



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Volume 8 - Número 2

REVISTA FITOS

Volume 8 - Número 2
Julho - Dezembro 2013

REVISTA
FITOS[®]

ISSN 1808-9669

Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Fitoterápicos

Uma revisão bibliográfica sobre Araceae com foco nos gêneros *Pistia*, *Philodendron* e *Montrichardia*: aspectos botânicos, fitoquímicos e atividades biológicas

Atividade antimicrobiana in vitro de extratos da casca do caule e da vagem de *Libidibia ferrea* L. frente a microrganismos da cavidade bucal.

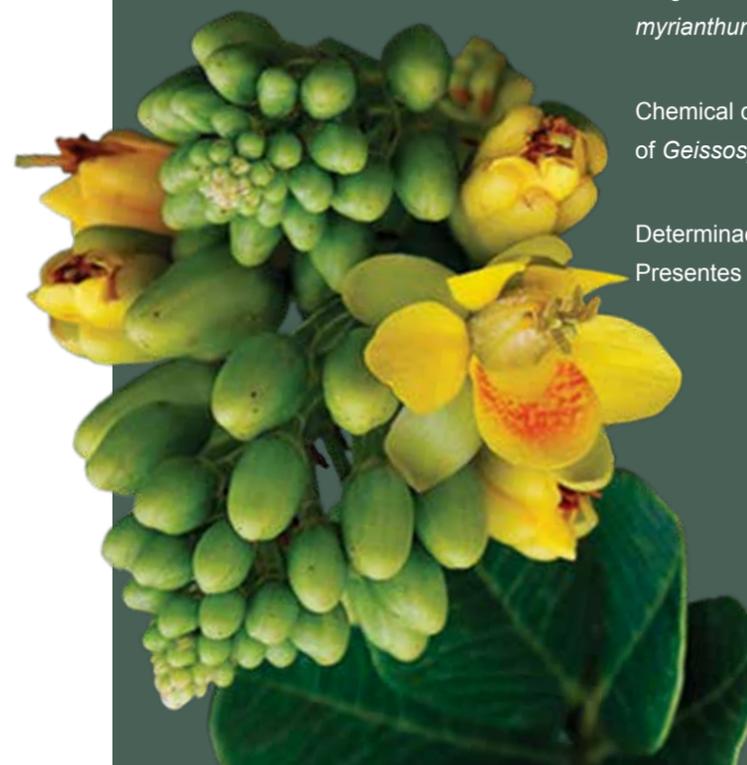
Perfil de Utilização de Fitoterápicos nos Municípios de Volta Redonda e Barra Mansa/RJ

Ação dos extratos de *Neoregelia compacta* (Mez) L.B. Smith e *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker sobre as formas imaturas de *Aedes (Stegomyia) aegypti*, Linnaeus, 1762.

Bioguided isolation of an antiviral compound from *Xylophragma myrianthum* (Cham.) Sprague (Bignoniaceae Juss.)

Chemical composition, ethnopharmacology and biological activity of *Geissospermum* Allemão species (Apocynaceae Juss.)

Determinação da Propriedade Antioxidante e Teores de Minerais Presentes nas Folhas de *Azadirachta indica* A. Juss.



Caesalpinia ferrea C. Mart



ISSN 1808-9569

Presidente da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ): Paulo Ermani Gadelha Vieira

Diretor do Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos): Hayne Felipe da Silva

Coordenador do Núcleo de Gestão em Biodiversidade e Saúde (NGBS): Glauco de Kruse Villas-Bôas

Editor Coordenador: Alaíde Braga de Oliveira, UFMG

Editores Assistentes: Adrian M. Pohlit, INPA

Fatima Checheto, UNESP

Jislaine de Fátima Guilhermino Pereira, FIOCRUZ

José Eduardo Lahoz da Silva Ribeiro, UEL

José Maria Gusman Ferraz, UNICAMP

Maria Augusta Arruda, FIOCRUZ

Pedro Barcellos de Souza, INCA

Editor Executivo: Rosane de Albuquerque dos Santos Abreu, FIOCRUZ

Corpo Editorial:

Alphonse Kelecom - INPA

Ângelo da Cunha Pinto - UFRJ

Armando Cáceres – Universidad de San Carlos de Guatemala

Benjamin Gilbert – Farmanguinhos/FIOCRUZ

Clélia Akiko Hiruma-Lima – UNESP - Botucatu

Edeltrudes de Oliveira Lima - UFPB

Elfriede Marianne Bacchi - USP

Elsie Franklin Guimarães - JBRJ

Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha - UFBP

Glauce Socorro de Barros Viana - UFCE

Glyn Mara Figueira - UNICAMP

João Batista Calixto - UFSC

João Carlos Palazzo de Mello - UEM

João Ernesto de Carvalho – CPQBA - UNICAMP

José Maria Barbosa-Filho - UFPB

Humberto Bizzo – EMBRAPA RJ

Lauro Xavier Filho – Universidade Tiradentes

Lígia Maria Marino Valente - UFRJ

Lin Chau Ming – UNESP- BOTUCATU

Luis Carlos Marques - UNIBAN

Luis Vitor Sacramento – UNESP- Araraquara

Luiz Claudio Di Stasi – UNESP - Botucatu

Mahabir Gupta – Universidad do Panamá

Maria Aparecida Medeiros Maciel - UFRN

Maria Auxiliadora Coelho Kaplan - UFRJ

Maria Cristina Marcucci Ribeiro - UNIBAN

Mary Ann Foglio – CPQBA - UNICAMP

Nídia Franca Roque - UFBA

Paulo César Vieira - UFSCar

Pedro Melillo de Magalhães - CPQBA - UNICAMP

Pedro Ros Petrovick - UFRS

Rivaldo Niero - UNIVALI

Rosendo Augusto Yunes - UFSC

Suzana Guimarães Leitão - UFRJ

Valdir Cechinel Filho – Universidade do Vale do Itajaí

Valdir Florêncio Veiga Junior - UFAM

Vanderlan da Silva Bolzani – UNESP - Araraquara

Wagner Villegas - UNESP – Araraquara



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



REVISTA FITOS

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos

Núcleo de Gestão em Biodiversidade e Saúde - NGBS

Correspondência / Mail

Toda correspondência deve ser enviada para:

All mail should be sent to:

Núcleo de Gestão em Biodiversidade e Saúde - NGBS

Complexo Tecnológico de Medicamentos – CTM Farmanguinhos, FIOCRUZ

Av. Comandante Guarany, 447 Jacarepaguá - Rio de Janeiro

RJ - CEP 22775-903

revistafitos@far.fiocruz.br

tel.: (21) 3348-5370, 3348-5598

Assinaturas/Subscriptions

Pedidos e informações sobre assinaturas podem ser obtidos por telefone ou e-mail.

Subscriptions orders or enquiries may be obtained by phone or e-mail.

Tel: (21) 3348-5370, 3348-5598

E-mail : revistafitos@far.fiocruz.br

Acesso on-line / On line Access

Os artigos estão disponíveis em formato PDF no endereço eletrônico do portal das RedesFito:

www.redesfito.far.fiocruz.br

Classificação CAPES-Qualis

Qualis B5 (Medicina e Ciências Biológicas II, Biodiversidade, Saúde Coletiva)

Qualis B4 (Engenharia e Biodiversidade)

Qualis C (Ciências Biológicas I e II, Farmácia, Biotecnologia, Química)

Escritório Editorial

Gerente Editorial – Preciosa de Jesus Meireles de Oliveira

Gerente de Comunicação – Denise Monteiro da Silva

Design e Auxiliar de Editoração Eletrônica – Eugênio Fernandes Telles

Revisora – Tatiana Vasconcelos Chaves Pontes

Auxiliar Administrativo – Luana Antonio Oliveira

Associada à ABEC

**Associação Brasileira
de Editores Científicos**



A Revista Fitos, que circula desde 2005, teve sua história marcada por grandes dificuldades, principalmente de ordem financeira. Em 2009, com o agravamento desta situação, o Núcleo de Gestão em Biodiversidade e Saúde (NGBS) de Farmanguinhos-FIOCRUZ assumiu o orçamento e a gestão editorial para sua realização, levando em conta sua importância para a ciência, tecnologia e inovação na área de plantas medicinais. Com isso, tivemos dificuldades em manter a periodicidade pretendida, que é de ser uma revista quadrimestral. Exatamente por estas dificuldades é que estamos publicando, com atraso, o volume 8, número 2. Apesar destas dificuldades, especialmente no campo da captação de artigos e do tempo de referagem, natural em qualquer revista científica jovem, a equipe de editoria e o escritório de gestão vem trabalhando para superar os obstáculos.

Em atendimento ao movimento internacional de acesso livre ao conhecimento científico, assim como à Política de Acesso Aberto ao Conhecimento da FIOCRUZ, a Revista Fitos do NGBS-Farmanguinhos/Fiocruz acaba de lançar o periódico na modalidade eletrônica, cujo endereço é <http://revistafitos.far.fiocruz.br>.

Tem sido prioridade da equipe editorial a melhoria da visibilidade de tão importante periódico. No seu escopo multidisciplinar, publica artigos das várias áreas do conhecimento que compõem a cadeia produtiva de medicamentos da biodiversidade, visando fortalecer a base de conhecimentos para a inovação destes medicamentos.

Atendendo ainda ao objetivo de ampliar a visibilidade da revista, informamos que hoje os artigos terão DOI e estamos trabalhando para a melhoria de sua indexação. Trata-se de um desafio conseguir atender aos critérios das diferentes bases, especialmente do Scielo.

Convidamos, assim, a toda comunidade científica a embarcar conosco neste desafio.

Editores da Revista Fitos

ERRATA

Informamos que na edição anterior da revista Fitos, o período correto a que a publicação se refere é de JANEIRO-JUNHO 2013.

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca de
Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

Revista Fitos: pesquisa, desenvolvimento e inovação em fitoterápicos. / Fundação Oswaldo Cruz; Instituto de Tecnologia em Fármacos; Núcleo de Gestão em Biodiversidade e Saúde. – v.1, n.1, (Jun. 2005), - . Rio de Janeiro: NGBS, 2005 – v.: il.

Anual: 2007 e 2011

Interrompida: 2008

Quadrimestral: 2010

Trimestral: 2012

Semestral: 2005, 2006, 2009, 2013

ISSN 1808-9569

1. Fitoterápicos. 2. Fitofármacos. 3. Medicamentos de origem vegetal. 4. Biodiversidade. 5. Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PD&I) I. Fundação Oswaldo Cruz. II. Instituto de Tecnologia em Fármacos. Núcleo de Gestão em Biodiversidade e Saúde.

CDD 615.12

Revista Fitos
ISSN 1808-9569
Volume 8, número 2
Julho-Dezembro, 2013

BOTÂNICA

Uma revisão bibliográfica sobre Araceae com foco nos gêneros *Pistia*, *Philodendron* e *Montrichardia*: aspectos botânicos, fitoquímicos e atividades biológicas
A bibliographic review on the family Araceae with foccus on the genera Pistia, Philodendron and Montrichardia: botanical, phytochemical and biological activity aspects

João Victor da S. Silva; Diele M. do Rosário; Andreza do S. S. da Veiga; Flávio de Vasconcelos;
Sandro Percário; Maria F. Dolabela

79-93

FARMACOLOGIA

Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos da casca do caule e da vagem de *Libidibia ferrea* L. frente a microorganismos da cavidade bucal

Antimicrobial activity in vitro of extracts of the stem bark and fruit of Libidibia ferrea L. against microorganisms of the oral cavity

Glauber P. Oliveira; Tatiane P. Souza; Sheila K. Caetano; Kaliny S. Farias;
Gisely N. Venancio; Maria F. C. L. Bandeira; Nikeila C. O. Conde

95-102

FARMACOLOGIA

Perfil de Utilização de Fitoterápicos nos Municípios de Volta Redonda e Barra Mansa/RJ
Profile for use of herbal medicines in the municipalities of Volta Redonda and Barra Mansa/RJ

Ana Paula Martinazzo; Luiz Carlos C. Filho; Débora A. Rosa; Carlos Eduardo S. Teodoro, Kallyanne Karla Tomazelli

103-112

QUÍMICA

Ação dos extratos de *Neoregelia compacta* (Mez) L.B. Smith e *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker sobre as formas imaturas de *Aedes (Stegomyia) aegypti*, Linnaeus, 1762

Action of extracts of Neoregelia compacta (Mez) L.B. Smith and Aechmea fasciata (Lindley) Baker on immature forms of Aedes (Stegomyia) aegypti Linnaeus, 1762

Maria das Graças A. Guimarães; Karine da S. Martins; Michele A.de Carvalho;
Victor A. Kersten; Richard R. B.T.Vieira; Marise Maleck

113-124

QUÍMICA

Bioguided isolation of an antiviral compound from *Xylophragma myrianthum* (Cham.) Sprague (Bignoniaceae Juss.)

Geraldo Célio Brandão, Erna G. Kroon, Allan W. Matos, José D. Souza Filho, and Alaíde B. Oliveira

125-136

QUÍMICA

Composição química, etnofarmacologia e atividade biológica de espécies de *Geissospermum Allemão* (*Apocynaceae* Juss.)

Chemical composition, ethnopharmacology and biological activity of Geissospermum Allemão species (Apocynaceae Juss.)

Marlene Rodrigues Marcelino Camargo; Rodrigo César das Neves Amorim, Luiz Francisco Rocha e Silva, Ana Lúcia Basílio Carneiro, Marcos José Salgado Vital, Adrian Martin Pohlit

137-146

QUÍMICA

Determinação da Propriedade Antioxidante e Teores de Minerais Presentes nas Folhas de *Azadirachta indica* A. Juss.

Determination of Antioxidant Property and Minerals Contained in the Leaves of Azadirachta indica A. Juss.

Denise P. Emerenciano; Angela Maria F. da Cruz; Joherbson Deivid dos S. Pereira; Maria de Fátima V. Moura; Maria Aparecida M. Maciel

147-156

Uma revisão bibliográfica sobre Araceae com foco nos gêneros *Pistia*, *Philodendron* e *Montrichardia*: aspectos botânicos, fitoquímicos e atividades biológicas

A bibliographic review on the family Araceae with foccus on the genera *Pistia*, *Philodendron* and *Montrichardia*: botanical, phytochemical and biological activity aspects

João Victor da S. Silva¹; Diele M. do Rosário¹; Andreza do S. S. da Veiga²; Flávio de Vasconcelos²; Sandro Percário³; Maria F. Dolabela^{2*}

¹ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, R. Augusto Correia, 1, B. Guamá, Belém, PA, Brasil CEP 66075-110

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará. R. Augusto Correia, 1, B. Guamá, Belém, PA, Brasil CEP 66075-110

³ Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará. R. Augusto Correia, 1, B. Guamá, Belém, PA, Brasil CEP 66075-110

Correspondência: *fanidolabela@gmail.com

Resumo

O presente estudo teve como objetivo realizar uma ampla revisão bibliográfica sobre a família Araceae. Esta revisão enfocou os gêneros *Pistia*, *Philodendron* e *Montrichardia* com alegação popular de uso medicinal. A pesquisa foi realizada em diferentes bases de dados, periódicos e livros especializados sobre o tema. A família Araceae é constituída por espécies ornamentais, tóxicas e medicinais. *Pistia stratiotes* conhecida popularmente como erva-de-santa-luzia, repolho-d'água, alface-d'agua e golfo, é usada como diurético, antifebrífugo, para tratamento de estrangúria, hematuria, diabetes, hemoptise, hidropsia, artrite, afecções hepáticas e escorbuto. Entretanto, estas alegações populares carecem de estudos de validação. Em termos químicos, foram isolados esteroides. O gênero mais estudado desta família, em termos de atividades biológicas, é o *Montrichardia*, sendo avaliadas suas atividades antiplasmódica, antibacteriana, antifúngica e antinociceptiva. Entretanto, existe uma carência de estudos fitoquímicos deste gênero. Para *Philodendron*, as principais alegações populares são tratamento da mordida de serpentes, analgésica, purgante, hemostática e vermífuga. Estudos fitoquímicos levaram ao isolamento de sitosteol e outras substâncias. Estudos biológicos confirmaram atividades em *Trypanossoma cruzi* e *Trichomonas vaginalis*, porém os mecanismos envolvidos na toxicidade ainda não estão completamente elucidados. Em síntese, esta família possui diferentes espécies com potencial terapêutico, sendo urgentes estudos que validem os usos medicinais descritos.

Palavras chave: Plantas medicinais; Araceae; *Montrichardia*; *Pistia*; *Philodendron*;

Abstract

The present paper reports a broad literature review on the Araceae family, focusing the genera with popular allegation of medicinal use. The review was carried through different databases, specialized periodicals and books. The Araceae family comprises ornamental, toxic and medicinal plants. Species with allegations of popular use against serpent bites and scurvy, as well as vermifuge, laxative, and hemostatic, among other uses, are described. The *Pistia* genus includes *P. stratiotes*, popularly known as *santa-luzia* with, *repolho-d'água*, *alface-d'agua* and *golfo*, with popular allegations of activity as diuretic, antipyretics, stranguria, hematuria, diabetes, hemoptysis, hydropsy, arthritis, liver affections, and treatment of scurvy. However, these popular allegations lack of validation studies. Phytochemically, steroids have been isolated from this species. Certainly the mostly studied genus of this family in terms of biological activities is *Montrichardia* that has been evaluated for antiplasmodial, antibacterial, antifungal, and antinociceptive activities. Another genus of this family with allegation of popular use is *Philodendron*, with the following allegations: treatment of serpent bites and pain killer, laxative, hemostatic and vermifuges. Phytochemical studies led to the isolation of sitosteol and other substances. Biological studies confirmed activities against *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*, but the mechanisms involved in toxicity are still not completely elucidated. In summary, this family includes different species with therapeutical potential that deserve validation studies.

Keywords: Medicinal plants; Araceae; *Montrichardia*; *Pistia*; *Philodendron*

1. Introdução

Muitas espécies vegetais brasileiras têm um longo histórico de uso popular, porém, apesar de avanços científicos na área de validação científica, ocorridos no Brasil nas últimas décadas, é grande o número de plantas com alegação de uso popular que carece de estudos que confirmem sua atividade biológica, bem como os princípios ativos relacionados (Luna et al., 2005; Amarante et al., 2011a). Os estudos das plantas medicinais brasileiras ocorreram de forma assimétrica sobre vários aspectos. O primeiro aspecto foi o regional, isto é, plantas de alguns biomas foram mais estudadas em termos químicos e de atividade. Outro aspecto relevante foi à priorização de estudos fitoquímicos e de atividades de espécies arbóreas, sendo negligenciados os arbustos e as plantas aquáticas utilizados na medicina tradicional (Lorenzi, 2002).

Araceae Jussieu, nom. cons. (APGIII, 2009), é um exemplo de família que carece de estudos fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos. Algumas espécies são utilizadas popularmente para o tratamento de mordidas de serpentes (Amorozo e Gély, 1988; Ottobelli et al., 2011), ou como vermífugas (Noelli, 1998), entre outros usos terapêuticos. Porém, os estudos dessas são preliminares ou ausentes. Dessa forma, estudos que sumarizem estes resultados podem contribuir para a orientação de pesquisas futuras. A presente revisão descreve os aspectos botânicos e etnobotânicos dessa família, dando ênfase aos estudos fitoquímicos e farmacológicos das espécies com alegação popular de uso medicinal.

2. Metodologia

Foram consultadas diferentes bases de dados, como Pubmed, Web of Science ISI, Scielo, entre outras. Além disso, foram pesquisadas literaturas especializadas brasileiras e de outros países. Os seguintes descritores foram utilizados: Araceae, *Pistia*, *Philodendron*, *Montrichardia* e *Anthurium*. Os trabalhos que relatavam resultados de estudos botânicos, etnobotânicos, fitoquímicos e biológicos, entre estes farmacológicos e toxicológicos, foram incluídos na presente revisão. Devido ao caráter qualitativo das informações não foi possível realizar análises estatísticas.

3. Resultados

3.1. Araceae

A família Araceae é constituída por 110 gêneros (Cronquist, 1981) e representam 2500 a 3000 espécies de angiospermas monocotiledôneas (Grayum, 1990). Cronquist (1981) afirma que, provavelmente, pelo menos metade das espécies dessa família pertence a quatro gêneros: *Anthurium* Schott (500 espécies), *Philodendron* Schott (250 espécies), *Arisaema* Mart. (mais de 100 espécies) e *Amorphophallus* Blume ex Decne (aproximadamente 100 espécies). Os gêneros com maior número de espécies são *Anthurium* e *Philodendron* (Souza e Lorenzi, 2005; Ottobelli et al., 2011). Sua distribuição natural é cosmopolita (Judd et al., 1999), exceto na Antártica

(Grayum, 1990), ocorrendo predominantemente em regiões tropicais (Grayum, 1990; Judd et al., 1999), em especial em florestas tropicais úmidas (Mayo, Borgner e Boyce, 1997). Também ocorre em regiões temperadas (Judd et al., 1999), sendo descritas apenas 10 gêneros nestes locais (Grayum, 1990).

De acordo com Cronquist (1981), a classificação taxonômica de Araceae é a seguinte:

- Divisão: Magnoliophyta
- Classe: Liliopsida
- Ordem: Arales
- Família: Araceae

No sistema APGIII (2009) esta família se inclui entre as angiospermas, sendo uma monocotiledônea, clado Alismatales. São distribuídas em sete subfamílias: Gymnostachydoideae, Orontioideae, Lemnoideae, Monsteroideae, Pothoideae, Lasiodeae, Zamioculcadoideae, Aroideae que diferem de sistemas de classificação anteriores.

Segundo Temponi (2006), há, contudo, controvérsias sobre as subfamílias da família Araceae. Outros estudos recentes discutem com base na filogenia molecular, uma nova classificação para as subfamílias de Araceae (Cabrera et al., 2008; Cusimano et al., 2011), ambos os resultados sendo coerentes com (Mayo et al., 1997).

Segundo Almeida (2006), Araceae pode ser o início de uma linhagem divergente entre as próprias monocotiledôneas, no qual Alismataceae é sua irmã remanescente (Dahlgren, Clifford e Yeo, 1985). Gonçalves (2002) considera que as Araceae podem ter divergido precocemente das monocotiledôneas, onde a classificação intrafamiliar para as Araceae ainda é um assunto controverso. Em Araceae são encontrados laticíferos articulados nos tecidos parenquimatosos e nos feixes vasculares (Cronquist, 1981). Dahlgren e Clifford (1987) citam a ocorrência de tais laticíferos como exemplo da relação filogenética desta família com a Alismataceae. Araceae é considerada monofilética, com base na morfologia e sequência de DNA (Judd et al., 1999). Hahn (1997) comenta a problemática em torno do posicionamento filogenético das monocotiledôneas dentro das angiospermas, especialmente de alguns grupos com características bastante divergentes, como no caso de Alismatanae e Aranae.

No Brasil, ocorrem 35 gêneros e cerca de 400 espécies de Araceae (Souza e Lorenzi, 2005), sendo

a maior diversidade encontrada na Mata Atlântica (Mayo, 1990). Vale ressaltar que este bioma foi o primeiro conjunto de ecossistema brasileiro a sofrer o impacto da exploração irracional (Moura, 2006) e continua sofrendo constante desmatamento (Fundação SOS Mata Atlântica/INPE, 2013). Neste contexto, várias espécies vegetais, incluindo as espécies de Araceae, podem entrar em extinção antes de serem identificadas e estudadas.

A família Araceae possui uma longa história evolutiva, sendo que a maioria dos fósseis foram registrados a partir de latitudes médias e altas. No Norte da Colômbia, foram encontrados folhas fósseis do período Paleoceno e grãos de pólen. Duas das espécies de folhas fósseis apresentaram morfologia foliar semelhantes ao *Anthurium*, porém ainda não foi estabelecida uma relação definitiva entre estes. Ainda no Norte da Colômbia, um tipo de folha fóssil da *Cerrejón*, foi identificada como pertencente ao gênero *Montrichardia*. Vale ressaltar que este foi o primeiro registro fóssil para este gênero. Estes fósseis foram encontrados em uma floresta costeira que existiu a cerca de 60 milhões de anos atrás, em habitat semelhante ao ocupado por exemplares das atuais espécies de Araceae (Herrera et al., 2008).

Em geral, são ervas perenes ou sazonais; caules aéreos eretos, trepadores, reptantes ou subterrâneos, rizomatosos ou tuberosos, entrenós com raízes adventícias. Chama a atenção seus frutos, constituídos por várias bagas parcialmente isoladas ou sincárpicas; sementes com ou sem endosperma, testa fina e espessada (Temponi et al., 2006).

Em termos econômicos, espécies pertencentes a esta família são utilizadas como plantas ornamentais, possuem potencial terapêutico e algumas são relatadas como tóxicas (Vianna, Soares e Appezzato-da-Gloria, 2001). Dentre as espécies ornamentais destaca-se o gênero *Dieffenbachia*. No Brasil, a espécie mais utilizada é a *Dieffenbachia picta* Schott, conhecida como “aningá-do-Pará” ou “comigo-ninguém-pode” (Schutz, 1968). Outra espécie utilizada como planta ornamental é *Pistia stratiotes*, popularmente conhecida por alface-d’água (Kissmann, 1997; Lorenzi, 2000). É uma macrófita aquática, nativa da região sul do continente americano, que se disseminou rapidamente para outras regiões, sendo densa e extensa sua colonização. Uma consequência, devida sua alta capacidade competitiva, é à redução da biodiversidade (Cilliers, Zeller e Strydo, 1996; Winton e Clayton, 1996), prejuízos

a esportes náuticos, entupimento de tubulações em hidrelétricas e canais de irrigação e prejuízos à produção de energia em usinas hidrelétricas, sendo considerada uma das principais plantas daninhas de ambiente aquático no Brasil (Cavenaghi et al., 2003; Cardoso et al., 2005; Cícero et al., 2007).

3.1.1. *Pistia stratiotes*

P. stratiotes pertence à ordem Alismatales R. Br. ex Bercht. & J. Presl e família Araceae Juss. (Engler, 1878). Este gênero possui apenas uma espécie, *Pistia stratiotes*, sendo o único gênero aquático da família Araceae (Bezerra e França, 1999) para a qual são conhecidas várias sinonímias. Esta espécie apresenta algumas variedades, entre elas podemos citar: *Pistia stratiotes* var. *cuneata* Engl., *Pistia stratiotes* var. *linguiformis* (Blume) Engl., *Pistia stratiotes* var. *obcordata* (Schleid.) Engl. e *Pistia stratiotes* var. *spathulata* (Michx.) Engl.

Esta espécie é encontrada em quase todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo (Stalcup, 2000). No Brasil é conhecida pelos seguintes nomes populares: erva-de-santa-luzia, repolho-d'água, alface-d'água e golfo. Morton (1982) e Stalcup (2000) definem em termos botânicos, sendo uma erva aquática ou enraizada em lama, estolonífera; frutos como baga elipsoide ou ovoide; sementes numerosas.

As folhas de *P. stratiotes* são utilizadas como emoliente e para fins oftálmicos (Toursarkissian, 1980). O decocto de folhas frescas é utilizado contra inflamações, especialmente hemorroidas, enquanto que o pó das folhas é usado para o tratamento da sífilis (Lahitte et al., 1998). A planta completa tem sido utilizada como diurético (Silva Filho e Brandão, 1992), antifebrífuga (Liu et al., 2008), estrangúria e hematúria, diabetes, expectoração sanguínea, hidropsia, artrismo e afecções hepáticas (Stalcup, 2000).

Esta espécie, apesar de diferentes usos populares, carece de estudos de validação e são poucos os estudos fitoquímicos. Ayyad (2002) relata o isolamento de (22E, 24R)-ergosta-7,22-dieno-3 β ,5 α ,6 β -triol (1), 7 β -hidroxistosterol (2), sitoindosideo (3), cerebrósideo (4), luteolina (5), crisoeriol-4-glicopiranosideo (6), β -sitosterol (7) e daucoterol (8) (Figura 1).

A maioria dos estudos químicos realizados com *P. stratiotes* avaliou a presença de oxalato de cálcio e seus efeitos. Outros estudos avaliaram a exposição do vegetal a diferentes metais e as consequências em seu metabolismo.

P. stratiotes foi exposta a várias concentrações de 8 metais pesados (Ag, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb e Zn) por 21 dias. Os metais pesados aumentaram a atividade da catalase, peroxidase e superóxido dismutase. No geral, o zinco (Zn) tem a menor indução de enzimas antioxidantes, enquanto o mercúrio (Hg) teve o maior incentivo (Odjegba e Fasidi, 2007).

3.1.2. *Montrichardia linifera*

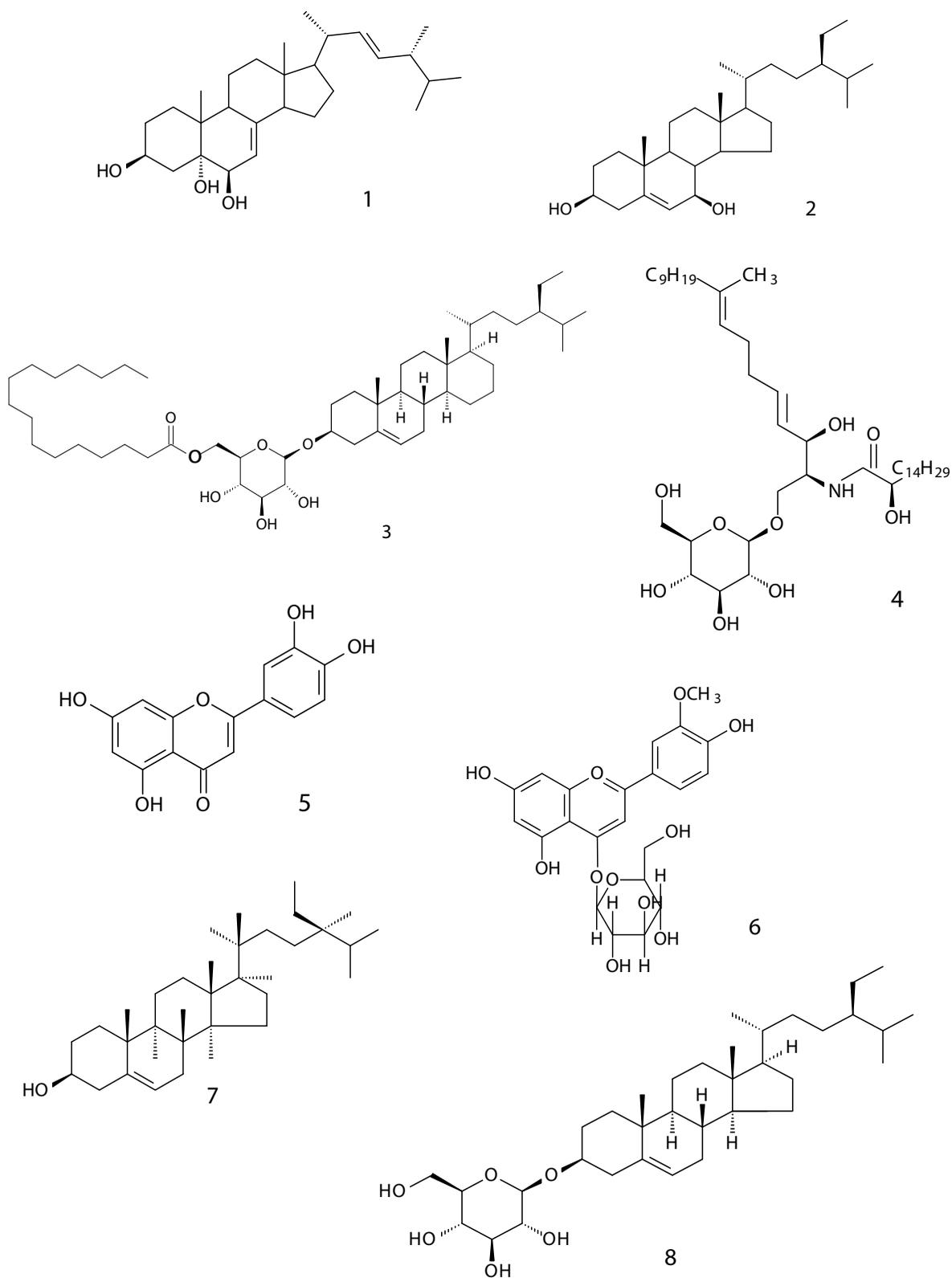
Montrichardia linifera (Arruda) Schott é uma macrófita aquática anfíbia que apresenta a seguinte posição taxonômica: família Araceae, subfamília Lasiodeae, tribo Montrichardiae, gênero *Montrichardia* Crüger (Engler, 1911). *M. linifera* ainda possui como sinonímia *Arum linifera* Arruda, *Caladium liniferum* (Arruda) Ness e *Philodendron cyclophyllum* K. Krause. (Coelho, 2013).

Esta espécie é herbácea, com 4-6 m de altura, de caule aéreo com evidentes nós, entrenós e dilatado na base. A infrutescência de *M. linifera* é de cor verde a verde-amarelada, e inteiras; não exalam nenhum aroma e, externamente, assemelham-se ao abacaxi. Os frutos (frutículos) caracterizam-se por apresentar forma cônica de coloração amarelo-pálida na parte interna, que exala aroma adstringente, persistente e desagradável ao olfato. Estes frutos destacam-se da infrutescência semelhantes a gomos, geralmente com uma semente dentro (Amarante et al., 2011b).

M. linifera é conhecida popularmente como aninga, aningaçu e aningaíba (Medina, 1959; Pulle e Lanjouw, 1968). É uma macrófita aquática, ocorre nas regiões tropicais (Mayo, Borgner e Boyce, 1997) e que se desenvolve em solos cobertos por água ou saturados por água, sendo distribuída nas várzeas amazônicas (Lins e Oliveira, 1994). Pode ainda ser encontrada em diversos ecossistemas inundáveis como: os igapós, margens de rios, furos e igarapés. Há também registros de sua ocorrência na margem do baixo Rio São Francisco, no Estado de Sergipe (Holanda et al., 2005), Piauí, Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil, Suriname (Macedo et al., 2005). Também foi descrita sua ocorrência em ambas as entradas, do Atlântico e do Pacífico, no Canal do Panamá (Panama, 2004).

Os ribeirinhos amazônicos consideram a *Montrichardia linifera* como venenosa, porque sua seiva causa queimaduras na pele e pode causar cegueira (Amarante et al., 2009). A irritação causada na pele pode ser atribuída à presença de cristais de oxalato de cálcio (Genua e Hillson, 1985) presentes na

Figura 1 - Estruturas de substâncias isoladas de *Pistia stratiotes*.



forma de drusas e ráfides nas folhas (Macedo et al., 2005) e nas raízes (Lins, 1994).

Essa espécie é usada na medicina tradicional por sua propriedade cicatrizante (Amarante, 2011b), anti-reumática (Macedo et al., 2005), hemoptise (Silva et al., 2009), expectorante (Lins, 1994), tratamento de tosse persistentes (Rodrigues, 2007), diurético, anti-inflamatório (Piedade, Schöngart e Junk, 2005), antiulceroso (Plowman, 1969), diabetes, tuberculose (Andel, 2000) e impingens (Amarante et al., 2009). Também é utilizada em compressas e emplastos no tratamento de abscessos no local de lesões provocadas por ferroada de arraia e mordidas de serpentes (Amorozo e Gély, 1988). Essas compressas e emplastos são, também, utilizados no tratamento de tumores (Matos, 2000).

Em relação às atividades biológicas de extratos, frações e substâncias isoladas de *M. linifera* poucos estudos foram realizados, sendo que, a maioria destes avaliou a atividade antimicrobiana e anti-parasitária. A atividade antimicrobiana foi avaliada frente às espécies *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, de diferentes tipos de extratos obtidos de *M. linifera*. A técnica utilizada nesta avaliação foi à difusão em ágar, a concentração de 500 µg/disco de cada extrato. Após 24h de exposição para bactérias e 48h para fungos, não foram observados halos de inibição (Amarante, 2010).

Outro estudo determinou a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato metanólico seco (EMS), do extrato metanólico fresco (EMF), do extrato etanólico seco (EES) e do extrato etanólico fresco (EEF) de *M. linifera*, em 6 linhagens bacterianas, sendo 3 Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) e 3 Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). Os resultados mostraram que EMS apresentou CIM de 400 µg/mL para as linhagens *S. aureus* e *S. epidermidis* e 200 µg/mL para *E. faecalis*. Para EMF e EES foram determinados CIM de 2.000 µg/mL (*S. aureus* e *S. epidermidis*) e 250 µg/mL (*E. faecalis*). Já para EEF não se observou inibição contra estas linhagens bacterianas nas concentrações testadas. Não foi observada nenhuma inibição das linhagens Gram negativas, nas concentrações testadas (Miranda, Rocha e Andrade, 2013). Os autores não deixam claro qual a metodologia utilizada, se o

teste de difusão em Agar ou a microdiluição para a determinação da CIM.

Estes dois trabalhos (Amarante, 2010; Miranda, Rocha e Andrade, 2013) mostraram que esta planta, nas condições testadas, não foi ativa contra bactérias Gram negativas. Em relação à atividade antifúngica, os dados foram escassos, somente Amarante (2010) relatou resposta negativa para uma cepa de *Candida*. Como é atribuída, popularmente, atividade antimicótica a esta espécie, sugeriu-se que novas avaliações sejam realizadas.

A primeira avaliação da atividade antiplasmódica do extrato etanólico obtido das folhas de *M. linifera* utilizou um clone de *P. falciparum* resistente à cloroquina (W2) (Costa et al., 2009), pelo microteste tradicional (Dolabela, 2007). Nestas condições, o extrato etanólico mostrou-se moderadamente ativo (CI₅₀= 11,7+1,17 µg/mL) (Costa et al., 2009). Este resultado justifica a realização de estudo fitoquímico biomonitorado para isolamento e identificação de substâncias ativas.

A atividade antiplasmódica foi, também, avaliada para o extrato hexânico obtido das folhas de *M. linifera*, utilizando o mesmo clone e a mesma metodologia descritos anteriormente por (Costa et al., 2009). Neste caso, observou-se que, nas concentrações 100 e 50 µg/mL, houve intensa hemólise, enquanto que na concentração de 25 µg/mL a inibição do crescimento do parasito foi inferior a 50%. Em síntese, este extrato não foi ativo para o clone W2 de *P. falciparum* (Silva et al., 2011a).

Um terceiro estudo avaliou a atividade antiplasmódica em clone resistente a cloroquina e sulfadoxina (Dd2). Neste, o extrato hexânico mostrou-se inativo, enquanto que o extrato etanólico apresentou uma CI₅₀ entre 10 a 100 µg/mL. O extrato etanólico foi fracionado e suas frações diclorometânica e metanólica foram ativas neste clone (CI₅₀< 10 µg/mL) (Amarante et al., 2011c).

Em síntese, a atividade antiplasmódica foi observada para o extrato etanólico e suas frações diclorometânica e metanólica, sugerindo que esta atividade pode estar relacionada à presença de compostos fenólicos. Em relação à atividade da fração diclorometânica, estudos fitoquímicos visando o isolamento dos princípios ativos estão sendo realizados pelos autores do presente artigo.

Em relação à toxicidade, a maioria dos estudos utilizou o teste de citotoxicidade em *Artemia salina*. O

extrato etanólico apresentou baixa toxicidade para *Artemia salina* ($CL_{50} > 5.000 \mu\text{g/mL}$) (Costa et al., 2009). Em outra avaliação, este se mostrou altamente citotóxico ($CL_{50} = 60,35 + 1,15 \mu\text{g/mL}$; Amarante et al., 2011c,d). Como os extratos foram submetidos à prospecção fitoquímica e apresentaram os mesmos constituintes químicos, provavelmente o teor destes pode ter sido diferente, o que pode explicar a diferença na toxicidade. Também foi avaliada a toxicidade, em *Artemia salina*, do extrato e frações obtidos do caule da *M. linifera*. Os extratos hexânico e etanólico, e as frações hexânica e diclorometânica mostraram-se muito tóxicas para este organismo, com $CL_{50} < 31 \mu\text{g/mL}$. A fração acetato de etila apresentou uma toxicidade moderada ($CL_{50} = 155,4 \pm 1,6 \mu\text{g/mL}$), enquanto que para a fração metanólica não foi observada toxicidade ($CL_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$; Amarante et al., 2011c). Já para os extratos hexânico e diclorometânico de folhas observou-se uma toxicidade alta, com CL_{50} de $42,5 \pm 2,5 \mu\text{g/mL}$ e $47,15 \pm 2,15 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, enquanto que para a fração metanólica não foi observada toxicidade ($CL_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$; Amarante, 2010).

Quando se correlacionam os resultados da atividade antiplasmódica com a toxicidade em *Artemia salina*, pode-se sugerir que a fração metanólica possui alto potencial antimalárico, visto apresentar alta atividade inibitória para o *P. falciparum* e baixa citotoxicidade. Recomenda-se o refração desta e identificação da(s) substância(s) responsável(is) pela atividade antiplasmódica observada.

Dois tipos de estudos químicos são descritos para a *M. linifera*. Alguns estudos avaliaram o teor de metais (micronutrientes e macronutrientes) nesta planta e outros investigaram os metabólitos secundários presentes em seus extratos.

Folhas de *M. linifera* foram coletadas na margem direita do Rio Guamá, em dois períodos (chuvoso e estiagem), e submetidas a análises por espectroscopia de absorção atômica de chama. Elevadas concentrações de íons Ca^{+2} e Mg^{+2} foram determinadas, sendo observadas variações sazonais. Tal fato pode estar relacionado à influência das marés oceânicas deste rio, que recebe constantemente sedimentos da baía do Guajará, com suas águas barrentas e, temporariamente, salobras no verão. As concentrações de manganês (Mn^{+2}) foram consideradas tóxicas. Os micronutrientes (Fe^{+2} , Cu^{+2} e Zn^{+2}) mostraram-se em menor concentração e não sofreram a influência da sazonalidade (Amarante et al., 2009).

Em um outro estudo, as folhas de *M. linifera* foram coletadas no período chuvoso, nas margens do rio Murucupi, Barcarena-PA, Brasil. Nesta cidade está localizada uma grande empresa que produz alumínio e seus despejos são tratados e descartados nos rios da região. O cobre (Cu^{+2}) não estava presente nas amostras em concentrações consideradas tóxicas. A média das concentrações de ferro (Fe^{+2}) foi relativamente mais baixa que a obtida no estudo das folhas coletadas à margem do Rio Guamá no Campus da UFPA, Belém-PA (Amarante et al., 2009). A concentração média de alumínio (Al^{+2}) estava dentro dos limites recomendados (Silva et al., 2011b).

