

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

POTENCIAL CITOTÓXICO E ANTIMICROBIANO DE
PLANTAS DA RESERVA FLORESTAL ADOLPHO DUCKE,
MANAUS-AM

ANA LÚCIA BASILIO CARNEIRO

MANAUS
2007

ANA LÚCIA BASILIO CARNEIRO

**POTENCIAL CITOTÓXICO E ANTIMICROBIANO DE
PLANTAS DA RESERVA FLORESTAL ADOLPHO DUCKE,
MANAUS-AM**

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutorado em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Adrian Martin Pohlit

MANAUS

2007

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Carneiro, Ana Lúcia Basílio

C289p Potencial citotóxico e antimicrobiano de plantas da Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus-Am / Ana Lúcia Basilio Carneiro. - Manaus: UFAM, 2011.
138 f.; il. color.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2011.

Orientador: Prof. Dr. Adrian Martin Pohlit

1. Plantas medicinais 2. Extratos vegetais 3. Fitoterapia I. Pohlit, Adrian Martin (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 633(811.3)(043.2)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE

No dia 15 de junho de 2007 às 15h no Auditório do CPD,
Bloco "M" – Mini-Campus- UFAM ANA LÚCIA BASÍLIO CARNEIRO defendeu sua
Tese de Doutorado intitulada "Potencial citotóxico e antimicrobiano de plantas da Reserva
Adolpho Ducke, Manaus - AM".

Banca de Examinadores:

Membros	Parecer	Assinatura
Dr. Adrian Martin Pohlit (INPA) – Presidente	Aprovado (X) Reprovado ()	
Dr. José Odair Pereira (UFAM)	Aprovado (X) Reprovado ()	
Dra. Maria Francisca Simas Teixeira (UFAM)	Aprovado (X) Reprovado ()	
Dra. Juliana Mesquita Vidal Martinez de Lucena (CEFET)	Aprovado (X) Reprovado ()	
Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior (UFAM)	Aprovado (X) Reprovado ()	

Resultado Final: Aprovado (X)
Reprovado ()

Manaus (AM), 15 de junho de 2007.

Coordenador do PPGBIOTEC

Av. Gal. Rodrigo Otávio Jordão Ramos, nº 3000 – Mini-Campus – Bl "G" - Sala 01
CEP: 69.077-000 – Manaus-AM Fone/Fax: (0XX92) 647-4018 e 647-4230

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, meu referencial de perseverança, generosidade e trabalho.

A Lindair Alves da Silva, pelo amor, companheirismo, incentivo, paciência e críticas, sempre oportunas.

Aos meus filhos, Lincoln e Júlio César, por me ensinarem a arte da vida e despertar o desejo de continuar. Eles são a prova do amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Adrian Martin Pohlit, pela orientação, paciência, valiosos ensinamentos e apoio que serão lembrados e repassados.

Manifesto minha admiração e agradecimento a Dra. Maria Francisca Simas Teixeira, grande mestre, pesquisadora incansável, exemplo de profissionalismo e constante fonte de encorajamento e informação.

A Dra. Ormezinda C. Fernandes, exemplo de humildade, respeito e dignidade, pelo apoio e decisiva contribuição nesse trabalho, partilhando sem reservas, conhecimento, expectativas e principalmente sua amizade.

A Viviana Maria Araújo de Oliveira por compartilhar de forma humilde e generosa sua amizade e conhecimento.

A Emilio Sponchiado e Juliana Pereira pela atenção e acolhimento nas primeiras fases de trabalho.

A Dra. Claudia do Ó Pessoa e sua equipe por realizarem as avaliações citotóxicas em linhagens de células tumorais.

A toda equipe do laboratório 18 do INPA.

A Glaucia Cauper, pela atenção, disponibilidade e valioso auxílio.

Ao Sr. Everaldo Pereira, mateiro, que nos acompanhou em todas as coletas, pelo profissionalismo e humor renovados a cada coleta.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade citotóxica, antitumoral e antimicrobiana de espécies vegetais amazônicas da Reserva Florestal Adolpho Ducke do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). As espécies vegetais sem estudos anteriores selecionadas e coletadas foram: *Diclinanona calycina* Benoist, (Annonaceae), *Lacmellea gracilis* (Mull. Arg.) Markgr. (Apocynaceae), *Pleurisanthes parviflora* (Ducke) Howard (Icacinaceae), *Dilkea johannesii* Berb. Rodr. (Passifloraceae), *Sterigma petalum obovatum* Kuhlmann (Rhizophoraceae), *Elaeoluma nuda* (Baehni) Aubrév. (Sapotaceae). Após coleta e extração as amostras foram avaliadas quanto a citotoxicidade frente a *Artemia franciscana* e em linhagens de células tumorais. O potencial antimicrobiano foi determinado pelo método de difusão em ágar frente a *Mycobacterium smegmatis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus sanguis*, *S. oralis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Extratos ativos foram conduzidos a avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) e bioautografia para identificar Rf's de componentes antimicrobianos. Prospeção fitoquímica das espécies promissoras foi realizada para detecção dos principais constituintes químicos. Dos 38 extratos avaliados para toxicidade em *A. franciscana*, dois apresentaram valores de CL₅₀ inferiores a 100 µg/mL, portanto, tóxicos para essa espécie. A menor CL₅₀ foi do extrato de *D. calycina* obtido em clorofórmio com valor de 22,9 ± 0,8 µg/mL. No *screening* para atividade antitumoral, nove extratos representando quatro espécies vegetais foram considerados muito ativos (MA) frente à célula tumoral de sistema nervoso (*E. nuda* e *S. obovatum*), cólon (*S. obovatum*), mama (*E. nuda*) e leucemia (*L. gracilis*, *P. parviflora*, *S. obovatum*). A maioria dos 75 extratos analisados inibiram o crescimento dos microrganismos teste com halos entre 8 e 40 mm de diâmetro. Extratos de *D. calycina* demonstraram atividade antimicrobiana com CIM de 48,8 µg/mL frente a *S. aureus*, *S. oralis* e *S. sanguis* e 97,7 µg/mL e 195 µg/mL frente a *M. smegmatis*. *L. gracilis* foi ativa apenas contra *M. smegmatis* (CIM 48,8 µg/mL). A bioautografia confirmou o potencial antimicrobiano de *D. calycina* e *L. gracilis*. Todos os microrganismos avaliados por bioautografia foram sensíveis ao extrato de galho de *D. calycina* obtido em clorofórmio. Na prospeção fitoquímica detectou-se a presença de fenóis, taninos, flavonóides, alcalóides e antraquinonas, em extratos de *D. calycina* e antraquinonas e cumarinas na espécie *L. gracilis*. Assim, a seleção permitiu identificar espécies vegetais amazônicas com atividade antimicrobiana e antitumoral in vitro e sugerir as espécies *D. calycina*, *L. gracilis*, *E. nuda* e *S. obovatum* para apreciação detalhada em outros estudos, pois poderão ter aplicação terapêutica no tratamento de doenças infecciosas e câncer.

Palavras-chave: Extratos vegetais, *Artemia franciscana*, bioautografia, *Diclinanona calycina*, *Elaeoluma nuda*.

ABSTRACT - PUBLICAÇÃO 1

Screening of Amazonian plants from the Adolpho Ducke forest reserve, Manaus, state of Amazonas, Brazil, for antimicrobial activity

Tropical forests are species-rich reserves for the discovery and development of antimicrobial drugs. The aim of this work is to investigate the in vitro antimicrobial potential of Amazon plants found within the National Institute on Amazon Research's Adolpho Ducke forest reserve, located in Manaus, state of Amazonas, Brazil. 75 methanol, chloroform and water extracts representing 12 plant species were tested for antimicrobial activity towards strains of *Mycobacterium smegmatis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* using the gel-diffusion method. Active extracts were further evaluated to establish minimum inhibitory concentrations (MIC) and antimicrobial profiles using bioautography on normal-phase thin-layer chromatography plates. *Diclinanona calycina* presented extracts with good antimicrobial activity and *S. oralis* and *M. smegmatis* were the most sensitive bacteria. *D. calycina* and *Lacmellea gracilis* presented extracts with the lowest MIC (48.8 µg/ml). *D. calycina* methanol and chloroform leaf extracts presented the best overall antimicrobial activity. All test organisms were sensitive to *D. calycina* branch chloroform extract in the bioautography assay. This is the first evaluation of the biological activity of these plant species and significant in vitro antimicrobial activity was detected in extracts and components from two species, *D. calycina* and *L. gracilis*.

Key words: plant extract - antibacterial - antifungal - *Diclinanona calycina* - *Lacmellea gracilis* – bioautography.

ABSTRACT - PUBLICAÇÃO 2

In Vitro Screening of Amazonian Plants from the Adolpho Ducke Forest Reserve, Manaus, State of Amazonas, Brazil for Cytotoxicity to Tumor Cell Lines

Many drugs owe their initial discovery to bioactive compounds isolated originally from plant sources. In the Amazon region many plant species are used to prevent and treat a wide variety of diseases, including cancer. The aim of the present work was to evaluate the *in vitro* cytotoxic activity in different tumor cell lines of plant species found in the National Institute for Amazonian Research's (INPA) Adolpho Ducke Forest Reserve located in Manaus in the Western Brazilian Amazon region. The plants represent 6 genera (from 6 different families) for which little or no chemical or pharmacological information is available in the literature. The species studied were *Diclinanona calycina* Benoist (Annonaceae), *Lacmellea gracilis* (Mull.Arg.) Markgr. (Apocynaceae), *Pleurisanthes parviflora* (Ducke) Howard (Icacaceae), *Dilkea johannesii* Berb. Rodr. (Passifloraceae), *Sterigmatopetalum obovatum* Kuhl. (Rhizophoraceae), *Elaeoluma nuda* (Baehni) Aubrév. (Sapotaceae). Branch and leaves were collected, dried, ground and extracted with water (by infusion), methanol (continuous extraction) and chloroform (continuous extraction). Samples were evaluated for *in vitro* cytotoxicity in tumor cell lines MDA-MB435 (human breast tumor), HCT-8 (human colon tumor), SF295 (human central nervous system cancer) and HL60 (human leukemia). Of the 38 extracts screened for cytotoxic activity, nine extracts (23.7 % of all extracts) representing four different plant species (66.7 % of total species) were considered very active to central nervous system tumor cells (*E. nuda*, *S. obovatum*), colon tumor cells (*S. obovatum*), breast cancer cells (*E. nuda*) and leukemia cells (*L. gracilis*, *P. parviflora*, *S. obovatum*). So, significant *in vitro* cytotoxic activity was found in one or more extracts of *L. gracilis*, *E. nuda* e *S. obovatum* e *P. parviflora*. This study helps elucidate the importance of previously unstudied Amazon plant biodiversity and the need to study unknown species found in the forest as potential sources of new cytotoxic extracts and substances.

Key words: *Elaeoluma nuda*, *Sterigmatopetalum obovatum*, *Pleurisanthes parviflora*, *Lacmellea gracilis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da salicina ($C_{13}H_{18}O_7$) (1) e aspirina ($C_9H_8O_4$) (2). .	19
Figura 2. Estrutura química de algumas drogas de origem vegetal. Pineno ($C_{19}H_{18}N_2$) (1), cocaína ($C_{17}H_{21}NO_4$) (2), kavaína ($C_{14}H_{14}O_3$) (3), cafeína ($C_8H_{10}N_4O_2$) (4) e taxol ($C_{47}H_{51}NO_{14}$) (5).	24
Figura 3. Estrutura química do eugenol (1), mentol (2), timol (3), carvacol (4), limoneno (5) e alicina (6).	26
Figura 4. Estruturas químicas de algumas drogas antifúngicas. Nistatina ($C_{21}H_{30}O_5$) (1), voriconazol ($C_{16}H_{14}F_3N_5O$) (2), fluconazol ($C_{13}H_{12}F_2N_6O$) (3) e flucitosina ($C_4H_4FN_3O$) (4).	53
Figura 5. Exemplos de marco na Reseva Ducke.....	58
Figura 6. Coleta realizada dia 27 de fevereiro de 2004 na Reserva Florestal Ducke, apresentando os coletores, Ana Lúcia Basílio Carneiro, Viviana Maria Araújo de Oliveira e o mateiro Everaldo da Costa Pereira.	59
Figura 7. Seqüência esquemática para o ensaio com <i>A. franciscana</i>	64
Figura 8. Tubos de ensaio contendo $FeCl_3$ para detecção de fenóis e taninos. Positividade evidenciada pelo desenvolvimento de coloração azul ou verde-azulada e precipitado escuro.....	71
Figura 9. Tubos de ensaio com reação positiva (vermelha ou rosa) para flavonóide através do método da cianidina.....	72
Figura 10 Exsicata de <i>Diclinanona calycina</i> (179085) do no Herbário do INPA. ..	77
Figura 11. Ficha da exsicata de <i>Diclinanona calycina</i> (179085) do Herbário do INPA.	77
Figura 12. Exsicata de <i>Dilkea johannesii</i> (206552) do Herbário do INPA.....	77
Figura 13 Ficha da exsicata de <i>Dilkea johannesii</i> (206552) do Herbário do INPA.	77
Figura 14. Exsicata de <i>E. nuda</i> (179316) do Herbário do INPA.	78
Figura 15. Ficha da exsicata de <i>E. nuda</i> (179316) do Herbário do INPA.	78
Figura 16. Exsicata de <i>P. parviflora</i> (195327) do Herbário do INPA.....	78
Figura 17. Ficha da exsicata de <i>P. parviflora</i> (195327) do Herbário do INPA.	78
Figura 18. Exsicata de <i>S. obovatum</i> (183424) do Herbário do INPA.....	79

Figura 19. Ficha da exsicata de <i>S. obovatum</i> (183424) do Herbário do INPA.	79
Figura 20. Exsicata de <i>L. gracilis</i> (189617) do Herbário do INPA.....	79
Figura 21. Ficha da exsicata de <i>L. gracilis</i> (189617) do Herbário do INPA.	79
Figura 22. Perfil cromatográfico de extratos vegetais revelados em luz ultravioleta nos comprimentos de onda 366 e 254 nm e medida da distância percorrida pelas amostras para cálculo do <i>R_f</i> . Fase móvel: Clorofórmio/acetona (9:1).	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies vegetais que deram origem a drogas utilizada na medicina moderna.	23
Tabela 2. Grupos químicos com atividade antimicrobiana obtida de plantas.	25
Tabela 3. Organismos produtores de antibióticos.	31
Tabela 4. Antibacterianos e respectivos halos de inibição (mm) e CIM frente a <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	34
Tabela 5. Microrganismos encontrados na cavidade oral.	36
Tabela 6. Espécies vegetais e/ou própolis avaliados em estudos anteriores frente a bactérias orais.	43
Tabela 7. Características para identificação de <i>S. sanguis</i> biótipo A e B.	45
Tabela 8. Espécies do gênero <i>Candida</i> e infecções clínicas relacionadas.	48
Tabela 9. Antifúngicos com respectiva origem, ano de descoberta e susceptibilidade da <i>Candida</i> spp.	52
Tabela 10. Trabalhos anteriores sobre inibição de <i>C. albicans</i> por extratos vegetais e / ou própolis.	55
Tabela 11. Solventes utilizados na preparação dos extratos, com respectivos pontos de ebulição e índice polar.	60
Tabela 12. Microorganismos e meios de cultura utilizados.	66
Tabela 13. Exemplo de página da planilha com o cadastro de famílias e gêneros da Reserva Florestal Ducke.	74
Tabela 14. Famílias e respectivas espécies vegetais selecionadas para coleta e extração na Reserva Ducke com sinonímia e nome comum.	76
Tabela 15. Famílias e respectivas espécies vegetais selecionadas para coleta e extraídas por Oliveira (2007) na Reserva Ducke com sinonímia e nome comum.	76
Tabela 16. Solventes utilizados na extração da serragem das espécies vegetais com respectiva massa da serragem (MS), massa do extrato liofilizado (ME) e teor de extrativos (TE). $TE = 100 \times \text{rendimento do extrato} / \text{serragem extraída}$	83
Tabela 17. Solventes utilizados na extração da serragem das espécies vegetais doadas por Oliveira (2007) com respectivo teor de extrativos (TE). $TE = 100 \times \text{rendimento do extrato} / \text{serragem extraída}$	84

Tabela 18. Resultado do teste de toxicidade para extrato clorofórmico de folhas de <i>D. calycina</i> em <i>Artemia francisca</i> , durante 24 horas.	85
Tabela 19. Resultado do teste de toxicidade de extratos vegetais em <i>Artemia franciscana</i> , durante 24 horas. A concentração final utilizada na determinação da mortalidade (% M) foi (500 µg/mL).	87
Tabela 20. Resultado da CL ₅₀ em <i>A. franciscana</i> e atividade antitumoral de extratos vegetais da Reserva Ducke.	92
Tabela 21. Média do diâmetro dos halos de inibição em mm dos extratos vegetais pelo método de difusão em ágar frente aos microrganismos teste. Concentração de trabalho 50 mg/mL.....	97
Tabela 22. Média do diâmetro dos halos de inibição em mm dos extratos vegetais pelo teste de difusão em ágar frente aos microrganismos teste. Concentração de trabalho 50 mg/ml (continuação).	98
Tabela 23. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais da Reserva Florestal Ducke pelo método de difusão em ágar.....	101
Tabela 24. Resultado da bioautografia de extratos vegetais da Reserva Florestal Ducke com seus respectivos <i>Rfs</i>	107
Tabela 25. <i>Rf</i> dos extratos ativos, conforme revelador empregado.	111
Tabela 26. Resultado da prospecção fitoquímica de metabólicos secundários das espécies vegetais promissoras através de reações de coloração em tubo.....	114

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 PLANTAS MEDICINAIS	17
2.1 Fitoterapia	19
3 A IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS COMO FONTE DE DROGAS	22
3.1 Plantas com Ação Antimicrobiana	25
4 SELEÇÃO DE PLANTAS PARA ESTUDO	27
5 ANTIBIÓTICOS E QUIMIOTERÁPICOS	29
6 DOENÇAS INFECCIOSAS	35
6.1 Doenças Infecciosas da Cavidade Oral Causada por Bactérias	35
6.1.1 Cárie Dental	38
6.2 Candidíase ou Candidose	47
6.2.1 <i>Candida albicans</i>	49
6.2.2 Métodos de Avaliação da Atividade Antifúngica	53
7 MATERIAL E MÉTODOS	56
7.1 SELEÇÃO DAS ESPÉCIES VEGETAIS	56
7.2 COLETA	57
7.3 SECAGEM e moagem	59
7.4 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	60
7.4.1 Extração Contínua com Extrator de Soxhlet	60
7.4.2 Extração Aquosa	61
7.5 TEOR DE EXTRATIVOS	61
7.6 TESTE DE TOXICIDADE PARA <i>Artemia franciscana</i>	62
7.6.1 Solubilização das Amostras	62
7.6.2 Criação de Larvas	62
7.6.3 <i>Screening</i> padrão com placa 6 X 4	63
7.7 TESTES PARA ATIVIDADE ANTITUMORAL	64
7.7.1 Células	65
7.7.2 Avaliação da Citotoxicidade <i>In Vitro</i>	65
7.7.3 Método de Análise dos Resultados	65
7.8 TESTE MICROBIOLÓGICO PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR	66
7.8.1 Controles	68
7.8.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	68
7.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO MÉTODO DE BIOAUTOGRAFIA	69
7.9.1 Cromatografia	69
7.9.2 Bioautografia	70
7.10 PROSPECCAO FITOQUÍMICA	70
7.10.1 Fenóis e Taninos	71
7.10.2 Flavonóides	71
7.10.3 Teste para Antocianinas, Antocianidinas e Flavonóides	72
8 RESULTADOS	73
8.1 ESPÉCIES VEGETAIS SELECIONADAS E COLETADAS	73
8.2 EXTRATOS PREPARADOS E TEOR EXTRATIVO (TE)	82

8.3 RESULTADOS DO TESTE DE TOXICIDADE PARA <i>Artemia franciscana</i> ..	85
8.4 RESULTADO DO SCREENING PARA ATIVIDADE ANTITUMORAL	90
8.5 RESULTADO DA AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA.....	94
8.5.1 Teste de Difusão em Meio Sólido.....	94
8.6 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	100
8.7 BIOAUTOGRAFIA	106
8.8 RESULTADO DO <i>SCREENING</i> FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS ATIVOS	110
8.8.1 Resultado da Revelação e <i>Screening</i> Fitoquímico em CCD	110
8.9 Resultado do <i>Screening</i> Fitoquímico Realizado em Tubo	114
9 CONCLUSÃO	116
10 REFERÊNCIAS	118

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é mundialmente conhecido por deter o maior repositório de angiospermas do planeta e a Amazônia, com sua floresta tropical úmida, é um centro de diversidades e endemias. Muitas espécies nativas desta floresta ainda são pouco conhecidas, principalmente, quanto as suas propriedades terapêuticas (RIBEIRO *et al.*, 1999).

Manaus apresenta uma significativa riqueza de espécies, pois nessa área há uma reserva florestal, a Reserva Florestal Adolpho Ducke, pertencente ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) desde 1963. Nesse local, já foram coletadas mais de 60 mil amostras de plantas. Hoje, a Reserva Ducke é uma das áreas da floresta amazônica melhor estudada (RIBEIRO *et al.*, 1999).

Aproximadamente 125.000 espécies vegetais estão nas florestas tropicais do mundo, as quais são um grande reservatório para a descoberta de novas moléculas bioativas, adjuvantes e medicamentos fitoterápicos nacionais. No entanto, apenas 1% das espécies tropicais foram estudadas quanto ao seu potencial farmacêutico. O Brasil, com 55.000 espécies vegetais, tem registrado apenas 0,4% da sua flora, portanto, muitas espécies são subutilizadas e outras ainda desconhecidas (MONTANARI e BOLZANI, 2006; GURIB-FAKIM, 2006).

Os países em desenvolvimento detêm praticamente toda a biodiversidade da terra. A diversidade vegetal é utilizada de diferentes maneiras por diferentes grupos humanos. No Brasil, pesquisadores, cronistas e historiadores deixaram valiosos relatos sobre a interação homem/flora, registrando a utilização de recursos naturais disponíveis como meio de prevenção e tratamento. Esses

relatos mostram a interação e conhecimento das sociedades tradicionais, indígenas e locais.

Apesar da existência de diversos livros incluindo o uso tradicional de plantas medicinais na Amazônia (CORRÊA, 1984; MARTINS, 1989; RODRIGUES, 1989; DUKE e VASQUEZ, 1994; MILLIKEN, 1997; MAIA, ZOGHBI e ANDRADE, 2001) ainda há poucos estudos científicos voltados para confirmar a ação farmacológica e tóxica dessa biodiversidade.

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar a atividade biológica de espécies vegetais amazônicas da Reserva Florestal Adolpho Ducke.

Os objetivos específicos foram:

- Selecionar espécies vegetais da Reserva Ducke que não foram objeto de estudos farmacológicos e/ou químicos anteriores;
- Avaliar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais da Reserva Ducke;
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos frente a larvas de *Artemia franciscana* e em linhagens de células tumorais;
- Realizar prospecção fitoquímica qualitativa de constituintes dos extratos com atividade antimicrobiana.

2 PLANTAS MEDICINAIS

Plantas medicinais são aquelas que têm atividade biológica, possuindo um ou mais princípios ativos úteis ao homem. Muitas são utilizadas em rituais e magias, em produtos cosméticos, sendo assim denominados cosmecêuticos, em suplementos alimentares ou medicamentos, sendo neste caso denominados como fitoterápicos (FERREIRA *et al.*, 1998).

Rizzini e Mors (1995) descreveram espécies vegetais com valor econômico no Brasil. Dessas, podem-se destacar as plantas:

- Medicinais, utilizadas como fármacos empíricos na prevenção e tratamento de patologias;
- Aromáticas, empregadas na perfumaria e, secundariamente, como condimentos e mesmo medicamentos;
- Utilizadas como alimento ou condimento na culinária;
- Ornamentais;
- Empregadas na produção de tecidos, vassouras e tapetes;
- Produtoras de corantes como, por exemplo, *Bixa orellana* (urucum) e *Curcuma longa* (curcuma);
- Tóxicas, como as tóxicas para o gado;
- Inseticidas;
- Alucinógenas (utilizadas nos ritos, magias e entre os jovens).

A utilização de plantas como terapia preventiva e curativa é tão antiga quanto a história da humanidade. Na história das antigas civilizações, por exemplo, egípcia, romana, chinesa, hindus, maias e do antigo mediterrâneo, há

várias referências às plantas e minerais medicinais. As experiências dos assírios e babilônicos contribuíram muito no desenvolvimento da medicina (BURGER, 1970; SAYED, 1980; MAHDI *et al.*, 2006).

A descoberta de fármacos originários de plantas data de vários séculos. Mitridates (II século a.C.), talvez o primeiro farmacologista experimental, já conhecia os opiáceos e inúmeras plantas tóxicas ou medicinais (BURGER, 1970).

De fato, a maioria das substâncias orgânicas conhecidas é “dádiva da natureza”. É interessante ressaltar a significativa contribuição do reino vegetal no fornecimento de substâncias úteis ao tratamento das patologias humanas. Estima-se que cerca de 60 % dos fármacos com atividade antitumoral, por exemplo, taxol, e antiparasitária, a exemplo da quinina e artemisinina, já comercializados ou em fase de pesquisa clínica, sejam de origem natural (MONTANARI e BOLZANI, 2001; TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

Indubitavelmente, esses produtos têm contribuído positivamente para o desenvolvimento da farmacologia e da terapêutica. Gradativamente, alguns componentes ativos encontrados nas plantas foram sintetizados, tendo os sintéticos substituído as formulação naturais. Muitos dos medicamentos utilizados hoje são produtos sintetizados em laboratório. Todavia, originaram-se do uso empírico. Assim, as fontes naturais fornecem compostos que podem ser modificados quimicamente tornando-se mais eficazes e menos tóxicos (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

O salgueiro (*Salix alba*) é um exemplo clássico de planta que deu origem a um produto natural que posteriormente foi sintetizado. Em 1829, foi isolada a salicina (1) e demonstrada sua ação antipirética. Nove anos depois, foi produzido

o ácido salicílico, muito irritante para a mucosa gástrica. Posteriormente, através de acetilação foi produzido o ácido acetil salicílico (AAS) (2) (Figura 1), registrado como aspirina em 1899 (MACKOWIAK, 2000; MAHDI *et al.*, 2006).

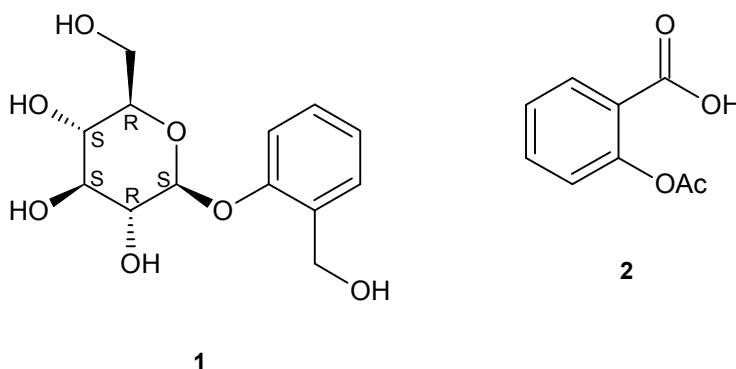


Figura 1. Estrutura química da salicina ($C_{13}H_{18}O_7$) (1) e aspirina ($C_9H_8O_4$) (2).

A aspirina é um fármaco indicado como analgésico, antipirético e cardiovascular (GWYNN e HYLANDS, 2000). Em decorrência de sua ação antiplaquetária, o AAS é indicado na prevenção de doenças cardiovasculares. Avanços nos estudos biológicos e epidemiológicos demonstram que a aspirina tem ação anticancerígena, pois em altas doses tem se mostrado inibidor da proliferação celular em várias linhagens de células cancerígenas. Recentes estudos relatam que pacientes submetidos ao uso prolongado de aspirina apresentam diminuição de incidência de câncer colo-retal (MAHDI *et al.*, 2006).

2.1 FITOTERAPIA

A fitoterapia, segundo o Ministério da Saúde (2006), é uma terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de

origem vegetal. Pode ser definida como o estudo e a aplicação dos efeitos terapêuticos de drogas vegetais e derivados dentro de um contexto holístico.

O termo medicamento fitoterápico (fitomedicamento) refere-se a preparações padronizadas de extratos de uma ou mais plantas. Segundo a OMS, os fitoterápicos são substâncias ativas presentes na planta como um todo ou em parte dela, na forma de extrato total ou processado (ELDIN e DUNFORD, 2001; SIANI, 2003).

Entre os séculos XVII a XX a fitoterapia estava em decadência em decorrência das experiências realizadas pelas classes mais altas, com a “medicina moderna”, os novos antibióticos produzidos por fermentação microbiana e o desenvolvimento de fármacos sintéticos. No entanto, a crescente necessidade de substâncias bioativas, a falta de acesso ao sistema oficial de saúde e o alto custo dos medicamentos foram fatores decisivos para ascensão da fitoterapia (ELDIN e DUNFORD, 2001).

O ressurgimento da fitoterapia ocorreu no período das guerras mundiais (1914-1918 e 1939-1945) quando faltaram os medicamentos essenciais. Na época, os Jardins Botânicos Reais da Inglaterra elaboraram planos de cultivo das espécies medicinais mais importantes, livrinhos e ilustrações para ajudar na identificação das espécies, aconselhamentos sobre coleta, armazenamento e distribuição. Houve ainda recomendação que o cultivo deveria concentrar-se em cinco espécies: *Digitalis purpurea* (dedadeira), *Atropa belladonna* (beladona), *Aconitum napellus* (acônito), *Datura stramonium* (estramônio) e *Hyoscyannus niger* (meimendro) (ELDIN e DUNFORD, 2001).

Hoje, o Ministério da Saúde no Brasil, através da Portaria N° 971 de 03 de maio de 2006, aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS). O PNPIC apresenta como diretrizes:

1. A elaboração da relação nacional de plantas medicinais e fitoterápicos;
2. Provimento do acesso a plantas medicinais e fitoterápicos aos usuários do SUS;
3. Formação e educação permanente dos profissionais de saúde em plantas medicinais e fitoterapia;
4. Acompanhamento e avaliação da inserção e implementação das plantas medicinais e fitoterapia no SUS;
5. Estabelecimento de política de financiamento para o desenvolvimento de ações voltadas à implantação das plantas medicinais e da fitoterapia no SUS;
6. Incentivo a pesquisa e desenvolvimento de plantas medicinais e fitoterápicos, priorizando a biodiversidade do País;
7. Promoção do uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos no SUS.

Michiles (2004) apresentou uma lista de quarenta e nove espécies vegetais que poderiam substituir medicamentos sintéticos da lista do SUS, muitas delas conhecidas da população e utilizadas rotineiramente na alimentação e no tratamento de doenças na forma de chás e infusões. Na lista estão alho, canela, eucalipto, erva cidreira, camomila, hortelã, maracujá, romã, chuchu, quebra-pedra, confrei, malva e gengibre, entre outras.

3 A IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS COMO FONTE DE DROGAS

As plantas produzem mais de 100.000 produtos naturais de baixo peso molecular, conhecido como metabólitos secundários. Aproximadamente 12.000 compostos de origem vegetal, quase 10 % dos metabólitos secundários, foram isolados (MONTANARI e BOLZANI, 2001; GURIB-FAKIM, 2006).

Estima-se que aproximadamente 40 % dos medicamentos disponíveis no mercado atualmente foram desenvolvidos direta ou indiretamente de fontes naturais, sendo 25 % de plantas, 13 % de microrganismos e 35 % de animais (SIANI, 2003). Metade dos 25 medicamentos mais vendidos no mundo tem sua origem em metabólitos secundários de origem vegetal (ALVES, 2001).

O conhecimento etnofarmacológico acumulado ao longo da evolução humana culminou com o desenvolvimento de fármacos de grande importância na terapêutica atual, tais como a morfina, a cânfora, a cocaína, a pilocarpina, os digitálicos, os curares, a quinina, artemisinina, atropina, escopolamina, cromolin, o ácido salicílico, taxol e a digoxina (COWAN, 1999; MONTANARI e BOLZANI, 2001; ALVES, 2001; SIANI, 2003). Algumas drogas de origem vegetal são apresentadas na Tabela 1.

Cento e dezenove compostos derivados de 90 espécies de plantas são importantes drogas indicadas nos grandes centros, destas 74 % foram isoladas de plantas de uso tradicional. Apenas 1 % das espécies tropicais foram estudadas quanto ao seu potencial terapêutico e aproximadamente 50 drogas são de espécies da floresta tropical úmida (CRAGG, NEWMAN e SNADER, 1997; GURIB-FAKIM, 2006). A Figura 2 apresenta estruturas químicas de algumas drogas de origem vegetal.

