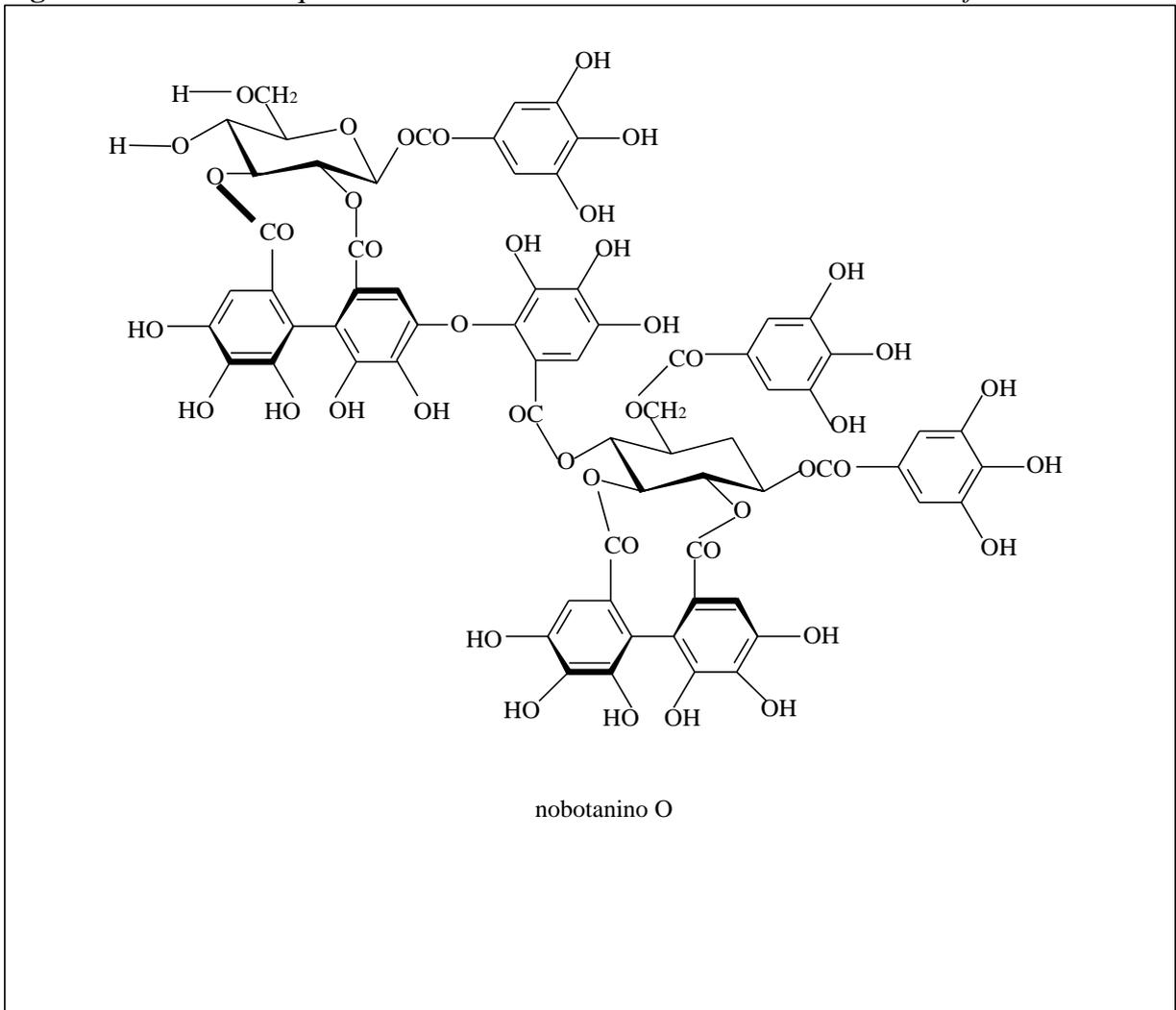
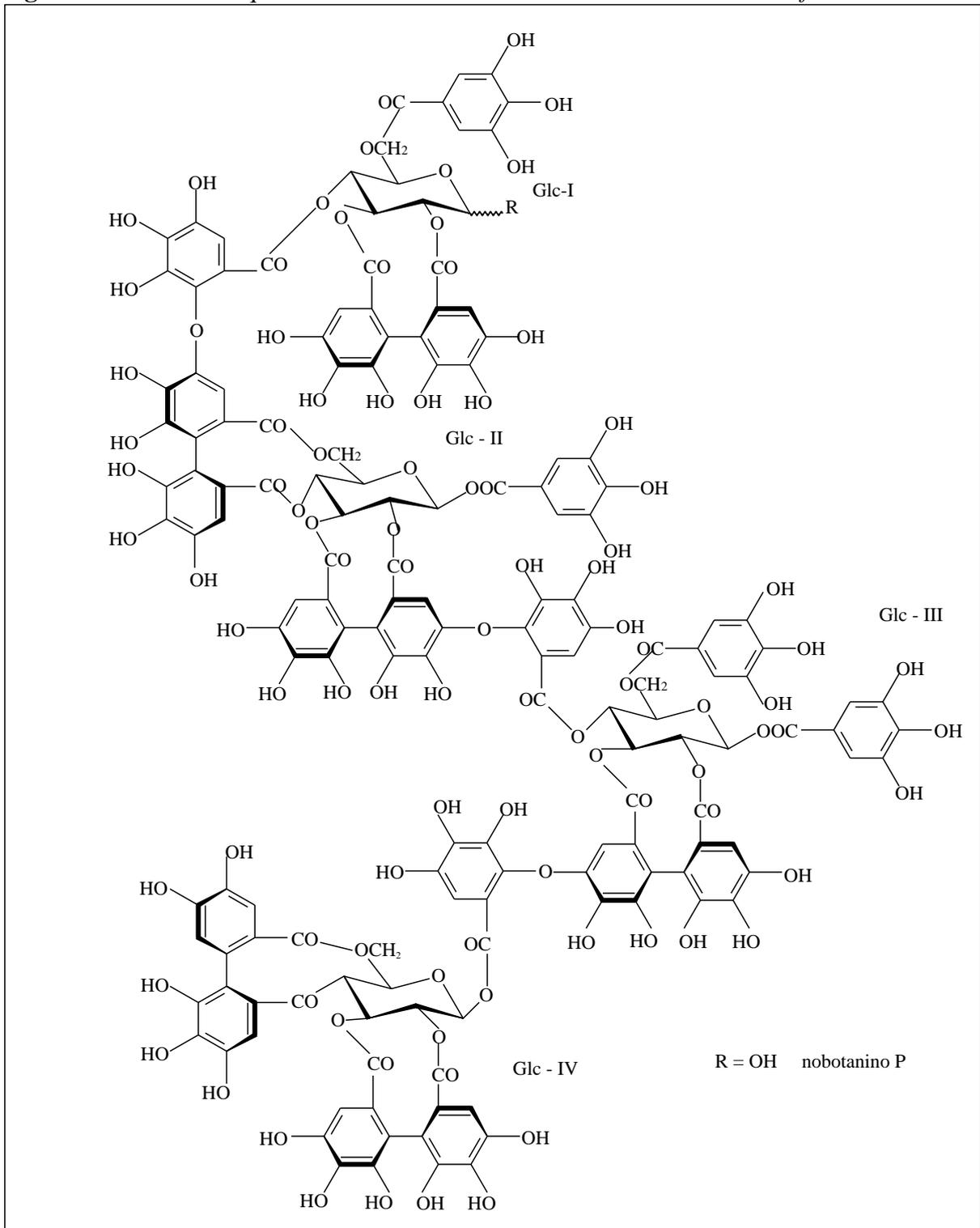