As folhas senescentes de *M. linifera* foram coletadas no Rio Guamá (Belém, PA, Brasil) e no Igarapé Furo do Boto (Rio Maratauíra, Abaetetuba, PA, Brasil) e avaliadas quanto à concentração de metais nestas e em seus chás. As folhas senescentes, obtidas de ambas as regiões, apresentaram praticamente a mesma composição química, principalmente em termos dos teores elevados de macronutrientes (Ca^{+2} e Mg^{+2}), com variações significativas em termos de teores de micronutrientes (Cu^{+2} , Fe^{+2} , Mn^{+2} e Zn^{+2}). Também foi observado o mesmo comportamento com relação à transferência desses minerais para os chás de folhas secas. Menores teores de metais foram observados no chá obtido com as folhas in natura (Amarante et al., 2011a).

Amostras de *M. linifera*, água e sedimentos foram coletados no lago do Museu Paraense Emílio Goeldi (Belém, PA, Brasil) e na Universidade Rural da Amazônia (Belém, PA, Brasil). As amostras de material vegetal foram separadas em raiz, caule, bainha, pecíolo e folhas, sendo submetidas à secagem e moagem. O cádmio (Cd^{+2}) foi determinado por espectroscopia de absorção atômica de chama, após digestão ácida. Constatou-se que *M. linifera* é capaz de acumular Cd^{+2} , uma vez que mais de 90% deste elemento foi encontrado em sua biomassa e apenas cerca de 5% no sedimento e água. As partes da planta que parecem acumular mais Cd^{+2} são a bainha e o pecíolo, enquanto menores teores foram encontrados nas folhas (Pantoja, Amarante e Lins, 2013).

As concentrações totais de Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+2} , Cu^{+2} , Mn^{+2} e Zn^{+2} nas folhas de *M. linifera* e *M. arborescens* (L.) Schott foram avaliadas. Estas espécies foram coletadas às margens do rio Guamá (Belém, PA, Brasil) e do Igarapé Anani (Belém, PA, Brasil). Os resultados mostraram que as espécies acumularam quantidades significativas de Ca^{+2} , Mg^{+2} e Mn^{+2} . Dos seis elementos quantificados,

cinco apresentaram teores similares para as duas espécies (*M. linifera* e *M. arborescens*), apenas o Fe+2 foi observado em maior teor na *M. arborescens* (Amarante et al., 2013).

Os resultados destes estudos (Amarante et al., 2009; Silva et al., 2011b; Pantoja, Amarante e Lins, 2013; Amarante et al., 2013) sugerem que *M. linifera* é uma planta promissora como bioindicadora de poluição ambiental dos ecossistemas de várzea da Amazônia.

O extrato etanólico obtido de folhas de *M. linifera* (coleta: abril de 2007 no Campus Universidade Federal do Pará - UFPA, Belém, PA) foi submetido à abordagem fitoquímica (Matos 1997; 2000) sendo detectados alcaloides, flavonoides, taninos, esteroides e triterpenoides. Saponinas e antraquinonas não foram detectadas neste extrato (Costa et al., 2009; Amarante et al., 2011d). Mesmo resultado foi obtido quando se avaliou o extrato metanólico das folhas (Amarante, 2010).

Prospecção fitoquímica, por cromatografia em camada delgada de sílica (CCD), foi realizada com extratos obtidos de folhas e caules de *M. linifera* os quais foram obtidos por percolação com solventes de polaridades crescentes. No extrato hexânico das folhas foram detectados esteroides, enquanto que no extrato diclorometânico foram detectados flavonoides, esteroides e cumarinas. No extrato metanólico foram detectados apenas flavonoides. Nos extratos hexânico e etanólico obtidos dos caules foi observada a presença de flavonoides, sendo que no extrato hexânico foram ainda detectados esteroides (Amarante, 2010).

A premissa inicial do estudo de Amarante (2010) foi que a atividade antiplasmódica observada estaria relacionada aos flavonoides e que, quanto maior este teor, maior seria atividade. Neste contexto, foi realizada a dosagem dos flavonoides dos diferentes extratos obtidos do caule, folhas e de frações. Verificou-se que, no caso das folhas, quanto maior a polaridade do solvente utilizado no processo extrativo, maior foi o teor de flavonoides. Estes resultados corroboram a premissa inicial, porém, até o presente, não foi isolado o marcador para a atividade antiplasmódica.

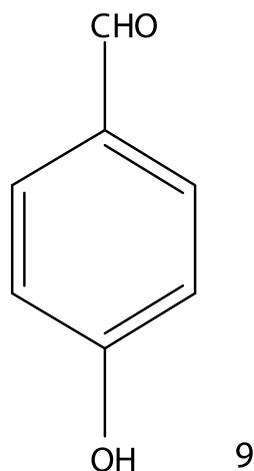
Para o caule, a maior concentração de flavonoides encontra-se no extrato hexânico. O fracionamento do extrato etanólico obtido dos caules por re-extração com solventes orgânicos levou a obtenção de

quatro frações, sendo que as maiores concentrações de flavonoides foram encontradas nas frações diclorometânica e acetato de etila (Amarante, 2010). Vale ressaltar que as folhas sofrem uma maior exposição à radiação solar que os caules, o que parece contribuir positivamente para a síntese de flavonoides. Outra possibilidade é que a síntese de flavonoides esteja relacionada a uma resposta química de adaptação a este agente ambiental (Amarante, 2010). Johann (2003), explica que essa adaptação dos flavonoides possa ser pela capacidade de filtrar raios ultravioletas.

Aos flavonoides têm sido atribuídas atividades anti-inflamatória e antinociceptiva (Meotti, 2006). Visando verificar o potencial antinociceptivo, Amarante (2010) avaliou essa atividade do extrato etanólico obtido dos caules, sendo observado efeito inibitório, sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético, de 90,6% (dose de 400mg/kg de camundongo) (Amarante, 2010). O extrato metanólico obtido das folhas de *M. linifera*, rico em flavonoides, ainda não foi submetido a esta avaliação.

O extrato etanólico obtido de caules de *M. linifera* foi submetido ao fracionamento em cromatografia em coluna, utilizando-se sílica gel como fase estacionária e solventes de polaridades crescentes como fase móvel. Desta coluna foi obtida uma substância pura (Figura 2) que deve tratar-se, provavelmente, do *p*-hidroxibenzaldeído (9) (Amarante et al., 2011c). Apesar de extensa revisão de literatura, não foram encontrados outros relatos sobre isolamento e identificação de metabólitos secundários de *M. linifera*.

Figura 2 - Estrutura química do *p*-hidroxibenzaldeído isolado do caule de *Montrichardia linifera*



3.1.3. *Philodendron scabrum* e *Philodendron bipinnatifidum*

O gênero *Philodendron* é constituído pelos subgêneros *Meconostigma*, *Philodendron* e *Pteromischum*, e cada subgênero possui seu padrão morfológico, anatômico e distribuição geográfica. O subgênero *Meconostigma* parece constituir um táxon distinto, com bastante variação morfológica do gineceu, apresentando formas mais simples em espécies da região Sudeste brasileira e mais elaborada em espécies amazônicas. Os subgêneros *Philodendron* e *Pteromischum* surgiram posteriormente, e são constituídos por plantas epífitas. Estes se distribuem, principalmente, em florestas úmidas do Nordeste da América do Sul (Mayo, 1988).

As espécies do subgênero *Pteromischum* podem ser morfológicamente caracterizadas por uma bainha foliar bem desenvolvida e crescimento simpodial (Grayum, 1996). A sua elevação a subgênero se apoiou em estudos anatômicos (Mayo, 1989) e filogenéticos (Gauthier, Barabé e Bruneau, 2008). Este subgênero ocorre na América Central e na Amazônia Ocidental (Grayum, 1996).

Philodendron scabrum K. Krause (Araceae), conhecida popularmente como “cipó ambé” e “banana ambé”, é utilizada para o tratamento da mordida de serpentes e como analgésico (Ottobelli et al., 2011), enquanto que a raiz de *Philodendron bipinnatifidum* é utilizada como purgante, hemostática e vermífuga (Noelli, 1998). *Dieffenbachia picta* Schott é considerada uma planta tóxica (Gardner, 1994). Assim como, relatada pelos índios guaranis, *Anthurium* sp, também é considerado como uma planta tóxica (Noelli, 1998). Levantamento realizado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto/SP- Brasil, demonstrou que esta espécie é a principal responsável pelos casos de internação por intoxicação em crianças (Oliveira, Godoy e Costa, 2003). Historicamente, esta planta foi utilizada por senhores de escravos jamaicanos, visando sua esterilização e nos judeus nos campos de concentração (Gardner, 1994). O mecanismo exato da intoxicação por *D. picta* ainda é controverso, sendo a possibilidade mais aceita de que ocorra somente irritação mecânica devido à ação das ráfides, seguida da penetração de agentes químicos presentes nas fendas e farpas das ráfides, capazes de provocar inflamação (Sakai, Hanson e Jones, 1972).

A partir de extratos obtidos de diferentes partes de espécies pertencentes a esse gênero foram isolados

(Figura 3) o poliisoprenoide hexaprenol (10), β -sistosterol (7) e 6 β -hidroxi-estigmast-4-en-3-ona (11), miristoleato de etila, α -bisabolol (12), isopalmitato de etila, 3-octadecenil-fenol (13) e o componente majoritário palmitato de etila (14) (Feitosa et al., 2007).

Alquil e arilresorcinois, isolados deste gênero, são os responsáveis pela dermatite alérgica ocasionada por estas plantas (Ponchet et al., 1980; Knight et al., 1996). A ingestão de plantas pertencentes ao gênero pode ocasionar o desenvolvimento de irritação intensa das membranas mucosas, resultando em inchaço da língua, dos lábios e do palato (Mrvos, Dean e Krenzelok, 1991).

Apesar de numerosos relatos de toxicidade, há poucos relatos de casos que fundamentam uma relação de causa - efeito entre a ingestão e a sintomatologia resultante. Revisão retrospectiva em um Centro de Informação identificou 188 casos de intoxicação por *Philodendron* (67,5% dos casos) e *Dieffenbachias* (32,5 %). Em 72,8% dos casos, esta intoxicação envolveu crianças de 4-12 meses, sendo que apenas 2,1% apresentaram sintomas. Em todos os casos, os sintomas ocorreram em menos de 5 minutos após a exposição e foram de curta duração, não sendo observadas complicações (Mrvos, Dean e Krenzelok, 1991).

Estas espécies e seus marcadores químicos, em especial 1-hexadecanoil-2,6-diidroxibenzeno (15), devem ser submetidos a estudos que investiguem o mecanismo envolvido na toxicidade bem como as suas possíveis aplicações farmacológicas (Ottobelli et al., 2011).

No óleo essencial obtido dos cipós de *P. scabrum* foram detectados óxido de cariofileno, α -copaeno, β -bisaboleno, α -zingibereno, α -bergamoteno, α -curcumeno, óxido de humuleno, α e β -pineno, óxido de cariofileno, limoneno e β -bisaboleno (Ottobelli et al., 2011).

Visando avaliar a potencial atividade do extrato de *Philodendron imbe* Schott contra a doença de Alzheimer, a enzima acetilcolinesterase foi exposta in vitro, a diferentes concentrações desse extrato. Nas concentrações utilizadas não foi observada inibição significativa dessa enzima (Trevisan e Macedo, 2003).

Atividades contra *Trypanosoma cruzi* e *Trichomonas vaginalis*, de extratos de várias espécies, foram realizados destacando-se *Philodendron bipinnatifidum*

Figura 3 - Estruturas químicas de substâncias isolados do gênero *Philodendron*.

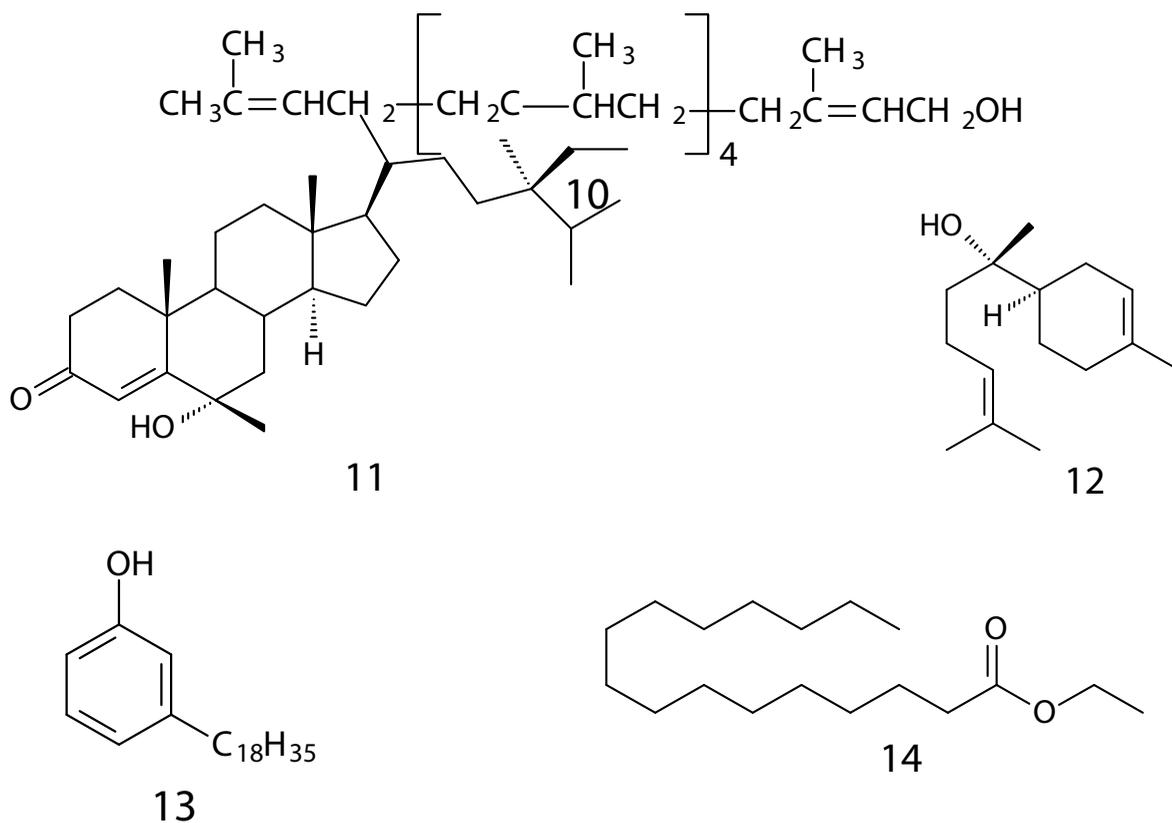
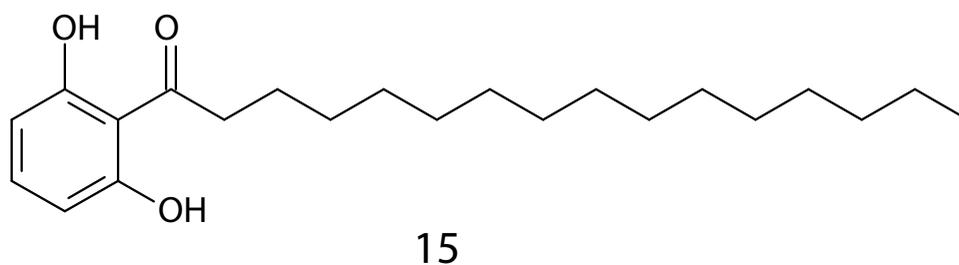


Figura 4 - Estrutura química do 1-hexadecanoil-2,6-diidroxibenzeno isolado de *Philodendron scabrum*.



Schott (Muelas-Serrano et al., 2000). A atividade bactericida do *Philodendron amurense* foi atribuída à presença de limonoides (Santos, 2011).

4. Considerações finais

Dentre as espécies da família Araceae que possuem alegação de uso medicinal, destacam-se *P. stratiotes* e *P. scabrum* que carecem de estudos de investigação sobre os mecanismos envolvidos na sua toxicidade. Enquanto que para *M. linifera*, ainda sendo escassos os estudos fitoquímicos visando o isolamento e identificação dos constituintes micro-moleculares, já existem alguns estudos de avaliação das atividades biológicas.

Outro aspecto que merece um estudo mais aprofundado é a atividade da *M. linifera* como bioindicadora de poluição ambiental em ecossistemas de várzeas, em especial na região Amazônica.

5. Referências

Almeida, S.L. 2006. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Anthurium coriaceum* G. Don (Araceae) em diferentes estádios do desenvolvimento. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

Amarante, C.B.; Silva, J.C.F.; Solano, F.A.R.; Nascimento, L.D.; Moraes, L.G.; Silva, G.F. e Uno, W.S. 2009. Estudo espectrométrico das folhas da aninga (*Montrichardia linifera*) coletadas à margem do Rio Guamá no Campus da UFPA, Belém-PA. Uma contribuição ao estudo químico da família Araceae. *Revista Científica da UFPA*, v. 7, p. 1-19.

Amarante, C.B. 2010. Estudo químico, farmacognóstico, atividade biológica e farmacológica de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Pará, Belém.

Amarante, C.B.; Silva, J.C.; Müller, A.H. e Müller, R.C.S. 2011a. Avaliação da composição mineral do chá da folha senescente de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae) por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). *Química Nova*, v. 34, p. 419-423.

Amarante, C.B.; Solano, F.A.R.; Lins, A.L.F.A.; Müller, A.H. e Müller, R.C.S. 2011b. Caracterização física, química e nutricional dos frutos da aninga. *Planta Daninha*, v. 29, p. 295-303.

Amarante, C.B.; Müller, A.H.; Pova, M.M. e Dolabela, M.F. 2011c. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). *Acta Amazonica*, v. 41, p. 431-434.

Amarante, C.B.; Müller, A.H.; Müller, R.C.S.; Oliveira, D.J.; Lins, A.L.F.A.; Prado, A.F. e Dolabela, M.F. 2011d. Estudo farmacognóstico, fitoquímico e citotóxico do extrato etanólico e frações obtidos do caule de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 92, p. 60-65.

Amarante, C.B.; Ruivo, M.L.P.; Silva, R.J.F.; Batista, R.J.R. e Botero, W.G. 2013. Teor de nutrientes do tecido foliar de duas espécies de *Montrichardia cruger* (araceae) em solos de várzea da Amazônia oriental. *Revista Analytica*, v. 67, p. 69-72.

Amorozo, M.C.M. e Gély, A.L. 1988. Uso de plantas medicinais por caboclos do Baixo Amazonas. Barcarena, PA, Brasil. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Série Botânica*, v. 4, p. 47-131.

Andel, T.R.V. 2000. Non-timber forest products of the North-West District of Guyana. Part 1. (PhD thesis). Utrecht University. Tropenbos-Guyana. Disponível em: < <http://dspace.library.uu.nl/handle/1874/1168>>. Acesso em: 29 maio. 2014.

APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 161, p. 105-121.

Ayyad, S.N. 2002. A new cytotoxic stigmastane steroid from *Pistia stratiotes*. *Pharmazie*, v. 57, p. 212-214.

Bezerra, M. e França, F. 1999. Arales de lagoas em uma área do semi-árido baiano. *Sitientibus*, v. 20, p. 45-54.

Cabrera, L.I.; Salazar, G.A.; Chase, M.W.; Mayo, S.J.; Bogner, J. e DÁVILA, P. 2008. Phylogenetic relationships of Aroids and Duckweeds (Araceae) inferred from coding and noncoding plastid DNA. *American Journal of Botany*, v. 95, p. 1153-1165.

Cardoso, L.R.; Martins, D.; Mori, E.S. e Terra, M.A. 2005. Variabilidade genética entre populações de *Pistia stratiotes*. *Planta Daninha*, v. 23, p. 181-185.

Cavenaghi, A.L.; Velini, E.D.; Galo, M.L.B.T.; Carvalho, F.T.; Negrisoli, E.; Trindade, M.L.B. e

Simionato, J.L.A. 2003. Caracterização da qualidade de água e sedimento relacionados com a ocorrência de plantas aquáticas em cinco reservatórios da bacia do rio Tietê. *Planta Daninha*, v. 21, p. 43-52.

Cícero, E.A.S.; Pitelli, R.A.; Sena, J.A.D. e Ferraudó, A.S. 2007. Variabilidade genética e sensibilidade de acessos de *Pistia stratiotes* ao herbicida glyphosate. *Planta Daninha*, v. 25, p. 579-587.

Cilliers, C.J.; Zeller, D. e Strydo, G. 1996. Short- and long-term control of water lettuce (*Pistia stratiotes*) on seasonal water bodies and on a river system in the Kruger National Park, South Africa. *Hydrobiologia*, v. 340, p. 173-179.

Coelho, M.A.N. 2013. *Montrichardia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB5014>>. Acesso em: 27 Jun. 2014.

Costa, E.S.S.; Dolabela, M.F.; Póvoa, M.M.; Oliveira, D.J. e Müller, A.H. 2009. Estudos farmacognósticos, fitoquímicos, atividade antiplasmódica e toxicidade em *Artemia salina* de extrato etanólico de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott, Araceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, p. 834-838.

Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press. New York.

Cusimano, N.; Bogner, J.; Mayo, S.J.; Boyce, P.C.; Wong, S.Y.; Hesse, M.; Hettterscheid, W.L.A.; Keating, R.C. e French, J.C. 2011. Relationships within the Araceae: comparison of morphological patterns with molecular phylogenies. *American Journal of Botany*, v. 98, p. 654-668.

Dahlgren, R.M.T.; Clifford, H.T.; Yeo, P.F. 1985. The Families of the Monocotyledons. Structure, Evolution, and Taxonomy. Springer-verlag. Germany.

Dahlgren, R.M.T. e Clifford, H.T. 1987. The monocotyledons. A comparative study. Academic Press. London.

Dolabela, M.F. 2007. Atividade antiplasmódica e citotoxicidade de *E. febrifuga* (A.St.Hill.)Juss. Ex. Mart. (Rutaceae) e espécies de *Aspidosperma* Mart. (Apocynaceae). Tese (Doutorado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Engler, H. G. A. 1878. Araceae. In: Martius, C. F. P. von; Eichler, A. W. & Urban, I. *Flora brasiliensis*. Munchen, Wien, Leipzig, v. 3, n. 2, p. 26-223.

Engler, A. 1911. Araceae-Lasioideae. In: ENGLER, Das Pflanzenreich [...] [Helf 48] IV. 23C. Real Jardín Botánico CSIC. Leipzig. Disponível em: <<http://bibdigital.rjb.csic.es/ing/Libro.php?Libro=577>>. Acesso em: 29 maio. 2014.

Feitosa, C.M.; Bezerra, M.Z.B.; Cito, M.G.L.; Junior, J.S.C.; Lopes, J.A.D. e Neto, J.M.M. 2007. Constituintes químicos de *Philodendron imbe* Schott. *Química Nova*, vol.30, p.41-44.

Fundação SOS Mata Atlântica; INPE. Divulgados novos dados sobre a situação da Mata Atlântica. 04 junho 2013. Disponível em: <<http://www.sosma.org.br/14622/divulgados-novos-dados-sobre-a-situacao-da-mata-atlantica/>>. Acesso em: 29 maio. 2014.

Gardner, D.G. 1994. Injury to the oral mucous membranes caused by the common houseplant, dieffenbachia. A review. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*, v. 78, p. 631-633.

Gauthier, M.P.L.; Barabé, D. e Bruneau, A. 2008. Molecular phylogeny of the genus *Philodendron* (Araceae): delimitation and infrageneric classification. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 156, p. 13-27.

Grayum, M.H. 1990. Evolution and phylogeny of the Araceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 77, p. 628-697.

Grayum, M.H. 1996. Revision of *Philodendron* subgenus *Pteromischum* (Araceae) for Pacific and Caribbean Tropical America. *Systematic Botany Monographs*, Michigan, v.47, p.1-233.

Genua, J.M. e Hillson, C.J. 1985. The occurrence, type and location of calcium oxalate crystals in the leaves of fourteen species of Araceae. *Annals of Botany*, v. 56, p. 351-361.

Gonçalves, E.G. 2002. Sistemática e evolução da tribo Spathicarpeae (Araceae). Tese (Doutorado em Botânica). Universidade de São Paulo. São Paulo.

Hahn, W.J. 1997. Monocotyledons. Disponível em: <<http://tolweb.org/Monocotyledons/20668>>. Acesso em: 29 maio. 2014.

- Herrera, F.A., Jaramillo, C.A.; Dilcher, D.L.; Wing, S.L. e Gómez-N, C. 2008. Fossil Araceae from a Paleocene Neotropical rainforest in Colombia. *American Journal of Botany*, v. 95, p. 1569-1583.
- Holanda, F.S.R.; Santos, L.G.C.; Santos, C.M.; Casado, A.P.B.; Pedrotti, A. e Ribeiro, G.T. 2005. Riparian vegetation affected by bank erosion in the Lower São Francisco River, Northeastern Brazil. *Revista Árvore*, v. 29, p. 327-336.
- Johann, S. 2003. Atividade antimicrobiana de flavonoides polimetoxilados isolados de frutos cítricos. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Judd, W.S.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A. e Stevens, P.F. (ed.) 1999. *Plant systematics: A phylogenetic approach*. Sinauer Associates. Massachusetts.
- Kissmann, K.G. (ed.) 1997. *Plantas infestantes e nocivas*. BASF. São Bernardo do Campo.
- Knight, T.E.; Boll, P.; Epstein, W.L. e Prasad, A.K. 1996. Resorcinols and catechols: A clinical study of cross-sensitivity. *American Journal of Contact Dermatitis*, v. 7, p. 138-145.
- Lahitte, H.B.; Hurrell, J.A.; Belgrano, M.J.; Jankowski, L.; Haloura, P. e Mehltreter, K. (ed.) 1998. *Plantas medicinales rioplatenses*. Editora. L.O.L.A. Buenos Aires.
- Lins, A.L.F.A. 1994. Aspectos morfológicos e anatômicos de raízes do gênero *Montrichardia* Crüger. (Aracea). Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/Botânica). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Lins, A.L.F.A. e Oliveira, P.L. 1994. Origem, Aspectos morfológicos e anatômicos das raízes embrionárias de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, sér. Bot.*, Belém, v. 10, (2): 221-236.
- Liu, Q.; Hu, C.; Tan, Q.; Sun, X.; Su, J. e Liang, Y. 2008. Effects of As on As uptake, speciation, and nutrient uptake by winter wheat (*Triticum aestivum* L.) under hydroponic conditions. *Journal of Environmental Science*. v. 20, p. 326-331.
- Lorenzi, H. (ed.) 2000. *Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas*. Plantarum. São Paulo.
- Lorenzi, H. (ed.) 2002. *Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. Plantarum. São Paulo.
- Luna J.S.; Santos, A.F.; Lima, M.R.F.; Omena, M.C.; Mendonça, F.A.C.; Bieber, L.W. e Sant'Ana, A.E.G. 2005. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 97, p. 199-206.
- Macedo, E.G.; Santos Filho, B.G.; Potiguara, R.C.V. e Santos, D.S.B. 2005. Anatomia e arquitetura foliar de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Aracea) espécie da várzea amazônica. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Série Ciências Naturais*, v. 1, p. 19-43.
- Matos, F.J.A. 1997. *Introdução à fitoquímica experimental*. UFC Edições. Fortaleza.
- Matos, F.J.A. (ed.) 2000. *Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil*. Imprensa Universitária/UFC. Fortaleza.
- Mayo, S.J. 1988. Aspectos da evolução e da geografia do gênero *Philodendron* Schott (Araceae). *Acta Botanica Brasílica*, v. 1, p. 27-40.
- Mayo, S.J. 1989. Observations of gynoecial structure in *Philodendron* (Araceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 100, p. 139-172.
- Mayo, S.J. 1990. Problems of speciation, biogeography and systematic in some Araceae of the Brazilian Atlantic Forest. In: *Anais do II Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira*. São Paulo.
- Mayo, S.J.; Borgner, J e Boyce, P.C. 1997. *The genera of Araceae*. Royal Botanic Gardens. Kew.
- Medina, J.C. 1959. *Plantas fibrosas da flora mundial*. Instituto Agrônomo, Campinas.
- Meotti, F.C. 2006. Análise dos mecanismos de ação antinociceptiva e antiinflamatória do flavonóide miricitrina: estudo in vivo e in vitro. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- Miranda, J.A.L.; Rocha, A.J. e Andrade, I.M. Atividade antibacteriana de extratos brutos de *Montrichardia linifera* (ARACEAE). 2013. 64º Congresso Nacional de Botânica. Belo Horizonte. Disponível em: <<http://www.botanica.org.br/trabalhos-cientificos/64CNBot/>>

resumo-ins19084-id4214.pdf>. Acesso em: 29 maio. 2014.

Morton, J.F. 1982. Plants poisonous to people in Florida and other warm places. Southeastern Printing Co. Florida.

Moura, F.B.P. 2006. A Mata Atlântica em Alagoas. Editora da UFAL. Maceió.

Mrvos, R.; Dean, B.S. e Krenzelok, E.P. 1991. Philodendron/Dieffenbachia ingestions: are they a problem? Journal of Toxicology - Clinical Toxicology, v. 29, p. 485-491.

Muelas-Serrano, S.; Nogal, J.J.; Martinez-Diaz, R.A.; Escario, J.A.; Martinez-Fernandez, A.R. e Gomez-Barrio, A. 2000. In vitro screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. Journal of Ethnopharmacology, v. 71, p. 101-107.

Noelli, F.S. 1998. Múltiplos usos de espécies vegetais pela farmacologia guarani através de informações históricas. Diálogos, v. 2, p. 177-199.

Odjegba, V.J. e Fasidi, I.O. 2007. Changes in antioxidant enzyme activities in *Eichornia crassipes* (Pontederiaceae) and *Pistia stratiotes* (Araceae) under heavy metal stress. Revista Biologia Tropical, v. 55, p. 815-823.

Oliveira, R.B.; Godoy, S.A.P. e Costa, F.B. 2003. Plantas Tóxicas: Conhecimento e Prevenção de Acidentes. Holos. Ribeirão Preto.

Ottobelli, I.; Facundo, V. A.; Zuliani, J.; Luz, C. C.; Brasil, H. O. B.; Militão, J.S.L.T. e Braz-Filho, R. 2011. Estudos químicos de duas plantas medicinais da amazônia: *Philodendron scabrum* k. Krause (araceae) e *Vatairea guianensis* aubl. (fabaceae). Acta Amazonica, v. 41, p. 393-400.

Panama. 2004. Tropical lake ecology assessment with emphasis on changes in salinity of lakes. Project N° SAA-140714. Technical Memorandum # 2: Inventory of flora and fauna. Panama Canal Authority; URS Holdings, Inc. Disponível em. < <http://www.panacanal.com/esp/plan/estudios/0261-03.pdf>>. Acesso em: 29 maio. 2014.

Pantoja, K.R.S.; Amarante, C.B. e Lins, A.L.F.A. Determinação de cádmio (Cd) em diferentes amostras de *Montrichardia linifera* (ARACEAE) por espectrometria de absorção atômica de chama. 2013. 64º Congresso Nacional de Botânica. Belo Horizonte. Disponível em:< <http://www.botanica.org.br/trabalhos-cientificos/64CNBot/resumo-ins19245-id6251.pdf>>. Acesso em: 29 maio. 2014.

Piedade, M.T.F.; Schöngart, J. e Junk, W.J. 2005. O manejo sustentável das áreas alagáveis da Amazônia central e as comunidades de herbáceas aquáticas. Uakari – Revista Eletrônica, v. 1, p. 43-55.

Plowman, T. 1969. Folk uses of new world aroids. Economic Botany, v.23, p.97-122.

Ponchet, M.; Martin-tanguy, J.; Marais, A. e Martin, C. 1980. Hydroxycinnamoyl acid amides and aromatic amines in the inflorescences of some Araceae species. Phytochemistry, v. 21, p. 2865-2869.

Pulle, A. A. e Lanjouw, J. 1968. Flora do Suriname Part. 2. E. J. Brill, Leiden.

Rodrigues, V.E.G. 2007. Etnobotânica e florística de plantas medicinais nativas de remanescentes de floresta estacional semidecidual na Região do Alto Rio Grande, MG. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Sakai, W.S.; Hanson, M. e Jones, C.R. 1972. Raphides with barbs and grooves in *Xanthosoma sagittifolium* (Araceae). Science, v. 178, p. 314-315.

Santos, A.P.B. 2011. A Beleza, a Popularidade, a Toxicidade e a Importância Econômica de Espécies de Aráceas. Revista Virtual de Química, v. 3, p. 181-195.

Schutz, A. (ed.) 1968. Introdução ao Estudo da Botânica Sistemática. Editora Globo. Rio de Janeiro.

Silva Filho, P.V. e Brandão, M. 1992. Plantas medicamentosas de uso popular coletadas e comercializadas na região metropolitana de Belo Horizonte, MG. Daphne, v. 2, p. 39-52.

Silva, L.M.; Oliveira, M.C; Silva, R.M.O.; Prado, A.F.; Müller, A.H.; Müller, R.C.S.; Dolabela, M.F. e

Amarante, C.B. Avaliação da toxicidade em *Artemia salina* de extratos obtidos do caule e folha de *Montrichardia linifera* (Araceae). 2009. Sociedade Brasileira de Química (SBQ) – 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Fortaleza.

Silva, R.N.O.; Souza, E.M.; Prado, A.F.; Muller, A.H.; Amarante, C.B.; Pova, M.M.; Mota, E.F. e Dolabela, M.F. 2011a. Prospección fitoquímica y actividad antiplasmódica del extracto hexánico de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, v. 16, p. 135-139.

Silva, C.S.; Pereira, S.F.P.; Souza Filho, A.P.S.; Diniz, V.M.; Oliveira, M.S.; Oliveira, G.R.F. e Santos, D.C. Distribuição de Fe, Al e Cu em aningas (*Montrichardia linifera*) em área atingida por vazamento de lama vermelha - polo industrial de Barcarena-Pará. 2011b. 51º Congresso Brasileiro de Química: Meio Ambiente e Energia – CBQ. São Luiz. Disponível em: < <http://www.abq.org.br/cbq/2011/trabalhos/4/4-226-10459.htm>>. Acesso em: 29 maio. 2014.

Souza, V.C. e Lorenzi, H. (ed.) 2005. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Editora Plantarum. São Paulo.

Stalcup, M.M. 2000. *Plantas de Uso Medicinal ou Ritual numa Feira Livre no Rio de Janeiro, Brasil*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Botânica). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Temponi, L.G.; Garcia, F.C.P.; Sakuragui, C.M. e Carvalho-Okano, R.M. 2006. Araceae do Parque Estadual do Rio Doce, MG, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 20, p. 87-103.

Toursarkissian, M. 1980. *Plantas medicinales de la Argentina*. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires.

Trevisan, M.T.S. e Macedo, F.V.V. 2003. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. *Química Nova*, v. 26, p. 301-304.

Vianna, W.O.; Soares, M.K.M. e Appezzato-da-gloria, B. 2001. Anatomia da raiz escora de *Philodendron bipinnatifidum* Schott (Araceae). *Acta Botanica Brasilica*, v.15, p. 313-320.

Winton, M.D. e Clayton, J.S. 1996. The impact of invasive submerged weed species on seed banks in lake sediments. *Aquatic Botany*, v. 53, p. 31-45.

Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos da casca do caule e da vagem de *Libidibia ferrea* L. frente a microrganismos da cavidade bucal

Antimicrobial activity *in vitro* of extracts of the stem bark and fruit of *Libidibia ferrea* L. against microorganisms of the oral cavity

Glauber P. Oliveira*¹; Tatiane P. Souza¹; Sheila K. Caetano¹; Kaliny S. Farias¹; Gisely N. Venancio¹; Maria F. C. L. Bandeira¹; Nikeila C. O. Conde¹.

E-mail: glauberpoliveira@hotmail.com

¹Universidade Federal do Amazonas – Faculdade de Odontologia FAO/UFAM. Avenida Waldemar Pedrosa, 1539, Centro. CEP: 69033-330 Manaus – AM Brasil.

Resumo

No presente estudo foi avaliada a ação antimicrobiana *in vitro* do extrato da casca do caule e da vagem de jucá frente a microrganismos da cavidade bucal. Tratou-se de um estudo experimental laboratorial, no qual foi avaliada a atividade antimicrobiana dos extratos aquosos a 7,5% em diluições variando de 1:1 a 1:512, através da técnica de difusão em ágar. Foram utilizadas cepas padrão de *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073); *Streptococcus mutans* (ATCC 25175); *Streptococcus oralis* (ATCC 10557); *Lactobacillus casei* (ATCC 7469) e a *Candida albicans* (INCQS 40040). A clorexidina 0,12% foi utilizada como controle positivo. Os resultados da difusão em ágar demonstraram que quando avaliado frente ao *L. casei*, o extrato da vagem mostrou-se mais efetivo, com CIM em 9,3 mg/ml comparado à CIM da casca que foi 37,5 mg/ml. Quando o extrato da vagem foi testado frente aos *S. oralis* e *S. mutans* os valores de MIC foram iguais e o dobro, respectivamente, quando comparados com os valores obtidos com o extrato da casca do caule. Em relação a *C. albicans*, o valor de MIC para o extrato da vagem e da casca do caule foi 18,7 mg/ml. Enquanto que frente a *S. salivarius* o extrato da casca do caule teve valor de MIC 37,5 mg/ml e o extrato da vagem não apresentou atividade. Pode-se concluir que o extrato da casca do caule de jucá apresentou atividade antimicrobiana satisfatória frente aos patógenos da cavidade bucal e superior ao extrato da vagem.

Palavras-chave: *Libidibia ferrea* L.; Biofilme; Fitoterapia.

Abstract

In the present study was evaluated *in vitro* antimicrobial activity of the extract of the stem bark and fruit jucá against microorganisms of the oral cavity. This was an experimental laboratory study in which was evaluated the antimicrobial activity of aqueous extracts 7.5% in dilutions ranging from 1:1 to 1:512, using the technique of agar diffusion. Standard strains used were: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus oralis* (ATCC 10557), *Lactobacillus casei* (ATCC 7469), *Candida albicans* (INCQS 40040) and *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073). Chlorhexidine 0.12 % was used as a positive control. The results of the agar diffusion showed that when assessed against *L. casei*, extract of the fruit was more effective, and with MICs 9.3 mg/mL compared to stem bark was 37.5 mg/mL. When the fruit extract were tested against *S. oralis* and *S. mutans* MIC values were the same and twice, respectively, when compared with values obtained with the extract of the stem bark. With respect to *C. albicans*, the MIC value for the extract of the fruit and stem bark was 18.7 mg/mL. While against *S. salivarius* extract of the stem bark had MIC value of 37.5 mg/mL and the extract of the fruit was inactive. It can be concluded that the extract of the stem bark of jucá showed satisfactory antimicrobial activity against pathogens of the oral cavity and superior to the extract of the fruit.

Key words: *Libidibia ferrea* L.; Biofilm; Phytotherapy.

Introdução

Na região Amazônica, existe uma grande biodiversidade de plantas medicinais utilizadas de maneira empírica, porém com indicações consolidadas por séculos de interação cultural. Dentre muitas plantas medicinais se destacam aquelas utilizadas como anti-inflamatório e antimicrobiano (Borrás, 2003).

Libidibia ferrea é uma planta utilizada na medicina popular e seus frutos possuem ação contra diabetes e anemia (Oliveira, 2008); além de atividade anticancerígena (Nakamura et al., 2002). Por outro lado, a casca do caule é utilizada para emagrecimento, como descongestionante em casos de enterocolite e diarreia, possível benefícios no sistema cardiovascular (Oliveira, 2008) e no tratamento de feridas cutâneas (Sampaio et al., 2009).

Desde que obtido adequadamente, o extrato vegetal reduzido a pó apresenta inúmeras vantagens frente à forma fluida, tais como, menor espaço necessário para o armazenamento do produto, melhor estabilidade, facilidade de manuseio e padronização dos princípios ativos presentes (Senna et al., 1997).

Através de estudo fitoquímico preliminar do extrato hidroalcoólico da casca e das folhas de jucá foi verificada a presença de flavonoides, saponinas, taninos, cumarinas, esteroides e compostos fenólicos (Silva, 2008). Taninos são os compostos majoritários do extrato e podem ser considerados os responsáveis pela atividade antidiabética (Souza et al., 2006). No caule, González, Barros e Bacchi (2004), também identificaram a presença de flavonoides, taninos, cumarinas, esteroides e derivados antracênicos.

Com relação à sua atividade, estudos comprovaram ação antimicrobiana sobre microrganismos do biofilme dental em modelo experimental com células planctônicas e multiespécie (Sampaio et al., 2009) e sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterobacter gergoviae* (Pereira et al., 2006).

Biofilme dental é o termo utilizado para descrever comunidades de microrganismos ligados à superfície do dente, tendo o *Streptococcus mitis* e o *Streptococcus sanguis* como bactérias pioneiras. A presença do *Streptococcus mutans* e do *Streptococcus sobrinus*, é mais prevalente nas etapas iniciais da cárie. O *Lactobacillus casei* é encontrado na evolução da cavitação (Buischi, 2000). Este biofilme é constituído de uma estrutura altamente organizada, na qual as espécies microbianas estão

unidas umas às outras, formando conglomerados em uma matriz de polissacarídeos e, assim, criando um sistema altamente protetor para as espécies que nele residem (Walker, 2004).

Neste sentido, o presente estudo avaliou a atividade antimicrobiana dos extratos aquosos da vagem e da casca do caule de *Libidibia ferrea* L. a fim de obter uma matéria-prima para formulação de um produto de uso tópico para mucosa bucal.

Materiais e métodos

Material vegetal

A casca do caule e a vagem da espécie vegetal *Libidibia ferrea* L. foram coletadas na cidade de Manaus em locais e datas indicados na Tabela 1. A identificação botânica foi realizada no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) recebendo o código de registro de número 228.022. Em seguida, as matérias-primas foram processadas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/UFAM) de acordo com a metodologia descrita por (Melo et al. 2010).

Tabela 1 - Regiões e tempos de coleta.

	Região 1	Região 2	Região 3	Região 4
Regiões de coleta	INPA	INPA, BR-174, KM 42	BR AM 104	INPA, BR-174, KM 42
Data	21/12/2010	27/01/2011	27/01/2011	20/09/2010

INPA = Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia.

Preparação do extrato

O fruto e a casca do caule da espécie *Libidibia ferrea* L. foram, separadamente, submetidos à secagem, seguindo-se a preparação do extrato. Tal escolha, quanto às partes da planta utilizadas no estudo, seguiu a orientação do modo de uso da medicina popular, e a fim de eliminar a dependência da sazonalidade do fruto, a casca do caule possibilitou uma nova opção de matéria-prima disponível durante todo o ano. Para a preparação do extrato foram utilizados os princípios de assepsia para que fosse preservada a qualidade do material.

O material vegetal, após coleta, foi colocado para secar a temperatura ambiente por 48 horas, a sombra, em lugar seco e arejado. Em seguida, todo o material

foi submetido à secagem em estufa de ar circulante, à temperatura de 40 °C ± 2 °C, até estabilização da umidade residual. Após a secagem, os farmacógenos foram submetidos à moagem em moinho de facas, a fim de obter a matéria-prima vegetal (MPV).