Tabela 1. Espécies vegetais que deram origem a drogas utilizada na medicina moderna.

ESPÉCIE	FAMÍLIA	CATEGORIA	DROGA
<i>Adhatoda vasica</i>	Acanthaceae	Antiespasmódico	Vasicina e vasicinona
<i>Ananás comosus</i>	Bromeliaceae	Antiinflamatório	Bromelina
<i>Artemisia annua</i>	Asteraceae	Antimalárico	Artemisinina
<i>Atropa belladonna</i> L.	Solanaceae	Antiespasmódico, anti-secretor, parassimpaticolítico	Atropina
<i>Cannabis sativa</i>	Cannabaceae	Antiemético, analgésico, sedativo, relaxante muscular, estimulante do apetite, esclerose múltipla	Cannabadiol, hemisuccinate
<i>Carica papaya</i>	Caricaceae	Antiinflamatório e antimicrobiano	Papaína
<i>Catharanthus roseus</i>	Apocynaceae	Anticancerígeno (leucemia, câncer de mama, doença de Hodgkin)	Vincristina e vimblastina
<i>Cephaelis ipecacuanha</i> Rich	Rubiaceae	Antidiarreico	Emetina
<i>Chondrodendron tomentosum</i>	Menispermaceae	Relaxante muscular	Curare
<i>Cinchona officinalis</i>	Rubiaceae	Antimalárico	Quinina
<i>Cinchona ledgeriana</i>			
<i>Colchicum autumnale</i>	Liliaceae	Antitumoral	Colchicina
<i>Digitalis purpurea</i>	Scrophulariaceae	Glicosídeo cardíaco	Digoxina
<i>Digitalis lanata</i>		Cardiotônico	
<i>Ephedra sinica</i>	Ephedraceae	Descongestionante, broncodilatador, antiasmático, rinite alérgica, sinusite	Efedrina e pseudoefedrina
<i>Erythroxylum coca</i>	Erythroxycaceae	Anestésico local, atividade contra cocos Gram positivos	Cocaína
<i>Eucalyptus globulus</i>	Myrtaceae	Moléstias do sistema respiratório (expectorante, fluidificante e antiséptica)	Eucapiltol
<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgoaceae	Demência deficiência cerebral; insuficiência venosa, antiagregante plaquetário	Ginkgoflavonas, bilobalídeos e ginkgolídeos A, B, C, M e J
<i>Harpagophytum procumbens</i>	Pedaliaceae	Dor, reumatismo	Ácido cafeico
<i>Mentha crispa</i>	Lamiaceae	Amebíase, giardiase	mentol
<i>Mentha piperita</i>			
<i>Mucuna deeringiana</i>	Fabaceae	Anti-parkinsoniano	L-dopa
<i>Papaver somniferum</i>	Papaveraceae	Analgésico, narcótico e antitussígeno	Codeína, morfina e outros alcalóides
<i>Piper methysticum</i>	Piperaceae	Ansiolítico, relaxante muscular	Kavaína
<i>Rauwolfia serpentina</i>	Apocynaceae	Antihipertensivo	Reserpina
<i>Salix alba</i>	Salicaceae	Antiinflamatório, antiplaquetário e analgésico	Ácido acetil salicílico
<i>Syzygium aromaticum</i>	Myrtaceae	Antibacteriano, antiinflamatório, anestésico local	Eugenol
<i>Taxus brevifolia</i> L.	Taxaceae	Anticancerígeno	Taxol
<i>Theobroma cacao</i>	Sterculiaceae	Estimulante do sistema nervoso	Cafeína
<i>Valeriana officinalis</i>	Valerianaceae	Ansiedade, insônia, stress	Valeprotriatos, ácidos valerênios

Fonte: Cowan (1999); Gwynn e Hylands (2000); Montanari e Bolzani (2001); Alves (2001); Siani (2003); Forlenza (2003); Gurib-Fakim (2006).

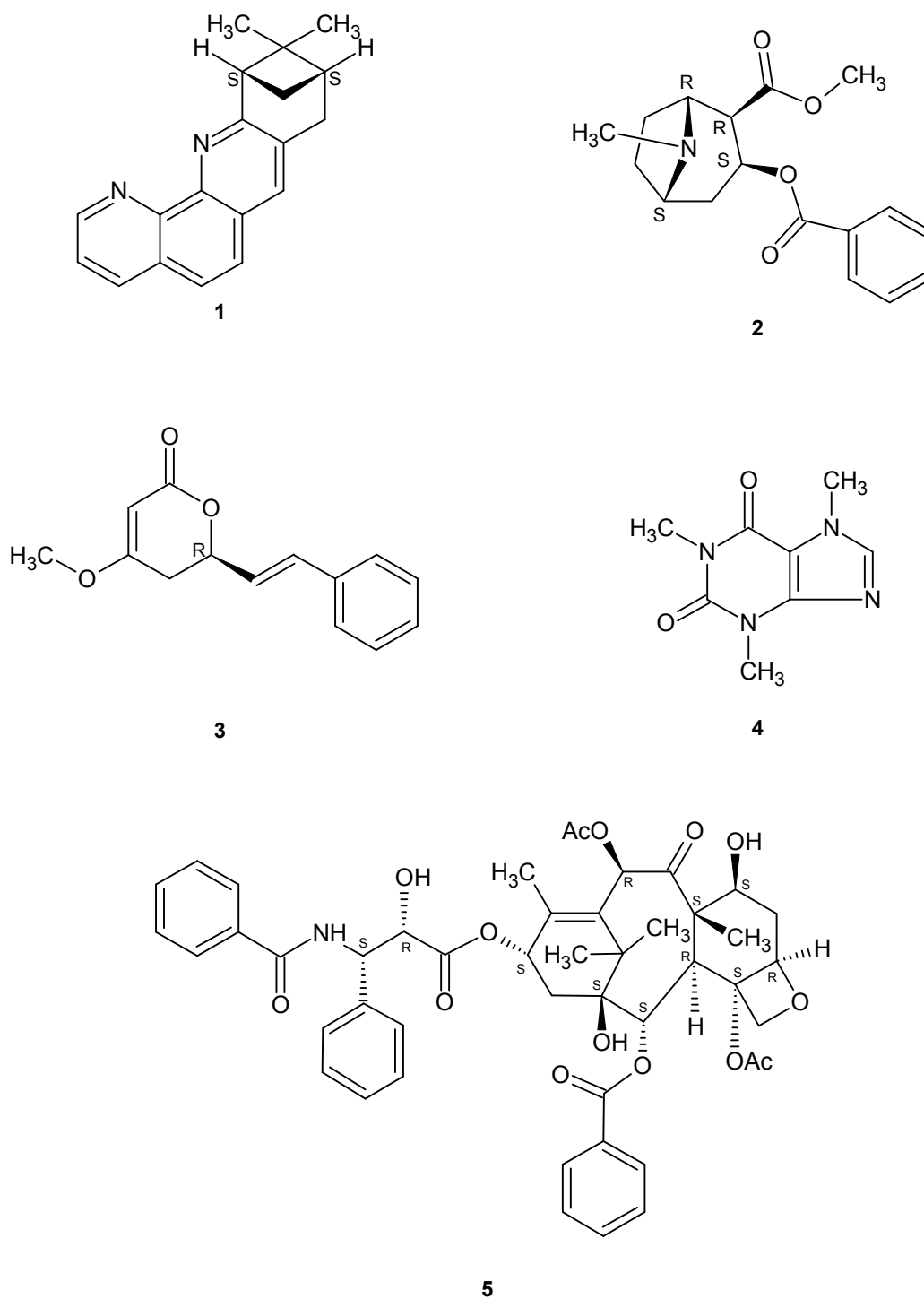


Figura 2. Estrutura química de algumas drogas de origem vegetal. Pineno ($C_{19}H_{18}N_2$) (1), cocaína ($C_{17}H_{21}NO_4$) (2), kavaína ($C_{14}H_{14}O_3$) (3), cafeína ($C_8H_{10}N_4O_2$) (4) e taxol ($C_{47}H_{51}NO_{14}$) (5).

3.1 PLANTAS COM AÇÃO ANTIMICROBIANA

As plantas dessa categoria podem ser subdivididas em antibacterianas, antifúngicas, antivirais e antiparasitárias. Os principais grupos de compostos produzidos por plantas com ação antimicrobiana são apresentados na Tabela 2 (DOMINGO e LÓPEZ-BREA, 2003). A Figura 3 apresenta a estrutura química de componentes encontrados em plantas com atividade antimicrobiana. Várias dessas são constituintes de óleos essenciais.

Tabela 2. Grupos químicos com atividade antimicrobiana obtida de plantas.

GRUPO QUÍMICO	COMPOSTO	ESPÉCIE	ATIVIDADE/INDICAÇÃO
Fenóis simples	Timol	<i>Thymus officinalis</i>	Geral*
	Carvacol	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>S. aureus</i> , <i>S. thyphimurium</i>
	Eugenol	<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>Salmonella</i>
	Ácido antémico	<i>Naricaria chamomilla</i>	
	Terpenóide	<i>Ocimum basilicum</i>	
Quinonas	Hipericina	<i>Hypericum perforatum</i>	HIV
Taninos	Elagitânico	<i>Eucalyptus globulus</i>	Bactérias, fungos e vírus
		<i>Melissa officinalis</i>	
		<i>Onobrychis viciifolia</i>	
		<i>Quercus rubra</i>	
		<i>Rhamnus purshiana</i>	
		<i>Salix alba</i>	
		<i>Thymus vulgaris</i>	
Cumarinas		<i>Matricaria chamomilla</i>	Antiviral
Flavonas	Catequina	<i>Camellia sinensis</i>	<i>Shigella</i> , <i>Vibrião</i> , <i>S. mutans</i>
	Isoflavona	<i>Nillettia thoningii</i>	<i>Schistosoma</i>
	Quercitina	<i>Quercus rubra</i>	
Alcalóides	Coca	<i>Erythroxylum nigrum</i>	Cocos Gram positivos
	Piperina	<i>Piper nigrum</i>	Antifúngico; <i>Lactobacillus</i>
	Mescalina	<i>Lophophora williamsii</i>	Geral*
	Berberina	<i>Berberis vulgaris</i>	Bactérias e protozoários
	Berberina	<i>Mahonia aquifolia</i>	<i>Plasmodium</i> , tripanossoma, geral
	Colchicina	<i>Gloriosa superba</i>	Geral*
	Reserpina	<i>Vinca minor</i>	Geral*
Aldeído	Hexanal	<i>Olea europea</i>	Geral*
Saponinas	Ginsenosídeo	<i>Panax ginseng</i>	<i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus</i> , fungos, vírus
Sulfóxidos	Alicina e alitastina	<i>Allium sativum</i>	<i>H. pylori</i> , antimicrobiana, bactéria, <i>candida</i>
Açúcares	Frutose	<i>Vaccinium</i> sp.	Geral*
Alcanos	Poliacetileno	<i>Bupleurum salicifolium</i>	<i>S. aureus</i> e <i>B. subtilis</i>

Fonte: Cowan (1999); Domingo e Lopez-Brea (2003); Burt (2004).

* Atividade frente a diferentes microrganismos.

Os óleos essenciais são utilizados desde a antiguidade na preservação, sabor dos alimentos e como agentes terapêuticos. Estima-se que existam três mil óleos essenciais conhecidos. Aproximadamente trezentos deles têm importância

comercial. O eugenol (1) e o carvacol (4), principais componentes fenólicos de óleos essenciais de algumas plantas aromáticas, são reconhecidos por suas propriedades antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiparasitária, analgésica e inseticida. As propriedades antibacterianas dos óleos essenciais são exploradas em diversos produtos comerciais para obturação de canais radiculares, utilizados na endodontia e produtos anti-sépticos de higiene bucal (BURT, 2004; MAZZAFERA, 2003; GURIB-FAKIM, 2006).

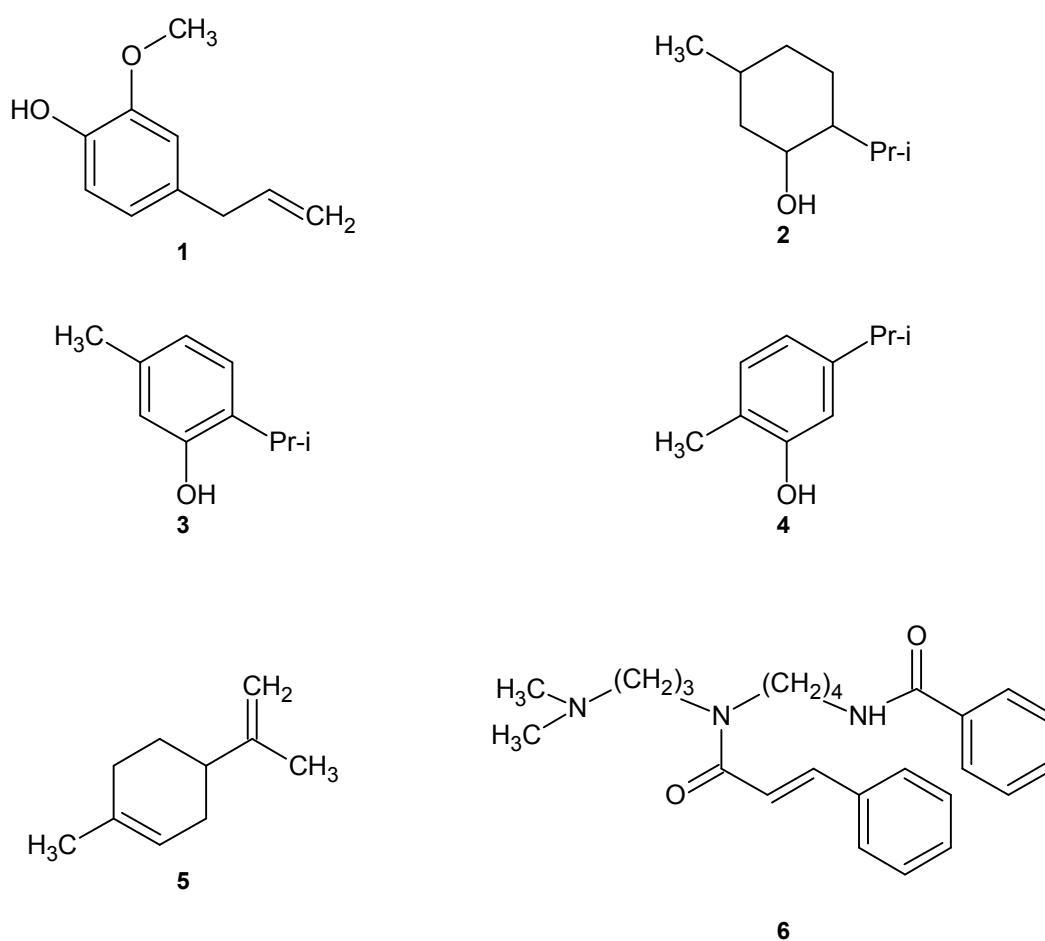


Figura 3. Estrutura química do eugenol (1), mentol (2), timol (3), carvacol (4), limoneno (5) e alicina (6).

4 SELEÇÃO DE PLANTAS PARA ESTUDO

A escolha da planta a ser estudada pode ser baseada em princípios distintos. Estima-se que existam 350.000 plantas sobre a superfície terrestre sem estudo fitoquímico e ou farmacológico, sendo o Brasil o país com maior número de espécies do mundo. Assim, a escolha da espécie vegetal para estudo pode ser realizada através de um ou mais critérios (SANT'ANA, 2002).

A literatura apresenta várias abordagens para a seleção de espécies vegetais para estudo. Segundo Maciel *et al.* (2002), três tipos de abordagens são os maiores alvos nas investigações:

a) Abordagem randômica ao acaso ou aleatória – escolha da planta sem qualquer critério, tendo como fator determinante a disponibilidade da planta;

b) Abordagem quimiotaxonômica ou filogenética – seleção da espécie correlacionada com a ocorrência de uma dada classe química de substância em um gênero ou família;

c) Abordagem etnofarmacológica – seleção da espécie de acordo com o uso terapêutico evidenciado por um determinado grupo étnico.

A seleção etnobotânica está fundamentada no uso pelas sociedades tradicionais, ou seja, no uso popular difundido ou não. Permite determinar os principais alvos para os testes além de aumentar a probabilidade de obter resultados positivos (DI STASI, 1996; HOSTETTMANN, QUEIROZ e VIEIRA, 2003).

No entanto, a coleta aleatória é indispensável, pois um grande número de plantas nunca foi estudado possibilitando a descoberta de novos agentes terapêuticos (DI STASI, 1996; HOSTETTMANN, QUEIROZ e VIEIRA, 2003).

Após seleção e coleta autorizada das espécies vegetais é necessário realizar a extração com método bem definido (maceração, infusão, decocção, percolação, arraste a vapor) realizar testes biológicos ou farmacológicos simples para desvendar seu potencial tóxico (toxicidade aguda e crônica) e sua (s) atividade (s) *in vitro* e *in vivo*. Para os testes biológicos pode ser utilizado microrganismos (bactérias, vírus e fungos), invertebrados (insetos, crustáceos, moluscos), cultura de células de organismo animal ou vegetal, órgãos isolados (vertebrados) e animais vivos (HOSTETTMANN, QUEIROZ e VIEIRA, 2003; SIANI, 2003).

5 ANTIBIÓTICOS E QUIMIOTERÁPICOS

O termo antibiótico deriva do termo antibiose que foi definido, pela primeira vez, por Vuillemin, no ano de 1889, para designar os fenômenos de antagonismo entre os microrganismos vivos, ou seja, o processo natural de seleção pelo qual um ser vivo destrói um outro para assegurar sua sobrevivência, o primeiro sendo inteiramente ativo e o segundo inteiramente passivo; um se opõe, sem restrições, à vida do outro (PELCZAR, REID e CHAN, 1980; LARPENT e SANGLIER, 1989; TAVARES, 1996).

Em 1942, Waksman definiu os antibióticos como substâncias químicas naturais produzidas por microrganismos que tem a propriedade de inibir o crescimento ou mesmo destruir os microrganismos (LARPENT e SANGLIER, 1989).

Sabe-se hoje que além das bactérias e fungos, vegetais superiores também produzem antibióticos como, por exemplo, o jacarandá (*Jacarandá caucana*, *Jacarandá mimosaeifolia*), a caviúna e o alho (*Allium sativum*) (NICASIO e MECKES, 2005).

Este fato possibilita ampliar o conceito anterior sendo, portanto, antibiótico um tipo especial de agente quimioterápico, geralmente obtido de organismos vivos, ou seja, é o produto metabólico de um organismo que é inibidor ou prejudicial para outros em concentrações muito baixas (PELCZAR, REID e CHAN, 1980; TAVARES, 1996).

Há ainda o termo *antibiotic-like* (semelhante a antibiótico) utilizado para as substâncias com propriedades antibacterianas produzidas por seres vivos superiores, vegetais ou animais (FONSECA, 1999).

Já o termo quimioterápico faz referência a substâncias químicas, sintetizadas em laboratório ou de origem natural, que destroem organismos ou parasitas infecciosos. Esses apresentam baixa toxicidade para as células normais do hospedeiro e, alta para o agente agressor (ROST, 1990; TAVARES, 1996).

As primeiras descrições sobre o uso de antimicrobianos datam de três mil anos atrás, quando os médicos chineses e indianos empregavam fungos para o tratamento de furúnculo e outras infecções. Nessa época, as propriedades terapêuticas dos antibióticos eram utilizadas de maneira empírica. Vários produtos empregados na Idade Antiga e Idade Média eram originários de substâncias produzidas por fungos. Desde então, a busca por substâncias para combater microrganismos direcionou ao estudo dos antibióticos (TAVARES, 1996).

O primeiro antibiótico foi descoberto por Alexander Fleming em 1928, a penicilina, produzido por *Penicillium notatum*. A descoberta de Fleming não foi valorizada, pois a atenção da sociedade científica estava voltada para as sulfonamidas, que haviam demonstrado atividade terapêutica contra infecções bacterianas sistêmicas (SOUZA e VASCONCELOS, 2005).

Na II Guerra Mundial, foram introduzidos os antibióticos de aplicação médica a partir do isolamento da penicilina no estado cristalino, em 1940 por Chain, Florey e colaboradores. Dois anos depois, em 1942, esse antibiótico foi introduzido na prática terapêutica para o tratamento de septicemia estafilocócica. Esse fármaco eficaz contra diversas doenças mostrou-se ineficaz contra a tuberculose (SALDAÑA *et al.*, 2004; SOUZA e VASCONCELOS, 2005).

O uso de antibiótico causou uma revolução na prática médica e continua até hoje a busca por novos compostos de maior eficiência e de menor toxicidade,

como a estreptomicina, isolada em 1944 por Selman Waskman e Albert Schatz, de uma amostra de *Streptomyces griseus*. Essa última constituiu-se no primeiro fármaco revolucionário na terapêutica anti-infecciosa humana com ação efetiva contra a tuberculose (TAVARES, 1996; SOUZA e VASCONCELOS, 2005).

As pesquisas pioneiras dos antibióticos contribuíram para a obtenção desses compostos a partir de microrganismos e após vários estudos, verificou-se a produção deles também por bactérias, actinomicetos, líquens, algas, animais e vegetais superiores. A quantidade e percentual de acordo com o tipo de organismo são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Organismos produtores de antibióticos.

ORGANISMO	ANTIBIÓTICO	
	QUANTIDADE	%
Actinomicetos	4.600	43
Plantas superiores	2.500	23
Cogumelos	1.600	15
Bactérias	950	9
Animais	700	7
Algas	250	2
Líquens	100	1
TOTAL	10.700	100

Fonte: Larpent e Sanglier, 1989.

Os actinomicetos são amplamente estudados e permanecem as maiores fontes de origem de novos metabólitos microbianos. Representam, portanto, o principal reservatório de antibióticos (CRAGG, NEWMAN e SNADER, 1997).

A partir dos estudos bioquímicos dos antibióticos naturais foi possível a obtenção das respectivas fórmulas estruturais, o que proporcionou a produção de antibióticos sintéticos. Além disso, o conhecimento da estrutura química e do seu

núcleo ativo permitiu o desenvolvimento de antibióticos semi-sintéticos, dentre os quais, os mais produzidos são os derivados da penicilina, cefalosporina, tetraciclina e eritromicina. Vale ressaltar que os derivados semi-sintéticos podem apresentar propriedades diferentes da substância natural (TAVARES, 1996).

Considerando o valor da biodiversidade brasileira, principalmente amazônica, e a necessidade crescente de drogas para prevenção e controle das doenças emergentes e outras que apresentam resistência frente às drogas de uso habitual, faz-se necessário os estudos de *screening*.

O *screening* simples envolve um ou dois testes com o objetivo de encontrar drogas com ação farmacológica específica. Quando não há informações sobre atividade farmacológica dos novos componentes eles são submetidos a vários testes para avaliar o seu potencial farmacológico, ou seja, determinar sua capacidade de inibir ou de estimular determinadas atividades biológicas associadas a doenças específicas ou a processos de cura (BURGER, 1970; SANT'ANA, 2002).

Nos bioensaios *in vitro* não é difícil encontrar um número razoável de substâncias ativas em baixas concentrações. Entretanto, muitas delas serão eliminadas após avaliação *in vivo*. Alguns fatores conduzem ao descarte de uma substância ativa *in vitro*, dentre eles pode-se destacar o tamanho das partículas, a toxicidade da substância e a incapacidade de atingir o local da infecção, por não atravessar uma barreira natural, ou ainda por serem metabolizadas rapidamente (BURGER, 1970; FOYE, 1990).

Por outro lado, é importante lembrar que a resistência *in vitro* pode não corresponder à resposta terapêutica. Uma vez administrada, a droga poderá atingir altas concentrações em locais específicos do organismo como, por

exemplo, vias urinárias ou biliares. Logo um agente infeccioso resistente *in vitro* poderá ser sensível *in vivo*. Nota-se que o termo sensível e resistente é relativo (TAVARES, 1996).

Há também “pro-drogas”, essas substâncias são ativadas por reações enzimáticas *in vivo*, mas inativas *in vitro*.

Os bioensaios para substâncias antifúngicas e antibacterianas são similares. Nos estudos de *screening* é importante selecionar microrganismos cuja sensibilidade aos antibióticos é imprevisível, devido ao desenvolvimento de resistência as drogas de uso convencional. Dentre os microrganismos selecionados estão sempre presentes nos estudos de *screening* as enterobactérias (*Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp.), a *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus* spp. (TAVARES, 1996). Esses podem ser vistos em muitos trabalhos publicados com plantas medicinais da África (RABE e STADEN, 1997; FABRY, OKEMO e ANSORG, 1998; KUDI *et al.*, 1999; EZEIFEKA, MBATA e PATRICK, 2004; CHAH *et al.*, 2006), da Finlândia (OJALA *et al.*, 2000) e da Ásia (ALZOREKY e NAKAHARA, 2002).

Após avaliações preliminares, os extratos com potencial deverão ser analisados mais profundamente para isolar os componentes quimicamente ativos e verificar se são inéditos (SANT`ANA, 2002). Modernamente, o método de replicação química é usado para verificar a presença de substâncias conhecidas ou não nesses extratos.

As espécies microbianas mais utilizadas em estudos de *screening* já foram avaliadas frente a várias drogas e seus halos de inibição nos testes de difusão em

água com disco de papel e suas concentrações inibitórias mínimas (CIM) já foram determinadas conforme Tabela 4.

Tabela 4. Antibacterianos e respectivos halos de inibição (mm) e CIM frente a *S. aureus* e *E. coli*.

ANTIBACTERIANOS	MICROORGANISMOS				
	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		
	Padrão para interpretação (sensível) (mm) ¹	Halo (mm) ¹	CIM (µg/mL)	Halo (mm) ¹	CIM (µg/mL)
Ampicilina	≥ 14* ≥ 29**	27-35 ≥ 29	0,05 0,06 ²	16-22 ≥ 14,0	5,0 2,0 ² 4,0 ²
Benzilpenicilina	≥ 29 **	26-37 ≥ 29	0,005-0,05	nd.	64,0
Clorafenicol	≥ 18	21-27	2,5-10	19-26	0,25-2,5
Clorotetraciclina	≥ 18	nd.	3,0	nd.	12,25
Estreptomicina	≥ 18	14-22	0,8	12-20	6
Gentamicina	≥ 15	19-27	0,1	19-26	1,5
Limcomicina	nd.	nd.	0,8	nd.	400
Neomicina B	≥ 17	18-26	0,1	17-23	0,06
Oxacilina	≥ 13	18-24	0,05-0,5	nd.	nd.
Oxytetraciclina	nd.	nd.	0,55	nd.	1,0
Rifamicina	nd.	nd.	0,025	nd.	1000 16 ²
Rifampicina	19	nd.	0,002 – 0,004	nd.	10 -16
Tetraciclina	≥ 19	19-28	0,21 0,5 ² 0,06 ²	18-25	0,73 1 ² 2 ²

Fonte: Andrews (2001). Farmacopéia Brasileira (1988) e Burger (1970).

¹Limites para controle laboratorial dos discos em meio água Mueller-Hinton sem sangue ou suplementos.

² Andrews (2001).

* Para Gram-negativos entéricos.

** Para *Staphylococcus*.

nd. = não determinado na literatura consultada.

O valor estabelecido para a CIM é variável na mesma espécie utilizando o mesmo antibiótico e cepas de origens diferentes. Para *S. aureus*, por exemplo, a gentamicina tem um CIM de 0,12 mm na cepa NCTC 6571 e 0,25 mm nas cepas ATCC 25923 e 29213 (ANDREWS, 2001).

O crescente surgimento de mecanismos de resistência a antimicrobianos tem gerado uma busca incessante das indústrias farmacêuticas e instituições de pesquisa por novas moléculas bioativas para a produção e lançamento de novas drogas.

6 DOENÇAS INFECCIOSAS

A doença infecciosa ocorre após interação entre parasito e hospedeiro, resultando em uma relação fracassada. A transmissão dessas doenças envolve um processo ecológico. O parasita pode ser transmitido de hospedeiro para hospedeiro por um vetor ou o hospedeiro pode manter o patógeno (KEESING, HOLT e OSTFELD, 2006).

Os agentes infecciosos apresentam poder tóxico, poder de penetração e manutenção (PEREIRA, 2004). Esses agentes pertencem a uma grande diversidade de classes e variam em tamanho, morfologia e patogenicidade. Na categoria de agentes infecciosos estão os príons, vírus, bactérias, fungos, protozoários, helmintos, ectoparasitas (piolhos, carrapatos, percevejos, pulgas), clamídias, riquetsias e micoplasmas (SAMUELSON, 2000).

6.1 DOENÇAS INFECCIOSAS DA CAVIDADE ORAL CAUSADA POR BACTÉRIAS

A microbiota oral é um ecossistema complexo com uma grande variedade de espécies. Dessas, muitas são indígenas e associadas com infecções orais, mas podem desencadear infecções à distância (MARCOTTE e LAVOIE, 1998).

Mais de 500 espécies de microrganismos colonizam os dentes, a língua, mucosa palatina e gengiva. Algumas são consideradas pioneiras como o *Streptococcus mitis*, *S. oralis* e *S. salivarius*. Outras como *S. mutans* e *S. sanguis* estão presentes na cavidade oral após erupção dos dentes.

Além das infecções na cavidade oral algumas bactérias são descritas na mucosa dos sistemas digestório e urinário (MARCOTTE e LAVOIE, 1998; GENDRON, GRENIER e MAHEU-ROBERT, 2000). Microrganismos encontrados na cavidade oral são apresentados da Tabela 5.

Tabela 5. Microrganismos encontrados na cavidade oral.

BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS		BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS	
Aeróbias ou facultativas	Anaeróbicas	Aeróbias ou facultativas	Anaeróbicas
Streptococcus <i>S. mitior</i> <i>S. milleri</i> <i>S. sanguis</i> <i>S. mutans</i> <i>S. salivarius</i> <i>S. rattus</i> <i>S. cricetus</i> <i>S. sobrinus</i>	Streptococcus <i>S. intermedius</i> <i>S. constellatus</i>	Neisseria <i>N. flavescens</i> <i>N. sicca</i>	Veillonella <i>V. alcalescens</i> <i>V. parvula</i> <i>V. atypica</i> <i>V. dispar</i>
Actinomyces <i>A. naeslundii</i> <i>A. viscosus</i>	Actinomyces <i>A. israelii</i> <i>A. odontolyticus</i> <i>A. meyeri</i>	Actinobacillus <i>A. actinomycetemcomitans</i>	Bacterioides <i>B. gingivales</i> <i>B. intermedius</i> <i>B. melaninogenicus</i> <i>B. forsythus</i> <i>B. loescheii</i> <i>B. oralis</i>
Bacterionema <i>B. matruchotii</i>	Arachinia <i>A. propionica</i>	Capnocytophaga <i>C. ochracea</i> <i>C. sputigena</i> <i>C. gingivalis</i>	Fusobacterium <i>F. nucleatum</i>
Lactobacillus <i>L. acidophilus</i> <i>L. brevis</i> <i>L. crispatus</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. salivarius</i> <i>L. casei</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. buchneri</i> <i>L. confusus</i> <i>L. fermentum</i>	Eubacterium <i>E. brachy</i> <i>E. alactolyticum</i> <i>E. alactolyticum</i> <i>E. lentum</i> <i>E. yurii</i>	Eikenella <i>E. corrodens</i>	Leptotrichia <i>L. buccalis</i>
Rothia <i>R. dentocariosa</i>	Peptostreptococcus <i>P. anarobius</i> <i>P. micros</i>	Campylobacter <i>C. sputorum</i>	Wolinella <i>W. recta</i>
Corynebacterium <i>C. matruchotti</i>			Campylobacter <i>C. concisis</i>
			Selenomonas <i>S. sputigena</i>
			Porphyromonas <i>P. gingivales</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. catoniae</i>
			Prevotella <i>P. oralis</i> <i>P. oris</i> <i>P. buccae</i> <i>P. corporis</i> <i>P. denticola</i> <i>P. intermedia</i> <i>P. nigrescens</i> <i>P. melaninogenica</i>

FONTE: marcote e Lavoie (1998); Gendron, Grenier e Maheu-Robert (2000).

