



ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA

PERLA ALVES DA SILVA

ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS
DE *Minquartia guianensis* AUBL. (OLACACEAE)

MANAUS
2018

PERLA ALVES DA SILVA

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS
DE *Minquartia guianensis* AUBL. (OLACACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cecília Veronica Nunez

MANAUS
2018

PERLA ALVES DA SILVA

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS
DE *Minquartia guianensis* AUBL. (OLACACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data da aprovação 28/03/2018

Banca Examinadora:

Dra. Márcia Rubia Silva Melo
Universidade do Estado do Amazonas - UEA

Dra. Waldireny Caldas Rocha
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Dra. Cecília Veronica Nunez
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

MANAUS
2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

S586e	<p>Silva, Perla Alves da Estudo químico e avaliação da atividade biológica de extratos de <i>Minquartia guianensis</i> AUBL. (Olacaceae) / Perla Alves da Silva. Manaus : [s.n], 2018. 75 f.: color.; 31 cm.</p> <p>Dissertação - PGSS - Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2018. Inclui bibliografia Orientador: Nunez, Cecilia Veronica</p> <p>1. extratos. 2. angiogênese . 3. antimicrobiano. I. Nunez, Cecilia Veronica (Orient.). II. Universidade do Estado do Amazonas. III. Estudo químico e avaliação da atividade biológica de extratos de <i>Minquartia guianensis</i> AUBL. (Olacaceae)</p>
-------	--

À Deus e à minha família.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois sem Ele nada é possível.

À minha família, meus pais Manoel Pedro e Pastora e minhas irmãs Paty, Raisal e Bia, pelo amor, compreensão e apoio em minhas decisões mesmo sem entender bem o que faço.

À minha orientadora, Prof^a. Cecilia Veronica Nunez, por ter me aceito como sua aluna, pelos ensinamentos, sugestões e críticas durante todo o trabalho.

Aos meus amigos do laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia, Maria Izabel, Laura, Wyrvir, André, Fábio, Ju, Lorena, Daniel, Rannier pelo apoio e ajuda durante todo o trabalho.

À Dra. Nádia pela sua ajuda inestimável nos ensaios.

À Me. Maria Teresa, pela ajuda durante toda a pesquisa, experimentos do laboratório e pela sua amizade.

À Me. Tais Guimarães pelo auxílio, contribuição e disponibilidade de troca de conhecimento durante todo este processo, e por ter conseguido um tempo para ensinar, ajudar, acrescentar, e por ter dado a oportunidade de conhecê-la como pessoa e amiga;

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da UEA.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da UEA.

À FAPEAM pelo auxílio financeiro.

A todos, que de uma forma direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

As plantas produzem uma grande variedade de substâncias que podem ser usadas para gerar medicamentos. Entre as espécies de ocorrência na Amazônia encontra-se a *Minqartia guianensis*. Resultados anteriores estimularam novas investigações químicas e a avaliação de novas atividades biológicas com esta espécie. Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar o estudo químico dos extratos metanólicos dos galhos da 1ª e da 2ª coleta e avaliar os extratos quanto às atividades de toxicidade frente à *Artemia salina*, antibacteriana, antifúngica, angiogênica e antimalárica. Assim, os materiais vegetais (galhos e folhas) foram secos, moídos e extraídos com diclorometano, metanol e água destilada. Como resultados obtidos, os extratos foram ativos sobre a *Artemia salina* (100% de mortalidade na concentração na concentração de 1000 µg/mL). Quanto a atividade antibacteriana testada pela metodologia de microdiluição, o extrato metanólico dos galhos apresentou uma concentração inibitória mínima (CIM) de 1000 µg/mL frente às bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Em relação à atividade antifúngica das fases do extrato metanólico dos galhos, a fase hidrometanólica apresentou CIM de 200 µg/mL e 800 µg/mL contra *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*, respectivamente e a fase de acetato de etila apresentou CIM de 400 µg/mL frente *C. albicans*. Todos os extratos testados, exceto o extrato dicloromêtanico das folhas apresentaram atividade antimalárica. Todos os extratos apresentaram atividade antiangiogênica, tendo destaque o potencial do extrato aquoso das folhas.

Palavras-chave: Atividades biológicas; antimicrobiano; angiogênese; antimalárico.

Abstract

Plants produce a wide variety of substances that can be used to generate drugs. Among the species of occurrence in the Amazon is *Minquartia guianensis*. Previous results stimulated new chemical investigations and the evaluation of new biological activities with this species. Therefore, the aim of this study was the chemical study of the methanol extracts of the 1st and 2nd branches collect and to evaluate the extracts for the activities of toxicity against *Artemia salina*, antibacterial, antifungal, angiogenic and antimalarial. Thus, the plant material (branches and leaves) were dried, grounded and extracted with dichloromethane, methanol and distilled water. As results obtained, the extracts were active on *Artemia salina* (100% mortality in concentration at the concentration of 1000 µg / mL). As for the antibacterial activity tested by the microdilution methodology, the methanolic extract of the branches had a minimum inhibitory concentration (MIC) of 1000 µg / mL against the bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. In relation to the antifungal activity of the phases of the methanolic extract of the branches, the hydromethanolic phase presented MICs of 200 µg / mL and 800 µg / mL against *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*, respectively, and the ethyl acetate phase had a MIC of 400 µg / mL against *C. albicans*. All the extracts tested, except the dichloromethane extract of the leaves presented antimalarial activity. All the extracts showed antiangiogenic activity, being higher the potential of the aqueous extract of the leaves.

Keywords: Biological activities; antimicrobial; angiogenesis; antimalarial.

Lista de Tabelas

Referencial Teórico

Quadro 01: Plantas medicinais e suas atividades farmacológicas.....	04
Quadro 02: Sinopse da Família Olacaceae no Brasil.....	15
Quadro 03: Substâncias isoladas da família Olacaceae.....	15
Quadro 04: Substâncias isoladas da <i>M. guianensis</i>	20

Capítulo II

Tabela 01: Resultado do ensaio de toxicidade sobre <i>Artemia salina</i>	53
Tabela 02: Resultado da avaliação antibacteriana.....	54
Tabela 03: Resultado da avaliação da atividade antifúngica das fases.....	54
Tabela 04: Resultado da avaliação antimalárica.....	56

Lista de Figuras

Referencial Teórico

Figura 01: Salicilina e ácido acetilsalicílico	5
Figura 02: Rota biossintética do metabolismo primário e secundário	7
Figura 03: Quinina	13
Figura 04: Artemisinina	13
Figura 05: Distribuição mundial da família Olacaceae	14
Figura 06: Foto da <i>M. guianensis</i> .	17
Figura 07: Distribuição geográfica de <i>Minquartia guianensis</i> no Mundo	18
Figura 08: Distribuição geográfica de <i>Minquartia guianensis</i> no Brasil.	18

CAPÍTULO I

Figura 01: Imagem de satélite da reserva A. Ducke	34
Figura 02: Fluxograma dos fracionamentos	38
Figura 03: Análise da Fração 9 em CCDC reveladas com NP/PEG	39
Figura 04: Análise da Fração 9 em CCDC revelada com $Ce(SO_4)_2$	39
Figura 05: Análise das frações 7-9 em CCDC reveladas com anisaldeído	39
Figura 06: Análise das frações 5-7 em CCDC reveladas com NP/Peg	40
Figura 07: Análise da fração 11 em CCDC reveladas com $FeCl_3$	41
Figura 08: Análise da fração 12 em CCDC revelada com $FeCl_3$	41

CAPÍTULO II

Figura 01: Metodologia da extração	47
Figura 02: Ensaio de toxicidade	48
Figura 03: Atividade Antiangiogênica apresentado pelo extrato Folha DCM	57
Figura 04: Atividade Antiangiogênica apresentado pelo extrato Galho DCM	58
Figura 05: Atividade Antiangiogênica apresentado pelo extrato Galho MeOH	58
Figura 06: Atividade Antiangiogênica apresentado pelo extrato Folha MeOH	60
Figura 07: Atividade Antiangiogênica apresentado pelo extrato Folha	60

H₂O

Gráfico 01: Atividade antiangiogênica do extrato folha MeOH	57
Gráfico 02: Atividade antiangiogênica do extrato galho MeOH	58
Gráfico 03: Atividade antiangiogênica do extrato folha DCM	59
Gráfico 04: Atividade antiangiogênica do extrato galho DCM	59
Gráfico 05: Atividade antiangiogênica do extrato folha H ₂ O	60
Gráfico 06: Atividade antiangiogênica do extrato galho H ₂ O	61

Lista de abreviaturas

AcOEt – Acetato de etila

CCDC – Cromatografia em camada delgada comparativa

CIM – Concentração inibitória mínima

CMB – Concentração mínima bactericida

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

DCM - Diclorometano

DMSO - Dimetilsulfóxido

HPLC – High performance liquid chromatography

MeOH – Metanol

NP/PEG – Difenilboriloxietilamina / Polietilenoglicol

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RPMI – Meio Roswell Park Memorial Institute

SUMÁRIO

1. Introdução	13
2. Referencial teórico	14
2.1. Plantas medicinais	14
2.2 Metabólitos secundários	16
2.3 Atividade de toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	18
2.4. Atividade antimicrobiana	19
2.4.1 Atividade bacteriana.....	20
2.4.4 Atividade antifúngica	20
2.5 Atividade antimalárica	21
2.7 Família Olacaceae	24
2.8 <i>Minquartia guianensis</i>	27
2.8.1 Estudos químicos com <i>Minquartia guianensis</i>	29
2.8.2 Atividades biológicas da <i>Minquartia guianensis</i>	32
3. Objetivos	34
3.1 Geral	34
3.2 Específicos.....	34
4. Referências	35
CAPÍTULO I	42
Introdução	43
2. Material e métodos	44
2.1 Coleta e identificação do material vegetal.....	44
2.2 Preparo dos extratos vegetais	44
2.3 Preparação dos reveladores utilizados na análise de cromatografia em camada delgada	45
2.4 Cromatografia em camada delgada.....	45
Resultados e discussão	46
Fracionamento dos extratos metanólicos dos galhos da 1º coleta	46
Fracionamento do extrato metanólico dos galhos da 2º coleta.....	47
Conclusão	51

Referências	52
CAPÍTULO II	53
Introdução	54
2. Material e métodos	55
2.1 Coleta e identificação do material vegetal.....	55
2.2 Preparo dos extratos vegetais	55
2.3 Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	56
2.4 Atividade antibacteriana.....	57
2.4.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	58
2.4.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM)	58
2.5 Atividade Antifúngica.....	58
2.6 Atividade antimalárica	59
2.7 Atividade antiangiogênica utilizando o método da membrana corioalantóica embrionária (CAM).....	60
Resultados e discussão	61
Resultado do ensaio sobre a <i>Artemia salina</i>	61
Avaliação antibacteriana	62
Avaliação de atividade antifúngica das fases.....	63
Ensaio antimalárico.....	64
Ensaio da atividade antiangiogênica.....	65
Referências	71

1.Introdução

O termo biodiversidade refere-se à diversidade biológica para designar a variedade de formas de vida em todos os níveis, desde microrganismos, flora e fauna até a espécie humana (ALHO, 2012). O Brasil possui uma variedade de ecossistemas e possui a maior cobertura de florestas tropicais do mundo, contendo quase 65% da região amazônica, considerado o ecossistema de maior diversidade (SILVA, 2012). Contudo, grande parte da flora amazônica permanece desconhecida do ponto de vista químico. De acordo com Cardoso e colaboradores (2017), apenas na porção brasileira da região amazônica, há cerca de 10.674 espécies de plantas (entre angiospermas e gimnospermas), e a maioria destas ainda não foi estudada.

Por essa razão, torna-se cada vez mais relevante o trabalho de bioprospecção para a compreensão desse bioma. Com os atuais métodos de bioprospecção e biotecnologia é possível, em prazos cada vez menores, descobrir novas substâncias e desenvolver novos bioprodutos agregando dessa forma valor à biodiversidade (ASTOLFI FILHO,SILVA e BIGI, 2014; BOLZANI, 2016).

As plantas são uma importante fonte de substâncias farmacologicamente ativas e seu uso como medicamento tem uma longa história no tratamento de várias doenças. Em vista disso, pesquisas com plantas usadas na medicina popular têm sido crescentes, motivadas pela sua utilização bem sucedida por grande parte da comunidade (VEERESHAM, 2012; BORSATO e FEIDEN, 2011). A interação entre plantas e seus predadores naturais pode ser usada como suporte para a descoberta de substâncias com atividade específica e como consequência, orientar as investigações farmacológicas. Para sobreviver e competir por espaço, as plantas desenvolveram formas de defesa ao ataque de herbívoros e patógenos, por esta razão, ao longo de milhões de anos criaram verdadeiras armas químicas, sendo este, um dos motivos pelos quais as plantas apresentam constituição molecular tão complexa (BRAZ FILHO, 2010; FERREIRA e PINTO, 2010).

Minquartia guianensis é uma espécie pertencente à família Olacaceae, encontrada em diversas regiões do Brasil como Norte, Nordeste e Centro-Oeste (ROSSI, 2016). O presente trabalho tem como objetivo aprofundar o estudo químico e avaliar as atividades biológicas dos extratos de *M. guianensis*, quanto à toxicidade sobre *Artemia salina*, atividade antimicrobiana, angiogênica e antimalárica.

2. Referencial teórico

2.1. Plantas medicinais

Plantas medicinais são aquelas que possuem em um ou em vários de seus órgãos substâncias utilizadas com finalidade terapêutica, as quais são conhecidas como princípio ativo, estes incluem alcaloides, flavonoides, taninos, cumarinas, óleos essenciais, entre outros (CARVALHO, 2015). Na tabela abaixo, podemos observar algumas espécies de plantas e suas atividades farmacológicas.

Quadro 01: Plantas medicinais e suas atividades farmacológicas

Família	Espécie	Ação
Fabaceae	<i>Abrus precatorius</i>	Afrodisíaco
Acanthaceae	<i>Adhatoda vasica</i>	Espasmolítico
Rosaceae	<i>Agrimonia eupatoria</i>	Antihelmíntico
Apiaceae	<i>Ammi visnaga</i>	Antiasmático
Asteraceae	<i>Artemisia absinthium</i>	Vermicida
Apocynaceae	<i>Aspidosperma quebr. Blanco</i>	Respiroestimulante
Solanaceae	<i>Atropa belladonna</i>	Bloqueio de colinérgicos
Asteraceae	<i>Baccharis sp.</i>	Anti-inflamatório
Nyctaginaceae	<i>Boerhavia diffusa</i>	Diurético
Fabaceae	<i>Caesalpinia crista</i>	Antipirético
Fabaceae	<i>Cassia fistula</i>	Laxante
Solanaceae	<i>Datura stramonium</i>	Alucinógeno
Winteraceae	<i>Drimys winteri</i>	Fungicida
Droseraceae	<i>Drosera sp.</i>	Proteolítico
Asteraceae	<i>Eclipta alba</i>	Hepatoprotetor
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia antiquorum</i>	Antihelmíntico
Asteraceae	<i>Gnaphalium sp.</i>	Anti-inflamatório
Apocynaceae	<i>Holarrhena antidysenterica</i>	Amebicida, anestésico, hipotensivo, vasodilatador
Phyllanthaceae	<i>Phyllanthus niruri</i>	Antisséptico

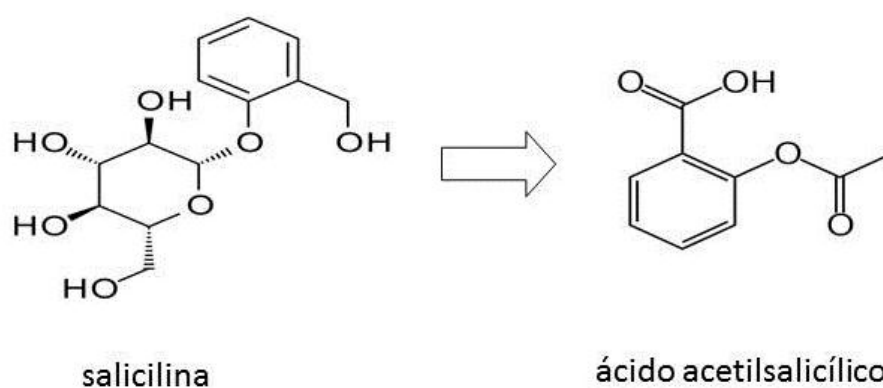
Myrtaceae	<i>Psidium guajava</i>	Espasmolítico
Asteraceae	<i>Montanoa spp</i>	Contraceptivo
Taxaceae	<i>Taxus brevifolia</i>	Antitumoral

Fonte: MALIK et al., 2012.

A data exata da obtenção de conhecimentos sobre o uso de plantas medicinais e outros produtos naturais é incerta. Na literatura histórica, há relatos nos quais o homem primitivo poderia ter começado a usar ervas locais para aliviar dores e lesões acidentalmente ou com base na superstição, como também por instinto ou na sorte (DHAMI, 2013) e ainda hoje, existem comunidades carentes e isoladas, onde esta modalidade de tratamento é a única alternativa terapêutica. Como por exemplo, podemos citar o ambiente amazônico, onde devido às grandes distâncias dos centros urbanos, a dificuldade de comunicação e de deslocamento, torna o tratamento convencional inviável. Porém, a facilidade de acesso aos produtos naturais em conjunto com o conhecimento obtido dos ancestrais, torna o uso de plantas um hábito comum no meio popular e um indicativo da atividade biológica destas (HARAGUCHI e CARVALHO, 2010).

Seja qual for a razão, é inegável a contribuição das plantas como fonte de fitofármacos ou de substâncias que servem de protótipos para novos fármacos e/ou fitoterápicos para a indústria farmacêutica (CRUZ et al., 2012). Podemos citar como exemplo, o ácido acetilsalicílico (Aspirina[®]) (Figura 01), o primeiro fármaco oriundo de uma planta (*Salix alba*) e que foi sintetizado pela indústria farmacêutica em 1839, o qual teve como protótipo a salicilina (BRAGA e CASTINHO, 2011).

Figura 01: Estrutura química da Salicilina (1) e do ácido acetilsalicílico (2)



Atualmente, há um crescente interesse pela fitoterapia, devido à crença de que poderá gerar produtos com preços baixos e com poucos efeitos colaterais

(MALIK et al., 2012). BRAZ filho (2010) cita os fatores que destacam o potencial das plantas brasileiras na descoberta de novos fármacos, que são estes: a facilidade de coleta, a biodiversidade estrutural de substâncias orgânicas naturais e a possibilidade de descoberta de princípios ativos entre tais constituintes químicos.

2.2 Metabólitos secundários ou especiais

A vida dos organismos é assegurada e controlada pelas transformações químicas realizadas pelos metabolismos primário e secundário ou especial (BRAZ Filho, 2010).