O extrato da vagem foi obtido através da técnica de decocção, sob-refluxo, por um período de extração de 15 minutos em uma relação droga: solvente de 7,5% (m/V). O extrato da casca do caule, por sua vez, foi obtida por infusão a partir da MPV, por 15 minutos, numa relação droga: solvente de 7,5:100 (m/v). Ambos utilizaram água destilada como líquido extrator.

O material extraído foi resfriado e filtrado em um balão volumétrico de 1000 ml, completando-se o volume com água destilada. As soluções extrativas de jucá foram levadas para o aparelho Spray Dry para que fosse obtido o extrato seco por aspersão, visando reduzir a pó e manter a estabilidade.

Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato da vagem e da casca de *Libidibia ferrea* L.

Microrganismos testes e preparação de inóculos

Os microrganismos utilizados para a determinação da CIM foram: *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073); *Streptococcus mutans* (ATCC 25175); *Streptococcus oralis* (ATCC 10557); *Lactobacillus casei* (ATCC 7469) e a *Candida albicans* (INCQS 40040). As cepas bacterianas foram fornecidas pelo

Laboratório de Microbiologia Bucal da Universidade Federal da Paraíba e INCQS / FIOCRUZ.

Para obtenção do inóculo os microrganismos foram reativados em caldo nutritivo de BHI (Brain Heart Infusion – DIFCO) em tubos de ensaios de 10x150mm, incubados a 37° C por 48 horas para *Streptococcus mutans* e os demais microrganismos por 24 horas, em aerofilia para o *L. casei* e em microaerofilia para os demais microrganismos. No caso da *Candida albicans*, foi reativado em caldo BHI e incubada a 37° C por 48 horas (Mattigati et al., 2012). Em condições assépticas foram retiradas alíquotas das bactérias e leveduras, inoculadas em 5 ml de caldo BHI, estéril, em tubo de ensaio de 10x150mm. As suspensões foram turbilhoadas em agitador de tubos (MARCONI, MA – 162) até se tornarem homogêneas. Os inóculos foram padronizados pela escala de McFarland (PROBAC) com turbidez compatível a 0,5, a fim de fornecer um padrão de 10⁸ UFC/ml (Sampaio et al., 2009).

Solução teste

Para a obtenção da solução teste 0,2 g de extrato em pó do fruto e da casca de jucá foram diluídos em 20 ml de água destilada. Foi levada ao agitador magnético (MARCONI – MA 085) a fim de obter soluções homogêneas.

Determinação da atividade antimicrobiana do extrato da vagem e da casca de *Libidibia ferrea* L. em meio sólido

A atividade antimicrobiana foi determinada, inicialmente, segundo metodologia proposta por Bauer

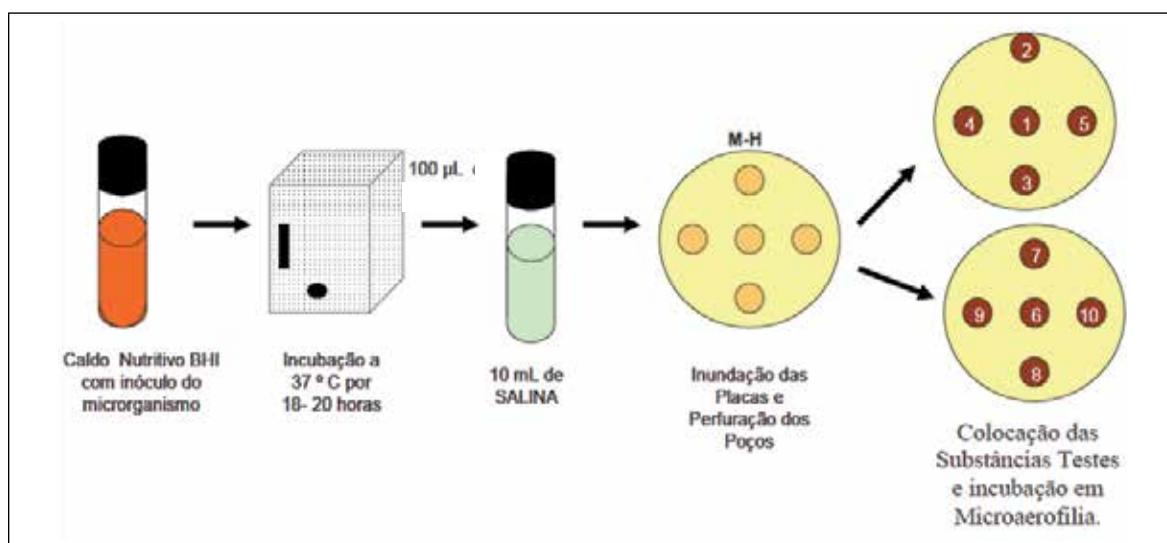


Figura 1 - Representação Esquemática da CIM.

e colaboradores (1966) modificados, através da difusão em meio sólido (Figura 1). Para tanto, as linhagens foram cultivadas em caldo nutritivo BHI (Brain Heart Infusion – DIFCO®), incubadas a 37°C por 24 horas.

Os meios para crescimento dos microrganismos foram preparados 24 horas antes do procedimento. Para melhor crescimento de *S. mutans* foram preparadas placas de Ágar Brain Heart Infusion (BHI – DIFCO®) suplementadas com 10% de sacarose; para *C. albicans* foram preparadas placas de Sabouraud Dextrose (DIFCO®) e placas de Agar Mueller Hinton (DIFCO®) para as demais bactérias. Após o controle de esterilidade, as placas foram inundadas com 10 ml solução salina inoculada com seus respectivos microrganismos do overnight, padronizados com a escala 0,5 de Mc Farland, em uma concentração de 10⁻¹ ml e no intervalo de 30 minutos de secagem em estufa, foram confeccionados orifícios padronizados de aproximadamente 6 mm de diâmetro.

Em cada placa foram confeccionados cinco orifícios que receberam numerações que variaram de 1 a 10, correspondendo a duas placas por ensaio de cada microrganismo. As numerações corresponderam ao número da diluição da substância teste em água destilada (1:1 até 1:512) como representada na Tabela 2, sendo o extrato puro a 75 mg/ml.

Após a colocação de 50µL dos extratos nos poços confeccionados, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas para *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* e 24 horas para os demais microrganismos, a fim de permitir o crescimento microbiano e verificar a ação do extrato testado por meio da formação de halos de inibição. Cada ensaio foi realizado em duplicata frente a cada linhagem selecionada. O mesmo procedimento foi utilizado para o controle positivo, o digluconato de clorexidina de 0,12% (Periogard®).

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi a menor concentração da substância capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano, ou seja, presença de halo maior ou igual de 12 mm (Bauer et al., 1969).

Resultados e discussões

O uso de fitoterápicos tornou-se crescente nos últimos tempos devido à adesão da população aos produtos de origem natural e à insatisfação com relação ao custo e à segurança da medicina convencional (Marques, 1992). Desta forma, novas pesquisas objetivando o desenvolvimento de formulações farmacêuticas a partir de matérias-primas vegetais que tenham eficácia e segurança comprovadas, têm sido desenvolvidas por vários pesquisadores (Gil, 2007).

A árvore adulta de jucá é descrita como vegetação pequena a mediana de até 10 metros de altura, muito predominante na vegetação da caatinga, sertão nordestino com abundância nos estados do Ceará e Bahia e introduzida na região amazônica a partir de imigrantes (Prance e Silva, 1975). Seus frutos são verdes enquanto imaturos e marrom após maturação, medindo em média 8,3 x 1,8 x 0,8 cm ele é de formato longo, levemente achatado e sinuoso com sutura ventral saliente, além de possuir base arredondada a curvada e ápice arredondado (Galdino, Mesquita e Kossmann, 2007).

A frutificação ocorre no final da estação seca e se prolonga por toda a estação chuvosa, possuindo flores amarelas e em cachos, o jucá apresenta alta produção de frutos em determinada época do ano (Galdino, Mesquita e Kossmann, 2007). A casca do caule, por sua vez, apresenta-se como matéria-prima disponível pra coleta durante todo o ano, eliminando uma fator crítico de sazonalidade inerente ao processo de frutificação da espécie *Libidibia ferrea* L.

O estudo utilizou o extrato aquoso da vagem e da casca do caule de jucá obtidos a partir do método de decocção e infusão, respectivamente. A metodologia diferente daquela descrita por Marreiro (2011), que utilizou a solução extratora de etanol (96°C) através da técnica de decocção e relata que a escolha do etanol foi pelo fato de não se tratar de um álcool tóxico (Carvalho, 2001). Difere também da metodologia descrita por Conde (2006), na qual a extração dos marcadores químicos foi feita através de percolação a temperatura ambiente e utilizando o metanol (80%v/v) como extrator. Porém ao comparar os

Tabela 2 - Concentração dos extratos da vagem e da casca do caule de jucá em diluição logarítmica.

Concentração do Extrato (mg/ml)									
Extrato Puro (75)	1:2 (37,5)	1:4 (18,7)	1:8 (9,3)	1:16 (4,6)	1:32 (2,3)	1:64 (1,1)	1:128 (0,5)	1:256 (0,2)	1:512 (0,1)

líquidos de extração, (Spagolla et al. 2009) relataram que o metanol é mais eficiente na extração de compostos fenólicos.

Dessa forma, os extratos aquosos da vagem e da casca do caule de jucá foram testados contra patógenos orais através do método de difusão em ágar. Os resultados com extratos da vagem, da casca do caule e clorexidina estão apresentados nas Tabelas 3, 4 e 5 e Figuras 2, 3 e 4, respectivamente. Quando avaliada a atividade frente ao *L. casei*, o extrato da vagem mostrou-se mais efetivo, com CIM em 9,3 mg/ml comparado à CIM da casca que foi 37,5 mg/ml (Figuras 2A e 3B). Quando o extrato da vagem foi testado frente aos *S. oralis* e *S. mutans* os valores

de MIC foi igual e o dobro, respectivamente, quando comparados com os valores obtidos com o extrato da casca do caule. Em relação a *C. albicans*, o valor de MIC para o extrato da vagem e da casca do caule foi 18,7 mg/ml. Enquanto que frente a *S. salivarius* o extrato da casca do caule teve valor de MIC 37,5 mg/ml e o extrato da vagem não apresentou atividade (Tabelas 3 e 4).

Ao analisar os resultados do método de difusão em ágar, observa-se que houve sensibilidade dos microrganismos testados frente aos extratos da casca do caule e dos frutos de *L. ferrea*, exceto em relação ao *S. salivarius*, o qual não apresentou halo de inibição superior a 12 mm com o extrato do fruto.

Tabela 3 - Média dos diâmetros dos halos de inibição (mm) do extrato da vagem de *Libidibia ferrea*.

MICROORGANISMOS	Extrato da Vagem (mg/ml)				
	EP (75)	1:2 (37,5)	1:4 (18,7)	1:8 (9,3)	1:16 (4,6)
<i>Streptococcus oralis</i>	13,5	11,5	11	0	0
<i>Streptococcus salivarius</i>	11	10	9,5	0	0
<i>Lactobacillus casei</i>	18,5	17	15,5	13	10,5
<i>Candida albicans</i>	21	19,5	18,5	0	0
<i>Streptococcus mutans</i>	12	10	0	0	0

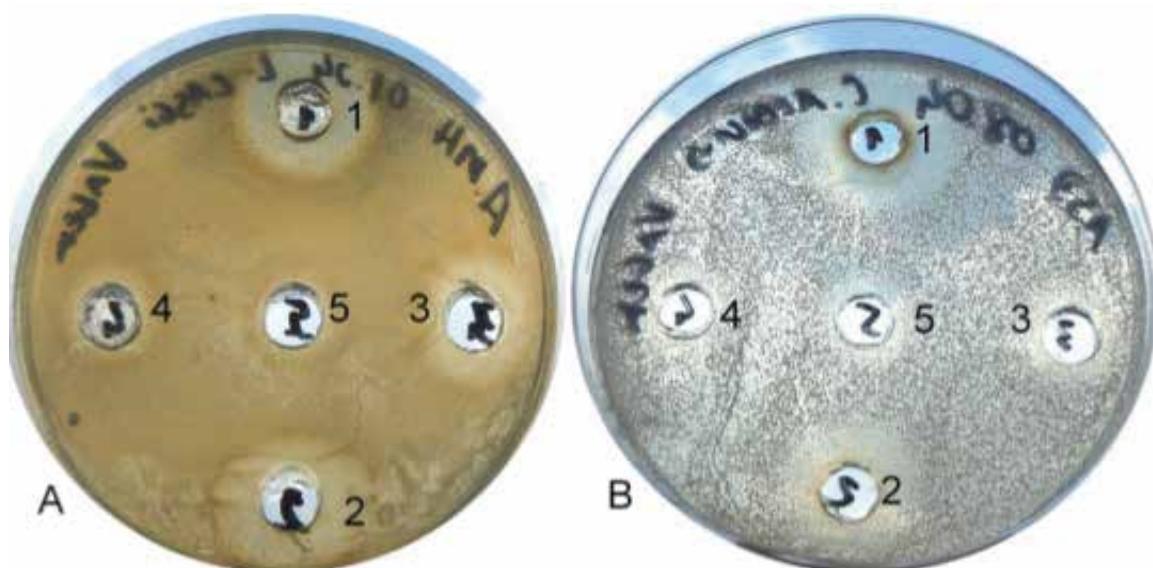


Figura 2 - Halos de inibição do extrato da vagem de *Libidibia ferrea* (Jucá) frente ao *Lactobacillus casei* (A) e *Candida albicans* (B).

Tabela 4 - Média dos diâmetros dos halos de inibição (mm) do extrato da casca do caule de *Libidibia ferrea*.

MICROORGANISMOS	Extrato da casca do caule (mg/ml)				
	EP (75)	1:2 (37,5)	1:4 (18,7)	1:8 (9,3)	1:16 (4,6)
<i>Streptococcus oralis</i>	14,5	13,5	10,5	0	0
<i>Streptococcus salivarius</i>	13,5	12	10,5	0	0
<i>Lactobacillus casei</i>	24,5	13	10	9,5	0
<i>Candida albicans</i>	21,5	17	14,5	0	0
<i>Streptococcus mutans</i>	13	11	9	0	0

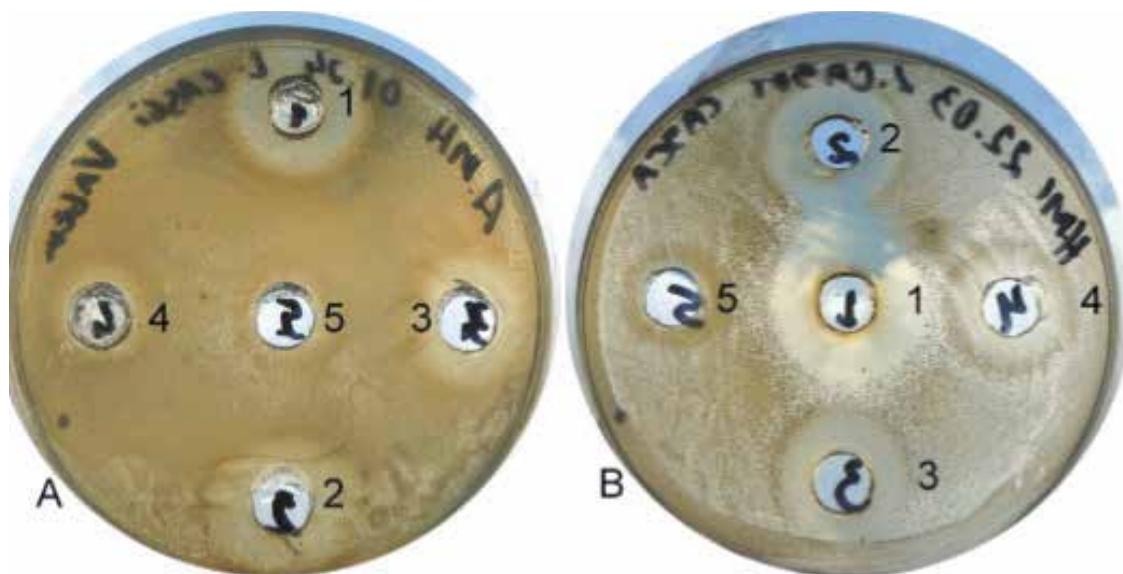


Figura 3 - Halos de inibição do extrato da casca do caule de *Libidibia ferrea* (Jucá) frente ao *Streptococcus oralis* (A) e *Lactobacillus casei* (B).

O controle positivo de clorexidina a 0,12% apresentou atividade frente aos microrganismos testados (Tabela 5; Figura 4). Tal resultado sugere a atividade antimicrobiana de jucá frente a diversas cepas de microrganismos.

Quanto à avaliação da atividade antibacteriana, Marreiro (2011) utilizaram o extrato hidroetanólico e um enxaguatório de *Libidibia ferrea* L. frente a cepas do meio oral, tais como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius* e *Lactobacillus casei* e avaliou sua ação antibacteriana através do método de micro diluição em microplacas para determinação da CIM (CLSI, 2002; Andrews et al., 2001; Sampaio et al., 2009). Seu estudo mostrou que o extrato de *Libidibia ferrea* L. a 0,6% apresentou atividade antibacteriana frente

a *S. mutans*, *S. oralis* e *L. casei* nas concentrações de 4,375 µg/ml; 3,750 µg/ml; 4,375 µg/ml, respectivamente. Tanto o extrato quanto o enxaguatório foram eficazes frente a *L. casei*, *S. oralis* e *S. mutans*. Entretanto, frente a *S. salivarius* nem o extrato nem o enxaguatório de jucá apresentaram atividade antimicrobiana.

Tais resultados corroboram com os resultados do presente estudo, onde o extrato aquoso dos frutos de *Libidibia ferrea* L. não apresentou atividade frente a *S. salivarius* no método de difusão em ágar. Tal resultado direcionou o foco para o extrato aquoso da casca do caule, uma vez que o *S. salivarius* representa um dos microrganismos de colonização inicial em mucosa e tem participação na formação de biofilme (Marsh e Martins, 2005).

Por outro lado, Sampaio e colaboradores (2009) ao avaliarem a atividade antimicrobiana de extrato metanólico de frutos de *L. ferrea* contra patógenos orais, *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis* e *Lactobacillus casei* através do método de micro diluição para células planctônicas e em um modelo de biofilme *in vitro*, obtiveram atividade antimicrobiana. E frente a *S. salivarius* o valor de MIC encontrado foi 100 µg/ml.

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios realizados, foi possível concluir que o extrato da casca do caule de jucá apresentou atividade antimicrobiana satisfatória frente aos patógenos da cavidade bucal e superior ao extrato da vagem quando testados através do método de difusão em ágar. Dessa forma, o extrato da casca do caule tornou-se o mais indicado para a formulação de uso tópico em mucosa oral.

Referências

Andrews, J.M., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 48, p. 5–16.

Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, v.45, p. 493-496.

Borrás, M.R.L. 2003. *Plantas da Amazônia: Medicinais ou mágica? – Plantas comercializadas no mercado Adolpho Lisboa*. Manaus: Valer/Governo do Estado do Amazonas, 322p.

Buischi, Y.P. 2000. *Promoção de saúde bucal na clínica odontológica*. São Paulo: Artes Médicas.

Tabela 5 - Média dos diâmetros dos halos de inibição (mm) de clorexidina – controle positivo.

MICROORGANISMOS	Clorexidina 012% (mg/ml)									
	SP (1,2)	1:2 (0,6)	1:4 (0,3)	1:8 (0,15)	1:16 (0,07)	1:32 (0,03)	1:64 (0,01)	1:128 (0,005)	1:256 (0,002)	1:512 (0,001)
<i>Streptococcus oralis</i>	26,5	23,5	23,5	21,5	21	21	16	15	8,5	7
<i>Streptococcus salivarius</i>	21	20,5	20,5	19	14,5	13,5	12,5	9	10	9
<i>Lactobacillus casei</i>	29	28	24	23,5	21	18	17	16	16	15
<i>Candida albicans</i>	22,5	20,5	20	18,5	10	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus mutans</i>	38	36,5	35	34,5	34	30	27	23	21	19



Figura 4 - Halos de inibição de clorexidina frente ao *Streptococcus mutans* nas diluições de 1:1 a 1:16 (A) e nas diluições de 1:32 a 1:512 (B).

Carvalho, L.C.C. 2001. Álcool do Brasil: energia limpa e renovável. *Agroanalysis*, FGV, v. 21, n. 9, São Paulo.

CLSI, 2002. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard. NCCLS document M27-A2, Wayne, PA.

Conde, N.C.O. 2006. *Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas da Amazônia sobre bactérias do biofilme dental*. Tese (Doutorado em Estomatologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

Galdino, G.; Mesquita, M.R.; Kossmann, I.D.F. 2007. Descrição morfológica da plântula e diásporos de *Caesalpinia ferrea* Mart. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 5, supl. 2, p. 747-749.

Gil, E.S. 2007. *Controle físico-químico de qualidade de medicamentos*. 2. ed., 293 p.

Gonzalez, F.G.; Barros, S.B.M.; Bacchi, E.M. 2004. Atividade Antioxidante e perfil fitoquímico de *Caesalpinia ferrea* Mart. In: Semana da Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 9, São Paulo. Anais. São Paulo: *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 40 p. 79.

Marques, L.C. 1992. *Produção e comercialização de fitoterápicos no Paraná: uma abordagem de vigilância sanitária*. 232 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba.

Marreiro, R.O. 2011. *Caesalpinia ferrea L.: avaliação da atividade antimicrobiana, controle de qualidade e compatibilidade biológica de uma formulação de enxaguatório bucal*. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa Saúde Sociedade e Endemias da Amazônia – UFAM.

Marsh, P.D.; Martin, M.V. 2005. *Microbiologia oral*. 4. ed. Livraria e Editora Santos, 192 p. São Paulo.

Mattigati, S., Ratnakar, P., Moturi, S., Varma, S., Rairam, S. 2012. Antimicrobial effect of conventional root canal medicaments vs propolis against *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Journal of Contemporary Dental Practice*, v.13, n. 3, p. 305–309.

Melo, Y.; Córdula, E.; Machado, S.R.; Alves, M. 2010. Morfologia de nectários em Leguminosae *senso lato* em áreas de caatinga no Brasil. *Acta botânica brasileira*, v. 24, n. 4, p. 1034-1045.

Nakamura, E.S., Kurosaki, F., Arisawa, M., Mukainaka, T., Okuda, M., Tokuda, H., Nishino, H., Pastore, F. 2002. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. *Cancer Letters*, v.177, p. 119–124.

Oliveira, A.F. 2008. *Avaliação da atividade cicatrizante da caesalpinia ferrea (tul.) Martius (jucá) em lesões cutâneas de caprinos*. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semiárido – UFRSA, Mossoró – RN.

Pereira, M.S.V., Rodrigues, O.G., Feijó, F.M.C., Athayde, A.C.R., Lima, E.Q., Sousa, M.R.Q. 2006. Atividade antimicrobiana de extratos de plantas no Semiárido Paraibano. *Agropecuária Científica no Semiárido*, v.2, n.1, p. 37-43.

Prance, G.T.; SILVA, M.F. 1975. *Árvores de Manaus*. INPA, Manaus, 312 p.

Sampaio, F.C.; Pereira, M.S.V.; Dias, C.S.; Costa, V.C.O.; Conde, N.C.O.; Buzalaf, M.A.R. 2009. *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, v.124, p.289–294.

Senna, E.L.; Petrovick, P.R.; Ortega, G.G.; Bassani, V.L. 1997. Preparation and characterization of spray dried powders from *Achyrocline satureioides* (Lam) DC extracts. *Phytotherapy Research*, v. 11 (2), p. 123-127.

Silva, A.C.C. 2008. *Avaliação das atividades citotóxica, antitumoral, anti-inflamatória e analgésica do extrato bruto e de uma fração parcialmente purificada da vagem de Caesalpinia ferrea Mart. ex Tul. Var. ferrea*. 87f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Souza; A.B., Souza, L.M.S., Carvalho, J.C.T., Maistro, E.L. 2006. Non clastogenic activity of *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae) extract on bone marrow cells of Wistar rats. *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, n. 2, p. 380-383.

Spagolla, L.C., Santos, M.M., Passos, L.M.L, Aguiar, C.L. 2009. Extração alcoólica de fenólicos e flavonoides totais de mirtilo “Rabbiteye” (*Vaccinium ashei*) e sua atividade antioxidante. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 30, n. 2, p. 59-64.

Walker, C.B. 2004. Chemotherapeutics: antibiotics and other antimicrobials. *Periodontology 2000*, v. 36, p. 146-165.

Perfil de Utilização de Fitoterápicos nos Municípios de Volta Redonda e Barra Mansa/RJ

Profile for use of herbal medicines in the municipalities of Volta Redonda and Barra Mansa/RJ

1*Ana Paula Martinazzo; 1Luiz Carlos C. Filho; 1Débora A. Rosa; 1Carlos Eduardo S. Teodoro, 1Kallyanne Karla Tomazelli

¹Universidade Federal Fluminense, Escola de Engenharia de Volta Redonda, Av. dos Trabalhadores, 420. Vila Santa Cecília, CEP: 27.255-125. Volta Redonda, RJ, Brasil.

*Correspondência:*e-mail: anapaulamartinazzo@gmail.com

Resumo

Os fitoterápicos constituem uma modalidade de terapia complementar diante das necessidades de saúde. Seu uso tem crescido na população de diversos países, inclusive o Brasil, no qual o governo federal estimula a utilização de tratamentos com fitoterapia no sistema único de saúde. Tendo em vista o atual cenário da busca por tratamentos naturais, este estudo objetivou caracterizar a utilização de fitoterápicos nos municípios de Volta Redonda e Barra Mansa/RJ. A expectativa é que as informações levantadas venham a auxiliar ações municipais que visem à implantação da fitoterapia na rede pública de saúde. Observou-se que a maioria dos fitoterápicos comercializados é vendida sob prescrição médica. A aquisição se concentra em monodrogas com ação ansiolítica, estando a *Passiflora incarnata* L. presente em 14,29% das formulações mais comercializadas. As bulas dos fitoterápicos de maior venda contêm os dizeres legais regulamentados pela ANVISA. Entre os usuários entrevistados, 70% declararam utilizar fitoterápicos, sendo a maioria do sexo feminino (68%), sem haver um padrão econômico específico faixa etária entre 19 e 30 anos, com grau de escolaridade superior completo ou incompleto. Destes, 31% utilizam fitoterápicos por prescrição médica ou por automedicação e acreditam que os fitoterápicos não são tóxicos, podem fazer bem a saúde.

Palavras Chave: Plantas medicinais, fitoterapia, medicina complementar.

Abstract

Herbal constitute a form of complementary therapy on health needs. Their use has grown in population in several countries, including Brazil, where the federal government encourages the use of herbal treatments in the public health system. Given the current scenario of the search for natural treatments, this study aimed to characterize the use of herbal medicines in the districts of Barra Mansa and Volta Redonda/RJ. The expectation is that the information gathered will assist municipal actions for the implementation of herbal medicine in public health. It was observed that most herbal medicines marketed is sold by prescription. The acquisition focuses on monodrogas anxiolytic action, with the *Passiflora incarnata* L. present in 14,29 % of the marketed formulations. The inserts of the highest-selling herbal medicines contain legal wording regulated by ANVISA. Among the users interviewed, 70% reported using herbal medicines, mostly female (68%), without having a specific economic pattern, aged 19 and 30 years, with a degree of complete or incomplete higher education. Of these, 31% use herbal or prescription for self medication and believe that herbal medicines are not toxic, can make good health.

Keywords: Medicinal plants, herbal medicine, alternative medicine.

Introdução

A utilização da fitoterapia, que significa o tratamento pelas plantas, vem desde épocas remotas. A referência mais antiga que se tem conhecimento do uso das plantas data de mais de sessenta mil anos. As primeiras descobertas foram feitas por estudos arqueológicos em ruínas do Irã. Também na China, em 3.000 a.C., já existiam farmacopéias que compilavam as ervas e as suas indicações terapêuticas. A utilização das plantas medicinais faz parte da história da humanidade, tendo grande importância tanto no que se refere aos aspectos medicinais, como culturais (Lainetti e Brito, 1980; Rezende e Cocco, 2002)

No Brasil, o surgimento de uma medicina popular com uso das plantas, deve-se aos índios, com contribuições dos negros e europeus; na época em que era colônia de Portugal, os médicos restringiam-se às metrópoles e na zona rural e/ou suburbana a população recorria ao uso das ervas medicinais. A construção desta terapia complementar surgiu da articulação dos conhecimentos dos indígenas, jesuítas e fazendeiros. Este processo de miscigenação gerou uma diversificada bagagem de usos para as plantas e seus aspectos medicinais, que sobreviveram de modo marginal até a atualidade (Araújo, 1989).

Supõe-se que mais de 70% dos medicamentos derivados de plantas foram desenvolvidos com base no conhecimento popular. Nos anos 80, o desenvolvimento da pesquisa científica resultou na identificação de 121 compostos de origem vegetal, provenientes de 95 espécies de plantas. Grande parte deles se inclui na atual terapêutica dos países ocidentais. Atualmente, metade dos 25 medicamentos mais vendidos no mundo tem sua origem em metabólitos secundários de origem vegetal (Alves, 2001).

Segundo a Organização Mundial da Saúde - OMS (2000), a situação legislativa referente às preparações fitoterápicas, varia de um país para outro. Alguns países fazem uma distinção entre produtos "oficialmente aprovados" e "oficialmente reconhecidos", que podem ser comercializados sem avaliação científica por parte das autoridades.

De acordo com a própria OMS, no caso de medicamentos herbários e produtos que não estejam registrados nem controlados por órgãos normativos, há necessidade de um sistema especial de concessão de licenças que permitam às autoridades de saúde identificar os ingredientes e exigir testes de qualidade antes da comercialização.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tem o papel de regulamentar todos os medicamentos, incluindo os fitoterápicos, e fiscalizar as indústrias produtoras de medicamentos controlando a produção, a liberação para registro e acompanhando a comercialização dos medicamentos, podendo retirá-los do mercado caso seu consumo apresente risco para a população. O registro de fitoterápicos segue o disposto na Lei nº 6.360/76 regulamentado pelo Decreto nº 79.094/77. Tem como regulamentos específicos a Resolução - RDC nº 14/10, complementada pelas seguintes: IN nº 5/10 (Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia), Resolução - RE nº 90/04 (Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica), Resolução - RE nº 91/04 (Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamentos pós-registro) e a IN nº 2/14 (Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado, lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado (Brasil, 2010a, 2010b, 2013a, 2014).

Em 2006, por meio da Portaria GM/MS nº 971 de 3 de maio de 2006, o Governo Federal aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), a qual, em caráter nacional, recomenda a adoção pelas Secretarias de Saúde dos Estados, do Distrito Federal e dos Municípios, da implantação e implementação das ações e serviços relativos às Práticas Integrativas e Complementares, com tratamentos como fitoterapia, homeopatia, acupuntura e com outros que fazem parte da medicina complementar. O estímulo da utilização de fitoterápicos objetiva o tratamento de enfermidades com um menor custo à população e aos serviços públicos de saúde, visto que os medicamentos obtidos por síntese química, comparativamente aos fitoterápicos, são, em geral, mais caros, devido às patentes tecnológicas envolvidas. Novas ações e diretrizes na área foram publicadas por meio do Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, o qual aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos no país e pela Portaria Interministerial nº 2.960, de 9 de dezembro de 2008, que aprovou o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e criou o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (Brasil, 2006a; 2006b; 2006c; 2008a).

O mercado mundial de fitoterápicos movimentava cerca de US\$ 22 bilhões por ano. Em 2000 o setor faturou US\$ 6,6 bilhões nos EUA e US\$ 8,5 bilhões na Europa. No Brasil estima-se que o comércio de fitoterápicos seja da ordem de 5% do mercado total de medicamentos, avaliado em mais de US\$ 400 milhões (Pinto et al., 2002).

Os dados obtidos em levantamento realizado pelo Departamento de Comércio Exterior demonstraram que, em 1998, nosso país exportou oficialmente 2.842 toneladas de plantas medicinais. De 1999 para 2000, as vendas de fitoterápicos aumentaram 15%, contra 4% dos medicamentos sintéticos e já atingem US\$ 260 milhões/ano (Agenda 21, 2003)

Alguns fatores poderiam explicar o aumento do uso de fitoterápicos pela população brasileira, como os avanços ocorridos na área científica que permitiram o desenvolvimento de fitoterápicos reconhecidamente seguros e eficazes, e também uma forte tendência de busca pela população, por terapias menos agressivas destinadas ao atendimento primário à saúde (Yunes, Pedrosa e Cechinel Filho, 2001). Embora a procura por esse tipo de medicamento tem crescido, algumas informações a respeito deles são escassas tanto para farmacêuticos e médico como para pacientes. (Grauds, 1996 *apud* Bello, Montanha e Shenkel, 2002)

O principal material informativo dos medicamentos fornecido aos pacientes é a bula. Legislação que está em vigor para regulamentar bulas de medicamentos é a RDC nº 47 de 8 de setembro de 2009, republicada em 19 de janeiro de 2010, que revogou a Portaria MS nº. 110/97 e a Resolução - RDC nº 140/03. A resolução estabelece regras para elaboração, harmonização, atualização, publicação e disponibilização de bulas de medicamentos para pacientes e para profissionais de saúde. A Resolução RDC nº95, de 11 de Dezembro de 2008, atualizada em 07 de maio de 2013, regulamenta o texto de bula de medicamentos fitoterápicos. A padronização das informações contidas nas bulas auxilia na redução de tempo para análises técnicas futuras envolvendo o registro de medicamentos e um facilitador de dúvidas em caso de tratamentos com medicamentos semelhantes, facilitando o acesso da população e do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária as informações (Brasil, 2008b, 2010c, 2013b)

A informação sobre o perfil de usuários auxilia a implantação de determinadas políticas que subsidiam a construção da saúde local e orientação do modelo de atenção. Tais políticas dependem de um conjunto de informações essenciais, onde é importante conhecer como as pessoas vivem seus valores, suas crenças e seus costumes, já que esses fatores podem interferir em suas vidas. Sendo assim, constitui-se uma importante estratégia para a melhoria da qualidade de vida da população.

A região sob influência do rio Paraíba do Sul, onde estão localizados os municípios de Barra Mansa e

Volta Redonda, no estado do Rio de Janeiro, era, em sua origem, coberta pela Floresta Atlântica, constituída em sua maior parte por mata de encosta. Teve sua exploração iniciada no século passado com a retirada de madeiras consideradas nobres. Posteriormente, o cultivo de café em grandes extensões, de outras culturas como o milho e a cana-de-açúcar em menor escala, e também a pecuária levaram à descaracterização da maior parte de sua cobertura vegetal. Em 1941 com início o ciclo de industrialização a região foi escolhida como local para instalação da Usina Companhia Siderúrgica Nacional (CSN), marcando as bases da industrialização brasileira (PMVR, 2011).

A região que hoje compreende os dois municípios pertencia a Barra Mansa, Volta Redonda de distrito, passou a ser independente em 1954, este fato faz com que suas histórias tenham a mesma origem, já foram berço de nações indígenas como a dos Puris e Acaris, tiveram a presença de grandes exploradores, barões do café, escravos, barqueiros e agricultores, e cederam, em sua história, lugar aos operários vindos das mais diversas regiões do Brasil (PMVR, 2011). Toda esta histórica miscigenação de raças trás consigo o costume popular de tratamento com plantas medicinais e remédios caseiros, que permanecem e se ampliam por meio do consumo de fitoterápicos.

Diante ao exposto, o presente projeto objetiva a realização de uma pesquisa para identificar a utilização de fitoterápicos nos municípios de Volta Redonda e Barra Mansa/RJ, cidades vizinhas situadas na microrregião do Vale do Paraíba dentro da mesorregião Sul Fluminense.

Especificamente objetiva-se traçar o perfil destes usuários, quantificar os medicamentos mais usados e os fins de sua utilização como forma de fonte de informação de potencial de mercado e para o poder público municipal, de forma a auxiliar nas decisões de implantação de políticas municipais de saúde assim como analisar se as bulas disponíveis desses medicamentos estão de acordo com a legislação vigente.

Material e Métodos

Para a realização do estudo, foi feito um levantamento dos estabelecimentos farmacêuticos e lojas de produtos naturais nos municípios de Volta Redonda e Barra Mansa que comercializam fitoterápicos.

A coleta dos dados em todos esses estabelecimentos foi realizada por meio de entrevistas diretas com

os consumidores de fitoterápicos e para se obter uma melhor precisão da quantidade de medicamento vendido, optou-se também entrevistar os responsáveis por cada núcleo de venda.

Para auxiliar na elaboração do questionário que foi aplicado nas farmácias e lojas, fez-se uma revisão bibliográfica a fim de que um conjunto de perguntas relevantes para que o estudo fosse montado. O questionário aplicado para entrevistar os responsáveis por cada núcleo de venda, continha variáveis relacionadas aos fitoterápicos mais comercializados, tais como: nome do produto vendido, fins e formas de uso. Para a coleta de dados dos consumidores de fitoterápicos o questionário aplicado continha variáveis relacionadas ao indivíduo, tais como sexo, idade, escolaridade e variáveis relacionadas aos fitoterápicos, tais como nome do produto adquirido, fins e forma de uso.

Feito esse levantamento, foram identificados os seguintes dados sobre as especialidades farmacêuticas mais vendidas: fabricante, forma farmacêutica, duração do uso, origem da prescrição/indicação e o local de obtenção. Remédios feitos em casa, como chás, ervas, raízes e remédios homeopáticos não serão investigados.

O questionário aplicado para a coleta dos dados foi testado em fase piloto em cinco farmácias de fitoterápicos para avaliação. Após a análise das dificuldades na fase piloto realizaram-se algumas alterações no questionário no sentido de agilizar seu preenchimento pelas pessoas dos estabelecimentos selecionados.

Além de analisar os medicamentos mais comercializados pelos estabelecimentos consultados, foram analisadas a suas bulas, através de comparações envolvendo os critérios estabelecidos pela ANVISA por meio da RDC nº 47 de 8 de setembro de 2009 e a Resolução nº 95, de 11 de dezembro de 2008,

atualizada em 07 de maio de 2013, que regulamenta o texto de bula de medicamentos fitoterápicos. Sendo analisadas as seguintes variáveis: forma farmacêutica, via de administração, composição, nomenclatura oficial, família, parte da planta utilizada, como funciona o medicamento, indicação, modo de usar, contra indicação, quais os males, superdosagem, armazenamento, posologia, uso em idosos, crianças e grupos de risco, interações medicamentosas, advertências e dizeres legais. Sendo estas separadas por categorias, uso adulto, informações ao paciente e informações técnicas aos profissionais de saúde.

Resultados e Discussão

Foram obtidos 49 questionários respondidos pelos responsáveis de diferentes estabelecimentos farmacêuticos sendo 32 em Volta Redonda e 17 em Barra Mansa, dos quais obteve-se o total de 36 fitoterápicos considerados mais vendidos, correspondendo a 15 diferentes indicações terapêuticas.

Observa-se na Tabela 01 a maior procura por ansiolíticos (51,49%) dos quais 42,65% são vendidos por prescrição médica com 88,24% na forma de comprimidos, dos quais são representados na região por 14 diferentes laboratórios. O termo ansiolítico é sinônimo de sedativo ou sedante, nome que se dá aos medicamentos capazes de diminuir a atividade do cérebro, principalmente quando este fica em estado de excitação acima do normal. O resultado obtido, apesar de tratar de fitoterápicos, vem de encontro com o levantamento realizado pela ANVISA (Brasil, 2012), sobre o consumo de medicamentos de 2007 a 2010, no qual os ansiolíticos lideraram a lista de remédios controlados mais vendidos no Brasil. É conhecimento comum que cada vez mais as pessoas têm recorrido aos tranquilizantes para enfrentar o estresse e as dificuldades da vida cotidiana, da mesma forma que alguns medicamentos de

Tabela 01 - A indicação, sua forma de uso, venda com prescrição médica e laboratórios fabricantes dos fitoterápicos mais comercializados nos municípios de Barra Mansa e Volta Redonda/RJ.

Indicação	(%)	Forma	(%)	Prescrição médica	Quantidade de Laboratórios
Ansiolítico	51,49	Comprimidos	87,50	42,65%	14
Afecções Broncopulmonares	11,94	Xaropes	100	87,50%	4
Cognitivo	11,94	Comprimidos	62,50	62,50%	7
Diurético	6,72	Encapsulados	55,56	22,22%	3
Laxante	5,97	Encapsulados	62,5	25%	5

efeito ansiolítico têm sido indicados por profissionais de diversas áreas da medicina.

Ainda de acordo com a Tabela 01 observa-se que após os ansiolíticos com porcentagem semelhante de venda (11,49%) vem os fitoterápicos para afecções broncopulmonares e cognitivas, seguido dos diuréticos e laxantes.

A diferença entre a primeira indicação mais vendida e as seguintes é significativa, porém observa-se maior indicação de prescrição médica para fitoterápicos para afecções broncopulmonares e memória em relação aos demais. Da mesma forma, o número de laboratórios da primeira indicação para os demais se destaca.

Constatou-se que dentre os fitoterápicos mais utilizados, apenas um era composto por associação de mais de uma espécie vegetal, sendo os demais compostos por apenas uma planta, também denominados como monodrogas, medicamentos formulados com apenas uma substância ativa. O mesmo foi observado por Amaral e colaboradores (2007) ao analisar as bulas de medicamentos fitoterápicos comercializados no município de Jequié, Bahia constataram que 80% dos medicamentos eram representados por apenas uma droga vegetal. Da mesma forma, Ribeiro, Leite e Dantas-Barros (2005) em estudo sobre o perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte, observaram um elevado percentual de fitoterápicos monodrogas, atribuindo a maior comercialização destes pelo fato da menor exigência por parte do governo, no registro destes fitoterápicos em relação aos que contemplam duas ou mais drogas vegetais, já que a literatura científica disponibiliza referências de estudos realizados com drogas vegetais individuais.

Separando os fitoterápicos mais vendidos na Tabela 01 de acordo com a espécie vegetal, obteve-se num total de 39 plantas utilizadas, dentre as quais

a *Passiflora incarnata* L. corresponde 14,29% das formulações mais vendidas, seguida pela *Crataegus oxyacantha* L. (7,94%), *Salix Alba* L. e *Hedera helix* L. (6,35% cada) e *Valeriana officinalis* L. (4,76%). A Tabela 02 apresenta as cinco espécies de plantas medicinais mais utilizadas nos principais fitoterápicos comercializados com seu respectivo nomes populares e se constam na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Rennisus) (Brasil, 2009).