Figura 2.20. Estrutura química do nobotanino P isolado de *Tibouchina multiflora*



2.5. Ensaio de Letalidade com *Artemia salina* Leach

Artemia salina é um microcrustáceo da ordem Anostraca que vive em água salgada e serve como alimento vivo para peixes⁷⁹. Esta espécie tem a habilidade de produzir cistos e náuplios. Os cistos apresentam diâmetro médio de 250 μm , podem ser armazenados a seco, suportando o vácuo. Os náuplios recém-eclodidos possuem 450 μm de comprimento e uma artêmia adulta possui corpo alongado, medindo cerca de 10 mm de comprimento⁸⁰.

Os ovos de *A. salina* Leach são comercializados em lojas de animais a um baixo custo e quando colocados em água marinha eclodem dentro de 48h gerando quantidade de larvas para o uso experimental⁶.

Figura 2.21. Foto do microcrustáceo de água salgada *Artemia salina*⁸¹



Em geral, os compostos bioativos são tóxicos às larvas de *A. salina*. Assim, a letalidade a este microcrustáceo pode ser utilizada como um teste preliminar rápido e simples durante o isolamento de produtos naturais⁸².

Há na literatura diversos trabalhos que apresentam uma boa correlação entre os ensaios de toxicidade a esta espécie e distintas atividades biológicas, tais como, antifúngica, antiviral, antimicrobiana, parasiticida, antitumoral, tripanossomicida, dentre outras⁸³.

Uma das principais metodologias empregadas nos testes de *Artemia salina* para avaliação de extratos e frações de produtos naturais é a que foi proposta por Meyer em 1982. Esta metodologia é avaliada tanto como uma das mais citadas e usadas quanto a mais utilizada para adaptações. Pode ser considerada uma referência para estabelecer uma correlação entre a atividade tóxica sobre a *Artemia salina* e o ensaio de atividade antitumoral⁸⁴.

Meyer e seus colaboradores estabeleceram uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, DL_{50} , apresentada por extratos de plantas sobre larvas de *Artemia salina*. Desde então, considera-se que quando são verificados valores acima de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, estas são consideradas atóxicas e quando menor que $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ são consideradas tóxicas⁸⁵.

Estudo realizado no litoral catarinense com 19 espécies de algas marinhas pertencentes aos filos Chlorophyta, Phaeophyta e Rhodophyta mostrou que 25 dos 26 extratos etanólicos testados frente à *Artemia salina* apresentaram toxicidade em pelo menos uma das concentrações testadas⁸⁶.

O teste de letalidade em *Artemia salina* L. também foi utilizado para avaliar a citotoxicidade do extrato hidroalcolólico obtido das folhas de *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae), a qual é uma erva nativa da América Tropical. O ensaio mostrou que o extrato testado apresentou atividade quando testados frente às larvas, sendo a DL_{50} igual a $224,56 \mu\text{g mL}^{-1}$ ⁸⁷.

Além de correlacionar a atividade tóxica sobre o microcrustáceo e o ensaio de atividade antitumoral, esta metodologia ainda tem sido empregada como bioindicadora e biomonitora da qualidade da água, como por exemplo, na determinação da citotoxicidade de pesticidas organofosforados⁸⁸.

Portanto, o ensaio de letalidade em *Artemia salina* mostra-se como uma ferramenta útil e versátil. Primeiro porque pode ser utilizada na avaliação e fracionamento monitorado para bioatividades, podendo levar ao isolamento de diversos produtos naturais, incluindo várias classes, tais como flavonóides, triterpenos, esteróis e compostos aromáticos simples, poupando a necessidade de ensaios antitumorais caros ou em animais. Segundo, porque este ensaio, segundo a literatura, está sendo utilizado em várias outras atividades biológicas confirmando assim a sua sensibilidade e versatilidade em estudos de toxicidade⁸⁴.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

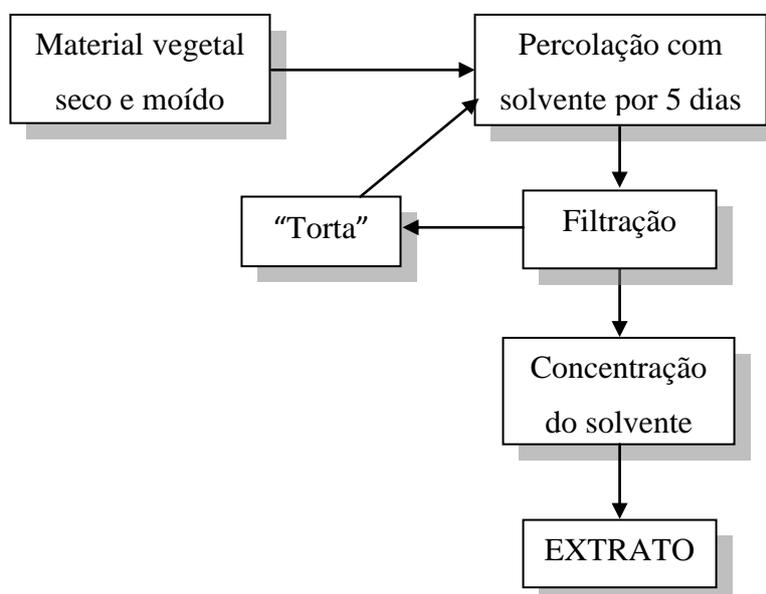
3.1. Coleta do material botânico

As folhas de *Miconia ferruginata* e de *Tibouchina granulosa* foram coletadas, respectivamente, nos meses de janeiro e fevereiro de 2013. Sendo que as folhas de *Tibouchina granulosa* foram coletadas na zona urbana da cidade de Anápolis-GO e as folhas de *Miconia ferruginata* foram coletadas no campus da Universidade Estadual de Goiás (UEG) também localizado na cidade de Anápolis.

3.2. Obtenção dos extratos brutos

O material vegetal foi seco em temperatura ambiente e pulverizado em moinho Willey. A extração do material moído foi realizada por percolação em etanol à temperatura ambiente, seguida pela evaporação do solvente em banho-maria a 60°C, obtendo-se os extratos brutos, conforme representado na Figura 3.1.