No Brasil e nos demais países em desenvolvimento as patologias mais freqüentes da cavidade oral, em ordem decrescente, são: a cárie dental, as doenças periodontais, as oclusopatias, o câncer oral e as fendas lábio-palatinas. A cárie e a doença periodontal são endêmicas em sociedades industrializadas atingindo a quase totalidade da população, principalmente crianças. É, portanto, um problema de saúde bucal de relevância em saúde coletiva (PINTO, 1994). A cárie dental e a doença periodontal são doenças infecciosas e estão associadas a um agente bacteriano.

As infecções anaeróbicas mais freqüentes na cavidade oral incluem as gengivites, as doenças periodontais, infecções pulpares e periapicais as periimplantites e pericoronarites (PIOVANO, 1999).

Muitos fatores são importantes na colonização e persistência do microrganismo entre eles pode-se citar: suprimento nutricional, interações microbianas, temperatura, pH, defesas do hospedeiro, presença de agentes antimicrobianos e inibidores, a natureza do organismo e sua situação (GOMES, LILLEY e DRUCKER, 1996).

No canal radicular, por exemplo, os microrganismos utilizam como nutriente o tecido necrótico da polpa dentária, o exudato inflamatório e os fluidos dos tecidos periapical e dos canais laterais (SHURRAB, 2006).

6.1.1 Cárie Dental

A cárie dental é uma doença infecciosa, crônica, transmissível e de origem bacteriana que acompanha a humanidade desde tempos imemoriais. É caracterizada por ser localizada, progressiva e promover a desintegração molecular da estrutura do dente (MARCOTTE e LAVOIE, 1998; NARVAI, 2000).

Os microrganismos causadores da cárie formam colônias que aderem à superfície dentária através de uma placa – a placa bacteriana dental (PBD). Sob condições favoráveis, os microrganismos cariogênicos podem fermentar açúcares (sacarose, glicose, trealose, maltose, rafinose, lactose) para produzir ácido (ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, ácido fórmico), o qual por sua vez tem a capacidade de desmineralizar o esmalte dentário através da dissolução do fosfato de cálcio e liberação de fósforo e cálcio (HAMADA e SLADE, 1980; MARCOTTE e LAVOIE, 1998; NARVAI, 2000).

Três são os fatores essenciais para o surgimento da cárie: microbiota oral cariogênica, substrato adequado e susceptibilidade do hospedeiro, devendo haver a interação entre estes fatores. Outros fatores são considerados seletivos e ajudam a manter o equilíbrio entre as populações bacterianas, são eles a temperatura, o pH, a disponibilidade de nutrientes e água, a anatomia da estrutura dental, o fluxo salivar e substâncias antimicrobianas (flúor, clorexidina, componentes fenólicos, íons metálicos, extratos de plantas) (MARCOTTE e LAVOIE, 1998).

A presença do microrganismo é um pré-requisito para a cárie dental. O alto número de *Streptococcus*, particularmente o *S. mutans*, considerado o microrganismo de maior potencial cariogênico no homem, e o *S. sobrinus* estão

associados com a etiologia da cárie. No entanto, outros microrganismos, como *Lactobacillus acidophilus*, encontrados em grandes quantidades na saliva de pessoas com altos índices de cáries, *S. salivarius* e o *L. casei* também parecem participar do processo cariogênico (MARCOTTE e LAVOIE, 1998).

Para avaliar a severidade da cárie e estimar sua prevalência na dentição é empregado um indicador de saúde bucal denominado DMFT ou CPO-D em inglês e português, respectivamente. Esse índice é aceito por toda a comunidade internacional, sendo uma representação numérica que indica a prevalência de cárie dental no indivíduo ou população. O cálculo é realizado a partir da quantidade de dentes cariados (C), dentes perdidos (P) e obturados (O). Com base nos seus valores é possível analisar diferentes situações e estabelecer metas epidemiológicas (NARVAI, 2000).

Os dados apresentados em 1996 pelo Ministério da Saúde dão conta que na região Norte o percentual CPO cariados é de 72 %, logo o maior do país. Esse levantamento epidemiológico mostrou que o Amazonas apresentou o menor índice da Região Norte (54 %), no entanto, apenas sete estados brasileiros apresentaram índices superiores. Nessa avaliação, o Amazonas liderou o percentual CPO extraídos (6,4 %) no país.

O levantamento realizado através do Projeto SB Brasil 2003, demonstrou que quase 27 % das crianças de 18 a 36 meses apresentam pelo menos um dente decíduo com experiência de cárie dentária, sendo que a proporção chega a quase 60 % nas crianças de 5 anos. Na dentição permanente, quase 70 % das crianças brasileiras de 12 anos e cerca de 90 % dos adolescentes de 15 a 19

anos apresentam pelo menos um dente permanente com experiência de cárie dentária (Gráfico 1 e 2).

Os resultados permitiram observar que de uma maneira geral, as regiões Norte e Nordeste apresentam necessidades maiores de dentes que necessitam de restaurações, tratamentos pulpares e extrações.

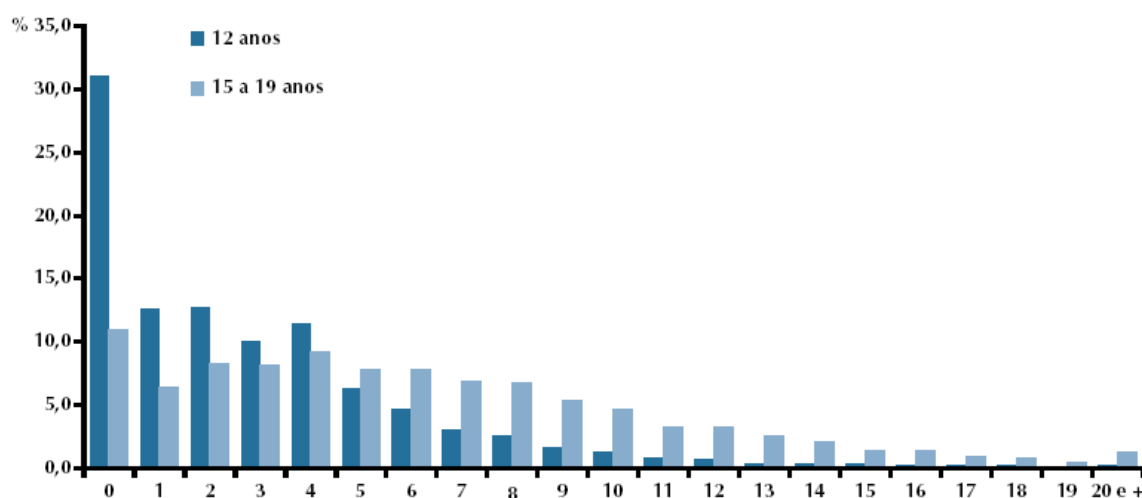


Gráfico 1 – Distribuição percentual dos valores de CPO-D na idade de 12 anos e na faixa etária de 15 a 19 anos. Brasil, 2003.

Fonte: Projeto SB Brasil 2003 (2004).

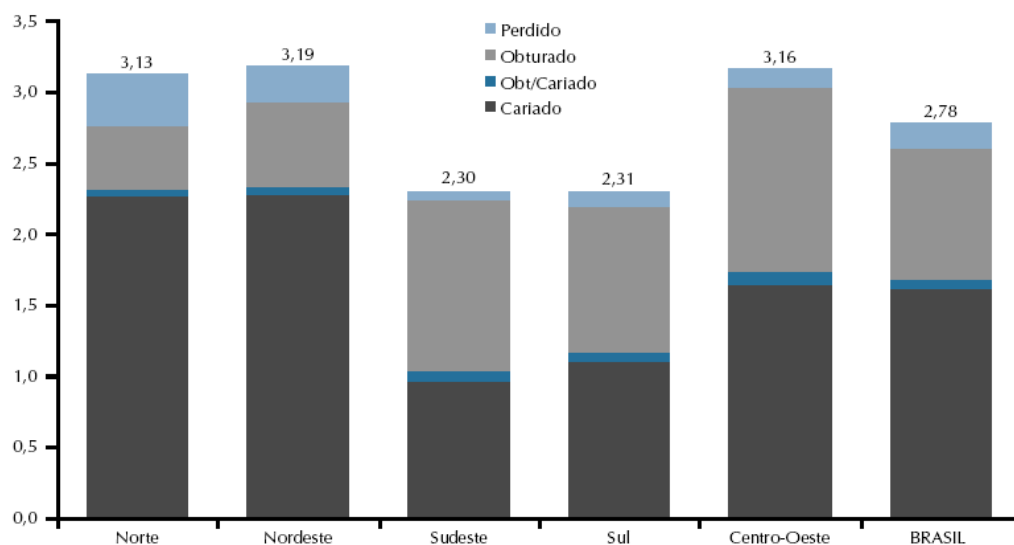


Gráfico 2 – Médias de CPO-D e proporções de componentes aos 12 anos segundo macrorregião. Brasil, 2003.

Fonte: Projeto SB Brasil 2003 (2004).

A fluoretação da água de consumo é o método mais seguro, efetivo, simples e econômico de prevenção pela via sistêmica e a melhor estratégia para o controle da doença. Esse método foi regulamentado no Brasil sendo recomendado e considerado pelo Ministério da Saúde (1975) o programa básico coletivo para prevenção de cárie no país (BRASIL, 1975).

Quanto ao percentual da população beneficiada com água fluoretada em relação à população total do país em 1996, o Amazonas foi o único estado da Região Norte a apresentar 0,0 %. O projeto SB 2003 observou que a região Norte apresentou 47 municípios não-fluoretados, o maior número do país (Gráfico 3).

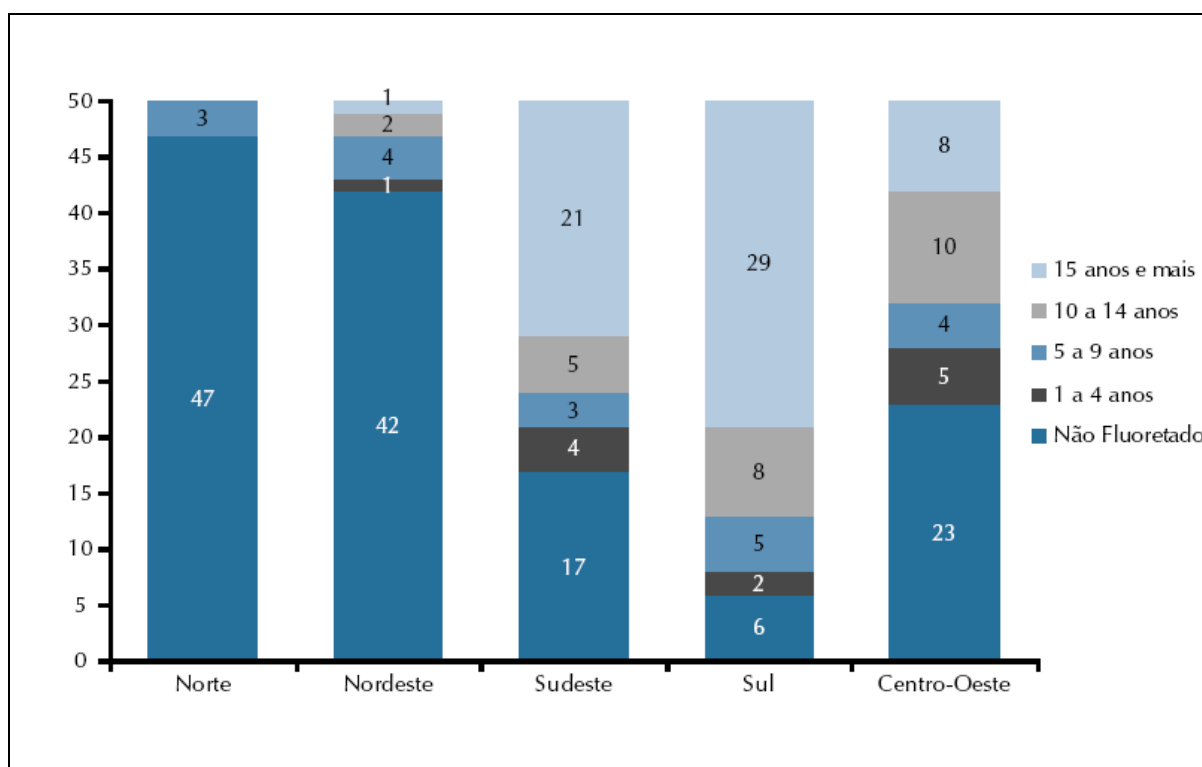


Gráfico 3 – Distribuição do número de municípios fluoretados e não-fluoretados segundo tempo de fluoretação e macrorregião. Brasil, 2003.
Fonte: Projeto SB Brasil 2003 (2004).

Segundo Narvai (2000), a fluoretação das águas apresenta um enorme potencial de “universalização” considerando socialmente injusto não realizá-la ou interrompê-la. Além disso, a adição de compostos fluoretados aos dentifrícios resultou na diminuição do índice CPO no Brasil (NARVAI, 2000).

Percebe-se a necessidade de modificar este quadro através da implantação de programas que atendam as peculiaridades regionais. O estudo da flora pode vir a trazer benefícios contribuindo para a diminuição nos índices CPO. Verifica-se a importância de obter outros meios de controle para auxiliar e talvez baratear a prevenção e tratamento da cárie e doença periodontal.

Diversas espécies de plantas têm demonstrado ação antibacteriana e antifúngica, no entanto poucas pesquisas foram realizadas para avaliar a ação dessas plantas contra microrganismos do ambiente oral, principalmente na Amazônia. A Tabela 7 apresenta algumas espécies vegetais que já foram avaliadas quanto à ação antimicrobiana em microrganismos orais.

Dos trabalhos apresentados na Tabela 6, apenas a avaliação de *Arctium lapa* e *Copaífera multijuga* foram realizados em Manaus. Observa-se que o método de difusão em ágar foi o mais utilizado.

Tabela 6. Espécies vegetais e/ou própolis avaliados em estudos anteriores frente a bactérias orais.

ESPÉCIE VEGETAL NOME COMUM	MICROORGANISMO	MÉTODO	REFERÊNCIA
<i>Allium cepa</i> L. Alho	<i>S. mutans</i> (JC-2) <i>S. sobrinus</i> (OMZ176) <i>P. gingivalis</i> (ATCC 33277) <i>P. intermédia</i> (ATCC 25611)	Difusão ágar/poço	Kim (1997)
<i>Drosera peltata</i> Smith	<i>S. mutans</i> (ATCC 25175) <i>S. sobrinus</i> (ATCC 33478) <i>S. rattus</i> (ATCC 19645) <i>S. cricetus</i> (ATCC 19642) <i>S. oralis</i> (ATCC 35037) <i>S. salivarius</i> (ATCC 7073) <i>S. mitis</i> <i>S. sanguis</i> <i>S. milleri</i> <i>P. oris</i> <i>P. buccae</i> <i>P. intermédia</i>	Difusão ágar/disco de papel CIM - Microdiluição em caldo	Didry <i>et al.</i> (1998)
<i>Arnica montana</i> Arnica Própolis	<i>S. mutans</i> (OMZ 175) <i>S. sobrinus</i> <i>S. sanguis</i> <i>S. cricetus</i> <i>A. naeslundii</i> ATCC12104 <i>A. viscosus</i> OMZ 105 <i>P. gingivalis</i> (isolado clínico) <i>P. endodontalis</i> (isolado clínico) <i>P. denticola</i> (isolado clínico)	Difusão ágar/cilindro	Koo <i>et al.</i> (2000)
<i>Arctium lapa</i> Bardana	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633) <i>E. faecalis</i> (ATCC 29210) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) <i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	Difusão ágar/disco Bioautografia	Pereira <i>et al.</i> (2005)
<i>Copaifera multijuga</i> Copaíba	<i>E. faecalis</i> <i>C. albicans</i>	Difusão ágar/poço Diluição/CIM	Abinader (2005)
<i>Pistacia vera</i> Pistacha	<i>E. coli</i> (ATCC 35218) <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145) <i>E. faecalis</i> (ATCC 29212) <i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	Microdiluição	Ozcelik <i>et al.</i> (2005)
<i>Catha edulis</i> Kat	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538) <i>S. mitis</i> (ATCC 9811) <i>S. mutans</i> (ATCC 25175) <i>S. sanguis</i> (ATCC10556) * 33 espécies avaliadas	Diluição em ágar	Al-Hebshi, Al-Haronl e Skaug (2006)
<i>Anacardium occidentale</i> Caju	<i>S. mitis</i> <i>S. mutans</i> <i>S. sanguis</i> *cepas do Instituto Adolfo Lutz	Difusão ágar/poços	Melo <i>et al.</i> (2006)

6.1.1.1 *Streptococcus*

Streptococcus são bactérias de forma esférica (cocos) ou ovóides, com diâmetro entre 0,5 a 2,0 μm , Gram-positivos, que crescem em pares ou em cadeias lineares, não formam esporos, são imóveis, aeróbios, facultativamente anaeróbios e algumas espécies são encapsuladas. Crescem em temperaturas entre 25 e 45 °C. São parasitas de vertebrados encontradas principalmente na cavidade oral e sistema respiratório. Algumas espécies são patogênicas para humanos e animais (HOLT *et al.*, 1994).

Os *Streptococcus* estão entre os agentes mais comuns de doenças humanas acometendo pessoas de todas as idades e manifestando-se através de múltiplas síndromes em regiões diferentes do corpo e com gravidade distinta (VERONESI e FOCACCIA, 2004). Causam uma miríade de infecções supurativas da pele, orofaringe, pulmões e valvas cardíacas e, também, síndromes pós-estreptocócicas, como a febre reumática, glomerulonefrite e eritema nodoso (COTRAN, KUMAR e COLLINS, 2000).

Os *Streptococcus viridans* são representados por espécies encontradas na microbiota das vias respiratórias superiores dos seres humanos e são considerados patógenos oportunistas. Nesse grupo, estão as espécies *S. milleri*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. salivarius* e *S. sanguis* que estão relacionados à endocardite bacteriana, cárie dentária, bacteremia, septicemia e infecções periapicais (PIOVANO, 1999; VERONESI e FOCACCIA, 2004). *S. viridans* é α -hemolítico e, portanto, verde em placas de ágar sangue (SAMUELSON, 2000).

6.1.1.1.1 *Streptococcus sanguis*

O nome da espécie foi dado por White e Niven para a espécie de *Streptococcus* α -hemolítico isolado do sangue de pacientes com endocardite subaguda (HAMADA e SLADE, 1980). Espécies de *S. sanguis* são separadas em dois biótipos A e B como apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Características para identificação de *S. sanguis* biótipo A e B.

	FERMENTAÇÃO					HIDRÓLISE		PEROXIDASE
	Manitol	Sorbitol	Melibiose	Rafinose	Esculina	Inulina	Arginina	
A	-	-	-	+	+	+	+	+
B	-	-	-	-	-	-	-	+

Fonte: Hamada e Slade (1980).

Algumas cepas são β -hemolíticas ou não hemolíticas. A maioria das amostras produz polissacarídeo extracelular glicano e ácidos a partir da glicose, sacarose e trealose. *S. sanguis* Tipo II é designado de *S. oralis* (JORGE, 1998).

S. sanguis é um dos predominantes colonizadores dos dentes já foi isolado de placas dentais humanas, língua e saliva, contudo algumas amostras têm pouca cariogenicidade para animais. As cáries produzidas por *S. sanguis* ocorrem principalmente em sulcos e são significativamente menores que as produzidas por *S. mutans* (HAMADA e SLADE, 1980; COYKENDALL, 1989; WADE *et al.*, 2005).

S. sanguis é encontrado nos canais radiculares, em infecções periapicais e nos tecidos adjacentes ao implante dentário em casos de insucesso, em infecções periodontais e causa endocardite (COYKENDALL, 1989; GOMES, LILLEY e DRUCKER, 1996; PIOVANO, 1999; WADE *et al.*, 2005).

6.1.1.2 *Staphylococcus*

São microrganismos de forma esférica (cocos), com diâmetro entre 0,5 e 1,5 µm, dispostas aos pares ou, quando sofrem divisão em três planos irregulares, em massas, mostrando-se agrupadas lembrando cachos de uva. São Gram-positivos, imóveis, anaeróbios facultativos e não formam esporos. Formam colônias opacas, mas podem ainda exibir coloração branca, creme e amarela a laranja. A temperatura ótima de crescimento está entre 30 e 37 °C (HOLT *et al.*, 1994).

O gênero *Staphylococcus* está associado principalmente à pele e membranas mucosas. Algumas espécies são patógenos oportunistas ou produzem toxina extracelular (HOLT *et al.*, 1994). *S. aureus*, por exemplo, causa lesões cutâneas (furúnculos, antraz, impetigo e pele escaldada), faringite, pneumonia, endocardite, intoxicação alimentar e a síndrome do choque tóxico. *S. aureus*, é a principal causa de infecção em pacientes com queimaduras graves e feridas cirúrgicas (SAMUELSON, 2000) e a bactéria mais comum nas infecções entre usuários de drogas envolvendo pele, ossos, articulações e sangue (LOWY e MILLER, 2002). Além disso, *S. aureus* juntamente com *S. sanguis* podem ser isoladas de infecções pulpares e periapicais (JORGE, 1998).

Segundo o manual de microbiologia clínica da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004) *S. aureus* está incluído entre os agentes mais comuns de infecções nosocomiais sendo isolada comumente na pele, feridas cirúrgicas e sangue. Segundo Moor e Ferguson (2006), dentre os patógenos mais comuns em infecções nosocomiais estão *S. aureus* (30 %), *Candida* spp. (17 %) e *Escherichia coli* (13 %).

6.2 CANDIDÍASE OU CANDIDOSE

Candidíase é um termo que contempla um grupo de condições infecciosas com localização mucosa e ou cutânea cujo agente etiológico são espécies de leveduras do gênero *Candida*. É uma entidade micopatológica com distribuição universal, de origem endógena ou exógena, aguda ou crônica (MCCULLOUGH, ROSS e READ, 1996; EGGIMANN, GARBINO e PITET, 2003).

O gênero *Candida* tem aproximadamente 200 espécies descritas. Entretanto, apenas 10 % são patogênicas (Tabela 8). Dentre elas, sete são apontadas como sendo de grande interesse médico. Dessas *C. albicans* é freqüentemente isolada e acredita-se ser a mais virulenta ao homem (MCCULLOUGH, ROSS e READ, 1996; EGGIMANN, GARBINO e PITET, 2003).

C. albicans é a espécie mais importante na candidíase oral sendo isolados em indivíduos saudáveis e comprometidos (FARAH, ASHMAN e CHALLACOMBE, 2000; EGGIMANN, GARBINO e PITET, 2003). No entanto, pode ocorrer candidíase sistêmica com manifestações orais. A candidíase sistêmica é a infecção oportunista que ocorre com maior freqüência em pacientes com comprometimento imunológico (HIV e AIDS, síndrome DiGeorge; síndrome Chediak-Higashi) (FARAH, ASHMAN e CHALACOMBE, 2000; LACAZ *et al.*, 2002).

Associada a essa contextualização, menciona-se que a microbiota oral de pacientes HIV-positivo difere da microbiota de pacientes imunocompetentes, pois a combinação de drogas (antimicrobianos, corticoides e antiinflamatórios) utilizadas no tratamento desses pacientes predispõe ao crescimento de leveduras tais como a *Candida* (NEVES e NASCIMENTO, 2001).

Tabela 8. Espécies do gênero *Candida* e infecções clínicas relacionadas.

ESPÉCIE	FREQUÊNCIA	INFECÇÕES CLÍNICAS
<i>C. albicans</i>	+++	Infecções cutaneomucosa, orofaríngeas, esofagite, vaginite, balanite, endocardite, peritonite e meningite
<i>C. parapsilosis</i>	++	Candidemia em neonatos
<i>C. tropicalis</i>	++	Candidíase sistêmicas em pacientes imunodeprimidos, candidíase bucal, broncopulmonar e intestinal, vaginite, endocardite e meningite,
<i>C. glabrata</i>	++	Candidíase sistêmica, vaginite e meningite
<i>C. krusei</i>	++	Candidemia e endoftalmite, vaginite
<i>C. dubliniensis</i>	+	Infecções orofaríngeas e pacientes HIV positivo
<i>C. guilliermondii</i>	+	Candidíase sistêmica e endocardite
<i>C. kefyr</i>	+	Candidíase sistêmica
<i>C. lipolytica</i>	+	Candidemia associada a cateter intravenoso
<i>C. lusitaniae</i>	+	Candidemia e infecções disseminadas
<i>C. norvegensis</i>	+	Infecções em decorrência de transplantes renais
<i>C. rugosa</i>	+	Candidemia
<i>C. zeylanoides</i>	+	Candidemia e artrites
<i>C. famata</i>	+	Candidemia

Fonte: Eggimann, Garbino e Pittet (2003) e Develoux e Bretagne (2005).

As espécies de *Candida* vivem como comensal em diferentes regiões do corpo. São encontradas na pele, unhas, mucosas, tubo digestório, sistema vascular, urogenital e respiratório, portanto são freqüentemente isoladas da pele, mucosa, fezes e urina de indivíduos normais. O sistema digestório é relatado como o principal habitat de *Candida spp.* (McCULLOUGH, ROSS e READ, 1996; CALDERONE e FONZI, 2001; LACAZ *et al.*, 2002; EGGIMANN, GARBINO e PITTET, 2003).

As leveduras por serem oportunistas e constituírem a microbiota humana podem desencadear doenças, tornando-se patogênicas, quando fatores locais ou sistêmicos estão presentes. No desenvolvimento da infecção são importantes a virulência do microrganismo (parede celular, adesão, produção de enzimas proteolíticas) e os fatores relacionados ao hospedeiro. Os principais fatores de risco são os naturais, a dieta, os mecânicos e iatrogênicos (McCULLOUGH, ROSS e READE, 1996; FARAH, ASHMAN, CHALLACOMBE, 2000; EGGIMAN, GARBINO e PITTET, 2003).

Assim, é possível destacar como fatores de risco os extremos de idade, uso de próteses intra-orais, doenças metabólicas e endócrinas, terapia antibacteriana, quimioterapia no tratamento do câncer, radioterapia, baixo fluxo salivar, nutrição parenteral, peritonite, uso de anticoncepcionais e gestação. Além desses fatores, o stress pode ser um fator adicional para infecção com *Candida* (DEACON, 1997; MCCULLOUGH, ROSS e READ, 1996; FARAH, ASHMAN e CHALLACOMBE, 2000; EGGIMANN, GARBINO e PITET, 2003; DAVIES, BRAILSFORD e BEIGHTON, 2006).

6.2.1 *Candida albicans*

O binômio *C. albicans* foi adotado oficialmente em 1954 no Eighth Botanical Congress. Entre os anos de 1950 e 1990 houve um aumento nos estudos de taxonomia, bioquímica e microscopia dessa espécie. Há relatos na literatura de cento e sessenta e seis sinônimos para *C. albicans* dentre eles *Oidium albicans*, *Monilia albicans*, *Monilia psilosis*, *Endomyces albicans* (MCCULLOUGH, ROSS e READ, 1996; LACAZ *et al.*, 2002).

Candida albicans é classificada como levedura fermentadora, microaerófila com capacidade de desenvolver-se em ambientes com pouco oxigênio ou na ausência do mesmo. A temperatura ótima de crescimento, dessa levedura, fica em torno de 20 a 30 °C. O pH favorável ao seu desenvolvimento está entre 5,0 e 7,0 não tolerando pH alcalino. No entanto, é capaz de se adaptar a extremos de pH (SIQUEIRA JR e SEN, 2004).

Quanto à morfologia são redondas ou ovais, com brotamento único, paredes espessas e carregadas de material lipídico com diâmetro entre 6 e 12 µm (SIQUEIRA JR e SEN, 2004).

A parede celular da *C. albicans* assemelha-se à parede celular das plantas quanto a arquitetura, mas não quimicamente. Aproximadamente 80 a 90 % da parede celular é composta por carboidratos, 6 a 25 % de proteínas, 1 a 7 % de lipídios e quitina apenas na região do broto. Do peso seco da parede celular pode-se destacar a presença de mananas (23 %), glucanos (40-60 %) e quitina (0,6-9 %) (MCCULLOUGH, ROSS e READ, 1996; SIQUEIRA JR e SEN, 2004).

Aproximadamente 50 % da população possui a *C. albicans* como parte da microbiota normal da boca sem, no entanto causar doença. Na cavidade oral é a infecção fúngica mais comum (SIQUEIRA *et al.*, 2002; SIQUEIRA e SEN, 2004). Na candidíase oral, a forma mais freqüente é a pseudomembranosa, caracterizada por placas brancas removíveis na mucosa oral e língua. Outras apresentações clínicas incluem a forma atrófica, com placas vermelhas e lisas sobre o palato duro ou mole, queilite angular e candidíase cutaneomucosa crônica (FARAH, ASHMAN e CHALLACOMBE, 2000).

A transição de *C. albicans* de comensal para patogênica está associada às condições predisponentes associadas a diversos fatores de virulência indispensáveis no sucesso da colonização ou invasão. Os três fatores de virulência mais estudados são aqueles relacionados à parede celular, essencial para o sucesso de um microrganismo como patógeno, à adesão e a produção de enzimas proteolíticas (MCCULLOUGH, ROSS e READ, 1996).

Dentre os mecanismos de patogenicidade, destaca-se a capacidade de adaptação em diferentes ambientes (oral, vaginal, sangue, pele), a adesão nas mais diferentes superfícies, transição morfológica, produção de enzimas

hidrolíticas, formação de biofilme, evasão e imunomodulação das defesas do hospedeiro (SIQUEIRA JR e SEN, 2004).

Segundo o manual da ANVISA (2004), *C. albicans* está entre os patógenos mais encontrados em infecções nosocomiais apresentando como sítio comum para isolamento o sistema urinário e o sangue.

Além das superfícies mucosas *C. albicans* é encontrada no interior dos canais radiculares infectados e/ou necrosados apresentando alta resistência às soluções irrigadoras (NaOCl; água oxigenada, hidróxido de cálcio). Está presente principalmente em infecções secundárias e persistentes e infecções endodônticas resistentes à terapia convencional, sendo muitas vezes responsável pelo insucesso dos tratamentos endodônticos (BAUMGARTNER, WATTS e XIA, 2000; SIQUEIRA, 2002; SHURRAB, 2006). Clorexidina e iodo-povidona são substâncias antimicrobianas utilizadas no tratamento de gangrena pulpar e em casos de falha na terapia convencional (SHURRAB, 2006).

C. albicans coloniza a parede dentinária e penetra na polpa dentária através dos túbulos dentinários (SIQUEIRA JR *et al.*, 2002). Essa ação é consequência dos processos de cárie de dentina, decorrente de traumas ou da própria manipulação do canal radicular durante o tratamento endodôntico. A resistência ao hidróxido de cálcio somada a habilidade de penetrar nos canais laterais e túbulos dentinários são responsáveis por sua presença em periodontites apicais persistentes (SHURRAB, 2006).

A maioria das infecções causadas por *Candida* pode ser tratada por aplicação tópica de antifúngicos. A susceptibilidade da *Candida* spp. aos agentes

antifúngicos é bastante diferenciada (Tabela 9) haja vista a CIM de 1 a 4 µg/mL frente a nistatina e 0,5 µg/mL frente a anfotericina B (TAVARES, 1996; EGGIMANN, GARBINO e PITET, 2003).

No período de 1983 a 1994 foram aprovados 16 antifúngicos todos de origem sintética (CRAGG, NEWMAN e SNADER, 1997). Segundo Newman, Cragg e Snader (2003) foram lançados 24 antifúngicos no mercado entre os anos de 1981 e 2002 dos quais 21 são sintéticos. A Figura 4 apresenta a estrutura química de algumas drogas antifúngicas.

Tabela 9. Antifúngicos com respectiva origem, ano de descoberta e susceptibilidade da *Candida* spp.

ANTIFÚNGICO	ORIGEM	ANO DESCOBERTA	CIM (µg/mL)		
			S	S-DD ou I	R
Voriconazol	St	-	≤ 1	n.d.	-
Posaconazol	-	-	≤ 1	n.d.	-
Ravuconazol	-	-	≤ 1	n.d.	-
Caspofungin	DPN	-	≤ 1	n.d.	-
Flucitosina	-	-	≤ 4	8-16	> 16
Griseofuvina	<i>Penicillium griseofulvus</i>	1939	0,18	-	-
Nistatina	<i>Streptomyces noursei</i>	1950	1-4	-	-
Anfotericina B	<i>Sterptomyces nodosus</i>	1955	≤ 1	-	-
Clotrimazol	St	1969	-	-	-
Miconazol	St	1969	-	-	-
Cetoconazol	St	1978	≤ 1	-	-
Tioconazol	St	1979	-	-	-
Fluconazol*	St	1982	≤ 8	16-32	> 32
Itraconazol *	St	1983	≤ 0,125	0,25-0,5	> 0,5

St= sintético; DPN= derivado de um produto natural; S= susceptibilidade; S-DD= Susceptibilidade dose dependente; I= intermediária; R= resistente; n.d.= não determinado. – informações não encontradas na literatura consultada.