Das cinco primeiras espécies medicinais utilizadas nas formulações com maior comercialização, apenas duas, *Passiflora incarnata* L. e *Salix Alba* L., são plantas medicinais que apresentam potencial para gerar produtos de interesse ao SUS. A finalidade da Rennisus é orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da relação de fitoterápicos disponíveis para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinadas doenças (Brasil, 2009). Observa-se que tanto a *P. incarnata* L. como a *S. Alba* L. não tem origem brasileira, sendo consideradas espécies exóticas. Da mesma forma, Ribeiro, Leite e Dantas-Barros, (2005) constataram que das 10 drogas vegetais adquiridas em farmácias comunitárias de Belo Horizonte apenas 3 espécies são nativas ou domesticadas no Brasil.

Segundo Brito (2010), a disputa entre plantas medicinais nativas e plantas medicinais exóticas, ocorre devido às exigências da atual legislação que dificultam o registro dos medicamentos fitoterápicos que utilizam como base plantas nativas, e que de alguma forma, acabam privilegiando as plantas estrangeiras. Este fato dar-se pela falta de estudos sobre as plantas medicinais brasileiras e por esse motivo poucas são as plantas medicinais nativas inclusas na Farmacopeia Brasileira.

A *Passiflora incarnata* L. é nativa dos Estados Unidos, onde é cultivada e conhecida como *wild passion flower*, ou como "maracujá-vermelho" (Souza e Meletti, 1997). É uma planta considerada

Tabela 02. Espécies medicinais utilizadas nas formulações com maior comercialização.

Planta Medicinal	Indicação na Rennisus	Nome Popular
<i>Passiflora incarnata</i> L.	Sim	Maracujá
<i>Crataegus oxyacantha</i> L.	Não	Pilriteiro
<i>Salix alba</i> L.	Sim	Salgueiro Branco
<i>Hedera helix</i> L.	Não	Hera-inglesa
<i>Valeriana officinalis</i> L.	Não	Valeriana

medicinal onde seu extrato composto pelas folhas tem efeito sedativo e ansiolítico. Em sua constituição tem frações alcaloídicas, derivados do indol, como harmalina, harmina; e porções flavonoídicas, vitexina, isovitexina (Brasil, 2004).

A espécie *Salix Alba* L., cujo nome popular é salgueiro branco, tem origem geográfica na Europa, Ásia e norte da África, apresenta ação antiinflamatória, antitérmica e analgésica (Brasil, 2004).

Em relação à bula médica, observou-se que todos os medicamentos citados possuíam. Ao contrário do obtido por Bello, Montanha e Shenkel (2002) que ao analisarem bulas de medicamentos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre, RS, constataram que 51% dos 65 produtos analisados não possuíam, ilustrando um descaso pelas informações nos medicamentos.

Na Tabela 03 são mostrados os percentuais de frequência de frases obrigatórias exigidas pela ANVISA segundo a RDC 47/09, a qual institui roteiro para texto de bula de medicamentos. Foi possível observar que três das nove frases obrigatórias, aparecem em 100% das bulas analisadas.

Analisando a presença de informações específicas, foi constatado que apenas duas informações não estavam contidas nas bulas avaliadas, sendo essas: "Informação sobre interrupção do tratamento" e "Ingestão concomitante com outras substâncias". Na Tabela 04 é mostrada a frequência das informações específicas presentes na bula.

Da mesma forma, foi analisada a presença de dizeres legais conforme a RDC nº 95/2008, no qual regulamenta o texto de bula de medicamentos fitoterápicos. Observou-se que todas as bulas analisadas

Tabela 04 - Percentual das informações específicas presentes nas bulas pesquisadas.

Informações específicas	Percentual (%)
"Ação esperada do medicamento"	100
"Cuidados de armazenamento"	100
"Prazo de validade"	100
"Gravidez e lactação"	100
"Cuidados de administração"	100
"Informações sobre interrupção do tratamento"	60
"Informações sobre reações adversas"	100
"Ingestão concomitante com outras substâncias"	80
"Informações sobre contra-indicações e precauções de uso"	100

Tabela 03 - Percentual relacionado com a presença de frases obrigatórias nas bulas analisadas, exigidas pela portaria 110/97 da ANVISA.

Frases Obrigatórias	Percentual (%)
"Todo medicamento deve ser mantido fora do alcance das crianças"	100
"Informe seu médico a ocorrência de gravidez na vigência do tratamento ou após o seu término"	60
"Informar ao seu médico se está amamentando"	80
"Não deve ser ingerido durante gravidez e lactação"	60
"Siga a orientação do seu médico, respeitando sempre os horários, as doses e a duração do tratamento"	60
"Não interromper o tratamento sem o conhecimento do seu médico"	60
"Informe seu médico o aparecimento de reações desagradáveis"	100
"Informe seu médico sobre qualquer medicamento que esteja usando, antes do início, ou durante o tratamento"	100
"Não tome remédio sem o conhecimento do seu médico pode ser perigoso para a saúde"	40

continham os dizeres como número de registro no Ministério da Saúde, farmacêutico responsável e inscrição profissional, nome da empresa, endereço e telefone de SAC. De acordo com a RDC, uma das causas do estabelecimento de regras é devido ao fato de que as bulas encontradas no mercado não são uniformes e trazem informações distintas e, às vezes, até conflitantes, fazendo com que o medicamento registrado com base no mesmo derivado de droga vegetal apresente indicações diferentes de acordo com a empresa que o comercializa.

A RDC 14/2010 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, determina a presença de informações sobre o princípio ativo e origem da planta utilizada. A Tabela 05 apresenta as informações necessárias sobre a espécie vegetal e o percentual de bulas que cumprem o estipulado, observa-se que apenas a nomenclatura botânica oficial estava presente em todas as bulas.

Em relação aos consumidores de fitoterápicos, foram realizadas 100 entrevistas por meio de questionários nos quais 32% são do sexo masculino e 68% do sexo feminino. Dos entrevistados, 70% alegaram que utilizam remédios fitoterápicos sendo 23% homens e 77% mulheres. Observa-se que a maioria que utilizam esse tipo de remédio é do sexo feminino o que está de acordo com outros estudos referentes a utilização desse tipo de medicamento como também de alopáticos. Um estudo realizado por Silva e colaboradores (2006) mostrou que 85,4% dos consumidores de fitoterápicos eram do sexo feminino.

Bertoldi e colaboradores (2004) mostram que as mulheres sobressaem na utilização de medicamentos alopáticos por serem as responsáveis de cuidar da saúde da família. Para a terapia complementar observa-se também uma grande aceitabilidade pelas mulheres em responder questionários a respeito da utilização de remédios que também pode ser observado em estudo feito em um município do Sul do Brasil, onde 87% dos entrevistados eram mulheres (Schwamback e Amador, 2007).

Na tabela 06 são apresentados os motivos mais comuns para os consumidores a utilizarem os fitoterápicos onde observa-se que a maior procura foi por não fazer mal à saúde e também por indicação médica, seguido por tradição familiar. Martinazzo e Martins. (2004) observaram que no município de Cascavel/PR, 46,8% dos entrevistados utilizam plantas medicinais por tradição familiar seguido por não fazer mal a saúde (30,2%).

A Tabela 07 apresenta a percentual do grau de escolaridade dos entrevistados onde se pode observar que 76% dos entrevistados que disseram que utilizam fitoterápicos estão concentrados no ensino superior completo ou incompleto e apenas 11% só com o ensino médio completo. O que sugere que com a maior escolaridade aumenta o uso de remédios fitoterápicos, sendo este um fator determinante. De forma semelhante, Ribeiro, Leite e Dantas-Barros, (2005), em estudo sobre o perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte, constataram que mais da metade dos

Tabela 06. Motivos para os consumidores a utilizarem remédios fitoterápicos.

Motivos	Percentual (%)
Mais Barato	7
Tradição familiar	27
Indicação Médica	31
Não faz mal à saúde	31
Outras	4

Tabela 05 - Informações sobre a planta utilizada.

Informações	Percentual (%)
Nomenclatura botânica oficial	100
Família botânica	60
Parte utilizada da planta	80
Composição do medicamento	80

usuários de fitoterápicos possuíam escolaridade superior.

Considerando o salário mínimo vigente, observa-se na Tabela 08 que a população com até 7 salários mínimos procuram mais fitoterápicos representando 79% dos entrevistados, mostrando que o uso destes medicamentos não está ligado a um padrão econômico específico.

Em relação à faixa etária dos entrevistados, buscou-se realizar a pesquisa com pessoas das mais variadas idades. A Tabela 09 apresenta a idade dos usuários.

Os dados da Tabela 9 mostram que a maior parte dos entrevistados usuários de fitoterápicos (47%) estão na faixa de 19 a 30 anos e 24% de 31 a 40

anos. Observa-se ainda que à medida que avança a faixa etária há uma queda no percentual de uso de medicamentos fitoterápicos. As entrevistas levaram à suposição que muitos idosos tenham preferência pelo uso direto de plantas, principalmente na forma de chá.

Conclusão

Observou-se que a maioria dos fitoterápicos comercializados na região é vendida sob prescrição médica. A aquisição por parte dos usuários se concentra em monodrogas com ação ansiolítica, estando a *Passiflora incarnata* L. em todas as formulações comercializadas nos estabelecimentos pesquisados.

A análise das bulas dos fitoterápicos de maior comercialização constatou-se que a maioria continha

Tabela 07 - Grau de escolaridade dos usuários de fitoterápicos.

Escolaridade	Percentual (%)
Ensino Fundamental Completo	1,0
Ensino Médio Incompleto	3,0
Ensino Médio Completo	11,0
Ensino Superior Incompleto	37,0
Ensino Superior Completo	39,0
Pós Graduado	9,0

Tabela 08 - Renda familiar dos usuários de fitoterápicos.

Renda familiar	Percentual (%)
Até 3 salários mínimos	29
3-5 salários mínimos	26
5-7 salários mínimos	24
8-9 salários mínimos	6
Acima de 9 salários mínimos	14

Tabela 09 - Faixa etária dos usuários de fitoterápicos.

Faixa Etária	Percentual (%)
0 – 18	4
19 – 30	47
31 – 40	24
41 – 50	20
51 – 60	4
61 – 70	1

as frases obrigatórias exigidas, os dizeres legais regulamentado, além da presença de informações sobre o princípio ativo e origem da planta utiliza, conforme estipulado pela ANVISA, porém, por ser uma obrigatoriedade, o correto é que todos os medicamentos estejam dentro das normas, sendo necessário empenho das empresas visando cumprir a lei, garantindo segurança aos pacientes e profissionais de saúde, pois informações incorretas, ou não atualizadas, podem induzir a prescrição e ao uso incorreto do medicamento.

Em relação aos usuários, os resultados indicam grande aceitação da população no tratamento com uso de fitoterápicos em especial entre as mulheres e que não há um padrão econômico específico. Observou-se ainda, que a maioria dos entrevistados utilizam fitoterápicos por indicação médica, tradição familiar e por acreditarem não fazer mal a saúde, encontrando-se na maioria, na faixa etária de 19 a 30 anos com grau de escolaridade superior completo e incompleto.

Referências

- Amaral, C.L.F.; Coelho, L.A.; Silva, A.B.; Souza, M.F. 2007. Análise das bulas de medicamentos fitoterápicos comercializados no município de Jequié, Bahia, Brasil. *Diálogos & Ciência – Revista da Rede de Ensino FTC*. v.5, p. 1-7.
- Araújo, A.M. 1979. *Medicina rústica*. Brasiliense. São Paulo. 301p.
- Agenda 21, 2003. Conservação e manejo de recursos para o desenvolvimento: abordagem integrada do planejamento e do gerenciamento dos recursos terrestres. Disponível em: <http://www.bdt.fat.org.br/publicações/política/agenda21>. Acesso 20 fev. 2011.
- Alves, H.M.A. 2001. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, p.10 -15.
- Bello, C.M.; Montanha, J.A.; Shenkel, E.P. 2002. Análise das bulas de medicamentos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre, RS, Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 12, p. 75-83.
- Bertoldi, A.D.; Barros, A.J.D.; Hallal, P.C.; Lima, R.C. 2004. Utilização de medicamentos em adultos: prevalência e determinantes individuais. *Revista Saúde Pública*, v.38 p.228-238.
- BRASIL 1997 – Portaria nº 110, de 10 de março de 1997. Institui roteiro para texto de bula de medicamentos, cujos itens devem ser rigorosamente obedecidos, quanto à ordem e conteúdo, de 18 de março de 1997.
- BRASIL 2004 – Resolução RE nº 89, de 16 de março de 2004. Determina a publicação da “Lista de registro simplificado de fitoterápicos”, de 18 de março de 2004.
- BRASIL 2006a – Portaria nº 971 de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde, de 4 de maio de 2006.
- BRASIL 2006b – Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências, de 23 de junho de 2006.
- BRASIL 2006c – *Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS: atitude de ampliação de acesso*. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília. Série B. Textos Básicos de Saúde. 92p.
- BRASIL 2008a – Portaria nº 2.960 de 9 de dezembro de 2008. Aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.
- BRASIL 2008b - Resolução RDC nº 95, de 11 de Dezembro de 2008. Regulamenta o texto de bula de medicamentos fitoterápicos, de 11 de Dezembro de 2008.
- BRASIL 2009 – Portal da Saúde. Plantas de interesse ao SUS. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30277. Acesso 06 nov. 2013.
- BRASIL 2010a - RDC nº 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, de 5 de abril de 2010.
- BRASIL 2010b - Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Registro de Fitoterápicos. <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/medicamentos/publicacao+medicamentos/registro+de+fitoterapicos>. Acesso em: 14 de maio de 2014.
- BRASIL 2010c - Resolução RDC nº 47, de 8 de setembro de 2009. Estabelece regras para elaboração,

harmonização, atualização, publicação e disponibilização de bulas de medicamentos para pacientes e para profissionais de saúde. BRASIL 2012 - Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Boletim de Farmacoepidemiologia do SNGPC, v.1, 8p.

BRASIL 2013a – Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Coordenação de Fitoterápicos, Dinamizados e Notificados (COFID). *Consolidado de normas da COFID*. Versão IV, 1000p.

BRASIL 2013b – Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Bulas Padrão de Medicamentos Fitoterápicos (atualizado em 07/05/2013). <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Assunto+de+Interesse/Medicamentos+fitoterapicos>. Acesso em: 13 de maio de 2014.

BRASIL 2014 – Instrução Normativa nº 2, de 13 de Maio de 2014. Publica a lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado e a lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado, de 14 de maio de 2014.

Brito, S.C.D. 2010. *Os efeitos do marco regulatório sobre a competitividade da cadeia produtiva de medicamentos fitoterápicos no Brasil*. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Tocantins. Palmas.

Grauds, C. 1996. Natural medicines in pharmacy texts, medical schools and government research. *Pharmacy Times*, v.62, p.92. *apud* Bello, C.M.; Montanha, J.A.; Shenkel E.P. 2002. Análise das bulas de medicamentos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre, RS, Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 12, p. 75-83.

Lainetti, R.; Brito, E.R.S. 1980. *A saúde pelas plantas e ervas do mundo inteiro*. Ediouro. Rio de Janeiro.

Martinazzo, A.P.; Martins, T. 2004. Plantas medicinais utilizadas pela população de Cascavel/PR. *Ciência da Saúde da Unipar*, v.8, p.3-5.

OMS – Organización Mundial de la Salud. 2000. *Situación reglamentaria de los medicamentos herbáricos – una resenã mundial*. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jwhozip58s/>>. Acesso 06 nov. 2013.

Pinto, C.A.; Silva, D.H.S.; Bolzani, U.S.; Lopes, N.P.; Epifânio, R.A. 2002. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, v.25, p.45-61.

PMVR 2011. Prefeitura Municipal de Volta Redonda. Histórico. Disponível em: <http://www.portalvr.com/cidade>. Acesso 28 mar. 2013.

Rezende, H.A.; Cocco, M.I.M. 2002. A utilização da fitoterapia no cotidiano de uma população rural. *Revista da Escola Enfermagem da USP*, v.36, n.3, p.282-288.

Ribeiro, A.Q.; Leite, J.P.V.; Dantas-Barros, A.M. 2005. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. *Revista Brasileira de Saúde Pública*, v.15, p. 65-70.

Schwambach, K.H.; Amador, T.A. 2007. Estudo da utilização de plantas medicinais e medicamentos em um município do Sul do Brasil. *Latin American Journal Pharmacy*, v.26, p.602-608.

Silva, M.I.G.; Gondim, A.P.S.; Nunes, I.F.S.; Sousa, F.C.F. 2006. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.16, p.455-462.

Souza, J.S.I.; Meletti, L.M.M. 1997. *Maracujá: espécies, variedades e cultivo*. FEALQ. Piracicaba. 179p.

Yunes, R.A.; Pedrosa, R.C.; Cechinel Filho, V. 2001. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofarmacos no Brasil. *Química Nova*, v.24, p.147-152.

Ação dos extratos de *Neoregelia compacta* (Mez) L.B. Smith e *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker sobre as formas imaturas de *Aedes (Stegomyia) aegypti*, Linnaeus, 1762

Action of extracts of *Neoregelia compacta* (Mez) L.B. Smith and *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker on immature forms of *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762

^{1,2,3}Maria das Graças A. Guimarães; ^{1,3}Karine da S. Martins; ^{1,3}Michele A.de Carvalho;^{1,3}Victor A. Kersten; ³Richard R. B.T.Vieira; ^{1,2,3,4}Marise Maleck

¹Laboratório de Insetos Vetores, Universidade Severino Sombra, Rua Antenor Caravana, 677, Vassouras, 27700-000, RJ, Brasil. E-mail: *mgaguima@yahoo.com.br; mmaleck@oi.com.br

²Mestrado Profissional em Ciências Ambientais, Universidade Severino Sombra, Av. Oswaldo de Almeida Ramos, 280, 27700-000, Vassouras, RJ, Brasil.

³Centro de Ciências Exatas, Tecnológicas e da Natureza e Centro de Ciências da Saúde, Universidade Severino Sombra, Av. Oswaldo de Almeida Ramos, 280, 27700-000, Vassouras, RJ, Brasil.

⁴Colégio Pedro II, Campo de São Cristóvão, 177, São Cristóvão, 20921-440, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Resumo

Estudos discutem as bromélias como criadouros do *Aedes aegypti* L., vetor da dengue. Avaliou-se a toxicidade de extratos brutos de *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker (Bromeliaceae) e *Neoregelia compacta* (Mez) LB Smith (Bromeliaceae) em larvas de *A. aegypti*. Folhas de *N. compacta* trituradas com etanol e água destilada, hexano e acetato de etila, resultaram nos extratos hidroalcoólico, hexânico e de acetato de etila. Das flores e folhas de *A. fasciata*, maceradas em acetato de etila, obteve-se o extrato de acetato de etila. Os bioensaios foram realizados com aplicação desses extratos no meio de criação das larvas (L3) de *A. aegypti*. Neste estudo foram avaliadas a viabilidade larval e pupal, a emergência e a mortalidade. Os resultados dos bioensaios apontaram para a alta toxicidade (DL50 = 39,4 µg/mL) de *A. fasciata* e (DL50 = 23 µg/mL) de *N. compacta*. Os dados sugerem estas bromeliáceas como fonte de bioprodutos ativos na busca de um fitoproduto larvicida no controle do mosquito vetor da dengue.

Palavras-chave: atividade larvicida; Bromeliaceae; *Aedes aegypti*; dengue.

Abstract

Several studies have discussed bromeliads as breeding grounds for *Aedes aegypti* L., a dengue vector. The toxicity of crude extracts of *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker (Bromeliaceae) and *Neoregelia compacta* (Mez) LB Smith (Bromeliaceae) on *A. aegypti* larvae was evaluated in this study. Leaves of *N. compacta* were ground up with ethanol and distilled water, hexane and ethyl acetate to produce hydro alcoholic, hexane and ethyl acetate extracts. Flowers and leaves of *A. fasciata* were macerated in ethyl acetate to obtain an ethyl acetate extract. The bioassays were performed with application of these extracts to the breeding medium of L3 larvae of *A. aegypti*. In this study, larval and pupal viability, emergence and mortality were evaluated. The results from

the bioassays indicated that these extracts were highly toxic: LD50=39.4µg/mL for *A. fasciata* and LD50= 23 µg/mL for *N. compacta*. The data suggest that, within the search for larvicidal phytoproducts, these bromeliads are sources of active bioproducts for dengue vector mosquito control.

Keywords: larvicidal activity; Brom *aegypti*; dengue.

Introdução

As plantas são fontes ricas de substâncias farmacologicamente ativas, e algumas delas apresentam atividade larvicida e inseticida (Silva et al., 2003; Siddiqui et al., 2004) no que diz respeito ao controle de insetos nas culturas agrícolas (Morandi Filho et al., 2006) e na saúde pública (WHO, 2009).

A família Bromeliaceae, a que pertencem às espécies *Noeregelia compacta* (Mez) L.B. Smith e *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker, apresenta grande representatividade no Brasil (Manetti, Delaporte e Laverde Junior, 2009). As bromélias são importantes devido aos seus recipientes fitotelmatas, permanentes e ricos em micro e macro floras e faunas associadas, da qual podem participar formas imaturas de mosquitos da família Culicidae, incluindo-se o *Aedes*. Mas, poucos são os estudos referentes à química e farmacologia de *N. compacta* e *A. fasciata*. Na literatura observou-se que os principais compostos já isolados e identificados de bromélias são pertencentes às classes dos triterpenóides e flavonoides. Em menor número encontram-se os esteróis, diterpenos, ácidos cinâmicos, gliceróis, lignanas, entre outros (Williams, 1978; Manetti, Delaporte e Laverde Junior, 2009; Fabri e Costa, 2012). A ocorrência de flavonoides na família bromeliácea evidencia a importância química dos mesmos como possíveis agentes farmacológicos e possibilita considerá-los como potenciais quimiotaxonômicos. Manetti e colaboradores (2010), que identificaram flavonoides, taninos e saponinas, sugerem que a sua atividade citotóxica está relacionada provavelmente à presença de saponinas. Manetti, Delaporte e Laverde Junior (2009) relacionam a larga variedade de atividades fisiológicas aos diterpenos isolados de Bromeliaceae.

Noeregelia compacta (Mez) L.B. Smith pertence à família Bromeliaceae, subfamília Bromelioideae, nativa do Brasil e endêmica nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo (Silva e Gomes, 2003). Com poucos dados encontrados na literatura, entre os compostos derivados do metabolismo secundário do gênero *Noeregelia* há aqueles compartilhados com a família Bromeliaceae. Yano (2003) cita três esteróides e uma substância pura 3,4-dimetoxicinamato

de 1'-glicerila dos extratos hexânicos de folhas de *N. cruenta* e *P. flammea*. Os extratos com diferentes preparações (hexânicos, metanólicos, aquosos) de folhas, rizomas, sementes e de frutos destas espécies mostraram atividades antineoplásica, antifúngica, antibacteriana e antioxidante.

O gênero *Aechmea* (Ruiz & Pav) é o maior e um dos mais complexos gêneros de Bromeliaceae (Forzza et al., 2012). Originária do Brasil, onde se encontram 60% de suas espécies, o gênero *Aechmea* reúne cerca de 240 espécies (Luther, 2008) endêmicas do Estado do Rio de Janeiro (Sousa e Wanderley, 2000).

Aedes aegypti L., vetor do vírus da dengue, é encontrado em áreas urbanas, e apresenta importância médica (Silva et al., 2004), por ser responsável por epidemias frequentes causadas pela migração dos quatro sorotipos nas Américas (WHO, 2009). A sua grande capacidade de adaptação a condições adversas, tais como períodos de quiescência de ovos em ambientes inóspitos (Barrera, 1996; Silva e Silva, 1999; Varejão et al., 2005; Serpa et al., 2006) e o crescimento normal em águas poluídas (Beserra et al., 2009; Beserra et al., 2010), faz com que o controle deste vetor seja muito difícil. O mosquito parece ter preferência por ambientes com riqueza de microrganismos e de matéria orgânica (Barrera, 1996), especialmente os encontrados em Bromeliaceae. A única forma de controle destes insetos ainda é aplicação de inseticidas e larvicidas.

Vários estudos têm chamado a atenção para os produtos naturais com atividade larvicida que poderiam ser úteis no controle de diversos vetores (Consoli et al., 1988; Park et al., 2002; Silva et al., 2003), incluindo *A. aegypti* (Cabral et al., 2009; Maleck et al., 2013).

Quando da epidemia de dengue no Rio de Janeiro em 2001/2002 foi levantada a possibilidade de bromélias domésticas serem criadouros de larvas de *A. aegypti* (Mocellin et al., 2009). Segundo Bermúdez-Monge e Barrios (2011) os efeitos químicos resultantes do metabolismo desses vegetais interferem na abundância e diversidade da fauna em seus

reservatórios. A necessidade de seu estudo se torna primordial (Cunha et al., 2002) quanto à possibilidade de possuir e eliminar nos seus reservatórios substâncias com atividades larvicidas para *A. aegypti* e à desmistificação como seus prováveis criadouros.

Este estudo teve como objetivo avaliar a interferência sobre o desenvolvimento de formas imaturas de *A. aegypti* e a toxicidade dos extratos de *A. fasciata* e *N. compacta* sobre as mesmas, tendo em vista encontrar-se na literatura referências divergentes para o fato de as bromélias serem ou não criadouros de mosquitos.

Material e Métodos

Material vegetal

Endêmica do Estado do Rio de Janeiro (Sousa e Wanderley, 2000), *A. fasciata* apresenta folhagem rígida, com estrias verticais, rosuladas, em forma de roseta aberta até tubular; bainha em geral alargada, lâminas com margens serradas ou serrilhadas - espinhos nas bordas - e marmorizadas de verde com escamas cinza prateadas, principalmente quando jovem; a inflorescência, durável e rígida, é formada por brácteas cor-de-rosa vistosas a inconspícuas, com espinhos nas bordas e flores roxas delicadas, com dois apêndices petalinos internos; sépalas livres a conatas, em geral assimétricas e mucronadas; pétalas róseas e lilases; seis estames, inclusos na corola, livres ou os do segundo ciclo adnatos às pétalas; ovário ínfero; fruto baga; sementes sem apêndices conspícuos; rizoma conspícuo; escapo bem desenvolvido (Sousa e Wanderley, 2000).

Também nativa do Brasil, endêmica nos Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, a *N. compacta* é um vegetal epífita caracterizando-se por ser acaule, rizomatosa, de roseta bem aberta, com até 0,40 m de diâmetro, com folhas largas, rijas e coriáceas, nas cores verde ou variegada. A inflorescência forma-se em uma depressão no centro da planta, pela modificação das folhas internas à roseta (brácteas) nas cores vermelho-viva, protegendo flores brancas e discretas e originando um receptáculo achatado para recolher água. As folhas que rodeiam as inflorescências são brilhantes e coloridas. Propaga-se por separação de rebentos ou por sementes (Silva e Gomes, 2003).

Dentre bromélias de origem brasileira, para este estudo foram escolhidas as espécies *Aechmea*

fasciata (Lindley) Baker e *Neoregelia compacta* (Mez) L.B. Smith. Os representantes de bromélias usados neste estudo localizavam-se em área periurbana do Município de Miguel Pereira, RJ, região serrana do Estado do Rio de Janeiro, em altitude de 640m, com temperatura média de 24°C e índice pluviométrico de 1.750mm³ (PMMP, 2011). As bromélias encontravam-se dispostas no solo, entre as coordenadas 22°28'30.77"S e 43°29'35.51" O, e em galhos de árvores, entre as coordenadas 22° 28' 30. 49"S e 43°29' 35. 23"O. Os espécimes utilizados foram classificados por Carlos Amaral e as suas exsiccatas estão depositadas no Herbário da Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ, Brasil sob os números HUSSBRO-001(*N. compacta*) e HUSSBRO-002 (*A. fasciata*).

Extração

Folhas e caules de *N. compacta* e *A. fasciata* foram lavadas em água destilada e secas em temperatura ambiente. Após a secagem, o material vegetal foi fragmentado e triturado para a preparação dos extratos.

As folhas de *N. compacta* (38g) foram maceradas, separadamente, utilizando diferentes solventes com polaridade crescente: em hexano (Isolar) (400 mL), em acetato de etila (Quimex) (370 mL) e em etanol (Vetec) e água destilada (400 mL; 1:1), obtendo-se os extratos hexânico, de acetato de etila e hidroalcoólico.

As flores (23g) e folhas secas (60g) de *A. fasciata* foram maceradas em 230 mL e 600 mL acetato de etila. Todos os materiais foram preparados em frasco de vidro escuro, sob agitação ocasional de duas vezes por semana, durante 20 dias. Após a maceração, o material vegetal foi filtrado e evaporado em rotavapor a 40°C, armazenado em frasco de vidro escuro, e mantido em geladeira a 12°C e 25% de UR. Para a utilização nos bioensaios, os extratos hidroalcoólico e de acetato de etila foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), devido a sua menor toxicidade perante aos demais solventes, e o extrato hexânico foi dissolvido em acetona, devido a sua polaridade.

Bioensaios

Os ovos de *A. aegypti* foram obtidos no Núcleo de Apoio e Pesquisa de Vetores–NapVE/Parceria DIRAC-IOC-VPAAPS/FIOCRUZ e mantidos no

laboratório de Insetos Vetores/USS, Vassouras, RJ. Para os bioensaios, os ovos foram colocados em um recipiente (4,0 cm x 4,5cm) contendo água mineral. Após 1h foi adicionado a este meio, alimento de ração de peixes (Alcon Guppy) (0,3 mg/larva) (WHO, 1970; Cabral et al., 2009) para incubação dos ovos e desenvolvimento das larvas (Cabral et al., 2009; Narciso, 2009; Leite et al., 2012). Após a eclosão, as larvas de terceiro estágio (L3) foram separadas e colocadas (20 larvas por grupo) em recipientes de vidro, contendo água mineral (20 mL). Após 1h foi adicionado a este meio de criação larval, alimento de ração de peixe conforme citado acima, para a realização dos testes biológicos.

Para avaliação da atividade larvicida, os extratos de folhas e flores de *N. compacta* e *A. fasciata* foram aplicados ao meio de criação larval nas concentrações de 10, 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e submetidos à investigação de atividade biológica sobre formas imaturas (L3) de *A. aegypti*.

Os bioensaios compreenderam grupos testes, grupo controle (controle sem solvente de diluição) e controle testemunho (com solvente de diluição). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e três repetições. Os bioensaios foram mantidos em câmara climatizada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e foto período de 12h.

As observações foram realizadas durante 30 dias, e os resultados analisados quanto ao período de desenvolvimento, à viabilidade e à mortalidade, além de avaliação morfológica das larvas mortas através de microscopia óptica.

Análises Estatísticas

Os resultados foram tratados pela análise de variância F- ANOVA (Sokal e Rohlf, 1979), a significância estatística foi determinada pelo teste Tukey sendo considerado como significativo $P \leq 0,05$ e o erro padrão calculado através da média dos experimentos, através do programa Graphpad Instat 3.05 (Motulsky, 1999) e BioEestat 5.0 (Ayres et al., 2007), e o teste χ^2 com nível de significância de $P \leq 0,01$. Os desvios padrão foram calculados utilizando a média dos experimentos e análise de Trimmed Spearman-Kärber para determinar a DL_{50} (Hamilton, Russo e Thurson, 1977).

Resultados

Da extração vegetal foram obtidos 0,155g de extrato hexânico, 1,927 g de hidroalcoólico, 274 g de

acetato de *N. compacta* e 179 mg de acetato de etila de *A. fasciata*.

O extrato hidroalcoólico de *N. compacta* estendeu a fase larval (L3-adulto) de *A. aegypti* em 3 dias em concentração de $10\mu\text{g mL}^{-1}$ (8-24) e diminuiu na concentração de $200\mu\text{g mL}^{-1}$ de L3-adulto (13-23) se comparado ao grupo controle (8-21) (Tabela 1A). O mesmo extrato de $200\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou $4,7 \pm 2,6$ de mortalidade para L4. Nas concentrações de 100 e $200\mu\text{g mL}^{-1}$ a mortalidade de pupas foi de $5,0 \pm 0,6$ para a concentração de $100\mu\text{g mL}^{-1}$ e $4,0 \pm 1,5$ para a de $200\mu\text{g mL}^{-1}$ quando comparadas a não ocorrência de mortalidade de pupas no grupo controle (Tabela 1C).

A viabilidade de adultos foi de apenas de $5,0 \pm 0,0$ a $6,3 \pm 4,0$ (200 e $100\mu\text{g mL}^{-1}$), em comparação a $18,3 \pm 2,1$ e $18,7 \pm 2,3$ de adultos dos grupos controles (Tabela 1B).

Na concentração de $100\mu\text{g mL}^{-1}$ as larvas L3 duraram 4 dias, as L4 duraram 9 dias e as pupas sobreviventes duraram 11 dias, com mortalidade de 33% em $200\mu\text{g mL}^{-1}$. As larvas L3 sobreviveram, as L4 duraram 10 dias com 25% de mortalidade e as pupas duraram 10 dias com 32% de mortalidade.

O extrato hexânico ($200\mu\text{g mL}^{-1}$) reduziu o período de desenvolvimento de larvas (L3) a adulto ($15,0 \pm 4,2$) ($P < 0,001$) quando comparado aos controles ($19,3 \pm 3,7$) e ($20,0 \pm 4,5$) e aumentou o período de desenvolvimento larval na concentração de $100\mu\text{g mL}^{-1}$ em 2 dias (2-11) em relação ao controle (2-9) (Tabela 2A). As concentrações de 100 ($13,0 \pm 3,5$) ($P < 0,001$) e $200\mu\text{g mL}^{-1}$ ($12,0 \pm 4,4$) ($P < 0,001$) aumentaram o período de desenvolvimento de pupa em dois dias se comparado ao grupo controle. O desenvolvimento de L3-adulto diminuiu em 2 dias na concentração de $10\mu\text{g/mL}^{-1}$ ($16,3 \pm 3,7$) ($P < 0,01$), 1 dia na concentração de $200\mu\text{g mL}^{-1}$ ($15,0 \pm 4,2$) ($P < 0,001$) e aumentou este período em 1 dia na concentração de $100\mu\text{g mL}^{-1}$ ($15,3 \pm 4,1$) ($P < 0,001$).

A mortalidade larval (L4) $5,3 \pm 2,0$; $6,7 \pm 3,0$ e $8,3 \pm 2,3$ ocorrida em 10, 100 e $200\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente, de extrato hexânico, não foi registrada no grupo controle (Tabela 2C) e, reduziu significativamente ($8,7 \pm 1,5$) ($P < 0,001$), ($11,0 \pm 2,0$) ($P < 0,001$) e ($9,0 \pm 1,0$) em 10, 100 e $200\mu\text{g mL}^{-1}$ a emergência em relação ao controle ($19,0 \pm 1,7$) (Tabela 2B).

O extrato de acetato de etila (AcoEt) de *N. compacta* reduziu entre 1 a 2 dias o período de desenvolvimento de *A. aegypti*, na concentração de $10\mu\text{g mL}^{-1}$

Tabela 1 - Duração do desenvolvimento (A), viabilidade (B) e mortalidade (C) de larvas de *Aedes aegypti* tratadas em 3º estágio (L3) no meio de criação com extrato hidroalcoólico de *N. compacta*.

Tratamento	Larval (dias)		Pupal (dias)		L3 – adulto (dias)	
	X ± DP	IV	X ± DP	IV	X ± DP	IV
Controle	3,5±0,5a	(3-4)	14,8±3,1a	(6-19)	17,0±3,3a	(8-21)
DMSO	3,7±0,47a	(3-4)	16,7±2,8b	(10-21)	19,0±3,1b	(12-24)
10µg mL ⁻¹	2,7±0,5b***	(2-5)	14±3,5ac***	(6-20)	16,0±5,4ac*	(8-24)
100µg mL ⁻¹	3,4±0,5ac*	(3-4)	13,7±2,7ac***	(8-21)	18,8±4,5a	(10-22)
200µg mL ⁻¹	3±2b***	(3-4)	15,2±2,5ab	(8-19)	19,8±4ad	(13-23)

B	L3-L4		L4-pupa		Pupa-adulto		L3 – adulto	
	X ± DP	%	X ± DP	%	X ± DP	%	X ± DP	%
Controle	20,0±0	100	20,0±0	92	18,3±2,1a	100	18,3±2,1a	92
DMSO	20,0±0	100	20,0±0	93	18,7±2,3a	100	18,7±2,3a	93
10µg mL ⁻¹	20,0±0	95	19,0±1,0	74	14,0±2,0a	82	5,3±4,0b**	27
100µg mL ⁻¹	20,0±0	100	20,0±0	72	14,3±3,0a	55	6,3±4,0b**	32
200µg mL ⁻¹	20,0±0	97	19,3±1,1	62	12,0±3,0a	45	5,0±0b**	25

C	L3			L4		Pupa			
	X ± DP	IV	%	X ± DP	IV	%	X ± DP	IV	%
Controle	0	0	0	1,7±2,1	(6-14)	8	0	0	0
DMSO	0	0	0	1,3±2,3	(9-14)	7	0	0	0
10µg mL ⁻¹	1,0±1,0	3-3	5	2,3±2,1	(4-24)	12	0,7±1,1a	(10-12)	5
100µg mL ⁻¹	0	4-4	0	2,3±1,5	(6-15)	12	5,0±0,6b***	(10-21)	33
200µg mL ⁻¹	0,7±1,1	0	3	4,7±2,6	(4-14)	25	4,0±1,5c**	(11-21)	32

Experimentos com 20 larvas (L3) de *A. aegypti*, para cada grupo teste e controle, em triplicatas e com 3 repetições. Média e desvio padrão (X ± DP). Intervalo de Variação (IV). Valores seguidos da mesma letra não possuem diferenças significativas. Níveis de significância por teste de Tukey, representados como *** P < 0.001; **P = < 0.01; *P < 0.1 vs controle de DMSO (testemunho).

Tabela 2 - Duração do desenvolvimento (A), viabilidade (B) e mortalidade (C) de larvas de *Aedes aegypti* tratadas em 3º estágio (L3) no meio de criação com extrato hexânico de *Neoregelia compacta*.

Tratamento	Larval (dias)		Pupal (dias)		L3 – adulto (dias)	
	X ± DP	IV	X ± DP	IV	X ± DP	IV
Controle	4,2±1,7	(2-9)	16,0±4,0a	(7-22)	19,3±3,7a	(9-23)
Acetona	4,0±2	(2-7)	17,0±5,0a	(1-4)	20,0±4,5a	(9-24)
10µg/mL ⁻¹	4,4±2,4	(2-9)	15,0±4,6a	(1-15)	16,3±3,7bd**	(9-21)
100µg/mL ⁻¹	4,3±2,1a	(2-11)	13,0±3,5ac***	(1-17)	15,3±4,1c***	(7-22)
200µg/mL ⁻¹	4,0± 1,8	(2-8)	12,0±4,4bc***	(1-17)	15,0±4,2c***	(8-21)

B	L3-L4		L4-pupa		L3 – adulto		Pupa-adulto	
	X ± DP	%	X ± DP	%	X ± DP	%	X ± DP	%
Controle	20,0±0a	95	19±1,7a	100	19,0±1,7a	100	19,0±1,7a	95
Acetona	20,0±0a	100	20,0±0a	97	19,3±0,6a	100	19,3±0,6a	97
10µg/mL ⁻¹	20,0±0a	100	20,0±0	63	12,7±0,6b**	68	8,7±1,5b***	43
100µg/mL ⁻¹	20,0±0a	97	19,3±0,6	67	12,3±2b**	85	11,0±2,0b***	55
200µg/mL ⁻¹	20,0±0a	97	19,3±1,0	55	10,7±1,5c***	81	9±1,0b***	43

C	L3			L4			Pupa		
	X ± DP	IV	%	X ± DP	IV	%	X ± DP	IV	%
Controle	1,0±1,7a	(3-5)	5	0	0	0	0	0	0
Acetona	0	0	0	0,7±0,6a	(4-4)	3	0	0	0
10µg/mL ⁻¹	0	0	0	5,3±2a	(11-22)	27	0,3±0,6a	(14-14)	2
100µg/mL ⁻¹	0,7±0,6a	(2-8)	3	6,7±3b*	(3-19)	32	1,0±1,0a	(11-21)	8
200µg/mL ⁻¹	0,7±1a	(1-7)	3	8,3±2,3b*	(2-20)	42	0,7±0,6a	(10-20)	6

Experimentos com 20 larvas (L3) de *A. aegypti*, para cada grupo teste e controle, em triplicatas e com 3 repetições. Média e desvio padrão (X ± DP). Intervalo de Variação (IV). Valores seguidos da mesma letra não possuem diferenças significativas. Níveis de significância por teste de Tukey, representados como *** P< 0.001; **P = <0.01; *P<0,1 vs controle de acetona (testemunho).

Tabela 3 - Duração do desenvolvimento (A), viabilidade (B) e mortalidade (C) de larvas de *Aedes aegypti* tratadas em 3º estágio (L3) no meio de criação com extrato bruto de acetato de etila de *Neoregelia compacta*.

B	L3-L4		L4-pupa		Pupa-adulto		L3 – adulto	
	X ± DP	%	X ± DP	%	X ± DP	%	X ± DP	%
Controle	20,0±0a	100	20,0±0a	98	19,6±0,6a	100	19,6±0,6a	98
DMSO	20,0±0a	100	20,0±0a	93	18,6±1,5a	100	18,6±1,5a	93
10µg mL ⁻¹	20,0±0a	100	20,0±0a	87	17,3±3,0a	67	11,6±3,0b***	58
100µg mL ⁻¹	20,0±0a	0	0	0	0	0	0	0
200µg mL ⁻¹	20,0±0a	0	0	0	0	0	0	0

B	L3-L4		L4-pupa		Pupa-adulto		L3 – adulto	
	X ± DP	%	X ± DP	%	X ± DP	%	X ± DP	%
Controle	20,0±0a	100	20,0±0a	98	19,6±0,6a	100	19,6±0,6a	98
DMSO	20,0±0a	100	20,0±0a	93	18,6±1,5a	100	18,6±1,5a	93
10µg mL ⁻¹	20,0±0a	100	20,0±0a	87	17,3±3,0a	67	11,6±3,0b***	58
100µg mL ⁻¹	20,0±0a	0	0	0	0	0	0	0
200µg mL ⁻¹	20,0±0a	0	0	0	0	0	0	0

C	L3			L4			Pupa		
	X ± DP	IV	%	X ± DP	IV	%	X ± DP	IV	%
Controle	0	0	0	0,3±0,6a	13-13	2	0	0	0
DMSO	0	0	0	1,3±1,5a	6-11	7	0	0	0
10µg mL ⁻¹	0	0	0	2,7±2,8a	5-11	13	5,6±2,8	3-9	32,7
100µg mL ⁻¹	20,0±0a	4-4	100	0	0	0	0	0	0
200µg mL ⁻¹	20,0±0a	4-4	100	0	0	0	0	0	0

Experimentos com 20 larvas (L3) de *A. aegypti*, para cada grupo teste e controle, em triplicatas e com 3 repetições. Média e desvio padrão (X ± DP). Intervalo de Variação (IV). Valores seguidos da mesma letra não possuem diferenças significativas. Níveis de significância por teste de Tukey, representados como *** $P < 0.001$; ** $P = < 0.01$; * $P < 0.1$ vs controle de DMSO (testemunho).