Figura 3.1. Obtenção dos extratos de *M. ferruginata* e *T. granulosa*

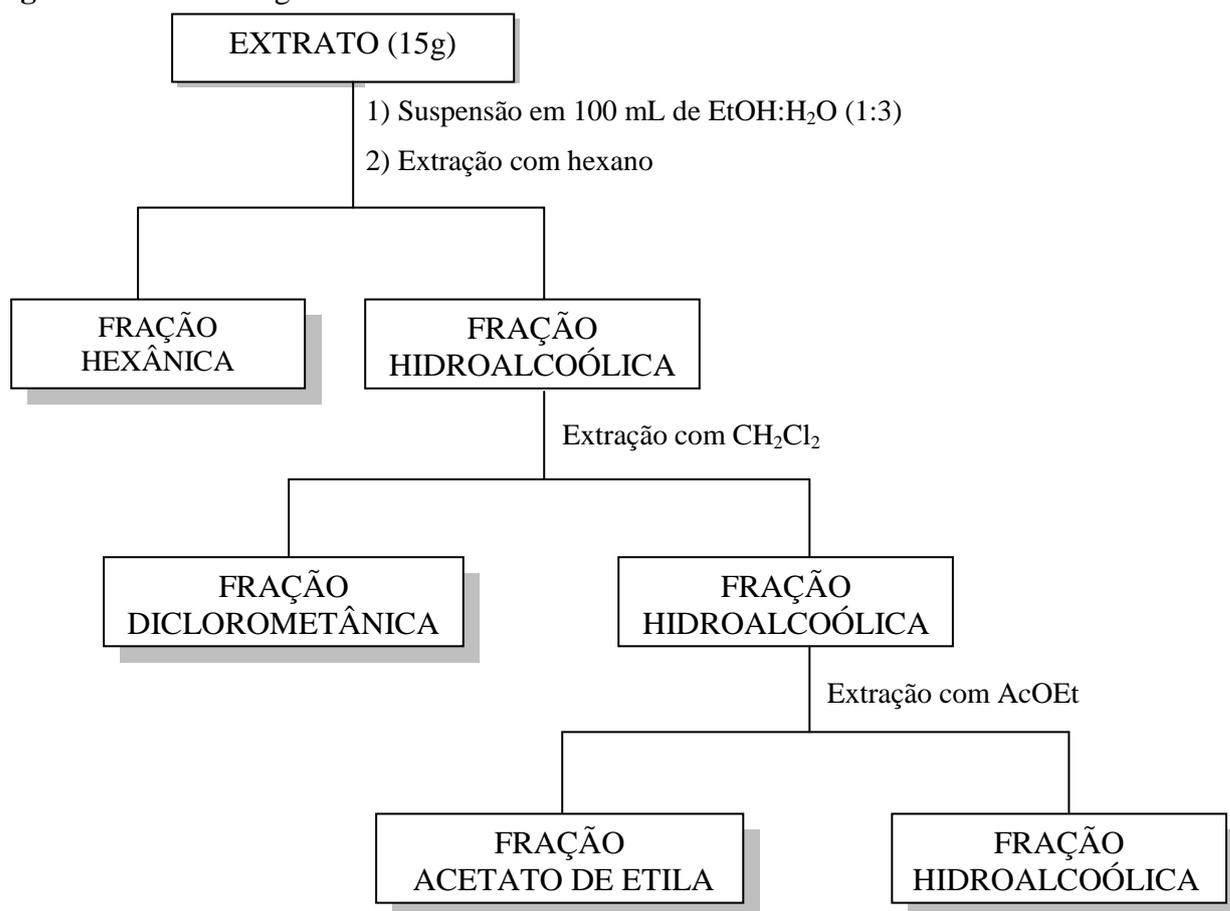


3.3. Fracionamento dos extratos e obtenção das frações

Os extratos etanólicos de *Miconia ferruginata* e *Tibouchina granulosa* foram fracionados através de partição líquido-líquido, utilizando-se solventes em ordem crescente de

polaridade: hexano, diclorometano e acetato de etila. Após o fracionamento, os solventes foram evaporados em temperatura de aproximadamente 50°C, originando as frações hexânicas, diclorometânicas, acetato de etila e hidroalcoólica, conforme representado na Figura 3.2 .

Figura 3.2. Metodologia utilizada no fracionamento dos extratos.



3.4. Preparação das amostras e ensaio de Letalidade em *Artemia salina* Leach.

O ensaio de letalidade em *Artemia salina* Leach foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Meyer (1982), com algumas modificações.

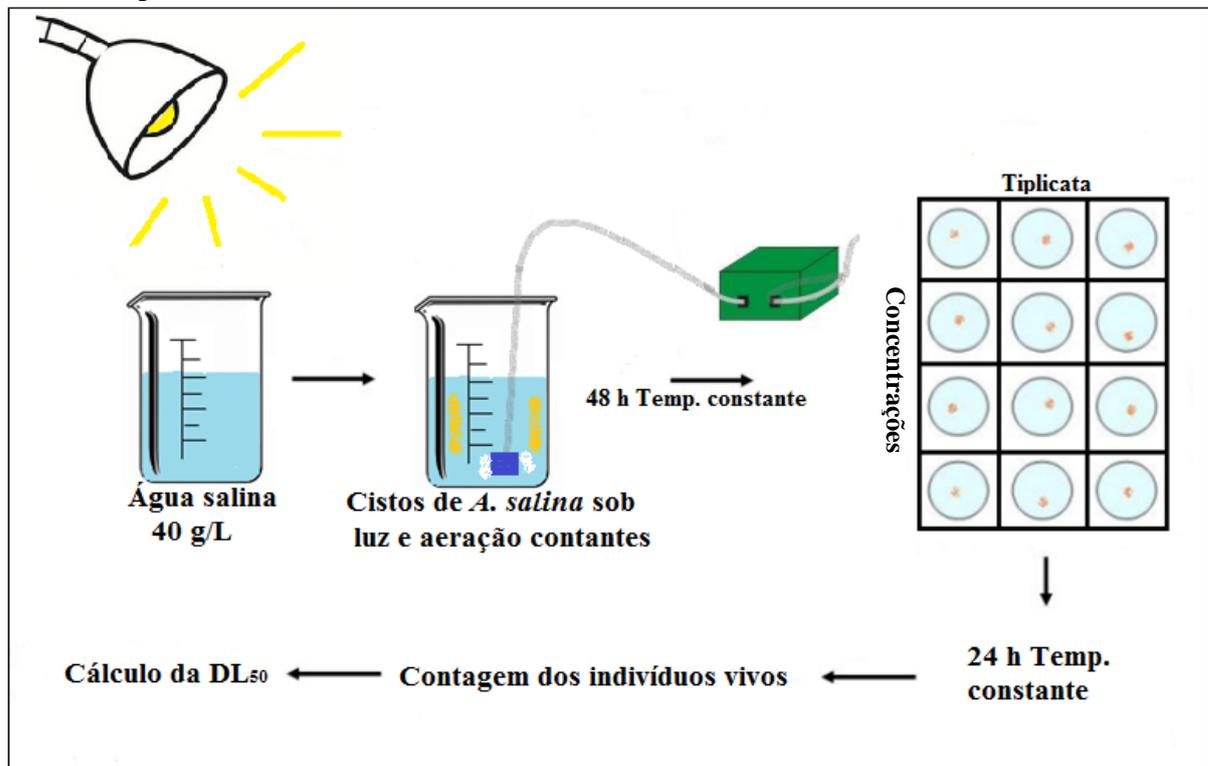
A execução deste teste se deu conforme a Figura 4.2. Os cistos de *Artemia salina* foram colocados para eclodir em uma solução de água e sal marinho a uma concentração de 40 g/L. A solução salina (pH 8-9) foi filtrada, sendo que 1L foi utilizado para a eclosão dos ovos (100 mg) e o restante utilizada para preparo das diluições das amostras a serem testadas. A eclosão dos ovos se deu em temperatura ambiente e sob luz de 100 W por um período de 48h.