Fonte: Tavares (1996); Eggimann, Garbino e Pittet (2003); Newman, Cragg e Snader (2003).

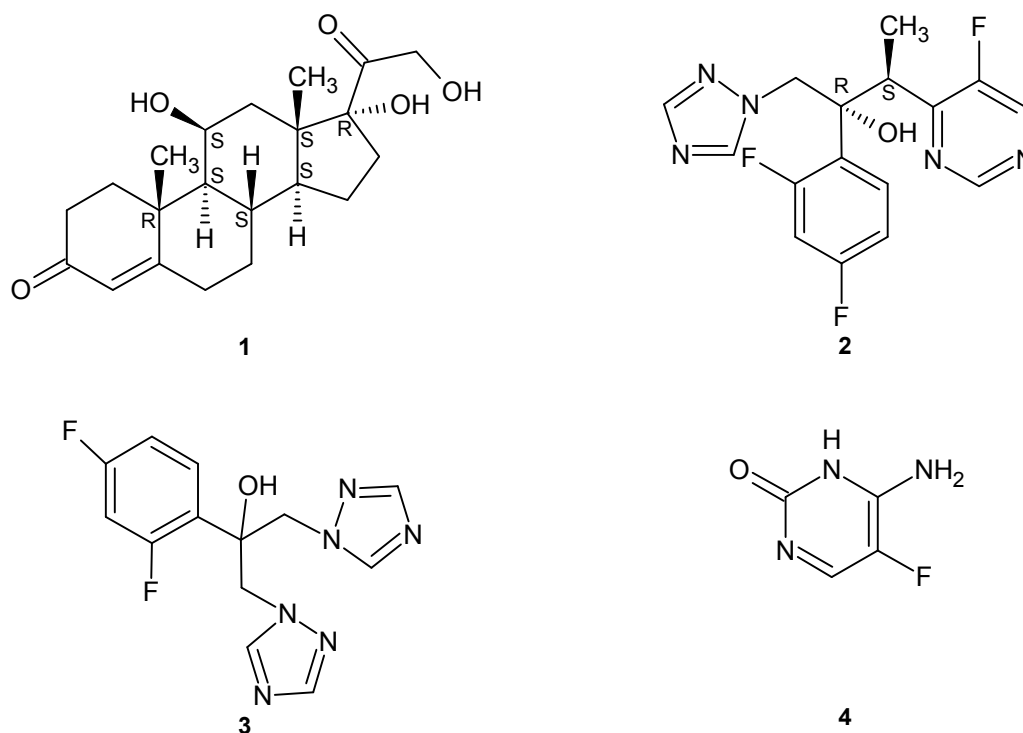


Figura 4. Estruturas químicas de algumas drogas antifúngicas. Nistatina ($C_{21}H_{30}O_5$) (1), voriconazol ($C_{16}H_{14}F_3N_5O$) (2), fluconazol ($C_{13}H_{12}F_2N_6O$) (3) e flucitosina ($C_4H_4FN_3O$) (4).

6.2.2 Métodos de Avaliação da Atividade Antifúngica

Os métodos empregados para avaliação antifúngica despertam muito interesse. Segundo Rex, Pfaller e Walsh (2001) o método de difusão em ágar com disco de papel é conveniente e econômico e tem boas relações com o método em caldo nos testes realizados com fluconazol.

O National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2002), publicou os métodos de referência para testes de diluição em caldo. O manual apresenta pontos de corte determinados para algumas combinações organismo-droga. Em alguns casos as diretrizes de interpretação dos testes de sensibilidade são decorrentes de experiência com infecções de mucosa não havendo dados disponíveis que suportem os pontos de corte para as infecções invasivas por *Candida* spp.

Os padrões são estabelecidos para antifúngicos comerciais conhecidos, entretanto para avaliação com extratos e novas drogas não há método definido.

Há diversos relatos na literatura sobre o desenvolvimento de mecanismos de resistência frente às drogas de uso clínico tais como mudança na parede celular ou membrana plasmática e ativação de vias alternativas que aumentam o metabolismo do antifúngico (EGGIMANN, GARBINO e PITET, 2003). Esse fato reforça a necessidade de estudos de *screening* para novas substâncias antifúngicas.

Screenings tem sido realizado para avaliar atividade antifúngica de espécies vegetais. De acordo com a Tabela 10, o método mais empregado foi difusão em ágar. Os resultados têm demonstrado que há espécies de uso popular que apresentam atividade contra *C. albicans* em estudos *in vitro*. No entanto, outros estudos realizados não apresentam resultados positivos (LOCHER *et al.*, 1995; MACKEEN *et al.*, 2000; AIYELAAGBE, 2000; AKINPELU, 2001; ZUQUE *et al.*, 2004).

Holetz *et al.* (2002) avaliaram 13 espécies vegetais frente a *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Apenas o extrato de *Psidium guajava* foi ativo frente a *C. albicans*.

Na Amazônia algumas espécies vegetais de uso popular são utilizadas como antifúngicas dentre elas pode-se citar: ucuúba (*Virola elongata* (Benth.) Warb.) (Myristicaceae), pichirina (*Vismia minutiflora* Ewan) (Hypericaceae), piquiá (*Aspidosperma schultesi*) (Apocynaceae) e capirona (*Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook) (Rubiaceae) (DUKE e VASQUEZ, 1994).

Tabela 10. Trabalhos anteriores sobre inibição de *C. albicans* por extratos vegetais e / ou própolis.

ESPÉCIE VEGETAL	CEPA TESTADA	MÉTODO	AUTOR
<i>Artemisia mexicana</i> <i>Bocconia arbores</i> <i>Punica granatum</i> <i>Eucalyptus globulus</i> <i>Ocimum basilicum</i> <i>Thymus vulgaris</i>	ATCC 10231	Difusão em ágar	Navarro <i>et al.</i> (1996)
<i>Annona purpurea</i> <i>Dendropanax arboreus</i> <i>Dorstenia drakena</i> <i>Guazuma ulmifolia</i> <i>Petiveria alliacea</i> <i>Piper aduncum</i> <i>Pityrogramma calomelanos</i> <i>Solanum torvum</i> <i>Thevetia ahouai</i>	NIH B311	Difusão em ágar/poços	Lentz <i>et al.</i> (1998)
Propolis	562	Difusão em ágar	Kujumgiev <i>et al.</i> (1999)
Própolis (<i>Apis-Flora</i>)	Amostra clínica	Diluição em meio sólido	Azevedo <i>et al.</i> (1999)
<i>Psidium guajava</i> <i>Rosmarinus officinalis</i> <i>Syzygium aromaticum</i> <i>Syzygium cumini</i> <i>Thymus vulgaris</i>	Isoladas em hospital	Difusão em ágar / disco	Nascimento <i>et al.</i> (2000)
<i>Arnica montana</i> Própolis	NTCC 3736 Amostra clínica	Difusão em ágar	Koo <i>et al.</i> (2000)
<i>Helichrysum italicum</i> <i>Hieracium pilosella</i> <i>Lonicera caprifolium</i> <i>Nepeta cataria</i> <i>Phytolacca dodecandra</i> <i>Plantago lanceolata</i>	ATCC 10231	Difusão em ágar/disco	Nostro <i>et al.</i> (2000)
<i>Senna racemosa</i> <i>Garcinia atroviridis</i> Griff	ATCC 10231	Difusão em ágar/disco Bioautografia	Sansores-Peraza <i>et al.</i> (2000) Mackeen <i>et al.</i> (2000)
<i>Tabebuia avellanedae</i> <i>Eucalyptus sp.</i> <i>Beta vulgaris</i> <i>Sapindus sp</i> <i>Casuarinas equistifolia</i> <i>Nelumbo nucifera</i> <i>Portulaca quadriflora</i> <i>Vitis vinifera</i> <i>Cordia dichotoma</i> <i>Nycanthes arbortristis</i>	CECT 10231 IOA-109	Difusão em ágar/disco Difusão em ágar/poços	Portillo <i>et al.</i> (2001) Ahmad e Beg (2001)
<i>Bergenia crassifolia</i> Própolis	ATCC 10231 ATCC 10231	Diluição em caldo Difusão em ágar/disco	Kokoska <i>et al.</i> (2002) Castaldo e Capasso (2002)
<i>Cassia alata</i> <i>Allium sativum</i> <i>Glycyrrhiza glabra</i> <i>Polygala myrtifolia</i> <i>Tulbaghia violácea</i> <i>Warburgia salutaris</i>	Amostras clínicas ATCC 10231 e Amostra clínica	Difusão em ágar/disco Difusão em ágar Bioautografia	Somchit <i>et al.</i> (2003) Motsei <i>et al.</i> (2003)
<i>Cinnamomum zelanicum</i> <i>Arctium lappa</i>	Amostra clínica ATCC 10231	Difusão em ágar/poços Bioautografia	Gayoso <i>et al.</i> (2004) Pereira <i>et al.</i> (2005) ¹
<i>Copaifera multijuga</i> + Hidróxido de cálcio	ATCC 18804	Difusão em ágar /poços	Bandeira <i>et al.</i> (2006) ¹

¹ Pesquisa realizada em Manaus.Nota: * os autores descreveram 24 plantas com atividade para *C. albicans*.

7 MATERIAL E MÉTODOS

7.1 SELEÇÃO DAS ESPÉCIES VEGETAIS

Inicialmente, foi elaborada uma planilha contendo a relação de famílias e gêneros de plantas da Reserva Florestal Adolpho Ducke de acordo com o livro de Ribeiro *et al.* (1999). A seguir, a literatura científica foi consultada principalmente através de um levantamento bibliográfico na rede mundial de computadores em sistemas de dados bibliográficos científicos (Scifinder, webofscience, Scirus, Scielo, Medline, Neuroscion e banco de teses). Durante a pesquisa todos os resumos referentes aos gêneros pesquisados foram direcionados para o programa EndNote®.

Após levantamento, os gêneros que não apresentaram estudos fitoquímicos e / ou farmacológicos ou uso popular para fins medicinais, foram selecionados. Em seguida, foi realizada pesquisa das espécies para busca de informações no banco de dados do projeto Flora da Reserva Ducke, no INPA. Este banco de dados fornece informações necessárias à identificação e localização das plantas na Reserva. Dentre as informações disponíveis no banco, foi solicitada, após cadastro dos gêneros de interesse, as seguintes:

- Nome científico das espécies vegetais;
- Número de registro dado pelo Projeto Flora da Reserva Ducke;
- Nome do(s) coletor (es);
- Número da exsicata depositada no herbário do INPA;
- Informações sobre localização geográfica exata das espécies (marco, ângulos, distância, local e número da planta).

As identificações botânicas haviam sido previamente efetuadas por integrantes do projeto flora da Reserva Ducke. Para o presente estudo, foi registrado anterior à coleta de campo através de fotografia, com câmera digital, as exsicatas depositadas no Herbário do INPA, com auxílio da tabela contendo gênero, espécie e número da exsicata. Assim a identidade botânica de cada espécime era conhecida antes da coleta. Apenas espécimes com exsicata e identidade botânica confirmada foram selecionadas para a próxima etapa (coleta).

7.2 COLETA

Após fotografar as exsicatas no herbário, e certo da identificação botânica em nível de espécie de cada espécime, foram estabelecidos critérios para selecionar espécies a serem coletadas. Assim, plantas com quaisquer informações geográficas ausentes tais como marco, local, ângulo e distância, foram eliminadas. Foi obtida no INPA autorização de acesso às espécies de interesse.

Com auxílio do mapa de trilhas da Reserva Ducke (Projeto Flora, 2006), foram realizadas as coletas selecionando os marcos mais próximos, para racionalizar o trabalho.

Com auxílio do mateiro Everaldo Pereira, ex-integrante do projeto Flora da Reserva Ducke, foram realizadas as coletas (Figuras 5 e 6). Para isso foram utilizados os seguintes materiais: bússola; podão; terçado; tesoura de poda; saco plástico (6 L); saco de fibra (60 L); caneta japonesa e lápis de grafite; prancheta e papel para anotações, cinto de segurança para subir em árvores mais altas e máquina fotográfica digital, para registros.

Amostras danificadas por insetos, fungos ou dano mecânico foram descartadas. As espécies coletadas foram acondicionadas em saco plástico, constando os dados de identificação (espécie, data da coleta e marco).

Após coleta, foi determinado o peso úmido de folhas, galhos e casca e / ou fruto, quando coletado, com auxílio de balança semi-analítica.



Figura 5. Exemplos de marco na Reserva Ducke.



Figura 6. Coleta realizada dia 27 de fevereiro de 2004 na Reserva Florestal Ducke, apresentando os coletores, Ana Lúcia Basílio Carneiro, Viviana Maria Araújo de Oliveira e o mateiro Everaldo da Costa Pereira.

7.3 SECAGEM E MOAGEM

O material vegetal coletado foi levado ao Herbário Prance do Curso de Biologia do Centro Universitário Luterano de Manaus – CEULM/ULBRA. Na secagem, utilizou-se de duas técnicas:

- Em estufa de secagem, confeccionada em madeira, com temperatura de aproximadamente 45 °C por oito dias, em sala com ar condicionado. A temperatura foi controlada com termômetro e retirando ou acrescentando lâmpadas incandescentes;
- Em sala com ar condicionado e 2 (dois) desumidificadores marca Desidrat por 8 (oito) dias.

Após secagem e conseqüente diminuição de volume e peso, as partes secas foram novamente pesadas para determinar o peso seco, e acondicionadas em saco de papel, identificado, até a moagem.

Para a moagem das folhas foi utilizado moinho (Tecnal/Willye modelo TE-650) no LAPAAM/CPPN/INPA. A serragem obtida a partir de cada parte de planta seca foi acondicionada em saco plástico, pesada e identificada.

7.4 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Na preparação dos extratos, as serragens foram extraídas utilizando dois métodos de extração. Os solventes selecionados para extração apresentam polaridade distinta, conforme apresentado na Tabela 11.

Tabela 11. Solventes utilizados na preparação dos extratos, com respectivos pontos de ebulição e índice polar.

SOLVENTE	PONTO DE EBULIÇÃO (°C)	ÍNDICE POLAR*
Água destilada (H ₂ O)	100	9,0
Metanol (CH ₃ OH)	64,5	6,6
Clorofórmio (CHCl ₃)	61	4,3

Fonte: Cienfuegos (2002).

7.4.1 Extração Contínua com Extrator de Soxhlet

Para os extratos metanólicos e clorofórmicos foi utilizado o processo de extração contínua com extrator de Soxhlet. Neste processo, o material vegetal seco e moído foi adicionado a um cartucho de papel de filtro, previamente preparado e pesado. Em seguida o cartucho com material vegetal foi introduzido no corpo do extrator. Em um balão de fundo redondo de 1 L, acrescentou-se um volume de solvente aproximadamente 2 (duas) vezes superior ao corpo do extrator ($\cong$ 400 mL).

Durante o processo foram realizadas 3 (três) extrações de 6 (seis) horas, totalizando 18 (dezoito) horas. A cada intervalo de 6 (seis) horas, o solvente foi renovado e o extrato retirado e armazenado em erlenmeyer.

Após as extrações, o extrato foi levado a rotaevaporador Fisatom para evaporação dos solventes. Já concentrados, os extratos foram removidos dos balões com auxílio de banho de água e ultra-som e colocados em recipientes de vidro etiquetados e pré-pesados, os quais foram novamente pesados para estabelecer o peso pré-liofilização e levados ao freezer para armazenamento até a liofilização.

7.4.2 Extração Aquosa

Para extração aquosa, foi pesada inicialmente a serragem em um béquer e 1 L de água fervente foi derramada sobre a serragem. A mistura foi tampada (abafada) e deixada em repouso por 15 minutos, seguida de filtração. O filtrado foi concentrado imediatamente em rotaevaporador e o extrato acondicionado em recipiente de vidro etiquetado e levado ao freezer para armazenamento até a liofilização.

7.5 TEOR DE EXTRATIVOS

Depois de liofilizado, cada extrato foi pesado para determinar o rendimento (peso em gramas) obtido e levado ao freezer. A eficiência da extração foi obtida pelo cálculo do teor de extrativos, de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ teor de extrativos} = 100 \times \text{rendimento de extrato (g)} / \text{serragem extraída (g)}$$

7.6 TESTE DE TOXICIDADE PARA *Artemia franciscana*

O bioensaio foi realizado em triplicata de acordo com a metodologia descrita por Meyer *et al.* (1982) com modificações. Para o cálculo da concentração letal média (CL₅₀) foi utilizado o método Probitos de análise.

7.6.1 Solubilização das Amostras

Para o ensaio de letalidade com o crustáceo marinho, *Artemia franciscana*, foi inicialmente realizado um teste de solubilidade dos extratos vegetais em dimetilsulfóxido (DMSO) e água. Após a pesagem de cada extrato em tubo eppendorff em balança analítica (OHAUS) foi acrescentado 1 mL de DMSO com pipeta automática lavando as paredes para retirar o máximo do material espalhado, obtendo uma concentração final de 50 mg/mL.

Os tubos eppendorfs foram fechados e agitados vigorosamente durante alguns segundos e depois colocados em suporte-bóia de isopor e levados ao banho de ultra-som por aproximadamente 15 minutos, agitando-se 2 ou 3 vezes para facilitar total suspensão e melhor homogeneização.

7.6.2 Criação de Larvas

Os ovos de *A. franciscana* foram retirados da geladeira antes de iniciar nova criação, para evitar choque de temperatura e a entrada de umidade. Foi colocada solução salina (35 g de sal marinho livre de silicato, fosfato e nitrato em água, 1 L) na placa de Petri, identificada com data e hora. Em seguida os ovos foram salpicados com auxílio de espátula, colocando-se quantidade razoável sobre a solução salina, homogeneizando com movimentos circulares e suaves. A placa foi coberta com papel de filtro e deixada a aproximadamente 50 cm da lâmpada. Após 48 horas, os ovos eclodiram e as larvas estavam prontas para os testes.

7.6.3 *Screening* padrão com placa 6 X 4

Cada poço da placa foi preenchido com 1.800 µL de solução salina com auxílio de micropipeta de 1.000 µL. Com a pipeta de Pasteur previamente calibrada, foram transferidas 10 (dez) larvas para cada poço com o cuidado de não ultrapassar 160 µL ($\cong$ 4 gotas) (Figura 7).

Foram aplicados 20 µL de cada solução de extrato em DMSO, cuja preparação foi descrita no item 5.1, em cada poço, utilizando uma micropipeta obtendo-se concentração final de 500 µg/mL em cada poço. O controle negativo foi preparado utilizando 20 µL de DMSO. A placa foi acondicionada e protegida de luminosidade intensa e deixada em repouso por 24 horas.

Durante o teste, foram avaliados os percentuais de larvas vivas em tempo 0 h e após 24 h. A partir do percentual de Sobrevivência (% S) foi calculado o percentual de mortalidade (% M) de acordo com a relação:

$$\% S = 100 \times \text{vivas (24 h)} / \text{vivas (0 h)}$$

$$\% M = 100 - \% S$$

Aqueles extratos que apresentaram % M maior que 30 % foram diluídos em diferentes concentrações para determinação da relação entre a concentração e a letalidade e a avaliação da CL₅₀.

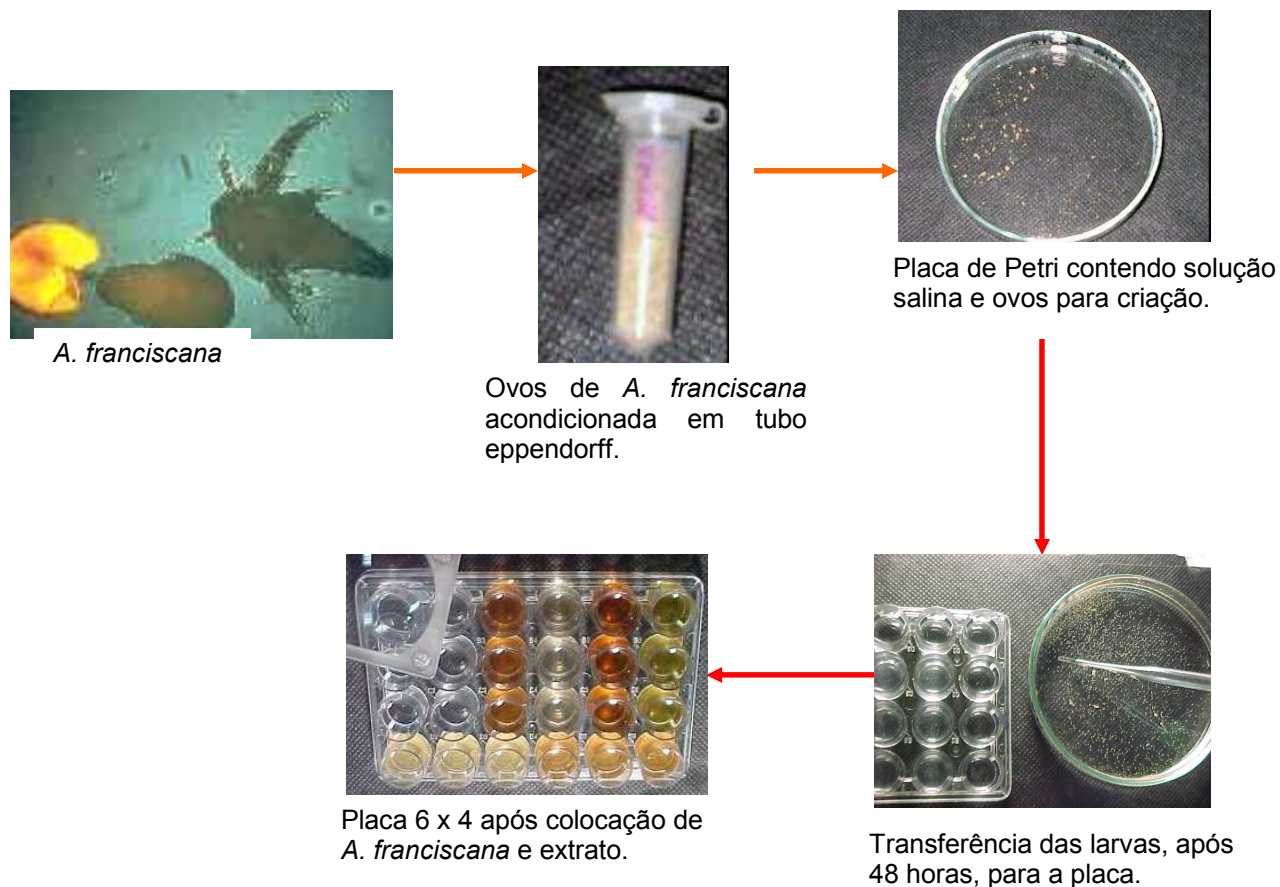


Figura 7. Seqüência esquemática para o ensaio com *A. franciscana*.

7.7 TESTES PARA ATIVIDADE ANTITUMORAL

As amostras, diluídas em DMSO na concentração estoque de 20 mg/mL, foram submetidas ao teste de citotoxicidade *in vitro* em 4 (quatro) linhagens de células tumorais. Os testes foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará como parte das atividades previstas no Convênio INPA/UFCE, sob a responsabilidade da Professora Dra. Cláudia do Ó Pessoa.

7.7.1 Células

As linhagens utilizadas foram cedidas pelo Mercy Children's Hospital tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5 % de CO₂. As linhagens foram: MDA-MB435 (mama humano), HCT-8 (cólon humano), SF295 (sistema nervoso humano) e HL60 (leucemia humana).

7.7.2 Avaliação da Citotoxicidade *In Vitro*

A citotoxicidade dos extratos foi avaliada pelo método da sulforodamina B (SKEHAN *et al.*, 1990). Foram plaqueadas em 5 placas de 96 cavidades por experimento, uma para cada linhagem celular testada e uma placa de tempo-zero com as quatro linhagens. As células foram plaqueadas nas seguintes concentrações: HCT-8, SF295 e MDA-MB-435 $0,7 \times 10^5$ células/mL e $0,6 \times 10^5$ células/mL para HL60. Após 24 horas de incubação, foi fixada a placa de tempo zero em ácido tricloroacético 50 % gelado e, as demais placas foram incubadas com drogas na dose de 100 µg/mL. As amostras foram testadas em duplicata. O etoposide (500 µg/mL) e o paclitaxel (150 µg/mL) foram utilizados como controles positivos. Estas placas foram fixadas após 48 horas de incubação com as drogas. Todas as placas foram coradas com sulforodamina B e lidas em espectrofotômetro de placa no comprimento de onda de 540 nm.

7.7.3 Método de Análise dos Resultados

O percentual de crescimento celular (% G) foi calculado comparando a absorbância do teste com o controle (100 %), tempo-zero (0 %) e padrões, paclitaxel e etoposide (-100 %). As frações foram classificadas em sem atividade (SA), com pouca atividade (aquelas que induziram inibição de até 50 % do

crescimento, PA), com moderada atividade (aquelas que induziram inibição entre 50 e 75 % do crescimento-MO), e com muita atividade (aquelas que induziram inibição maior que 75 % do crescimento, MA) para cada linhagem testada.

7.8 TESTE MICROBIOLÓGICO PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Todos os extratos foram submetidos à avaliação da atividade antimicrobiana pela técnica de difusão em ágar realizando-se perfurações no meio de cultura, ou seja, “poços” para preenchimento com os extratos previamente solubilizados na concentração final de 50 mg/mL (ALVES *et al.*, 2000; EZEIFEKA, MBATA e PATRICK, 2004; CHAH *et al.*, 2006; MELO *et al.*, 2006; BANDEIRA *et al.*, 2006).

Para a avaliação da atividade antibacteriana dos extratos foram utilizadas cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas da American Type Culture Collection (ATCC) e do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (DAUPE). Para avaliar a atividade antifúngica utilizou-se *Candida albicans* da coleção do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (DPUA), conforme apresentado na Tabela 12. Os microrganismos foram reativados segundo a orientação do DAUPE, DPUA e ATCC.

Tabela 12. Microorganismos e meios de cultura utilizados.

MICROORGANISMOS	ORIGEM	MEIO DE CULTURA	MEIO PARA TESTE
<i>Staphylococcus aureus</i>	DAUPE	BHI	Mueller Hinton
<i>Streptococcus oralis</i>	ATCC 10557	BHI	Mueller Hinton
<i>Streptococcus sanguis</i>	ATCC 15300	BHI	Mueller Hinton
<i>Escherichia coli</i>	DAUPE 224	BHI	Mueller Hinton
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	ATCC 607	BHI	Mueller Hinton
<i>Candida albicans</i>	DPUA	Ágar sabouraud	Ágar Sabouraud

*ATCC = American Type Culture Collection; DPUA = Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas; DAUPE = Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco; BHI = Brain Heart Infusion (caldo cérebro coração).

O cultivo dos microorganismos foi realizado em condições nutritivas e físicas, considerando as exigências de cada espécie. Para o cultivo foi utilizado meio de cultura, disponível no mercado, favorável ao crescimento e reprodução. Para os testes de antibiose utilizou-se o meio Mueller Hinton (MH) para as bactérias, pois de acordo com a Farmacopéia Brasileira (1988) e Organização Mundial de Saúde (OMS), o MH é o meio de cultura padrão recomendado para antibiograma.

O meio de cultura desidratado foi dissolvido em volume adequado de água destilada, conforme especificações do fabricante, e o pH ajustado (NaOH, HCl) com auxílio de fitas de pH (0-14) da Merck. Em seguida, o meio foi distribuído em frascos ou tubos e esterilizado em autoclave. Na Tabela 18 estão relacionados os microorganismos e respectivos meios utilizados na cultura e avaliação da atividade antimicrobiana.

Foram utilizados 25 mL do meio de cultura fundido em placas de Petri 90 x 15 mm. Depois da solidificação do meio, 100 µL do inóculo foi homogeneizado e colocado no centro da placa, com um *swab* estéril a inoculação foi feita em forma de estrias na superfície do ágar em três direções, girando a placa após cada estria. Após 10 minutos, tempo necessário para absorção do excesso de umidade da superfície, preparou-se orifícios circulares de 6 mm de diâmetro, formando cinco poços eqüidistantes.

Uma alíquota do extrato (50 µL) e dos controles positivo (rifampicina ou nistatina) e negativo (DMSO, água ou etanol) foi dispensada na cavidade. Após 30 minutos foi incubado. Depois de 18 a 24 horas de incubação, as placas foram

examinadas para verificar o crescimento, a presença de contaminantes e a definição do halo de inibição.

O resultado foi avaliado posteriormente ao período de incubação de 24 horas para as bactérias e 48 horas para *C. albicans*. A sensibilidade do organismo-teste foi determinada através da presença de um halo de inibição formado em torno da cavidade. Os diâmetros das zonas de inibição foram medidos em mm com auxílio de régua. A lupa estereoscópica foi utilizada para auxiliar na leitura. Todos os testes foram realizados em triplicata, calculando-se ao final a média do diâmetro dos halos.

7.8.1 Controles

Neste teste foram realizados os seguintes controles:

- a. Controle negativo do meio (apenas meio de cultura);
- b. Controle positivo de crescimento bacteriano e fúngico (meio de cultura com suspensão do microrganismo);
- c. Controle negativo do extrato (meio de cultivo mais extrato primário).
- d. Controle negativo do solvente (DMSO, água, etanol);
- e. Controle positivo utilizando rifampicina e nistatina.

7.8.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os extratos considerados muito ativos, ou seja, com halos de inibição maiores que 20 mm no teste de difusão em ágar na concentração final de 50 mg/mL, foram conduzidos para a determinação da CIM.

A CIM foi avaliada pelo método de diluição em meio sólido adaptando-se técnica proposta por Melo *et al.* (2006). Para o teste de microdiluição, foram formulados 35 mL de ágar, MH para bactérias e Sabouraud para *C. albicans*,

homogeneizados com 1,5 mL da suspensão do microrganismo de densidade igual a escala número 1 de McFarland.

O formulado acima foi distribuído em placa de Petri de 140 X 15 mm. Em cada placa foram feitos 30 orifícios de 4 mm de diâmetro com auxílio de um *punch*. Nesses orifícios foram inoculados, em triplicata, 15 µL de uma série de 10 diluições do extrato bruto preparada a partir de uma solução-estoque de concentração definida (50 mg/mL). Após incubação, os halos foram medidos em milímetros. A CIM foi determinada, considerando-se a menor concentração que inibiu o crescimento do microrganismo.

7.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO MÉTODO DE BIOAUTOGRAFIA

Os extratos que apresentaram atividade nos testes de toxicidade e antimicrobiano foram conduzidos para a avaliação através do método de bioautografia adaptado de diversos autores (LOCKHART, 1954; ALVES *et al.*, 2001; HOLETZ *et al.*, 2002).

7.9.1 Cromatografia

Os extratos foram solubilizados em solventes orgânicos (clorofórmio, metanol, etanol) e aplicadas em cromatofolhas-alumínio da MERCK. Após secagem sob fluxo de ar, as placas foram eluídas em fase móvel clorofórmio/acetona (9:1) em cubas previamente saturadas.

Após total evaporação da fase móvel foi feita a iluminação para avaliar a migração diferencial das substâncias e calcular o fator de retenção (*R_f*). O *R_f* é a

relação entre a distância percorrida pela substância e pelo eluente. As substâncias foram visualizadas sob luz visível e ultravioleta (254 e 366 nm).

Os extratos mais ativos em bioautografia na avaliação antimicrobiana foram submetidos à revelação por métodos químicos.

7.9.2 Bioautografia

Para o teste foi utilizado 25 mL de meio de cultura fundido (MH para bactérias e Sabouraud para *C. albicans*) e aguardou-se até atingir 50 °C. Em seguida foi adicionado 500 µL de cultura do microrganismo-teste (*M. smegmatis*, , *E. coli*, *S. aureus*, *S. oralis*, *S. sanguis*) em meio líquido na escala 1 de MacFarland. Foi adicionado ainda 1 mL do revelador em solução aquosa (cloreto de 2,3,5 - trifeniltetrazólio (TTC)) 1 % para facilitar a observação das zonas de inibição. A mistura foi homogeneizada rapidamente e vertida sobre as placas cromatográficas reveladas e acondicionadas em placa de Petri. As placas foram incubadas e os resultados foram observados após 24 e 48 horas. A inibição foi indicada por zonas de clareamento no bioautograma.