Tabela 4 - Duração do desenvolvimento (A), viabilidade (B) e mortalidade (C) de larvas de *Aedes aegypti* tratadas em 3º estágio (L3) no meio de criação com extrato bruto de acetato de etila de *A. fasciata*.

Tratamento A	Larval (dias)		Pupal (dias)		L3 – adulto (dias)	
	X ± DP	IV	X ± DP	IV	X ± DP	IV
Controle	6,0±1,0a	(4-7)	10,5±2,3 a	(5-14)	11,4±1,6a	(7-15)
DMSO	5,0±0,4a	(4-5)	9,0±3,0b	(5-13)	10,1±2,6b	(7-15)
10µg mL ⁻¹	2,3±0,6b***	(2-4)	6,4±1,7c***	(5-11)	6,9±1,4c***	(7-13)
100µg mL ⁻¹	2,0±0b***	(2-2)	7,0±2,1bc**	(5-12)	7,2±1,6c***	(7-14)
200µg mL ⁻¹	0	0	0	0	0	0

B	L3-L4		L4-pupa		Pupa-adulto		L3 – adulto	
	X ± DP	%	X ± DP	%	X ± DP	%	X ± DP	%
Controle	20,0±0a	100	20,0±0a	98	19,7±0,6a	100	19,7±0,6a	98
DMSO	20,0±0a	100	20,0±0a	93	18,7±1,5a	100	18,7±1,5a	93
10µg mL ⁻¹	20,0±0a	100	20,0±0a	73	14,7±3,5a	75	11,0±4,0a	55
100µg mL ⁻¹	20,0±0a	45	9,0±10b*	74	7,0±6,5bc*	95	6,3±6,0b**	32
200µg mL ⁻¹	20,0±0a	0	0	0	0	0	0	0

C	L3			L4			Pupa		
	X ± DP	IV	%	X ± DP	IV	%	X ± DP	IV	%
Controle	0	0	0	0,3±0,6a	13-13	2	0	0	0
DMSO	0	0	0	1,3±1,5a	6-11	7	0	0	0
10µg mL ⁻¹	0	0	0	5,3±3,5a	3-10	27	3,6±0,6b***	5-10	25
100µg mL ⁻¹	11,0±10,1a	3-3	55	2,3±4,0a	3-10	12	0,3±0,6a	10-10	5
200µg mL ⁻¹	20,0±0a	3-3	100	0	0	0	0	0	0

Experimentos com 20 larvas (L3) de *A. aegypti*, para cada grupo teste e controle, em triplicatas e com 3 repetições. Média e desvio padrão (X ± DP). Intervalo de Variação (IV). Valores seguidos da mesma letra não possuem diferenças significativas. Níveis de significância por teste de Tukey, representados como *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.1$ vs controle de DMSO (testemunho).

(9,0 ± 2,0) (P<0,001). Não houve desenvolvimento larval em 100 e 200µg mL⁻¹. O período de desenvolvimento L3-adulto (9,0 ± 2,0) (P=<0,001) e de pupas (7,2 ± 2,0) (P=<0,01) foi reduzido em 3 dias, na concentração de 10µg mL⁻¹ em relação ao controle 13,2 ± 1,7 e 10,6 ± 2, 3 respectivamente) (Tabela 3A). A viabilidade de adultos foi de 11,6 ± 3,0 em relação a 19,6 ± 0,6 no controle. A viabilidade de L3 a adulto (11,6 ± 3,0) (P=<0,001) foi reduzida, na concentração de 10µg mL⁻¹, em relação ao controle (19,6 ± 0,6). Devido à mortalidade não houve viabilidade em 100 e 200µg mL⁻¹ (Tabela 3B).

O extrato de AcoEt mostrou toxicidade larval (L3) em 100 e 200µg mL⁻¹, em 4 dias após o tratamento, e uma dose letal (DL₅₀) = 23µg mL⁻¹. Na concentração de 10µg mL⁻¹ a mortalidade de pupas foi de 5,6 ± 2,8 em relação ao controle onde a mesma não ocorreu (Tabela 3C).

O estudo da atividade larvicida com o extrato de AcoEt de *A. fasciata* alterou o período de desenvolvimento das larvas, nas concentrações de 10 (2,3 ± 0,6) (P< 0,001) e 100µg mL⁻¹ (2,0 ± 0,0) (P<0,001) com redução de 5 dias; e, de L3-adulto (6,9 ± 1,4) (P<0,001) e (7,2 ± 1,6) (Tabela 4A).

Na concentração de 10µg mL⁻¹ de AcoEt, a viabilidade de pupa para adultos foi 11,0 ± 4,0 em relação ao grupo controle (19,7 ± 0,6). Na concentração de 100µg mL⁻¹, o extrato bruto de AcoEt resultou em mortalidade larval (L3), em 3 dias, e de 2,3 ± 4,0 (L4), perfazendo um total de 67% de larvas mortas num período de 10 dias. A mortalidade de pupas (3,6 ± 0,6) (P=<0,001) ocorreu em concentração de 10µg mL⁻¹ (Tabela 4C). A atividade larvicida foi obtida na concentração de 200µg mL⁻¹ com 100% de mortalidade larval em 3 dias após a aplicação do extrato de *A. fasciata*, e registrando uma DL₅₀ = 39,4µg mL⁻¹.

Discussão e Conclusão

Espécies da família Bromeliaceae vêm sendo estudadas quanto à identificação e isolamento e atividades farmacológicas de seus compostos orgânicos como triterpenos, esteroides, flavonoides, derivados de ácidos cinâmicos, gliceróis etc. (Manetti, Delaporte e Laverde Junior, 2009).

Em relação à atividade inseticida, citam-se os estudos com *Bromelia antiacantha*, bromélia terrestre nativa da Mata Atlântica, sobre o Hemiptera *Oncopeltus fasciatus* Dallas (1852) (Hemiptera: Lygaidae) (Santos et al. 2009). A toxicidade dos extratos de *B.*

antiacantha encontrada sobre o Hemiptera confirma o alto índice de mortalidade (55 a 100%), mostrados com os extratos de AcoEt (200µg mL⁻¹) de *N. compacta* e *A. fasciata* sobre as larvas de *A. aegypti*. Em contrapartida o extrato hexânico de *N. compacta* apresentou toxicidade abaixo de 50% sobre as larvas de *A. aegypti*. Estes dados mostraram que a atividade larvicida foi obtida com o extrato de AcoEt tanto para *N. compacta* como para *A. fasciata*.

Estudos de Candido (2011) com os óleos vegetais de *R. communis* (mamona) e *C. phyllacanthus* (favela) sobre larvas L3 de *A. aegypti* demonstraram que os óleos vegetais daqueles vegetais apresentaram toxicidade ao larval (L3) (90%); o estágio de pupa demonstrou ser susceptível aos extratos vegetais avaliados; que os tais extratos causaram mortalidade significativa dos mosquitos; que o aumento da exposição aos produtos implica na utilização de menores concentrações dos extratos vegetais para atividade pupicida de 100%; que óleos extraídos das sementes possuem maior potencialidade no controle de larvas e pupas; que concentrações letais CL₅₀ e CL₉₀ de *C. phyllacanthus* e *R. communis* alteraram o ciclo de vida do *A. aegypti*, reduzindo o índice de emergência de adultos tais como se obteve com extrato de AcoEt de *N. compacta* em concentração de 10µg mL⁻¹ (58%); que os extratos de mamona atuam negativamente em pelo menos algum estágio do ciclo de vida de *A. aegypti*, semelhante a extratos de 100µg mL⁻¹ e 200µg mL⁻¹ de *N. compacta* que foram letais a larvas do 4º estágio (L4).

Estudada a ação de extrato hexânico de *N. compacta* sobre larvas de terceiro instar (L3) de *A. aegypti* pode-se acrescentar que este, nas concentrações de 10, 100 e 200 µg mL⁻¹ não apresentaram toxicidade sobre as larvas de 3º estágio (L3), as pupas e os adultos de *A. aegypti*, além da viabilidade de 100% entre L3-adultos no extrato dissolvido em acetona (testemunho). O extrato hidroalcoólico de *N. compacta* nas concentrações utilizadas, de 10, 100 e 200µg mL⁻¹, não apresentou toxicidade significativa sobre a viabilidade e o desenvolvimento larval (L3 e L4) e pupal.

O extrato bruto de acetato de etila de *N. compacta* apresentou maior eficácia, nas concentrações de 100 e 200µg mL⁻¹ sobre L3, L4 e pupas quando comparado aos extratos hidroalcoólico e hexânico da mesma espécie de bromélia.

Em extrato de acetato de etila de *A. fasciata* a eficácia da concentração 200µg mL⁻¹ expressou-se

semelhante ao extrato de acetato de etila de *N. compacta*, eliminando as larvas L3 em menos de um dia e consequentemente impedindo seu desenvolvimento.

A toxicidade do extrato de AcoEt de *N. compacta* (200µg mL⁻¹) sobre L4 foi de 100%. Tais resultados indicam o uso do extrato de *N. compacta* na concentração de 200µg mL⁻¹ no controle de formas imaturas de *A. aegypti*, também confirmando a ação de extratos de fumo (*Nicotina tabacum*), inseticida largamente estudado, que apresentou potencial larvicida, mas não como ovicida em *A. aegypti* como registrado por Quirino et al. (2009).

Consoli et al. (1988) utilizando extratos de vinte e nove espécies vegetais, verificaram suas influências na sobrevivência de larvas de que *A. fluviatilis* (Lutz) (Diptera: Culicidae): que quando os extratos são diluídos em metanol e etanol não apresentam influência na sobrevivência de larvas; os extratos de *Anacardium occidentale*, *Agave americana*, *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Nerium oleander*, *Spatodea campanulata*, *Tibouchinas crobiculata* e *Vernonias alzmanni* reduziram a sobrevivência larvária significativamente quando em concentração de 100ppm; ainda demonstraram ação larvicida de *A. sativum* na concentração de 1 ppm e *A. occidentale* na concentração de 100 ppm., o que se pode confirmar na concentração de 100µg mL⁻¹ de extrato de AcoEt de *N. compacta* e *A. fasciata* sobre as larvas L3.

O período de desenvolvimento larval pelo extrato de AcoEt de *A. fasciata* torna-se menor nas concentrações de 10µg mL⁻¹ e 100µg mL⁻¹ (55% e 31,66%), respectivamente, e inexistente em 200µg mL⁻¹, o que significa que maiores concentrações aumentam o efeito tóxico sobre as larvas, se comparado ao desenvolvimento do grupo controle (98%) e ao grupo testemunho (93%), como demonstrado para outras espécies de bromélias estudadas por Consoli et al. (1988).

Os ensaios biológicos com os extratos brutos de *A. fasciata* e *N. compacta*, comparados ou não aos estudos encontrados sobre estas espécies de bromélias, sugerem a necessidade da purificação do extrato de acetato de etila na busca de um fito-produto natural com ação larvicida para *A. aegypti*. Este estudo é pioneiro sobre a atividade larvicida de extratos de *N. compacta* e *A. fasciata* sobre *A. aegypti* e consequentemente podendo agir como método alternativo sobre a população do principal mosquito vetor da dengue.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ): a FUSVE/USS; a Dra. Nildimar Honorio Rocha (Núcleo de Apoio e Pesquisa de Vetores–NapVE/ Parceria DIRAC-IOC-VPAAPS/ FIOCRUZ) a parceria e os ovos de *A. aegypti*; a Dr^a Ana Paula de Almeida pelas correções e sugestões; e, a Msc. Michele Teixeira Serdeiro pelas sugestões e leitura do manuscrito.

Referências

Ayres, M.; Ayres Júnior, M.; Ayres, D.L.; Santos, A.S. 2007 – *Bio Estat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. 5ª ed., Sociedade Civil Mamirauá: Belém (PA).

Barrera, R.1996 - Competition and resistance to starvation in larvae of container-inhabiting *Aedes* mosquitoes. *Ecological Entomology*, v. 21, n. 1, p. 117–127.

Bermúdez-Monge, J.; Barrios, H. 2011 - Insectos Asociados a *Vriesea sanguinolenta* Cogn. & Marshal (Bromeliaceae). *Scientia* (Panamá), v.21, n.2, p.7-32.

Beserra, E.B.; Fernandes, C.R.M.; Sousa, J.T.; Freitas, E.M.; Santos, K. 2010 - Efeito da Qualidade da Água no Ciclo de Vida e na Atração para Oviposição de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). Nov.– Dec.. *Neotropical Entomology*, v. 39, n. 6, p. 1016-1023.

Beserra, E.B.; Freitas, E.M.; Souza, J.T.; Fernandes, C.R.M.S.; Santos, K.D. 2009 - Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. *Iheringia, Série Zoologia*, Porto Alegre, v.99, n.3, p.281-285.

Cabral, M.M.O.; Alencar, J.A.; Guimarães, A.E.; Kato, M.J. 2009 - Larvicidal activity of grandisin against *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, v.25, n.1, p.103-105.

Candido, L.P. 2011 - *Bioatividade de extratos vegetais sobre os diferentes estágios do ciclo de vida de Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.1762). Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental (MCTA)), Centro de Ciências e Tecnologias, Universidade Estadual da Paraíba, 2010, 112p. Disponível em: <http://pos-graduacao.ascom.uepb>.

edu.br/ppgcta/?wpfb_dl=28. Acesso em: 26 mai. 2012.

Consoli, R.A.G.B.; Mendes, N.M.; Pereira, J.P.; Santos, B.S.; Lamounier, M.A. 1988 - Influência de diversos derivados de vegetais na sobrevida de larvas de *Aedes fluviatilis* (Lutz) (Diptera: Culicidae) em laboratório. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.83, n.1, p. 87-93.

Cunha, S.P.; Alves, J.R.C.; Lima, M.M.; Duarte, J.R.; Barros, L.C.V.; Silva, J.L.; Gammara, A.T.; Monteiro Filho, O.S.; Wanzeler, A.R. 2002 - Presença de *Aedes aegypti* em Bromeliaceae e depósitos com plantas no Município do Rio de Janeiro, RJ. In: Gerência de Entomologia da Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v.36, n.2, p.244-245.

Fabri, R.L.; Costa J.A.B.M. 2012 – *Bromelia antiacantha* Bertol. 2012 - *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. IX, n.2, p.37-48.

Forzza, R.C.; Costa, A.; Siqueira Filho, J.A.; Martinelli, G.; Monteiro, R.F.; Santos-Silva, F.; Saraiva, D.P.; Paixão-Souza, B. 2012 - Bromeliaceae. In: *Lista de Espécies da Flora do Brasil*, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB005805>>. Acesso em: 8 jan. 2013.

Hamilton, M.A.; Russo, R.C.; Thurson, R.V. 1977 – Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. *Environment Science Technology*, v.11, n.7, p. 714-719. Disponível em: <<http://www.math.montana.edu/~jimrc/classes/stat524/notes/TrimmedSpearmanKarber.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2012.

Leite, A.C.F.C.; Kato, M.J.; Soares, R.O.A.; Guimarães, A.E.; Santos-Mallet, J.R.; Cabral, M.M.O. 2012 - Grandisina caused morphological changes larval and toxicity on *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.22, n.3, p.517-521.

Luther, H.E. 2008 - *An Alphabetical List of Bromeliad Binomials*. 11^a ed., Sarasota: The Marie Selby Botanical Gardens. Disponível em: <http://www.selby.org/sites/all/files/Bromeliad_Binomial_List_For_Web.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2012

Maleck, M.; Santos, F.C.C.; Serdeiro, M.T.; Guimarães, A.E.; Ferreira, B.; Gunaydin, K.; Almeida, A.P. 2013 - Kellin: a furanochromone with toxicity against *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera)

and *Aedes aegypti* (Diptera). *Journal of Natural Pharmaceuticals*, v.4, n.1, p.32-36.

Manetti, L.M.; Delaporte, R.H.; Laverde Junior, A. 2009 - Metabólitos secundários da família bromeliaceae. *Química Nova* [online], v.32, n.7, p.1885-1897. ISSN 0100-4042.

Manetti, L.M.; Turra, A.F.; Takemura, O.S.; Svidzinski, T.I.E.; Laverde Junior, A. 2010 - Avaliação das atividades antimicrobiana, citotóxica, moluscicida e antioxidante de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.12, n.4, p.406-413.

Mocellin, M.G.; Simões, T.S.C.; Nascimento, T.F.S.; Teixeira, M.L.F.; Lounibos, L.P.; Oliveira, R. L.. 2009 - Bromeliad-inhabiting mosquitoes in an urban botanical garden of dengue endemic Rio de Janeiro - Are bromeliads productive habitats for the invasive vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* [online], 104 (8): 1171-1176, . ISSN 0074-0276.

Morandi Filho, W.J.; Botton, M.; Grützmacher, A.D.; Giolo, F.P.; Manzoni C.G. 2006 - Ação de produtos naturais sobre a sobrevivência de *Argyrotaenia sphaleropa* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae) e seletividade de inseticidas utilizados na produção orgânica de videira sobre *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Ciência Rural* [online]. Santa Maria, v.6, n.4, p.1072-1078. ISSN 0103-8478.

Motulsky, H.J. 1999 - *Analyzing data Graph Pad Prism*. San Diego, CA: Graph Pad Software Inc.; 1999.

Narciso, J.O.A. 2009 – Atividade larvicida de neolignana isolada de *Ocotea cymbarum* sobre *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). Monografia de Especialização em Entomologia Médica. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Brasil.

Park, I.K.; Schin, S.C.; Park, J.D.; Ahn, Y.J. 2002 - Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.50, p.1866-1870. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11902925>>. Acesso em: 07 dez. 2012.

Prefeitura Municipal de Miguel Pereira – PMMP-Venha conhecer a cidade de Miguel Pereira visitando o site de informações da cidade e região: Miguel Pereira - O 3º Melhor Clima do Mundo - Site Oficial.

Disponível em: <<http://www.miguelpereira.com.br/>>. Acesso em 23 out.2011.

Quirino, T.F.; Beserra, E.B.; Silva, J. A.; Silva, A.D.; Albuquerque, I.M. 2009 - *Avaliação do potencial inseticida de extratos de Nicotiana tabacum (Solanacea) para o controle de Aedes aegypti (L.) (Diptera: culicidae)*. Anais do Congresso de Pós-graduação e Pesquisa, XVI Encontro de Iniciação Científica. Campina Grande, PB. ISSN: 2176-7963.

Santos, F.C.C.; Almeida, A.P.; Cabral, M.M.O.2009 – *Bromelia antiacantha* apresenta toxicidade para *Oncopeltus fasciatus*. Anais do VIII Encontro de Iniciação Científica. Vassouras, RJ. ISSN: 978-85-88187-13-9.

Serpa, L.L.N.; Costa, K.V.R.M.; Voltolini, J.C.; Kakitani, I. 2006 - *Variação sazonal de Aedes aegypti e Aedes albopictus no município de Potim, São Paulo*. *Revista de Saúde Pública*. [online]. v.40, n.6, p. 1101-1105. ISSN 0034-8910.

Siddiqui, B.S.; Gulzar, T.; Mahmood, A.; Begum, S., Khan, B.; Afshan, F.2004 - *New insecticidal amides from petroleum ether extracto of dried Piper nigrum L. whole fruits*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*(Tokyo), v.52, p.1349-52.

Silva, H.H.G.; Silva, I.G. 1999 - *Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, [online], v.32, n.4, p.349-355. ISSN 0037-8682.

Silva, H.H.G.; Silva, I.G., Santos, R.M.G.; Rodrigues Filho, E.; Elias, C.N. 2004 - *Atividade larvicida de taninos isolados de Magonia pubescens St. Hil. (Sapindaceae) sobre Aedes aegypti (Diptera, Culicidae)*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.37, n.5, p.396-399.

Silva, I.G.; Guimarães, V.P.; Lima, C.G.; Silva, H.H.; Elias, C.N.; Mady, C.M.; Silva, V.V.M.; Nery, A.P.; Rocha, K.R.; Rocha, C.; Isac, E. 2003 - *Efeito*

larvicida e toxicológico do extrato bruto etanólico da casca do caule de *Magonia pubescens* sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) em criadouros artificiais. *Revista de Patologia Tropical*, v.32, n.1, p.73-86.

Silva, N.N.F.; Gomes, J.M.L. 2003 - *Bromeliaceae do Sítio Morro do Céu, Serra, ES*. *Natureza on line*, [online], v.1, n.2, p.1–11.

Sokal, R.R.; Rohlf, J.F. 1979 - *Biometria. Principios y Métodos Estadísticos em la Investigación Biológica*, H Blume, Madrid, 832 p.

Sousa, G.M.; Wanderley, M.G.L. 2000 - *Aechmea Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) do Estado de Pernambuco, Brasil*. *Acta Botânica Brasileira*. [online], v.14, n.1, p.77-97. ISSN 0102-3306.

Varejão, J.B.M.; Santos, C.B.; Rezende, H.R.; Bevilacqua, L.C.; Falqueto, A. 2005 - *Criadouros de Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus, 1762) em bromélias nativas na Cidade de Vitória, ES*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, [online], v.38, n.3, p.238-240. ISSN 0037-8682.

Williams, C.A.1978 - *The systematic implications of the complexity of leaf flavonoids in the bromeliaceae*. *Phytochemistry*, v.17, n.4, p.729–734.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 1970 - *Health aspects of chemical and biological weapons*. Geneva, Switzerland: WHO. Disponível em: <http://www.who.int/csr/deliberedemics/biochem1stenglish/en/>. Acesso em: 28 Jul. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2009 - *Dengue Hemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. Geneva, Switzerland: WHO. Disponível em: <http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/048-59.pdf>. Acesso em: 28 jul. 2011.

Yano, M. 2003 - *Estudo químico e farmacológico de Neoregelia cruenta (R. Graham) LB. Smith (Bromeliaceae)*. *Biblioteca Virtual em Saúde: Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro, s.n; ago. 175p.

Bioguided isolation of an antiviral compound from *Xylophragma myrianthum* (Cham.) Sprague (Bignoniaceae Juss.)

Geraldo Célio Brandão^{ad*}, Erna G. Kroon^b, Allan W. Matos^a, José D. Souza Filho^c, and Alaíde B. Oliveira^a

^aFaculdade de Farmácia, Departamento de Produtos Farmacêuticos, Universidade Federal of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31.270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil.

^bDepartamento de Microbiologia, ICB, Universidade Federal of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

^cDepartamento de Química, ICEX, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

^dEscola de Farmácia, Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Campus Morro do Cruzeiro, s/n, CEP 35.400-000 Ouro Preto, MG, Brazil.

*Corresponding author: Geraldo Célio Brandão.

Tel.: +55 31 3559 1088 - Fax +55 31 3559 1069

E-mails: celiobrandao@ef.ufop.br - celiobrandao@yahoo.com

Abstract

Xylophragma Sprague species (family Bignoniaceae Juss.) are climbing plants belonging to the tribe Bignonieae Juss. and some species have a wide spectrum of traditional medicinal uses including remedies for the treatment of infections. This paper reports the bioguided fractionation of an ethanol extract of *X. myrianthum* (Cham.) Sprague stems (EEXMS) for antiviral effects against *Human herpesvirus 1* (HSV-1), *Dengue virus 2* (DENV-2), murine *Encephalomyocarditis virus* (EMCV) and *Vaccinia virus* (VACV) that afforded XM-1 as an active compound. Spectroscopic analyses allowed the identification of XM-1 as arjunic acid whose occurrence in the Bignoniaceae and anti-DENV-2 activities are reported for the first time. *X. myrianthum* is revealed herein as a source of an antiviral compound and fractions.

Key words: Triterpene; Arjunic acid; *Dengue virus*; MTT assay

Resumo

Espécies do gênero *Xylophragma* Sprague são trepadeiras pertencentes à família Bignoniaceae Juss. (tribo Bignonieae Dumort.) e algumas tem um amplo espectro de usos medicinais, incluindo o tratamento de infecções. No presente artigo relatamos o fracionamento do extrato etanólico de caules de *Xylophragma myrianthum* (Cham.) Sprague biomonitorado por testes de atividade contra *Human herpesvirus 1* (HSV-1), *Dengue virus 2* (DENV-2), *Encephalomyocarditis virus* murino (EMCV) e *Vaccinia vírus* (VACV), o que levou ao isolamento de uma substância ativa, XM-1. Análises espectroscópicas permitiram a identificação desta como sendo o triterpeno ácido arjúnico, cuja atividade anti-DENV-2 e ocorrência em Bignoniaceae são relatadas pela primeira vez. *X. myrianthum* revela-se, portanto, como fonte de uma substância e frações antivirais.

Palavras Chave: Triterpeno; Ácido Arjúnico; Vírus Da Dengue; Ensaio do MTT

Introduction

Xylophragma Sprague species are climbing plants belonging to the family Bignoniaceae Juss. (tribe Bignonieae Dumort.). Several representatives of the Bignoniaceae have a wide spectrum of traditional medicinal uses including remedies for the treatment of infections. The family Bignoniaceae comprises about 82 genera and 827 species that are distributed mainly in tropical regions around the world (Gentry, 1992; Lohmann, 2006). This botanical family consists of trees, lianas, and more rarely shrubs and herbs. Brazil is an important center of diversity of the Bignoniaceae family with the occurrence of 32 genera and about 390 species (Lohmann, 2014). Ten species are recorded for the *Xylophragma* genus according to The Plant List (The Plant List, 2014). Of the six species occurring in Brazil, three are endemic, among them *Xylophragma myrianthum* (Cham.) Sprague. No report was found on medicinal uses of *Xylophragma* species. The scarcity of data on this genus has motivated its inclusion in our project on the antiviral activity of Bignoniaceae.

Plants belonging to the family Bignoniaceae are used as timbers and ornamentals. Some species have a traditional history of use as astringents and in the treatment of inflammation, syphilis, intestinal cramps, diarrhea, leucorrhea, anemia, leukemia, skin disorders and gonorrhea in different countries (Brandão et al., 2010a).

Several Bignoniaceae species have been investigated for their medicinal value including **the treatment of symptoms possibly related to viral infections (Brandão et al., 2010a). Evaluations of the anticancer activity have revealed the presence of highly cytotoxic naphthoquinones, mainly in the genus *Tabebuia* Gomes ex DC.** (Hussain et al., 2007).

Phytochemically, the Bignoniaceae family is characterized by the presence of naphthoquinones such as lapachol, α and β -lapachone, along with flavonoids and their O- and C-glycosides plus several terpenes (Barbosa et al., 2008; Oliveira et al., 1990; Pauletti et al., 2003; Pauletti, Bolzani and Young, 2003). *X. harleyi* (A.H. Gentry ex M.M. Silva & L.P. Queiroz) L.G. Lohmann (synon. *Arrabidaea harleyi* A.H. Gentry ex M.M. Silva & L.P. Queiroz) is the only species previously investigated. From the bark of this species a mixture of verbascoside and isoverbascoside was isolated and was shown to be active against *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Enterococcus*

faecalis, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* and *Candida albicans* (Lima et al., 2003).

Plants belonging to the family Bignoniaceae have been investigated for antiviral activity. The naturally occurring naphthoquinone β -lapachone and the semi-synthetic derivative succinamidyl- β -norlapachone have shown significant inhibition of echovirus type 19 (Pinto et al., 1987). Ethanol extracts of *Markhamia lutea* (Benth.) K. Schum., a plant used in folk medicine in Rwanda, showed prominent activity against herpes simplex virus and moderate activities against Coxsackie virus and polio virus (Vlietinck et al., 1995); phenylpropanoid glycosides isolated from this species were active against sincial respiratory viruses (RSV) (Kernan et al., 1998).

Biologically active compounds from natural sources have always been of great interest as sources of potentially useful drugs against infectious diseases. Viral infections are a current problem of industrialized and developing countries, accounting for severe damages in human health and economic losses in livestock. The limited number of antiviral drugs in clinical use explains the search for new drugs and/or templates, and the plant chemical diversity might represent a source of novelty (Chattopadhyay and Naik, 2007). Within this context, the aim of the present study was the bioguided fractionation of *X. myrianthum* extracts and constituents against *Human herpesvirus 1* (HSV-1), *Dengue virus 2* (DENV-2), murine *Encephalomyocarditis virus* (EMCV) and *Vaccinia virus* (VACV). The antiviral activity of *X. myrianthum* against VACV-WR was first reported recently along with the evaluation of the ethanol extract of eight other species of the Bignoniaceae family (Brandão et al., 2010b).

The four viral samples used in the present investigation represent virus of human and veterinary clinical interest. HSV-1, an RNA virus, is a highly prevalent pathogen causing primary infections which present clinically as herpes labialis or as primary herpetic gingivostomatitis. About 12% of primary HSV-1 infections are associated with symptoms, e.g. epidermal lesions inside and around the mouth. Acyclovir remains as the main antiherpetic drug although drug resistant strains frequently develop following therapeutic treatment of herpes virus (Whitley and Roizman, 2001).

VACV is a poxvirus (family Poxviridae), with a DNA genome that can infect invertebrates and vertebrates including humans as natural hosts. Re-emergence of infections by human vaccinia virus (VACV) besides

exanthematic VACV outbreaks have affected dairy cattle and rural workers in Brazil and Asia causing economic losses and affecting health services (Assis et al., 2013).

EMCV (Picornaviridae family) is associated to sporadic myocarditis and encephalitis in domestic swines, several non-human primates and other mammals. The infection is frequently fatal with sudden death. Outbreaks of this virus have been recorded in captive livestock (Oberste et al., 2009).

Dengue virus is an arbovirus of the Flaviviridae family with a RNA genome. With more than one-third of the world's population living in areas at risk for infection, dengue virus is a leading cause of illness and death in the tropics and subtropics. As many as 400 million people are infected yearly. No vaccine or specific antiviral therapy currently exists to address the growing threat of dengue. In Brazil, dengue is the fastest growing disease with an increasing number of dengue hemorrhagic fever cases (Teixeira, 2012).

Experimental section

Plant material

Aerial parts of *X. myrianthum* were collected in Caratinga, state of Minas Gerais, Brazil. The species was identified by Dr. J. A. Lombardi, Department of Botany, Institute of Biosciences, UNESP, Rio Claro, Brazil. A voucher specimen is deposited in the BHCB/UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, under the number 24760.

Extraction, isolation and chromatographic analyses

After drying at 40 °C for 72 h, plant leaves (133.8 g) and stems (268.4 g) were ground and exhaustively extracted by percolation with 96% EtOH at room temperature. The solvent was removed in a rotatory evaporator under vacuum at 50 °C, giving a dark residue (EEXML, 28.9 g and EEXMS, 18.1 g), which was kept in a dissector until constant weight. A portion of EEXMS (10.0 g) underwent filtration on a column of silica gel eluted successively with 1:1 *n*-hexane-CH₂Cl₂, CH₂Cl₂, 1:1 CH₂Cl₂-EtOAc, EtOAc, 1:1 EtOAc-MeOH, MeOH and 8:2 MeOH-H₂O. The elution was monitored by TLC observing the plates under UV (254 and 365 nm) and visible light, before and after spraying with sulfuric *p*-anisaldehyde.

Partial concentration of the ethyl acetate fraction afforded a white solid which was recrystallized in ethanol, giving XM-1 (52.8 mg).

Structure determination

Structure determination was accomplished by spectral analysis and comparison with literature data. ¹H NMR, ¹³C NMR, NOESY, TOCSY, HSQC, and HMBC spectra were obtained in DMSO-d₆ with TMS as internal standard and were recorded on a Bruker Advance DPX400 equipment. Chemical shifts are given as δ (ppm). LC-MS were obtained by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) on an UPLC Acquity (Waters) with Argon as the collision gas, and the collision energy was set at 40 eV. Analysis was performed on a quadrupole instrument fitted with an electrospray source in the positive mode. Ion spray voltage: -4 kV; orifice voltage -60 V.

Spectral data

Arjunic acid (XM-1): White amorphous solid. IR: ν_{\max} 3386, 2933, 1688 cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 5.23 (m, 1H, H-12), 5.14 (m, 1H, OH-19), 4.47 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, OH-2), 3.4 (bl, H-2), 2.92 (bl, 1H, H-18), 3.11 (dd, *J* = 8.0 and 4.0 Hz, 1H, H-19), 2.74 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-3), 1.09 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.71 (s, 3H), 0.67 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): See TABLE 2. ESI-MS: found *m/z* 489.5 [M+H]; calculated for C₃₀H₄₉O₅ *m/z* 489.4.

Conditions

A LiChrospher 100 RP-18 column (5 μm, 250 × 4 mm i.d.) (Merck) was employed at a temperature of 40 °C, flow rate of 1.0 mL/min and detection at wavelengths of 220, 280 and 350 nm. The injection volume was 10.0 μL. Elution was carried out with a linear gradient of water (A) and acetonitrile (B) (from 5% to 95% of B in 60 min).

Sample preparation

To an aliquot (10.0 mg) of dried EEXMS, HPLC grade MeOH was added. The mixture was dissolved by sonication in an ultrasound bath for 15 min, followed by centrifugation at 10,000 rpm for 10 min. The supernatant was filtered through a Millipore membrane (0.2 μm) before injection.

Cell culture and virus

Vero cells (ATCC CCL-81) and LLCMK₂ cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) at 37 °C, in 5% CO₂ atmosphere, supplemented with 5% fetal bovine serum, 50 µg/mL gentamicin, 100 U/mL penicillin and 5 µg/mL amphotericin B. HSV-1 was a clinical isolate of human herpes virus type 1 (HSV-1) obtained in the Virus Laboratory, UFMG, Belo Horizonte, Brazil. Dengue virus 2 (DENV-2), encephalomyocarditis murine virus (EMCV) and the Western Reserve strain of vaccinia virus (VACV-WR) were kindly donated by Dr. L. Figueiredo (USP, Ribeirão Preto, Brazil), Dr. I. Kerr (London Research Institute, London, UK) and Dr. C. Jungwirth (University of Würzburg, Germany), respectively.

Cytotoxicity assay

Vero and LLCMK₂ cell monolayers were trypsinized, washed with culture medium and plated in a 96-well flat-bottomed plate with 6.0×10^4 cells per well. After 24 h incubation, the diluted extracts, fractions and compound (500 – 0.125 µg/mL) were added to the wells and the plates were further incubated for 48 h and 72 h at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂. The supernatants were removed from the wells and 28 µL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Merck, 2 mg/mL solution in PBS) were added to each well. The plates were incubated for 1.5 h at 37 °C and DMSO (130 µL) was added to the wells to dissolve the resulting formazan crystals. The plates were placed on a shaker for 15 min and the optical density was determined at 492 nm (OD₄₉₂) on a multi-well spectrophotometer (Stat Fax 2100) (Kumar and Das, 1996). The results were obtained from four replicates with at least four concentrations of each sample. Cytotoxicity (percentage inhibition of cell growth) was calculated using the equation $100 \times (A - B) / A$, where A and B are the OD₄₉₂ values of untreated and treated cells, respectively.

Antiviral assays

The viral samples were titrated by the tissue culture infectious dose (TCID₅₀) microculture assay and the titer was expressed as the virus dilution which causes a 100% cytopathic effect in a cell monolayer after 48 h of incubation for HSV-1 and EMCV and 72 h for VACV-WR (Rodriguez et al., 1990). The determined titers were 2.5×10^6 , 1.0×10^6 and 1.0×10^6 TCID₅₀/ml, 1.0×10^4 , respectively, for HSV-1, EMCV, VACV-WR and DEN-2 virus.

The antiviral activity of the extracts and isolated compounds were evaluated by the MTT colorimetric assay (Betancur-Galvis et al., 1999). Vero cell monolayers were grown in 96 well microtiter plates. Dilutions of the extracts and compounds in non-cytotoxic concentrations were added to the wells after viral infection. The plates were incubated at 37 °C in humidified 5% CO₂ atmosphere for a period of 48 and/or 72 h. Controls consisted of untreated infected, treated non-infected and untreated non-infected cells. Positive controls (acyclovir, Calbiochem, USA; α-2a interferon, Bergamo, Brazil) were also employed in each assay. Cell viability was evaluated by the MTT colorimetric method as described above for the cytotoxicity assay.

The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) of the assayed samples is defined as the concentration that reduces the OD₄₉₂ value of treated uninfected cells to 50% of that of untreated uninfected cells. The 50% antiviral effective concentration (EC₅₀) is expressed as the concentration that achieves 50% protection of treated infected cells from the cytopathic effect of the virus. The percentage of protection is estimated by the equation $[(A - B) / (C - B)] \times 100$, where A, B and C are the OD₄₉₂ values of treated infected, untreated infected and untreated uninfected cells, respectively.

CC₅₀ and EC₅₀ values for each sample were obtained from dose-effect curves and are the average of four assays carried out with four different concentrations within the inhibitory range of the samples. The selectivity index (SI) is defined as CC_{50} / EC_{50} .

Results and Discussion

Bioguided fractionation of the ethanol extract from *Xylophragma myrianthum* stems (EEXMS)

Confirming previously published results (Brandão et al., 2010b), the ethanol extract from the stems of *X. myrianthum* (EEXMS) has shown a moderate antiviral activity against VACV-WR (36.4 ± 3.7 µg/mL) and was inactive against the other assayed virus. An aliquot of this extract (10.0 g) was submitted to bioguided chromatographic fractionation through a silica gel column employing as eluents: 1:1 n-hexane-CH₂Cl₂, CH₂Cl₂, 1:1 CH₂Cl₂-EtOAc, EtOAc, 1:1 EtOAc-MeOH, MeOH and 8:2 MeOH-H₂O). 1:1 CH₂Cl₂-EtOAc and EtOAc fractions inhibited the replication of HSV-1, VACV-WR and DENV-2. The EC₅₀

value for the 1:1 CH₂Cl₂-EtOAc fraction was 30.6 ± 1.7 µg/mL against HSV-1 while the EtOAc fraction was active against HSV-1 (EC₅₀ 29.1 ± 2.4 µg/mL), VACV-WR (EC₅₀ 9.8 ± 0.4 µg/mL) and DENV-2 (EC₅₀ < 12.5 µg/mL). The EtOAc fraction afforded a precipitate whose recrystallization from ethanol led to the isolation of XM-1 that exhibited activity only against DENV-2 (EC₅₀ 24.8 ± 0.8 µg/mL). No test sample inhibited the multiplication of EMCV. Extract (EEXMS) and 1:1 n-hexane-CH₂Cl₂, 1:1 EtOAc-MeOH, MeOH and 8:2 MeOH:H₂O fractions were not cytotoxic to LLCMK₂ and Vero cells (CC₅₀ > 200 µg/mL) while all the other fractions have generally shown low cytotoxicity against Vero cells (CC₅₀ from 46.6 ± 1.6 to 67.0 ± 4.0 µg/mL). XM-1 showed moderate cytotoxicity to Vero cells (CC₅₀ 20.4 ± 2.4 µg/mL) and was less cytotoxic to LLCMK₂ cells (CC₅₀ > 40 µg/mL). Selectivity indexes (SI = CC₅₀ / EC₅₀) were calculated and ranged from 1.6 to 13.7 (TABLE 1).

Structural identification of XM-1

Fractionation of EEXMS afforded XM-1 which was identified as arjunic acid (Fig. 1) by spectrometric analyses (UV, IR, MS, 1D and 2D NMR).

XM-1 was isolated as a white solid, melting point 278.6 - 280.4 °C, showing one purple spot in TLC

when sprayed with the Liebermann-Burchard reagent that is a positive result for triterpenes (Wagner, Bladt and Zgainsky, 1984). The IR spectrum disclosed a wide band for O-H stretching (3386 cm⁻¹), an intense band for C=O stretching (1688 cm⁻¹); bands at 1031-1048 cm⁻¹ are related to C-O in alcohols and no signals were registered at 1600 and 1500 cm⁻¹ confirming the aliphatic character of XM-1 (Siverstein and Webster, 2000).

The ¹H-NMR spectrum (400 MHz, DMSO-d₆, TABLE 2) was typical of a triterpene exhibiting more intense signals in the range of δ 0.6 to 1.6 with seven singlets for seven methyl groups linked to quaternary carbons. A multiple at δ 5.23 was assigned to an olefinic hydrogen. The signals at δ 3.11 (dd, J = 8.0 and 4.0 Hz, 1H) and δ 2.74 (d, J = 8.0 Hz, 1H) should be related to two carbinolic hydrogens located at C-3 and C-2, respectively. Considering that H-3 is in an axial position, as it is in most of the oleanenes, H-2 must be also in an axial position and, therefore, the hydroxy groups at C-2 and C-3 are in a *trans*-diequatorial relationship, as is confirmed by the coupling constant between these hydrogens (J_{H₂H₃} = 8.0 Hz). The hydroxy groups exhibited signals at δ 5.14 (m, 1H) and δ 4.47 (d, J = 4.0 Hz, 1H). The multiplicity of these signals is explained by the use of DMSO-d₆ as

Table 1 - Cytotoxicity and *in vitro* antiviral activity of stem ethanol extract (EEXMS), fractions and pure compound (XM-1) from *Xylophragma myrianthum*.