No preparo das soluções a serem testadas foram utilizados 40 mg de todas as

amostras, os quais foram transferidos para balões de 10 mL. Devido a baixa solubilidade em água salina, foram adicionados em cada amostra 1,5 mL de DMSO e 3 mL de Tween 80 a 5%. A partir da solução preparada anteriormente (40 mg mL^{-1}) foram realizadas diluições para tubos de ensaio de 10 mL de forma a obter as seguintes concentrações: $1040 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $520 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $260 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e $130 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. O controle negativo (0 mg mL^{-1}) foi preparado utilizando apenas água salina e os reagentes utilizados na solubilização das amostras. Vale lembrar que o teste foi realizado em triplicata.

Após o preparo das soluções, 10 náuplios foram coletados com uma micropipeta e transferidos para os tubos nos quais estavam presentes os extratos e frações nas diferentes concentrações. Os tubos foram deixados em temperatura ambiente por 24 horas. Passado este período, estes foram analisados para registrar a quantidade de larvas vivas. O número de larvas vivas em relação ao aumento da concentração dos extratos e frações foram utilizados para calcular os valores da DL_{50} .

Figura 3.3. Esquema de preparação e execução do teste de Letalidade em *Artemia salina* Leach (adaptado)⁸⁹.



3.5. Cálculo dos valores de DL₅₀

A obtenção da dose que causa letalidade de 50% dos náuplios (DL₅₀) foi feita por cálculos do método PROBIT de análise, através do software estatístico com 95% de confiança.

“O probit é um método que estima com eficiência a dose letal de um indivíduo a 50% (DL₅₀) [...] Estima doses críticas em ensaios de dose-resposta, onde uma determinada droga é administrada em k diferentes doses (níveis), d₁, d₂, . . . , d_k em, respectivamente, m₁, m₂, . . . , m_k indivíduos, obtendo-se como resposta, após um período especificado, y₁, y₂, . . . , y_k indivíduos que mudam de estado (ocorrência de um sucesso, por exemplo, morte). Neste tipo de ensaio uma amostra com indivíduos de uma mesma espécie é selecionada. Tal amostra é dividida em k grupos, cada um com m_i indivíduos, i = 1, 2, . . . , k. Cada dose é aplicada a cada grupo e o número de sucessos por grupo (morte do indivíduo, por exemplo) é contado. Uma informação que é de interesse prático em experimentos de dose-resposta é a medida de Susceptibilidade ou Tolerância de uma unidade experimental ao tratamento a que ela foi submetida. Esta tolerância pode ser entendida como o valor crítico que o tratamento assume no limiar entre sucesso ou fracasso do ensaio, por exemplo, nos experimentos de dose-resposta, ela pode ser entendida como a menor dose possível para matar um determinado indivíduo, ou seja, a dose letal (*lethal dose - DL*) do indivíduo. Esta Tolerância é uma variável aleatória contínua que não pode ser medida diretamente. O que pesquisador tem em mãos são as proporções de sucessos (ou fracassos) para cada grupo do qual foi submetido o tratamento”⁹⁰.

Sendo assim, diante dos valores da DL₅₀ obtidos através deste método, as substâncias testadas em diferentes concentrações serão classificadas tóxicas quando a DL₅₀ for menor que 1000 µg mL⁻¹ e não tóxicas quando a DL₅₀ for maior que 1000 µg mL⁻¹⁸⁵.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Resultados da extração

Os extratos brutos etanólicos das folhas de *M. ferruginata* e *T. granulosa* foram obtidos conforme o procedimento 3.1 descrito na página 36. A Tabela 4.1 apresenta as quantidades de extratos brutos obtidos.

Tabela 4.1. Massa de material vegetal e quantidade de extrato obtido das folhas *M. ferruginata* e *T. granulosa*

<i>Material Vegetal Seco (g)</i>	<i>Solvente</i>	<i>Massa de extrato obtida (g)</i>	<i>Massa de extrato obtida (%)</i>	<i>Código</i>
<i>M. ferruginata</i> (935,22)	Etanol	23,41	2,5	MFFE
<i>T. granulosa</i> (870,65)	Etanol	23,89	2,7	TGFE

M = *Miconia*; F = *ferruginata*; T = *Tibouchina*; G = *granulosa*; F = folha; E = etanol.

4.2. Resultados do fracionamento dos extratos brutos através da partição líquido-líquido

A tabela 4.2 descreve a quantidade inicial dos extratos brutos etanólicos das folhas de *M. ferruginata* e *T. granulosa* utilizados na partição líquido-líquido, bem como o rendimento das frações hexânicas, diclorometânicas, em acetato de etila e das frações hidroalcoólicas após a partição.

Tabela 4.2. Massas obtidas da partição líquido-líquido dos extratos brutos de *Miconia ferruginata* e *Tibouchina granulosa*.

<i>Extrato (g)</i>	<i>Solvente</i>	<i>Massa das frações obtidas (g)</i>	<i>Massa das frações obtidas (%)</i>	<i>Código</i>
<i>M. ferruginata</i> (15)	Hexano	0, 5128	3,4	MFFE-H
	Diclorometano	0, 6163	4,1	MFFE-D
	Acetato de etila	0,4569	3,0	MFFE-A
	Resíduo aquoso	0,738	4,9	MFFE-W
<i>T. granulosa</i> (15)	Hexano	0, 6839	4,5	TGFE-H
	Diclorometano	1, 00	6,6	TGFE-D
	Acetato de etila	1, 4742	9,8	TGFE-A
	Resíduo aquoso	2, 1661	14,4	TGFE-W

M = *Miconia*; F = *ferruginata*; T = *Tibouchina*; G = *granulosa* F = folha; E = etanol; H = hexano; D = diclorometano; A = acetato de etila; W = água

4.3 Avaliação da atividade tóxica de extratos e frações de *Miconia ferruginata*.

O ensaio de toxicidade frente ao microcrustáceo *A. salina* foi realizado com quatro amostras da espécie *Miconia ferruginata*: MFFE, MFFE-H, MFFE-D e MFFE-A.

Conforme demonstrado na Tabela 4.3, observa-se que tanto o extrato bruto quanto as frações de *Miconia ferruginata* apresentaram $DL_{50} < 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 4.3. Avaliação da toxicidade em *A. salina* Leach (DL_{50}) de extratos e frações obtidos de *Miconia ferruginata* e seus respectivos limites do intervalo de confiança de 95%.