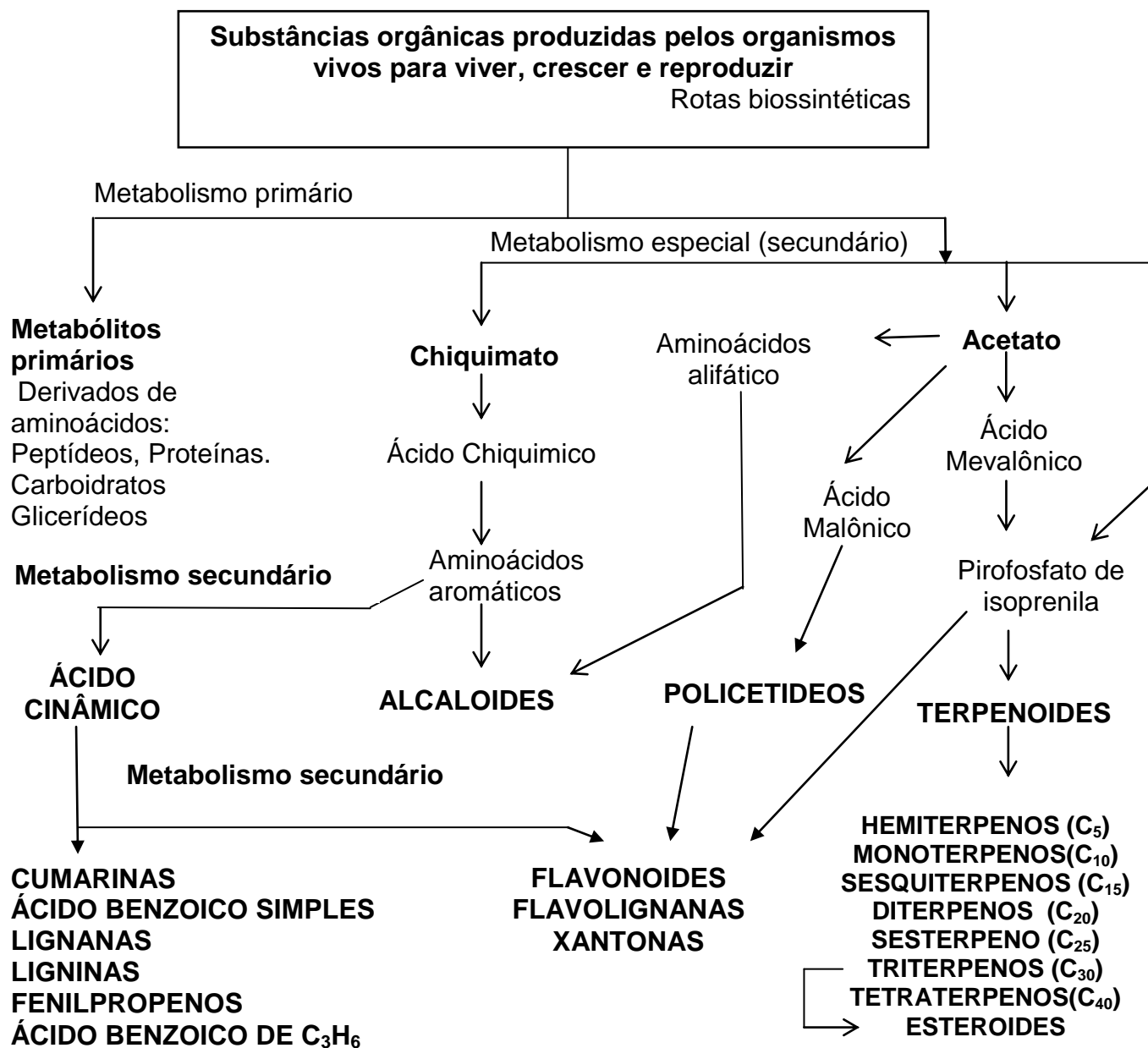
Os metabólitos primários são substâncias produzidas por todos os seres vivos e estão diretamente envolvidos no crescimento, desenvolvimento ou reprodução. Os metabólitos secundários ou especiais estão envolvidos na relação entre os seres vivos e o meio ambiente. Os metabólitos secundários vegetais destacam-se na área da farmacologia principalmente devido a seus efeitos biológicos. Muitos desses têm se mostrado agentes antibacterianos e/ou antifúngicos, antitumorais, agentes antiparasitários, herbicidas dentre outros (PEREIRA e CARDOSO, 2012; VAISHNAV e DEMAIN, 2010).

Como exemplo de metabólitos secundários com propriedades farmacológicas podemos citar o alcaloide ibogaína, isolado de *Tabernanthe iboga* (Apocynaceae), predominante nesta espécie cujo extrato hidroalcoólico era largamente empregado por tribos nativas da África, que conheciam suas propriedades alucinógenas e a utilizavam para reduzir a fadiga e a fome. Podemos citar também o diterpeno, colforsina, isolado da planta indiana *Coleus forskohlii* (Labiatae), que apresenta acentuada atividade inotrópica positiva e vasodilatadora (BARREIRO e BOLZANI, 2009).

Como essas substâncias são produzidas ante os estímulos provocados pelo ambiente, fatores como sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, nutrientes, dentre outros, podem influenciar na produção e no conteúdo de metabólitos secundários (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Conhecer esses fatores é essencial para definir as condições e os períodos de coleta, onde períodos distintos podem significar concentrações diferenciadas de substâncias bioativas (PAVARINI et al., 2012).

Essas substâncias geralmente pertencem a uma dessas três classes químicas: terpenos, substâncias fenólicas e alcaloides (Figura 02) (ADEYEMI, 2011).

Figura 02: Rota biossintética do metabolismo primário e secundário ou especial



Fonte: BRAZ FILHO, 2010.

Os terpenos, também chamados de “alcenos naturais” são hidrocarbonetos insaturados com uma dupla ligação carbono-carbono. Porém, quando esses apresentam um átomo de oxigênio, são chamados de terpenoides, e representam uma das classes de substâncias de origem vegetal das mais diversificadas (FELIPE e BICAS, 2017). O nome terpenoide ou terpeno, deriva do fato de que os primeiros membros da classe foram isolados da terebentina (terpentin em alemão). Os

terpenos são formados através da condensação sucessiva de difosfato de isopentenila ou difosfato de dimetilalila e assim originando a todos os terpenos (VIZZOTTO, KROLOW e WEBER, 2010).

As substâncias fenólicas também estão amplamente distribuídas no reino vegetal e por isso são facilmente encontradas em alimentos, o que proporciona vantagens à nossa saúde, devido apresentar propriedades antioxidantes, prevenindo doenças degenerativas que possuem alta ocorrência na população (ACHKAR, et al. 2013). Dentro desses destacam-se os flavonoides que são pigmentos amplamente difundidos em plantas, fazem parte da nossa dieta e auxiliam na prevenção das doenças crônicas. Esses formam um grande grupo de substâncias bioativas, possuindo cerca de 4000 substâncias, possuem um esqueleto contendo 15 carbonos, organizados como C₆-C₃-C₆, com diferentes substituições. São derivados biossinteticamente de fenilalanina oriundos da via mista (BIRT e JEFFERY, 2013; Merken e Beecher, 2000; SIMÕES et al.,2017)

O uso terapêutico de flavonoides também é vasto, como exemplo, podemos citar o medicamento Daflon[®], composto por diosmina e por flavonoides expressos em hesperidina. O medicamento atua no sistema vascular, aumentando a velocidade de circulação do sangue nas veias, normalizando a permeabilidade capilar e reforçando a resistência capilar na microcirculação e aumentando a drenagem linfática. Também é responsável por atenuar a intensidade da dor, reduzir e acelerar a reabsorção dos hematomas e edemas e melhorar os sintomas relacionados à doença venosa crônica (DAFLON, 2016).

Os alcaloides são um grupo grande e diverso de metabólitos secundários que possui uma ampla gama de atividades biológicas de grande importância para plantas, animais e seres humanos. As principais funções dos alcaloides podem diferir nas várias espécies de plantas e seus perfis metabólicos podem ser vinculados a fatores ambientais específicos e a sinais de desenvolvimento, muitas vezes conferindo um valor adaptativo (MATSUURA e FETT-Neto, 2015).

2.3 Atividade de toxicidade frente à *Artemia salina*

Apesar de muitas plantas apresentarem propriedades terapêuticas é necessário cautela em seu uso. Por consequência, os ensaios de toxicidade são amplamente utilizados para avaliar o potencial de toxicidade de extratos vegetais (HAMIDI, JOVANOVA e PANOVSKA, 2014). O teste de letalidade com *Artemia*

salina, desenvolvido por Meyer e colaboradores (1982) pode ser usado como uma ferramenta simples para orientar a triagem e fracionamento de extratos de plantas ativas, onde uma das mais simples respostas biológicas para monitorar é a letalidade, uma vez que existe apenas um critério: vivo ou morto (MONTANHERZ et al., 2002).

A principal razão pelo qual a *A. salina*, crustáceo anostraca de água salgada, seja amplamente utilizada para testes de toxicidade de extratos de produtos naturais, é relação custo/benefício, como a facilidade de execução do ensaio e a disponibilidade comercial de ovos dormentes (cistos) a um baixo custo, pois estes são colhidos em grandes quantidades em lagos de sal. As larvas eclodidas de cistos são usadas em todo o mundo na aquicultura e na aquariologia como alimentos para peixes juvenis. Ovos de *A. salina* dormentes permanecem viáveis por muitos anos e desta forma, são uma adequada fonte biológica, rápida, simples e pouco dispendiosos para bioensaios (MAYORGA et al., 2010).

2.4. Atividade antimicrobiana

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o aparecimento da resistência antimicrobiana é uma consequência da utilização indiscriminada de antibióticos. Esses são essenciais para curar algumas infecções, mas o seu uso indevido ocorre de forma significativa em grande parte do mundo, geralmente sob a forma de uso abusivo e desnecessário, o que aumenta a pressão seletiva sobre as bactérias para que desenvolvam resistência (OMS, 2012).

A disseminação de microrganismos resistentes é uma grande ameaça às terapias bem-sucedidas. Há uma necessidade urgente de novas substâncias, as quais devem possuir diversas estruturas químicas e atuar por diferentes mecanismos de ação. Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos e direcionados à descoberta de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos vegetais e outros produtos naturais, com o intuito de descobrir substâncias com atividade similar à das tradicionais utilizadas, contudo, com uma menor toxicidade, mais eficazes contra a resistência de microrganismos patogênicos e com menor impacto ambiental (BONA et al., 2014)

Como exemplo, podemos citar o carvacrol, monoterpene fenólico encontrado em algumas plantas, que é uma molécula versátil com potenciais perspectivas em diferentes campos biológicos e representa um bom agente antimicrobiano (NOSTRO

e PAPALIA, 2012).

Um levantamento realizado por Newman e Cragg (2016) sobre a busca por novos agentes antimicrobianos, das 140 drogas antibacterianas aprovadas no período 1981-2014, 82 são provenientes de produtos naturais e /ou derivados que imitam produtos naturais. E das 136 drogas antifúngicas aprovadas no mesmo período, apenas 3 são derivadas de produtos naturais.

2.4.1 Atividade bacteriana

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria extremamente resistente, e grande maioria das pessoas com infecções por esta bactéria possuem imunidade baixa, enquanto que indivíduos saudáveis possuem mecanismos múltiplos para resistir a infecção. Exemplos de pessoas vulneráveis são os diabéticos e os idosos, os quais se tornam suscetíveis a infecções por *K. pneumoniae* (PACZOSA e MECSAS, 2016).

Outra bactéria de interesse clínico é a *Escherichia coli*, que é uma bactéria que normalmente vive nos intestinos de pessoas e animais. A maioria das *E. coli* são inofensivas e na verdade são uma parte importante de um trato intestinal humano saudável, no entanto, algumas são patogênicas (CDC, 2017).

Já os *Estafilococos* são as bactérias não esporuladas mais resistentes do meio ambiente, apesar dos antimicrobianos existentes, da melhora das condições sanitárias e das medidas de controle de infecção hospitalar, este microrganismo continua a ser um dos mais importantes patógenos para o homem, como exemplo podemos citar o *Staphylococcus epidermidis*, causador de infecções de cateteres e próteses (VON NOWAKONSKI e MAMIZUKA, 2013).

Outra bactéria de também grande interesse é a *Pseudomonas aeruginosa*, notória por sua capacidade de adquirir resistência aos antibióticos, e por seus diversos mecanismos de resistência. As taxas de mortalidade por pneumonia pela *P. aeruginosa*, torna a terapia particularmente desafiadora (SUN et al., 2011).

2.4.4 Atividade antifúngica

A criptococose é uma micose sistêmica causada por *Cryptococcus neoformans*, e ocorre em pacientes com deficiência da imunidade celular. Com o aparecimento da AIDS (Síndrome da imunodeficiência adquirida), a incidência de

criptococose aumentou, sendo essa uma das infecções oportunistas que definem um caso de AIDS (PAPPALARDO; MELHEM, 2003). Os riscos de criptococose em pacientes imunossuprimidos por razões diferentes do HIV/AIDS também têm sido de crescente interesse. O espectro desses grupos de pacientes é diverso e inclui pacientes com defeitos de células T, hipogamaglobulinemia, receptores de transplante e condições auto-imunes, como sarcoidose e lúpus eritematoso sistêmico (CHANG e SHARON, 2016).

C. neoformans e *Candida albicans* são dois dos mais importantes fungos humanos patogênicos. O *C. neoformans* é um saprófito do solo com distribuição mundial. *C. gattii* é um fungo que vive no meio ambiente em muitas áreas tropicais e subtropicais do mundo. Tanto os seres humanos como os animais são suscetíveis a *C. gattii* e em algumas circunstâncias, os animais podem ser sentinelas da doença humana. O *C. albicans* é um comensal no trato digestivo humano e na pele. Apesar destas diferenças, esses dois microrganismos são causas comuns de infecções sistêmicas graves na vasta população de imunodeprimidos (CHEN, MEYER e SORRELL, 2014; NICOLA et al., 2012).

A incidência de criptococose cresceu junto com a pandemia do vírus da imunodeficiência humana (HIV), mas seu tratamento depende fortemente dos recursos médicos disponíveis em regiões específicas. Na era da terapia com anti-retrovirais altamente ativa, o tratamento da criptococose tornou-se uma mistura de regimes antifúngicos estabelecidos, juntamente com o tratamento agressivo da doença subjacente (PERFECT et al., 2010). O diagnóstico e o tratamento prévios da criptococose, bem como novas opções de terapias antifúngicas são necessárias (CHANG e SHARON, 2016). Em um estudo sobre a caracterização da criptococose no estado do Amazonas determinou-se que os pacientes mais afetados pela criptococose eram homens, jovens (16-30 anos), HIV-positivo e habitantes da zona leste da cidade de Manaus (SILVA et al., 2012).

2.5 Atividade antimalárica

A malária é um grave problema de saúde pública mundial, sendo uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida ao homem por fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*, produzindo febre precedida de calafrios, seguida de sudorese profusa, fraqueza e cefaleia, que ocorrem em

padrões cíclicos, dependendo da espécie de plasmódio infectante, além de outros sintomas (BRASIL, 2009; 2014).

Cinco espécies de protozoários do gênero *Plasmodium* podem causar a malária humana: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. No Brasil, há três espécies associadas à malária em seres humanos: *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. O mais agressivo é o *P. falciparum*, que se multiplica rapidamente na corrente sanguínea, destruindo de 2% a 25% do total de hemácias (glóbulos vermelhos) e provocando um quadro de anemia grave. Além disso, os glóbulos vermelhos parasitados pelo *P. falciparum* sofrem alterações em sua estrutura que os tornam mais adesivos entre si e às paredes dos vasos sanguíneos, causando pequenos coágulos que podem gerar problemas como trombozes e embolias em diversos órgãos do corpo. Por isso, a malária por *P. falciparum* é considerada uma emergência médica (BRASIL, 2014; FIOCRUZ, 2013).

No Brasil, a grande extensão geográfica da área endêmica e as condições climáticas favorecem o desenvolvimento dos transmissores e agentes causais da malária. Especialmente na Amazônia Legal, a transmissão é instável e geralmente focal, alcançando picos principalmente após os períodos chuvosos. A área endêmica do Brasil compreende a região amazônica brasileira, incluindo os estados do Acre, Amazonas, Amapá, Para, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão. Esta região é responsável por 99% dos casos autóctones do país. Fora da região amazônica, mais de 80% dos casos registrados são importados dos estados pertencentes à área endêmica brasileira, de outros países amazônicos, do continente africano, ou do Paraguai (BRASIL, 2014).

Devido a sua grande biodiversidade, a América do Sul desempenha um papel-chave na identificação de novos medicamentos no combate à malária, a sua diversidade natural juntamente com os medicamentos populares indígenas permite um grande potencial no tratamento e na identificação de novos antimaláricos, como aconteceu com as substâncias lapachol e quinino. Novas moléculas estão sendo identificadas, porém sua otimização para atividade *in vivo* tem sido lenta, argumentando que mais recursos precisam ser focados nestas áreas (CRUZ et al., 2013).

A quinina (Figura 03), isolado de *Cinchona officinalis* e a artemisinina (Figura 04), isolado da *Artemisia annua*, podem ser utilizados como exemplos marcantes em

uma demonstração clara do enorme potencial de produtos naturais como fontes de fármacos e de matéria-prima para produção de antimaláricos (BRAZ Filho, 2010).

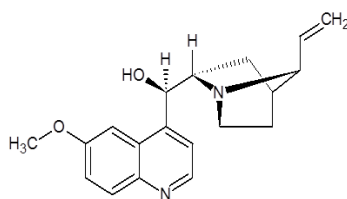


Figura 03: Quinina

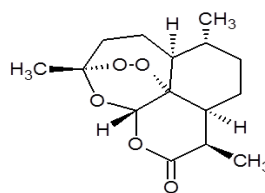


Figura 04: Artemisinina

Na Amazônia brasileira existe uma diversidade de plantas que são tradicionalmente utilizadas para tratar infecções antimaláricas, contudo, pouco ou nada se sabe sobre sua composição química tornando-as interessantes pontos de partida para a investigação sobre medicamentos antimaláricos (POHLIT et al., 2013).

2.6 Angiogênese

A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes pela proliferação de células endoteliais e musculares lisas (OLIVEIRA, et al., 2010).

É um processo essencial durante o desenvolvimento, ocorrendo também na idade adulta, durante a cicatrização de feridas e restauração do fluxo sanguíneo para os tecidos lesados. A angiogênese é regulada por uma interação muito sensível de fatores de crescimento e inibidores, e seu desequilíbrio pode levar a doenças como o câncer, onde angiogênese excessiva alimenta o tecido doente e destrói o tecido normal, ela não inicia a malignidade, mas promove progressão tumoral e metástase. Ao contrário das células tumorais, as células endoteliais são genômica e funcionalmente estáveis e foram, portanto, originalmente consideradas como alvos terapêuticos ideais que não se tornariam resistentes à terapia antiangiogênica (KANJOORMANA e KUTTAN, 2010).