Extract, Fractions, Compounds	Vero cells CC ₅₀ mg/mL	LLCMK ₂ cells CC ₅₀ mg/mL	¹ HSV-1 EC ₅₀ mg/mL	SI ^c	² VACV-WR EC ₅₀ mg/mL	SI ^c	³ EMCV EC ₅₀ mg/mL	⁴ DENV-2 EC ₅₀ mg/mL	SI ^d
EEXMS	> 500	88.2±4.1	NA		36.4 ± 3.7	> 13.7	NA	NA	
1:1 Hex-CH ₂ Cl ₂	> 200	NT	NA		NA		NT	NT	
CH ₂ Cl ₂	46.6 ± 1.6	NT	NA		NA		NT	NT	
1:1 CH ₂ Cl ₂ -EtOAc	49.5 ± 2.9	NT	30.6 ± 1.7	1.6	NA		NA	NT	
EtOAc	67.0 ± 4.0	80.2 ± 0.8	29.1 ± 2.4	2.3	9.8 ± 0.4	6.8	NA	< 12.5	> 6.4
1:1 EtOAc-MeOH	> 200	NT	NT		NA		NT	NT	
MeOH	> 200	NT	NT		NA		NT	NT	
2:1 MeOH-H ₂ O	> 200	NT	NT		NA		NT	NT	
XM-1	20.4 ± 2.4	> 40	NA		NA		NA	24.8 ± 0.8	> 1.6
Acyclovir			^a 40						
α-2a Interferon					^{ab} 2.5 × 10 ²		^{ab} 1.5 × 10 ²	^{ab} 2.5 × 10 ³	

SI, selective index; ¹viral titer TCID₅₀/mL 2.5 × 10⁶ in 48 h; ²viral titer TCID₅₀/mL 1.0 × 10⁶ in 48 h; ³viral titer TCID₅₀/mL 1.0 × 10⁶ in 48 h; ⁴viral titer TCID₅₀/mL 1.0 × 10⁴ in 72 h; NA, no activity in the assayed concentrations; NT, no text; ^a80 to 100% inhibition of cytopathic effect; ^bconcentration in IU/mL; ^ccalculation based on the values of CC₅₀ in Vero cells; ^dcalculation based on the values of CC₅₀ in LLCMK₂ cells

Table 2 - ^{13}C NMR (100 MHz) data for arjunic acid and XM-1 in DMSO-d_6

Position	Arjunic acid ^{13}C δ^a	XM-1 ^{13}C δ	^b Multiplicity
C-1	47.1	47.1	CH_2
C-2	67.2	67.2	CH
C-3	82.2	82.3	CH
C-4	38.8	38.9	C
C-5	54.8	54.9	CH
C-6	16.9	18.1	CH_2
C-7	32.4	32.4	CH_2
C-8	38.9	45.4	CH
C-9	47.2	47.3	CH
C-10	38.5	46.7	C
C-11	23.0	23.2	CH_2
C-12	122.6	122.2	CH
C-13	143.4	143.5	C
C-14	41.9	41.4	C
C-15	28.4	28.4	CH_2
C-16	24.0	24.1	CH_2
C-17	46.6	44.7	C
C-18	43.1	43.2	CH
C-19	80.0	80.1	CH
C-20	36.9	37.8	C
C-21	28.4	27.9	CH_2
C-22	34.8	34.9	CH_2
C-23	27.1	28.8	CH_3
C-24	16.8	17.0	CH_3
C-25	16.1	16.2	CH_3
C-26	16.9	16.9	CH_3
C-27	28.7	28.1	CH_3
C-28	179.0	179.2	C
C-29	28.7	24.5	CH_3
C-30	24.4	24.1	CH_3

^aDelgado, Da Silva and Fot (1984) in $\text{C}_6\text{D}_6\text{N}$ (100 MHz). ^bAssigned according to ^{13}C NMR DEPT 135 experiment.

solvent what slows down the chemical exchange of such protons and the coupling is established.

The ^{13}C NMR spectrum of XM-1 (100 MHz, DMSO-d_6) exhibited signals of olefinic carbons at δ 143.54 (C) and δ 122.21 (CH) whose multiplicity was given by a DEPT 135 experiment and that were assigned to C-12 and C-13 in a 12-oleanene triterpene skeleton (Mahato and Kundu, 1994). The presence of a carboxyl group in XM-1 was indicated by the signal of a carbonyl group at δ 179.19 that is in agreement with the IR spectrum that showed a band for a carbonyl

group. Three signals were registered for carbinol carbons (δ 67.2, 80.1 and 82.3) and the DEPT 135 experiment showed that they correspond to methine carbons of secondary alcohols. It should be noticed that the ^1H NMR spectrum had shown signals for only two carbinol hydrogens at δ 3.11 (dd, $J = 8.0$ and 4.0 Hz, 1H) and 2.74 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H). The presence of a third secondary alcohol in the structure of XM-1 was then inferred from 2D heteronuclear NMR experiments that have shown correlations between the carbon signal at δ 80.1 (C-19) and a hydrogen signal at δ 3.11 (H-19) in a HSQC experiment, besides a

long distance correlation (HMBC) between H-19 and C-17 (d 44.7). Previous examination of the ^1H NMR spectrum of XM-1 had shown that the signal for this carbinolic hydrogen was not observed and it was assumed that it would be superimposed on the wide band of water that is present in the DMSO-d_6 . The assignment of the signals at d 67.2 and 82.3 to C-2 and C-3, respectively, was confirmed by heteronuclear correlations (HSQC) with ^1H signals at d 2.74 (H-2) and 3.11 (H-3). Further long distance couplings were registered for H-3 with C-24 (d 17.0) and C-4 (d 38.9) by HMBC experiments (TABLE 3).

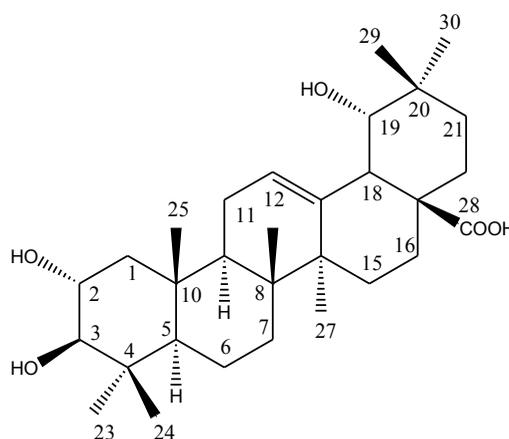
XM-1 has a molecular mass of 488 u as inferred from the molecular ion adduct at m/z 489.34 (M + H) that was determined by LC-MS/ESI. No fragmentation was observed for the M + H ion. This molecular mass is in agreement with the structure of a dihydroxy derivative of oleanolic acid in which one hydroxy group is located at C-2, as already discussed. The other hydroxy group should be located at C-19 on the basis of 2D NMR data (HSQC and HMBC). The H-19 signal at d 3.11 exhibits correlations with the C-19 signal at d 80.1 ($^1J^{13}\text{C}$, HSQC) and with C-17 (d 44.7, $^2J^{13}\text{C}$, HMBC) as shown in TABLE 3.

The spectroscopic data allowed the identification of XM-1 as arjunic acid by comparison (TABLE 2) with previously reported ^{13}C NMR data (Delgado et al., 1984). Some discrepancies are certainly due to the use of different solvents: DMSO-d_6 and $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$. Up to now, arjunic acid is described mainly in the family Combretaceae and discloses a wide spectrum of biological activities (Eldeen et al., 2008).

XM-1 is responsible for the peak at Rt 33.2 min in the HPLC-DAD profile of EEXMS (FIGURE 2) and its UV spectrum registered online shows only a terminal absorption curve that is coherent with the structure of arjunic acid. Importantly, EEXMS exhibited moderate

activity against VACV (EC_{50} 36.4 ± 3.7 mg/ml, IS = 13.7) but was inactive against DENV-2. This result is an indication of the low content of XM-1 in EEXMS. The AcOEt fraction was more potent than XM-1 disclosing an EC_{50} of 12.5 $\mu\text{g/mL}$ and IS > 5 against DENV-2 that may be related to possible synergism with other compounds present in this fraction. The presence of other antiviral compounds in the AcOEt fraction can be inferred from its activity against VACV and HSV-1 while XM-1 has shown no effect against these viruses (TABLE 1).

Figure 1 - Chemical structure of arjunic acid (XM-1).



Triterpenes as antivirals

There are few reports on the antiviral activity of triterpenes. Recently, Brandão and Collaborators (2013) reported the antiviral activity of ursolic acid against HSV-1 and dengue virus 2 (DENV-2) with EC_{50} values of 6.2 and 3.2 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

Arjunic acid was firstly isolated from *Terminalia arjuna* (Roxb. ex DC.) Wight & Arn. and occurs in several

Table 3 - Heteronuclear correlations observed in the HSQC and HMBC contour maps for XM-1 (^1H 400 MHz; ^{13}C 100 MHz; DMSO-d_6)

^1H (δ)	$^1J^{13}\text{C}$ (δ)	$^2J^{13}\text{C}$ (δ)	$^3J^{13}\text{C}$ (δ)
H-2 (3.40)	C-2 (67.2)		
H-3 (2.74)	C-3 (82.3)		C-24 (17.0)
			C-4 (38.9)
			C-2 (67.2)
H-12 (5.23)	C-12 (122.2)	C-14 (41.4)	
H-18 (2.92)	C-18 (43.2)		
H-19 (3.11)	C-19 (80.1)	C-17 (44.7)	
19-OH		C-19 (80.1)	C-18 (43.2)

other plant species (Verma et al., 2012). Triterpenes are a class of natural products that exhibit a broad spectrum of biological activities including anti-inflammatory, antimicrobial, anti-cancer, antimalarial and other activities (Lucetti et al., 2010; Manzano et al., 2013; Wu et al., 2013). Several triterpenes have shown antiviral activity (Cos et al., 2004; Jassim and Naji, 2003; Khan et al., 2005). The highly oxygenated triterpenes ganoderiol F and ganodermanontriol have been isolated from the fruits of *Ganoderma lucidum* and are active against HIV-1 (Et-Mekkawy et al., 1998). Another triterpene with activity against HIV-1 is lancilactone C that inhibited the replication of this virus with an EC_{50} value of 1.4 $\mu\text{g/mL}$ and a therapeutic index greater than 71.4 (Chen et al., 1999). Chiang and Collaborators (2005) reported the broad spectrum antiviral activity of *Ocimum basilicum* L., the sweet basil of Indian and Chinese medicine, against diverse virus families. Aqueous and ethanolic extracts afforded ursolic acid that showed strong activity against HSV-1, adenovirus 8 (ADV-8), CVB1 and enterovirus 71 (EV71) with EC_{50} values of 6.6, 4.2, 0.4 and 0.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The antiviral activity of ursolic acid against CVB1 and EV71 is evident during the infection process and the replication phase, indicating that ursolic acid can be a potential candidate against these RNA viruses, what deserves further investigation (Chiang et al. 2005).

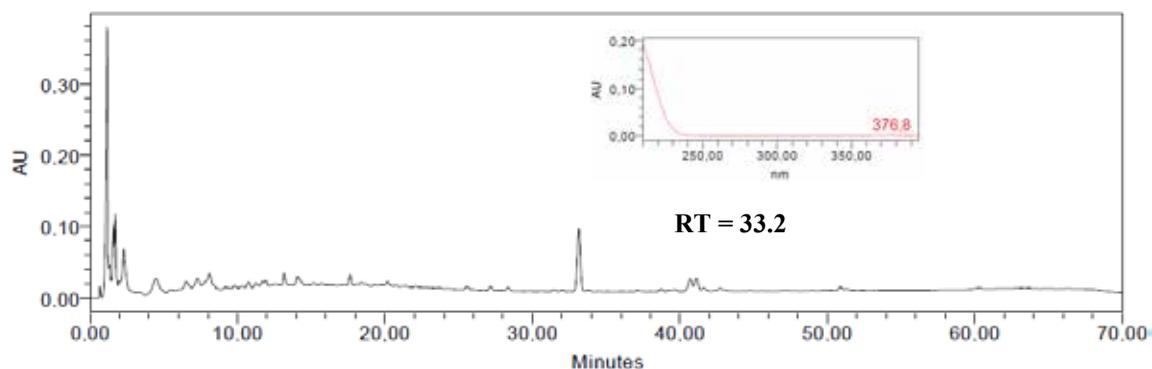
Zhou and Collaborators (2010) reported two new antiviral triterpenes, shion-22-methoxy-20(21)-en-3-one and shion-22(30)-en-3,21-dione, isolated from the rhizomes of *Aster tataricus*. These compounds showed inhibitory effects against hepatitis B surface antigen (HBsAg) with EC_{50} values of 0.89 and 4.49

$\mu\text{g/mL}$, respectively. Shion-22-methoxy-20(21)-en-3-one inhibited hepatitis Be antigen (HBeAg) with EC_{50} value of 0.83 $\mu\text{g/mL}$, and shion-22(30)-en-3,21-dione showed inhibitory activity on hepatitis A (HAV) with an EC_{50} value of 11.2 $\mu\text{g/mL}$. Moronic acid which was isolated from *Rhus javanica* L. has shown activity against acyclovir-resistant, thymidine kinase-deficient and wild-type HSV-1 strains with EC_{50} of 1.6, 2.0 and 3.9 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The betulonic acid isolated from this same species exhibited activity against wild-type HSV-1 (EC_{50} 2.6 $\mu\text{g/mL}$). Oral administration of moronic acid to cutaneously HSV-1 infected mice significantly retarded skin lesions and/or prolonged the mean survival times of infected mice without toxicity. It can be considered a potential anti-HSV agent with a different mechanism of action than acyclovir, the main anti-herpes drug (Kurokawa et al, 1999).

The chloroform extract of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. contains some triterpene esters. Only 3-*O-trans*-caffeoyltormentic acid reduced rhinovirus infection. This compound was ineffective towards HIV-1 and sindbis virus replication (Tommasi et al., 1992).

Ursolic, oleanolic and betulonic acids and their derivatives occur frequently and sometimes abundantly in many plants and inhibit HIV-1 protease and the stability of the gp120/gp41 complex (Matthe'e; Wright and Konig, 1999; Labrosse, Treboute and Alizon, 2000; Cos et al., 2003; Yogeewari and Sriram, 2005). Betulinic and oleanolic acids were isolated from *Syzygium claviflorum* (Roxb.) Wall. ex A.M. Cowan et Cowan. and exhibited anti-HSV and anti-HIV activity.

Figure 2 - RP-HPLC-DAD fingerprint for the crude ethanol extract of *Xylophragma myrianthum* stems (EEXMS). Detection: 220 nm. UV spectra on line, $R_t = 33.2$ min (XM-1 = arjunic acid). Chromatographic conditions: see Experimental Section.



Betulinic acid is more active with an EC₅₀ value of 1.4 µM (Ikeda et al, 2005; Chattopadhyay and Naik, 2007). Dihydrobetulinic acid has an EC₅₀ of 0.9 µM, while the esterification at C-3 hydroxyl of those acids resulted in the more potent antiviral compound 3-O-(3,3'-dimethylsuccinyl) betulinic acid (DSB) with an EC₅₀ < 3.5 × 10⁻⁴ µM. DSB can block a key step in the processing of a viral core capsid protein (Kashiwada et al. 1996) and is very active against drug-resistant virus, effective in an animal model of HIV infection and suitable for use in combination therapy and is under phase II clinical trial.

Pavlova and Collaborators (2003) reported antiviral properties of betulin, betulinic and betulonic acids in cell cultures infected with HSV-1, influenza FPV/Rostock and ECHO 6 viruses. All the evaluated triterpenes were active against HSV-1. Betulin, and especially betulinic acid, also suppressed ECHO 6 virus replication.

Oleanolic acid isolated from many plants, including *Xanthoceras sorbifolium* Bunge wood (Sapindaceae), inhibits herpes and HIV virus replication, but oxidation at the C-3 hydroxyl position resulted in 3-oxotirucalla-7,24-dien-21-oic acid with improved antiviral activity (EC₅₀ 0.0039 µg/mL) and also block HIV protease with an IC₅₀ of 10 µg/mL (Labrosse, Treboute and Alizon et al., 2000; Yogeewari and Sriram, 2005). Ursolic acid isolated from *Crataegus pinnatifida* Bunge leaves showed potent action against HIV-1 protease activity at 100 µg/mL (Kashiwada et al., 1996). Maslinic acid isolated from *Geum japonicum* Thunb. can inhibit HIV-1 protease at EC₅₀ 17.9 µg/mL while moronic acid extracted from *Myrceugenia euosma* (O. Berg) D. Legrand showed significant anti-HIV activity with therapeutic index greater than 186 (Ito et al. 2001; Xu et al., 1996). The protostanes, garcisaterpenes A and C, isolated from *Garcinia speciosa* Wall., showed significant inhibitory activities against HIV-1 RTase and in the syncytium formation assay, while a secocycloartene triterpenoid, nigronoic acid, from *Schisandra sphaerandra* Stapf, inhibits the RTase of both HIV-1 and HIV-2 (Rukachaisirikul et al. 2003; Sun et al., 1996).

Conclusion

The presently reported results identified the ethanol extract of *X. myrianthum* stems as a source of anti-dengue and anti-vaccinia virus compounds. Finally, our findings are in line with the traditional use of

Bignoniaceae species as antiviral agents in different South American countries. To the best of our knowledge, the occurrence of arjunic acid in Bignoniaceae and the anti-DENV-2 activity are reported here for the first time.

Acknowledgements

This work was supported by funds from FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Brazil) and CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

References

- Assis, F.L.; Borges, I.A.; Mesquita, V.S.; Ferreira, P.C.; Trindade, G.S.; Kroon, E.G.; Abrahão, J.S. 2013 - Vaccinia Virus in Household Environment during Bovine Vaccinia Outbreak, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v.19, p.2045 – 2047.
- Barbosa, W.L.R.; Pinto, L.N.; Quignard, E.; Vieira, J.M.V.; Silva Jr., J.O.C.; Albuquerque, S. 2008 - *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.18, p.544-548.
- Betancur-Galvis, L.A.; Saez, J.; Granados, H.; Salazar, A.; Ossa, J.E. 1999 - Antitumor and Antiviral Activity of Colombian Medicinal Plant Extracts. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 531-535.
- Brandão, G.C.; Kroon, E.G.; Santos, J.R.; Oliveira, A.B. 2010a - Antiviral activities of plants occurring in the state of Minas Gerais, Brazil: Part 2. Screening Bignoniaceae species. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.20, p.742-750.
- Brandão, G.C.; Kroon, E.G.; Santos, J.R.; Stehmann, J.R.; Lombardi, J.A.; Oliveira, A.B. 2010b - Antiviral activity of Bignoniaceae species occurring in the State of Minas Gerais (Brazil): part 1. *Letters in Applied Microbiology*, 51, 469-476.
- Brandão, G.C.; Kroon, E.G.; Souza, D.E.R.; Souza Filho, J.D.; Oliveira, A.B. 2013 - Chemistry and Antiviral Activity of *Arrabidaea pulchra* (Bignoniaceae). *Molecules*, v.18, p.9919-9932.
- Chattopadhyay, D.; Naik T.N. 2007 - Antivirals of Ethnomedicinal Origin: Structure-activity

Relationship and Scope. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, v.7, p.275-301.

Chen D.; Zhang, S.; Wang, H.; Zhang, S.; Sun, Q.; Cosentino, L.; Lee, K. 1999 - Novel anti-HIV lancilactone C and related triterpenes from *Kadsura lancilimba*. *Journal of Natural Products*, v.62, p.94-97.

Chiang, L.C.; Leng, L.T.; Cheng, P.W.; Chiang, W.; Lin, C.C. 2005 - Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v.32, p.811-816.

Cos, P.; Maes, L.; Vanden Berghe, D.; Hermans, N.; Pieters, L.; Vlietinck, A.J. 2004 - Plant substances as anti-HIV agents selected according to their putative mechanism of action *Journal of Natural Products*, v.67, p.284-293.

Cos, P.; Vanden Berghe, D.; De Bruyne, T.; Vlietinck, A.J. 2003 - Plant substances as antiviral agents: an update (1997-2001). *Current Organic Chemistry*, v.7, p.1163-1180.

Delgado, M.C.C.; Da Silva, M.S.; Fot, R.B. 1984 - 3 β -hydroxy-21 β -e-cinnamoyloxyolean-12-en-28-oic acid, a triterpenoid from *Enterolobium contortisiliquum*. *Phytochemistry*, v.23, p.2289-2292.

Eldeen, I.M.; Van Heerden, F.R.; Van Staden, J. 2008 - Isolation and biological activities of termilignan B and arjunic acid from *Terminalia sericea* roots. *Planta Médica*, v.74, p.411-413.

El-Mekkawy, S.; Meselhy, M.R.; Nakamura, N.; Tezuka, Y.; Hattori, M.; Kakiuchi, N.; Shimotohno, K.; Kawahata, T.; Otake, T. 1998 - Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, v.49, p.1651-1657.

Gentry, A.H. 1992 - A synopsis of Bignoniaceae ethnobotany and economic botany. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v.79, p.53-64.

Hussain, H.; Krohn, K.; Ahmad, V.U.; Miana, G.A.; Green, I.R. 2007 - Lapachol: an overview. *Arkivoc*, p.145-171.

Ikeda, T.; Yokomizo, K.; Okawa, M.; Tsuchihashi, R.; Kinjo, J.; Nohara, T.; Uyeda, M. 2005 - Anti-herpes virus type 1 activity of oleanane-type triterpenoids. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v.28, p.1779-1781.

Ito, J.; Chang, F.R.; Wang, H.K.; Park, Y.K.; Ikegaki, M.; Kilgore, N.; Lee, K.H. 2001 - Anti-AIDS Agents. 48.1 anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis *Journal of Natural Products*, 64, 1278-1281.

Jassim, S.A.A.; Naji, M.A. 2003 - Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Journal of Applied Microbiology*, v.95, p.412-427.

Kashiwada, Y.; Hashimoto, F.; Cosentino, L.M.; Chen, C.H.; Garrett, P.E.; Lee, K.H. 1996 - Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives as potent anti-hiv agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.39, p.1016-1017.

Kernan, M.R.; Amarquaye, A.; Chen, J.L.; Chan, J.; Sesin, D.F.; Parkinson, N.; Ye, Z.; Barrett, M.; Bales, C.; Stoddart, C.A.; Sloan, B.; Blanc, P.; Limbach, C.; Mrisho, S.; Rozhon, E.J. 1998 - Antiviral phenylpropanoid glycosides from the medicinal plant *Markhamia lutea*. *Journal of Natural Products*, v.61, p.564-570.

Khan, M.T.H.; Ather, A.; Thompson, K.D.; Gambari, R. 2005 - Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. *Antiviral Research*, v.67, p.107-119.

Kumar, P.A.; Das, S.K. 1996 - A colorimetric assay to evaluate the cytotoxic activity of the intestinal intraepithelial lymphocytes of chickens. *Veterinary Research Communications*, v.20, p.513-518.

Kurokawa, M.; Basnet, P.; Ohsugi, M.; Hozumi, T.; Kadota, S.; Namba, T.; Kawana, T.; Shiraki, K. 1999 - Anti-herpes simplex virus activity of moronic acid purified from *Rhus javanica* in vitro and in vivo. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.289, p.72-78.

Labrosse, B.; Treboute, C.; Alizon, M. 2000 - Sensitivity to a nonpeptidic compound (RPR103611) blocking human immunodeficiency virus type 1 Env-mediated fusion depends on sequence and accessibility of the gp41 loop region. *Journal of Virology*, v.74, p.2142.

Lima, C.S.A.; Amorim, E.L.C.; Sena, K.X.F.R.; Chiappeta, A.A.; Nunes, X.P.; Agra, M.F.; Cunha, E.V.L.; Silva, M.S.; Barbosa-Filho, J.M. 2003 - Antimicrobial activity of a mixture of two isomeric phenylpropanoid glycosides from *Arrabidaea harleyi*

- A.H. Gentry (Bignoniaceae). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.39, p.77-81.
- Lohmann, L.G. 2006 - Untangling the phylogeny of neotropical lianas (Bignoniaceae, Bignoniaceae). *American Journal of Botany*, v.93, p.304–318.
- Lohmann, L.G. 2014 - Bignoniaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB112305>>. Acesso em: 01 Mar. 2014.
- Lucetti, D.L.; Lucetti, E.C.P.; Bandeira, M.A.M.; Veras, H.N.H.; Silva, A.H.; Leal, L.K.A.M.; Lopes, A.A.; Alves, A.C.C.; Gabriela S Silva, G.S.; Brito, G.A.; Viana, G.B. 2010 - Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. *Journal of Inflammation* 7:60 Disponível em: <<http://www.journal-inflammation.com/content/7/1/60>> Acesso em 03 Dez. 2014
- Mahato, S.B.; Kundu, A.P. 1994 - ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. *Phytochemistry*, v.37, p.1517-1575.
- Manzano, P.I.; Miranda, M.; Abreu-Payrol, J.; Silva, M.; Sterner, O.; Peralta, E.L. 2013 - Pentacyclic triterpenoids with antimicrobial activity from the leaves of *Vernonanthura patens* (Asteraceae). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, v.25, p.539-543.
- Matthée, G.; Wright, A.D.; König, G.M. 1999 - HIV reverse transcriptase inhibitors of natural origin. *Planta Médica*, v.65, p.493-506.
- Oberste, M.S.; Blair, E.P.G.; Nix, A.W.; Ksiazek, T.G.; Comer, J.A.; Rollin, P.; Goldsmith, C.S.; Olson, J.; Kochel T.J. 2009 - Human febrile illness caused by Encephalomyocarditis Virus infection, Peru. *Emerging Infectious Diseases*, v.5, p.640-646.
- Oliveira, A.B.; Raslan, D.S.; Miraglia, M.C.M.; Mesquita, A.A.L.; Zani, C.L.; Ferreira, D.T.; Maia, J.G.S. 1990 - Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de Bignoniáceas brasileiras. *Química Nova*, v.13, p.302-307.
- Pauletti, P.M.; Bolzani, V.S.; Young, M.C.M. 2003. Constituintes químicos de *Arrabidaea samydoides* (Bignoniaceae). *Química Nova*, v.26, p.641-643.
- Pauletti, P.M.; Gamboa, I.C.; Silva, D.H.S.; Young, M.C.M.; Tomazela, D.M.; Eberlin, M.N.; Bolzani, V.S. 2003 - New antioxidant C-Glucosylxanthones from the stems of *Arrabidaea samydoides*. *Journal of Natural Products*, v. 66, p. 1384-1387.
- Pavlova, N.I.; Savinova, O.V.; Nikolaeva, S.N.; Boreko, E.I.; Flekhter, O.B. 2003 - Antiviral activity of betulin, betulinic and betulonic acids against some enveloped and non-enveloped viruses. *Fitoterapia*, v.74, p.489–492.
- Pinto, A.V.; Pinto, M.C.F.R.; Lagrota, M.H.; Wigg, M.D.; Aguiar, A.N.S. 1987 - Antiviral activity of naphthoquinones: I. Lapachol derivatives against enteroviruses. *Revista latinoamericana de microbiologia*, v.29, p.15-20.
- Rodríguez, D.J.; Chulia, J.; Simões C.M.O.; Amoros, M.; Mariotte, A.M.; Girre, L. 1990 - Search for *in vitro* antiviral activity of a new isoflavonic glycoside from *Ulex europaeus*. *Planta Medica*, v.56, p.59-62.
- Rukachaisirikul, V.; Pailee, P.; Hiranrat, A.; Tuchinda, P.; Yoosook, C.; Kasisit, J.; Taylor, W.C.; Reutrakul, V. 2003 - Anti-HIV-1 protostane triterpenes and diglyceranylbenzophenone from trunk bark and stems of *Garcinia speciosa*. *Planta Médica*, v.69, p.1141-1146.
- Silverstein, R.M.; Webster, F.X. (ed.) 2000 - *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.
- Sun, H.D.; Qiu, S.X.; Lin, L.Z.; Wang, Z.Y.; Lin, Z.W.; Pengsuparp, T.; Pezzuto, J.M.; Fong, H.H.S.; Cordell, G.A.; Farnsworth, N.R. 1996 - Nigranoic acid, a triterpenoid from *Schisandra sphaerandra* that inhibits HIV-1 reverse transcriptase. *Journal of Natural Products*, v.59, p.525-527.
- Teixeira M.T. 2012 - Few characteristics of dengue's fever epidemiology in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 54(Suppl. 18), p.S1-S4.
- The Plant List A working list of all plant species. 2014. <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=Xylophragma>. Acesso 23/03/14.
- Tommasi, N.; Simone, F.; Pizza, C.; Mahmood, N.; Moore, P.S.; Conti, C.; Orsi, N.; Stein, M.L. J. 1992 - Constituents of *Eriobotrya japonica*. A study of their antiviral properties. *Journal of Natural Products*, v.55, p.1067-1073.

Verma, S.C.; Jain, C.L.; Padhi, M.M.; Devalla, R.B. 2012 - Microwave extraction and rapid isolation of arjunic acid from *Terminalia arjuna* (Roxb. ex DC.) stem bark and quantification of arjunic acid and arjunolic acid using HPLC-PDA technique. *Journal of Separation Science*, v.35, p.1627-33.

Vlietinck, A.J.; Van Hoof, L.; Totté, J.; Lasure, A.; Vanden-Berghe, D.; Rwangabo, P.C.; Mvukiyumwami, J. 1995 - Screening of hundred Rwandese medicinal plants for antimicrobial and antiviral properties. *Journal of Ethnopharmacology*, v.46, p.31-47.

Wagner, H.; Blatt, S.; Zgainsky, E.M. (ed.) 1984 - *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Springer. Berlin.

Whitley, R.J.; Roizman, B. 2001 – Herpes simplex virus infections. *The Lancet*, v.357; p.1513-1518.

Wu, G.S.; Guo, J.J.; Bao J.L.; Li, X.W.; Chen, X.P.; Lu, J.J.; Wang, Y.T. 2013 - Anti-cancer properties of triterpenoids isolated from *Ganoderma lucidum* – a review. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, v.22, p.981-992.

Yogeeswari, P.; Sriram, D. 2005 - Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties *Current Medicinal Chemistry*, v.12, p.657-666.

Xu, H.X.; Zeng, F.Q.; Wan, M.; Sim, K.Y. 1996 - Anti-HIV Triterpene acids from *Geum japonicum*. *Journal of Natural Products*, v. 59, p. 643–645.

Zhou, W.B.; Tao, J.T.; Xu, H.M.; Chen, K.L.; Zeng, G.Z.; Ji, C.J.; Zhang, Y.M.; Tan, N.H. 2010 - Three new antiviral triterpenes from *Aster tataricus*. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, v. 65b, p.1393-1396.

Chemical composition, ethnopharmacology and biological activity of *Geissospermum Allemão* species (Apocynaceae Juss.)

Composição química, etnofarmacologia e atividade biológica de espécies de *Geissospermum Allemão* (Apocynaceae Juss.)

¹Marlene Rodrigues Marcelino Camargo; ²Rodrigo César das Neves Amorim, ²Luiz Francisco Rocha e Silva, ³Ana Lúcia Basílio Carneiro, ¹Marcos José Salgado Vital, ^{2*}Adrian Martin Pohlit

1. Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, Universidade Federal de Roraima. Av. Ene Garcez, 2413, Bairro Aeroporto, CEP 69304-000, Boa Vista, Roraima, Brasil.

2. Amazonian Active Principles Laboratory (LAPAAM), Department of Technology and Innovation (COTI), National Institute for Amazonian Research (INPA). Av. André Araújo, 2936, Petrópolis, CEP 69067-375, Manaus, Amazonas, Brazil.

3. Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Av. General Rodrigo Octávio, 6200, Coroado I, CEP 69077-000, Manaus, Amazonas, Brazil.

*Corresponding author: ampohlit@inpa.gov.br Phone: +55 92 3643-3177; FAX: +55 92 3643-3079.

Resumo

A literatura de química e farmacologia sobre *Geissospermum* é revisada. Pau-pereira ou pao pereira (*G. laeve* (Vell.) Miers; *G. vellosii* Fr. All. é sinónimo) é a mais conhecida de aproximadamente seis espécies de *Geissospermum*. A casca de pau-pereira é usada principalmente por sua amargura e propriedades medicinais. É usada para tratar dor, doenças de fígado, febres, perda de apetite, mal-digestão, tontura, prisão de ventre e malária, entre outras enfermidades. A outra espécie de *Geissospermum* tem usos tradicionais semelhantes. Pau-pereira é fonte de alcaloides indólicos monoterpênicos isolados e extratos e frações enriquecidos nesses alcaloides que são utilizados na clínica médica para o tratamento do câncer de próstata (flavopereirina) e HIV-AIDS (flavopereirina). Também, os extratos de *G. vellosii* exibem atividade antinociceptiva em animais (talvez devido a 12-metoxi-1-metilaspidospermina). Amnesia induzida em camundongos é reduzida por extratos de pau-pereira e geissospermina que também possuem atividade anticolinesterase e aplicação potencial contra o mal de Alzheimer. Extratos de *G. argenteum* Woodson exibem atividade antibacteriana. Extratos de três espécies de *Geissospermum* e os alcaloides isolados aspidocarpina, flavopereirina e geissolosimina inibem fortemente o parasito da malária humana *Plasmodium falciparum* Welch *in vitro*. Duas espécies de *Geissospermum* inibem *Plasmodium yoelii* em roedores e exibem toxicidade. Os extratos de *Geissospermum* e alcaloides inibem *P. falciparum*, *Leishmania infantum* Nicolle e *Trypanosoma cruzi* Chagas e merecem estudos futuros como agentes terapêuticos.

Palavras-chave: pau-pereira; anticâncer; anti-HIV; anti-*Leishmania*; anti-*Trypanosoma*; antimalárico.

Abstract

The chemistry and pharmacology literature on *Geissospermum* is surveyed. Pau-pereira or pao pereira (*G. laeve* (Vell.) Miers; *G. vellosii* Fr. All. is a synonym) is the best known of approximately six *Geissospermum* species. Pau-pereira bark is mainly used for its bitterness and medicinal properties. It is used to treat pain, liver ailments, fevers, appetite loss, indigestion, dizziness, constipation and malaria, among other ailments. The other *Geissospermum* species have similar traditional uses. Pau-pereira provides monoterpene indole alkaloid rich extracts and fractions and pure isolates that comprise formulations used in clinical practice for the treatment of prostate cancer

(flavopereirine) and HIV-AIDS (flavopereirine). Also, *G. vellosii* extracts exhibit pronounced antinociceptive activity in animals (perhaps due to 12-methoxy-1-methylaspidospermine). Induced amnesia in mice is reduced by pau-pereira extracts and geissospermine which also have anticholinesterase activity and potential application against Alzheimer's Disease. *G. argenteum* Woodson extracts exhibit *in vitro* antibacterial activity. Extracts of three *Geissospermum* species and isolated alkaloids aspidocarpine, flavopereirine, and geissolosimine strongly inhibit the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* Welch *in vitro*. Two *Geissospermum* species inhibit *Plasmodium yoelii* in rodents and exhibit toxicity. *Geissospermum* extracts and alkaloids inhibit *P. falciparum*, *Leishmania infantum* Nicolle and *Trypanosoma cruzi* Chagas and deserve further study as therapeutic agents.

Keywords: pau pereira; anticancer; anti-HIV; anti-*Leishmania*; anti-*Trypanosoma*; antimalarial.

Botanic aspects of *Geissospermum Allemão*

According to (Ribeiro et al., 1999), this genus is comprised of trees with alternate leaves, furrowed trunk and little or no latex. Lorenzi (2002) reports that this genus produces latex in the fruit and the extremities of the branches. The trees of this genus exhibit heavy, yellowed sapwood, differentiated from the darker heartwood; regular and irregular grain, fine texture, indistinct smell and bitter taste. The Plant List (TPL, 2014) recognizes six *Geissospermum* species all of which are native to Brazil (Table 1). They occur in the terra firme woods of the Amazon region, mainly in Amazonas and Pará States and also in the northeast, southeast and south of Brazil (Forzza, 2010) and in other countries of the Amazon region (WCSP, 2014). Importantly, *G. laeve* is the accepted name and *G. vellosii* is a synonym however the species cited in each work surveyed was maintained throughout the text.

Chemistry of *Geissospermum* species

Studies on the chemical composition of *Geissospermum* species began at the end of the 19th century in Brazil and Europe. *G. vellosii* (synonym

for *G. laeve*), known as pau-pereira, was the first species of this genus to undergo studies on chemical composition. From this species, many alkaloids were isolated. Fewer chemical studies have been performed on the other 5 species of *Geissospermum*.

Alkaloids of *G. laeve*

The most important alkaloid isolated from *G. laeve* is geissospermine (**1**) (Figure 1). Isolated for the first time by O. Hesse in 1877 (Puisseux et al., 1959), **1** (isolated from *G. vellosii*) was subjected to acid hydrolysis and yielded cleavage products geissoschizine (**2**), apogeissoschizine (**3**) and geissoschizoline (**4**) (Rapoport et al., 1958). The structure of **2** was proposed by (Rapoport et al., 1958) and confirmed by (Puisseux et al., 1959). The structures of the cleavage products **2** and **3** together with a partial structure of **1** were later proposed (Rapoport et al., 1960). The stereochemistry of **1** was established by X-ray crystallography and by NMR methods (Chiaroni et al., 1976; Goutarel et al., 1978). Chiaroni and Riche (1979) isolated **1** from *G. laeve* and re-confirmed that acid hydrolysis of **1** provided **2** and **4**. Recently, alkaloids **1**, **2** and **4** were found to be the main components of *G. vellosii* bark, with other classes of compounds (Werner et al., 2009).

Table 1 - Accepted *Geissospermum* species names, synonyms and geographical distributions.

Accepted Name ¹	Synonym ¹	Distribution ^{2,3}
<i>G. argenteum</i> Woodson		N. South America: N. Brazil (AM, AP, RO) to Venezuela, Guianas
<i>G. fuscum</i> Markgr.		S. Venezuela to N. Brazil
<i>G. laeve</i> (Vell.) Miers	<i>G. martianum</i> Miers <i>G. vellosii</i> Fr. All. <i>Tabernaemontana laevis</i> Vell.	N. South America: Guianas to Brazil (AP, PA, AM, MA, BA, DF, MG, ES, RJ)
<i>G. reticulatum</i> A. H. Gentry		S. Venezuela, Peru, N. Brazil (AC, RO) to N. Bolivia
<i>G. sericeum</i> Benth. & Hook. f.		N. South America: Guianas, Brazil (AP, AM, AC, RO, MA)
<i>G. urceolatum</i> A. H. Gentry		N. Brazil (PA, AM)

¹TPL (2014); ²WCSP (2014); ³Forzza (2010).

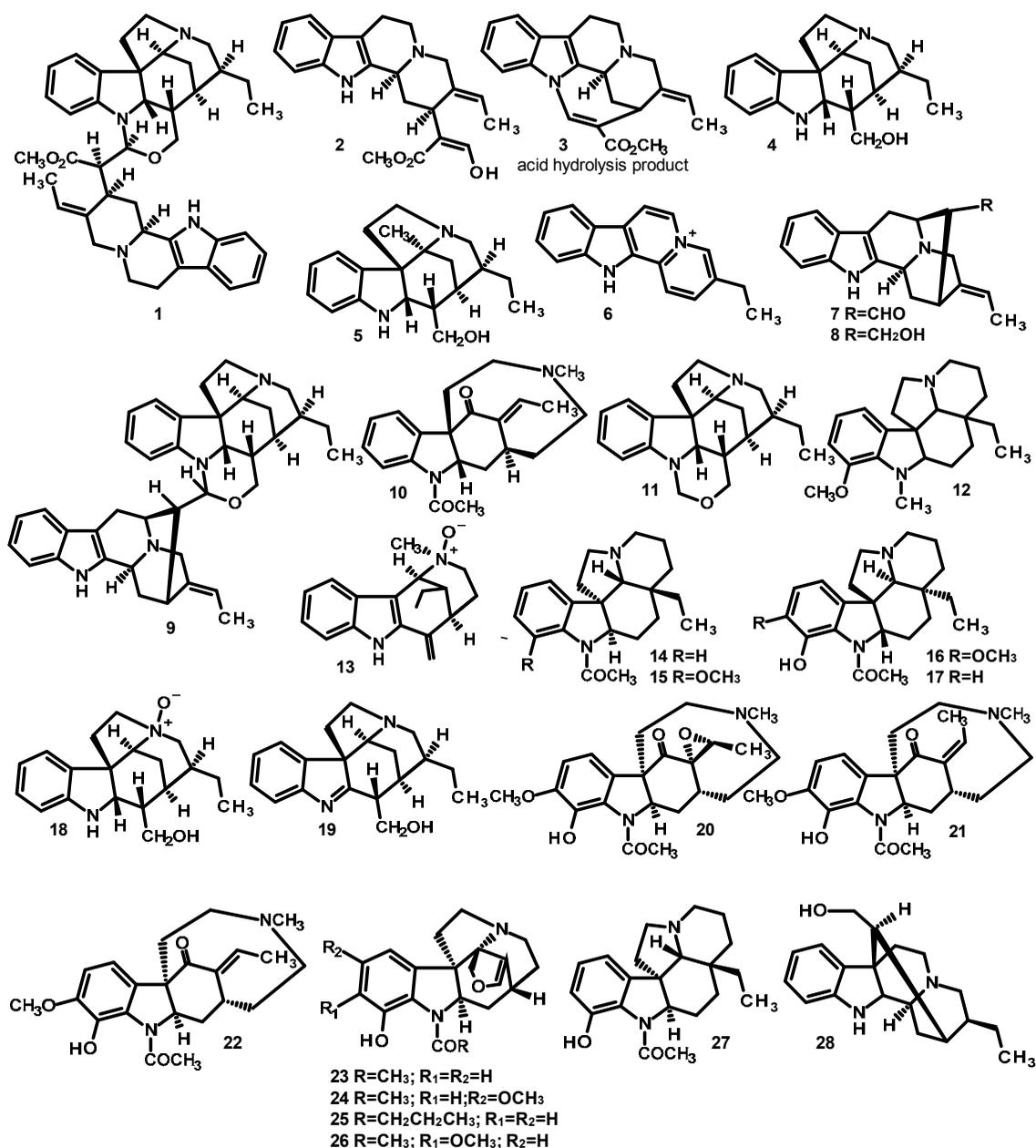
Pereirine (**5**) (Figure 1) was the first alkaloid isolated in Brazil. It was obtained as a mixture from pau-pereira by the pharmacist Ezequiel Corrêa dos Santos. However, this isolation of **5** was not recognized in Europe (Almeida et al., 2009). Bertho and Koll (1961) determined the structure of **5** isolated from pau-pereira.

(Bejar et al., 1957) and Hughes and Rapoport (1958) independently isolated the strong base flavopereirine (**6**) (cited species were *G. laeve* and *G. vellosii*,

respectively) and elucidated its structure (Figure 1). Ban and Seo (1961) reported methods for the synthesis of **6** and other β -carboline derivatives. Later, Wenkert and Kilzer (1962) synthesized **6** using then novel methods in indole alkaloid synthesis such as mercuric acetate oxidation and palladium-induced conversion.

Rapoport and Moore (1962) isolated three monoterpenoid indole alkaloids from *G. vellosii*: vellosimine (**7**), vellosiminol (**8**) and geissolosimine (**9**) (Figure

Figure 1 - Structures of alkaloids found in *Geissospermum* species.



1) through fractionation of the alkaloid-rich pH 7 fraction (Manske and Harrison, 1965). In 1973, geissovelline (**10**) was isolated from *G. vellosii* (Moore and Rapoport, 1973). Recently, high performance counter-current chromatography (HPCCC) and electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS_n) techniques were applied to the isolation of **1**, **4**, **8** and **9** and geissoschizone (**11**) from *G. vellosii* stem bark crude methanol extract. The electrospray ionization mass spectrometry fragmentation behavior of these alkaloids was also established (Mbeunkui, Grace and Lila, 2012; Mbeunkui et al., 2012). Werner and collaborators (2009) isolated the alkaloid 12-methoxy-1-methylaspidospermidine (**12**) from the bark of *G. vellosii*. Pausperadine A (**13**) was isolated from *G. vellosii* by Ishiyama and collaborators (2005).