<i>Amostras</i>	<i>DL₅₀ (μg mL⁻¹)</i>	<i>Intervalo de confiança 95%</i>	
		<i>Limite inferior</i>	<i>Limite superior</i>
MFFE	328, 425	225, 920	430, 924
MFFE-H	835, 941	712, 773	959, 1095
MFFE-D	571, 153	360, 937	781, 370
MFFE-A	502, 219	376, 825	627, 612

M = *Miconia*; F = *ferruginata*; F = folha; E = etanol; H = hexano; D = diclorometano; A = acetato de etila.

Meyer e seus colaboradores (1982) estabeleceram uma classificação na qual, amostras que apresentam $DL_{50} > 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ são consideradas atóxicas e amostras que $DL_{50} < 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados tóxicas frente ao microcrustáceo *A. salina*. Também descreveram que o bioensaio com *A. salina* não é um ensaio específico para esta ou aquela atividade biológica. Outras correlações utilizando o microcrustáceo *A. salina* já foram determinadas, como é o caso de bioensaios para determinação de atividades inseticidas⁸⁴ e para determinação anti-tripanosoma⁹.

De acordo com McLaughlin (1998), existe uma correlação entre a toxicidade sobre os microcrustáceos *A. salina* e células tumorais humanas⁶.

Assim, os resultados obtidos para os extratos e frações de *M. ferruginata* demonstraram que além da atividade antitumoral as substâncias isoladas a partir desta espécie possam também apresentar outras atividades biológicas, já que os valores da DL_{50} evidenciam que todas as amostras testadas apresentaram toxicidade sobre as larvas de *Artemia salina*.

Diante disso, vale ressaltar que na literatura consultada não foram encontrados estudos que tenham verificado a toxicidade da espécie *Miconia ferruginata* em *A. salina*. No entanto, um estudo realizado com a espécie *Miconia ferruginata* o extrato bruto etanólico e as frações hexânica, diclorometânica e acetato de etila foram submetidos a ensaios de inibição enzimática (*in vitro*) das catepsinas B e K. Os resultados mostraram que todas as amostras, exceto a fração hexânica, inibiram mais de 75% das enzimas⁵⁷.

No mesmo estudo foi avaliada a citotoxicidade *in vitro* da mistura isomérica dos ácidos ursólico e oleanólico, isolada da fração hexânica de *M. ferruginata*, bem como da mistura dos derivados semi-sintéticos ursolato e oleanolato de metila. A citotoxicidade das amostras frente a três linhagens MDA-MB-435 (melanoma), HCT- 8 (cólon) e SF-295 (sistema nervoso central) estão representadas na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Porcentagem de inibição dos triterpenos nas formas ácida e metilada.

<i>Amostra</i>	<i>Linhagem celular</i>		
	<i>MDA-MB-435</i>	<i>HCT- 8</i>	<i>SF-295</i>
Ácido ursólico e ácido oleanólico	15,08%	40,59%	32,98%
Ursolato e oleanolato de metila	98,10%	98,57%	69,89%

Fonte: ⁵⁷

Levando em consideração que valores maiores que 90% são relevantes quanto à inibição do crescimento tumoral, pode-se concluir que a forma metilada apresentou maior citotoxicidade frente às linhagens testadas do que a forma ácida.

4.4 Avaliação da atividade tóxica de extratos e frações de *Tibouchina granulosa*.

O ensaio de toxicidade frente ao microcrustáceo *A. salina* foi realizado com quatro amostras da espécie *Tibouchina granulosa*: TGFE, TGFE-D, TGFE-A e TGFE-W.

Conforme a Tabela 4.5, observa-se que das quatro amostras testadas duas apresentaram resultados significativos, $DL_{50} < 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, e duas apresentaram alta toxicidade frente a *A. salina*.

Tabela 4.5. Avaliação da toxicidade em *A. salina* Leach (DL_{50}) de extratos e frações obtidos de *Tibouchina granulosa* e seus respectivos intervalos de confiança de 95%.

<i>Amostras</i>	$DL_{50} (\mu\text{g mL}^{-1})$	<i>Intervalo de confiança 95%</i>	
		<i>Limite inferior</i>	<i>Limite superior</i>
TGFE	1096, 515	972, 551	1220, 479
TGFE – D	633, 817	488, 202	779, 432
TGFE – A	1331, 549	763, 104	1899,99
TGFE – W	695, 435	583, 671	807, 180

T = *Tibouchina*; G = *granulosa*; F = folha; E = etanol; D = diclorometano; A = acetato de etila; W = água

Também não foram encontrados na literatura estudos realizados com a espécie *Tibouchina granulosa* frente à microcrustáceos de *Artemia salina* Leach. No entanto, estudos realizados com algumas espécies deste gênero têm demonstrado atividades biológicas tais como: antimicrobiana, como é caso de *Tibouchina stenoscarpa*⁷⁷, antifúngica, como é o caso de *Tibouchina grandifolia*⁷¹ e antioxidantes como é o caso da espécie *Tibouchina semidecandra* L⁷⁵.

5. CONCLUSÃO

A avaliação da atividade tóxica das espécies *M. ferruginata* e *T. granulosa* frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach corroboraram para o fato de que esta é realmente uma técnica muito sensível.

O teste demonstrou que o extrato etanólico e as frações hexânica, diclorometânica e em acetato de etila da espécie *M. ferruginata* se mostraram ativas frente ao microcrustáceo *A. salina* Leach já que apresentaram $DL_{50} < 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Quanto à espécie *Tibouchina granulosa* foi observado que das quatro amostras testadas, duas apresentaram toxicidade frente ao microcrustáceo, como foi o caso da fração diclorometânica e da fração hidroalcoólica. As outras duas amostras, extrato etanólico e a fração em acetato de etila não apresentaram toxicidade frente ao microcrustáceo *A. salina* Leach.

Sendo assim, torna-se possível a realização de estudos mais aprofundados em relação às espécies estudadas, já que apresentaram toxicidade frente ao microcrustáceo *A. salina* Leach.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. NOLDIN, V.F.; FILHO, V.C.; MONACHE, F.D.; BENASSI, J.C.; CHRISTMANN, I.L.; PEDROSA, C.P.; YUNES, R.A. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p.331-334, 2003.
2. CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal and Biological Research**, v.33, n. 1, p. 179-189, 2000.
3. CECHINEL-FILHO, V. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n.1, p. 99-105, 1998.
4. HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P.J.; LEE, C.C. The sulforhodamine B assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v.42, n. 4. p. 377-87, 2007.
5. WANG, L.; LIN, L.; YE B. Electrochemical studies of the interaction of the anticancer herbal drug emodin with DNA. **Journal of Pharmaceutical and biomedical Analyses**,v. 42, n. 5, p. 625-9, 2006.
6. MCLAUGHLIN, J.L, ROGERS, L.L. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, v. 32, p.513-24, 1998.
7. MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, Jr.V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p.429-38, 2002.
8. RIMOLI-ODÁLIA, A.; ARRUDA, E.J. de.; RIMOLI, R. BUENO, N.R.; COSTA, R.B. Biodiversidade, biotecnologia e Conservação Genética em desenvolvimento local. **Revista internacional e desenvolvimento local**, v.1, n.1, p. 21-30, Setembro, 2010.
9. ALVES T.M.A.; SILVA A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA E.F.A.; SMÂNIA, Jr.A.; ZANI, C.L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n.3, p. 367-373, Rio de Janeiro, 2000.
10. LORENZI, H.; MATOS, F.J de A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. 2ª Ed. São Paulo: Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2008.
11. DORTA, E.J. Introdução. In: **Escala Rural**: especial de plantas medicinais, 1 (4): 1-62. São Paulo: Escala, 1998 apud TOMAZZONI, M.I. **Subsídios para a introdução do uso de fitoterápicos na rede básica de saúde do município de Cascavel/ PR**. 2004. 125 f.

Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 2004.

12. ELDIN, S.; DUNFORD, A. **Fitoterapia na atenção primária à saúde**. São Paulo: Manole, 2001 apud TOMAZZONI, M.I. **Subsídios para a introdução do uso de fitoterápicos na rede básica de saúde do município de Cascavel/ PR**. 2004. 125 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 2004.

13. ALMEIDA, E.R. **Plantas medicinais brasileiras**. São Paulo: Hemus, 1993 apud TOMAZZONI, M.I. **Subsídios para a introdução do uso de fitoterápicos na rede básica de saúde do município de Cascavel/PR**. 2004. 125 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 2004.

14. DEVIENNE, K.F.; RADDI, M.S.G.; POZETTI, G.L. Das plantas medicinais aos fitofármacos, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 6, n.3, p. 11-14, 2004.

15. CUNHA, P.A da. Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes activos e fitoterapia. Disponível em: <http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/aspectos_historicos.pdf> acesso em: 13 de abril de 2013 às 00:26.

16. BARREIRO, E.J. Sobre a química dos remédios, dos fármacos e dos medicamentos. **Química Nova na Escola**, n. 3, p. 4-9, 2001.

17. PINTO, A.C. *et al.* Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, p. 45 - 61, 2002.

18. KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 3, p. 206-220, 2005.

19. BRUNING, M.C.R.; MOSEGUI, G.B.G; VIANNA, C.M. de M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu – Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **OPINIÃO**, v. 17, n. 10, p. 2675 – 2685, 2012.

20. SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J. R. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: UFRGS; 1988 apud BRUNING, M.C.R.; MOSEGUI, G.B.G. VIANNA, C.M. de M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu – Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **OPINIÃO**, p. 2675 – 2685.

21. ALVES, D.L.; SILVA, C.R. **Fitohormônios: abordagem natural da terapia hormonal**. São Paulo: Atheneu; 2002.

22. TEIXEIRA, JB.P. **Estratégia de proteção patentária para plantas Mediciniais e Medicamentos Fitoterápicos em adição aos Genéricos no SUS**. 2005. 211 f. Tese (Doutorado em Política, Planejamento e Administração em Saúde) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

23. AMOROZO, M.C.M.; GÉLY, A.; Uso de Plantas Medicinais por Caboclos do Baixo Amazonas: Barcarena, PA, Brasil. **Museu Paraense Emílio Goeldi**, n. 4, p. 47,1988.
24. **MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE**. Biodiversidade brasileira. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acesso em 20 de maio de 2013 às 21:00.
25. **CONSERVATION INTERNATIONAL BIODIVERSITY HOTSPOTS**. Disponível em <<http://www.biodiversityhotspots.org/xp/hotspots/Pages/default.aspx>>. Acesso em 20 de maio de 2013 às 21:30.
26. BRANDÃO, M.G.L. et al. **Biodiversidade, uso tradicional de plantas medicinais e produção de fitoterápicos em Minas Gerais**. Disponível em: <http://www.cedeplar.ufmg.br/seminarios/seminario_diamantina/2010/D10A022.pdf>. Acesso em: 21 de maio de 2013 às 16:30.
27. COOPER- DRIVER, G.A. e BHATTACHARYA, M. Role of phenolics in plant evolution. **Phytochemistry**. v.49, p. 1165-1174, 1998.
28. FUNASAKI, M. **Estruturas, atividade biológica e biossíntese de metabólitos secundário de *Ocotea catharinensis* Mez (Lauraceae)**. 2006. 132 f. Tese de doutoramento – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
29. GOBBO – NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p.374-381, 2007.
30. HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios ativos de plantas**. São Carlos: EDUFSCAR, 2003.
31. RENNER, S.S. Phylogeny and classification of the Melastomataceae and Memecylaceae. **Nordic Journal of Botany**., v.13, p. 519-540, 1993.
32. MEYER, J.Y. Observations on the reproductive biology of *Miconia calvescens* DC (Melastomataceae), an alien invasive tree on the Island of Tahiti (South Pacific Ocean). **Biotropica**, v. 30, p. 609-624, 1998.
33. ROMERO, R. MARTINS, A.B. Melastomataceae do parque nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, n.1, p.19-24, mar. 2002.
34. CELOTTO, A.C.; NAZARIO, D.Z.; CUNHA, W.R.; SPESSOTO, M.A.; MARTINS, C.H.G. Evaluatin of the in vitro antimicrobial activity of crude extracts of three *Miconia* species. **Brazilian Jornal of Microbiology**, v. 34, p. 339 – 340, 2003.
35. CRUZ, A.V.M.; KAPLAN, M.A.C. Estudo Comparativo do Perfil Químico e do Uso Popular de Espécies das Famílias Myrtaceae e Melastomataceae. **Rev. Flores. Amb.**, v. 11, p. 47-52 apud LEITE, T.C.C. **Estudo químico e avaliação da atividade antimicrobiana de espécies do gênero *Marcetia* (Melastomataceae)** . 2009. 130 f. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.