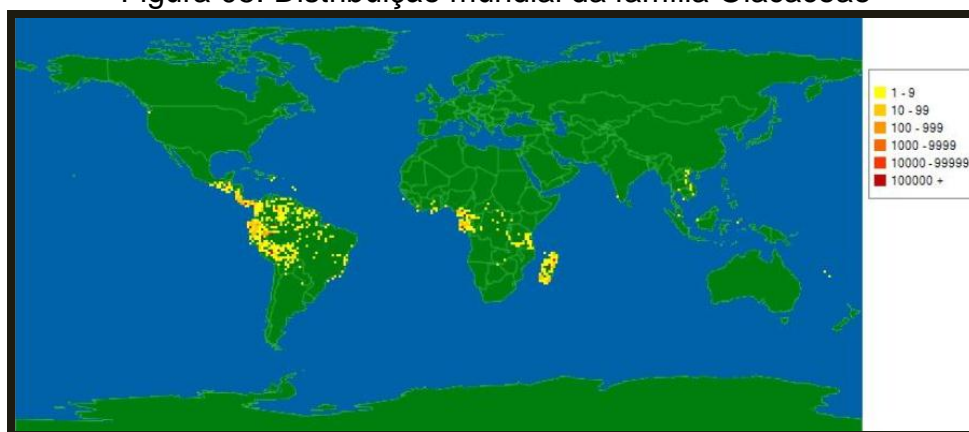
O modelo de membrana corioalantóica do embrião de galinha é uma membrana extra-embriônica que é comumente usada para estudar agentes que influenciam a angiogênese. Uma resposta angiogênica na forma de aumento da densidade do vaso ao redor do implante ocorre 72-96 horas após a estimulação com

uma substância angiogênica. Uma substância angiostática induzirá os vasos ao redor do implante a tornarem-se menos densos e até desaparecerem. Os ensaios *in vivo* fornecem uma avaliação fisiológica mais completa da angiogênese. Uma potencial vantagem de fitoquímicos e outras substâncias derivadas de produtos naturais é que eles podem agir através de múltiplas vias de sinalização celular e reduzir o desenvolvimento de resistência por células cancerígenas (SAGAR, YANCE e WONG, 2006).

2.7 Família Olacaceae

A família Olacaceae é uma família da ordem de Santalales com 29 gêneros e 180 espécies (CHRISTENHUSZ e BYNG, 2016). São árvores, arbustos ou lianas lenhosas em geral hemiparasitas. Caracterizam-se por folhas simples, alternas, de margem inteira e sem estípulas. A região neotropical é considerada o centro de diversidade da família, onde ocorre metade dos gêneros e espécies (SLEUMER, 1984). Na figura abaixo podemos observar a distribuição mundial da família Olacaceae (Figura 05).

Figura 05: Distribuição mundial da família Olacaceae



Fonte: <http://www.tropicos.org>

Essa família não é endêmica do Brasil, mas pode ser encontrada nas regiões Amazônica, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e no Pantanal. No Brasil apresenta os gêneros *Aptandra* Miers, *Brachynema* Benth., *Cathedra* Miers, *Chaunochiton* Benth., *Curupira* G.A.Black, *Douradoa* Sleumer, *Dulacia* Vell., *Heisteria* Jacq., *Minquartia* Aubl., *Olax* L., *Ptychopetalum* Benth., *Tetrastylidium* Engl., *Ximenia* L. (ROSSI,

2015). No quadro abaixo podemos observar a sinopse da família Olacaceae no Brasil.

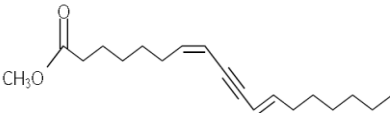
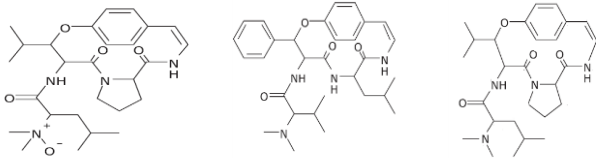
Quadro 02: Família Olacaceae no Brasil

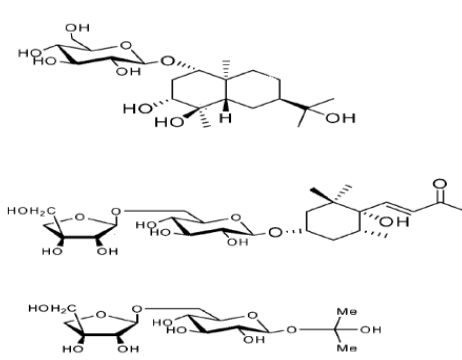
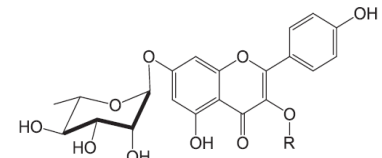
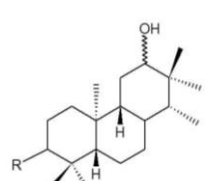
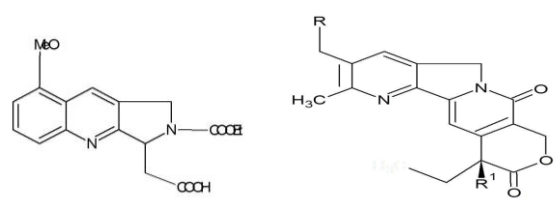
	Aceitos	Endêmicos	Sinônimos
Gêneros	12	1	16
Espécies	53	21	107
Subespécies	0	0	0
Variedades	1	0	4

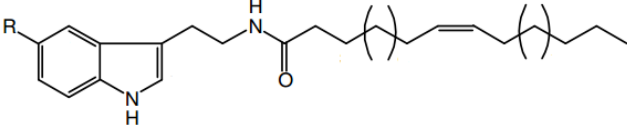
Fonte: Flora do Brasil

Estudos fitoquímicos feitos com espécies de Olacaceae revelaram a presença de flavonoides (HARON e PING, 1997; OKOYE et al., 2015), terpenos (CURSINO et al., 2009; TANG, WANG e ZHANG, 2016), flavanonas (UKIDA et al., 2013), alcaloides (GOVINDACHARI e VISWANATHAN, 1972), ácido graxos (REZANKA e SIGLER, 2007), saponinas, taninos e fenóis (MULUGETA et al., 2015), como podemos observar no quadro 03.

Tabela 03: Algumas substâncias isoladas da família Olacaceae

Espécie	Substância	Referência
<i>Heisteria silvanii</i> . Jacq	<p>Ácido heisterico isolado do óleo das sementes de <i>Heisteria silvanii</i></p> 	SPITZER et al., 1997
<i>Heisteria nítida</i> Spruce ex Engl.	<p>Ciclopeptídeos alcaloides isolados das cascas da <i>heisteria nítida</i></p> 	EL-SEEDI, SONY e ANDERS, 2005

<p><i>Liriosma ovata</i> Miers.</p>	<p>Glicosídeos isoprenoides do extrato metanólico das cascas da <i>Liriosma ovata</i></p> 	<p>PICERNO et al., 2008</p>
<p><i>Olax manii</i> L.</p>	<p>Flavonoide glicosilado isolado de <i>Olax manii</i></p>  <p>1 R α- D- apiofuranosyl (1 \rightarrow 2)- α- L- arabinofuranosyl 2 R β Dglucopyranosyl (1 \rightarrow 2)- α- L- arabinofuranosyl 3 R α- D- arabinopyranosyl (1 \rightarrow 4)- α- L-rhamnopyranosyl</p>	<p>OKOYE et al., 2015</p>
<p><i>Ptychopetalum olacoides</i> Benth.</p>	<p>Diterpenoides isolados das cascas de <i>Ptychopetalum olacoides</i></p>  <p>1:R-O, 12αOH; 1a: R- OH 2: R-O, 12βOH</p>	<p>TANG,WANG e ZHANG, 2016</p>
<p><i>Mappia foetida</i> Miers.</p>	<p>Alcaloides isolados dos galhos da <i>Mappia foetida</i> Miers.</p>  <p>(1a) R= H, R₁ (1b)R= H, R₁= OAc (1c)R= OMe, R₁=OH (1d) R=OMe, R₁=OAc</p>	<p>GOVINDACHARI e VISWANATHAN,1972</p>

<p><i>Scorodocarpus borneensis</i> Becc.</p>	<p>Alcaloide Scorodocarpines dos frutos de <i>Scorodocarpus borneensis</i> Becc.</p>  <p>R = H :Dehydroxy scorodocarpine B (1) R = OH:Scorodocarpine B (2)</p>	<p>KARTIKA et al.; 2014</p>
--	--	-----------------------------

2.8 *Minquartia guianensis*

A *Minquartia guianensis* é uma árvore de dossel (cresce cerca de 30 m de altura), possui madeira com coloração marrom-escuro, dura, pesada e muito durável. Seu tronco é bastante irregular e sua madeira muito resistente ao apodrecimento e a ataques de cupins, por esta razão é muito usada na indústria na fabricação de pisos e forros. Cresce bem em florestas de várzea com precipitação anual de 2.000 a 4.000 mm, e suas sementes não regeneram em campos abertos, o que mostra que é uma espécie que precisa de sombra e que pode ser classificada como espécie do estágio tardio de sucessão (MAGALHÃES, MARENCO e MENDES, 2009).

Seus troncos grandes são caracterizados por serem perfurados e apresentando ramos muito profundos, sendo facilmente reconhecido pelo tronco de casca castanha acinzentada, escalas retangulares e ramos verticais retos, e suas folhas tão distintas (NEBEL, 2000).

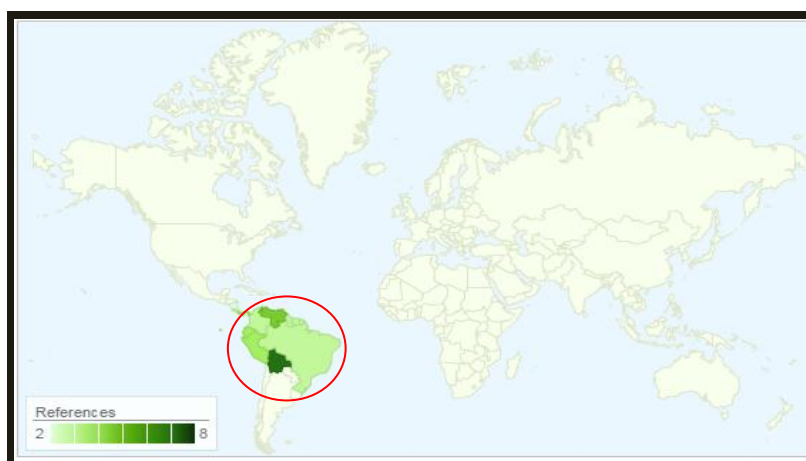
Figura 06: Foto da *M. guianensis*



Fonte: Acervo pessoal

A *Minquartia guianensis* (Figura 06) é popularmente conhecida como: Acariquara, Aquariquara, Aquariquara roxa. No mundo, a *M. guianensis* pode ser encontrado nos países como Nicarágua, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Equador, Peru, Bolívia e Brasil (TROPICOS, 2016) (Figura 07).

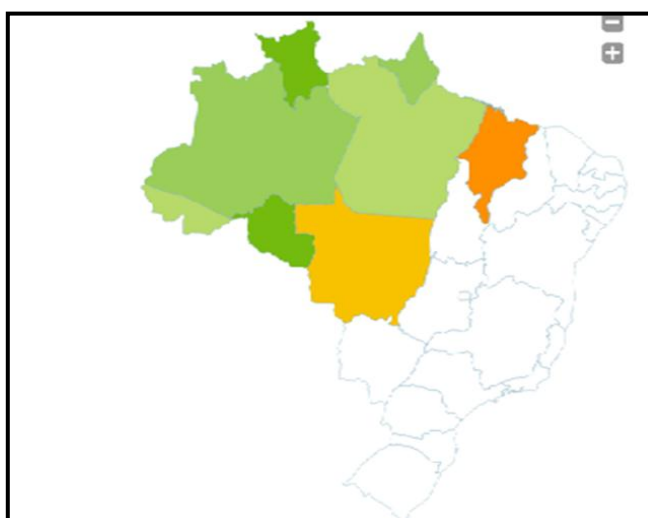
Figura 07: Distribuição geográfica de *Minquartia guianensis* no mundo



Fonte: Tropicos.

Apresenta distribuição geográfica no Brasil nas regiões: Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima), Nordeste (Maranhão) e Centro-oeste (Mato Grosso) (Figura 08). Pode ser encontrada em floresta ciliar ou galeria, floresta de igapó e floresta de Terra firme (ROSSI, 2015).

Figura 08: Distribuição geográfica de *Minquartia guianensis* no Brasil



Fonte: Flora do Brasil.

As sinonímias desta espécie são: *Eganthus poeppigii* Tiegh., *Endusa punctata* Radlk., *Minquartia macrophylla* Ducke, *Minquartia parvifolia* A.C. Sm., *Minquartia punctata* (Radlk.) Sleumer, *Secretania loranthacea* Müll. Arg. (TROPICOS, 2016).

2.8.1 Estudos químicos com *Minquartia guianensis*

Um estudo realizado por Marles e colaboradores (1989) com o extrato clorofórmico de cascas da *M. guianensis*, descreve o isolamento e a identificação de um poliacetileno, o ácido 17-hidroxi-9,11,13,15-octadecatetraínico também chamado de ácido minquartinóico.

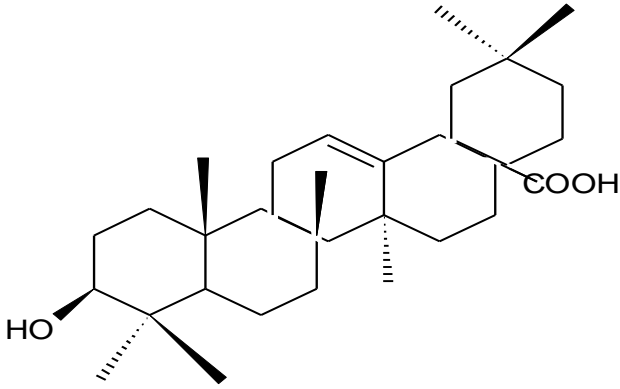
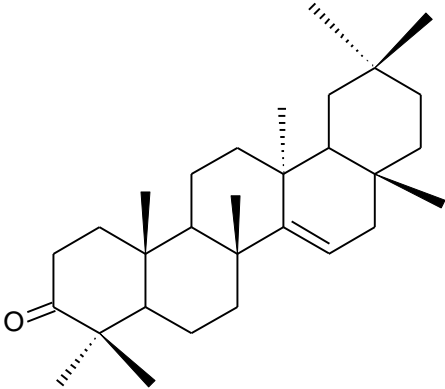
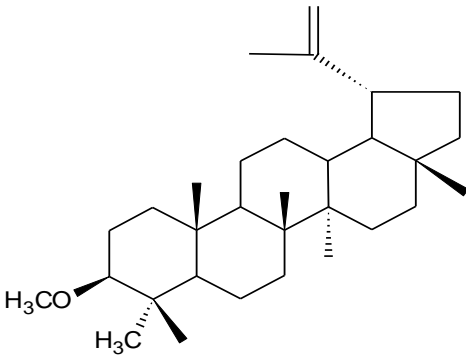
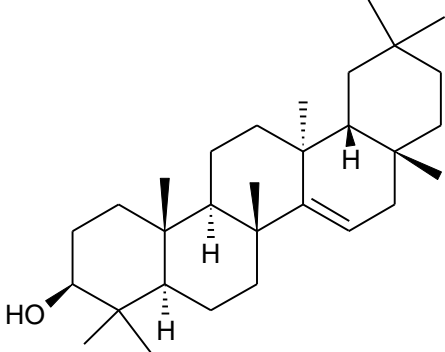
Em outro estudo também com cascas da *M. guianensis*, El Seedi e colaboradores (1994), relatam a identificação dos triterpenos: eritrodiol e betulina, eritrodiol e betulina esterificados com ácidos graxos, ácido minquartinóico, lichexantona, 13,28-epoxi-3-acetoxi-11-oleaneno e éter derivado do eritrodiol.

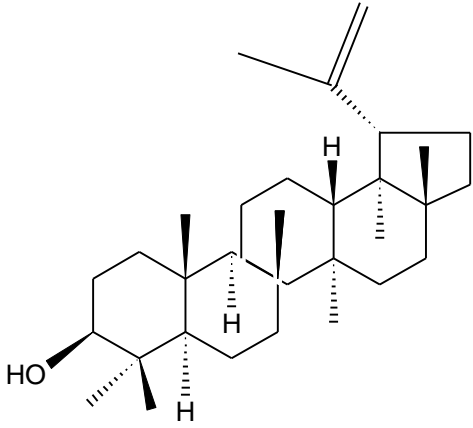
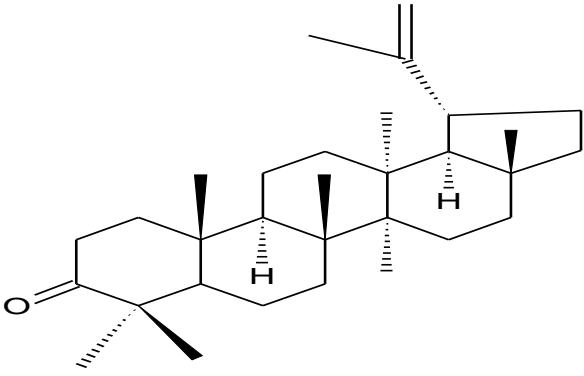
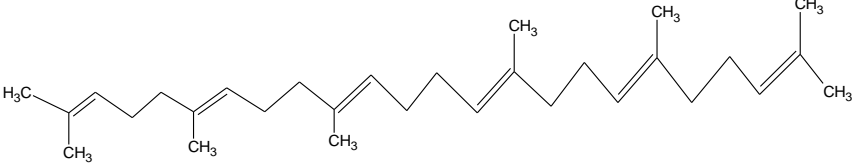
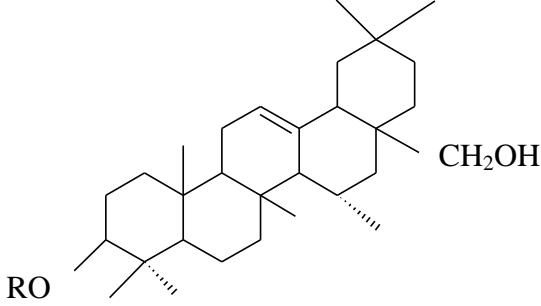
Cursino e colaboradores (2009), em um estudo com extratos diclorometânico de folhas de *M. guianensis*, isolaram os triterpenos: taraxerol, lupeol, lupen-3-ona e esqualeno. Em outro estudo, também realizado por Cursino e colaboradores (2012) foram isolados o ácido oleanólico e taraxer-3-ona.