Alkaloids of *G. argenteum*, *G. reticulatum* and *G. sericeum*

Paccioni and Husson (1978) studied *G. argenteum* bark and leaves collected in French Guiana. Chloroform extraction, basification, followed by column chromatography led to the isolation of (-)-demethoxyaspidospermine (**14**), (-)-aspidospermine (**15**), (+)-aspidoscarpine (**16**) and (+)-demethylaspidospermine (**17**). Steele and collaborators (2002) isolated **4**, **6**, geissoschizoline N⁴-oxide (**18**) and 1,2-dehydrogeissoschizoline (**19**) from the water-methanol extracts of *G. sericeum* bark (from Roraima State, Brazil). Recently, aspidospermatan-type monoterpene indole alkaloids **20-26** were isolated from the leaves and bark of *G. reticulatum* (Reina et al., 2012). The absolute configuration was established for (+)-2R,7R,15R,17S,19S-10-demethoxy-12-hydroxy-17,19-epoxygeissovelline (**20**) by vibrational circular dichroism (VCD). The handedness of geissovelline derivatives **21** and **22**, geissospermidine (**23**) and related geissospermidine derivatives **24-26** was deduced based on their connectivity, relative stereochemistry, and the determination of skeletal chiral centers 2R,7R,15R of **20** (Gordillo-Román et al., 2013). Also, O-demethylaspidospermine (**27**), geissosreticulatine (**28**) and **6** were isolated from *G. reticulatum* in this work.

Names for *Geissospermum* species and non-medicinal uses

Geissospermum species are known in different parts of Brazil by the names: pau-pereira, quinarana ("false quinine"), quina-quina (a reference to the

bitterness of quinine), acari, acariquara, acariquara branca, among other names. Plants of this genus are known for their extreme bitterness. Acariquara branca is used in civil construction for the manufacture of posts and poles for the support of telephone and power lines, supports for houses in inundated areas and for the production of handles for different tools and agricultural implements (hammers, hoes, spades, shovels, etc.).

Ethnobotanic and other literature on medicinally-useful *Geissospermum* species

Besides these uses, the bark of *Geissospermum* species is highly valued for its medicinal properties (Lorenzi, 2002). Pau-pereira (*G. vellosii*) was considered by Gustavo Peckolt (1861-1923) to be one of the ten most important Brazilian medicinal plants (Santos, Pinto and Alencastro, 1998). The bark of *G. vellosii* is frequently used to prepare traditional remedies for the treatment of liver problems, fever, malaria, dizziness, stomach disorders, appetite loss, indigestion, constipation, pain and is used as an aphrodisiac (Muñoz et al., 2000; Jácome, Souza and Oliveira, 2003; Werner et al., 2009). Its curative powers are associated with its bitterness. *G. vellosii* (pau-pereira) was cited in the first edition of the Brazilian Pharmacopeia. Pau-pereira may be suffering from diminished use (availability) and species authenticity in medicinal plant markets in Brazil (Brandão et al., 2013). In their literature survey on Brazilian medicinal plant research, Brito and Brito (1993) reported that *G. vellosii* extracts are used as: neuromuscular blocker, anticholinesterase agents and hypotensives. The active principle cited for these and other biological activities is flavopereirine (**6**).

Geissospermum species bark is generally cited in the ethnobotanic literature for the treatment of malaria. Brandão and collaborators (1992) performed a field survey of traditionally used antimalarial plants in locations in south Pará and northeast Rondônia State in the Brazilian Amazon region and found that *G. sericeum* was used. Furthermore, Oliveira and collaborators (2003) found *G. sericeum* to be among the most important antimalarial plants in a survey of 108 literature sources on ethnomedical uses of plants. Also, *G. sericeum* was among the antimalarial plants revealed by an ethnobotanic survey by Milliken (1997) conducted among the indigenous groups of the savanna and forest of Roraima State in the northern Brazilian Amazon region. *G. sericeum*

bark decoctions can cause abortions. Nevertheless, they are used in the treatment of malaria by the Wapixana, Wai-Wai, Macuxi, Taurepang and Xiriana (Yanomami) peoples. *G. sericeum* was said by one of the informants to be used in association with *Citrus aurantifolia* roots (Rutaceae) in the prophylaxis of malaria. Also, *G. sericeum* and other antimalarial plants are used as abortifacients and plant choice is based on the extremely bitter taste which may have some relation to the toxicity.

An ethnopharmacological study in French Guiana revealed the common use of 34 plant species as antimalarials in traditional preparations. Modern drugs were also in regular use among the group studied. Many individuals combine modern drugs and traditional preparations so as to guarantee a real cure. The plant is believed to purify the blood and the liver. *Geissospermum* species were said also to be used for the prevention (prophylaxis) of malaria (Vigneron et al., 2005).

Ethnopharmacology and biological activity of *Geissospermum* species

There are a variety of medicinal uses for *Geissospermum* extracts and isolated alkaloids. This includes clinically-used standardized extracts in anti-cancer formulations and an anti-HIV formulation based on pure isolated substances. *Geissospermum* extracts and or alkaloids exhibit *in vitro* and *in vivo* anticholinesterase and antinociceptive, *in vitro* antimicrobial, *in vitro* anti-*Trypanosoma* and anti-*Leishmania*, and *in vitro* and *in vivo* (in mice) antimalarial activities. The literature on the pharmacological activity of *Geissospermum* species extracts and isolated alkaloids is surveyed in the next sections.

Anti-cancer activity and clinical usefulness of pau-pereira (*G. laeve*)

Bemis and collaborators (2009) tested the *in vitro* and *in vivo* effects of a *G. vellosii* extract against the human prostate cancer LNCaP cell line. This extract strongly inhibited the growth of cultures of LNCaP cells in a dose-dependent manner and induced apoptosis. Extract was administered orally over 6 weeks to immunodeficient mice xenografted with LNCaP cells. Tumor growth was suppressed by up to 80% in some groups compared with tumors in vehicle-treated mice (controls). Lower doses (10 or 20 mg/kg/day), not higher ones, were best at inducing tumor cell apoptosis

and in reducing tumor cell proliferation and xenograft growth compared to controls.

A natural formulation was developed comprised of pau-pereira (*G. vellosii*) bark extract and *Rauwolfia vomitoria* Afzel extract (Apocynaceae) for the prevention and treatment of prostate cancer. This phytotherapeutic agent contains the β -carboline flavopereirine (**6**) from pau-pereira and the alkaloid alstonine from *Rauwolfia vomitoria* in the proportion 3-4:1, respectively. These alkaloids exhibit different mechanisms of action in the prevention and control of cancer. The mechanism of action of this natural formulation is based on the induction of apoptosis (programmed cell death) through the destabilization of the DNA of cancerous cells. At proper formulation doses, the mechanism is selective for neoplastic cells. It is claimed that this natural medicine reduces the levels of PSA (prostate specific antigen), an important metabolic marker for this type of cancer. It is also said to attenuate symptoms such as benign prostatic hyperplasia (BPH). The preparation of this formulation involves partial purification to remove toxic compounds (Hall and Beljanski, 2005).

The Beljanski alternative cancer protocol based on *G. vellosii* and *R. vomitoria* is recognized in medical circles and is the subject of ongoing research to establish the extent to which it can be used against different forms of prostate cancer (Block, 2014). Recently the effects of *G. vellosii* extracts on castration-resistant prostate cancer (CRPC) have been examined *in vitro*. Pau-pereira (called pao-pereira or pao) extracts induce cell growth arrest and apoptosis, partially through inhibiting NF- κ B activation in prostate cancer cells and may protect against CRPC (Chang et al., 2014).

Pau-pereira extracts exhibit *in vitro* and *in vivo* cytotoxicity to ovarian cancer cells and also exhibit synergistic effects when combined with the ovarian cancer drug carboplatin. *In vivo*, pau-pereira extract alone suppressed tumor growth in a mouse model of preclinical ovarian cancer by 79% and decreased ascites by 55%. A pau-pereira-carboplatin combination increased tumor inhibition to 97% and ascites were completely suppressed. These extracts could enhance the effects of carboplatin and have potential in ovarian cancer chemotherapy (Yu and Chen, 2014).

Anti-HIV activity of flavopereirine

A pharmaceutical composition was developed based on flavopereirine (**6**) for the treatment of HIV (human

immunodeficiency virus) infections. The formulation consists of 250-500 mg orally administered or 200-600 µg intradermally injected active principle (Beljanski, 1994; 2005).

Antinociceptive activity of *G. laeve*

In their survey of sources of Brazilian plants from the 16th to 19th century with possible action on the central nervous system (CNS), Giorgetti, Rossi and Rodrigues (2011) revealed preliminary work demonstrating the inhibition of serotonin capture by alkaloids from *G. laeve* (Barros et al., 2006). Later, Werner and collaborators (2009) demonstrated that the crude ethanol extract and a chloroform fraction obtained from *G. vellosii* Fr. All. exhibited pronounced antinociceptive effects in chemical models of nociception. These models involved induced pain produced by acetic acid and formalin in mice. The doses used (1, 10, 30 and 100 mg/kg of animal weight) did not interfere with the locomotion of the animals. The antinociceptive effect of the dichloromethane fraction involved an interaction with the serotonergic 5-HT_{1A} system. The alkaloid that was isolated and identified as being a participant in this interaction was 12-methoxy-1-methyl-aspidospermine (**12**) which contributed to the explanation of the antinociceptive properties of the plant extract.

Anticholinesterase activity of *G. laeve*

Antiacetylcholinesterase activity of an alkaloid-rich fraction from *G. vellosii* stem bark has been studied (Lima et al., 2009). This fraction inhibited rat brain and electric eel acetylcholinesterases, and horse serum butyrylcholinesterase in a concentration-dependent manner with median inhibition concentration (IC₅₀) values of 39.3, 2.9 and 1.6 mg/mL, respectively. The effect of this alkaloid fraction from *G. vellosii* trunk bark on the memory of mice was also explored. The main alkaloid in this fraction was geissospermine (**1**) and it promoted reduction in scopolamine-induced amnesia in mice. This model of cholinergic deficit is validated for the development of drugs used in the symptomatic treatment of Alzheimer's Disease. Thus, **1** exhibits anticholinesterase activity and can reverse cognitive deficits in models based on cholinergic hypofunction.

In follow up work, a docking study was performed on **1** in the active site of acetylcholinesterase (AChE).

This allowed predictions of optimal "bioactive" conformation and binding orientation for **1** that exhibited a large number of interactions between specific functional groups of geissospermine and AChE amino acid residues (Araújo et al., 2011).

Antimicrobial activity of *G. argenteum*

The antimicrobial activity of crude ethanol extracts of 10 species of plants found in Amapá State in the Brazilian Amazon forest was studied (Correia et al., 2008). *G. argenteum*, known by the common name quinarana-da-fruta-pequena, was one of the plants collected. The diffusion in agar protocol was used to evaluate antimicrobial activity. The procedure was carried out by impregnating paper discs that are 6 mm in diameter with ethanol extracts and then evaporating the ethanol to obtain quantities of extract of 80 to 1.25 µg on the paper discs. The extracts were tested against ATCC (American Type Culture Collection) and multi-drug-resistant strains obtained from a hospital (clinical) collection. In this study, *G. argenteum* exhibited activity against multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* (minimum inhibitory concentration (MIC) of 5 µg). In tests against ATCC strains, these extracts exhibited activity against *Pseudomonas aeruginosa* (MIC 20 µg) and against *S. aureus* (MIC 80 µg).

In a more recent study, the antimicrobial activity of extracts and fractions of *G. argenteum* collected in Roraima State, Brazil was evaluated. The leaf water and bark methanol extracts, as well as the ethyl acetate fraction of the bark methanol extract and the water-methanol fraction of the bark methanol extract were found to be partially active against *S. aureus*. Bark methanol extract and the hexane fraction of the bark methanol extract were partially active against *S. mutans*. Extracts and fractions tested were inactive against *Escherichia coli* and *Candida albicans* (Camargo, 2011).

Anti-*Leishmania* and anti-*Trypanosoma* activities of *G. reticulatum* extracts and alkaloids

G. reticulatum extracts and isolated alkaloids exhibit inhibitory activity against protozoan parasites (Reina et al., 2012). *O*-demethylaspidospermine (**27**) was very active against *Leishmania*

infantum (Concentration that inhibits cell growth by 50%, GI_{50} = 7.7 mg/mL) and less active against *Trypanosoma cruzi* (GI_{50} = 41.7 mg/mL). The toxicity of **27** against CHO cells (GI_{50} = 16.7 mg/mL) was lower than that of the reference drugs amphotericin B and nifurtimox (GI_{50} = 10.3 and 13.9 mg/mL, respectively). N-Deacetyl-N-butanoylgeissospermidine (**25**) moderately inhibited *L. infantum* (GI_{50} = 52.2 mg/mL).

Antimalarial activity of *Geissospermum* extracts and alkaloids

A survey of traditionally used antimalarial plants from the Brazilian Amazon found that *G. sericeum* trunk bark extracts were inactive against *P. berghei* *in vivo* (Brandão et al., 1992). In an independent study, the bark methanol extract of *G. argenteum* was considered to be highly active as it exhibited *in vitro* antiplasmodial activity (IC_{50} = 4.6 μ g/mL) against *P. falciparum* K1 strain (Camargo, 2011). As discussed above, aspidocarpine (**16**) is a component of the bark extracts of *G. argenteum* (Paccioni and Husson, 1978). This compound (isolated from *Aspidosperma desmanthum* (Henrique, Nunomura and Pohlit, 2010) has been shown to exhibit high *in vitro* activity (IC_{50} = 19 nM) against *P. falciparum* K1 strain (Andrade-Neto et al., 2007).

In a study of antimalarial plants used traditionally by a Chácobo Amerindian community in the Bolivian Amazon, the *G. laeve* trunk bark ethanol-water extract exhibited good *in vitro* inhibitory activity against the chloroquine-sensitive F32 strain (IC_{50} = 3.1 μ g/mL) and the chloroquine-resistant (IC_{50} = 2.0 μ g/mL) Indo strain of *P. falciparum*. *G. laeve* extracts were evaluated in the 4-day suppressive test in *P. vinckei* or *P. berghei*-infected mice and at doses of 50 mg/kg/day, these extracts suppressed parasitemias by 41 or 36 %, respectively, versus controls. Also, *G. laeve* extracts were toxic to rodents at doses of 100 mg/kg. There is a need for phytochemical studies and isolation of constituents to determine the antiplasmodial and toxic compounds present in *G. laeve* polar extracts (Muñoz et al., 2000).

In French Guiana, a study was performed on the traditional preparations used in the treatment of malaria. Thus, *G. laeve* bark (40 g) was placed in cold water (1 L), then boiled (15 min) and allowed to cool. In another preparation, *G. laeve* bark (40 g) was macerated in rum (250 mL) for 1 month).

G. argenteum bark was similarly macerated in rum. After total evaporation, *G. laeve* extract was found to be inactive (no schizonticidal activity) *in vitro* against chloroquine-resistant *P. falciparum*. This preparation inhibited parasitemia *in vivo* against *Plasmodium yoelii* versus controls by 35% at a dose of 23 mg/kg in rodents. *G. argenteum* extract was not tested *in vitro*. *In vivo* at a dose of 324 mg/kg this preparation inhibited *P. yoelii* by 44.3%. *G. argenteum* extracts were tested in the *P. yoelii* liver stage and exhibited 83% inhibition of the intra-hepatic cycle of the parasite, consistent with its use in malaria prophylaxis (Bertani et al., 2005).

In vitro antiplasmodial tests were performed on *G. sericeum* bark methanol-water extracts (90:10) and on isolated alkaloids (Steele et al., 2002). In these tests, the chloroquine-resistant K1 strain and chloroquine-sensitive T9-96 strain of *P. falciparum* were used. The crude extract exhibited IC_{50} = 1.78 \pm 0.047 μ g/mL against K1 strain. Geissoschizoline (**4**) and geissoschizoline N⁴-oxide (**18**) were inactive (IC_{50} > 40 μ M) against both parasite strains. 1,2-dehydrogeissoschizoline (**19**) was inactive against K1 and T9-96 *P. falciparum* strains (IC_{50} = 27.26 \pm 10.9 and 35.37 \pm 2.36 μ M, respectively). Flavopereirine (**6**) exhibited IC_{50} = 11.53 \pm 0.54 and 1.83 \pm 0.10 μ M against K1 and T9-96 strains, respectively, and was the most active compound tested.

G. vellosii bark methanol extract exhibited high *in vitro* inhibitory activity (IC_{50} = 2.22 μ g/mL) against the chloroquine-sensitive *P. falciparum* D10 strain. Geissospermine (**1**), geissoschizoline (**4**) geissolosimine (**9**) and geissoschizone (**11**) were isolated and exhibited a range of antiplasmodial activities (IC_{50} = 0.96 - 13.96 μ M). Vellosoiminol (**8**) was inactive (IC_{50} = 157 μ M). Geissolosimine (**9**) exhibited the highest *in vitro* antiplasmodial activity (IC_{50} = 0.96 μ M) (Mbeunkui et al., 2012).

The search for active substances in Amazonian medicinal plants is very promising, besides being a strategy for the discovery of new antimalarial drug leads (Andrade-Neto et al., 2007; Pohlit et al., 2013). As shown above, several *Geissospermum* alkaloids have high *in vitro* antiplasmodial activity. From *in vivo* work on extracts, it is clear that the antimalarial and toxic components of these extracts should be identified in future work. Thus, more work on the chemistry and antimalarial activity of *Geissospermum* species, especially on the *in vivo* antimalarial activity and toxicity of *Geissospermum* indole alkaloids is necessary. Future work should focus on addressing the dearth of *in vivo* studies on these alkaloids in animal models

of malaria. Also, more compositional studies on *G. argenteum*, *G. reticulatum* and *G. sericeum* are needed. The chemical composition of *G. urceolatum* has, to date, not been studied.

References

- Almeida, M. R.; Lima, J. A.; Santos, N. P.; Pinto, A. C. 2009. Pereirina: o primeiro alcalóide isolado no Brasil? *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 19, n. 4, p. 942-952. DOI: 10.1590/S0102-695X2009000600026.
- Andrade-Neto, V. F.; Pohlit, A. M.; Pinto, A. C. S.; Silva, E. C. C.; Nogueira, K. L.; Melo, M. R. S.; Henrique, M. C.; Amorim, R. C. N.; Silva, L. F. R.; Costa, M. R. F.; Nunomura, R. C. S.; Nunomura, S. M.; Alecrim, W. D.; Alecrim, M. G. C.; Chaves, F. C. M.; Vieira, P. P. R. 2007. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 3, p. 359-365. DOI: 10.1590/S0074-02762007000300016.
- Araújo, J.Q.; Lima, J.A.; Pinto, A. C.; De Alencastro, R. B.; Albuquerque, M. G. 2011. Docking of the alkaloid geissospermine into acetylcholinesterase: A natural scaffold targeting the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Modeling*, v. 17, n. 6, p. 1401-1412. DOI: 10.1007/s00894-010-0841-2.
- Ban, Y.; Seo, M. 1961. The synthesis of β -carboline derivatives—I. A synthesis of some 12H-indolo[2,3-a]pyridocolinum salts, including flavopereirine. *Tetrahedron*, v. 16, p. 5-10.
- Barros J.S.; Oliveira, S. S.; Neves, S. M. B.; Tanae, M. M.; Souccar, C.; Lapa, A.J.; Landman, M. T. R. L. 2006. *Inibição da captação de serotonina por alcaloides de Geissospermum laeve Vell. Baill.* XIX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. Salvador, Brazil.
- Bejar, O.; Goutarel, R.; Janot, M. M.; Le Hir, A. 1957. Constitution de la flavopéirine, alcaloïde du *Geissospermum laeve* (Vellozo) Baillon (Apocynacées). *Compt. Rend. Acad. Sci.*, v. 244, p. 2066-2068.
- Beljanski, M. 1994. Flavopereirine-based pharmaceutical composition for treatment of HIV infection. WO9402146 A1, February 3, 1994.
- Beljanski, M. 2005. Flavopereirine-based pharmaceutical composition and use thereof for treating HIV. Canadian Patent. CA 2120001 C (PCT/FR1993/000761), February 8, 2005.
- Bemis, D.L.; Capodice, J.L.; Desai, M.; Katz, A.E.; Buttyan, R. 2009. β -carboline alkaloid-enriched extract from the Amazonian rain forest tree pao pereira suppresses prostate cancer cells. *Journal of the Society for Integrative Oncology*, v. 7, n. 2, p. 59-65. DOI: 10.2310/7200.2009.0009.
- Bertani, S.; Bourdy, G.; Landau, I.; Robinson, J.C.; Esterre, P.; Deharo, E. 2005. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 98, p. 45-54. DOI: 10.1016/j.jep.2004.12.020.
- Bertho, A.; Koll, M. 1961. Alkaloide der Pereiro-Rinde, VI. Die constitution von Pereirin. *Chemische Berichte*, v. 94, p. 2737-2746. DOI: 10.1002/cber.19610941022.
- Block, K.I. 2014. In this issue [editorial]. *Integrative Cancer Therapies*, v. 13, n. 3, p. 179-180. DOI: 10.1177/1534735414532011.
- Brandão, M. D. G. L.; Cosenza, G. P.; Pereira, F. L.; Vasconcelos, A. S.; Fagg, C. W. 2013. Changes in the trade in native medicinal plants in Brazilian public markets. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 185, n. 8, p. 7013-7023. DOI: 10.1007/s10661-013-3081-y.
- Brandão, M. G. L.; Grandi, T. S. M.; Rocha, E. M. M.; Sawyer, D. R.; Krettli, A. U. 1992. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 36, p. 175-182. DOI: 10.1016/0378-8741(92)90018-M.
- Brito, A. R. M.; Brito, A. A. 1993. Forty years of Brazilian medicinal plant research. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 39, p. 53-67. DOI: 10.1016/0378-8741(93)90050-F.
- Camargo, M. R. M. 2011. *Avaliação da atividade antimalárica e antimicrobiana de Geissospermum argenteum e Miquartia guianensis, coletadas em Roraima*. Masters Dissertation. Federal University of Roraima. Roraima, Brazil.
- Chang, C.; Zhao, W.; Xie, B.; Deng, Y.; Han, T.; Cui, Y.; Dai, Y.; Zhang, Z.; Gao, J.; Guo, H.; Yan, J. 2014. Pao Pereira Extract Suppresses Castration-Resistant Prostate Cancer Cell Growth, Survival, and Invasion Through Inhibition of NF- κ B Signaling. *Integrative Cancer Therapies*, v. 13, n. 3, p. 249-258. DOI: 10.1177/1534735413510557.

- Chiaroni, A.; Riche, C.; Pais, M.; Goutarel, R. 1976. Alcaloides indoliques CIV: Structure cristalline de la geissospermine. *Tetrahedron Letters*, v. 17, n. 51, p. 4729-4730.
- Chiaroni, A.; Riche, C. 1979. Structure et stéréochimie d'alcaloides indoliques. Structure de la geissospermine. *Structural Crystallography and Crystal Chemistry*, v. B35, p. 1820-1825. DOI: 10.1107/S0567740879007834.
- Correia, A. F.; Segovia, J. F. O.; Gonçalves, M. C. A.; Oliveira, V. L.; Silveira, D.; Carvalho, J. C. T.; Kankazi, L. I. B. 2008. Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug-resistant bacteria. *European Review for Medical and Pharmacology Sciences*, v. 12, n. 6, p. 369-380.
- Forzza, R. C. (Org.). 2010. *Catálogo de plantas e fungos do Brasil*. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 1.
- Giorgetti, M.; Rossi, L.; Rodrigues, E. 2011. Brazilian plants with possible action on the central nervous system - a study of historical sources from the 16th to 19th century. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 21, n. 3, p. 537-555. DOI: 10.1590/S0102-695X2011005000044.
- Gordillo-Román, B.; Reina, M.; Ruiz-Mesia, L.; Ruiz-Mesia, W.; Joseph-Nathan, P. 2013. Absolute configuration of indoline alkaloids from *Geissospermum reticulatum*. *Tetrahedron Letters*, v. 54, n. 13, p. 1693-1696. DOI: 10.1016/j.tetlet.2013.01.055.
- Goutarel, R.; Pais, M.; Gottlieb, H.E.; Wenkert, E. 1978. ¹³C Analysis of geissospermine and its indole alkaloid monomer fragments. *Tetrahedron Letters*, v. 14, p. 1235-1238. DOI: 10.1016/S0040-4039(01)94510-1.
- Hall, J. L.; Beljanski, S. P. 2005. Flavopereirine and alstonine combinations in the treatment and prevention of prostate cancer. WO2005112964 (A1).
- Henrique, M. C.; Nunomura, S. M.; Pohlit, A. M. 2010. Alcaloides indólicos das cascas de *Aspidosperma vargasii* e *A. desmanthum*. *Química Nova*, v. 33, n. 2, p. 2284-2287.
- Hughes, N.A.; Rapoport, H. 1958. Flavopereirine, an alkaloid from *Geissospermum vellosii*. *Journal of the American Chemical Society*, v. 80, n. 7, p. 1604-1609. DOI: 10.1021/ja01540a024.
- Ishiyama, H.; Matsumoto, M.; Sekiguchi, M.; Shigemori, H.; Ohsaki, A.; Kobayashi, J. 2005. Two new indole alkaloids from *Aspidosperma subincanum* and *Geissospermum vellosii*. *Heterocycles*, v. 66, n. 1, p. 651-658. DOI: 10.3987/COM-05-S(K)63.
- Jácome, R. L. R. P.; Souza, R. A.; Oliveira, A. B. 2003. Comparação cromatográfica entre o extrato de *Aspidosperma parvifolium* e o fitoterápico "pau-pereira". *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 13, p. 39-41. DOI: 10.1590/S0102-695X2003000300015.
- Lima, J. A.; Costa, R. S.; Epifânio, R. A.; Castro, N. G.; Rocha, M. S.; Pinto, A. C. 2009. *Geissospermum vellosii* stem bark: anticholinesterase activity and improvement of scopolamine-induced memory deficits. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 92, p. 508-513. DOI: 10.1016/j.pbb.2009.01.024.
- Lorenzi, H. 2002. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. v. 2.
- Manske, R. H. F.; Harrison, W. A. 1965. Chapter 19 The alkaloids of *Geissospermum* species. *Alkaloids: Chemistry and physiology*, 8 (C), p. 679-691. DOI: 10.1016/S1876-0813(08)60058-5.
- Mbeunkui, F.; Grace, M.H.; Lila, M.A. 2012. Isolation and structural elucidation of indole alkaloids from *Geissospermum vellosii* by mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 885-886, p. 83-89. DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.12.018.
- Mbeunkui, F.; Grace, M. H.; Lategan, C.; Smith, P.J.; Raskin, I.; Lila, M.A. 2012. *In vitro* antiplasmodial activity of indole alkaloids from the stem bark of *Geissospermum vellosii*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 139, p. 471-477. DOI: 10.1016/j.jep.2011.11.036.
- Milliken, W. 1997. Traditional antimalarial medicine in Roraima, Brazil. *Economic Botany*, v. 51, p. 212-237. DOI: 10.1007/BF02862091.
- Moore, R. E.; Rapoport, H. 1973. Geissovelline, a new alkaloid from *Geissospermum vellosii*. *Journal of Organic Chemistry*, v. 38, n. 2, p. 215-230. DOI: 10.1021/jo00942a007.
- Muñoz, V.; Sauvain, M.; Bourdy, G.; Callapa, J.; Bergeron, S.; Rojas, I.; Bravo, J. A.; Balderrama, L.; Ortiz, B.; Gimenez, A.; Deharo, E. 2000. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through

a multidisciplinary approach. Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Chacobo Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 69, n. 2, p.127-137. DOI: 10.1016/S0378-8741(99)00148-8.

Oliveira, F. Q.; Junqueira, R. G.; Stehmann, J. R.; Brandão, M. G. L. 2003. Potential of medicinal plants as source of new antimalarials: species indicated in Brazilian ethnomedical bibliography. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 5, n. 2, p. 23-31.

Paccioni, J. P.; Husson., P. 1978. Alkaloids of *Geissospermum argenteum* (Apocynaceae). *Phytochemistry*, v. 17, n. 12, p. 2146-2147.

Pohlit, A. M.; Lima, R. B. S.; Frausin, G.; Rocha e Silva, L. F. R.; Lopes, S. C.; Moraes, C. B.; Cravo, P.; Lacerda, M. V. G.; Siqueira, A. M.; Freitas-Junior, L. H.; Costa, F. T. M. 2013. Amazonian plant natural products: perspectives for discovery of new antimalarial drug leads. *Molecules*, v. 18, p. 9219–9240.

Puiseux, F.; Le Hir, A.; Goutarel, R.; Janot, M. M.; Lemen, J. 1959. Alkaloids of *Geissospermum laeve*. III. Geissoschizoline, apogeissoschizine and geissospermine. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, v. 17, p. 626-633.

Rapoport, H.; Onak, T. P.; Hughes, N. A.; Reinecke, M. G. 1958. Alkaloids of *Geissospermum vellosii*. *Journal of the American Chemical Society*, v. 80, p. 1601-1604. DOI: 10.1021/ja01540a023.

Rapoport, H.; Windgassen Jr., R. J.; Hughes, N. A.; Onak, T. P. 1960. Alkaloids of *Geissospermum vellosii*. Further studies on geissospermine and the structures of the indolic cleavage products, geissoschizine and apogeissoschizine. *Journal of the American Chemical Society*, v. 82, p. 4404-4414. DOI: 10.1021/ja01501a069.

Rapoport, H.; Moore, R. E. 1962. Alkaloids of *Geissospermum vellosii*. Isolation and structure determinations of vellosimine, vellosiminol and geissosimine. *Journal of Organic Chemistry*, v. 27, p. 2981-2985. DOI: 10.1021/jo01056a004.

Reina, M.; Ruiz-Mesia, W.; López-Rodríguez, M.; Ruiz-Mesia, L.; González-Coloma, A.; Martínez-Díaz, R. 2012. Indole alkaloids from *Geissospermum*

reticulatum. *Journal of Natural Products*, v. 75, n. 5, p. 928-934. DOI: 10.1021/np300067m.

Ribeiro, J. E. L. S.; Hopkins, M. J. G.; Vicentini, A.; Sothers, C.A.; Costa, M.A.S.; Brito, J.M.; Souza, M. A. D.; Martins, L. H. P.; Lohmann, L. G.; Assunção, P. A. C. L.; Pereira, E. C.; Silva, C. F.; Mesquita, M. R.; Procópio, L. C. 1999. Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central. Manaus: INPA-DFID, 798 p.

Santos, N. P.; Pinto, A. C.; Alencastro, R. B. 1998. Theodoro Peckolt: naturalista e farmacêutico do Brasil imperial. *Química Nova*, v. 21, p. 666-670. DOI: 10.1590/S0100-40421998000500023.

Steele, J. C. P.; Veitch, N. C.; Kite, G. C.; Simmonds, M. S. J.; Warhurst, D. 2002. Indole and β -carboline alkaloids from *Geissospermum sericeum*. *Journal of Natural Products*, v. 65, p. 85-88. DOI: 10.1021/np0101705.

TPL – The Plant List. Version 1.1. URL: www.the-plantlist.org/ accessed on Sept. 8th, 2014.

Vignerón, M.; Deparis, X.; Deharo, E.; Bourdy, G. 2005. Antimalarial remedies in French Guiana: a knowledge attitudes and practices study. *Journal of Ethnopharmacology*, n. 98, p. 351-360. DOI: 10.1016/j.jep.2005.01.049.

WCSP. 2014. World Checklist of Selected Plant Families. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet; <http://apps.kew.org/wcsp/> Retrieved September 8, 2014.

Wenkert, E.; Kilzer, J. 1962. A flavopereirine synthesis. *Journal of Organic Chemistry*, v. 27, p. 2283-2284. DOI: 10.1021/jo01053a552.

Werner, J. A. T.; Oliveira, S. M.; Martins, D. F.; Ferreira, J.; Santos, A.R.S. 2009. Evidence for a role of 5-HT_{1A} receptor on antinociceptive action from *Geissospermum vellosii*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 125, p. 163-169. DOI: 10.1016/j.jep.2009.05.026.

Yu, J.; Chen, Q. 2014. The plant extract of pao peireira potentiates carboplatin effects against ovarian cancer. *Pharmaceutical Biology*, v. 52, n. 1, p. 36-43. DOI: 10.3109/13880209.2013.808232.

Determinação da Propriedade Antioxidante e Teores de Minerais Presentes nas Folhas de *Azadirachta indica* A. Juss.

Determination of Antioxidant Property and Minerals Contained in the Leaves of *Azadirachta indica* A. Juss.

*^{1,2}Denise P. Emerenciano; ¹Angela Maria F. da Cruz; ²Joherbson Deivid dos S. Pereira; ¹Maria de Fátima V. Moura; ^{2,3}Maria Aparecida M. Maciel

1 Laboratório de Métodos Analíticos Fundamentais e Aplicados, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, Av. Sen. Salgado Filho, 1610, Lagoa Nova, CEP 59078-970, Natal, RN, Brasil.

2 Laboratório de Tecnologia em Tensoativos, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, Av. Sen. Salgado Filho, 1610, Lagoa Nova, CEP 59078-970, Natal, RN, Brasil.

3 Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, PPGB - UnP, Universidade Potiguar Laureate International Universities, Av. Sen. Salgado Filho, 1610, Lagoa Nova, CEP 59056-000, Natal, RN.

*Correspondência: e-mail: deniseemerenciano@yahoo.com.br

Resumo

O mercado farmacêutico atual, volta sua atenção para medicamentos de origem vegetal e suas inovações tecnológicas. Neste contexto, inclui-se a espécie *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) popularmente conhecida como *neem*, uma planta nativa da Índia, com ampla aplicação fitoterápica. Neste trabalho, aspectos químicos e farmacológicos desta planta são discutidos, bem como sua propriedade antioxidante e métodos usados para determinar micro e macronutrientes. Para tanto, obteve-se o extrato hidroalcoólico das folhas de *A. indica* (EAI) e a propriedade antioxidante foi avaliada pelo método do fosfomolibdênio de amônio. O resultado obtido (26,5 %) foi relacionado com a propriedade antioxidante do ácido ascórbico, podendo ser justificado pela presença de compostos polares presentes no extrato EAI, com destaque para azadiractina, nimbina e salanina. Os resultados obtidos para a determinação dos teores de umidade, cinzas e minerais (cálcio, chumbo, cobre, cromo, ferro, magnésio, manganês, níquel, potássio, sódio e zinco) nas folhas de *A. indica*, foram 68,0 % de umidade, 12,3 % de cinzas e dentre os minerais detectados, o cálcio apresentou maior percentual (73,0 %), seguido de potássio (15,0 %), magnésio (11,0 %), e sódio (1,0 %). Aspectos correlacionados com os teores de minerais e suas importâncias nos metabolismos dos vegetais, também são objetos de discussão.

Palavras-chave: *Azadirachta indica*; Extrato Hidroalcoólico; Aspectos Químicos e Farmacológicos.

Abstract

The pharmaceutical industry turned its attention to medicines of plant origin, which include plant extracts. In this context, it becomes significant to complete characterization of species for medical use, for example, *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) popularly known as *neem*, a native plant of India, with significant medicinal applications. In this work, chemical and pharmaceutical aspects of this plant are discussed and, an antioxidant property and methods to determine micronutrients and macronutrients were applied to its leaves. The antioxidant property evaluation was realized by analysis of the hydroalcoholic extract of the leaves of *A. indica* (EAI) using the phosphomolybdenum method. Ascorbic acid was considered to be the maximal (100 %) antioxidant value. The obtained result for EAI was 26 % of the antioxidant activity of ascorbic acid, which can be explained by the presence of polar compounds such as azadirachtin, nimbin and salannin. The results for determination of humidity, ashes and

minerals (calcium, lead, copper, chromium, iron, magnesium, manganese, nickel, potassium, sodium and zinc) in leaves of *A. indica*, were 68.0 % humidity, 12.3 % of ashes and among the mineral contents calcium showed the highest percentage (73.0 %), followed by potassium (15.0 %) magnesium (11.0 %), and sodium (1.0 %). Aspects correlated to percentages of minerals and the importances to the metabolism of plants are also discussed.

Key words: *Azadirachta indica*; Hydroalcoholic Extract; Chemical and Pharmacological Aspects.

Introdução

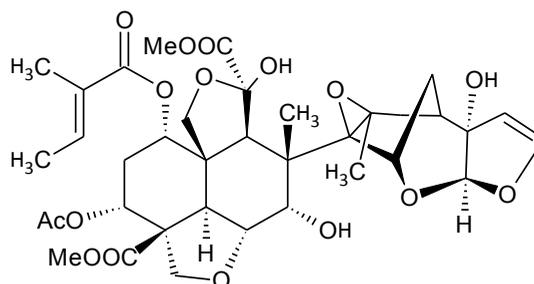
O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos localizados em todo o mundo. Em um contexto abrangente, as plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e farmácias de manipulação e detêm 25 % dos medicamentos do mercado farmacêutico. Nos últimos 20 anos, o progresso científico de pesquisas com produtos naturais possibilitou avanços nos estudos químicos e farmacológicos de inúmeras plantas utilizadas para fins medicinais (Maciel et al., 2002).

Azadirachta indica A. Juss. (sinonímia *Melia azadirachta* L.), conhecida no vernáculo como *neem*, é amplamente distribuída na Ásia, África e outras partes tropicais do mundo. Esta planta vem sendo utilizada na medicina indígena para o tratamento de várias doenças humanas, especialmente contra enfermidades originárias de bactérias e fungos (Luo et al., 2000). Estudos científicos desenvolvidos por vários grupos de pesquisa em todo o mundo possibilitaram o isolamento e elucidação estrutural de mais de 100 metabólitos de *A. indica*, dentre eles destaca-se o metabólito de maior teor tóxico denominado de azadiractina (FIGURA 1), um tetranortriterpenóide (Soon e Bottrell, 1994). Esta substância é encontrada em todas as partes da planta, com maior teor nas sementes (Teixeira, 2012). Apesar de *Azadirachta indica* ser conhecida pela presença do pesticida azadiractina, não se tem registros de toxicidade em humanos, pela ingestão desta espécie vegetal. A avaliação do efeito tóxico de azadiractina foi realizada por Boeke e colaboradores (2004) e de acordo com esta pesquisa, não se detectou efeitos adversos para humanos e em outros trabalhos, ficou esclarecido que este metabólito por ser biodegradável, não oferece danos ao meio ambiente (Coats, 1994; Boeke et al., 2004; Mossini e Kimmelmeier, 2005; Oliveira et al., 2009). Devido à espécie *A. indica* ser considerada um pesticida natural eficaz, a sua utilização na pecuária é uma alternativa para substituir compostos de natureza sintética, rotineiramente utilizados no controle de parasitos de animais (Oliveira et al., 2009). Mossini e Kimmelmeier (2005) relataram que *A. indica* como alimento de cabra, foi considerado uma excelente fonte protéica, porém pode provocar a formação de microcálculos nos rins. No entanto, de acordo com Coats

(1994), os efeitos tóxicos desta planta em mamíferos ocorrem apenas em doses elevadas.

De fato, na África e no Caribe, os usuários desta espécie medicinal, principalmente crianças, ingerem seus frutos maduros como alimento. Na Índia, desde os tempos mais remotos, as folhas de *neem* são consumidas para o preparo de chá e em menor escala, como alimento. Curiosamente, os animais domésticos também se alimentam destas folhas (Teixeira, 2012).

Figura 1 - A estrutura química de azadiractina



Relatos da literatura mostram a ampla diversidade de funções biológicas de *Azadirachta indica*, dentre elas encontram-se as atividades antiinflamatória, anticâncer, hipolipidêmica e hepatoprotetora (Mossini e Kimmelmeier, 2005; Franco et al., 2011). Também possui atividade anticarcinogênica supostamente por auxiliar os sistemas de defesa antioxidantes celulares (Biswas et al., 2002).

A cadeia transportadora de elétrons na membrana mitocondrial é a principal fonte de ATP em células de mamíferos, fato pelo qual a torna essencial à vida. Durante a fosforilação oxidativa uma pequena fração de todo o oxigênio consumido pela mitocôndria sofre redução incompleta gerando radicais livres que podem atacar a própria organela, motivo pelo qual a mitocôndria é um excelente modelo para estudos de estresse oxidativo (Lopes, Paiva e Rodrigues, 2009), desequilíbrio do organismo ocasionado pelo excesso de radicais livres, que são, na maioria das vezes, espécies reativas de oxigênio (ERO), que possuem um elétron desemparelhado na última camada de valência. Ao serem formadas, estas espécies reativas reagem rapidamente com outro radical ou com outra

molécula por vários mecanismos, sendo que a velocidade e a especificidade dessas reações dependem da concentração do radical, de sua reatividade e da localização do elétron desemparelhado (Valko et al., 2007). Várias doenças são frequentemente associadas com o estresse oxidativo, em que as biomoléculas, tais como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, são atacadas por radicais livres, podendo originar vários distúrbios, como envelhecimento precoce, processos inflamatórios, disfunção cerebral, doenças do coração, câncer e outros danos (Prieto, Pineda e Aguilar, 1999).

Partindo destas informações, e levando-se em consideração que plantas são ricas em minerais, que podem contribuir para o equilíbrio do organismo, e quando em excesso, podem causar possíveis distúrbios; no presente trabalho, relata-se a determinação da propriedade antioxidante, umidade, cinzas e identificação de minerais e seus teores para a espécie *Azadirachta indica* A. Juss.

Alguns minerais como o ferro, cobre, zinco, manganês e magnésio são considerados essenciais às plantas. O magnésio presente na estrutura da clorofila é fundamental para absorção de energia solar do vegetal. No entanto, quando são absorvidos pelas plantas em condições desfavoráveis (adubação inapropriada, por exemplo), podem alterar significativamente a formação de metabólitos secundários de espécies vegetais, que podem ser os agentes biológicos responsáveis pelas suas atividades biológicas (Valmorbida et al., 2007). Para animais em geral, a ingestão de plantas pode resultar na transferência de espécies metálicas que se acumulam em todos os tecidos vegetais, comprometendo a qualidade da cadeia alimentar. Citando apenas um exemplo, o chumbo, que pode ser absorvido pelo organismo por via inalatória ou oral, é extremamente nocivo ao organismo animal, mesmo sendo ingerido em pequenas quantidades. Em organismo humano, este metal inibe a enzima que catalisa uma etapa essencial na produção de hemoglobina, causando a anemia crônica, além disso, não apresenta nenhuma função biológica sendo, portanto, absorvido, distribuído e excretado sem nenhuma ação biológica saudável (Bonato et al., 1998; Maiga et al., 2005; Franco et al., 2011).

O solo em que a planta se encontra, é um fator importante na absorção de espécies metálicas, já que consiste em uma mistura de materiais minerais e orgânicos que propiciam um ambiente fundamental ao crescimento do vegetal (Malavolta et al., 2006). Quando as quantidades dos minerais encontrados nas plantas excedem aos valores recomendados pela legislação, isso pode ser indício de contaminação do

solo, água, dentre outros. Recentemente, no Brasil estabeleceu-se uma legislação nacional sobre teores permissíveis de metais em solos. Os valores orientadores para solos utilizados na agricultura, de acordo com esta legislação (CONAMA, 2009), indicam que o teor máximo permitido para os minerais chumbo, cobre, cromo, níquel, e zinco, são respectivamente: 180, 200, 150, 70 e 450 ppm. No que se refere à ingestão de plantas e os seus riscos toxicológicos em função dos teores de minerais, a ingestão diária recomendada (IDR) para homens adultos estabelecidos pela ANVISA (1998), para os minerais: cálcio, cobre, cromo, ferro, magnésio, manganês e zinco, são respectivamente: 800 mg, 3 mg, 200 µg, 14 mg, 300 mg, 5 mg e 15 mg.