7.10 PROSPECCAO FITOQUÍMICA

Os extratos com atividade antimicrobiana foram submetidos a *screening* fitoquímico para as principais classes de metabólitos secundários. A abordagem fitoquímica foi adaptada de Matos (1997).

Extratos com CIM menor que 100 µg/mL e com resultados positivos em bioautografia foram avaliadas em CCD através de revelados físicos (UV 254 e 366) e químicos (iodo, anisaldeído, KOH e Dragendorff).

7.10.1 Fenóis e Taninos

Foi dissolvido 10 mg do extrato em 5 mL de solvente (água ou etanol) e adicionado 100 μ L de solução 10 % de cloreto férrico (FeCl_3). A mudança na coloração ou formação de precipitado foi indicativo de reação positiva quando comparado com o teste em branco (água + solução de FeCl_3). Coloração inicial entre o azul, verde-azulada e o vermelho foi indicativo da presença de fenóis. Precipitado escuro de tonalidade azul ou verde indicou a presença de taninos (Figura 8).

7.10.2 Flavonóides

Colocou-se em um tubo de ensaio, 3 mL de solução metanólica, três fragmentos de magnésio (Mg) e adicionou-se pelas paredes do tubo 1 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado. Após o término da efervescência, a reação foi considerada positiva quando surgiu a cor rosa ou vermelha na solução (Figura 9). A reação é conhecida como reação da cianidina, de Shinoda ou hidrogenação.

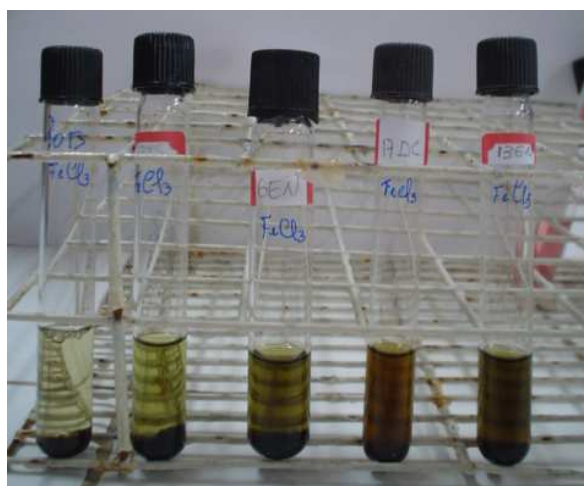


Figura 8. Tubos de ensaio contendo FeCl_3 para detecção de fenóis e taninos. Positividade evidenciada pelo desenvolvimento de coloração azul ou verde-azulada e precipitado escuro.



Figura 9. Tubos de ensaio com reação positiva (vermelha ou rosa) para flavonóide através do método da cianidina.

7.10.3 Teste para Antocianinas, Antocianidinas e Flavonóides

Alguns miligramas do extrato seco foram dissolvidos em 20 mL de água destilada. Em seguida transferiu-se para três tubos de ensaio 3 mL da solução (para cada tubo de ensaio). O primeiro tubo foi acidulado com HCl a um pH 3 e os dois restantes alcalinizados com NaOH a pH 8,5 e 11. O resultado foi obtido através da coloração do meio que pode variar do vermelho (pH 3), lilás (pH 8,5) e azul, amarela, vermelho púrpura ou vermelho laranja em pH 11 (MATOS, 1997).

8 RESULTADOS

8.1 ESPÉCIES VEGETAIS SELECIONADAS E COLETADAS

A seleção das espécies vegetais para este estudo foi realizada com base na inexistência de estudos anteriores ou poucos trabalhos relevantes sobre o gênero de acordo com consulta na rede mundial de computadores (Scifinder, webofscience, Scirius, Scielo, Medline, Neuroscion) e banco de teses da CAPES.

Das 152 famílias catalogadas na Reserva Ducke pelo Projeto Flora foram cadastradas nesse estudo 146 famílias, ou seja, 96,1 %. Esse trabalho foi elaborado em colaboração com Viviana Maria Araújo de Oliveira, responsável pelo levantamento parcial dos dados. A Tabela 13 apresenta um exemplo de página da planilha com cadastro de famílias e gêneros.

Partindo dos resultados desse levantamento, foi possível selecionar 88 gêneros pertencentes a 51 famílias diferentes. A maioria dos 88 gêneros não teve nenhum trabalho farmacológico publicado e detectado nessa pesquisa.

Aquelas espécies que apresentaram apenas uma publicação, só foram selecionadas após verificação do conteúdo. Sendo aceito aquelas com publicações botânicas.

Ao final a relação foi levada ao banco de dados existente no INPA, organizado e sob a responsabilidade do Dr. José Eduardo L. da S. Ribeiro (CPBO/INPA) membro da equipe do Projeto Flora.

Os 88 gêneros foram digitados no banco de dados gerando uma tabela com 142 espécies, contendo informações sobre: nome científico, localização

geográfica e dados sobre a exsicata, coletor(es) e número da exsicata depositada no herbário do INPA).

Tabela 13. Exemplo de página da planilha com o cadastro de famílias e gêneros da Reserva Florestal Ducke.

FAMÍLIA	GÊNERO	WOS	Medline / Neuroscion
ASPLENIACEAE	<i>Asplenium</i>	262	21 / 14
CYATHEACEAE	<i>Sphaeropteris</i>	14	0
DAVALLIACEAE			
	<i>Nephrolepis</i>	74	/4
	<i>Oleandra</i>	13	/2
DENNSTAEDTIACEAE			
	<i>Lindsaea</i>	12	0
	<i>Pteridium</i>	517	/98
DRYOPTERIDACEAE			
	<i>Cyclodium</i>	2	0
	<i>Polybotrya</i>	7	/2
GLEICHENIACEAE			
	<i>Dichranopteris</i>	0	0
	<i>Sticherus</i>	5	/1
GRAMMITIDACEAE	<i>Cochlidium</i>	6	0
HYMENOPHYLLACEAE			
	<i>Hymenophyllum</i>	27	/3
	<i>Trichomanes</i>	85	/8
LOMARIOPSIDACEAE			
	<i>Elaphoglossum</i>	26	0
	<i>Lomariopsis</i>	2	0
MARATTIACEAE	<i>Danaea</i>	16	0
METAXYACEAE	<i>Metaxya</i>	8	0
OPHIOGLOSSACEAE	<i>Ophioglossum</i>	98	/3
POLYPODIACEAE (pteridophyta)			
	<i>Campyloneurum</i>	5	0
	<i>Microgramma</i>	14	/1
	<i>Niphidium</i>	2	0
	<i>Polypodium</i>	274	/51
	<i>Pecluma</i>	3	0
PTERIDACEAE			
	<i>Adiantum</i>	324	/36
	<i>Pityrogramma</i>	55	/3
	<i>Pteris</i>	206	/45
VIOLACEAE			
	<i>Amphirrhox</i>	0	1
	<i>Leonia</i>	2	0
	<i>Paypayrola</i>	1	2

WOS = webofscience.

Foram feitas 232 fotografias no herbário incluindo exsicatas, fichas, flor e fruto quando presentes. As exsicatas de algumas espécies (*Sextonia rubra* (178633); *Aptandra tubicina* (185648); *Dilkea johannesii* (186849)) não foram localizadas no herbário.

Assim foi possível garantir a identidade botânica das espécies sem estudos anteriores para gerar, posteriormente, conhecimento sobre sua atividade biológica.

Veja na Tabela 14 as espécies vegetais selecionadas para coleta e elaboração de extratos com respectiva sinonímia e nome comum. Imagens gravadas das exsicatas e fichas das espécies vegetais que foram coletadas podem ser vistas nas Figuras 10 a 21.

Em projeto de tese de doutorado elaborado sobre atividade hemolítica e antiagregante de plantas da Reserva Ducke, extratos das espécies na Tabela 15 foram preparados por Oliveira (2007) e cedidos para o presente projeto para aumentar o número total de amostras disponíveis provenientes de plantas da Reserva Ducke.

Tabela 14. Famílias e respectivas espécies vegetais selecionadas para coleta e extração na Reserva Ducke com sinonímia e nome comum.

FAMÍLIA	ESPÉCIE	SINONIMIA	NOME COMUM
Annonaceae	<i>Diclinanona calycina</i> Benoiste	<i>Xylopia calycina</i> Diels	Envireira ³
Apocynaceae	<i>Lacmellea gracilis</i> (Mull.Arg.) Markgr.	<i>Zschokkea gracilis</i> Mull	Caramurizinho, sorvinha ¹
Icacinales	<i>Pleurisanthes parviflora</i> (Ducke) Howard	—	—
Passifloraceae	<i>Dilkea johannesii</i> Barb. Rodr.	<i>Dilkea ulei</i> Harms	Grão de bode ¹ Pacarupia ²
Rhizophoraceae	<i>Sterigmatopetalum obovatum</i> Kuhlmann	—	—
Sapotaceae	<i>Elaeoloma nuda</i> (Baehni) Aubrév.	<i>Pouteria nuda</i>	—

Fonte: ¹Silva, Lisboa e Lisboa (1977); ² Corrêa (1978); ³ Ribeiro *et al.*, (1999).

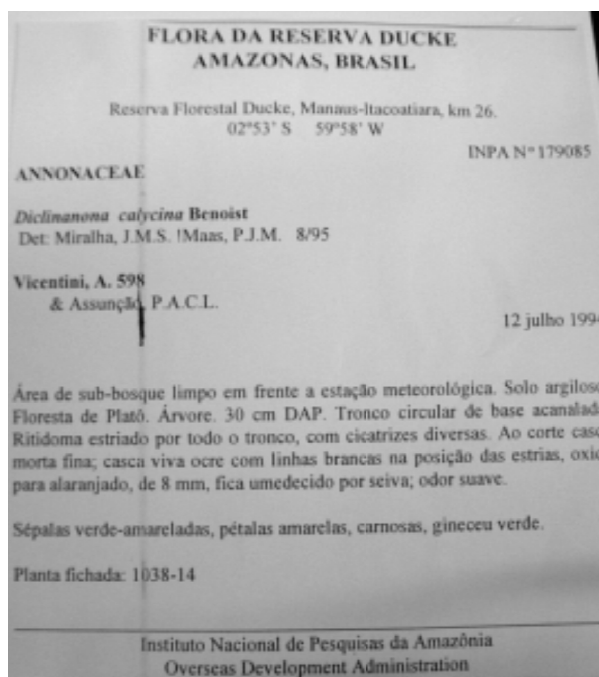
Tabela 15. Famílias e respectivas espécies vegetais selecionadas para coleta e extraídas por Oliveira (2007) na Reserva Ducke com sinonímia e nome comum.

FAMÍLIA	ESPÉCIE	SINONIMIA	NOME COMUM
Anacardiaceae	<i>Thyrsodium spruceanum</i> Benth.	<i>Thyrsodium paraense</i> Huber	Breu-de-leite
Oleaceae	<i>Chaunochiton kappleri</i> (Sagot ex Engl.) Ducke	<i>Chaunochiton breviflorum</i> Ducke	—
Polygalaceae	<i>Moutabea guianensis</i> Aubl.		Grão-de-macaco
Sapotaceae	<i>Sarcaulus brasiliensis</i> (A.DC.) Eyma	<i>Sarcaulus macrophyllus</i> (Mart) Radlk	Guajará ³
Thymelaeaceae	<i>Schoenobiblus daphnoides</i> Mart.	—	—
Violaceae	<i>Paypayrola grandiflora</i> Tul.	<i>Paypayrola ventricosa</i> Tul.	—

Fonte: ¹Silva, Lisboa e Lisboa (1977); ² Corrêa (1978); ³ Ribeiro *et al.*, (1999).



Diclinanona calycina
INPA.



Planta de *Diclinanona*
do INPA.



Figura 12. Exsicata de *Dilkea johannesii* (206552) do Herbário do INPA.

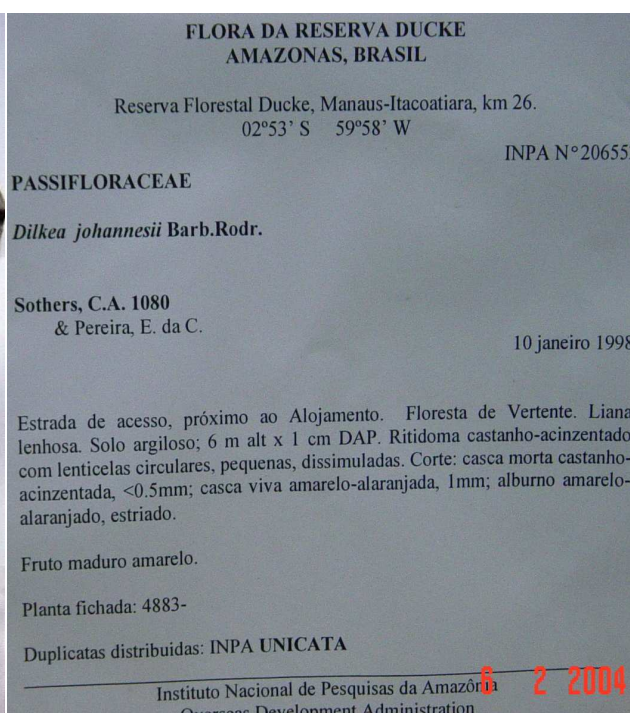


Figura 13 Ficha da exsicata de *Dilkea johannesii* (206552) do Herbário do INPA.



uda (179316) do

**FLORA DA RESERVA DUCKE
AMAZONAS, BRASIL**

Reserva Florestal Ducke, Manaus-Itacoatiara, km 26.
02°53' S 59°58' W

INPA N° 179316

SAPOTACEAE

Elaeoluma nuda (Baehni) Aubrév.
Det: Pennington, T.D. 2/98

Ribeiro, J.E.L.S. 1532
& Silva, C.F. da

15 dezembro 1994

Floresta de Vertente. Árvore. 30m alt. Solo argiloso, dossel. Tronco cilíndrico, base acanalada. Sapopema côncava, A igual a C (30cm), em alguns pontos a raiz parece digitada. Lenticelas lineares, castanhas, tamanho variável, dissimulada. Ritidoma marrom-avermelhado, sulcado, frágil, desprendimento em placas retangulares. Casca morta marrom-avermelhada, menor que 1mm espess. Casca viva creme-arroseada, odor suave, fibrosa, 4mm espess. Alburno creme-esbranquiçado. Látex branco, na casca viva, escasso.

Cálice verde, corola branca, ovário verde, anteras castanhas.

Planta fichada: 2228-05

Duplicatas distribuídas: K INPA MG NY SP MO RB U R NÃO DISTR

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Overseas Development Administration

de *E. nuda* (179316)



arviflora (195327)

**FLORA DA RESERVA DUCKE
AMAZONAS, BRASIL**

Reserva Florestal Ducke, Manaus-Itacoatiara, km 26.
02°53' S 59°58' W

INPA N° 195327

ICACINACEAE

Pleurisanthes cf. parviflora (Ducke) Howard
Det: Brito, J.M. de 0/0

Souza, M.A.D. de 118
& Assunção, P.A.C.L.

17 outubro 1995

Estrada de acesso ao alojamento Capoeira. Liana lenhosa. Liana escandente. Caule achatado, 1cm largura x 3mm espess.; casca cinza, microfissurada; casca viva verde, 0,5cm espess.; alburno amarelo-esverdeado, oxid. imperceptível. Floresta de platô, mata perturbada, solo argiloso.

Cauliflora. Inflorescência verde-clara; botões laranja-claros; flores amarelo-esverdeadas, perfumadas.

Planta fichada: 3901-46

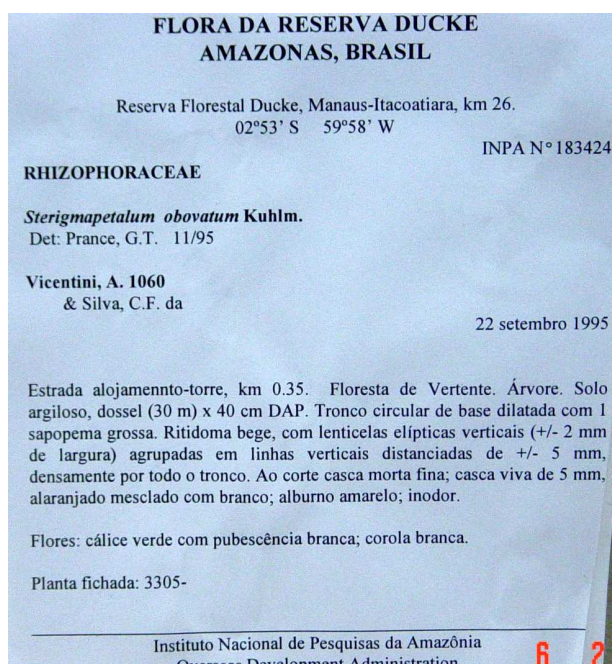
Duplicatas distribuídas: INPA K MG G UB GH VIC S ICN W

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Overseas Development Administration

ata de *P. parviflora*



petalum (183424) do



S. obovatum (183424)



cilis (189617) do



L. gracilis (189617) do

Foram coletadas doze espécies vegetais em 4 (quatro) coletas realizadas na Reserva Florestal Ducke. Dessas, seis foram coletadas por Viviana Maria Araújo de Oliveira e, portanto, detalhes sobre extração estão apresentados em Oliveira (2007).

A partir do peso úmido (PU) e peso seco (PS) foi calculado o % de perda de peso durante a secagem (Tabela 22).

Tabela 22. Peso úmido (PU), peso seco (PS) e percentual de perda de peso durante a secagem, das espécies coletadas na Reserva Ducke.

ESPÉCIE	FAMÍLIA	EXCICATA	PARTE	PU (g)	PS (g)	PERDA (%)
<i>D. calycina</i>	Annonaceae	179085	Folha Galhos	2000	402,2 518,7	46
<i>D. johannesii</i>	Passifloraceae	206552	Folha Galho	392,7 778,5	147,5 393,1	37,6 50,5
<i>E. nuda</i>	Sapotaceae	179316	Folhas Galhos Casca	1254 1345 920	665 760 370	53 56,5 40,2
<i>L. gracilis</i>	Apocynaceae	189617	Folhas Galhos Fruto	1000	247,2 271,6 13,7	53,3
<i>P. parviflora</i>	Icacinales	195327	Folha Cipó	385 211	172,7 95,4	44,9 45,2
<i>S. obovatum</i>	Rhizophoraceae	183423	Folha Galho	570,7 1157	273,4 647,8	47,9 56

A metodologia empregada permitiu selecionar doze espécies vegetais sem estudos anteriores contribuindo para o conhecimento das plantas da superfície terrestre que não foram submetidas a estudos fitoquímicos e / ou farmacológicos anteriormente. Este tipo de seleção é importante considerando que novos agentes terapêuticos podem ser descobertos. Segundo Maciel *et al.* (2002), em uma abordagem randômica, as probabilidades de novas descobertas de substâncias

inéditas, bioativas ou não, é maior. Além disso, foi possível garantir a identidade botânica das plantas coletadas e a secagem foi feita em condições controladas.

É importante destacar que as variáveis ambientais tais como o horário e a estação do ano da coleta podem influenciar nos resultados dos ensaios, pois as plantas possuem uma organização temporal no seu metabolismo.

Muitos ritmos biológicos são claramente associados a um ciclo geofísico. Destes, o mais evidente é o ciclo claro-escuro (CE), importante para todas as espécies que possuem algum tipo de pigmento fotossensível (MARQUES, GOLOMBEK e MORENO, 1997).

Além do horário de coleta, o método de secagem deverá resultar em menores perdas em componentes químicos e em rendimento. Por serem plantas ainda não estudadas, não se sabe sobre a melhor forma de secagem (em estufa com temperaturas de 40, 50, 60 °C; ao sol; à sombra, etc.) e o tempo de secagem. Temperaturas acima de 70 °C, por exemplo, diminuem consideravelmente a concentração de taninos e de outras substâncias fenólicas (SIMÕES *et al.*, 2003).

O método empregado procurou utilizar temperatura branda assim garantindo a perda mínima de material orgânico volátil, maior desidratação possível e menor decomposição das substâncias presentes para armazenamento.

8.2 EXTRATOS PREPARADOS E TEOR EXTRATIVO (TE)

Foram preparados trinta e nove extratos vegetais (folhas, galho, casca e cipó) utilizando métodos usuais de extração, evaporação e liofilização. Trinta e seis extratos foram preparados e cedidos pela colaboradora Viviana Maria Araújo de Oliveira conforme mostrado na Tabela 24.

Como as espécies escolhidas não são conhecidas foram submetidas a extração com solventes de polaridades distintas (clorofórmio, metanol, água) o que permitiu a extração de substâncias com propriedades físicas e químicas diferentes. Extratos de polaridade intermediária parecem produzir melhores atividades biológicas que os aquosos (extremamente polares) (DI STASI, 1996). No entanto, a água é utilizada universalmente como solvente na extração em *screenings* de plantas para possível atividade antimicrobiana (COWAN, 1999).

Em geral, nos extratos metanólicos, são extraídos taninos, saponinas, antocianinas, polifenóis, flavonas e lactonas. O clorofórmio permite a extração de terpenóides e flavonóides. Os extratos aquosos extraem saponinas, antocianinas, taninos, terpenóides e polipeptídios (COWAN, 1999).

Os extratos foram pesados após liofilização para determinar o rendimento (massa em gramas). Portanto, a eficiência na preparação foi avaliada pelo cálculo do teor extrativo (% TE), conforme apresentado nas Tabelas 16 e 17.

Tabela 16. Solventes utilizados na extração da serragem das espécies vegetais com respectiva massa da serragem (MS), massa do extrato liofilizado (ME) e teor de extrativos (TE). TE = 100 x rendimento do extrato / serragem extraída.

ESPÉCIE	PARTE	SOLVENTES	MS (g)	ME (g)	TE (%)
<i>D. calycina</i>	Folha	Água	56,10	9,15	16,31
		Metanol	80,85	29,73	36,77
		Clorofórmio	89,27	10,9	12,21
	Galho	Água	26,84	1,62	6,04
		Metanol	60,36	3,12	5,17
		Clorofórmio	63,68	1,17	1,84
<i>D. johannesii</i>	Folha	Água	26,02	2,05	7,87
		Metanol	78,82	8,14	10,32
		Clorofórmio	32,83	0,86	2,61
	Galho	Água	46,13	1,10	2,38
		Metanol	72,38	2,99	4,43
		Clorofórmio	55,62	0,38	0,68
<i>E. nuda</i>	Folha	Água	52,51	8,33	15,86
		Metanol	45,40	14,60	32,15
		Clorofórmio	89,27	6,98	7,81
	Galho	Água	48,39	3,47	7,17
		Metanol	118,48	14,62	12,34
		Clorofórmio	86,89	2,57	2,96
	Casca	Água	92,81	13,29	14,31
		Metanol	92,91	22,59	24,31
		Clorofórmio	96,38	12,23	12,63
<i>L. gracilis</i>	Folha	Água	54,3	n.d.	n.d.
		Metanol	70,28	21,27	30,26
		Clorofórmio	52,37	4,62	8,82
	Galho	Água	37,94	1,59	4,19
		Metanol	52	2,75	5,29
		Clorofórmio	52,89	0,65	1,22
<i>P. parviflora</i>	Folha	Água	51,50	6,78	13,16
		Metanol	66,04	9,72	14,71
		Clorofórmio	50,60	2,33	4,60
	Cipó	Água	15,37	1,10	7,156
		Metanol	45,98	2,20	4,78
		Clorofórmio	40,39	0,59	1,46
<i>S. obovatum</i>	Folha	Água	61,77	8,79	14,23
		Metanol	95,93	16,44	17,13
		Clorofórmio	86,67	4,91	5,66
	Galho	Água	48,49	3,34	6,89
		Metanol	109,67	8,57	7,81
		Clorofórmio	78,32	1,12	1,43

n.d. = não determinado.

Tabela 17. Solventes utilizados na extração da serragem das espécies vegetais doadas por Oliveira (2007) com respectivo teor de extrativos (TE). TE = 100 x rendimento do extrato / serragem extraída.

ESPÉCIE	PARTE	SOLVENTES	TE (%)
<i>C. kappleri</i>	Folha	Água	18,59
		Metanol	19,38
		Clorofórmio	4,05
	Galho	Água	5,85
		Metanol	7,77
		Clorofórmio	1,29
<i>M. guianensis</i>	Folha	Água	10,83
		Metanol	8,34
		Clorofórmio	3,04
	Galho	Água	8,40
		Metanol	4,93
		Clorofórmio	1,30
<i>P. grandiflora</i>	Folha	Água	7,73
		Metanol	17,63
		Clorofórmio	3,80
	Galho	Água	3,47
		Metanol	3,74
		Clorofórmio	1,17
<i>S. brasiliensis</i>	Folha	Água	7,70
		Metanol	17,00
		Clorofórmio	3,40
	Galho	Água	8,20
		Metanol	7,07
		Clorofórmio	2,73
<i>S. daphnoides</i>	Folha	Água	18,96
		Metanol	18,70
		Clorofórmio	4,12
	Galho	Água	5,41
		Metanol	13,88
		Clorofórmio	2,30
<i>T. spruceanum</i>	Folha	Água	10,49
		Metanol	19,15
		Clorofórmio	4,08
	Galho	Água	3,54
		Metanol	10,24
		Clorofórmio	2,65

De modo geral, dos solventes selecionados para extração, conforme resultados apresentados na Tabela 23 e 24, os extratos obtidos com metanol apresentaram o maior rendimento, enquanto os extratos obtidos com clorofórmio apresentaram os menores rendimentos.

8.3 RESULTADOS DO TESTE DE TOXICIDADE PARA *Artemia franciscana*

Dos trinta e oito extratos avaliados, oito extratos apresentaram % M > 30 % e foram selecionados para avaliação da CL₅₀. A partir do % de animais mortos obteve-se o valor de probitos. Esse foi plotado contra o log da concentração do extrato, obtendo-se dessa relação uma reta através de regressão linear, conforme Tabela 18 e Gráfico 1, apresentados abaixo para exemplificar.

Tabela 18. Resultado do teste de toxicidade para extrato clorofórmico de folhas de *D. calycina* em *Artemia francisca*, durante 24 horas.

CONCENTRAÇÃO	Log []	ORGANISMOS EXPOSTOS	NÚMERO DE MORTOS	% M	PROBIT
1000	3	30	30	100	7,4
500	2,69	30	30	100	7,4
250	2,39	30	30	100	7,4
125	2,09	30	30	100	7,4
62,5	1,79	30	25	83,33	5,95
31,25	1,49	30	20	66,66	5,44
15,625	1,19	30	10	33,33	4,56

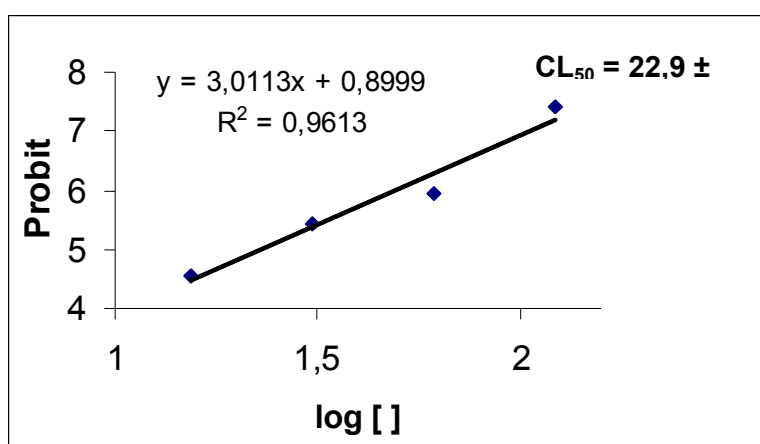


Gráfico 3. Gráfico probit resposta (mortalidade) em função do logaritmo da concentração do extrato Clorofórmico de folha da espécie *D. calycina*.

Apenas dois extratos apresentaram valores de CL_{50} inferiores a 100 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 26). Segundo Alves *et al.* (2000) extratos com CL_{50} menor ou igual a 100 ppm poderão ser considerados ativos. Portanto, das doze espécies avaliadas, apenas uma apresentou extrato ativo, altamente tóxico no ensaio com *A. franciscana*, a *D. calycina*. A menor CL_{50} foi do extrato clorofórmico de folha de *D. calycina* com valor de $22,9 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$.

Dolabela (1997) estabeleceu critérios de classificação para avaliação da CL_{50} : de acordo com seus estudos de atividade antitumoral e anti *Trypanossoma cruzi* quais sejam: extratos com $CL_{50} < 80 \mu\text{g/mL}$, altamente tóxicos; CL_{50} entre 80 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$, moderadamente tóxico; e $CL_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$, com baixa toxicidade ou não tóxicos. Dos extratos vegetais avaliados no presente trabalho dois apresentaram CL_{50} menor que 80 $\mu\text{g/mL}$ portanto de acordo com Dolabela (1997) altamente tóxicos. Dois extratos (5,26 %), segundo o mesmo critério, podem ser considerados moderadamente tóxicos. A maioria dos extratos testados (89,47 %) neste estudo pode ser classificada como não tóxicos ou de baixa toxicidade.

Apenas 5,26 % dos extratos testados são considerados tóxicos ou moderadamente tóxicos sendo da espécie *D. calycina*. A Tabela 19 apresenta as espécies vegetais testadas e os respectivos resultados.

Os diversos extratos testados exibiram diferentes graus de toxicidade. Os efeitos tóxicos desses extratos devem ser determinados a fim de evitar a utilização indiscriminada após comprovação de suas atividades biológicas.

Tabela 19. Resultado do teste de toxicidade de extratos vegetais em *Artemia franciscana*, durante 24 horas. A concentração final utilizada na determinação da mortalidade (% M) foi (500 µg/mL).

ESPÉCIE	FAMÍLIA	PARTE	SOLVENTE	% M A. <i>franciscana</i>	CL ₅₀ µg / mL
<i>D. calycina</i>	Annonaceae	folha	clorofórmio	100	22,9±0,82
			metanol	100	53,33±1,46
			água	0	n.t.
		galho	clorofórmio	100	118,00±2,42
			metanol	86,66	180,47±5,53
			água	23,3	n.t.
<i>D. johannesii</i>	Passifloraceae	folha	clorofórmio	0	n.t.
			metanol	3,3	n.t.
			água	3,3	n.t.
		galho	clorofórmio	30	305,35±16,12
			metanol	10	n.t.
			água	10	n.t.
<i>E. nuda</i>	Sapotaceae	folha	clorofórmio	0	n.t.
			metanol	23	n.t.
			água	3	n.t.
		galho	clorofórmio	10	n.t.
			metanol	6,66	n.t.
			água	3,3	n.t.
		casca	clorofórmio	n.t.	n.t.
			metanol	13,33	n.t.
			água	13,33	n.t.
<i>L. gracilis</i>	Apocynaceae	folha	clorofórmio	6,66	n.t.
			metanol	3,3	n.t.
			água	0	n.t.
		galho	clorofórmio	63,33	1.054,80±84,66
			metanol	6,66	n.t.
			água	0	n.t.
<i>P. parviflora</i>	Icacinaceae	folha	clorofórmio	0	n.t.
			metanol	0	n.t.
			água	6,66	n.t.
		cipó	clorofórmio	26,66	n.t.
			metanol	33,33	410,30±8,91
			água	3,3	n.t.
<i>S. obovatum</i>	Rhizophoraceae	folha	clorofórmio	53,3	916±149,70
			metanol	3,3	n.t.
			água	0	n.t.
		galho	clorofórmio	16,66	n.t.
			metanol	0	n.t.
			água	10	n.t.

nt. = não testado.

A avaliação preliminar do grau de letalidade de *A. franciscana* permite inferir a presença de substâncias bioativas nos extratos, utilizando-se a CL₅₀ como parâmetro de avaliação de atividade biológica, pois compostos bioativos são geralmente tóxicos em altas doses. Dada a atividade antitumoral/antiproliferativa de muitas substâncias e extratos com atividade contra *A. franciscana*, essas espécies ativas podem vir a ser fontes de substâncias antimicrobianas e anticâncerígenas.

A comunidade científica vem buscando alternativas para avaliação da toxicidade das substâncias bioativas recomendando o uso criterioso de animais de laboratório e o desenvolvimento de métodos experimentais alternativos. Parra *et al.* (2001), demonstraram boa correlação entre os testes *in vivo*, com camundongos, e *in vitro*, com *A. salina*, sugerindo esse último como um modelo alternativo para os testes de toxicidade.