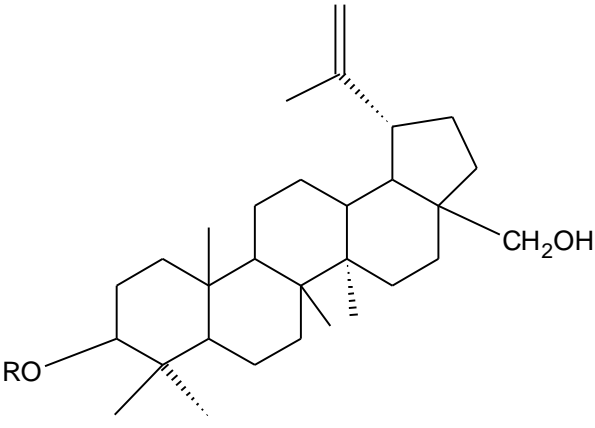
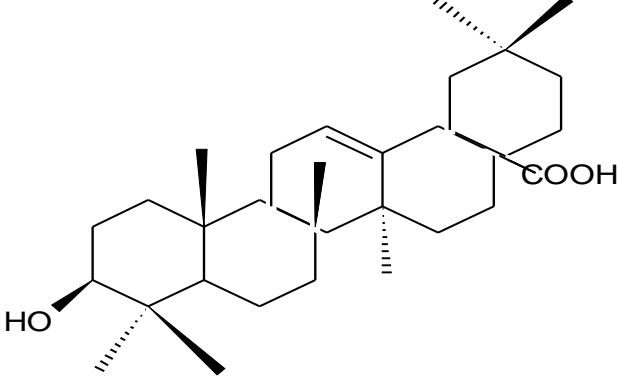
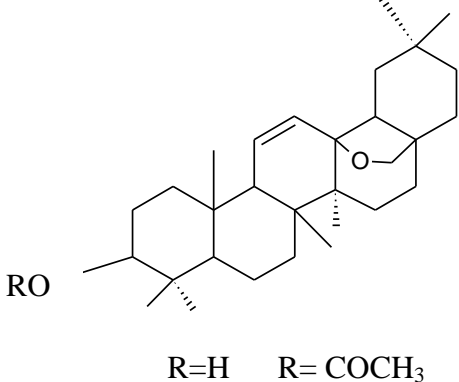
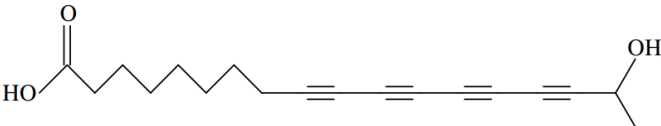
Em uma prospecção fitoquímica realizada com extratos metanólicos e aquoso das folhas e galhos de *M. guianensis* foram detectados a presença de fenóis, taninos, flavonoides, saponinas e triterpenos (CURSINO et al., 2011).

As substâncias isoladas da espécie *M. guianensis* descritas na literatura são mostradas na tabela 04.

Quadro 04: Substâncias isoladas da *M. guianensis*.

Substância	Estrutura	Referência
Ácido oleanólico		CURSINO et al., 2012.
Taraxer-3-ona		CURSINO et al., 2012.
3β-metoxi-lup-20(29)-eno		CURSINO et al., 2012.
Taraxerol		CURSINO et al., 2009.

<p>Lupeol</p>		<p>CURSINO et al.,2009.</p>
<p>Lupen-3-ona</p>		<p>CURSINO et al.,2009.</p>
<p>Esqualeno</p>		<p>CURSINO et al., 2009.</p>
<p>Eritrodiol e Eritodiol esterificado com ácido graxo</p>	 <p>R=H R= Ácido graxos</p>	<p>EL-SEEDI et al., 1994</p>

<p>Betulina e Betulina esterificada com ácido graxo</p>		<p>EL-SEEDI et al., 1994</p>
<p>Lichexantona</p>		<p>EL-SEEDI et al., 1994</p>
<p>13,28-epoxi-3- acetoxi-11- oleaneno e Éter derivado do eritrodíol</p>	 <p>R=H R= COCH₃</p>	<p>EL-SEEDI et al., 1994</p>
<p>Ácido minquartinóico</p>		<p>MARLES et al., 1989.</p>

2.8.2 Atividades biológicas da *Minquartia guianensis*

Diversos estudos apontam o potencial biológico que os extratos da *M. guianensis* apresentam, como o estudo realizado por Rodrigues e colaboradores

(2014) sobre atividade antifúngica de plantas amazônicas brasileiras contra espécies de *Candida*, o qual o extrato aquoso e metanólico de galhos da mesma, mostraram atividade contra três espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*), o extrato aquoso das folhas e o extrato diclorometânico de galhos também apresentaram potencial atividade contra *C. albicans* e *C. parapsilosis*.

Em ensaios realizados para analisar o potencial antibacteriano de extratos de *M. guianensis*, mostrou que o extrato diclorometânico e metanólico das folhas e metanólico dos galhos apresentaram atividade para *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, *Bacillus liquefaciens* e *B. cereus* (CURSINO et al., 2011).

Outra avaliação realizada foi a de atividade antimalárica *in vitro* com extrato diclorometânico de folhas e galhos de *M. guianensis* bem como os triterpenos isolados (ácido oleanólico, esqualeno e taraxerol), frente o *Plasmodium falciparum*, todos mostraram-se parcialmente ativos. Exceto o extrato diclorometânico dos galhos não mostrou ser ativo (CURSINO et al., 2012).

Em um estudo para verificar o potencial tóxico de extratos de espécies de plantas da floresta amazônica brasileira utilizando o método de letalidade da *Artemia salina*, mostrou que os extratos diclorometânico na concentração 250µg/mL, metanólico (320 µg/mL) e aquoso das folhas (790 µg/mL) de *M. guianensis* apresentam potencial atividade (CL₅₀) de toxicidade (OLIVEIRA et al., 2015).

Rasmussen e colaboradores (2000) realizaram estudos com o ácido minquartinóico, ácido presente em grande quantidade nas cascas da *M. guianensis* e que revelaram atividade *in vitro* moderada contra o *P. falciparum* e *Leishmania major*.

3. Objetivos

3.1 Geral

- Realizar o estudo químico e avaliar as atividades biológicas dos extratos de *Miquartia guianensis*.

3.2 Específicos

- Avaliar os extratos de folhas e galhos quanto às seguintes atividades biológicas: toxicidade frente à *Artemia salina*, atividade antimalárica frente ao *Plasmodium falciparum*, atividade antiangiogênica.
- Avaliar a atividade antibacteriana do extrato metanólico dos galhos;
- Avaliar a atividade antifúngica das fases do extrato metanólico dos galhos;
- Fracionar os extratos metanólicos dos galhos.

4. Referências

- ACHKAR, M. T.; NOVAES, G. M.; SILVA, M. J. D.; VILEGAS, W. Propriedade antioxidante de compostos fenólicos: importância na dieta e na conservação de alimentos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 11, n. 2, p. 398-406, 2013.
- ADEYEMI, M. M. H. A Review of secondary metabolites from plant materials for post harvest storage. **International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology**. v. 6, n. 2, p. 94–102, 2011.
- ALHO, C. J. R. Importância da biodiversidade para a saúde humana: uma perspectiva ecológica. **Estudos avançados**, v. 26, n. 74, p. 151-166, 2012.
- ASTOLFI FILHO, S.; SILVA, C. G. N.; BIGI, M. DE F. M. A. Bioprospecção e biotecnologia. **Parcerias Estratégicas**. v. 19, n. 2011, p. 45–80, 2014.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BIRT, D. F. ; JEFFERY, E. Flavonoids. **Advances in Nutrition**, v. 4, n. 5, p. 576-577, 2013.
- BONA, E. A. M. ; PINTO, F. G. S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C.M.; MOURA, A. C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, p. 218–225, 2014.
- BRAGA, F.C.; CASTILHO, R.O. Potencialidades do cerrado como fonte de substância bioativas e de espécies medicinais para o desenvolvimento de fitoterápicos. In: SOUZA, G.H.B.; MELLO, J.C.P.; LOPES, N. P. Farmagnosia: Coletânea Científica. Ouro Preto: editora UFOP; 2011.pg 295-318.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de diagnóstico laboratorial da malária**. 2. ed. – Brasília, 2009. 38p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. Brasília, 2014. 814p.
- BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.
- BOLZANI, V. da S. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. **Ciência e Cultura**, v. 68, n. 1, 2016 .
- BORSATO, A. V.; FEIDEN, A. Biodiversidade funcional e as plantas medicinais, aromáticas e condimentares. **Embrapa Pantanal**, 2011.

- CARDOSO, D.; SÄRKINEN, T.; ALEXANDERC, S.; AMORIM, A. M.; BITTRICH, V.; CELIS, M.; DALY, D. C.; FIASCHI, P.; FUNK, V. A.; GIACOMINJ, L. L.; GOLDENBERG, R.; HEIDEN, G.; IGANCIM, J.; KELLOFF, C.L.KNAPPN, S.; LIMA, H.C.; MACHADO, A. F. P.; SANTOS, R.M.; MELLO-SILVA, R.; MICHELANGELI, F. A.; MITCHELL, J.; MOONLIGHT, P.; MORAES, P. L. R.; MORI, S. A.; NUNES, T. S.; PENNINGTON, T.D.; PIRANI, J.R.; PRANCE, G. T.; QUEIROZ, L. P.; RAPINI, A.; RIINA, R.; RINCON, C. A. V.; ROQUE, N.; SHIMIZU, G.; SOBRAL, M.; STEHMANN, J.R.; STEVENS, W. D.; TAYLOR, M. C.; TROVÓ, M.; BERG, C. V. D.; WERFF, H. V. D.; VIANA, P. L.; ZARTMAN, C. E.; FORZZA, R.C. Amazon plant diversity revealed by a taxonomically verified species list. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 40, p. 10695-10700, 2017.
- CARRION, L. L.; RAMOS, D. F.; MARTINS, D.; OSÓRIO, M. I. C.; CURSINO, L.M.C.; MESQUITA, D. W. O.; NUNEZ, C.V.; SILVA, P. E. A. Antibacterial activity of *Minquartia guianensis* extracts and phytochemical evaluation of *Minquartia guianensis*. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 23, p. 505–510, 2011.
- CARVALHO, L. M. de. Orientações Técnicas para o Cultivo de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares. **Circular Técnica, 70**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Aracaju, 2015.
- Centers for disease control and prevetion *E. coli* (CDC). Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>>. Acesso em: 15 de dezembro de 2017.
- CHANG, C. C.; SHARON. C. A. C. Colliding Epidemics and the Rise of *Cryptococcosis*. **Journal of fungi**, v.1, n. 2, p. 1-11, 2016.
- CHEN, S. C.; MEYER, W.; SORRELL, C. *Cryptococcus gattii* Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 980–1024, 2014.
- CHRISTENHUSZ, M. J. M.; BYNG, J. W. The number of known plants species in the world and its annual increase. **Phytotaxa**, v. 261, p. 201–217, 2016.
- CRUZ, L. R.; SPANGENBERG, T.; LACERDA, M.VG.; WELLS, T.N.C. Malaria in South America : a drug discovery perspective. **Malaria Journal**, v.12, n.168, p. 1–12, 2013.
- CRUZ, A.B.; MALHEIROS, A.; GARCIA, A.C.; BITTENCOURT, C.M.S.; QUINTÃO,N.L.M.;NIERO,R.; SILVA, R. M. L.; ANDRADE, S.F.;BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V.Potencial terapêutico de algumas plantas medicinais da Flora Catarinense. In: SOUZA, G.H.B.;MELLO, J.C.P.; LOPES,N. P. **Farmagnosia: Coletânea Científica**. Ouro Preto: editora UFOP; 2012. pg. 117-155.
- CURSINO, L.M.C.; MESQUITA, A. S. S.; MESQUITA, D.W. O.; FERNANDES, C.C.; PEREIRA JUNIOR, O. L.; AMARAL, I. L.; NUNEZ, C.V. Triterpenos das folhas

de *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae). **Acta Amazonica**, v. 39, n. 1, p. 181-185, 2009.

CURSINO, L. M. C., SANTOS, I., MARIÚBA, L. A. M., JEFFREYS, M. F., LIMA, N. M., OLIVEIRA, J. L., ORLANDI, P. P., NUNEZ, C. V. Antibacterial activity of *Minquartia guianensis* extracts and phytochemical evaluation. **Emirates Journal of Food and Agriculture** .v. 23, p. 505–510, 2011.

CURSINO, L.M.C.; PAULA, R.C.; NASCIMENTO, M. F.A.; SANTOS, P.A.; NUNEZ, C.V. Triterpenes from *Minquartia guianensis* (Olacaceae) and in vitro antimalarial activity. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2165-2168, 2012.

Daflon[®]: Comprimidos. Responsável técnico: Patrícia Kasesky de Avellar. Rio de Janeiro: Laboratórios Servier do Brasil Ltda. 2016. Bula de remédio.

DHAMI, N. Trends in Pharmacognosy: A modern science of natural medicines. **Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 4, p. 123–131, 2013.

EL-SEEDI, H. R.; HAZELL, A. C.; TORSSELL, K. B. G. Triterpenes, lichexanthone and an acetylenic acid from *Minquartia guianensis*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 5, p. 1297–1299, 1994.

EL-SEEDI, H. R.; SONNY, L.; ANDERS, B. Chemosystematic value of cyclopeptide alkaloids from *Heisteria nitida* (Olacaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, p. 831– 839, 2005.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais, **Química nova**, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 9, p. 1829, 2010 .

FIOCRUZ 2013. Disponível em <: <https://agencia.fiocruz.br/malaria>>. Acesso em: 14. 03. 2016

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

GOVINDACHARI, T. R. .; VISWANATHAN, N. Alkaloids of *Mappia foetida*. **Phytochemistry**, v. 11, n. 12, p. 3529–3531, 1972.

HAMIDI, M. R.; JOVANOVA, B.; PANOVSKA, T. K. Toxicological evaluation of the plant products using Brine shrimp (*Artemia salina* L.) model. **Macedonian Pharmaceutical Bulletin**. v. 60, n. 1, p. 9–18, 2014.

HARAGUCHI, L. M. M.; CARVALHO, O. B. **Plantas Medicinais**. 1ª Edição ed. São Paulo, 2010.

HARON, N. W.; PING, S. T. Distribution and taxonomic significance of flavonoids in

- the Olacaceae and Icacinaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, n. 3, p. 263–265, 1997.
- KANJOORMANA, M.; KUTTAN, G. Antiangiogenic Activity of Ursolic Acid. **Integrative Cancer Therapies**, v.9, p. 224 – 235, 2010.
- KARTIKA,R.; BARUS,T.; SURBAKTI,R.; PARTOMUAN, S. Structure Characterization of Alkaloid Scorodocarpienes Derivative from Fruits of *Scorodocarpus borneensis* Becc (Olacaceae). **Asian Journal of Chemistry**, v. 26, p. 6047–6049, 2014.
- JERZ, G.; WAIBEL, R.; ACHENBACH, H. Cyclohexanoid protoflavanones from the stem-bark and roots of *Ongokea gore* q. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1698–1706, 2005.
- MAGALHÃES, S.; MARENCO, R.A.; MENDES, K. R. Aclimação de mudas de acariquara à alta irradiância. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.44, n. 1, p. 687–694, 2009.
- MALIK, C. P.; GARG, P.; SINGH, Y.; GROVER, S. Medicinal uses , chemical constituents and micro propagation of three potential medicinal plants abstract medicinal. **International journal of life science e Pharma Research**, v. 2, n. 3, p. 20, 2012.
- MARLES, R.J.; FARNSWORT, N. R. Isolation of a novel cytotoxic polyacetnene from a traditional anthelmintic medicinal plant *Minquartia guianensis*. **Journal of Natural Products**, v.52, p.261-266,1989.
- MATSUURA, H.; FETT-NETO, A. Plant Alkaloids: Main Features, Toxicity, and Mechanisms of Action. **Plant Toxins**, p.1-15 ,2015.
- MAYORGA, P., PÉREZ, K. R., CRUZ, S. M., CÁCERES, A. Comparison of bioassays using the anostracan crustaceans *Artemia salina* and *Thamnocephalus platyurus* for plant extract toxicity screening. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 897-903, 2010.
- MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of Food Flavonoids by High Performance Liquid Chromatography: A Review. **Journal of the Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577-599, 2000.
- MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHIN, J.L. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31-34, 1982.
- MONTANHERZ, A. B. P.; PIZZOLATTI, M. G.; COSTA, I. M. B. An Application of the brine shrimp bioassay for general screening of brazilian medicinal plants. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 21, n. 3, p. 175–178, 2002.
- MULUGETA, T.; UNNITHAN, C. R.; TESFAYSC, D.; WEMARIAM, Y. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Ximenia americana* leaves. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical**

sciences, v. 4, n. 09, p. 916–923, 2015.

NEBEL, G. *Minquartia guianensis* Aubl. : Uso, ecología y manejo en forestería y agroforestería. **Folia amazónica**, v. 10, p.1-2, 2000.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal Natural Products**, v. 79, p. 33, 2016.

NICOLA, A. M.; ALBUQUERQUE, P.; MARTINEZ, L. R.; DAL-ROSSO, R. A. SAYLOR, C.; JESUS, M.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Macrophage Autophagy in Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. **American Society for Microbiology Journal**. v. 80, n. 9, p. 3065–3076, 2012

NOSTRO, A.; PAPALIA, T. Antimicrobial Activity of Carvacrol : Current Progress and Future Prospectives. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 7, p. 28–35, 2012.

OKOYE, F. B. C.; WAMTINGA, R. S.; JANDIRK S.; AMAL, H. A.; QUANDT, B.; WRAY, V.; HENSEL, A. ESIMONE, C. O.; DEBBAB, A.; DIEDERICH, M.; PROKSCH, P.. Flavonoid glycosides from *Olex mannii*: Structure elucidation and effect on the nuclear factor kappa B pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 176, p. 27–34, 2015.

OLACACEAE *in* **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB175>>. Acesso em: 13 Mar. 2017.

OLIVEIRA, A. C. D. E.; MESQUITA, D. W. O. ; MESQUITA, A. S. S. ; FERNANDES, C. C. ; PINHEIRO, C. C.; SOUZA, E. S.; OSORIO, I. C.; CURSINO, L. M.C.; MARINHO, J. V. N. ; BELESA, M. M. B. ; AMARAL, I. L. ; NUNEZ, C. V. Brine Shrimp Bioassay of Plants of the Brazilian Amazon Rainforest. **European academic research**. v. 2, p. 14615–14619, 2015.