36. KALA, C.P. Ethnomedicinal botany of the Apatani in the Eastern Himalayan region of India. **J. Ethnobiol. Ethnomed.**, v.1, p. 213-229, 2005.
37. FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L.A.; RATES, S.M.K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 369-394, jul/set, 2006.
38. RODRIGUES, J.; MICHELIN, D.C.; RINALDO, D.; ZOCCOLO, G.J.; CAMPNER DOS SANTOS, L.; VILEGAS, W.; SALGADO, H.R.N. Antimicrobial Activity of *Miconia* Species (Melastomataceae). **Journal of Medicinal Food**, v.1, p.120-126, 2008.
39. JAMAL, C.M; TAVARES, K.G; RASLAN, D.S; MIRAGLIA, M.C.M.; DUARTE, L.D. G. Isolation of constituents as analgesic agents from *Lavoisiera pulcherrima* DC (Melastomataceae). **Acta Horticulturae**, v. 501, p. 145-150, 1999.
40. CUNHA, W.R.; MARTINS, C.; FERREIRA, D.D.; CROTTI, A.F.M.; ALBUQUERQUE, S. *In vitro* trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. **Planta Medica**, v. 69, p. 474-478, 2003.
41. DÈVÈHAT, F.L.; BAKHTIAR, A.; BÈZIVIN, C.; AMOROSO, M.; BOUSTIE, J. Antiviral and cytotoxic activities of some Indonesian plants. **Fitoterapia**, v. 73, p. 400-405, 2002.
42. NIÑO, J.; HERNANDEZ, J.A.; CORREA, Y.M.; MOSQUERA, O.M.; In vitro inhibition of acetylcholinesterase by crude plant extracts from Colombian flora. **Mem. Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, p. 783-785, November 2006.
43. VASCONCELOS, M.; ROYO, V.A.; FERREIRA, D.S.; CROTTI, A.E. M.; SILVA, M. L.A.E.; CARVALHO, J.C.T.; BASTOS, J.K.; CUNHA, W.R. In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleanoic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). **J. Bioscienc.**, v. 61, p. 477-482, 2006.
44. SANTOS, F.V.; TUBALDINI, F.R.; CÓLUS, I.M.R.; ANDRÉO, M.A.; BAUAB, T.M.; LEITE, C.Q.F.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A. Mutagenicity of Mouriripusa Gardner and Mouririelliptica Martius. **Food Chem. Toxic.** V. 46, p. 2721-2727, 2008.
45. ANDREO, M.A; BALLESTEROS, K.V.R.; HIRUM-LIMA, C.A.; DA ROCHA, L.R. M.; BRITO, A.R.M.S.; VILEGAS, W. Effect of *Mouriri pusa* extracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: Role of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 431-44, 2006.
46. MARTINS, A.B.; SEMIR, J.; GOLDENBERG, R.; MARTINS, E. O gênero *Miconia* Ruiz & Pav (Melastomataceae) no estado de São Paulo. **Acta Bot. Bras.**, v. 10, p. 267-316, 1996.
47. FERREIRA, D. da S. **Propriedades terapêuticas de triterpenos ácidos na doença de Chagas experimental – avaliação em fase aguda da infecção.** 2010. 131 f. Tese (Doutorado em Biociências aplicadas à Farmácia) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

48. IKEDA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H. Ursolic acid: an anti – and proinflammatory triterpenoid. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, p. 26-42, 2008.
49. JEONG, H.G.; KIM, H.G.; HWANG, Y.P. Involvement of cytokines in the hepatic expression of metallothionein by ursolic acid. **Toxicology Letters**, Netherlands, v. 155, p. 369-76, 2005 apud FERREIRA, D. da S. **Propriedades terapêuticas de triterpenos ácidos na doença de Chagas experimental – avaliação em fase aguda da infecção**. 2010. 131 f. Tese (Doutorado em Biociências aplicadas à Farmácia) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
50. STEELE, J.C.; WARHUST, D.C.; KIRBY, G.C. SIMMONDS, M.S. In vitro and in vivo evaluation of betulinic acid as an antimalarial. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 115 – 119, England, 1999 apud FERREIRA, D. da S. **Propriedades terapêuticas de triterpenos ácidos na doença de Chagas experimental – avaliação em fase aguda da infecção**. 2010. 131 f. Tese (Doutorado em Biociências aplicadas à Farmácia) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
51. TORRES – SANTOS, E.C.; LOPES, D.; OLIVEIRA, R.R.; CARAUTA, J.P.; FALCÃO, C.A.; KAPLAN, M.A.; ROSSI-BERGMANN, B. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*, **Phytomedicine**, v. 11, p. 114-120, Germany, 2004 apud FERREIRA, D. da S. **Propriedades terapêuticas de triterpenos ácidos na doença de Chagas experimental – avaliação em fase aguda da infecção**. 2010. 131 f. Tese (Doutorado em Biociências aplicadas à Farmácia) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
52. GUA, J. Q.; WANG, Y.; FRANZBALU, S.G.; MONTENEGRO, G.; TIMMERMANN, B. N. Constituents of *Quinchamalium majus* with potential antitubercular activity. **Zeitschrift fur Naturforschung C, Journal of Biosciences**, v. 59, p. 797-802, Germany, 2004.
53. OVESNA, Z.; VACHALKOVA, A.; HORVATHOVA, K.; TOTHOVA, D. Pentacyclitriterpenoic acids: new chemoprotective compounds, Minireview, **Neoplasma**, v. 51, p. 327-333, Slovakia, 2004.
54. CHATTOPADHYAY, D.; DUNGDUNG, S.R.; MANDAL, A.B.; MAJUMDER, G.C.A. A potent sperm motility-inhibiting activity of bioflavonoids from an ethnomedicine of *Onge*, *Alstoniamacrophylla* Wall ex A. DC, leaf extract. **Contraception**, v. 71, p. 372-378, United States, 2005.
55. NOVOTNY, L.; VACHALKAOVA, A.; BIGGS, D. Ursolic acid: an anti-tumorigenic and chemopreventive activity. **Neoplasma**, v. 48, p. 241- 246, Slovakia, 2001.
56. KANG, S.Y.; YOON, S.Y.; ROH, D.H.; JEON, M.J.; SEO, H.S.; UH, D.K.; KWON, Y.B.; KIM, H.W.; HAN, H.J.; LEE, J.H.; The anti-arthritis effect of ursolic acid on zymosan-induced acute inflammation and adjuvant-induced chronic arthritis models. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, p. 1347-54, England, 2008.
57. OLIVEIRA, G.S. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades antimicrobiana, citotóxica e inibitória das catepsinas B e K de *Miconia ferruginata* (Melastomataceae)**. 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado em ciências moleculares) - Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2010.