Nesse contexto os testes com *Artemia* são utilizados como indicador de toxicidade para detectar toxicidade preliminar de algas marinhas, avaliar efeitos de exposição a metais pesados (LHULLIER, HORTA e FALKENBERG, 2006), realizar triagem de toxinas fúngicas (HARWIG e SCOTT, 1971), monitorar fracionamento de extratos, toxicidade de substâncias químicas, pesticidas (BARAHONA e SANCHEZ-FORTÚN, 1996) e testes de toxicidade em materiais dentários (PELKA *et al.*, 2000).

O teste com *Artemia* é um bioensaio simples para produtos naturais utilizado na detecção e isolamento dos constituintes de plantas. Além disso, não necessita de equipamentos especiais e utiliza pequena quantidade da amostra para o teste. Para o cálculo da CL₅₀ é utilizado o método probit (MEYER *et al.*, 1982).

Artemia é utilizada como um substituto, barato, simples e rápido para os ensaios citotóxicos com células. Os ovos são adquiridos em lojas de animais e as larvas desenvolvem-se rapidamente em água salgada artificial. Além disso, o resultado é obtido em 24 horas. Este teste é baseado na correlação entre a toxicidade sobre o crustáceo e a citotoxicidade sobre células cancerosas do tipo P-388 (MEYER *et al.*, 1982; HOSTETTMANN, QUEIROZ e VIEIRA, 2003; QUIGNARD *et al.*, 2004).

Associado às vantagens já citadas, pode-se acrescentar que é um ensaio preliminar e não exige técnicas assépticas, havendo muitos trabalhos publicados utilizando esse ensaio de toxicidade (AJAIYEOBA, RAHMAN e CHOUDHARY, 1998, SIQUEIRA, BOMM e PEREIRA, 1998; SIQUEIRA e ZIMINIANI, 2001; QUIGNARD *et al.*, 2003).

Um fato interessante é a idade das larvas submetidas aos testes, 24 ou 48 horas. Barahona e Sánchez-Fortun (1996) observaram que larvas de *A. salina* com 48 horas são mais sensíveis aos componentes fenólicos. Os autores sugerem o uso de larvas com 48 horas para realização de bioensaios e a necessidade de testes com maior tempo de exposição para avaliar não apenas a sobrevivência, mas também o crescimento, a maturação e reprodução, concluindo que muitas vezes o teste crônico tem maior importância ecológica que os obtidos em testes agudos.

Dada a atividade antitumoral/antiproliferativa de muitas substâncias antimicrobianas, tem-se interesse nessa atividade mesmo que formalmente não esteja comprovada a relação entre letalidade em *Artemia* spp. e atividade antimicrobiana.

8.4 RESULTADO DO SCREENING PARA ATIVIDADE ANTITUMORAL

Foram avaliados trinta e oito extratos de seis espécies vegetais. Do total de cento e quarenta e quatro avaliações realizadas, nove resultados (6 %) foram considerados muito ativos (MA). Os extratos clorofórmicos de *E. nuda*, *L. gracilis*, *P. parviflora* e *S. obovatum* foram MA em linhagem de células HL60 (leucemia). A maioria dos resultados (85 %) apresentou pouca atividade (Tabela 20).

Os melhores resultados foram apresentados pela espécie *S. obovatum*, cujos extratos clorofórmicos foram muito ativos em três das quatro linhagens. *E. nuda* apresentou extratos polares de folhas muito ativos em tumor de mama e sistema nervoso.

A família Sapotaceae tem aproximadamente 40 gêneros e 700 espécies amplamente distribuídas em áreas tropicais. As espécies *Lucuma lasiocarpa* e *L. neriifolia* conhecidas como abiu-rana são utilizadas como adstringente na Amazônia brasileira (SCHULTES e RAFFAUF, 1990).

O gênero *Pouteria* possui aproximadamente 80 espécies. Quanto ao uso popular pode-se citar o uso como desinfetante (*Pouteria cainito*), purgativo (*P. melinonii*), vermífugo (*P. ucuqui*), afrodisíaco (*P. obtusifolia* Baehni), hemorragia e disenteria (*P. salicifolia* Hook. & Arn.) (SCHULTES e RAFFAUF, 1990; MORS RIZZINI e PEREIRA, 2000; CORREA, 1984). Não foi encontrado na literatura consultada uso popular para *Pouteria nuda*.

O extrato clorofórmico de *S. obovatum* (Rhizophoraceae) foi muito ativo frente a três linhagens de células tumorais. A família Rhizophoraceae apresenta indicação popular para diarreia, hemorragia e inflamação (*Rhizophora mangle* L.) (MORS, RIZZINI e PEREIRA, 2000; SILVA, 2001). *R. mangle* L. conhecida como

mangue-vermelho, fornece bebida apreciada pelos índios é adstringente e rica em taninos, materiais corantes e resinas (SILVA, 2001).

O extrato clorofórmico de galhos de *L. gracillis* (Apocynaceae) foi muito ativo no teste *in vitro* frente a células leucêmicas. A família Apocynaceae tem sido alvo de muitos estudos fitoquímicos, pois é rica em alcalóides, terpenos, polifenóis, cumarinas e lignanas e, além disso, tem espécies conhecidas por sua ação anticâncerígena (SCHULTES e RAFFAUF, 1990). Outras espécies vêm sendo submetidas à avaliação para tal atividade (LOACES, LUIS e CABRERA, 2003). Entretanto, o gênero *Lacmellea* não tem sido quimicamente estudado (SCHULTES e RAFFAUF, 1990).

Os extratos com menor CL₅₀ na avaliação para atividade frente a *A. franciscana* não apresentaram os melhores resultados na atividade antitumoral. Portanto, o presente resultado não corrobora com a classificação de atividade apresentada por Dolabela (1997).

Algumas espécies vegetais são conhecidas por produzir princípios ativos para o tratamento do câncer dentre elas figuram *Camptotheca acuminata*, *Combretum cafferum*, *Colchicum autumnale*, *Podophyllum peltatum* e *Catharanthus roseus*, *Brucea antidysenteric*, *Taxus brevifolia* e *Aspidosperma* spp. (FONSECA, 1999; GWYNN e HYLANDS, 2000; NEWMAN, CRAGG e SNADER, 2003; GURIB-FAKIM, 2006).

Tabela 20. Resultado da CL₅₀ em *A. franciscana* e atividade antitumoral de extratos vegetais da Reserva Ducke.

EXTRATOS			<i>A. franciscana</i>	CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS TUMORAIS			
ESPÉCIE	PARTE	SOLV.	CL ₅₀	SF295 (SN)	HCT8 (cólon)	MDA-MB435 (mama)	HL60 (leucemia)
<i>D. calycina</i>	folha	CHCl ₃	22,9±0,82	PA	MO	PA	PA
		CH ₃ OH	53,33±1,46	PA	PA	MO	PA
		H ₂ O		PA	PA	PA	n.t.
	galho	CHCl ₃	118,00±2,42	MO	MO	PA	PA
		CH ₃ OH	180,47±5,53	MO	PA	MO	PA
		H ₂ O		PA	PA	PA	n.t.
<i>D. johannesii</i>	folha	CHCl ₃		PA	PA	PA	PA
		CH ₃ OH		PA	PA	PA	PA
		H ₂ O		PA	PA	PA	n.t.
	galho	CHCl ₃	305,35±16,12	PA	PA	PA	MO
		CH ₃ OH		PA	PA	PA	PA
		H ₂ O		PA	PA	PA	n.t.
<i>E. nuda</i>	folha	CHCl ₃		PA	PA	PA	PA
		CH ₃ OH		PA	PA	MA (93 %)	PA
		H ₂ O		MA (100 %)	PA	MA (100 %)	PA
	galho	CHCl ₃		PA	PA	PA	MO
		CH ₃ OH		PA	MO	PA	PA
		H ₂ O		MO	MO	PA	n.t.
	casca	CHCl ₃		PA	PA	PA	PA
		CH ₃ OH		PA	PA	PA	PA
		H ₂ O		PA	SA	SA	n.t.
<i>L. gracilis</i>	folha	CHCl ₃		PA	PA	PA	PA
		CH ₃ OH		PA	PA	PA	PA
		H ₂ O		n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
	galho	CHCl ₃	1.054,80±84,66	PA	PA	PA	MA (97 %)
		CH ₃ OH		PA	PA	PA	MO
		H ₂ O		PA	PA	PA	n.t.
<i>P. parviflora</i>	folha	CHCl ₃		PA	PA	PA	PA
		CH ₃ OH		PA	PA	PA	PA
		H ₂ O		PA	PA	PA	PA
	cipó	CHCl ₃		PA	PA	PA	MA (82 %)
		CH ₃ OH	410,30±8,91	PA	PA	PA	PA
		H ₂ O		PA	PA	PA	n.t.
<i>S. obovatum</i>	folha	CHCl ₃	916±149,70	MA (88 %)	MA (84 %)	PA	MA (98 %)
		CH ₃ OH		PA	PA	PA	PA
		H ₂ O		PA	PA	PA	PA
	galho	CHCl ₃		PA	PA	PA	MA (100 %)
		CH ₃ OH		PA	PA	PA	PA
		H ₂ O		PA	PA	PA	n.t.
TOTAL		39	8	38	38	38	30

SOLV = solvente; SA = sem atividade; PA= pouca atividade; MO= atividade moderada (inibição entre 50 e 75%); MA= muita atividade (inibição maior que 75%); n.t. = não testado.

Dos produtos de origem natural com ação anticâncerígena, os mais conhecidos são os alcalóides vimblastina e vincristina isolados de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). Vimblastina é utilizada no tratamento de linfoma, câncer de mama e testículo, sarcoma de Kaposi e doença de Hodgkin's. Vincristina é utilizada no tratamento de leucemia, linfoma e doença de Hodgkin (GURIB-FAKIM, 2006). No presente trabalho o extrato clorofórmico de galho da espécie *L. gracillis* (Apocynaceae) apresentou 97 % de inibição em células tumorais de leucemia (HL60).

O taxol foi adicionado recentemente no arsenal de drogas de origem natural para tratamento do câncer. O taxol é obtido de *Taxus spp.* e segundo Loaces, Luis e Cabrera em 2003, esse produto contava com cento e quarenta e nove patentes. Paclitaxel (taxol) é considerado o antitumoral mais promissor desenvolvido nos últimos vinte anos. É utilizado no tratamento do câncer de pulmão que não respondem a outras terapias, ovário e mama. Paclitaxel inibe o crescimento dos tumores malignos, pois atua nos microtúbulos e conseqüentemente na divisão celular. Paclitaxel foi desenvolvido a partir de *screening* realizado no *National Cancer Institute* (NCI/EUA) (SIMÕES *et al.*, 2003; GURIB-FAKIM, 2006).

A espécie *Camptotheca acuminata*, árvore chinesa, deu origem a dois fármacos análogos da camptotecina: o topotecan (Hycantina®) e o irinotecan, esses foram aprovados pelo "Food and Drug Administration" (FDA) em 1996, e são indicados para o tratamento de câncer de cólon e de reto respectivamente (VIEGAS JR, BOLZANI e BARREIRO, 2006).

Outras espécies vegetais estão sendo investigadas quanto a sua ação anticâncerígena como, por exemplo, *Cephalotaxus harringtonia*, *Cynara scolymus* L., *Cassia fistula* L., *Cassia amara*, *Carapa guianensis* Aubl., *Anacardium occidentale* e *Atropa belladonna* Linn. (LOACES, LUIS e CABRERA, 2003).

A investigação de plantas para avaliar a atividade antitumoral é uma das prioridades atuais no mundo principalmente de extratos de espécies da flora autóctone.

8.5 RESULTADO DA AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA

8.5.1 Teste de Difusão em Meio Sólido

O teste de difusão em meio sólido explorou a difusão de substâncias no ágar a partir de uma cavidade (6 mm) preenchida com uma amostra solubilizada (50 µL). Foram realizados quatrocentos e sessenta e oito testes (78 extratos x 6 microrganismos) em triplicata.

Neste estudo foram utilizadas bactérias Gram-positivas (*Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*) e Gram-negativa (*E. coli*) e uma levedura, *C. albicans*. Os microrganismos selecionados são importantes patógenos da cavidade oral ou são ainda encontrados em doenças sistêmicas com repercussões orais.

Dentre as bactérias está o *S. aureus* considerado a bactéria-teste de escolha em *screening* primário, por três razões: é um agente patogênico sistêmico (pode causar infecção ao nível de vários órgãos), parece desenvolver estados de resistência com mais facilidade do que outras bactérias e está entre os

Staphylococcus mais freqüentes no homem. Uma das infecções mais comuns causadas por esta bactéria é o furúnculo (TRABULSI e TOLEDO, 1991).

E. coli, utilizada como microorganismo-teste, é recomendada pelo NCCLS para ser usada como controle em testes de susceptibilidade antimicrobiana para enterobactérias (ESMERINO, PEREIRA e SCHELESKY, 2005) associado ao fato que *E. coli* e *S. aureus* são detectadas em casos de meningite e são patógenos respiratórios em potencial (GENDRON, GRENIER e MAHEU-ROBERT, 2000).

S. sanguis, por exemplo, é responsável juntamente com *S. mutans* por aproximadamente 50 % dos casos de endocardite bacteriana e *S. oralis* pode causar meningite após procedimento de extração dentária (GENDRON, GRENIER e MAHEU-ROBERT, 2000).

Os bacilos tuberculosos podem disseminar-se envolvendo fígado, rins, vértebras, sistema digestório, pleura, pericárdio e as meninges, causando meningite tuberculosa. O envolvimento bucal pode atingir língua, gengiva, lábios, ângulos da boca, tonsilas, alvéolos dentários e palato mole (SONIS, FAZIO e FANG, 1989).

Após *screening* inicial para determinar a atividade antimicrobiana foi verificado que a espécie *D. calycina* apresentou os melhores resultados frente às bactérias testadas. Os resultados mostram que, no período de 24 horas, as maiores médias de halos visualizados foram para os extratos metanólico e clorofórmico de *D. calycina* (Tabela 21).

M. smegmatis apresentou maior sensibilidade no teste de antibiose. Dos setenta e oito extratos apenas onze apresentaram resultados negativos, não havendo formação de halo de inibição. Verifica-se que ao todo onze extratos

permitiram a formação de halos de inibição maiores que 20 mm frente ao *M. smegmatis* (Tabelas 21 e 22).

Os extratos da espécie *P. parviflora* apresentaram discreta ou nenhuma atividade frente aos microrganismos testados.

Os antimicrobianos comerciais (nistatina e rifampicina) utilizados nos testes como controle positivo apresentaram halos de inibição compatíveis com os esperados frente aos microrganismos testados, diferente dos controles negativos (DMSO, água, etanol) que não apresentaram halo de inibição.

Nas Tabelas 21 e 22 observa-se que muitas espécies apresentaram zona de inibição, de diferentes diâmetros, em torno da cavidade, entretanto o tamanho da zona de inibição depende da capacidade de difusão das substâncias no meio sólido, da atividade das substâncias, da origem do microrganismo, do pH dos substratos nas placas, da densidade do inóculo e do crescimento e atividade metabólica do microrganismo no meio. Isso sugere que a maior atividade não está necessariamente relacionada ao maior halo de inibição (PAULI *et al.*, 2005; BANDEIRA *et al.*, 2006).

Halo de inibição pequeno pode estar relacionado à deterioração da substância ativa, a densidade do inóculo ou confirmar a resistência do microrganismo. Halo demasiadamente grande pode confirmar a presença de uma substância muito potente se todas as outras variáveis estão padronizadas.

O diâmetro dos halos de inibição pode ainda estar relacionado com a polaridade das substâncias testadas e composição da parede celular do microrganismo teste, pois microrganismos Gram-positivos apresentam na parede

celular baixo teor em lipídeos (1-4 %) e os Gram-negativos altos teores em lipídeos (11-22 %) (PELCZAR, REID e CHAN, 1980).

Tabela 21. Média do diâmetro dos halos de inibição em mm dos extratos vegetais pelo método de difusão em ágar frente aos microrganismos teste. Concentração de trabalho 50 mg/mL.

ESPÉCIE	PARTE	SOLVENTE	DIÂMETRO DO HALO DE INIBIÇÃO (mm)					
			<i>M. smegmatis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S. sanguis</i>	<i>C. albicans</i>
<i>D. calycina</i>	folha	CHCl ₃	26	20	20	23	22	15
		CH ₃ OH	40	20	17	18	20	-
		H ₂ O	16	16	-	15	14	15
	galho	CHCl ₃	15	15	14	15	18	10
		CH ₃ OH	21	-	11	13	16	9
		H ₂ O	15	11	-	14	9	13
<i>D. johannesii</i>	folha	CHCl ₃	12	17	-	8	9	-
		CH ₃ OH	14	11	8	-	-	-
		H ₂ O	8	12	8	9	-	-
	galho	CHCl ₃	11	-	13	11	15	-
		CH ₃ OH	15	11	-	10	10	-
		H ₂ O	-	20	9	10	9	-
<i>E. nuda</i>	folha	CHCl ₃	12	10	-	8	9	-
		CH ₃ OH	10	11	-	14	12	20
		H ₂ O	16	20	10	16	12	15
	galho	CHCl ₃	17	15	10	20	10	-
		CH ₃ OH	15	-	11	14	13	-
		H ₂ O	15	9	8	11	10	10
	casca	CHCl ₃	15	10	10	10	10	-
		CH ₃ OH	10	12	10	13	13	-
		H ₂ O	15	16	-	12	8	12
<i>L. gracilis</i>	folha	CHCl ₃	-	15	-	25	10	10
		CH ₃ OH	12	10	-	-	-	15
		H ₂ O	12	12	-	-	-	-
	galho	CHCl ₃	21	18	15	24	15	12
		CH ₃ OH	10	12	10	11	11	-
		H ₂ O	11	-	9	11	-	23
<i>P. parviflora</i>	folha	CHCl ₃	10	-	15	8	9	-
		CH ₃ OH	9	-	9	9	9	-
		H ₂ O	-	-	-	-	-	-
	cipó	CHCl ₃	11	-	15	12	-	-
		CH ₃ OH	15	-	11	11	12	-
		H ₂ O	16	-	-	10	-	-
<i>S. obovatum</i>	folha	CHCl ₃	14	20	11	12	17	-
		CH ₃ OH	14	15	11	12	13	-
		H ₂ O	11	9	12	8	13	-
	galho	CHCl ₃	15	18	11	13	15	9
		CH ₃ OH	15	20	12	13	12	9
		H ₂ O	-	9	10	10	12	20
Rifampicina			30	21	16	21	20	n.t
Nistatina			n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	35
Total de Resultados Positivos			35	29	27	35	31	16

- = resultado negativo; n.t. = não testado.

Tabela 22. Média do diâmetro dos halos de inibição em mm dos extratos vegetais pelo teste de difusão em ágar frente aos microrganismos teste. Concentração de trabalho 50 mg/ml (continuação).

ESPÉCIE	PARTE	SOLVENTE	DIÂMETRO DO HALO DE INIBIÇÃO (mm)					
			<i>M. smegmatis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S. sanguis</i>	<i>C. albicans</i>
<i>C. kappleri</i>	Folha	CHCl ₃	19	10	10	9	10	-
		CH ₃ OH	15	14	12	15	13	10
		H ₂ O	14	16	14	15	14	11
	Galho	CHCl ₃	14	-	11	12	16	12
		CH ₃ OH	15	15	9	15	15	15
		H ₂ O	15	-	14	16	13	12
<i>M. guianensis</i>	Folha	CHCl ₃	12	11	11	10	9	10
		CH ₃ OH	10	10	8	10	8	-
		H ₂ O	-	-	21	-	8	-
	Galho	CHCl ₃	12	10	12	12	15	8
		CH ₃ OH	19	10	15	19	10	8
		H ₂ O	-	12	-	-	10	20
<i>P. grandiflora</i>	Folha	CHCl ₃	-	11	11	9	9	10
		CH ₃ OH	12	14	14	13	14	12
		H ₂ O	-	12	13	12	14	12
	Galho	CHCl ₃	12	12	-	14	14	10
		CH ₃ OH	25	12	13	15	9	15
		H ₂ O	10	-	10	12	12	-
<i>S. brasiliensis</i>	Folha	CHCl ₃	15	18	12	13	12	-
		CH ₃ OH	10	14	13	14	11	10
		H ₂ O	15	-	12	13	14	-
	Galho	CHCl ₃	13	15	16	12	16	16
		CH ₃ OH	-	13	14	14	14	15
		H ₂ O	24	-	11	15	12	-
<i>S. daphnoides</i>	Folha	CHCl ₃	15	13	9	10	9	-
		CH ₃ OH	12	-	11	10	11	-
		H ₂ O	-	-	-	8	-	-
	Galho	CHCl ₃	14	13	16	18	15	-
		CH ₃ OH	18	12	15	13	13	10
		H ₂ O	10	12	12	8	-	-
<i>T. spruceanum</i>	Folha	CHCl ₃	26	10	10	8	9	-
		CH ₃ OH	25	15	14	13	14	19
		H ₂ O	25	15	13	16	14	19
	galho	CHCl ₃	11	11	10	15	15	25
		CH ₃ OH	27	20	11	16	20	30
		H ₂ O	25	16	8	17	16	25
Total de Resultados Positivos			30	28	33	34	34	23

- = resultado negativo.

Nas condições testadas, trinta e quatro extratos apresentaram halos maiores que 20 mm frente aos microrganismos teste e foram selecionados para avaliação da concentração inibitória mínima (CIM).

Alves *et al.* (2000), utilizando o mesmo método empregado neste trabalho, difusão em ágar, com poços de 7 mm de diâmetro, considerou extratos com

zonas de inibição entre 9 e 12 mm, parcialmente ativo, entre 13 e 18 mm, ativos e maior que 18 mm, muito ativo.

Os componentes extraídos por cada solvente, a sua capacidade de difusão e solubilidade nos diferentes meios utilizados nos ensaios biológicos estão relacionados (ALVES *et al.*, 2000) podendo favorecer ou mascarar os resultados nos testes de avaliação antimicrobiana. Di Stasi (1996) afirma que muitos solventes utilizados nos procedimentos de estudos químicos de espécies vegetais são incompatíveis com os ensaios biológicos, principalmente *in vivo*, por envolver a solubilidade dos compostos químicos e as grandes quantidades necessárias para administrar aos animais de experimentação.

Vale ressaltar que os testes *in vitro* para avaliar a sensibilidade de um microrganismo são importantes na seleção de extratos promissores, porém simula parcialmente as situações *in vivo* e, revela apenas a relação entre parasita e substância teste, e não reflete o papel fundamental que exerce o hospedeiro.

O presente trabalho fez uso de técnicas simples, rápidas, de baixo custo e condizentes com as condições de infra-estrutura oferecidos nas instituições locais para avaliação antimicrobiana. Método similar foi utilizado em estudos recentes para avaliar atividade antimicrobiana de extratos vegetais e frações frente a *S. aureus*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (CHAH *et al.*, 2006), *S. mitis*, *S. mutans* e *S. sanguis* (MELO *et al.*, 2006) e *C. albicans* e outras leveduras que causam infecções oportunistas (LIMA *et al.*, 2005).

Percebe-se que não há método convencional padronizado para as novas drogas e a necessidade de novas drogas ativas é urgente, desencadeando um renovado e crescente interesse em avaliar extratos e frações na busca de novas

substâncias (TELLES e MOSCA, 2000). Nesse sentido o presente trabalho, através de técnicas simples, aponta resultados inéditos e promissores, e poderá levar a descoberta de novas substâncias antimicrobianas a partir dessas espécies vegetais.

8.6 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Após triagem preliminar de setenta e oito extratos brutos, a CIM dos extratos mais promissores, foi verificada através de difusão em meio sólido. Foram considerados promissores extratos com halo de inibição maior que 20 mm, ou seja, 34 extratos. Além disso, foram selecionados 10 extratos com halos menores que 20 mm, mas que apresentaram alguma atividade citotóxica nos testes *in vitro*.

Os extratos das espécies *D. calycina* e *L. gracilis* apresentaram as menores CIMs (Tabela 23). Segundo Holetz *et al.* (2002) extratos com CIM menor que 100 µg/mL são considerados ativos, extratos com CIM entre 100 e 500 µg/mL apresentam atividade moderada, entre 500 e 1000 µg/mL baixa atividade e maior que 1000 µg/mL é inativo. Considerando a faixa de corte preconizada por Holetz *et al.* (2002), oito extratos são ativos, cinco apresentaram atividade moderada, sete baixa atividade e vinte e quatro são considerados inativos nas condições testadas e faixa de corte estabelecida.

Nas condições testadas, nenhum dos oito extratos avaliados frente a *C. albicans* foi considerado ativo.

Os extratos metanólico e clorofórmico de folha de *D. calycina* apresentaram os melhores resultados frente ao *M. smegmatis*, *E. coli*, *S. oralis*, *S. aureus* e *S. sanguis* (ver Tabela 23).

Tabela 23. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais da Reserva Florestal Ducke pelo método de difusão em ágar.

Espécie	Parte	Solvent e	CIM (µg/mL)					Atividade Antifúngica C a
			Atividade Antibacteriana					
			Ms	Ec	So	Sa	Ss	
<i>C. kappleri</i>	Galho	CH ₃ OH	>1.000	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>D. calycina</i>	Folha	CH ₃ OH	195	195	97,7	48,8	195	n.t.
	Folha	CHCl ₃	781,3	97,7	48,8	48,8	48,8	n.t.
	Galho	CH ₃ OH	>1.000	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
	Galho	CHCl ₃	97,7	781,3	n.t.	n.t.	781,3	n.t.
<i>D. johannesii</i>	Galho	H ₂ O	n.t.	>1.000	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>E. nuda</i>	Folha	CH ₃ OH	>1.000	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	>1.000
	Folha	H ₂ O	>1.000	>1.000	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>L. gracilis</i>	Galho	CHCl ₃	48,8	781,3	390,6	n.t.	n.t.	3.519
	Galho	H ₂ O	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	>1.000
<i>M. guianensis</i>	Folha	H ₂ O	n.t.	n.t.	n.t.	>1.000	n.t.	n.t.
	Galho	H ₂ O	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	>1.000
<i>P. grandiflora</i>	Galho	CH ₃ OH	>1.000	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>P. parviflora</i>	Cipó	CHCl ₃	n.t.	n.t.	781,3	n.t.	n.t.	n.t.
<i>S. brasiliensis</i>	Galho	H ₂ O	>1.000	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>S. obovatum</i>	Folha	CHCl ₃	n.t.	781,3	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
	Galho	CH ₃ OH	n.t.	>1.000	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
	Galho	H ₂ O	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	>1.000
<i>T. spruceanum</i>	Folha	CH ₃ OH	>1.000	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
	Folha	CHCl ₃	>1.000	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
	Folha	H ₂ O	390,6	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
	Galho	CH ₃ OH	781,25	>1.000	n.t.	n.t.	3.125	>1.000
	Galho	CHCl ₃	>1.000	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	>1.000
	Galho	H ₂ O	>1.000	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	>1.000
TOTAL DE EXTRATOS AVALIADOS			16	9	4	3	4	8

n.t. = não testado.

Os resultados indicam que os extratos de *D. calycina* (Anonaceae) são promissores, apresentando atividade frente a todas as cepas bacterianas testadas com valores de CIM inferiores a 100 µg/mL. Se confirmada sua ação antibacteriana em estudos posteriores, a *D. calycina* parece já preencher uma das qualidades desejadas em um antibiótico: atividade letal ou inibitória sobre muitas espécies diferentes de microrganismos patogênicos (PELCZAR, REID e CHAN, 1980).

O extrato clorofórmico de *L. gracilis* (Apocynaceae) foi o que apresentou menor CIM (48,8 µg/mL) frente ao *M. smegmatis*. Considerando a faixa de corte

CARNEIRO, A.L.B. **Potencial Citotóxico e Antimicrobiano de Plantas da Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus-AM**. Manaus: UFAM, 2007. Tese de Doutorado em Biotecnologia.

estabelecida por Holetz *et al.* (2002), apenas dois extratos são ativos frente ao *M. smegmatis*. Entretanto, para micobactérias, a literatura tem mostrado outras faixas de corte como 200 µg/mL (COLLINS e FRANZBLAU, 1997; TOSUN *et al.*, 2004) e 500 µg/mL (NEWTON *et al.*, 2002). Com esse último critério quatro extratos vegetais pertencentes a três espécies, *D. calycina*, *L. gracilis* e *T. spruceanum*, são ativos frente ao *M. smegmatis*.

A elevada concentração de lipídios de alto peso molecular presente na parede de micobactérias, parede celular hidrofóbica, parece funcionar como uma barreira para os compostos polares (PAULI *et al.*, 2005), justificando os valores de CIM mais promissores para extratos menos polares, os clorofórmicos.

Constata-se que os melhores resultados, ou seja, menores CIMs, foram obtidos com extratos clorofórmicos. Também os resultados do teste de citotoxicidade frente a *A. franciscana* mostram que a menor CL₅₀ foi do extrato clorofórmico de folha de *D. calycina*. Estes resultados confirmam que os testes preliminares de citotoxicidade em *A. franciscana* são fundamentais e convenientes em *screening* para seleção de extratos ativos. Corroboram, portanto com inferências relatadas na literatura sugerindo uma correlação entre a toxicidade geral frente a *Artemia* spp. e atividade biológica (MEYER *et al.*, 1982; CAVALCANTE *et al.*, 2000; ZUQUE *et al.*, 2004).

O clorofórmio extrai das plantas os terpenóides e flavonóides entre outros componentes químicos (COWAN, 1999). Os terpenóides são chamados de inseticidas naturais, desempenhando um papel de proteção às plantas. Alguns extratos contendo alta concentração de terpenóides foram testados e

apresentaram atividade contra micobactéria (BILLO *et al.*, 2005) e efeitos hipoglicemiantes (NEGRI, 2005).

Os flavonóides constituem um grande grupo de pigmentos vegetais de ampla distribuição na natureza. São responsáveis pela coloração das flores e frutos. Nas plantas exercem funções importantes nos processos bioquímicos e farmacológicos, como agentes antioxidantes, inibidores enzimáticos, precursores de substâncias tóxicas ou pigmentos. Conferem segurança e proteção aos vegetais contra a ação nociva de infecções bacterianas, fúngicas, e até mesmo como agente protetor contra ação dos raios ultravioleta e atração de polinizadores. Atualmente os flavonóides têm despertado o interesse da comunidade científica por suas propriedades antiinflamatória, analgésica, antitumoral, anti-HIV, antifúngica, antioxidante e antiulcerogênica (GURIB-FAKIM, 2006; LONGUEFOSSE, 2003). A presença de flavonóides nos extratos metanólicos de *D. calycina* e *T. spruceanum* pode explicar sua atividade frente aos microrganismos avaliados.

A família Annonaceae é composta por aproximadamente 130 gêneros e 2000 espécies. A família possui espécies utilizadas na alimentação, na indústria madeireira, nos rituais indígenas e na medicina popular (MURILLO_A, 2001).

Há indicação de uso popular de espécies da família Annonaceae como anti-reumático, antimicrobiano, vermífugo, antiinflamatório, carminativos, digestivos, estimulantes da bexiga urinária, anticoncepcionais masculinos e antileucorréicos. Além disso, é também indicado para distúrbios do sistema nervoso com ação sedativa, sonífero e calmante (*Annona muricata*), estimulante (*A. squamosa*; *Xylopia aromática* e *X. frutescens*), afrodisíaco (*Xylopia aromática* e *X. frutescens*)

e no tratamento de epilepsia (*Guatteria elata*) (SCHULTES e RAFFAUF, 1990; ZOGHBI, ANDRADE e MAIA, 2000; MARTINS-JÚNIOR *et al.*, 2004).

Várias substâncias químicas já foram descritas na família Annonaceae dentre elas as acetogeninas, mono e diterpenos (*X. sericea*), alcalóides (*X. emarginata*), sesquiterpenos (*X. brasiliensis* e *Duguetia glabriúscula*), ácido kaurenóico (*Annona glabra*), limoneno e confeno (*Annona squamosa*) e flavonoides (*X. emarginata*) (TAKAHASHI *et al.*, 2001; MOREIRA *et al.*, 2003; MOREIRA, LAGO e ROQUE, 2003 e 2005).

As acetogeninas da família Annonaceae foram descritas nos gêneros *Uvária*, *Asimina*, *Goniothalamus*, *Rollinia* (*Rollinia laurifolia*), *Annona* e *Xylopia*. As acetogeninas apresentam diversas atividades biológicas tais como: citotoxicidade, antitumoral *in vivo*, antimalárica, pesticida, antiparasitária e antimicrobiana (COLMAN-SAIZARBITORIA, ZAMBRANO e FERRIGNI, 1994; COLMAN-SAIZARBITORIA, GU e McLAUGHLIN, 1994; ALFONSO *et al.*, 1996; GURIB-FAKIM, 2006).