OLIVEIRA, L. B. O.; GOMES, C. F.; BAMPI, V.; RHEINGANTZ, M.G.; SOUZA, M. A. L. Angiogênese e tumorigênese: onde ocorre a intersecção e as possibilidades de terapias. **Vitalle-Revista de Ciências da Saúde**, v. 22, n. 2, p. 11-22, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). A crescente ameaça da resistência antimicrobiana: Opções de ação. p. 16, 2012.

PACZOSA, M.K. ; MECSAS J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.80, n.3, p.629–661, 2016.

PAPPALARDO, M. C. S. M.; MELHEM, M. S. C. *Cryptococcosis*: A review of the brazilian experience for the disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 6, p. 299–305, 2003.

- PAVARINI, D. P.; PAVARINI, S. P.; NIEHUES, M.; LOPES, N. P. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, n. 1, p. 5–16, 2012.
- PEREIRA, R. J.; CARDOSO, G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n.4, p. 146–152, 2012.
- PERFECT, J.R.; DISMUKES, W.E.; DROMER, F.; GOLDMAN, D.L.; GRAYBILL, J.R.; HAMILL, R.J.; HARRISON, T.S.; LARSEN, R.A.; LORTHOLARY, O.; NGUYEN, M.H.; PAPPAS, P.G.; POWDERLY, W.G.; SINGH, N.; SOBEL, J.D.; SORRELL, T.C. Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. v. 50, p. 291–322, 2010.
- PICERNO, P.; MENCHERINI, T.; RASTRELLI, L.; PICCINELLI, A.; AQUINO, R. Isoprenoid Glycosides from *Liriosma ovata*. **Journal Natural Products**, v. 71, n. 2 p. 265–268, 2008.
- POHLIT, A. M.; LIMA, R. B. S.; FRAUSIN, G.; SILVA, L. F. R.; LOPES, S.C.P.; MORAES, C. B.; CRAVO, P.; LACERDA, M. V.G.; SIQUEIRA, A. M.; FREITAS-JUNIOR, L. H. COSTA, F. T. M. Amazonian Plant Natural Products: Perspectives for Discovery of New Antimalarial Drug Leads. **Molecules**, v. 18, n. January, p. 9219–9240, 2013.
- RASMUSSEN, H. B.; CHRISTENSEN, S. B.; KVIST, L. P.; KHARAZMI, A.; HUANSI, A. G. Absolute Configuration and Antiprotozoal Activity of Minquartynoic Acid. **Journal Natural Products**, v. 63, n. 9, p. 1295–1296, 2000.
- REZANKA, T.; SIGLER, K. Identification of very long chain unsaturated fatty acids from Ximenia oil by atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography – mass spectroscopy. **Phytochemistry**, v. 68, p. 925–934, 2007.
- RODRIGUES, K.; RAMOS, D. F.; CARRION, L. L.; CURSINO, L. M. C.; JEFREYS, M. F.; PEDROZA, L. S.; OSÓRIO, M. I. C.; OLIVEIRA, J. L.; ANDRADE, J. I. A.; FERNANDES, C. C.; NUNEZ, C. V.; SILVA, P. E. A.; RAMOS, D. F. Antifungal activity of brazilian amazon plants. **International Journal of Phytopharmacology**. v. 5, n. 6, p. 445–453, 2014.
- ROSSI, L. 2015 *Olacaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB19958>>.
- SAGAR, S. M.; YANCE, D.; WON, R.K. Natural health products that inhibit angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat cancer—Part 1. **Current Oncology**, v.13, n.1, p.14-26, 2006.
- SILVA, B. K.; FREIRE, A. K.; BENTES, A. S.; SAMPAIO, I. L.; SANTOS, L. O.;

- SANTOS, M. S.; SOUZA, J. V. Characterization of clinical isolates of the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex from the Amazonas State in Brazil. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 29, n. 1, p. 40–43, 2012.
- SILVA, F.A. Legislação que incide sobre a coleta, acesso ao patrimônio genético e aos conhecimentos tradicionais associados. In: SOUZA, G.H.B.; MELLO, J.C.P.; LOPES, N. P. **Farmacognosia: Coletânea Científica**. Ouro Preto: editora UFOP; 2012. pg. 197-217.
- SIMÕES, C. M. ; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. P. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- SLEUMER, H. O. Olacaceae. Flora Neotropica. Monografia, v. 38, p. 1–159, 1984.
- SPITZER, V.; TOMBERG, W.; HARTMANN R. ; AICHHOLZ R. Analysis of the Seed Oil of *Heisteria silvanii* (Olacaceae) — A Rich Source of a Novel C 18 Acetylenic Fatty Acid. **Lipids**, v. 32, n. 11, p. 1189–1200, 1997.
- TANG, W.; WANG, Q.; ZHANG, W. Two new stachane diterpenoids from the bark of *Ptychopetalum olacoides*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 52, p. 719–721, 2016.
- TROPICOS. Disponível em: < <http://www.tropicos.org/Name/22900119?tab=synonyms> > . Acesso em : 30 de maio de 2016.
- UKIDA, K.; DOI, T.; SUGIMOTO, S.; MATSUNAMI, K.; OTSUKA, H.; TAKEDA, Y. Schoepfiajasmins A – H: C -Glycosyl Dihydrochalcones , Dihydrochalcone Glycoside , C -Glucosyl Flavanones , Flavanone Glycoside and Flavone Glycoside from the Branches of *Schoepfia jasminodora*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 61, n. 11, p. 1136–1142, 2013.
- VAISHNAV, P.; DEMAINE, A. L. Unexpected applications of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 29, n.2 p. 223–229, 2010.
- VEERESHAM, C. Natural products derived from plants as a source of drugs. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v.3, n.4, p. 200-201, 2012.
- VIZZOTTO, M.; KROLOW, A.C.; WEBER, G.E.B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. Pelotas: Embrapa clima temperado, 2010.
- VON NOWAKONSKI, Â.; MAMIZUKA, E. M. Capítulo 1: Estafilococos, Estreptococos, Enterococos e outros. **Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde**, Módulo 6 : Detecção e identificação de bactérias de importância médica /Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Brasília: Anvisa, 2013.

CAPÍTULO I

ESTUDO QUÍMICO DOS EXTRATOS METANÓLICOS DOS GALHOS DE *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae)

ESTUDO QUÍMICO DOS EXTRATOS METANÓLICOS DOS GALHOS DE *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae)

*Silva, P.A ; **Nunez, V.C.

*Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brasil

**Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

As plantas possuem diversos constituintes químicos, e muito deles são substâncias bioativas de grande importância em variadas áreas, sendo dessa forma necessário o seu isolamento. Nesse sentido, os galhos da *Minquartia guianensis* Aubl. foram coletados na Reserva Florestal Adolpho Ducke em duas coletas. O material vegetal foi seco, moído e extraído com diclorometano (DCM), metanol (MeOH) e água (H₂O). Dando continuidade a estudos realizados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, o extrato metanólico dos galhos foi escolhido para estudo químico. Foram realizadas duas tentativas para isolar os seus constituintes químicos. Na primeira foi feita a partição do extrato metanólico dos galhos da primeira coleta, e com o extrato da segunda coleta foi feita uma coluna filtrante. Os extratos obtidos foram submetidos à diversas técnicas de cromatografia, como a cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), cromatografia coluna aberta (CC), com as frações sendo monitoradas por CCDC, Espectrometria de Massas (MS) e Espectroscopia de Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹H). No presente estudo químico não foi possível o isolamento de nenhuma substância.

Abstract

The plants have several chemical constituents, and many of them are bioactive substances of great importance in various areas, and thus their isolation is necessary. In this sense, the branches of *Minquartia guianensis* Aubl. were collected in the Adolpho Ducke Forest Reserve in two collections. The plant material was dried, ground and extracted with dichloromethane (DCM), methanol (MeOH) and water (H₂O). Continuing studies conducted previously by our research group, the methanolic extract of the branches was chosen for chemical study. Two attempts have been made to isolate their chemical constituents. In the first one, the methanolic extract of the branches of the first collection was separated, and with the extract of the second collection a filter column was made. The extracts were submitted to various chromatography techniques, such as comparative thin layer chromatography (TLC), open column chromatography (CC), with the fractions being monitored by CCDC, Mass Spectrometry (MS) and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy hydrogen (¹H-NMR). In the present chemical study it was not possible to isolate any substance.

Introdução

Minquartia guianensis Aubl. é uma árvore que no Brasil pode ser encontrada nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste (ROSSI, 2015). No mundo é encontrada nos países como Nicarágua, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Equador, Peru, Bolívia e Brasil (TROPICOS, 2016).

Dessa espécie foram isolados o ácido minquartinóico (MARLES e FARNSWORT, 1989), eritrodiol e betulina, eritrodiol e betulina esterificados com ácidos graxos, lichexantona, 13,28-epoxi-3-acetoxi-11-oleaneno, éter derivado do eritrodiol (ELSEEDI, HAZELL e TORSSELL, 1994), taraxerol, lupeol, lupen-3-ona, esqualeno (CURSINO et al., 2009), o ácido oleanólico e taraxer-3-ona (CURSINO et al., 2012).

O objetivo do presente estudo foi realizar o fracionamento dos extratos metanólicos dos galhos da *Minquartia guianensis*, bem como a identificação de seus componentes.

2. Material e métodos

2.1 Coleta e identificação do material vegetal

O material vegetal foi coletado na Reserva Adolpho Ducke, INPA, Manaus, AM (Figura 01). Foram realizadas duas coletas, a primeira em julho de 2008 e a segunda em fevereiro de 2011, ambas as exsiccatas foram depositadas no herbário do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas – IFAM sob os n° 10662 e o n° 10663, respectivamente.



Figura 01: Imagem de satélite da reserva A. Ducke

2.2 Preparo dos extratos vegetais

O material vegetal (folhas e galhos) foi seco em estufa a 50 °C e posteriormente triturado em moinho de facas. Folhas e galhos foram submetidos à extração com solventes de polaridade em ordem crescente (diclorometano, metanol e água destilada), em banho de ultrassom (UNIQUE®) por 20 minutos (figura 02). Após filtração os extratos foram concentrados em rota-evaporador a vácuo (FISATOM®).

Foram utilizados solventes com grau comercial de pureza para as extrações e análises cromatográficas em camada delgada, sendo estes previamente destilados no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia – LABB (INPA). Os extratos foram

armazenados na extratoteca do laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia– INPA até o uso.

2.3 Preparação dos reveladores utilizados na análise de cromatografia em camada delgada

- Solução de sulfato cérico: Utilizam-se 4,2 g de sulfato de cério IV que serão solubilizados em 50 mL de água destilada. Após solubilização será acrescentado 2,8 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado e submetido a aquecido. Após resfriamento, será completado com 100 mL de água destilada. Este é um revelador universal, nas cores entre lilás, laranja, vermelho e rosa indicam a presença de terpenos.
- Solução de anisaldeído sulfúrico: Foram misturados 0,5 mL de anisaldeído com 10 mL de ácido acético glacial e adiciona-se 85 mL de MeOH e mais 5 mL de H_2SO_4 concentrado. Este é um revelador universal, nas cores como lilás e rosa indicam a presença de terpenos.
- Solução de cloreto férrico: Foi solubilizado 3 g de cloreto férrico em 100 mL de álcool etílico. Esta solução revela indícios da presença de compostos fenólicos.
- NP/Peg: Para o NP foi solubilizado 0,5 g de difenilboriloxietilamina 1,0%, em 50 mL de metanol e para o Peg foi solubilizado 2,5 g de polietilenoglicol 4000 em 50 mL de metanol. Observação após a placa ser borrifada, observa-se no UV 254 nm e 365 nm a intensificação da fluorescência, o que indica a possível presença de flavonoides.

2.4 Cromatografia em camada delgada

Os extratos obtidos foram analisados em cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC) em cromatoplasmas de sílica 60, com indicador de fluorescência UV_{254 nm}, com 0,20 mm de espessura, em suporte de alumínio (MACHERY – NAGEL –MN[®]), para a detecção das classes dos constituintes químicos presentes em cada extrato. As amostras foram solubilizadas em solventes escolhidos de acordo com a polaridade do extrato e aplicadas nas cromatoplasmas na forma de

soluções. A eluição ocorreu em cubas cromatográficas de vidro com a fase móvel determinada a partir de sistemas apropriados também de acordo com a sua polaridade.

Após eluição as placas foram reveladas com luz UV (254 e 365 nm) e os seguintes reveladores químicos: $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ para detecção de terpenos, anisaldeído para detecção de terpenos entre outras classes, FeCl_3 para detecção de substâncias aromáticas e NP/PEG para flavonoides. Assim conseqüentemente, foi possível estabelecer uma estratégia para a separação e análise dos constituintes químico da amostra.

Os extratos também foram submetidos a uma série de cromatografias em coluna, utilizando a fase estacionária mais adequada dependendo da composição amostral e sistemas de eluição determinados por CCDC. Todas as frações obtidas dos fracionamentos foram reunidas por características químicas semelhantes.

Resultados e discussão

Fracionamento dos extratos metanólicos dos galhos da 1° coleta

Dando continuidade ao trabalho iniciado no nosso grupo de pesquisa por Cursino (2011), efetuamos o estudo do extrato metanólico dos galhos. Este foi submetido à cromatografia líquido-líquido (partição), utilizando-se 4,0 g de amostra, que foi dissolvida em 100 mL de solução metanol-água destilada (1:1) em funil de separação de 1000 mL. Foram obtidas três fases: diclorometânica, acetato de etila e hidrometanólica.

Fracionamento da fase Diclorometânica (DCM)

Uma alíquota (400 mg) da fase DCM dos galhos foi fracionada em coluna aberta ($h \times \varnothing = 36 \times 1,75 \text{ cm}$) utilizando alumina (50 g) como fase estacionária e eluída com misturas dos solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, com um volume de 100 mL para cada mistura de gradiente. Foram obtidas 66 frações que foram submetidas à cromatografia em camada delgada comparativa

(CCDC) e reunidas posteriormente. As frações apresentaram alta complexidade química quando analisadas por CCDC, e massa insuficiente para fracionamento e ensaios biológicos, portanto, não foi dado continuidade ao fracionamento.

Fracionamento da fase AcOEt

A fase AcOEt (800 mg) foi fracionada em coluna aberta (h x Ø = 20 x 1,75 cm) utilizando Florisil (40 g) como fase estacionária e eluída com misturas de diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol, com um volume de 150 mL para cada mistura de gradiente. Foram obtidas 79 frações que foram submetidas à cromatografia em camada delgada comparativa e reunidas posteriormente.

A fração 70 foi submetida à purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As subfrações obtidas apresentaram alta complexidade química quando analisadas por CCDC e massa insuficiente para posterior purificação.

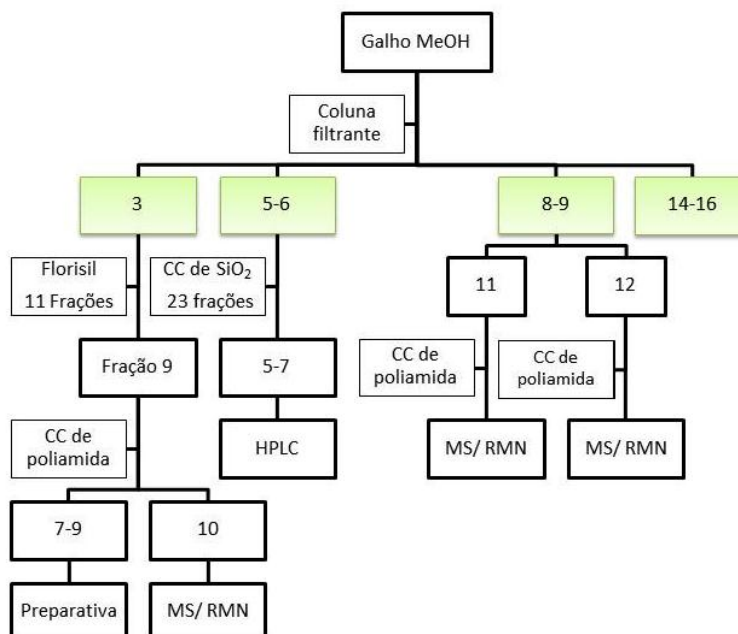
Fracionamento da fase hidrometanólica

A fase hidrometanólica foi fracionada em coluna aberta de Sephadex LH- 20 e eluída em metanol 100%, as frações foram submetidas à CCD, porém apresentaram rastros e indícios de que seus constituintes ficaram retidos na origem, sendo assim preteridas para posterior análises.

Fracionamento do extrato metanólico dos galhos da 2ª coleta

Novos métodos de fracionamento foram impostos ao extrato metanólico dos galhos. Cerca de 11 g do extrato metanólico foi fracionado em coluna filtrante de sílica, eluída com misturas de DCM, AcOEt, Acetona, Metanol, fornecendo 16 frações, que foram analisadas por CCDC e reunidas de acordo com suas semelhanças químicas. As que apresentaram características flavonoidicas, quando reveladas com NP/PEG (Difenilboriloxietilamina/Polietilenoglicol) foram submetidas á fracionamento. Abaixo o fluxograma geral dos fracionamentos, em destaque as frações com características flavonoidicas fracionadas, as demais frações serão posteriormente trabalhadas.

Figura 02: Fluxograma dos fracionamentos do extrato metanólico dos galhos da 2^o Coleta



Fracionamento da fração 3

A fração 3 (126,9 mg) foi fracionada em coluna cromatográfica aberta ($h \times \varnothing = 19,5 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$) de Florissil (12,69 g) e eluída com misturas de DCM, AcOEt, Acetona e MeOH em diferentes concentrações. As frações coletadas foram submetidas à CCDC. A fração coletada n.9 (54 mg) apresentou intensificação de fluorescência quando revelada com NP/PEG, características de substâncias flavonoidicas (OLIVEIRA et al., 2010) (figura 03) e apresentou coloração marrom quando reveladas com $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, características de substâncias terpênicas (figura 04). Esta foi fracionada em coluna cromatográfica aberta ($h \times \varnothing = 15 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$) de Poliamida (4,32 g) gerando 14 frações que foram submetidas à CCDC. A reunião das frações 7-9 (figura 05) foi submetida à CCDC em DCM/ACOET 8:2, gerando 2 subfrações. A fração 10 por apresentar certo grau de pureza, foi analisada por MS e RMN de ^1H , no entanto, não possível a sua elucidação, devido à pouca quantidade de massa.

CHCl ₃ / MeOH 7:3				
Visível	U.V. 254nm	U.V. 365nm	U.V. 254nm	U.V. 365nm
A			B	
Antes do NP/PEG			Após o NP/PEG	

Figura 03: Análise da Fração 9 em CCDC antes (A) e depois (B) de reveladas com NP/PEG.