58. GUNATILAKA, A.A.L.; BERGER, J.M.; EVANS, R.; MILLER, J.S.; WISSE, J.H.; NEDDERMANN, K.M.; BURSUKER, I.; KINGSTON, D.G. I. Isolation, synthesis and structure-activity relationships of bioactive benzoquinones from *Miconia lepidota* from the Suriname rainforest. **J. Nat. Prod.**, v. 64, p. 2-5, 2001.
59. SPESSOTO, M.A.; FERREIRA, D.S.; CROTTI, A.E. M.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R. Evaluation of the analgesic activity of extracts of *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae). **Phytomedicine**, v. 10, p. 606-609, 2003.
60. RODRIGUES, J.; DA SILVA, M.A.; DOS SANTOS, L.C.; VILEGAS, W. **Isolamento e identificação dos flavonóides presentes nas folhas de *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae)**. 30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia-SP, 2007.
61. CHAN, W.R.; SHEPPARD, V.; MEDFORD, K.A.; TINTO, W.F.; REYNEOLDS, W.F.; MCLEAN, S. Tripernes from *Miconia stenostachya*. **J. Nat. Prod.**, v. 55, p. 963-966, 1992.
62. PERALTA, P. Las species del género *Tibouchina* (Melastomataceae) em la Argentina. **Darwiniana**, v.40, p. 107-120.
63. Guimarães, P.J.F.; Martins, A.B. *Tibouchina* sect. *Pleroma* (D.Don) Cogn. (Melastomataceae) no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 20, p. 11-33, Junho 1997.
64. SILVA, J.B. da. **Biologia das interações entre os visitantes florais (hymenoptera, apidae) e *tibouchina pullchra* cogn. (Melastomataceae)**. 2006. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
65. STEIN, B.A.; TOBE, H. Floral nectaries in Melastomataceae and their systematic and evolutionary implications. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 76, p.519-531, 1989.
66. RENNER, S.S. A survey of reproductive biology in neotropical Melastomataceae and Memecylaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.76, p. 496-518, 1989.
67. YOSCHIDA, T.; NAKATA, F.; OKUDA, T. Tannis and related polyphenols of Melastomataceus plants VIII. Nobotanins L, M and N, trimeric hydrolyzable tannins from *Tibouchina semidecandra*. **Chem. Pharm. Bull**, v. 47, p. 824-827, 1999.
68. YOSCHIDA, T.; AMAKURA, Y.; YOKURA, N.; ITO, H.; ISAZA, J.H.; RAMIREZ, S.; PELAEZ, D.P.; RENNER, S.S. Oligomeric hydrolyzable tannins from *Tibouchina multiflora*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 1661-1666, 1999.
69. YOSCHIDA, T.; OHBAYASHI, H.; ISHIHARA, K.; OHWASCHI, W.; HABA, K.; OKANO, Y.; SHINGU, T.; OKUDA, T. Tannins and related polyphenols of Melastomataceous plants I. Hydrolyzable tannins from *Tibouchina semidecandra* Cogn. **Chem. Pharm. Bull**, v. 39, p. 2233-2240, 1991.

70. SANTOS, F.M. DOS.; SOUZA, M.G. DE.; CROTTI, A.E.M.; MARTINS, C.H.G.; AMBRÓSIO, S.R.; VENEZIANI, R.C.S.; SILVA, M.L.A. e.; CUNHA, W.R. Evaluation of antimicrobial activity of extracts of *Tibouchina Candolleana* (Melastomataceae), isolated compounds and semi-synthetic derivatives against endodontic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 793 -799, 2012.
71. KUSTER, R.M.; ARNOLD, N.; WESSJOHANN, L.; Anti-fungal flavonoids from *Tibouchina grandifolia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 63-65, 2009.
72. JONES, E.; EKUNDAYO, E .; KINGSTON, D. Anticancer agents XI. 2,6-dimethoxybenzoquinone as a cytotoxic constituent of *Tibouchina pulchra*. **J. Nat. Prod.**, v. 44, p. 493-494,1980.
73. BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A .; DEGÁSPARI, C.H.; Anthocyanins from *Tibouchina grandiflora*. **Food Chem.**, v. 18, p. 153-159, 1985.
74. JANNA, O.A.; KHAIRUL, A.K.; MAZIAH, M. Anthocyanin stability in *Tibouchina semidecandra* L. **Food Chem.**, v. 101, p. 1640-1646, 2006.
75. SIRAT, H.M.; RELAZI, M.F.; UJANG, Z. Isolation and identification of radical scavenging and tyrosinase inhibition of polyphenols from *Tibouchina semidecandra* L. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, p. 10404-10409, 2010.
76. MOSQUERA, O.M.; CORRERA, Y.M.; NINO, J. Antioxidant activity of plant extracts from Colombian flora. Braz. **J. Pharmacognosia**, v. 19. P. 382-387, 2009.
77. FARIA, A.U.; ANDRADE E SILVA, M.L.; MARTINS, C.H.G.; FURTADO, N.A.J.C.; VINHOLIS, A.H.C.; CUNHA, W. R. **Atividade antimicrobiana in vitro de extratos brutos de *Tibouchina stenoscarpa* (Melastomataceae) frente a microrganismos da cavidade bucal.** 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia-SP, 2006.
78. BRIDE, P.; TRIMBERLAKE, C.F. Anthocyanin As Natural Food Colours-Selected Aspects. **Food chemistry**, v. 58, p. 103-109, 1997.
79. NASCIMENTO, J.E.; MELO A.F.M.; LIMA, T.C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS, E.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; AMORIM, E.L.C. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (*Phyllanthaceae*).**Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 145-150, 2008.
80. IGARASHI, M.A. Pubvet, v. 2(31), Ed. 42, Art. 386, 2008.
81. www.kribensis.kit.net/conteudo/artemia.jpg. apud Pizzolotto, G. **Avaliação da atividade tóxica e antimicrobiana in vitro dos extratos metanólicos de *calendula officinalis* L. (asteraceae) visitadas e protegidas de insetos.** 2010. 52 f. Dissertação (mestrado em Farmácia) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2010.
82. RAHMAN, A.; CHOUDHARY, M.I.; THOMSON, W. J. **Bioassay techniques for drug development**, Harwood academic publishers, 2001.

83. PISUTTHANAN, S.; PLIANBANGCHANG, P.; PISUTTHANAN, N.; RUANRUAY, S.; MUANRIT, O. Brine Shrimp Lethality Activity of Thai Medicinal Plants in the Family Meliaceae. **Naresuan University Journal**, v.12, p. 13-18, 2004.
84. HARADA, T.N. **Correlação entre os ensaios de citotoxicidade em *Artemia salina* Leach e atividade antineoplásica sobre linhagens de células tumorais para algumas classes de produtos naturais.** 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.
85. MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, DE, Mclaughlin, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 5, p.31-34, 1982.
86. LHULLIER, C.; HORTA, P.A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.158-63, 2006.
87. SANTOS, N.C.; DIAS, C.N.; COUTINHO-MORAES, D.F.; VILANOVA, C.M.; GONÇALVES, J. de R.; SOUZA, N. da S.; ROSA, I.G. Toxicidade e avaliação de atividade moluscicida de folhas de *Turnera ulmifolia* L. **Revista brasileira de biociência**, v. 8, n.4, p. 324 - 329, out./dez. 2010.
88. VARÓ, I.; NAVARRO, J.C.; AMAT, F.; GUILHERMINO, L. Characterisation of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia parthenogenetica*. **Chemosphere**, v. 48, n. 6, p. 563-569, 2002.
89. BORTOLOTTO. et al.; Evaluation of the toxic and genotoxic potentials of landfill leachates using bioassays. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2009 apud Pizzolotto, G. **Avaliação da atividade tóxica e antimicrobiana in vitro dos extratos metanólicos de *calendula officinalis* L. (asteraceae) visitadas e protegidas de insetos.** 2010. 52 f. Dissertação (mestrado em Farmácia)-Universidade do Extremo Sul Catarinense Criciúma, 2010.
90. SOUZA, E.M.; CHAVES, L.M; MUNIZ, J.A.; **Avaliação dos métodos: Probit, Probit Isotonizado E Up And Down em dados de sensibilidade.** Disponível em: <http://www.ime.unicamp.br/sinape/sites/default/files/Lucas%20Monteiro.pdf>. Acesso em: 20 de Junho de 2013 às 18:00.