Pesquisas com a família *Annonaceae* apontam para ação antibacteriana (*Annona glabra* e *Xylopia aethiopica*), antitumoral (*Duguetia panamensis*), citotóxica (*Guguetia glabriúscula*), vermífugo, analgésico e antiinflamatório (*A. glabra*) fungicida, inibidora da motilidade de espermatozóides, antimalárica e antidiabética (*A. squamosa* Linn) (SIQUEIRA e ZIMINIANI, 2001; BOYOM *et al.*, 2003; EZEIFEKA *et al.*, 2004; NEGRI, 2005).

A família Apocynaceae, com aproximadamente 300 gêneros e mil e quinhentas espécies, é conhecida por conter diversos tipos de alcalóides, esteróides, terpenos, polifenóis, cumarinas e lignanas (SCHULTES e RAFFAUF, 1990). É comumente usada na medicina tradicional contra diabetes, como antiglicemiante, anticâncerígeno (*Catharanthus roseus*) (GURIB-FAKIM, 2006) e para doenças do sistema respiratório (BILLO *et al.*, 2005).

C. roseus (Apocynaceae), por exemplo, é capaz de produzir mais de 90 compostos alcalóidicos entre eles os alcalóides indólicos, como a vincristina e vimblastina utilizados em diferentes esquemas de tratamento quimioterápico (ALVES, 2001).

O gênero *Lacmellea* tem aproximadamente 20 espécies as quais não têm sido quimicamente estudadas (SCHULTES e RAFFAUF, 1990). *Lacmellea gracilis* (Apocynaceae) conhecida popularmente como caramurizinho ou sorvinha é uma arvoreta comum na capoeira de terra firme e ocasional na mata. Apresenta látex branco abundante e adocicado. Seus frutos são amarelos e comestíveis (SILVA, LISBÔA e LISBÔA, 1977).

Com base nesses resultados verifica-se que *D. calycina* (Annonaceae) e *L. gracilis* (Apocynaceae) são espécies promissoras que necessitam de outros estudos para definir suas substâncias tóxicas a fim de avaliar seus efeitos farmacológicos bem como a determinação estrutural dos seus componentes bioativos.

Todos os dados apresentados neste trabalho são inéditos e contribuem para o conhecimento de novas espécies bioativas que podem ser usadas como matrizes para a descoberta de novos fármacos.

8.7 BIOAUTOGRAFIA

Os extratos foram, após avaliação da CIM, submetidos ao procedimento de bioautografia. Esta técnica é considerada eficiente e sensível na determinação da atividade antimicrobiana, pois permite localizar substâncias antifúngicas e/ou antibacterianas em uma matriz complexa; combina a cromatografia em camada delgada (CCD) e o teste biológico *in situ*.

Inicialmente prepararam-se placas de CCD analíticas com uma pequena quantidade do extrato e utilizou-se o TTC como corante (Figuras 22 e 23).

A bioautografia consiste na aspersão de uma suspensão de microorganismos sobre um cromatograma, no qual avalia-se a zona de inibição, se houver, a luz natural. A visualização é facilitada pelo auxílio de corantes como a eosina (SOUZA, BARBOSA e VIEIRA, 2004) ou TTC.

A CCD é um método analítico básico da fitoquímica tradicionalmente e amplamente utilizada para análise de plantas medicinais, sendo incluída como um método de identificação em monografias de drogas herbáceas.

O TTC atua na cadeia respiratória, no interior das mitocôndrias, revelando através de uma coloração vermelha os locais onde houve crescimento do microorganismo (RICH *et al.*, 2001).

Os resultados revelam que vários extratos, principalmente os clorofórmicos, apresentaram substâncias ativas exibindo diferentes zonas de inibição em diferentes *R_f*s, sugerindo a presença de atividade antimicrobiana em substâncias de diferentes polaridades (Tabela 24 e Figuras 22 e 23).

Os extratos de *D. calycina* apresentaram os melhores resultados na bioautografia. Todas as espécies avaliadas neste estudo foram sensíveis ao extrato clorofórmico de galho, a maioria (*M. smegmatis*, *S. oralis*, *S. aureus* e *S. sanguis*) em mais de um Rf.

Tabela 24. Resultado da bioautografia de extratos vegetais da Reserva Florestal Ducke com seus respectivos Rfs.

Rf								
Espécie	Parte	Solvente	Atividade Antibacteriana					Atividade Antifúngica
			Ms	Ec	So	Sa	Ss	C a
D. calycina	Folha	CH3OH	0,93	0,71	-	0,78	-	0,81
	Folha	CHCl3	0,93	0,70	-	0,55 0,86	0,5 0,39 0,28	0,78
	Galho	CH3OH	0,75	-	-	-	-	-
	Galho	CHCl3	0,47 0,36 0,24 0,20	0,55	0,56 0,66	0,86 0,77 0,52 0,16	0,59 0,42 0,27	0,8
D. johannesii	Galho	H2O	n.t.	-	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
E. nuda	Folha	H2O	-	n.t.	0,5	n.t.	n.t.	n.t.
L. gracilis	Folha	CHCl3	n.t.	-	-	-	-	-
	Galho	CHCl3	-	0,46 0,52	0,49 0,53 0,23	0,32	-	0,39
	Galho	H2O	-	-	-	-	-	-
M. guianensis	Folha	H2O	-	-	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
	Galho	H2O	n.t.	-	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
P. grandiflora	Galho	CH3OH	-	0,83 0,76	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
P. parviflora	Cipó	CHCl3	-	0,83 0,77	-	n.t.	n.t.	n.t.
S. obovatum	Folha	CHCl3	-	-	n.t.	-	n.t.	n.t.
T. spruceanum	Folha	CH3OH	-	-	n.t.	-	-	0,40
	Folha	CHCl3	0,27	-	-	-	-	-
	Folha	H2O	-	-	n.t.	n.t.	-	-
	Galho	CH3OH	-	-	0,22	n.t.	n.t.	-
	Galho	CHCl3	-	-	-	n.t.	n.t.	0,16
	Galho	H2O	-	-	n.t.	-	n.t.	n.t.
TOTAL DE EXTRATOS TESTADOS			17	19	13	11	10	12

n.t. = não testado; - = resultado negativo.

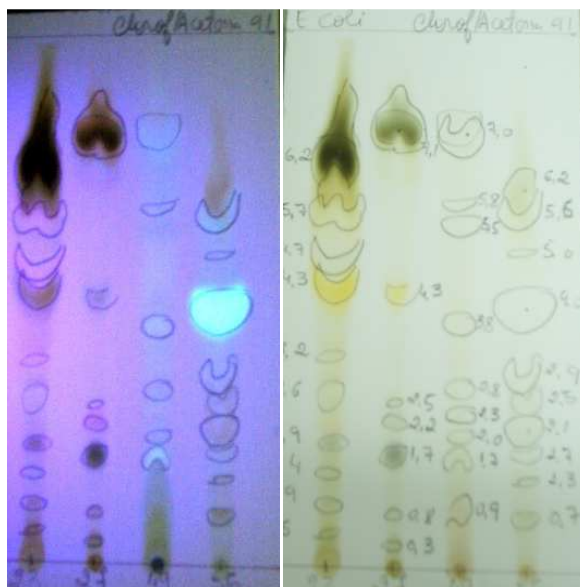


Figura 22. Perfil cromatográfico de extratos vegetais revelados em luz ultravioleta nos comprimentos de onda 366 e 254 nm e medida da distância percorrida pelas amostras para cálculo do *R_f*. Fase móvel: Clorofórmio/acetona (9:1).

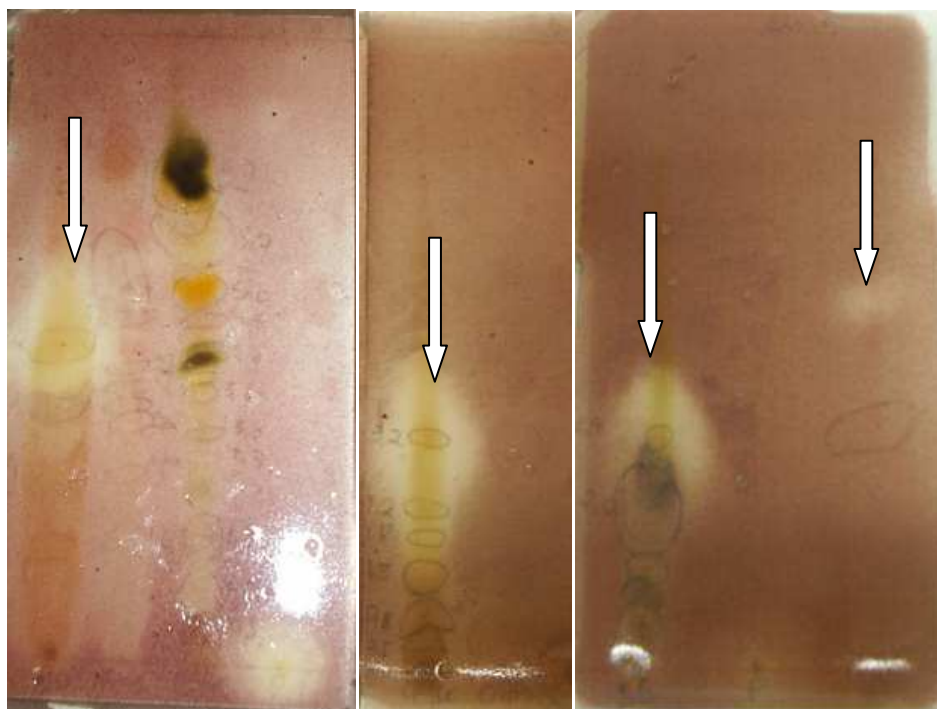


Figura 23. Bioautograma *M. smegmatis*. A – *D. calycina*, *T. spruceanum*, *S. obovatum*; B – *D. calycina*, *M. guianensis* e C - Bioautograma *S. aureus* - *L. gracilis* (56, 81).

Os resultados da bioautografia confirmam mais uma vez que a *D. calycina* é uma espécie promissora. Estes resultados confirmam a ação do extrato clorofórmico de folha da espécie *D. calycina* e acrescenta o extrato clorofórmico de galho como um potencial antimicrobiano.

A técnica de bioautografia mostrou seis extratos com substâncias ativas frente a *C. albicans*. Difere, portanto da avaliação da CIM na qual nenhum dos extratos avaliados foi considerado ativo nas condições testadas.

Foi verificada considerável diferença entre o método de difusão em ágar e a bioautografia, pois o extrato clorofórmico de galho da espécie *L. gracillis* que apresentou a menor CIM pelo método de difusão em ágar frente a *M. smegmatis* não apresentou zona de inibição na avaliação através de bioautografia. Em contrapartida o extrato clorofórmico de galho de *D. calycina* que apresentou halo maior que 20 mm e boa atividade (CIM < 100 µg/mL) apenas para *M. smegmatis*, na bioautografia apresentou substâncias ativas em diferentes Rfs frente a todas microrganismos avaliadas.

Resumindo, a bioautografia permitiu selecionar mais extratos ativos, somando à avaliação pelo método de difusão em ágar. Com isso, observa-se que é fundamental em *screening* de extratos brutos aplicar diferentes metodologias no intuito de confirmar e conduzir o *screening* para revelar o maior número de extratos e substâncias bioativas.

Os dados apresentados pela bioautografia permitem estabelecer a natureza das substâncias responsáveis pela ação antimicrobiana e, associados ao método de difusão em ágar, sugerir espécies vegetais com potencial atividade

antimicrobiana indicando a possibilidade de aproveitamento farmacêutico do vegetal.

As substâncias bioativas de origem vegetal são em princípio biodegradáveis e renováveis, características de grande interesse na sociedade atual, especialmente quando se pensa não apenas no uso sustentável, mas na conscientização da população para garantir um ecossistema viável no futuro, pois espécies ainda não estudadas poderão gerar drogas no futuro para isso deverão estar disponíveis.

8.8 RESULTADO DO SCREENING FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS ATIVOS

Para a revelação de substâncias separadas utilizam-se métodos físicos, químicos, biológicos e enzimáticos. No método físico são usadas lâmpadas UV (240-260 e 360 nm), pois muitas substâncias orgânicas absorvem radiações de luz ultravioleta e tornam-se fluorescentes (COLLINS, BRAGA e BONATO, 1990).

No método químico a solução reveladora (agente cromogênico) detecta classes de substâncias. O hidróxido de potássio (KOH), por exemplo, revela antraquinonas (vermelho), antronas (amarelo, UV 366 nm) e cumarinas (azul, UV 366 nm) e os vapores de iodo formam manchas marrons ao ligar-se nos compostos orgânicos (COLLINS, BRAGA e BONATO, 1990).

8.8.1 Resultado da Revelação e *Screening* Fitoquímico em CCD

As placas de CCD reveladas com KOH demonstraram a presença de antraquinonas em extratos metanólico e clorofórmico de folha de *D. calycina* e clorofórmico de galho de *L. gracillis*. Cumarinas foram evidenciadas no extrato clorofórmico de galhos de *L. gracillis* (Tabela 25).

O reagente de Dragendorff permitiu demonstrar a presença de alcalóides nos extratos clorofórmicos de folha e galho de *D. calycina* (Tabela 25). A mancha com *Rf* 0,24 foi positivo para alcalóide e apresentou atividade antimicobacteriana frente ao *M. smegmatis*. Já a mancha com *Rf* 0,28 testou positivo para alcalóide e também apresentou atividade antibacteriana frente a *S. sanguis*. Os resultados sugerem, portanto a presença de alcalóides com ação antimicobacteriana no extrato clorofórmico de galho e antibacteriana no extrato clorofórmico de folha.

Tabela 25. *Rf* dos extratos ativos, conforme revelador empregado.

ESPÉCIE	PARTE	EXT	UV (nm)		IODO	ANI	KOH / CLASSE			ALC
			254	366			ANTQ	ANT	CUM	
<i>D. calycina</i>	Folha	CHCl ₃	0,82	0,94	0,29	-	0,89	-	-	0,28
			0,78	0,90	0,20		0,29			0,11
			0,73	0,83			0,07			
			0,71	0,67						
			0,58	0,52						
			0,53	0,29						
			0,41	0,09						
			0,36							
			0,33							
			0,19							
	Folha	CH ₃ OH	0,96	0,96	0,99	0,81	0,92	-	-	-
			0,92	0,04	0,18	0,02				
			0,88							
			0,85							
			0,81							
			0,73							
			0,58							
			0,30							
			0,19							
			0,055							
<i>L. gracilis</i>	Galho	CHCl ₃	0,47	0,69	0,98	0,1	-	-	-	0,24
			0,26	0,1	0,49					
	Galho	CHCl ₃	0,11							
			0,69	0,8	0,47	0,44	0,51	-	0,36 ¹	-
			0,64	0,711	0,41					
			0,61	0,581	0,33					
			0,53	0,51	0,09					
			0,32 ¹	0,3 ¹						
				0,09						

EXT = extrato; ANI = Anisaldeído; ANTQ = antraquinona; ANT = antrona; CUM = cumarina; ALC = alcalóide; - = resultado negativo.

¹Azul brilhante.

As cumarinas são metabólitos secundários derivados da lactona do ácido o-hidroxi-cinâmico com odor característico e várias atividades farmacológicas (Di Stasi *et al.*, 1989). Dentre suas propriedades pode-se destacar a anticoagulante, protetora vascular, antiespasmódica, foto-protetora e é útil no tratamento de psoríase. O derivado cumarínico de *Calophyllum calaba* (Gutiferaceae) possui propriedades anti-HIV por inibição da transcriptase reversa (LONGUEFOSSE, 2003). Há descrição ainda de atividade moderada frente ao *Mycobacterium tuberculosis*, *M. aurum*, *M. fortuitum*, *M. phlei* e *M. smegmatis* (OKUNADE, ELVIN-LEWIS e LEWIS, 2004).

No presente trabalho o extrato com reação positiva para cumarina, extrato clorofórmico de galho de *L. gracilis*, foi o que apresentou menor CIM (48,83 µg/mL) frente ao *M. smegmatis*.

As famílias mais citadas na literatura pelo conteúdo em cumarinas são: Apiaceae, Rutaceae, Asteraceae, Fabaceae, Oleaceae, Moraceae e Thymeleaceae (CARVALHO, GOSMANN e SCHENKEL, 2003).

A caracterização das cumarinas no extrato pode ser feita pela observação sob luz UV (360 nm), pois a maioria apresenta fluorescência azul brilhante ou verde. As cumarinas em solução alcalina desenvolvem cor amarela, devido ao rompimento do anel lactônico (SIMÕES *et al.*, 2003). O extrato clorofórmico de galhos de *L. gracillis* apresentou fluorescência azul brilhante em CCD com sistema clorofórmio:acetona (9:1) na mancha com *R_f* 0,36. No extrato clorofórmico a reação química com KOH confirmou a presença de cumarinas.

Quinonas são compostos orgânicos considerados produtos da oxidação dos fenóis. São utilizadas como pigmentos naturais em corantes alimentares. Há

descrições recentes de quinonas apresentando diversas atividades biológicas como, por exemplo, inibidora da replicação do vírus HIV e atividade quimioprotetora contra carcinogênese (SIMÕES *et al.*, 2003).

Atualmente são encontradas mais de 1.500 quinonas. Em plantas superiores, uma classe de quinonas, as antraquinonas, foram descritas principalmente nas famílias Rubiaceae, Caesalpiniaceae, Rhamnaceae, Polygonaceae, Liliaceae, Verbenaceae e Asphodelaceae (SIMÕES *et al.*, 2003).

Antraquinonas são utilizadas como laxante, e recentemente foi comprovada também atividade antiviral e antifúngica. Como exemplos de antraquinona pode-se citar o crisofanol, reina, fisciona, aloe-emodina, crisofanol e alizarina (SIMÕES *et al.*, 2003).

Uma antraquinona derivada do metabolismo secundário de fungo foi descrita por apresentar atividade modesta (CIM=216,6 µg/mL) frente ao *M. tuberculosis* (OKUNADE, ELVIN-LEWIS e LEWIS, 2004).

Neste trabalho a reação com KOH revelou a presença de antraquinonas nos extratos das espécies *D. calycina* e *L. gracilis*. Esses extratos apresentaram atividade antimicobacteriana frente ao *M. smegmatis*. Além disso, através de bioautografia observou-se atividade antibacterina do extrato clorofórmico de galho de *L. gracilis* frente a *E. coli* e *S. oralis* nos *Rfs* 0,52 e 0,53, respectivamente. Considerando o resultado positivo para antraquinona na mancha com *Rf* 0,51 os resultados sugerem ação antimicrobiana de antraquinonas no referido extrato.

Os alcalóides constituem um importante grupo de substâncias naturais nitrogenadas, de origem vegetal, de caráter básico e ação farmacológica enérgica (DI STASI *et al.*, 1989). Dentre as famílias ricas em alcalóides estão: Liliaceae,

Amaryllidaceae, Apocynaceae, Berberiaceae, Leguminosae, Papaveraceae, Ranunculaceae, Rubiaceae e Solanaceae (GURIB-FAKIM, 2006). Os alcalóides presentes na espécie *Sanguinaria canadensis* (Papaveraceae) exibiram boa atividade (CIM= 24,5 e 14,3 µg/mL) frente a *M. avium*, *M. bovis* BCG e *M. smegmatis* (OKUNADE, ELVIN-LEWIS e LEWIS, 2004).

8.9 RESULTADO DO SCREENING FITOQUÍMICO REALIZADO EM TUBO

Os ensaios cromáticos são importantes nos estágios preliminares de análise. Neste estudo foram avaliados os extratos mais ativos na avaliação antimicrobiana e os ativos em mais de um bioensaio.

O extrato metanólico de folhas da espécie *D. calycina* apresentou reação positiva para fenóis, taninos e flavonóides. Além disso, em pH 11 apresentou reação positiva para flavonas, flavonóis e xantonas (Tabela 26). A presença desses constituintes pode estar relacionada a sua ação antibacteriana. Trabalho realizado por Oliveira (2007) detectou atividade antiagregante de extratos de *D. calycina*. A presença de flavonóides pode justificar essa ação.

O extrato clorofórmico de galhos de *L. gracilis* apresentou reação negativa para todos os testes (Tabela 26).

Tabela 26. Resultado da prospecção fitoquímica de metabólicos secundários das espécies vegetais promissoras através de reações de coloração em tubo.

ESPÉCIE	PARTE	EXTRATO	Fenóis	Taninos	Flavonóides	Flavonas Flavonóis Xantonas	Flavanonois
<i>D. calycina</i>	Folha	CHCl ₃	+	-	-	+	-
	Folha	CH ₃ OH	+	+	+	+	-
	Galho	CHCl ₃	-	-	-	+	-
	Galho	CH ₃ OH	-	-	+	+	-
<i>E. nuda</i>	Folha	CH ₃ OH	+	+	+	-	+
<i>L. gracilis</i>	Galho	CHCl ₃	-	-	-	-	-
<i>T. spruceanum</i>	Folha	CH ₃ OH	+	+	+	+	-
		H ₂ O	+	+	+	-	+
	Galho	CH ₃ OH	+	+	+	n.t.	n.t.

n.t. = não testado

Taninos são substâncias poliméricas de alto peso molecular e com propriedade de precipitar proteínas. São compostos polifenólicos hidrossolúveis que formam complexos insolúveis com alcalóides, gelatina e outras proteínas. Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional com ação adstringente interna e externa (DI STASI *et al.*, 1989; LONGUEFOSSE, 2003), no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas, na diarreia, como hemostática, hipoglicemiante e anti-séptica, como cicatrizante, no reumatismo, em queimaduras, em problemas estomacais e renais. Estudos recentes identificaram atividade anticancerígena, anti-HIV, bactericida, fungicida, antiviral e moluscicidas de taninos (LONGUEFOSSE, 2003; SIMÕES *et al.*, 2003; GURIB-FAKIM, 2006).

Os extratos de *T. spruceanum* e *E. nuda* contém taninos. É interessante lembrar que *E. nuda*, por exemplo, apresentou-se muito ativa na avaliação *in vitro* com células tumorais e também atividade hemolítica (OLIVEIRA, 2007).

Os flavonóides são substâncias geralmente fenólicas que ocorrem de forma livre (agliconas) ou ligadas a açúcares (glicosídeos) com inúmeras ações farmacológicas (DI STASI *et al.*, 1989). Possui ação antioxidante, antiinflamatória antitumoral, antiespasmódica, antimicrobiana, antimutagênica, antiúlcera, antiviral, estrogênica e tripanossomicida (LONGUEFOSSE, 2003; SIMÕES *et al.*, 2003).

Os resultados revelaram a presença de flavonóides em extratos de *D. calycina*, *E. nuda* e *T. spruceanum*, no entanto não são suficientes para definir quais constituintes químicos é responsável pelos resultados apresentados neste trabalho.

9 CONCLUSÃO

A metodologia empregada resultou na seleção de espécies vegetais sem estudos anteriores. Os resultados apresentados, todos inéditos, permitiram apontar espécies vegetais promissoras com ação antimicrobiana e antitumoral. Assim, confirmando a importância do estudo de espécies vegetais sem indicação popular e a potencialidade de utilização de várias delas, assim, como a necessidade de estudos da flora regional.

A avaliação da atividade biológica das espécies vegetais da Reserva Ducke permitiu concluir que:

1. Os extratos de *D. calycina* obtidos em metanol e clorofórmio apresentaram um maior percentual de mortalidade e menor CL₅₀ no bioensaio frente a *A. franciscana*, portanto, foram os mais tóxicos;
2. A maioria dos extratos apresentou pouca atividade antitumoral. Apenas seis extratos de quatro espécies vegetais, *E. nuda* (2), *L. gracillis* (1), *P. parviflora* (1) e *S. obovatum* (2), foram muito ativos. As espécies *L. gracilis*, *P. parviflora* e *S. obovatum* foram muito ativas frente a linhagem de células HL60 (leucemia);
3. O estudo demonstrou atividade antimicrobiana das espécies *D. calycina* e *L. gracilis* frente a *M. smegmatis* (CIM < 100 µg/mL). Além disso, *D. calycina* foi ativa frente a *E. coli*, *S. oralis*, *S. aureus* e *S. sanguis*;
4. As espécies *E. nuda*, *L. gracilis*, *S. obovatum*, *M. guianensis* e *T. spruceanum* apresentaram halos de inibição maiores que 20 mm de diâmetro frente a *C. albicans*. Entretanto a CIM desses extratos foi maior que 1000 µg/mL. Na bioautografia apenas os extratos de *D. calycina* (3),

L. gracilis (1) e *T. spruceanum* (2) exibiram halos de inibição frente a *C. albicans*;

5. Os extratos de folha de *D. calycina* contêm fenóis, flavonóides, taninos, antraquinonas e alcalóide. A bioautografia demonstrou atividade antimicrobiana dos alcalóides de *D. calycina*;
6. O extrato de *L. gracilis* obtido em clorofórmio contem antraquinonas e cumarinas. O Rf correspondente as antraquinonas foi responsável pela atividade antimicrobiana frente a *E. coli* e *S. oralis* na bioautografia.

Os resultados sugerem as espécies *D. calycina*, *L. gracilis*, *E. nuda* e *S. obovatum* para apreciação detalhada em outros estudos. Outras investigações poderão conduzir a obtenção de novos medicamentos fitoterápicos ou substâncias com potencial farmacológico.

Foi possível, portanto inserir novas espécies vegetais na lista de plantas com possibilidade de gerar produtos de origem natural para tratamento de novos e velhos distúrbios para os quais existe um número limitado de medicamentos ou que desenvolvem resistência frente aos medicamentos de uso habitual.

10 REFERÊNCIAS

- ABINADER, C. D. **Avaliação in vitro da Atividade Antimicrobiana da Pasta de Hidróxido de Cálcio Associado a Diferentes Veículos Frente a *Candida albicans* e ao *Enterococcus faecalis***. Universidade Federal do Amazonas. Manaus. 2005.
- AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, 74, 2001. 113-123.
- AIYELAAGBE, O. O. Antibacterial activity of *Jatropha multifida* roots. **Fitoterapia**, 72, 2000. 544-546.
- AJAIYEOBA, E. O.; RAHMAN, A. U.; CHOUDHARY, I. M. Preliminary antifungal and cytotoxicity studies of extracts of *Ritchies capparoides* var. longipedicellata. **Journal of Ethnopharmacology**, 62, 1998. 243-246.
- AKINPELU, D. A. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. **Fitoterapia**, 72, 2001. 286-287.
- ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, 3, 2001. 10-15.
- ALVES, T. M. A. et al. Biological screening of brazilian medicinal plants. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 95, 2000. 367-373.
- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentration. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 48, 2001. 5-16.
- ANVISA. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Hospitalar em Serviços de Saúde**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Salvador. 2004.
- BANDEIRA, M. F. C. L. et al. Avaliação in vitro da sensibilidade da *Candida albicans* ao hidróxido de cálcio associado ao óleo de copaíba. **Dentística on line**, 13, 2006. 12-22.
- BAUMGARTNER, J. C.; WATTS, C. M.; XIA, T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. **Journal of Endodontics**, 26, 2000. 695-698.
- BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**. 24. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1985.
- BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 4. ed. Brasília: Atheneu, 1988.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Decreto 76.872 de 22 de Dezembro de 1975. Regulamenta a Lei 6,050, de 24 de Maio de 1974, que dispõe sobre a fluoretação da água em sistemas públicos de abastecimento**. Brasília. 1975.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Anuário Estatístico de Saúde do Brasil**. Brasília. 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria 971 de 03 de maio de 2006. aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) do Sistema Único de Saúde.** Brasília. 2006.

BURGER, A. **Medicinal Chemistry.** [S.l.]: Wiley-Interscience, 1970.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, 94, 2004. 223-253.

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, 9, 2001. 327-335.

CHAH, K. F. et al. Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 104, 2006. 164-167.

CIENTFUEGOS, F. **Tabelas Químicas.** Rio de Janeiro: Interciência, 2002.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução A Métodos Cromatográficos.** 4. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1990.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas.** Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura-Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal-Imprensa Nacional, 1984.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiological Reviews**, 12, 1999. 564-582.

COYKENDALL, A. L. Classification and identification of the viridans Streptococci. **Clinical Microbiology Reviews**, 2, 1989. 315-328.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drugs discovery and development. **J Nat Prod**, 60, 1997. 52-60.

DAVIES, A. N.; BRAILSFORD, S. R.; BEIGHTON, D. Oral candidosis in patients with advanced cancer. **Oral Oncology**, 42, 2006. 698-702.

DEACON, J. P. **Modern Mycology.** Oxon-NY: Blackwell Science, 1997.

DEVELOUX, M.; BRETAGNE, S. Candidiasis and yeast infections. **EMC - Maladies Infectieuses**, 2, 2005. 119-139.

DI STASI, L. C. **Plantas Medicinais:** arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 1996.

DIDRY, N. et al. Antimicrobial activity of aerial parts of *Drosera peltata* Smith on oral bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, 60, 1998. 91-96.

DNUNES, D. A. et al. A utilização de agentes fitoterápicos em Odontologia. **Revista da Faculdade de Odontologia da UFBA**, 18, 1999. 11-14.

DOLABELA, M. F. **Triagem in vitro para Atividade Antitumoral e Anti *T. cruzi* de Extratos Vegetais, Produtos Naturais e Substâncias Sintéticas.** Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 1997.

DUKE, J. A.; VASQUEZ, R. **Amazonian Ethnobotanical Dictionary.** Florida: CRC Press, 1994.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **The Lancet Infectious Diseases**, 3, 2003. 685-702.

ELDIN, S.; DUNFORD, A. **Fitoterapia na Atenção Primária à Saúde.** São Paulo: Manole, 2001.

ESMERINO, L. A.; PEREIRA, A. V.; SCHELESKY, M. E. Doseamento da potência da ciprofloxacina em comprimidos orais. **Revista Brasileira de Farmácia**, 86, 2005. 17-20.

FABRY, W.; OKEMO, P. O.; ANSORG, R. Antibacterial activity of East African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 60, 1998. 79-84.

FARAH, W.; ASHMAN, P. O.; CHALLACOMBE, S. J. Oral candidoses. **Clinics in Dermatology**, 18, 2000. 553-562.

FERREIRA, S. H. et al. **Medicamentos a partir de Plantas Medicinais no Brasil.** [S.l.]: Academis Brasileira de Ciências, 1998.

FONSECA, A. L. **Antibióticos na Clínica Diária.** 6. ed. Rio de Janeiro: EPUB, 1999.

FORLENZA, O. V. Ginkgo biloba e memória: mito ou realidade. **Rev Psiq Clin**, 30, 2003. 218-220.

FOYE, W. O. **Principles of Medicinal Chemistry.** 3. ed. London: Lea & Febiger, 1990.

GENDRON, R.; GRENIER, D.; MAHEU-ROBERT, L. The oral cavity as a reservoir of bacterial pathogens for focal infections. **Microbes and Infection**, 2, 2000. 897-906.

GOMES, B. P. F. A.; LILLEY, J. D.; DRUCKER, D. B. Clinical significance of dental root canal microflora. **Journal of Dentistry**, 24, 1996. 47-55.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

GWYNN, B. J.; HYLANDS, P. J. Plants a source of new medicines. **Drug Discovery World Summer**, 2000. 54-59.

HAMADA, S.; SLADE, H. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiology Reviews**, 44, 1980. 331-384.

HARWIG, J.; SCOTT, P. M. Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. **Applied Microbiology**, 21, 1971. 1011-1016.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031, 2002.

HOLT, J. H. et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

JORGE, A. O. C. **Microbiologia Bucal**. 2. ed. São Paulo: Santos, 1998.

KIM, J. H. Anti-bacterial action of onion (*Allium cepa* L) extracts against pathogenic bacteria. **J Nihon Univ Sch Dent**, 39, 1997. 136-141.

KOO, H. et al. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. **Archives of Oral Biology**, 45, 2000. 141-148.

KUJUMGIEV, A. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 235-240, 1999.

LARPENT, J. P.; SANGIER, J. J. **Biotechnologie des Antibiotiques**. Paris: Masson Editors, 1989.

LOACES, D. L.; LUIS, I. R.; CABRERA, G. S. Descubrimiento y desarrollo de agentes cancerígenos derivados de plantas medicinales. **Rev Cubana Plant Med**, 8, 2003.

LOCKHART, W. R. A rapid micromethod for bioautographic assay, 1954. 152-153.

LONGUEFOSSE, J. L. **Plantas Medicinales de la Caribe**. [S.l.]: Gondwana Editions, 2003.

LOWY, F. D.; MILLER, M. New methods to investigate infectious disease transmission and pathogenesis - *Staphylococcus aureus* disease in drug users. **The Lancet Infectious Disease**, 2, 2002. 605-612.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, 25, 2002. 429-438.