Acetona/ MeOH 1:1			
Visível	U.V. 254 nm	U.V. 365nm	Ce(SO ₄) ₂

Figura 04: Análise da Fração 9 em CCDC revelada com Ce(SO₄)₂

DCM / ACOET 8:2			
Visível	U.V. 254 nm	U.V. 365 nm	Anisaldeído

Figura 05: Análise das frações 7-9 em CCDC reveladas com anisaldeído

Fracionamento da fração 5-6

A fração 5-6 (134 mg) da coluna filtrante, foi fracionada em coluna cromatográfica aberta (h x Ø = 25 cm x 1 cm) de sílica gel (13,4 g) e eluída com misturas de DCM, AcOEt, Acetona e MeOH em diferentes concentrações. As

frações coletadas foram submetidas à CCDC. A reunião das frações 5-7 (10 mg) (figura 06) apresentaram características de flavonoides quando analisadas por CCDC e foi enviada para RMN de ^1H , revelando alto grau de impureza, sendo assim, tentativas de purificação por HPLC também não foram bem sucedidas, inviabilizando a continuação do seu fracionamento.




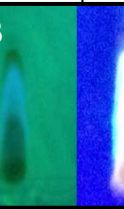

DCM/ ACOET 1:1				
Visível	U.V. 254 nm	U.V. 365nm	U.V. 254nm	U.V. 365nm
				
Antes do NP/Peg			Após o NP/Peg	

Figura 06: Análise das frações 5-7 em CCDC antes (A) e depois (B) de reveladas com NP/ PEG.

Fracionamento da fração 8-9

A fração 8-9 (361,1 mg) também da coluna filtrante, foi fracionada em coluna cromatográfica aberta (h x Ø = 26 cm x 2cm) de sílica gel (36,11 g) e eluída com misturas de DCM, AcOEt, Acetona e MeOH em diferentes concentrações. A fração coletada n.11 (64,2 mg) foi fracionada novamente, por apresentar características fenólicas quando reveladas com cloreto férrico (FeCl_3) pois revelava com uma coloração azul escuro (figura 07), esta foi fracionada utilizando coluna cromatográfica aberta (h x Ø = 18,5 x 2 cm) de poliamida (5,12 mg) e eluída com água destilada, MeOH e AcOEt em diferentes concentrações. Foram coletadas 24 frações que foram submetidas à cromatografia em camada delgada. A fração 12 (62 mg) foi escolhida para purificação, pois apresentava coloração azul escuro, característica de substâncias fenólicas (figura 08). Esta foi fracionada em coluna cromatográfica aberta (h x Ø = 18,5 cm x 2 cm) de poliamida (5 g), gerando 14 frações que foram submetidas à cromatografia em camada delgada. Contudo, tanto para as subfrações da fração 11 quanto da fração 12, a grande complexidade química das frações exige nova e mais elaborada metodologia para isolamento e identificação de seus constituintes.

Figura 07: Análise da fração 11 em CCDC reveladas com FeCl₃









DCM/ MEOH 7:3			
Visível	U.V. 254 nm	U.V. 365 nm	FeCl ₃
			

Figura 08: Análise da fração 12 em CCDC revelada com FeCl₃

DCM/ MEOH 7:3			
Visível	U.V. 254nm	U.V. 365 nm	FeCl ₃
			

Fracionamento da fração 13-16

Foi realizado também o fracionamento da fração 13-16 (2,22 g) coluna cromatográfica aberta (h x Ø = 26 cm x 5 cm) de sílica gel (200g) e eluída com misturas de AcOEt e MeOH em diferentes concentrações. Foram coletadas 24 frações que foram submetidas à cromatografia em camada delgada e reunidas posteriormente em 9 frações. Devido complexidade química das frações obtidas não foi dado continuidade no seu estudo.

Para Matos (2009), os extratos brutos de plantas mesmo quando utilizado solventes pouco polares podem ser muito complexos e ricos em componentes. Quando a extração é feita com solventes polares, maior ainda é a sua complexidade.

Conclusão

As análises em CCDC demonstram que os extratos metanólicos apresentam indícios da presença de flavonoides e terpenos. Apesar de trabalharmos com

extratos com períodos diferentes de coleta e diferentes metodologias (partição e coluna filtrante), não foi possível no período disponível realizar o isolamento de nenhuma substância.

Referências

- CURSINO, L.M.C.; MESQUITA, A. S. S.; MESQUITA, D.W. O.; FERNANDES, C.C.; PEREIRA JUNIOR, O. L.; AMARAL, I. L.; NUNEZ, C.V. Triterpenos das folhas de *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae). **Acta Amazonica**, v. 39, n. 1, p. 181-185, 2009.
- CURSINO, L. M. C. Estudo fitoquímico e bioatividade dos extratos e frações de *Minquartia guianensis* (Olacaceae) p.121. 2011. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Recursos Naturais) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus. 2011.
- CURSINO, L.M.C.; PAULA, R.C.; NASCIMENTO, M. F.A.; SANTOS, P. A.; NUNEZ, C.V. Triterpenes from *Minquartia guianensis* (Olacaceae) and *in vitro* antimalarial activity. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2165-2168, 2012.
- EL-SEEDI, H. R.; HAZELL, A. C.; TORSSELL, K. B. G. Triterpenes, lichexanthone and an acetylenic acid from *Minquartia guianensis*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 5, p. 1297–1299, 1994.
- MARLES, R.J.; FARNSWORT, N. R. Isolation of a novel cytotoxic polyacetene from a traditional anthelmintic medicinal plant, *Minquartia guianensis*. **Journal of Natural Products**, v.52, p.261-266,1989.
- MATOS,F.J.A.Introdução á Fitoquímica experimental. 3ªed. Fortaleza:Edições UFC, 2009.
- OLIVEIRA, F.; RITTO, J.L.A.; AKISUE, G.; BACCHI, E.M. Fundamentos de cromatografia aplicada a fitoterápicos. São Paulo: Editora Atheneu, 2010.
- ROSSI, L. 2015 *Olacaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB19958>>.
- TROPICOS.Disponível em:
<<http://www.tropicos.org/Name/22900119?tab=synonyms> >. Acesso em : 30 de maio de 2016.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS DE *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae)

Avaliação das atividades biológicas da *Minquartia guianensis* Aubl. Olacaceae

*Silva, P.A ; **Nunez, V.C.

*Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brasil

**Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

As plantas são fonte de milhares de substâncias que apresentam atividades biológicas. Entre essas plantas podemos citar a *Minquartia guianensis* Aubl. Olacaceae. Os extratos diclorometânico, metanólicos e aquosos das folhas e galhos da *Minquartia guianensis* foram testados para determinar sua toxicidade sobre à *Artemia salina* e para avaliar a atividade antibacteriana, antifúngica, antimalárica e angiogênica. Todos os extratos testados apresentam toxicidade frente à *Artemia salina*. A avaliação através de testes antibacterianos demonstrou que o extrato metanólico dos galhos apresentou atividade frente às bactérias contra *Escherichia coli* (CIM de 1000 µg/mL) e *Pseudomonas aeruginosa* (CIM de 1000 µg/mL). A avaliação antifúngica das fases do extrato metanólico dos galhos demonstrou que a fase hidrometanólica apresentou atividade para *Cryptococcus neoformans* (CIM de 200 µg/mL) e *Candida albicans* (CIM de 800 µg/mL) e a fase de acetato de etila apresentou atividade *C. albicans* (CIM de 400 µg/mL). Quanto aos ensaios antimaláricos todos os extratos foram ativos, exceto o extrato diclorometânico das folhas. Em relação ao teste da avaliação da angiogênese, todos os extratos apresentaram atividade antiangiogênica.

Abstract

Plants are the source of thousands of substances that are responsible for biological activities. Among them we can mention a *Minquartia guianensis* Aubl. Olacaceae. *Minquartia guianensis* extracts were tested to determine their toxicity to *Artemia salina* to evaluate antibacterial, antifungal, antimalarial and angiogenic activity. All extracts tested have toxicity to *Artemia salina*. The evaluation through antibacterial tests showed that the methanolic extract of the branches showed activity against the bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. The antifungal evaluation of the phases of the methanolic extract of the branches showed that the hydromethanolic phase presented activity against *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* and the ethyl acetate phase presented activity against *C. albicans*. As for the antimalarial tests, all the extracts were active, except the dichloromethane extract of the leaves. In relation to the angiogenesis evaluation test, all extracts presented antiangiogenic activity.

Introdução

O estudo dos produtos vegetais e a ação biológica dos metabólitos secundários em tratamentos terapêuticos têm sido de grande relevância, especificamente na área química e na medicina (CUNHA et al., 2016). Várias razões podem explicar o interesse pelas substâncias do reino vegetal como sua

disponibilidade de fontes, o relativo baixo custo e o impressionante número de substâncias químicas que espécies de plantas podem conter (GOTTI, 2011).

A *Minquartia guianensis* Aubl. pertence à família Olacaceae e pode ser encontrada em Floresta Ciliar, Floresta de Igapó e de Terra Firme (ROSSI, 2015). É uma árvore de interesse comercial, pois a madeira desta espécie é usada para produção de postes e construção (SILVEIRA, et al., 2013). *Minquartia* é um gênero monotípico, contendo a espécie única *Minquartia guianensis* (IUCN, 1998).

O presente estudo tem como objetivo avaliar os extratos vegetais quanto à atividade tóxica frente à *Artemia salina*, antimicrobiana, antimalárica e antiangiogênica.

2. Material e métodos

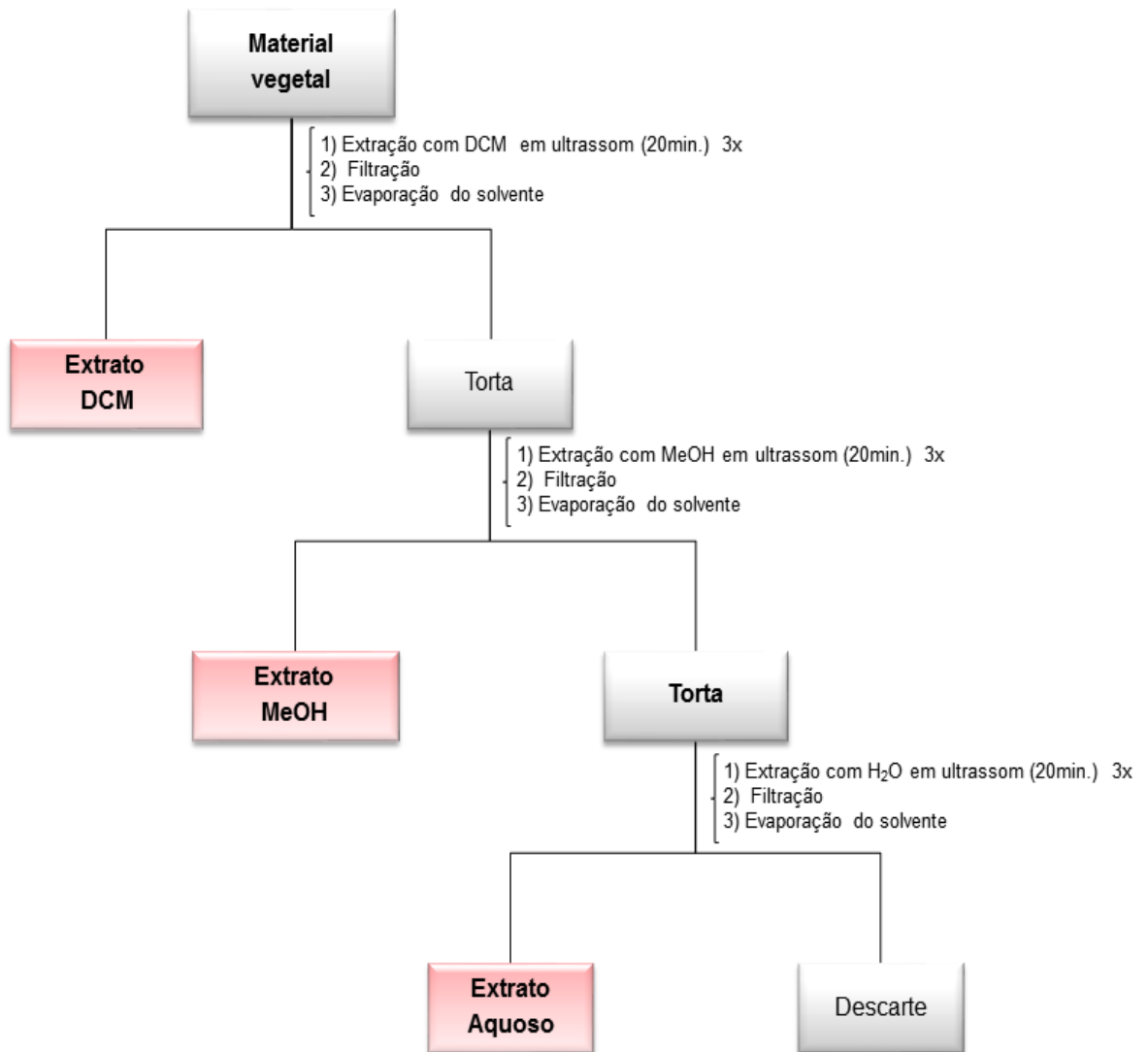
2.1 Coleta e identificação do material vegetal

O material vegetal foi coletado na Reserva Adolpho Ducke, INPA, Manaus, AM em julho de 2008, sua exsicata foi depositada no herbário do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas – IFAM sob o n° 10662.

2.2 Preparo dos extratos vegetais

O material vegetal (folhas e galhos) foi seco em estufa a 50 °C e posteriormente triturado em moinho de facas. Folhas e galhos foram submetidos à extração com solventes de polaridade em ordem crescente (diclorometano, metanol e água destilada), em banho de ultrassom (UNIQUE[®]) por 20 minutos. Após filtração os extratos foram concentrados em rota-evaporador a vácuo (FISATOM[®]) (Figura 01). Os solventes utilizados para as extrações e análises cromatográficas em camada delgada possuem grau comercial de pureza, sendo previamente destilados no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia - LABB (INPA). Os extratos foram armazenados na extratoteca do laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia- INPA, até o uso.

Figura 01: Metodologia da extração



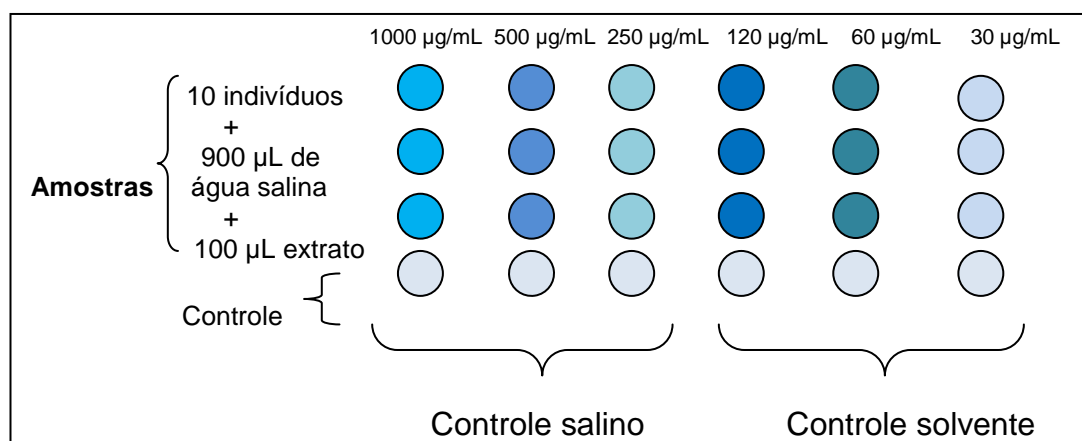
2.3 Toxicidade frente à *Artemia salina*

Para este ensaio foi utilizada a metodologia desenvolvida por Meyer et al., (1982), foi usado uma solução marinha 3,8%, como meio de eclosão e crescimento, onde foram adicionados 10 mg dos cistos de *A. salina*, nas seguintes condições de crescimento: temperatura de 27 a 30 °C sob iluminação artificial (luminária) durante 48 horas. Após o período de eclosão, as larvas foram transferidas para placas de 24 poços e distribuídas 10 larvas de *A. salina* para cada poço. As amostras foram adicionadas nos poços em triplicata na concentração inicial de 1000 µg/mL e diluídos até encontrar a concentração letal média (CL₅₀). Foram realizados também

os controles do meio salino (larvas da *A. salina* e solução salina) e do solvente (larvas da *A. salina*, solução salina e DMSO) (Figura 02).

As placas com as larvas de *A. salina* foram mantidas por 24 horas sob iluminação de lâmpada artificial. Após esse período, foi avaliado o número de larvas sobreviventes, tanto nos poços de controles quanto no teste.

Figura 02: Ensaio de toxicidade



2.4 Atividade antibacteriana

A avaliação da atividade antibacteriana dos extratos metanólicos dos galhos foi realizada frente às cepas cedidas pela coleção de microrganismo de referência em vigilância sanitária - CRMS, Fiocruz, INCQS, Rio de Janeiro, RJ.

- ***Escherichia coli* (ATCC 11775):** bactéria bacilar gram-negativa
- ***Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145):** bactéria gram-negativa.
- ***Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883):** bactéria gram-negativa.
- ***Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228):** bactéria gram-positiva.

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) dos extratos/substâncias foram realizadas conforme metodologia descrita por Eloff (1998) e CLSI (2003).

2.4.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração inibitória mínima (CIM) é definida como a menor concentração de um antimicrobiano capaz de inibir o crescimento visível de um microrganismo (ANVISA).

O extrato metanólico dos galhos foi primeiramente solubilizado em dimetilssulfóxido (DMSO) a 5%, e em seguida foram realizadas diluições sucessivas para a obtenção das concentrações de 1000 µg/mL a 15,6 µg/mL. Em seguida, cada concentração foi adicionada em poços (microplaca de 96 poços). Foram adicionados 95 µL de cada concentração do extrato e 5 µL do inóculo (McFarland 0,5 contendo aproximadamente $1,5 \times 10^8$) diluída 10 vezes. Para o controle negativo foram utilizados 95 µL de caldo DMSO 5%, meio e o inóculo. Para o controle positivo utilizou-se o antibiótico oxitetraciclina na concentração de 125 µg/mL e inóculo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Em seguida a placa foi agitada e incubada a 29 ou 37 °C dependendo das características de cada bactéria. A CIM foi detectada com o auxílio do revelador cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (2 mg/mL), foi adicionada uma quantidade de 40 µL deste revelador em cada poço. Microrganismos metabolicamente ativos coram-se de vermelho. A CIM é definida como a menor concentração do extrato que não houve mudança de coloração.

2.4.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Foi realizada também a análise para a determinação da CBM, que determina onde não houve crescimento bacteriano a partir da CIM. Primeiramente, foram retirados 10 µL de cada concentração que não demonstrou crescimento microbiano na CIM e posteriormente foi semeada em Ágar Mueller-Hinton. As placas foram incubadas a temperatura de 29 ou 37 °C dependendo das características de cada bactéria por um período de 18 a 24 horas.