MAHDI, J. G. et al. The historical analysis of aspirin discovery, its relation to the willow tree and proliferative and anticancer potential. **Cell Prolif**, 39, 2006. 147-155.

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. D. G. B.; ANDRADE, E. H. A. **Plantas Aromáticas na Amazônia e seus Óleos Essenciais**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2001. 186 p.

MARCOTTE, M. D.; LAVOIE, M. C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 62, 1998. 71-109.

MARQUES, M. D.; GOLOMBEK, D.; MORENO, C. Adaptação Temporal. In: MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. **Cronobiologia: princípios e aplicações**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1997.

MARTINS, J. E. C. **Plantas Medicinais de Uso na Amazônia**. 2. ed. Belém: CEJUP, 1989.

MATOS, F. J. A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFP, 1997.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasil Bot**, 26, 2003. 231-238.

MCCULLOUGH, M. J.; ROSS, B. C.; READ, P. C. Candida albicans: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. **International Journal Oral & Maxillofacial Surgery**, 25, 1996. 136-144.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, 45, 1982. 31-34.

MICHILES, E. Fitoterapia como prática institucional: a experiência do Estado do Rio de Janeiro. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, 2, 2004. 30-37.

MILLIKEN, W. **Plants for Malaria Plants for Fever: medicinal species in Latin America - a bibliography e survey**. Kew: The Royal Botanic Gardens, 1997.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, 7, 2006. 148-151.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal Plants of Brasil**. United States of America: [s.n.], 2000.

MURILLO_A, J. Las Annonaceae de Columbia. **Biota Colombiana**, 2, 2001. 49-58.

NARVAI, P. C. Cárie dentária e flúor: uma relação do século XX. **Ciência e Saúde Coletiva**, 3, 2000. 381-392.

NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras, Pennsylvania, n. 2, 2002.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 41, 2005. 121-142.

NEVES, M. I. R.; NASCIMENTO, M. D. S. B. Aspectos Clínicos e microbiológicos da candidíase oral em pacientes com Aids. **Revista do Hospital Universitário/UFMA**, 2, 2001. 20-25.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. S. Natural products as source of new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Prod.**, 66, 2003. 1022-1037.

NICASIO, P.; MECKES, M. Hypotensive effect of the hydroalcoholic extract from *Jacaranda mimosaeifolia* leaves in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 97, 2005. 301-304.

OLIVEIRA, V. M. A. **Atividade Hemolítica e Inibitória da Agregação Plaquetária de Extratos de Plantas Amazônicas**. Universidade Federal do Amazonas. Manaus. 2007.

OZCELIK, B. et al. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of the lipophylic extracts of *Pistacia vera*. **Microbiological Research**, 160, 2005. 159-164.

PANIZZA, S. **Plantas que Curam: cheiro de mato**. 22. ed. São Paulo: IBRASA, 1997.

PARRA, A. L. et al. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, 8, 2001. 395-400.

PAULI, G. F. et al. New perspectives on natural products in TB drug research. **Life Science**, 78, 2005. 485-494.

PELCZAR, M. J.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1980.

PELKA, M. et al. A new screening test for toxicity testing of dental material. **Journal of Dentistry**, 28, 2000. 341-345.

PEREIRA, M. M. Fatores de Virulência Microbiana. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

PINTO, V. G. **Saúde Bucal: odontologia preventiva e social**. 3. ed. São Paulo: Santos, 1994.

PIOVANO, S. Bacteriology of most frequent oral anaerobic infections. **Anaerobe**, 5, 1999. 221-227.

QUIGNARD, E. L. J. et al. Screening of plants found in Amazonas State for lethality towards brine shrimp *Artemia franciscana*. **Acta Amazônica**, 33, 2003. 93-104.

RABE, T.; STADEN, J. Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. **Journal of Ethnopharmacology**, 56, 1997. 81-87.

RIBEIRO, J. E. L. S. et al. **Flora da Reserva Ducke**: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA, 1999.

RIBEIRO, M. O. et al. Avaliação de testes rápidos em microplacas usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida e rifampicina. **J Brasileiro de Pneumologia**, 30, n. 4, 2004. 455-460.

RIZZINI, C. T.; MORS, W. B. **Botânica Econômica Brasileira**. 2. ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1995.

RODRIGUES, R. M. **A Flora Amazônica**. Belém: CEJUP, 1989.

ROST, W. J. Chemotherapy: an introduction. In: FOYE, W. O. **Principles of Medicinal Chemistry**. 3. ed. Philadelphia_London: Lea & Febiger, 1990.

SALDAÑA, L. S. et al. Antibióticos sistêmicos en dermatologia primeira parte: Betalactâmicos - Carbapenems - Aminoglucósidos - Macrólidos. **Dermatología Peruana**, 14, 2004. 7-11.

SAMUELSEN, A. B. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. **Journal of Ethnopharmacology**, 71, 2000. 1-212.

SAMUELSON, J. Doenças Infecciosas. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

SANT'ANA, P. J. P. **A Bioprospecção no Brasil**: contribuição para uma gestão ética. Brasília: Paralelo 15, 2002. 220 p.

SAYED, M. D. Traditional medicine in health care. **Journal of Ethnopharmacology**, 2, 1980. 19-22.

SCHULTES, R. E.; RAFFAUF, R. F. **The Healing Forest**: medicinal and toxic plants of the northwest Amazonia. Portland: Dioscorides Press, 1990.

SHURRAB, M. Y. Antimicrobial efficiency of some antiseptic products on endodontic microflora isolated from gangrenous pulp tissue. **The Journal Contemporary Dental Practice**, 7, 2006. 1-8.

SIANI, A. C. **Desenvolvimento Tecnológico de Fitoterápicos**: plataforma metodológica. Rio de Janeiro: Scriptorio, 2003. 97 p.

SILVA, M. F.; LISBÔA, P. L. B.; LISBÔA, R. C. L. **Nomes Vulgares de Plantas Amazônicas**. Belém: INPA, 1977.

SILVA, R. C. **Plantas Medicinais na Saúde Bucal**. Vitória: [s.n.], 2001.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS e UFSC, 2003.

SINGH, S. Tuberculose. **Current Anaesthesia & Critical Care**, 15, 2004. 165-171.

SIQUEIRA JR, J. F. et al. Fungal infection on the radicular dentin. **Journal of Endodontics**, 28, 2002. 770-773.

SIQUEIRA JR, J. F.; SEN, B. H. Fungi in endodontic infections. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, 97, 2004. 632-641.

SIQUEIRA, J. F. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, 94, 2002. 281-293.

SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, 21, 1998. 557-559.

SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer - drug screening. **Journal Natl Cancer Insti**, 82, 1990. 1107-1112.

SONIS, S. T.; FAZIO, R. C.; FANG, L. **Medicina Oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989.

SOUZA, H. C. A.; BARBOSA, W. L. R.; VIEIRA, J. M. Investigação fitoquímica e isolamento de substância antibacteriana presente na espécie *Ananás erectifolius* (curauá). **Revista Científica da UFPA**, 4, 2004.

SOUZA, M. V. N.; VASCONCELOS, T. R. A. Fármacos no combate a tuberculose: passado, presente e futuro. **Química Nova**, 28, 2005. 678-682.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

TELLES, M. A. S.; MOSCA, A. Avaliação da técnica de microdiluição em placa para determinação de concentração inibitória mínima de isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. **Rev Inst Adolfo Lutz**, 59, 2000. 16-19.

TOMIOKA, H. Prospects for development os new antimycobacterial drugs. **J Infec Chemother**, 6, 2000. 8-20.

TRABULSI, L. R.; TOLEDO, M. R. F. **Microbiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1991.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitofármacos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 42, 2006. 289-306.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química moderna. **Química Nova**, 29, 2006. 326-337.

WADE, W. G. et al. Specificity of the oral microflora in dentinal caries, endodontic infections and periodontitis. **International Congress Series**, 1284, 2005. 150-157.

APÊNDICE A – MANUSCRITO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

Screening of Amazonian plants from the Adolpho Ducke forest reserve, Manaus, state of Amazonas, Brazil, for antimicrobial activity

ABSTRACT

Tropical forests are species-rich reserves for the discovery and development of antimicrobial drugs. The aim of this work is to investigate the *in vitro* antimicrobial potential of Amazon plants found within the National Institute on Amazon Research's Adolpho Ducke forest reserve, located in Manaus, state of Amazonas, Brazil. 75 methanol, chloroform and water extracts representing 12 plant species were tested for antimicrobial activity towards strains of *Mycobacterium smegmatis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* using the gel-diffusion method. Active extracts were further evaluated to establish minimum inhibitory concentrations (MIC) and antimicrobial profiles using bioautography on normal-phase thin-layer chromatography plates. *Diclinanona calycina* presented extracts with good antimicrobial activity and *S. oralis* and *M. smegmatis* were the most sensitive bacteria. *D. calycina* and *Lacmellea gracilis* presented extracts with the lowest MIC (48.8 µg/ml). *D. calycina* methanol and chloroform leaf extracts presented the best overall antimicrobial activity. All test organisms were sensitive to *D. calycina* branch chloroform extract in the bioautography assay. This is the first evaluation of the biological activity of these plant species and significant *in vitro* antimicrobial activity was detected in extracts and components from two species, *D. calycina* and *L. gracilis*.

Key words: plant extract - antibacterial - antifungal - *Diclinanona calycina* - *Lacmellea gracilis* – bioautography.

World. It occupies almost half the South American continent and is a center of biological diversity. Aside from its importance in the global ecological equilibrium and as a location of increasing ecological tourism, this region is a very rich source of species for agriculture, plant domestication and medicinal applications. Approximately 125,000 plant species are in tropical forests which continue to be a great reservoir for the discovery of new bioactive molecules and phytotherapeutic agents. However, the pharmacological potential of only about 1% of all tropical plant species has been evaluated. Also, Brazil has catalogued only about 0.4% of its flora. It is estimated that ca. 60% of all commercially available or clinical-phase antitumor and antimicrobial drugs are of natural origin (Montanari & Bolzani 2001, Gurib-Fakim 2006, Turolla & Nascimento 2006).

Despite the existence of publications on the traditional (Fenner et al. 2006, Giorgetti et al. 2007) and pharmaceutical (Moreira et al. 2006) uses of plant species found in Brazil there are still relatively few scientific studies on the

pharmacological and toxicological properties of plants from Brazil. There are also very few examples of the discovery of bioactive substances from Brazilian biodiversity which have served as prototypes for development of phytotherapeutic agents and pharmaceuticals in Brazil. Furthermore, many active substances present in native plant extracts from Brazil have still not been identified so this is an area which needs to be explored (Moreira et al. 2006). As examples of Brazilian plant-derived commercial products one should mention Ierobina®, which is used in the treatment of indigestion (Botion et al. 2005), and the anti-inflammatory phytotherapeutic agent Acheflan® (Giorgetti et al. 2007). The relatively scarce interaction between mainly public universities and companies in Brazil as well as Brazilian patent law have been drawbacks for transformation of research results into developed products and patents (Moreira et al. 2006, Giorgetti et al. 2007).

Native Amazon forest plants have been poorly studied and there are no good estimates of the number of species which have been studied or which have application to human health. The use of flora from this region has been modest in relation to its strategic value in the development of local products. Our group has been actively screening medicinal and other plants found in the Brazilian Amazon region for larvicidal and insecticidal (Pohlit et al. 2004) as well as cytotoxic (Quignard et al. 2003, Quignard et al. 2004) properties, among other biological activities.

Many plant species have demonstrated antibacterial (Koo et al. 2000, Melo et al. 2006) and antifungal (Motsei et al. 2003, Gayoso et al. 2004) properties. However, little research has focused on the evaluation of plant species for activity against microorganisms from the oral cavity (Pereira et al. 2005, Bandeira et al. 2006). This is especially true for plants from the Amazon region.

Therefore, there is a general lack of scientific investigation which can provide more realistic knowledge of the potential of Amazon biodiversity. As a means of contributing to knowledge of the pharmacological potential of the Amazon flora, the present work evaluated 12 Amazonian plant species - having no known previous pharmacological study- for in vitro antimicrobial activity in bacteria and a

fungus species associated with the human oral cavity diseases, as well as other diseases.

MATERIALS AND METHODS

Plant selection - Species identified by the Flora Project (Ribeiro et al. 1999) in the National Institute on Amazon Research's Adolpho Ducke forest reserve in Manaus, state of Amazonas, Brazil were initially contemplated for study. These plant specimens had been previously catalogued so that their botanic identities (based on voucher samples at the Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia-INPA Herbarium) and exact locations in the Ducke reserve were readily available. After a literature search, several hundred plant species for which no ethnobotanic, phytochemical, pharmacological or medicinal information were available were identified. From this larger group of plants, the 12 plant species were chosen for the purposes of this study (Table I) based on: (1) the ease of access and availability of sufficient plant materials in the Ducke reserve; and (2): their broad representative value of the local, unexplored flora (the species under study belong to 11 distinct botanic families).

Plant collection - Plants were collected between January and June 2004 in the Ducke reserve. Plant specimens were located in the field based on the Ducke reserve trail map (Flora Project 2006) and geographical coordinates were obtained from the Flora Project database. Plant materials (leaves, branches, vine or bark) were initially dried in an air-conditioned, dehumidified room, then further dried in an oven at ca. 40°C for a total of ca. seven days, and then finally ground.

Preparation of extracts - Plant methanol and chloroform extracts were prepared by continuous extraction of ground plant material in a soxhlet apparatus for 18 h (3 x 6 h) followed by rotary evaporation and freeze-drying. Water extracts were prepared by infusion followed by filtration and total evaporation of the filtrate. Extracts were stored in a freezer at -20°C.

Microorganisms used - Standardized strains from the American type culture collection (ATCC) and the Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco (DAUPE) were used in bioassays. The Gram-positive bacteria were

Mycobacterium smegmatis (ATCC 607), *Streptococcus oralis* (ATCC 10557), *Streptococcus sanguis* (ATCC 15300) and *Staphylococcus aureus* (DAUPE). The Gram-negative bacterium was *Escherichia coli* (DAUPE 224). Antifungal activity was evaluated using a clinical strain of *Candida albicans* from the collection of the Department of Parasitology, Federal University of Amazonas. Organisms were maintained at 4°C on brain heart agar (bacteria) and sabouraud (SAB) (*C. albicans*). For the antibacterial tests, organisms were grown overnight in brain heart infusion followed by incubation at 37°C. Before the test, *C. albicans* was cultured on SAB at 37°C for 48 h.

Antimicrobial susceptibility testing - Evaluation of the antimicrobial activity of plant extracts was carried out in Petri dishes using the agar diffusion method (Alves et al. 2000, Chah et al. 2006, Melo et al. 2006) by perforating the culture medium and charging each cavity with extract dissolved in dimethylsulphoxide (DMSO), ethanol or sterilized distilled water at a concentration of 50 mg/ml.

For antibacterial tests, 25 ml of Mueller Hinton (MH) culture medium was used. For antifungal tests, SAB was used (*C. albicans*). Microbial suspensions were prepared and the density was adjusted in the tube to 1 on the McFarland scale. After solidification, medium was inoculated with microbial suspension (100 µl) with the aid of a swab. After 10 min, the agar was perforated so as to yield five circular, equidistant cavities (diameter 6 mm each). An aliquot of extract (50 µl of a 50 mg/ml solution) and positive (rifampicin and nistatin) and negative (solvent blank) controls were transferred to cavities. After the incubation period (24 and 48 h) at 37°C, plates were examined and extract activity was evaluated by measurement of inhibition zone diameters (in mm). Tests were performed in triplicate and average halo diameters were determined. Rifampicin (1 mg/ml) was used as positive control for bacteria and nistatin (1 mg/ml) was used for tests involving *C. albicans*. The negative controls were DMSO, ethanol and sterilized, distilled water in accordance with the solvents used to dissolve each extract. A negative control containing culture medium was also used.

Determination of minimum inhibitory concentrations (MIC) - Extracts considered very active in the above susceptibility tests (inhibition halo > 20 mm in

the agar diffusion test) were next evaluated to determine MIC. This was carried out by dilution in solid culture medium by adapting techniques proposed by Melo et al. (2006). For the test, 35 ml of agar were prepared. MH was used for bacteria and SAB for *C. albicans*, using homogenization with 1.5 ml of the microorganism suspension having a density equal to 1 on the McFarland scale. Thirty 4 mm diameter orifices were prepared and inoculated, in triplicate, with 15 µl of each of a series of 10 dilutions of each crude extract stock solution (50 mg/ml). MICs correspond to the lowest concentration which inhibited the growth of the microorganism.

Thin-layer chromatography (TLC) - Aluminum-backed commercial TLC silica gel GF254 plates (MERCK) were used. The extracts were applied to plates and eluted with chloroform/acetone (90:10). Eluted TLC plates were observed under ambient lighting and illuminated with an ultraviolet lamp at 254 and 366 nm.

Bioautography - Active extracts were evaluated through the bioautography technique adapted from Alves et al. (2001) and Holetz et al. (2002). Briefly, microorganism culture (1 on McFarland's scale, 500 µl) and developing agent (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, 1 ml) in aqueous solution (this reagent aids in the observation of inhibition zones) were added to the culture medium (25 ml) at 50°C. After homogenization, this mixture was poured over eluted chromatograms and these were placed in Petri dishes and incubated at 37°C. Plates were observed after incubation for 24 and 48 h. Inhibition was evidenced by clear zones on the plates where no ostensible microorganism growth had occurred.

RESULTS

In the screening for antimicrobial activity, after a period of 24 h, the largest average inhibition halos resulted from the action of the methanol and chloroform extracts of *Diclinanona calycina*. *S. oralis* e *M. smegmatis* were the most sensitive organisms in this test. Of the 75 extracts evaluated for inhibitory effects on *M. smegmatis*, only ten presented negative results (no inhibition halos), while 11 allowed for the formation of inhibition halos with diameters greater than 20 mm. Extracts of *Pinus parviflora* presented slight or no activity towards the microorganisms used in testing. These and other results are presented in Table II.

Antimicrobial substances used as positive controls presented inhibition halos as expected, differing from negative controls (DMSO, water, ethanol blanks), which in general did not present inhibition halos.

This preliminary screening of all extracts permitted triage of promising antimicrobial extracts (presenting inhibition halo diameter ≥ 20 mm). 34 halos with diameters ≥ 20 mm, corresponding to 23 different extracts, were observed. Active extracts were further tested in dilution for the determination of minimum inhibition concentrations (MIC) by diffusion in solid culture medium. *D. calycina* e *Lacmella gracilis* presented the lowest MIC values (48.8 $\mu\text{g/ml}$). *D. calycina* leaf methanol and chloroform extracts presented the best inhibitory effects on *E. coli*, *S. oralis*, *S. aureus* and *S. sanguis*. *L. gracilis* branch chloroform extract presented the lowest MIC on *M. smegmatis* (48.8 $\mu\text{g/ml}$). Under the experimental conditions used, none of the eight tested extracts inhibited *C. albicans* growth (Table III).

Results of bioautography screening revealed several (mainly chloroform) extracts which exhibited inhibition zones corresponding to substances of differing polarities/retention factors (Rfs) (Table IV). *D. calycina* extracts presented the best bioautography results. All microorganisms tested in this study were sensitive to *D. calycina* branch chloroform extract and most of these microorganisms (*M. smegmatis*, *S. oralis*, *S. aureus* and *S. sanguis*) showed sensitivity to more than one chemical component of this extract. In this way, screening and MIC determinations by diffusion in agar and bioautography permitted identification of active extracts containing antibacterial components. In this way, it was observed that in screening of extracts for antimicrobial activity it can be very important to use a variety of test methods which can, as in the present case, reveal information about the most active extracts and also reveal information on the number of bioactive components.

DISCUSSION

Microorganisms selected for this study are important human oral cavity pathogens or are of interest because they represent diseases which are of interest to public health. *S. sanguis*, for example, is one of the predominant colonizers of teeth. It has been isolated from human dental plaque, tongue, saliva, root canals,

periapical and periodontal infections and it causes endocarditis. Cavities produced by *S. sanguis* occur principally in tooth fissures (Hamada & Slade 1980, Coykendall 1989, Piovano 1999, Wade et al. 2005).

E. coli is recommended as control group in antimicrobial susceptibility tests for enterobacteria. Also, *E. coli* and *S. aureus* are included among the most common agents of hospital infections and are detected in cases of meningitis and are potential respiratory pathogens (Gendron et al. 2000, Melo-Souza, 2000, Esmerino et al. 2005).

M. smegmatis is an important test model for initial, primary screening for antimycobacterial activity, which is important in the search for drugs with potential anti-tuberculosis effects. *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculosis causing agent) is usually used at a later stage for further studies. *M. smegmatis* (ATCC 607) has been employed in bioassays and is cited many times, erroneously, in many publications as *M. tuberculosis* 607. It is chosen as a model for tuberculosis since it does not present the pathogenic properties ascribed to *M. tuberculosis* and it exhibits rapid growth, in contrast to *M. tuberculosis*, with which slow growth is normally associated (Reyrat & Kahn 2001, Newton et al. 2002, Okunade et al. 2004, Pauli et al. 2005).

Several screening studies have been performed to evaluate in vitro antimycobacterial activity of plant extracts. Tosun et al. (2004), using *M. tuberculosis* H37Ra as test microorganism, and an ethnobotanic approach for plant selection, evaluated extracts from 44 plant species belonging to 17 families and found that 23 extracts inhibited growth at concentrations from 50 to 200 µg/ml. Billo et al. (2005) evaluated 22 plants (55 extracts) used in traditional medicine for treatment of symptoms potentially related to tuberculosis, representing 16 families, using *M. bovis* BCG as test organism, and found that five species exhibited activity towards this test organism.

Many plant species present inhibition zones of differing diameters, however, size difference of the inhibition zone depends primarily upon these factors: (a) diffusion capacity of substances (present in the extracts) in the agar medium, (b) antimicrobial activity of diffused substances, (c) origin of microorganisms, (d) pH of

substrates in plates, (e) density of inoculation, and (f) growth and metabolic activity of microorganisms in the medium. This suggests that inhibitory activity is not necessarily proportional to the inhibition zone diameter, especially when comparing different extracts. Inhibition zone diameter can further be associated with polarities of substances which make up the tested extracts and also with cell wall composition of test organisms since Gram-positive bacteria present cell walls with lower lipid levels than do Gram-negative bacteria (Pauli et al. 2005, Bandeira et al. 2006).

Mycobacterium cell walls have elevated levels of high molecular weight lipids. This feature of cell wall structure seems to function as a barrier to the direct absorption of polar compounds (Pauli et al. 2005) and may be responsible for the more promising results obtained in the present study for chloroform extracts which have the lowest polarity among the extracts tested.

The present study made use of simple, rapid and inexpensive techniques for in vitro evaluation of antimicrobial activity. A similar method was used in recent studies to evaluate the activity of plant extracts and fractions in strains of *S. aureus*, *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa* (Chah et al. 2006), *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans* and *S. sanguis* (Melo et al. 2006), as well as, *C. albicans* and other fungi which cause opportunistic infections (Lima et al. 2005). Alves et al. (2000), using the same method employed in the present study, namely diffusion in agar (wells were 7 mm in diameter), considered extracts with inhibition zones with diameters between 9 and 12 mm to be partially active, between 13 and 18 mm to be active, and greater than 18 mm to be very active. In the present study, extracts having inhibition zones with diameters greater than 20 mm were considered to be very active.

Bioautography revealed promising extracts from *D. calycina*. These results not only confirmed the activity of the leaf chloroform extract of this species detected in the other assays, but also revealed the antimicrobial potential of substances present in the branchwood chloroform extract, which were active in all microorganisms tested. Bioautography also revealed six extracts having components with inhibitory effects towards *C. albicans*. This activity towards *C. albicans*

observed in bioautography contrasts strikingly with the results of MIC evaluation using this same species which revealed no significant activity for any of the extracts.

A considerable difference was shown to exist in the results obtained using diffusion in agar and bioautography. For example, *L. gracillis* branch chloroform extract, which presented the lowest MIC (48.8 µg/ml) using *M. smegmatis* in the diffusion method, was inactive in bioautography. On the other hand, *D. calycina* branch chloroform extract, which presented inhibition zone diameter > 20 mm and good inhibitory activity (MIC < 97.7 µg/ml) only towards *M. smegmatis*, under bioautography conditions, presented active (growth inhibiting) substances (multiple Rfs) for all microorganisms evaluated.

Based on these results, *D. calycina* (Annonaceae) e *L. gracilis* (Apocynaceae) are promising antimicrobial plant species which need further study to reveal the identity of the antimicrobial substances present in their extracts. It should be stressed that the antimicrobial activity presented for these plant species is new information, having no basis in popular use or direct relation to previously published laboratory studies. These results contribute to the knowledge of bioactive species in the Amazon flora which, through further study, can reveal new lead compounds for drug development.

REFERENCES

- Alves TMA, Ribeiro FL, Kloos H, Zani CL 2001. Polygodial, the fungitoxic component from the brazilian medicinal plant *Polygonum punctatum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 831-833.
- Alves TMA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Smânia EFA, Smânia Jr A, Zani CL 2000. Biological screening of brazilian medicinal plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 367-373.
- Bandeira MFCL, Teixeira MFS, Abinader CD, Parente RC, Lima PSL 2006. Avaliação *in vitro* da sensibilidade da *Candida albicans* ao hidróxido de cálcio associado ao óleo de copaíba. *Rev Dentística* 6: 12-22.
- Billo M, Cabalion P, Waikedre J, Fourneau C, Bouttier S, Hocquemiller R, Fournet A 2005. Screening of some new Caledonian and Vanuatu medicinal plants for antimycobacterial activity. *J Ethnopharmacol* 96: 195-200.

Botion LM, Ferreira AVM, Côrtes SF, Lemos VS, Braga FC 2005. Effects of the Brazilian phytopharmaceutical product Ierobina® on lipid metabolism and intestinal tonus. *J Ethnopharmacol* 102: 137-142.

Chah KF, Eze CA, Emuelosi CE, Esimone CO 2006. Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some nigerian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 104: 164-167.

Corrêa MP 1984. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, Vol. 6, Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Imprensa Nacional, Brasília, 777 pp.

Coykendall AL 1989. Classification and identification of the viridans Streptococci. *J Ethnopharmacol* 2: 315-328.

Esmerino LA, Pereira AV, Schelesky ME 2005. Doseamento da potência da ciprofloxacina em comprimidos orais. *Rev Bras Farm* 86: 17-20.

Fenner R, Betti AH, Mentz LA, Rates SMK 2006. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Braz J Pharm Sci* 42: 369-394.

Flora Project 2006. Available from: <http://curupira.inpa.gov.br/projetos/duckel/index.html> [cited 2006 Dec 15].

Gayoso CW, Lima EO, Souza EL, Trajano VN, Pereira FOE, Lima IO 2004. Ação Inibitória do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume, α -pineno e β -pineno sobre fungos isolados de onicomiose. *J Bras Fitomed* 2: 25-29.

Gendron R, Grenier D, Maheu-Robert L 2000. The oral cavity as a reservoir of bacterial pathogens for focal infections. *Microbes Infect* 2: 897-906.

Giogetti M, Negri G, Rodrigues E 2007. Brazilian plants with possible action on the central nervous system - a study of historical sources from the 16th to 19th century. *J Ethnopharmacol* 109: 338-347.

Gurib-Fakim G 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med* 27: 1-93.

Hamada S, Slade H 1980. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 44: 331-384.

Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP 2002. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infections diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 1027-1031.

Koo H, Gomes BPFA, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Park YK, Cury JA 2000. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch Oral Biol* 45: 141-148.

Lima IO, Araújo R, Oliveira RAG, Lima EO, Souza EL, Farias NP, Navarro DF 2005. Inhibitory effect of some phytochemicals in Antimicrobial Amazonian s

pecies the growth of yeasts potentially causing opportunistic infections. *Braz J Pharm Sci* 41: 199-203.

Melo AFM, Santos EJV, Souza LFC, Carvalho AAT, Pereira MSV, Higino JS 2006. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Anacardium occidentale* L. sobre espécies de *Streptococcus*. *Rev Bras Farmacogn* 16: 202-205.

Melo-Souza SE 2000. *Tratamento das Doenças Neurológicas*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 849 pp.

Montanari CA, Bolzani VS 2001. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Quím Nova* 24: 105-111.

Moreira AC, Müller ACA, Pereira Jr N, Antunes MAS 2006. Pharmaceutical patents on plant derived materials in Brazil: policy, law and statistics. *World Patent Inf* 28: 34-42.

Motsei ML, Lindsey KL, Staden JE, Jäger AK 2003. Screening of traditionally used African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. *J Ethnopharmacol* 86: 235-241.

Newton SM, Lau C, Gurucha SS, Besra GS, Wright CW 2002. The evaluation of forty-three plant species for in vitro antimycobacterial activities; isolation of active constituents from *Psoralea corylifolia* and *Sanguinaria canadensis*. *J Ethnopharmacol* 79: 57-67.

Okunade AL, Elvin-Lewis PF, Lewis WH 2004. Natural antimycobacterial metabolites: current status. *Phytochemistry* 65: 1017-1032.

Pauli GF, Case RJ, Inui T, Wang Y, Cho S, Fischer NH, Franzblau SG 2005. New perspectives on natural products in TB drug research. *Life Sci* 78: 485-494.

Pereira JV, Bergamo DCB, Pereira JO, França SC, Pietro RCLR, Souza-Silva YTC 2005. Antimicrobial activity of *Arctium lappa* constituents against microorganisms commonly founding endodontic infections. *Braz Dent J* 16: 192-196.

Piovano S 1999. Bacteriology of most frequent oral anaerobic infections. *Anaerobe* 5: 221-227.

Pohlit AM, Quignard ELJ, Nunomura SM, Tadei WP, Hidalgo AF, Pinto ACS, Santos EVM, Moraes SKR, Saraiva RCG, Ming LC, Alecrim AM, Ferraz AB, Pedroso ACS, Diniz EV, Finney EK, Gomes EO, Dias HB, Souza KS, Oliveira LCP, Don LC, Queiroz MMA, Henrique MC, Santos M, Lacerda Júnior OS, Pinto PS, Silva SG, Graça YR 2004. Screening of plants found in the State of Amazonas, Brazil for larvicial activity against *Aedes aegypti* larvae. *Acta Amazônica* 34: 97-105.

Quignard ELJ, Nunomura SM, Pohlit AM, Alecrim AM, Pinto ACS, Portela CN, Oliveira LCP, Don LC, Silva LFR, Henrique MC, Santos M, Pinto PS, Silva SG

2004. Median Lethal Concentrations of Amazonian Plant Extracts in the Brine Shrimp Assay. *Pharm Biol* 42: 253-257.

Quignard ELJ, Pohlit AM, Nunomura SM, Pinto ACS, Santos EVM, Moraes SKR, Alecrim AM, Pedroso ACS, Cyrino BRB, Melo CS, Finney EK, Gomes EO, Souza KS, Oliveira LCP, Don LC, Silva LFR, Queiroz MMA, Henrique MC, Santos M, Pinto OS, Silva SG 2003. Screening plants found Amazonas state for lethality towards brine shrimp *Artemia franciscana*. *Acta Amazônica* 33: 93-104.

Reyrat JM, Kahn D 2001. *Mycobacterium smegmatis*: an absurd model for tuberculosis? *Trends Microbiol* 9: 472-473.

Ribeiro JELS, Hopkins MJG, Vicentini A, Sothers CA, Costa MAS, Brito JM, Souza MAD, Martins LHP, Lohmann LG, Assunção PACL, Pereira EC, Silva CF, Mesquita MR, Procópio LC 1999. *Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central*, INPA, Manaus, 816 pp.

Silva MF, Lisbôa PLB, Lisbôa RCL 1977. *Nomes Vulgares de Plantas Amazônicas*, INPA, Belém, 222 pp.

Tosun F, Kizilay ÇA, Sener B, Vural M, Palittapongarnpim P 2004. Antimycobacterial screening of some Turkish plants. *J Ethnopharmacol* 95: 273-275.

Turolla MSR, Nascimento ES 2006. Informações toxicológicas de alguns fitofármacos utilizados no Brasil. *Rev Bras Cien Farm* 42: 289-306.

Wade WG, Munson MA, Lillo A, Weightman AJ 2005. Specificity of the oral microflora in dentinal caries, endodontic infections and periodontitis. *Int Congr Ser* 1284: 150-157.

Financial support: PPG-7/CNPq (557106/2005-2), PPBio/MCT/INPA
+ Corresponding author: ampohlit@inpa.gov.br
Received 15 May 2007