2.5 Atividade Antifúngica

O ensaio foi realizado em colaboração com o laboratório de micologia médica do INPA, sob a supervisão do professor Dr. João Vicente Braga de Souza. Foi avaliada a atividade antifúngica das fases diclorometano, acetato de etila e hidrometanólica do extrato metanólico dos galhos frente às cepas dos fungos

Cryptococcus neoformans e *C. gattii*, obtidas de pacientes infectados de Manaus e cepas de *Candida albicans* (ATCC 36231). O método utilizado foi o de microdiluição. As fases do extrato metanólico dos galhos foram testados em concentração final de $2,5 \times 10^3$ células em placas de 96 poços. Foi utilizado o meio Sabouraud dextrose Agar para o cultivo e as células foram preparadas em 5 mL de solução salina a 0,85%.

As fases foram testadas para determinar a concentração inibitória mínima (MIC) pelo método Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2003). A concentração final de cada extrato variou entre 800-6,25 $\mu\text{g/mL}$. As amostras foram preparadas em DMSO 10%. As placas de 96 poços foram incubadas a 35 °C durante 24 h para *C. albicans* e 35 °C durante 72 h para *C. gattii* e *C. neoformans*. O controle positivo foi o antifúngico anfotericina B (64 $\mu\text{g/mL}$) e dois outros controles como fungos em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) cultivado.

2.6 Atividade antimalárica

O ensaio de avaliação de atividade antimalárica foi realizado em colaboração com a fundação Oswaldo Cruz- Instituto Leônidas e Maria Deane (FIOCRUZ), sob a supervisão da Prof^a Dra. Patricia Orlandi.

O estudo da atividade antimalárica foi realizado em placas de 96 poços de fundo chato, utilizando 50 μL de Meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) distribuídos em cada poço. Os extratos (10 mg) foram dissolvidos em 1 mL de meio RPMI incompleto, no qual deste foram retirados 10 μL e distribuídos em quatro diluições seriadas de 1:100, 1:1000, 1:10000 e 1:100000 em triplicata para cada diluição de extrato vegetal nos 50 μL do meio RPMI distribuídos na placa de 96 poços em uma concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$. O parasita *Plasmodium falciparum* foi distribuído utilizando uma solução com 100 μL de hemácias parasitadas, 100 μL de hemácias saudáveis, 10 μL de gentamicina e 10 mL de meio completo obtendo uma suspensão de parasita a 2% de hematócrito e parasitemia a 3%, desta solução 50 μL foram distribuídos em cada um dos poços dos extratos, foi feito uma triplicata para o controle positivo sem droga e uma triplicata controle negativo (eritrócitos não parasitados) sem droga, utilizado 20 μL de hemácias saudáveis e 1 mL de meio completo com hematócrito a 2%.

Foi feita a avaliação da atividade antimalárica dos extratos diclorometânico, metanólico e aquoso das folhas e galhos. O controle negativo utilizado foi o dimetilssulfóxido (DMSO) e hemácias saudias. O controle positivo foi o parasita sem o extrato para controle parasitário.

A leitura foi realizada em 72 h com contagem e porcentagem da parasitemia utilizando citômetro de fluxo para a análise das amostras no qual para identificação do parasita foi utilizado o corante brometo de etídio, que é uma substância acumulativa fluorescente que destaca o DNA das células.

A inibição é determinada comparando relativamente à parasitemia observada quando na cultura foram adicionados os extratos e a parasitemia do controle positivo sem extrato vegetal e controle negativo de células saudias sem extrato, em consideração a emissão de fluorescência do brometo detectado por citometria de fluxo.

2.7 Atividade antiangiogênica utilizando o método da membrana corioalantóica embrionária (CAM)

Para a realização dos experimentos referentes à avaliação da atividade antiangiogênica, foram utilizados ovos de galinha (*FC Cabocla III*) fertilizados adquiridos na Universidade Federal do Amazonas.

A avaliação da atividade antiangiogênica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Nguyen, Shing e Folkman (1994) sendo realizados em triplicata. Ovos fertilizados foram incubados em uma incubadora automática e digital Chocmaster®, na posição horizontal, à temperatura de 37,5°C e sob umidade relativa do ar de 33%. Após 48 h de incubação uma pequena janela de 5 mm de diâmetro foi aberta na casca, na região onde se localiza a câmara de ar do ovo e assim, uma quantidade de cerca de 3 mL de clara foi retirada afim de se evitar a aderência dos embriões nas membranas ovulares.

Em seguida, outra janela, agora com cerca de 15 mm de diâmetro foi aberta na região do ovo posicionada acima da região da membrana corioalantóica dos embriões. Essas janelas foram fechadas com auxílio de uma fita isolante de cor preta para minimizar a perda de umidade. Os embriões permaneceram assim, sob incubação, por mais 72 h até a idade embrionária de 6 dias, quando um disco de metilcelulose (1,5%) embebido com 10 µL de extratos nas concentrações de 1000 µg/mL, 500 µg/mL e 100 µg/mL diluídos com álcool etílico foram implantados sobre

os vasos sanguíneos no terço externo da membrana corioalantóica. O orifício foi novamente fechado com a fita goma preta. Assim, a incubação prosseguiu por mais 48 h, até a idade embrionária de 8 dias, quando se realizou a análise da atividade antiangiogênica.

A fita foi retirada e os dados referentes ao desenvolvimento embrionário e vascular na região de implantação do disco foram registrados com uma câmera fotográfica com aumento de 20x, que capturou imagens que foram enviadas para um computador, onde cada imagem em triplicata foi utilizada para se realizar uma contagem de vasos sanguíneos que interceptam o disco e vasos presentes na vizinhança em uma área de 0,9 cm². Os resultados foram expressos como Percentual de vasos ± Desvio-padrão.

Resultados e discussão

Resultado do ensaio sobre a *Artemia salina*

O ensaio frente ao microcrustáceo *A. salina* indica o potencial de toxicidade dos extratos, frações e substâncias. A técnica é descrita por Meyer e colaboradores (1982), onde estes estabeleceram uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média (CL₅₀) apresentada por extratos de plantas sobre larvas de *A. salina*. São considerados tóxicos os extratos onde há acima de 50% de mortalidade das larvas na concentração de 1000 µg/mL.

Mclaughlin, Rogers e Anderson, (1998) mostraram uma correlação positiva entre o teste de toxicidade com *A. salina* com os testes de toxicidade sobre células tumorais. A partir deste estudo, este ensaio tornou-se uma ferramenta de pré-triagem na busca de extrato/substâncias antitumorais.

Para esse ensaio, todos os extratos da *M. guianensis* foram testados na concentração inicial de 1000 µg/mL, os extratos avaliados que se mostraram tóxicos nesta concentração foram testados em concentrações menores, na busca da CL₅₀. Os resultados obtidos mostram que os extratos metanólicos das folhas e galhos e o extrato aquoso das folhas foram tóxicos, por esta razão foram testados na concentração de 500 µg/mL, apenas o extrato aquoso dos galhos mostrou ser atóxico, como podemos observar na tabela 01.

Os resultados obtidos são compatíveis com os de Oliveira et al., (2015), onde os extratos das folhas também se mostraram tóxicas. Podemos atribuir este potencial tóxico do extrato de folhas *M. guianenses* a sua riqueza em triterpenos (CURSINO et al. 2009), pois para esta classe de substâncias foram relatadas atividades antitumorais (DALLA VECHIA, GNOATTO e GOSMANN, 2009; SAFE et al., 2012) que evidenciam a toxicidade destes.

Tabela 01: Resultado do ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina*

Extratos	% de mortalidade	
	1000 µg/mL	500 µg/mL
Folha MeOH	100	44
Galho MeOH	100	17
Folha H ₂ O	66	10
Galho H ₂ O	47	-

Legenda: (-) não testado

Avaliação antibacteriana

Agentes antimicrobianos podem atuar sobre bactérias com 3 mecanismos de ação diferentes. Os bacteriostáticos inibem o crescimento das mesmas, enquanto que os bactericidas as matam efetivamente. A terceira classe, os bacteriolíticos, além de matar as bactérias pelo impedimento da formação da parede celular, ainda eliminam as células mortas pelo processo de lise celular (LONDERO e CARRION, 2015).

Para o desenvolvimento deste trabalho, o extrato metanólico dos galhos foi avaliado quanto ao seu potencial bacteriostático e bactericida. O potencial bacteriostático foi avaliado pelo método da microdiluição para encontrar a menor concentração inibitória (CIM), este método é de grande sensibilidade e necessita de quantidade mínima de reagentes, o que possibilita um maior número de réplicas e confiabilidade dos resultados (ELOFF, 1998; OSTROSKY et al., 2008). Para avaliar o potencial bactericida, foi usado o ensaio de Concentração Bactericida Mínima (CBM). Apesar dos testes em ágar serem os mais utilizados e possuírem vantagens como a simples visualização do halo, eles apresentam desvantagens, pois o uso do

disco imerso no extrato deixa resíduo adjacente ao disco, influenciando na medição dos halos e na concentração do próprio disco (BONA et al., 2014).

O extrato apresentou CIM de 1000 µg/mL, para *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, para as demais bactérias não houve atividade. No ensaio bactericida, porém, não houve atividade para nenhuma das bactérias testadas (Tabela 02). Estes resultados demonstram que o extrato tem potencial antimicrobiano, atuando pelo mecanismo de ação de inibição de crescimento de para *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Tabela 02: Resultado da avaliação antibacteriana do extrato metanólico dos galhos

BACTÉRIAS	Extrato metanólico dos galhos	
	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
<i>Escherichia coli</i>	1000	N/A
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	N/A	N/A
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1000	N/A
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	N/A	N/A

Legenda: CIM: Concentração inibitória mínima; N/A: Não ativo; CBM: Concentração bactericida mínima

Avaliação de atividade antifúngica das fases

Para este estudo também foi utilizado o método da diluição com o intuito de encontrar a concentração inibitória mínima, desta vez para as fases hidrometanólica, diclorometânica e acetato de etila do extrato metanólico dos galhos frente às cepas de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *C. gatti* (Tabela 03).

Tabela 03: Resultado da avaliação da atividade antifúngica das fases do extrato metanólico dos galhos

Fases	Concentração mínima inibitória (MIC) (µg/mL)		
	<i>Candida albicans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Cryptococcus gatti</i>
F-H-MeOH	800	200	-
F- DCM	-	-	-
F-AcOEt	400	-	-

Legenda: F-AcOEt : Fase Acetato de etila; F-DCM: Fase diclorometânica
F-H-MeOH: Fase hidrometanólica; Não ativo: -.

Neste ensaio a fase hidrometanólica apresentou o melhor resultado, pois apresentou atividade para *C. neoformans* (200 µg/mL) e *C. albicans* (800 µg/mL). A

fase acetato de etila também apresentou atividade promissora para *C. albicans* (400 µg/mL). Enquanto que a fase diclorometano não apresentou atividade para nenhum dos fungos testados. No trabalho predecessor a este, Cursino (2011) experimentou apenas a atividade do extrato bruto metanólico dos galhos frente à *C. gatti*, e em ensaio de bioautografia, observou-se a atividade de diversas frações frente ao mesmo. De uma destas frações ativas, foi isolado o poliacetileno ácido minquartinoico (CURSINO, 2011).

Ensaio antimalárico

A avaliação da atividade antimalárica dos extratos foi feita através da quantidade de parasitas detectados no citômetro de fluxo. Neste caso, o corante brometo de etídio se liga ao material genético do parasita, e a intensidade da fluorescência dos parasitas corados aumenta durante o seu desenvolvimento, a análise por citometria de fluxo apresenta o estágio de desenvolvimento do parasita. Os extratos que apresentam ação antimalárica provocam a morte do parasita e fazem com que o material genético presente nas hemácias não possa ser detectado, uma vez que o parasita não consegue se replicar e invadir novas células (JANSE e VAN VIANEN, 1994).

Com exceção do extrato diclorometânico das folhas, todos os outros extratos foram ativos neste ensaio. Os melhores resultados foram vistos para o extrato diclorometano dos galhos e para os extratos aquosos de galhos e folhas, sendo ativos em todas as concentrações testadas. Os extratos metanólicos das folhas e dos galhos foram ativos inclusive, em concentrações variando de 3,12 µg/mL a 0,39 µg/mL (tabela 04).

Os resultados obtidos neste trabalho são corroborados pelos dados obtidos por Rasmussen et al., (2000), que após estudos etnobotânicos, houve forte indicio do uso de *M. guianensis* como uma das principais espécies utilizadas no tratamento de malária e leishmania por comunidades tradicionais do Peru. A partir desse dado, o mesmo grupo de pesquisa realizou o fracionamento bioquímico das cascas de *M. guianensis*, que revelou que o potencial antiparasítico desta espécie está associado ao principal constituinte do extrato, o ácido minquartinoico, um poliacetileno, que está presente em quantidade extramente grande no extrato, constituindo de 2-3% do peso seco do extrato. Ainda neste estudo, o ácido minquartinoico foi testado frente

ao *Plasmodium falciparum* e *Leishmania major* obtendo atividade *in vitro* moderada (RASMUSSEN et al., 2000).

O ácido minquartinoico foi isolado pela primeira vez em *M. guianensis* por Marles e colaboradores (1989) do extrato clorofórmico das cascas. O mesmo ácido foi obtido e testado por Cursino (2011), o qual apresentou atividade bactericida e bacteriostática frente à *Aeromonas hydrophila*, bem como atividade antifúngica frente à *C. gatti* em frações onde o mesmo estava presente.

Cursino et al. (2012), também mostrou em seu estudo com extratos diclorometânicos e os triterpenos isolados apresentaram atividade antimalárica. Para este poliacetileno, já foi relatado a ação frente ao *Plasmodium falciparum* e *Leishmania major* (RASMUSSEN et al., 2000).

Tabela 04: Resultado da avaliação antimalárica

Extratos	Concentração (mg/mL)							
	50	25	12,5	6,5	3,12	1,56	0,78	0,39
DCM Galhos	+	+	+	+	+	+	+	+
DCM Folhas	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ O Galhos	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ O Folhas	+	+	+	+	+	+	+	+
MeOH Galhos	-	-	-	-	+	+	+	+
MeOH Folhas	-	-	-	-	+	+	+	+

Legenda: (+) Ativo, (-) Não ativo

Ensaio da atividade antiangiogênica

Câncer é um nome geral dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento desordenado de células que tendem a invadir tecidos e órgãos vizinhos (INCA, 2017). É caracterizado por um desvio nos mecanismos de controle dos processos de proliferação e diferenciação celular. As lesões expansivas, denominadas tumores ocorrem em órgãos sólidos, à medida que se desenvolvem, podem comprimir ou invadir estruturas adjacentes normais (SILVA,

2007). Para que estas células possam se desenvolver é necessária uma fonte de suprimento sanguíneo constante, ocorrendo uma vascularização maior do que nos tecidos normais (PINHO, 2005).

O uso da membrana corioalantóica de embrião de galinha é um modelo experimental versátil e uma alternativa atual para a investigação *in vivo* de diversos processos fisiológicos, como a angiogênese. Em todos os modelos experimentais de angiogênese a etapa de contagem do número total de vasos e dos neovasos é de suma importância, permitindo assim a determinação dos efeitos dos estímulos pró ou antiangiogênicos (EGOSHI et al., 2015).

O extrato diclorometânico das folhas apresentou atividade antiangiogênica em todas as concentrações testadas (Figura 03), as concentrações de 100 µg/mL e de 500 µg/mL apresentaram inibição de formação de vasos de aproximadamente 30% e 35%, respectivamente. Enquanto o extrato na concentração de 1000 µg/mL, apresentou inibição de 70% quando comparado ao controle (gráfico 01).

Figura 03: Atividade Antiangiogênica apresentado pelo extrato Folha DCM

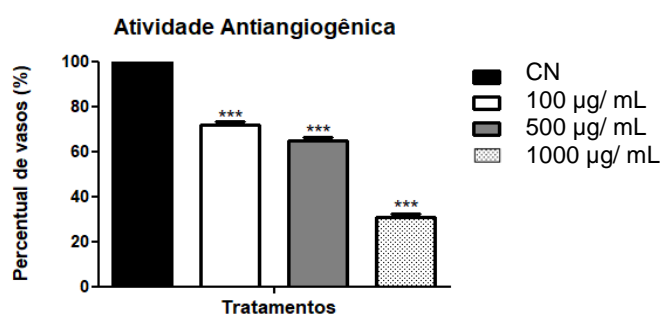
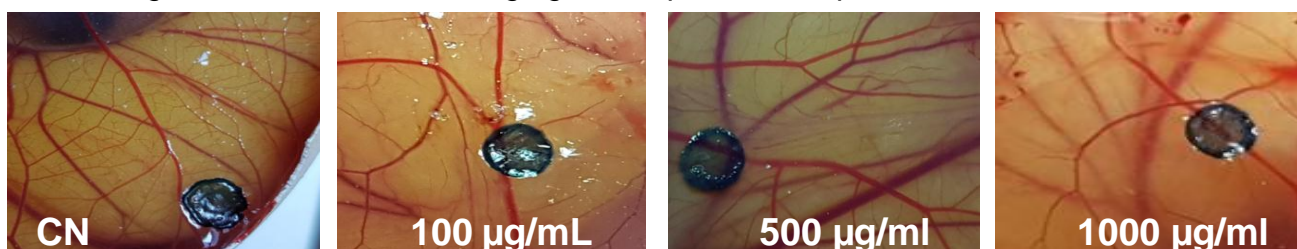


Gráfico 01: Atividade Antiangiogênica dose-dependente apresentada pelo extrato Folha DCM. Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão, n=3. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle negativo (CN).

Na avaliação com o extrato diclorometânico dos galhos (Figura 04), o extrato também apresentou atividade em todas as concentrações testadas, apresentando o percentual de inibição de formação de novos vasos de 25%, 60% e 85% de vasos

nas concentrações de 100 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL, respectivamente (gráfico 04).

Figura 04: Atividade Antiangiogênica apresentado pelo extrato Galho DCM

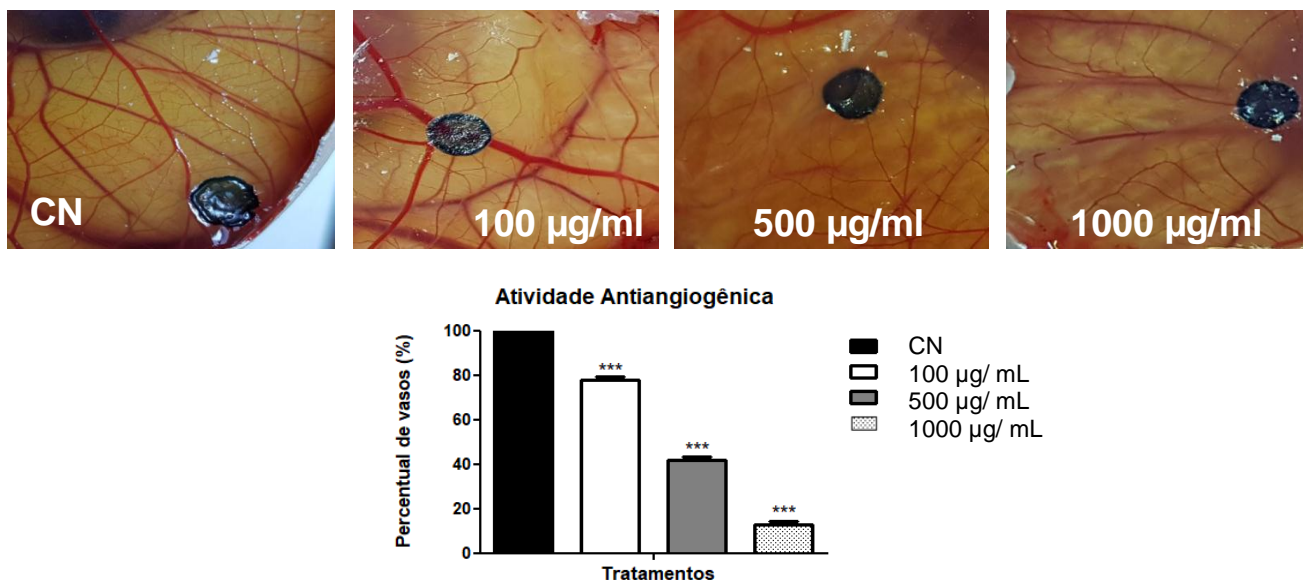
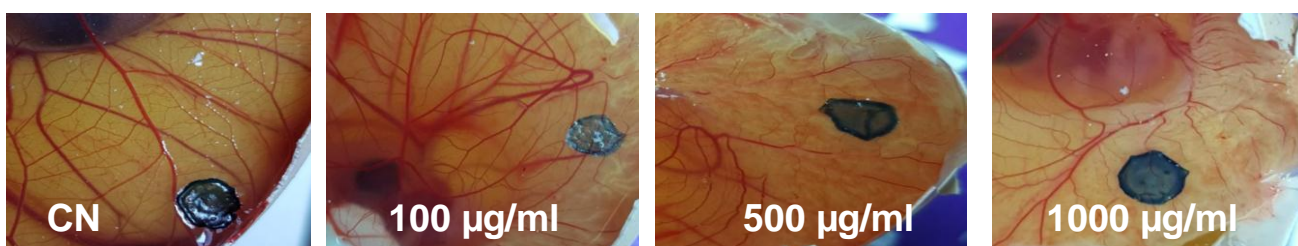


Gráfico 02: Atividade Antiangiogênica dose-dependente apresentada pelo extrato Galho DCM. Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão, n=3. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle negativo (CN).

Na avaliação da atividade antiangiogênica frente ao extrato metanólico dos galhos (Figura 05), o extrato na concentração de 100 µg/mL apresentou o percentual de 30% de inibição de formação de novos vasos, enquanto que o extrato na concentração de 500 µg/mL apresentou o percentual de 50%, porém o resultado mais promissor foi na concentração de 1000 µg/mL que mostrou um efeito de 90% de inibição de formação de novos vasos (gráfico 03).

Figura 05: Atividade Antiangiogênica apresentado pelo extrato Galho MeOH



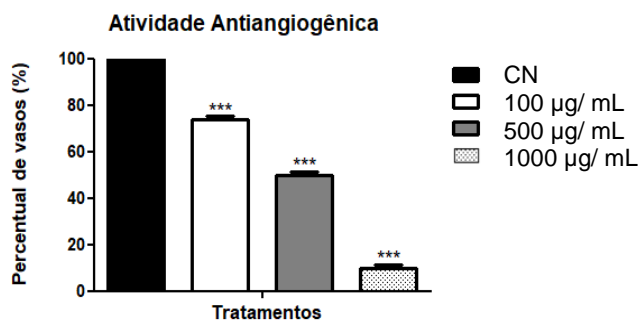


Gráfico 03: Atividade Antiangiogênica dose-dependente apresentada pelo extrato Galho MeOH. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=3. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle negativo (CN).

Na avaliação da atividade antiangiogênica do extrato metanólico das folhas (Figura 06), o extrato foi tóxico nas concentrações de 1000 $\mu\text{g/mL}$ e 500 $\mu\text{g/mL}$, ocasionando a morte do embrião, por esta razão não foi realizado a contagem do número de novos vasos nestas concentrações, contudo quando analisado na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, o extrato apresentou um número significativo de inibição de aproximadamente 50% de formação de novos vasos, futuros estudos com este extrato serão realizados em concentrações menores (gráfico 04).

Figura 06: Atividade Antiangiogênica apresentado pelo extrato Folha MeOH

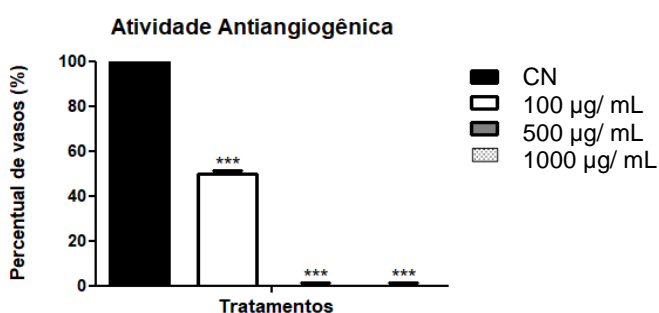
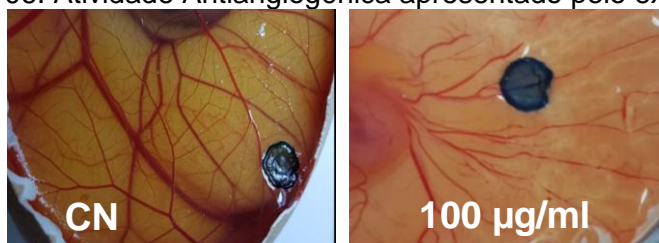


Gráfico 04: Atividade Antiangiogênica dose-dependente apresentada pelo extrato de Folha MeOH. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=3. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle negativo (CN).

O extrato aquoso das folhas foi o extrato que apresentou melhor resultado de atividade antiangiogênica (Figura 07), o extrato na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$

apresentou o percentual de inibição de 50% de vasos, enquanto que os extratos na concentração de 500 µg/mL e 1000 µg/mL, apresentaram inibição de formação de novos vasos entre 70% e 90% de vasos, respectivamente (gráfico 05).

Figura 07: Atividade Antiangiogênica apresentado pelo extrato Folha H₂O

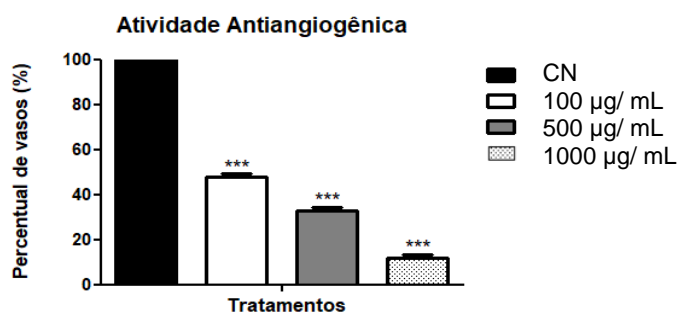
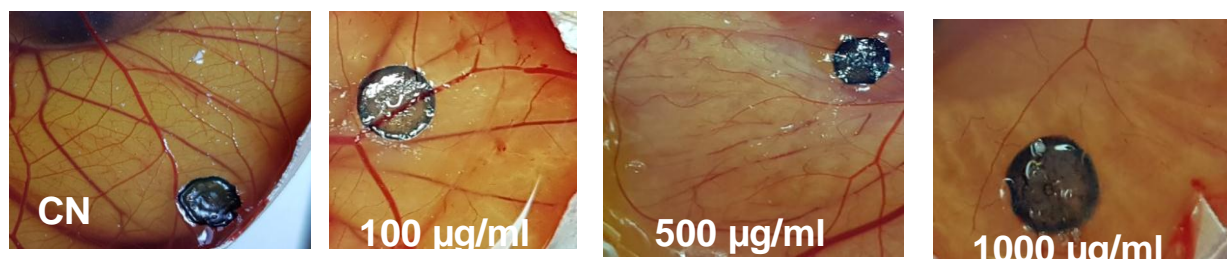
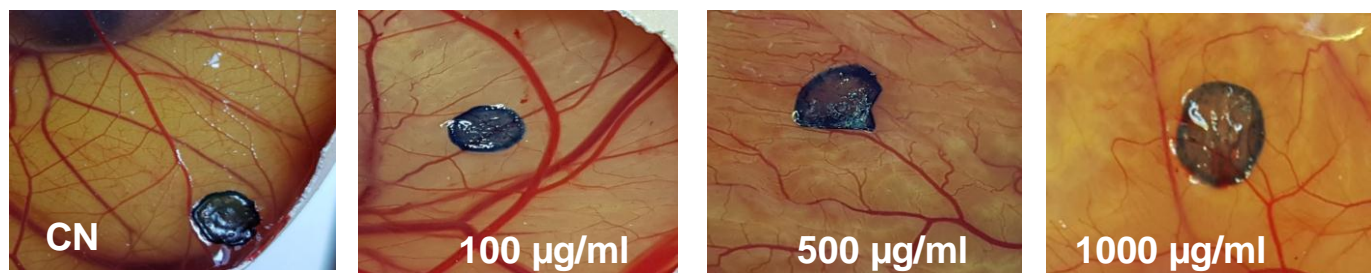


Gráfico 05: Atividade Antiangiogênica dose-dependente apresentada pelo extrato Folha H₂O. Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão, n=3. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle negativo (CN).

E por fim, na avaliação da atividade antiangiogênica do extrato aquoso dos galhos (Figura 08), o extrato na concentração de 100 µg/mL apresentou o percentual de inibição de 30% de vasos, enquanto que os extratos na concentração de 500 µg/mL e 500 µg/mL, apresentaram inibição de 60% e 50% de vasos, respectivamente (gráfico 06).

Figura 08: Atividade Antiangiogênica apresentado pelo extrato galho H₂O



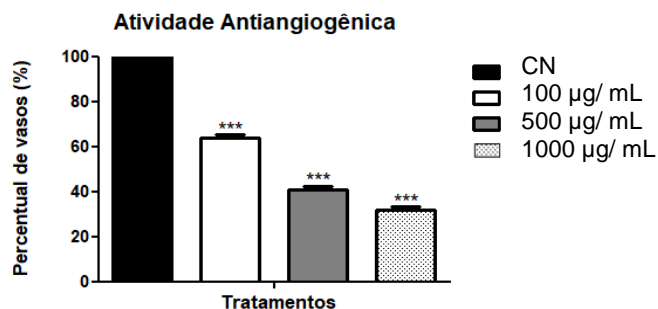


Gráfico 06: Atividade Antiangiogênica dose-dependente apresentada pelo extrato Galho H₂O. Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão, n=3. (***) representa diferença estatística significativa (p<0,001) em relação ao grupo controle negativo (CN).

Os dados obtidos demonstram que o aumento da concentração dos extratos, aumenta a atividade antiangiogênica, ou seja, inibe a formação de novos vasos. Todos os extratos testados apresentaram atividade antiangiogênica, sendo os mais promissores o extrato metanólico e o aquoso das folhas. A inibição da angiogênese é atualmente percebida como uma das estratégias promissoras no tratamento do câncer (PRATHEESHKUMAR et al.,2012). Esse é o primeiro relato de atividade antiangiogênica com a espécie *M. guianensis*.

Conclusão

No presente trabalho, os extratos de *Minquartia guianensis* apresentam toxicidade frente à *Artemia salina*.

A avaliação através de testes antibacterianos demonstrou que o extrato metanólico dos galhos apresentou atividade frente às bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

A avaliação antifúngica das fases do extrato metanólico dos galhos desmostrou que a fase hidrometanólica apresentou atividade para *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* e a fase de acetato de etila mostrou-se ativa para *C. albicans*.

Quanto aos ensaios antimaláricos todos os extratos foram ativos, com exceção do extrato diclorometânico das folhas.

Todos os extratos testados apresentaram atividade antiangiogênica, enfatizamos que este é o primeiro relato desta atividade com a espécie *M. guianensis*.

Os resultados obtidos contribuíram para o conhecimento da atividade biológica e mostraram o grande potencial da espécie *M. guianensis*.

Referências

- AMERICAS REGIONAL WORKSHOP (Conservation & Sustainable Management of Trees, Costa Rica, November 1996) *Minquartia guianensis*. The IUCN Red List of Threatened Species, 1998.
- ANVISA. Antimicrobianos - Bases teóricas e uso clínico. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/propriedades4.htm>.
- BONA, E. A. M.; PINTO, F. G. S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C.M.; MOURA, A. C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, p. 218–225, 2014.
- CLSI, W. P. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard, Pennsylvania 19087-1898 USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003.
- COSTA, C.; PAIS, P.; TEIXEIRA, M. C. Multidrug resistance in pathogenic yeasts : emphasis on the role of ABC and MFS multidrug transporters. In: The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, **Technological Advances and Educational Programs**. Editora A. Méndez-Vilas; 2015. p. 947–954.
- CUNHA, A. L.; MOURA, K. S.; BARBOSA, J. C.; SANTOS, A. F. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas Journal**, v.1, p. 175-181, 2016.
- CURSINO, L.M.C.; MESQUITA, A. S. S.; MESQUITA, D.W. O.; FERNANDES, C.C.; PEREIRA JUNIOR, O. L.; AMARAL, I. L.; NUNEZ, C.V. Triterpenos das folhas de *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae). **Acta Amazonica**, v. 39, n. 1, p. 181-185, 2009.
- CURSINO, L. M. C. Estudo fitoquímico e bioatividade dos extratos e frações de *Minquartia guianensis* (Olacaceae) p.121. 2011. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Recursos Naturais) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus. 2011.
- DALLA VECHIA, L.; GNOATTO, S. C. B.; GOSMANN, G. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade

antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1245-1252, 2009.

EGOSHI, C.T; ZERBINI, D.; UTUMI, P. H .; STUELP-CAMPELO, P. M.; ZISCHLER, L. C. M; MORENO-AMARAL, A. N.; ELIFIO-ESPOSITO, S. Quantificação da angiogênese induzida por tumor em membrana corioalantóica de embrião de galinha. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 1, p. 303-310, 2015.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Médica**, v.64, p.711-713, 1998.

GOTTI, R. Capillary electrophoresis of phytochemical substances in herbal drugs and medicinal plants. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p.775–801, 2011.

Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Educação ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. 3ª ed. rev. e atual. Rio de Janeiro: INCA; 2017.

JANSE, C. J.; VAN VIANEN, P. H. Flow Cytometry in Malaria Detection. **Flow Cytometry**, v. 42, p. 295, 1994.

LONDERO, A. A.; CARRION, J. C., Bactericida vs. Bacteriostático. 2015. Disponível em: < <http://tnsolution.com.br/2015/11/18/bactericida-vs-bacteriostatico>>. Acesso em: 12 de Dezembro de 2017.

MCLAUGHLIN, J. L. ; ROGERS, L.L.; ANDERSON, J. E. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, v.32, p. 513-524, 1998.

MARIATH, I. R.; FALCÃO, H. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SOUSA, L. C. F.; TOMAZ, A. C. A.; BATISTA, L. M.; DINIZ, M. F. F. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L. Plants of the American continent with antimalarial activity. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 19, n. 1, p. 158-191, 2009.

MARLES, R.J.; FARNSWORT, N. R. Isolation of a novel cytotoxic polyacetnene from a traditional anthelmintic medicinal plant *Minquartia guianensis*. **Journal of Natural Products**, v.52, p.261-266,1989.

- MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHIN, J.L. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, n.5, p. 31-34, 1982.
- NGUYEN, M., SHING, Y. FOLKMAN, J. Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick-embryo chorioallantoic membrane. **Microvascular Research**, v.47, n.1, p.31-40, 1994.
- NICOLA, A. M.; ALBUQUERQUE, P.; MARTINEZ, L. R.; DAL-ROSSO, R. A. SAYLOR, C.; JESUS, M.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Macrophage Autophagy in Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. **American Society for Microbiology Journal**, v. 80, n. 9, p. 3065–3076, 2012.
- OLIVEIRA, A. C. D. E.; MESQUITA, D. W. O. ; MESQUITA, A. S. S. ; FERNANDES, C. C. ; PINHEIRO, C. C.; SOUZA, E. S.; OSORIO, I. C.; CURSINO, L. M.C.; MARINHO, J. V. N. ; BELESA, M. M. B. ; AMARAL, I. L. ; NUNEZ, C. V. Brine Shrimp Bioassay of Plants of the Brazilian Amazon Rainforest. **European academic research**. v. 2, p. 14615–14619, 2015.
- OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Divulgação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301–307, 2008.
- PINHO, M. S. L. Angiogênese: o gatilho proliferativo. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v.25, n.4, p. 396-402, 2005.
- PRATHEESHKUMAR, P.; BUDHRAJA, A.; SON, YO; WANG, X.; ZHANG, Z.; DING, S.; WANG, L.; HITRON, A.; LEE, J.C.; XU, M. CHEN, G.; LUO, J.; SHI, X. Quercetin Inhibits Angiogenesis Mediated Human Prostate Tumor Growth by Targeting VEGFR- 2 Regulated AKT/mTOR/P70S6K Signaling Pathways. **Plos one**, v.7, n.10, 2012.
- RASMUSSEN, H. B.; CHRISTENSEN, S. B.; KVIST, L. P.; KHARAZMI, A.; HUANSI, A. G. Absolute Configuration and Antiprotozoal Activity of Minquartynoic Acid. **Journal Natural Products**, v. 63, n. 9, p. 1295–1296, 2000.
- ROSSI, L. 2015 *Olacaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB19958>>. Acesso em: 26 de dezembro de 2017.
- SAFE, S. H., PRATHER, P. L., BRENTS, L. K., CHADALAPAKA, G., JUTOORU, I. Unifying Mechanisms of Action of the Anticancer Activities of Triterpenoids and

Synthetic Analogs. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 12, n.10, p.1211–1220, 2012.

SILVA, T. H. A.; BUTERA, A. P.; LEAL, D. H. S.; ALVES, R. J. Agentes antitumorais inibidores da angiogênese – Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, 2007.

SILVEIRA, L. H. C.; REZENDE, A. V.; VALE, A. T. Teor de umidade e densidade básica da madeira de nove espécies comerciais amazônicas. **Acta Amazonica**, v. 43, n. 2, p. 179-184, 2013.

SOLDATELLI, R.P.P.; LORENZINI, E. Estratégias para prevenção de resistência bacteriana: contribuições para a segurança do paciente. **Revista Cuidarte**, v.5, n. 2 p. 757-764, 2014.