Apesar dos avanços científicos voltados para os estudos com plantas medicinais e as exigências dos órgãos fiscalizadores, os índices de fontes naturais utilizadas empiricamente é significativo, com amplos relatos de toxicologia que podem ser irreversíveis (Maciel et al., 2002; Veiga Jr., Pinto e Maciel, 2005; Viegas Jr., Bolzani e Barreiro, 2006). Neste contexto, análises de micro e macronutrientes vinculadas ao controle de qualidade de minerais tornam-se relevantes para a comercialização segura de fitoterápicos em geral. Neste contexto, objetivando-se contribuir com as pesquisas desenvolvidas com a espécie medicinal *Azadirachta indica*, amplamente comercializada em todo o mundo, realizaram-se neste trabalho, análises que avaliaram os teores de umidade, cinzas, minerais, e propriedade antioxidante como se encontram descritos a seguir.

Materiais e Métodos

Material Vegetal: coleta, identificação botânica e secagem

As folhas de *Azadirachta indica* A. Juss. (FIGURA 2) foram coletadas no Campus da UFRN, Natal-RN, em Fevereiro de 2011. A identificação botânica foi realizada pelo Professor Dr. Jomar Gomes Jardim, com exsicata de número 6400, depositada no herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. As análises de umidade foram realizadas de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008). Amostras (10 g, em triplicata) foram secas em estufa com ventilação (Quimis Q314M) a 105°C, por 24h, com etapas subsequentes de aquecimentos e resfriamentos (à temperatura ambiente em dessecador), com intervalos de 1 h, seguido de pesagens (até massa constante).

Figura 2: Fotografia representativa de folha de *A. indica*



Determinação dos Minerais por ICP-OES e Análise Estatística

Para a determinação dos teores de minerais, 5 g de folhas secas foram trituradas e calcinadas em forno mufla (EDG 3P-S Tecnal 3000) à temperatura de 550°C durante 6h, até decomposição de toda a matéria orgânica. As cinzas obtidas foram solubilizadas em 5 mL de ácido nítrico P.A. tendo sido transferidas para balões volumétricos, completando-se o volume de 100 mL com água destilada. As soluções obtidas a partir das cinzas foram analisadas para os seguintes minerais: cálcio (Ca), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), magnésio (Mg), manganês (Mn), níquel (Ni), potássio (K), sódio (Na) e zinco (Zn), utilizando-se a técnica de espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) da marca Thermo Analítica modelo iCAP 6300, procedimento descrito em SW-846 USEPA 6010C (USEPA, 2007), com análises realizadas em triplicata. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para cada mineral estão descritos na TABELA 1. A análise estatística para comparação dos resultados expressos em médias e desvio padrão (\pm) das médias obtidas para as amostras avaliadas foi realizada utilizando-se ANOVA com teste t (LSD) $p < 0,05$.

Obtenção do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *A. indica* (EAI)

Para obtenção do extrato hidroalcoólico (EAI), o material vegetal (folhas) de *Azadirachta indica* (225,26 g), previamente seco (40°C) e triturado, foi submetido a extrações via percolação (24 h), com etanol/água (7:3), sendo utilizados 5 litros de solvente. Ao término, o extrato hidroalcoólico foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo (Simões et al., 2010).

Determinação da Propriedade Antioxidante do EAI

Os ensaios para determinar o potencial antioxidante do extrato hidroalcoólico das folhas de *A. indica* (EAI) foram realizados utilizando-se o método do fosfomolibdênio de amônio, que consiste na formação do complexo de fosfomolibdênio em meio aquoso, com coloração amarela, quando oxidado, e verde à medida que é reduzido por substâncias antioxidantes. A coloração verde é mais intensa quanto maior for a propriedade antioxidante da amostra. Em comparação, utilizou-se uma solução padrão de ácido ascórbico (vitamina C) (Prieto, Pineda e Aguilar, 1999).

A reação para formação do complexo fosfomolibdênio requer o preparo de um reativo, que consistiu em uma solução com fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ (28 mL), molibdato de amônio 0,03 mol L⁻¹ (12 mL) e ácido sulfúrico 3 mol L⁻¹ (20 mL), sendo o volume completado com água para 100 mL. A solução padrão de ácido ascórbico, assim como as amostras, foram preparadas na concentração de 200 µg mL⁻¹ (Bianco, 2003).

A partir das soluções preparadas de cada amostra e do padrão (200 µg mL⁻¹), retirou-se uma alíquota de 0,4 mL, que foi transferida para um tubo de ensaio e adicionaram-se 4 mL de reativo (a solução descrita acima). Um branco foi constituído a partir de 0,4 mL de água destilada e 4 mL de reativo. As análises foram feitas em triplicata, com os tubos hermeticamente fechados. Os tubos foram incubados por 90 minutos a 95°C e depois resfriados até temperatura ambiente. Após isso, procederam-se as leituras das absorbâncias em 695 nm em espectrofotômetro de UV/Vis (Thermo Electron Corporation/Nicolet Evolution 100). A ação antioxidante das amostras foi expressa em relação ao ácido ascórbico, considerando que o valor de sua absorbância corresponde a 100 % de ação antioxidante, de acordo com a FIGURA 3 (Prieto, Pineda e Aguilar, 1999).

Figura 3 - Fórmula utilizada para o cálculo da propriedade antioxidante

$$\%AA = \frac{A_{amostra} - A_{branco}}{A_{padrão} - A_{branco}} \times 100$$

Em que, $A_{amostra}$ é a absorbância de cada amostra, A_{branco} é a absorbância do branco e $A_{padrão}$ é a absorbância do padrão (ácido ascórbico).

Resultados e Discussão

A implementação de padrões de qualidade organolépticas, físico-químicas, microbiológicas e fitoquímicas que venham a atender ao mercado consumidor de fitoterápicos encontram-se inserida nos requisitos estabelecidos pela ANVISA que é o órgão nacional que controla a comercialização de medicamentos em geral (ANVISA, 1976). Em um contexto abrangente para as comercializações de plantas medicinais em feiras livres, por exemplo, não existem parâmetros estabelecidos que avaliem a qualidade do vegetal (Braga et al., 2007). Os resultados obtidos no presente trabalho encontram-se voltados para o enriquecimento de informações sobre a espécie medicinal *Azadirachta indica* que representa uma espécie medicinal amplamente comercializada em todo o mundo.

Como parte inicial do trabalho avaliou-se o percentual de umidade das folhas desta planta, tendo sido evidenciado em função do elevado teor de umidade obtido (68,03 % \pm 0,02) que podem sofrer contaminação por fungos e bactérias, portanto, devem ser submetidas a processos de secagem adequados. Este teor está acima do obtido por Kashif e Ullah, (2013) (10,30 % \pm 0,28). Na sequência, utilizou-se uma amostra (5,00 g \pm 0,09) da massa seca resultante (31,97% \pm 0,02) que após procedimento de calcinação, apresentou um percentual de cinzas de 12,28 %, (0,61 g \pm 0,09), percentual é semelhante ao encontrado para outras plantas, como por exemplo, o percentual obtido para as folhas secas de *Ipomoea*

pes-caprae (L.) R.Br., 12,51 % (Barni, Cechinel Filho e Couto, 2009). As cinzas em soluções aciduladas foram submetidas às análises de ICP-OES que avaliaram os teores dos seguintes minerais: Ca, Pb, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, Ni, K, Na e Zn. Na TABELA 1 encontram-se descritos os valores em mg 100 g⁻¹ dos minerais identificados, tendo sido comprovado um percentual maior para o cálcio (73,0 %; 166,90 mg 100 g⁻¹ \pm 1,27), em comparação, aos percentuais minoritários observados para o potássio (15,0 %; 35,65 mg 100 g⁻¹ \pm 0,42), magnésio (11,0 %; 24,34 mg 100g⁻¹ \pm 0,69) e sódio (1,0 %; 2,38 mg 100 g⁻¹ \pm 0,23) (FIGURA 4). Outros minerais, tais como Pb, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni e Zn apresentaram massas percentuais abaixo de 1,0 %.

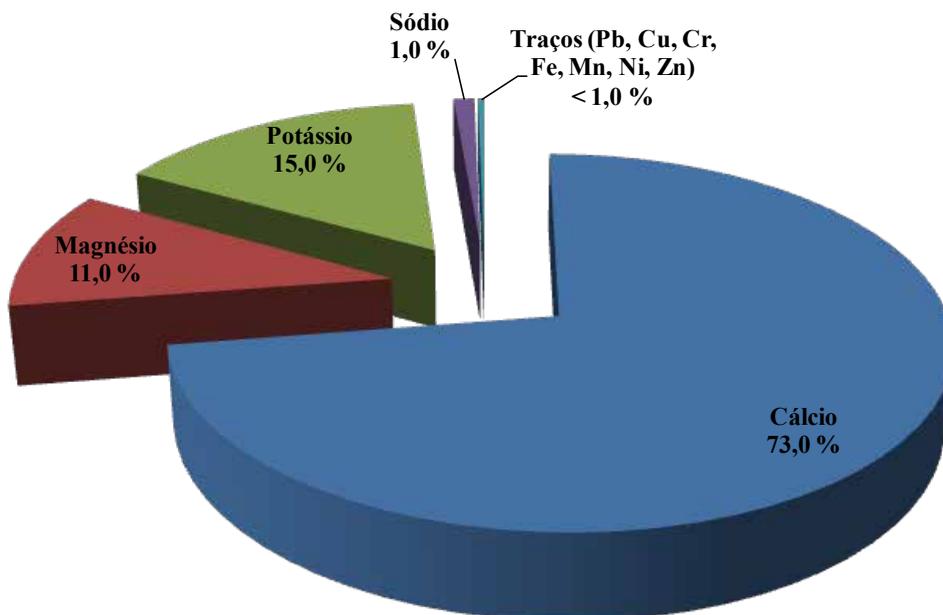
Sahito e colaboradores (2003) determinaram os teores dos minerais sódio, potássio, cálcio, magnésio, ferro, zinco, cobalto, cromo, níquel cobre, chumbo, cádmio, bário e alumínio em folhas de *A. indica*, pelo método de absorção atômica, tendo sido observado que os teores de chumbo (0,1270 mg 100 g⁻¹), níquel (0,2950 mg 100 g⁻¹), sódio (1355,90 mg 100 g⁻¹), cálcio (1393,60 mg 100 g⁻¹) e potássio (1415,35 mg 100 g⁻¹), encontram-se acima dos teores obtidos no presente trabalho (TABELA 1). Em outro trabalho, desenvolvido por Neves e Colaboradores(2013) determinaram-se os teores de alguns minerais, e concluiu-se que independente dos teores dos nutrientes presentes nos solos analisados, *Azadirachta indica* é uma espécie que absorve preferencialmente, nitrogênio, fósforo e cálcio. No entanto, apenas para o potássio houve correlação positiva entre o teor

Tabela 1: Determinação dos teores de minerais encontrados nas folhas de *A. indica*

Minerais	Média (mg 100 g ⁻¹)	Desvio Padrão (\pm)	LD*	DQ**
Cálcio (Ca)	166,9000	1,2728	0,3333	1,0000
Chumbo (Pb)	0,0077	0,0015	0,0033	0,0010
Cobre (Cu)	0,0304	0,0010	0,0033	0,0010
Cromo (Cr)	0,0199	0,0099	0,0033	0,0010
Ferro (Fe)	0,5243	0,0653	0,3333	1,0000
Magnésio (Mg)	24,3400	0,6879	0,3333	1,0000
Manganês (Mn)	0,0628	0,0002	0,0033	0,0010
Níquel (Ni)	0,0072	0,0004	0,0033	0,0010
Potássio (K)	35,6533	0,4203	0,3333	1,0000
Sódio (Na)	2,3777	0,2308	0,3333	1,0000
Zinco (Zn)	0,0797	0,0031	0,0033	0,0010

*LD - Limite de detecção em mg L⁻¹, **LQ - Limite de quantificação em mg L⁻¹

Figura 4 - Gráfico representativo dos teores de minerais encontrados nas folhas de *A. indica*



obtido no solo e o teor determinado nas folhas inferiores da parte média da planta. Também se verificou que em função do teor elevado de cálcio (superiores a 14,8 mg 100 g⁻¹; detectado nas folhas de espécies provenientes de diferentes locais) *A. indica* é uma espécie calcícola (medianamente as espécies apresentam teores foliares de Ca na faixa 15,7 a 22,7 mg 100 g⁻¹).

A análise estatística (ANOVA) foi empregada para obtenção do coeficiente de correlação de Pearson (ρ), que indica a relação entre duas variáveis lineares com valores 1 e -1. Nesta análise, os sinais positivos e negativos indicam a direção e a dimensão que a variável informa sobre a força de correlação. Valores de ρ maiores que 0,70 (+ ou -) indicam correlação significativa, valores entre 0,30 e 0,70 (+ ou -) indicam correlação moderada e fraca correlação para a faixa entre 0,00 e 0,30. Desta forma, a correlação de Pearson entre os metais avaliados, revelou correlação positiva para Fe e K (0,31), Cu e Fe (0,99), Cu e Zn (0,98) e Cu e K (0,41) (TABELA 2).

À medida que a planta absorve um mineral, possivelmente carrega outro, como exemplo, ao absorver o potássio, a planta também absorverá Cu e Fe. Correlações negativas foram observadas entre K e Ca (-0,87) e K e Mg (-0,83). Dessa forma, no cultivo de *A. indica*, o solo não pode ser rico em K, que em percentuais elevados inibirá as absorções de Ca e Mg.

Biondi e Colaboradores (2011) avaliaram os teores dos minerais Fe, Mn, Zn, Cu, Ni e Co presentes em solos de Pernambuco/BR, tendo sido observado correlação linear de Pearson (ρ) entre teores dos minerais e propriedades dos solos. De acordo com os resultados obtidos, comprovou-se que há um baixo potencial de liberação de Cu, Co e Ni, dos solos para plantas em geral, enquanto para Zn, Fe e Mn as deficiências são menos prováveis.

Almeida Junior (2010) também avaliou por meio de correlação de Pearson, o efeito da adubação orgânica em solos e os teores de minerais em plantas. Neste estudo, houve correlação positiva entre a matéria seca da parte aérea da cana-de-açúcar e os minerais N, P, K, Cu, Zn e Al que estavam presentes no solo. Uma correlação negativa foi observada entre pH do solo da planta. Para a matéria seca da raiz desta planta, não foram verificadas correlações significativas.

O extrato hidroalcoólico obtido das folhas de *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) (EAI) apresentou o rendimento de extração de 36,7 %. A propriedade antioxidante do EAI foi avaliada pelo método do fosfomolibdênio de amônio, comumente utilizado para comparar a capacidade antioxidante de diversos extratos, além de ser simples e de baixo custo (Rocha et al., 2007; Morais et al., 2009; Negri, Possamai e Nakashima, 2009; Nunes, 2011;).

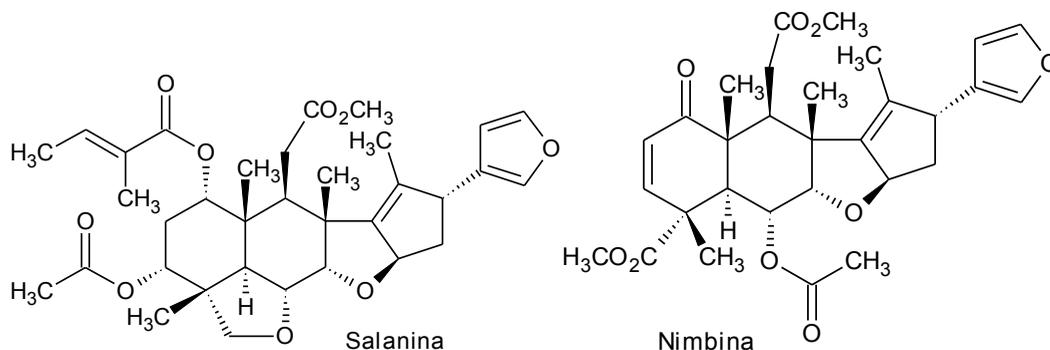
Tabela 2 - Coeficientes de correlação de Pearson observados nas folhas de *A. indica*

Metal/Metal*	Ca	Pb	Cu	Cr	Fe	Mg	Mn	Ni	K	Na	Zn
Ca	1,00**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pb	-0,77	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cu	-0,81	1,00	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-
Cr	-0,93	0,95	0,97	1,00	-	-	-	-	-	-	-
Fe	-0,74	1,00	0,99	0,94	1,00	-	-	-	-	-	-
Mg	1,00	-0,81	-0,85	-0,96	-0,79	1,00	-	-	-	-	-
Mn	-0,30	-0,38	-0,32	-0,07	-0,42	-0,23	1,00	-	-	-	-
Ni	-0,30	-0,38	-0,32	-0,07	-0,42	-0,23	1,00	1,00	-	-	-
K	-0,87	0,35	0,41	0,62	0,31	-0,83	0,73	0,73	1,00	-	-
Na	-0,07	0,69	0,64	0,43	0,72	-0,14	-0,93	-0,93	-0,44	1,00	-
Zn	-0,67	0,99	0,98	0,89	0,99	-0,72	-0,51	-0,51	0,20	0,79	1,00

*Todos os valores possuem um nível de 95% de confiança

**Os valores em vermelho indicam forte correlação ± entre os minerais

Figura 5 - Estrutura de limonóides bioativos encontrados nas folhas de *A. indica*



O resultado antioxidante obtido para o EAI apresentou um percentual antioxidante de 26,50 %, que pode ser justificado pela maior concentração de compostos polares presentes no extrato, como é o caso da azadiractina (FIGURA 1), nimbina, salanina, dentre outros (FIGURA 5) (Kraus et al., 1987; Mourão et al., 2004).

Conclusões

O cultivo de plantas comestíveis ou de uso medicinal deve ser rigoroso em função da quantidade de minerais presentes no solo, já que podem alterar os percentuais de metais presentes nas plantas, e ainda, interferir em seus metabolismos, podendo interferir

ainda, em suas atividades biológicas (Amaral et al., 2003; Braga et al., 2007; Franco et al., 2011; Santiago et al., 2011).

Para a *Azadirachta indica* A. Juss. comprovou-se quantidade majoritária de cálcio (73,0 %) seguida dos minerais potássio (15,0 %), magnésio (11,0 %) e sódio (1,0 %). Pela correlação de Pearson, observou-se que a medida que a planta absorve um mineral (Fe, K, Cu, Zn e K) positivamente possibilita o efeito sinérgico de absorção dos outros metais via absorção positiva. Para os metais K, Ca e Mg, observou-se correlações negativas, portanto, quando um fertilizante rico em potássio for administrado para *A. indica*, estima-se que haja redução na absorção destes minerais. Desta forma, dependendo da finalidade

da utilização da planta, pode-se manipular o tipo de fertilizante, favorecendo a absorção de nutrientes específicos.

Em função do elevado teor de umidade (68,0 %) as folhas de *A. indica* devem ser comercializadas de forma desidratada, objetivando-se a preservação dos seus metabólitos especiais, evitando-se a proliferação de fungos e bactérias que podem favorecer a produção de substâncias tóxicas, tornando o vegetal impróprio ao consumo.

A partir desta pesquisa foi possível comprovar que o extrato hidroalcoólico das folhas da espécie vegetal *Azadirachta indica* apresentou potencial antioxidativo significativo (26,5 %), quando comparado a outras espécies vegetais, como por exemplo *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa), em que para o mesmo método, extrato bruto das folhas apresentou 30,0 % de ação antioxidante (Pessuto, 2006; Negri, Possamai e Nakashima, 2009). No entanto, o extrato aquoso das cascas de *Lafoensia pacari* (dedaleiro), a propriedade antioxidante (método de fosfomolibdênio de amônio), apresentou resultado muito inferior (5,0 %) (Campos e Frasson, 2011). Levando em consideração este resultado comparativo, bem como dados de atividade biológica atribuídos para *A. indica*, novas investigações farmacológica estarão sendo realizadas com o extrato hidroalcoólico obtido das folhas desta espécie.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES/UFRN pelo suporte financeiro durante e realização desta pesquisa, e ao NUPRAR/UFRN pelas análises no ICP-OES.

Referências

Almeida Júnior, A. B. 2010. *Adubação orgânica em cana-de-açúcar: efeitos no solo e na planta*. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Amaral, F. M. M.; Coutinho, D. F.; Ribeiro, M. N. S.; Oliveira, M. A. 2003. Avaliação da qualidade de drogas vegetais comercializadas em São Luís/ Maranhão. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. n. 13, p. 27 - 30.

ANVISA 1976 - Secretaria de Vigilância Sanitária, Lei nº. 6.360 de 23 de setembro de 1976. Dispõe

sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências.

ANVISA 1998 - Secretaria de Vigilância Sanitária, recommended dietary allowances (RDA), ingestão diária recomendada (IDR) de vitaminas, minerais e proteínas. Portaria nº 33, de 13 de janeiro de 1998. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, Seção I-E, p. 5, jan, 1998.

Barni, S. T.; Cechinel Filho, V.; Couto, A. G. 2009. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria-prima farmacêutica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 4, p. 865 - 870.

Bianco, E. M. 2003. *Química e potencial antioxidante de folhas e caules de Bauhinia microstachya (Raddi) Macbr., Caesalpinaceae*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná, Brasil.

Biondi, C. M.; Nascimento, C. W. A.; Fabricio Neta, A. B.; Ribeiro, M. R. 2011. Teores de Fe, Mn, Zn, Cu, Ni e Co em solos de referência de Pernambuco. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 35, p. 1057 - 1066.

Biswas, K.; Chattopadhyay, I.; Baerjee, R. K.; Bandyopadhyay, U. 2002. Biological activities and medicinal properties of *neem* (*Azadirachta indica*). *Current Science*. n. 11, v. 82, p. 1336 - 1345.

Boeke, S. J.; Boersma, M. G.; Alink, G. M.; Van Loon, J. J. A.; Van Huis, A.; Dicke, M.; Rietjens, M. C. M. 2004. Safety evaluation of *neem* (*Azadirachta indica*) derived pesticides. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 94, p. 25 - 41.

Bonato, C. M.; Rubin Filho, C. J.; Melges, E.; Santos, V. 1998. *Nutrição mineral de plantas*. UEM - Universidade Estadual de Maringá, p. 137.

Braga, T. V.; Oliveira, T. T.; Pinto, J. T.; Dores, R. G. R.; Nagem, T. J. 2007. Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* e avaliação do processo de secagem em estufa com ventilação forçada. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. n. 3, v. 28, p. 287 - 290.

Campos, J. S.; Frasson, A. P. Z. 2011. Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de

Lafoensia pacari A. ST-HIL. em emulsão não-iônica. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 32, n. 3, p. 363 - 368.

Coats, J. R. 1994. Risks from natural versus synthetic insecticides. *Annual Review of Entomology*. v. 39, p. 489 - 515.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]. Brasília, DF. n. 249, de 30/12/2009, p. 81 - 84.

Franco, M. J.; Caetano, I. C. S.; Caetano, J.; Dragunski, D. C. 2011. Determinação de metais em plantas medicinais comercializadas na região de Umuarama-PR. *Revista Arquivos de Ciências da Saúde UNIPAR*. n.2, v. 15, p. 121 - 127.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. 2008. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. Zenebon, O; Pascuet, N. S.; Tiglea, P. (coord.) São Paulo: IMESP 2008, 4 ed., (1 ed., digital), p. 98 - 99.

Kashif, M.; Ullah, S. 2013. Chemical composition and minerals analysis of *Hippophae rhamnoides*, *Azadirachta indica*, *Punica granatu* and *Ocimum sanctum* leaves. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, v. 8, n. 1, p. 67 - 73.

Kraus, W.; Bokel, M.; Klenk, A.; Pöhl, H. 1987. Structure determination by NMR of azadirachtin and related compounds from *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae). *Tetrahedron Letters*, v. 43, n. 12, p. 2817 - 2830.

Lopes, G. O.; Paiva, J.; Rodrigues, T. 2009. Caracterização das propriedades antioxidantes de extratos glicólicos de *Azadirachta Indica* em mitocôndrias isoladas. XII Congresso de Iniciação Científica, Mogi das Cruzes, Brasil. Disponível em: <http://www.umc.br/_img/_diversos/pesquisa/pibic_pvic/XII_congresso/projetos/Guilherme_Oliveira.pdf>. Acesso em: 12 Jul. 2014.

Luo, X.-D.; Wu, S.-H.; Ma, Y.-B.; Wu, U, D.-G. 2000. A new triterpenoid from *Azadirachta indica*. *Fitoterapia*, v. 71, p. 668 - 672.

Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Veiga Jr., V. F.; Echevarria, A.; Grynberg, N. F. 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, p. 429 - 438.

Maiga, A.; Diallo, D.; Bye, R.; Paulsen, B. S. J. 2005. Determination of some toxic and essential metal ions in medicinal and edible plants from Mali. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n. 6, v. 53, p. 2316 - 2321.

Malavolta, E.; Leão, H. C.; Oliveira, S. C.; Lavres Jr., J.; Moraes, M. F.; Cabral, C. P.; Malavolta, M. 2006. Repartição de nutrientes nas flores, folhas e ramos da laranjeira cultivar Natal. *Revista Brasileira de Fruticultura*, n. 3, v. 28, p. 506 - 511.

Morais, S. M.; Cavalcanti, E. S. B.; Costa, S. M. O.; Aguiar, L. A. 2009. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, p. 315 - 320.

Mossini, S. A. G.; Kimmelmeier, C. 2005. A árvore nim (*Azadirachta indica* A. Juss.): múltiplos usos. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, n.1, v. 24, p. 139 - 148.

Mourão, S. A.; Zanuncio, J. C.; Pallini Filho, A.; Guedes, R. N. C.; Camargos, A. B. 2004. Toxicidade de extratos de nim (*Azadirachta indica*) ao ácaro-vermelho-do-cafeeiro *Oligonychus ilicis*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 39, n. 8, p. 829 - 830.

Negri, M. L. S.; Possamai, J. C. Nakashima, T. 2009. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n.2, p. 553 - 556.

Neves, E. J. M.; Reissmann, C. B.; Dedecek, R. A.; Carpanezi, A. A. 2013. Caracterização nutricional do nim em plantios no Brasil. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.17, n.1, p. 26 - 32.

Nunes, P. M. P. 2011. *Estudo fitoquímico e atividades biológicas do óleo da semente de Citrus sinensis (L.) Osbecke sua aplicação na área cosmética*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná, Brasil.

Oliveira, M. C. S.; Giglioti, R.; Forim, M. R.; Calura, F. H.; Oliveira, H. N.; Chagas, A. C. S.; Brito, L. G. 2009. Uso de extratos de nim (*Azadirachta indica*) no controle do carrapato *Rhipicephalus*

(*Boophilus microplus*). Comunicado Técnico - EMBRAPA. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPAF-RO-2010/14398/1/PROCIComTec90MCSO2009.00316.pdf>>. Acesso em: 18 Set. 2014.

Pessuto, M. B. 2006. *Análise fitoquímica de extratos de folhas de Maytenus ilicifolia Mart. Ex Reiss. e avaliação do potencial antioxidante*. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, 104 f.

Prieto, P.; Pineda, M.; Aguilar, M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, v. 269, p. 337 - 341

Rocha, F. D.; Pereira, R. C.; Kaplan, M. A. C.; Teixeira, V. L. 2007. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, n.17, p. 631 - 639.

Sahito, S. R.; Memon, M. A.; Kazi, T. G.; Jakhrani M. A.; Haque, Q. U.; Shar, G. Q. 2003. Evolution of mineral contents in medicinal plant *Azadirachta indica (neem)*. *Journal of The Chemical Society Of Pakistan*, v. 25, n. 2, p. 139 - 143.

Santiago, D. M.; Teixeira, G. C. B.; Souza, R. R.; Goulart, A. T. 2011. Teores de cádmio, chumbo e zinco em plantas medicinais cultivadas em solos contaminados. *PERQUIRERE - Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão*, n. 8, v. 1, p. 195 - 202.

Simões, M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentez, L. A.; Petrovick, P. R. 2010. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6ª ed.

Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC.

Soon, L. G.; Bottrell, D. G. 1994. *Neem pesticides in rice: potencial and limitations*. IRRI - International Rice Research Institute. Disponível em: <http://books.irri.org/9712200477_content.pdf>. Acesso em: 15 Jun. 2014.

Teixeira, J. G. 2012. *Efeito preservativo de produtos químicos naturais e do tratamento térmico na bio-deterioração da madeira de Pinus caribaea Morelet*. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil.

USEPA. Method 6010C. 2007. Inductively coupled plasma - atomic emission spectrometry. rev. 03, p. 72. Disponível em: <<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/6010c.pdf>>. Acesso em: 23 Set. 2014.

Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.D.; Mazur, M.; Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, n. 39, p. 44 - 84.

Valmorbida, J.; Boaro, C. S. F.; Scavroni, J.; David, E. F. S. 2007. Crescimento de *Mentha piperita* L., cultivada em solução nutritiva com diferentes doses de potássio. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, n. 4, v. 9, p. 27 - 31.

Veiga Jr., V. F.; Pinto, A. C.; Maciel, M. A. M. 2005. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, v. 28, p. 519 - 528.

Viegas Jr., C.; Bolzani, V. S.; Barreiro, E. J. 2006. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, n. 29, p. 326 - 337.

A revista Fitos publica artigos com elevado mérito científico relativos a Plantas Medicinais, que contribuam para os campos temáticos: pesquisa, desenvolvimento e inovação de medicamentos da diversidade vegetal e para estudos e aprofundamentos de temas e disciplinas afins.

A Revista publica trabalhos nas seguintes áreas do conhecimento:

- Agroecologia
- Botânica
- Etnofarmacologia
- Farmacologia
- Inovação (gestão e CTI em saúde)
- Química

Os autores devem ler atentamente as instruções abaixo antes de submeterem seus artigos à Revista Fitos.

1. A REVISTA FITOS aceita trabalhos para as seguintes seções:

1.1 Revisão: revisão crítica da literatura sobre temas pertinentes ao estudo de plantas medicinais; da gestão da inovação e desenvolvimento de medicamentos da biodiversidade brasileira e de temas e disciplinas afins;

1.2 Artigos: resultado de pesquisa de natureza empírica, experimental ou conceitual;

1.3 Comunicação Breve: relatando resultados preliminares de pesquisa, ou ainda resultados de estudos originais que possam ser apresentados de forma sucinta;

1.4 Debate: artigo teórico que se faz acompanhar de cartas críticas assinadas por autores de diferentes instituições, convidados pela equipe editorial, seguidas de resposta do autor do artigo principal;

1.5 Fórum: seção destinada à publicação de 2 a 3 artigos coordenados entre si, de diferentes autores, e versando sobre tema de interesse atual. Os interessados em submeter trabalhos para essa seção devem consultar o Conselho Editorial da Revista Fitos;

1.6 Perspectivas: análises de temas conjunturais, de interesse imediato e sobre a importância das plantas

medicinais; da gestão da inovação e desenvolvimento de medicamentos da biodiversidade brasileira e de temas e disciplinas afins, em geral a convite da equipe editorial;

1.7 Questões Metodológicas: artigo completo, cujo foco é a discussão, comparação e avaliação de aspectos metodológicos importantes para o campo, seja na área de desenho de estudos, análise de dados ou métodos qualitativos;

1.8 Resenhas: resenha crítica de livro relacionado aos campos temáticos da REVISTA FITOS, publicado nos últimos dois anos;

1.9 Cartas: crítica a artigo publicado em fascículo anterior da REVISTA FITOS;

2. Diretrizes para autores

2.1 A REVISTA FITOS publica somente artigos inéditos e originais, e que não estejam em avaliação em nenhum outro periódico simultaneamente. Os autores devem declarar essas condições no processo de submissão. Caso seja identificada a publicação ou submissão simultânea em outro periódico o artigo será desconsiderado. A submissão simultânea de um artigo científico a mais de um periódico constitui grave falta de ética do autor.

2.2 Uma vez aceito, os direitos autorais de todos os artigos, incluindo a sua reprodução por qualquer meio, seja eletrônico ou impresso, pertencerá à Revista Fitos. O autor deverá preencher uma declaração de cessão de direitos autorais enviada pela Revista Fitos.

2.3 Serão aceitas contribuições de artigos escritos em Português, Inglês, Francês ou Espanhol.

2.4 Todos os trabalhos envolvendo estudos em humanos ou animais deverão estar acompanhados dos Pareceres dos Comitês de Ética de Pesquisa em Seres Humanos ou em Animais das instituições a que pertencem os autores, autorizando tais estudos.

2.5 Qualquer conceito emitido nos trabalhos publicados será de responsabilidade exclusiva dos autores.

2.6 Os autores deverão manter uma cópia dos manuscritos em seu poder, em caso de eventual extravio daquele enviado à revista.

2.7 As figuras, tabelas, quadros, estruturas químicas, fotografias, gráficos, desenhos etc. deverão ser inseridas pelos próprios autores nos locais adequados e numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. As respectivas legendas deverão ser claras, concisas, sem abreviaturas e localizadas na parte superior das mesmas. As tabelas não podem ser fechadas por linhas laterais.

2.8 Notas de rodapé não serão aceitas.

2.9 Fontes de financiamento

2.9.1 Os autores devem declarar todas as fontes de financiamento ou suporte, institucional ou privado, para a realização do estudo.

2.9.2 Fornecedores de materiais ou equipamentos, gratuitos ou com descontos, também devem ser descritos como fontes de financiamento, incluindo a origem (cidade, estado e país).

2.9.3 No caso de estudos realizados sem recursos financeiros institucionais e/ou privados, os autores devem declarar que a pesquisa não recebeu financiamento para a sua realização.

2.10 Conflito de interesses

2.10.1 Os autores devem informar qualquer potencial conflito de interesse, incluindo interesses políticos e/ou financeiros associados a patentes ou propriedade, provisão de materiais e/ou insumos e equipamentos utilizados no estudo pelos fabricantes.

2.11 Formatação Inicial do Trabalho

2.11.1 Os originais deverão ser redigidos na ortografia oficial e digitados em papel tamanho A4, espaço duplo, fonte tipo Times New Roman, tamanho 12, com texto justificado, margem de 2 cm em cada um dos quatro lados, e perfazendo o total de, no máximo, 20 e, no mínimo, 5 páginas, incluindo figuras, tabelas e quadros.

2.11.2 Título e subtítulo: deverão estar de acordo com o conteúdo do trabalho, levando em conta o âmbito da Revista. Estes deverão estar escritos em negrito com a primeira letra da palavra em maiúscula, fonte tipo Times New Roman, tamanho 14. Deverão também estar em versão para a língua inglesa, com as mesmas características, mas em fonte tamanho 12.

2.11.3 Autores: o primeiro nome de cada autor deve vir abaixo do título, à esquerda. O nome e o último

sobrenome devem ser por extenso. Os demais sobrenomes devem conter apenas a primeira letra inicial (ex. José Carlos F. P. Oliveira.). No caso de vários autores, seus nomes deverão ser separados por ponto e vírgula.

2.11.4 Filiação dos autores: antes do nome de cada autor deverá constar um número arábico, sobrescrito, indicando seu local de trabalho, com endereço completo (inclusive CEP) e deverá aparecer logo abaixo dos nomes dos autores, também à esquerda. Deve-se assinalar o nome do autor principal com um asterisco sobrescrito, para o qual toda correspondência deverá ser enviada.

2.11.5 Resumo em português: deverá apresentar concisamente o trabalho, destacando as informações de maior importância, expondo metodologia, resultados e conclusões. Permitirá avaliar o interesse pelo artigo, prescindindo de sua leitura na íntegra. Dever-se-á dar destaque ao Resumo como tópico do trabalho, (máximo de 200 palavras).

2.11.6 Abstract: versão do resumo para a Língua Inglesa. Evitar traduções literais. Quando não houver domínio deste idioma, consultar pessoas qualificadas. Providenciar também versão do título para a língua inglesa.

2.11.7 Palavras-chave: deverão identificar/representar o conteúdo do artigo. Observar o limite máximo de 6 (seis). São importantes para levantamentos em banco de dados, com o objetivo de localizar e valorizar o artigo em questão. Deverão vir separados por ponto e vírgula.

2.12 Formatação do Trabalho

2.12.1 Introdução: deverá estabelecer com clareza o objetivo do trabalho e sua relação com outros trabalhos na mesma área. Extensas revisões da literatura deverão ser substituídas por referências às publicações mais recentes, onde estas revisões tenham sido apresentadas.

2.12.2 Materiais e Métodos: a descrição dos materiais e dos métodos usados deverá ser breve, porém suficientemente clara para possibilitar a perfeita compreensão e a reprodução do trabalho. Processos e técnicas já publicados, amenos que tenham sido extensamente modificados, deverão ser referenciados por citação.

2.12.3 Resultados: deverão ser apresentados com o mínimo possível de discussão ou interpretação pessoal

e, sempre que possível, ser acompanhados de tabelas e figuras adequadas. Os dados, quando pertinentes, deverão ser submetidos a uma análise estatística.

2.12.4 Discussão: deverá ser restrita ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados, evitando-se inferências não baseadas nos mesmos.

Obs.: Eventualmente, Resultados e Discussão poderão ser apresentados num único item.

2.12.5 Agradecimentos: Possíveis menções em agradecimentos incluem instituições que de alguma forma possibilitaram a realização da pesquisa e/ou pessoas que colaboraram com o estudo, mas que não preencheram os critérios para serem coautores. Este item é opcional e deverá vir antes das Referências.

2.13 Referências: baseadas nas normas da ABNT

2.13.1 Referência dentro do texto:

No início da citação. Nome do(s) autor (es) em caixa baixa, seguido do ano entre parênteses. Ex. 'Pereira (1999) descreveu a atividade ansiolítica de *Lippia alba*'. Quando houver dois autores, deverá obedecer a ordem alfabética dos autores e seguido o seguinte padrão: 'Castro e Silva (1998) analisaram a toxicologia do extrato de *Psidium guajava*'. Para três autores, a regra será semelhante à anterior, separando os dois primeiros autores por meio de vírgula. Por exemplo, 'Amoroso, Costa e Soares (1997) descreveram a propriedade analgésica de toxicologia da *Lippia alba*'. No caso de mais de três autores, deverá ser mencionado apenas o nome do primeiro, seguido de e colaboradores e do ano entre parênteses. Por exemplo, Silva e colaboradores (1999) confirmaram o efeito broncodilatador de *Mikania glomerata*.

No final da citação. Autor em caixa baixa seguido do ano. Ex. (Silva, 1999). Quando houver dois autores, estes deverão ser separados pela partícula 'e' e ser obedecida a ordem alfabética. Ex. (Castro e Silva, 1998). No caso de três autores, a regra será (Albuquerque, Lima e Sousa, 2000). Quando houver mais de três autores, deverá ser mencionado apenas o nome do primeiro, seguido de et al. e do ano. Por exemplo, (Silva et al., 1999) ou (Silva et al., 1995a,b).

2.13.2 Citação textual: colocar, também, a página. Ex. (Silva, 1999, p.24)

2.13.3 As Referências no final do artigo deverão ser ordenadas alfabeticamente pelo sobrenome do

primeiro autor, em caixa baixa e em ordem crescente de data de publicação, com o ano de publicação sempre após o nome do último autor. Devem-se levar em consideração as seguintes ocorrências:

2.13.3.1 Livro com um autor:

Autor, ano, título do livro em itálico, editora, cidade. COSTA, A.F. 1996. Farmacognosia. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa

2.13.3.2 Livro com dois ou mais autores:

Autores, ano, título do livro em itálico, editora, cidade. SANTOS, I.F.; PEREIRA, F.L. 1995. Criando um Novo Mundo. Atheneu, São Paulo.

2.13.3.3 Livro editado

Deverão ser citados os nomes de todos os editores ou **organizadores**. Editor(es) ou organizador(es), ano, título do livro em itálico, editora, cidade.

Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosman, G.; Palazzo de Melo, J.; Mentz, L.A. e Petrovick, P.R. (org.) 2003. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. Editora da UFRGS/Editora da UFSC. Porto Alegre/Florianópolis.

Yunes, R.A e Calixto, J.B (ed.) 2001 – Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna. Editora Argos. Chapecó.

2.13.3.4 Capítulo de livro:

Autor(es), ano, título do capítulo, editor (ou organizador), título do livro em itálico, páginas inicial e final, editora, cidade.

Furlan, M.; Bergamo, D.C.B. e Kato. M.J. 2009 – Biossíntese de Produtos Naturais: Atualidades e Perspectivas no Desenvolvimento de Novos Fármacos. In: Yunes, R.A. e Cechinel Filho, V. (org.), Química de Produtos Naturais: Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia, p. 83-102. Editora da Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí.

2.13.3.5 Tese ou Dissertação:

Autor, ano, título da tese ou dissertação em itálico, nome da Faculdade ou Instituto, nome da Universidade, cidade.

Lima, N. 1991 - Influência da ação dos raios solares na germinação do nabo selvagem. Tese (Doutorado).

Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Campinas.

2.13.3.6 Artigo de periódico:

Deverão ser citados os nomes de todos os autores, ano, título do artigo, nome completo do periódico em itálico, volume, página inicial e final.

Carlini, E.A.; Duarte-Almeida, J.M. Rodrigues, E. e Tabach, R. 2010 - Antulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemao, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.20, p.140-146.

2.13.3.7 Citação indireta:

As duas citações devem ser mencionadas de maneira completa, com autor, ano, título do livro ou do periódico.

Carballo, S.A. 1995 - Plantas medicinales del Escambray cubano. Apuntes científicos. TRAMIL VII. Islã San Andrés, Colômbia. apud Germosén-Robineau, L. G., (ed) 1996 -Farmacopea Vegetal Caribeña, p.127-130. Editions Emile Désormeaux, Fort-de-France, Martinica.

Wax E.T. 1977. Antimicrobial activity of Brazilian medicinal plants. *J Braz Biol Res* 41: 77-82, apud *Nat Prod Abs* 23, p.588-593, 1978.

2.13.3.8 Eventos científicos (Congressos, Seminários, Simpósios e outros):

Autor(es). Título do trabalho, ano, nome do evento, nº do evento, identificação do trabalho ou resumo, cidade de realização do evento.

Oliveira, J.P.C.; Ferreira, E.L.F. e Chaves, M.H. 2009 – Fenóis totais e atividade antioxidante e citotóxica de extratos das folhas de *Lecynites pisonis*. 32ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, PN-003, Fortaleza.

2.13.3.9 Patentes: Devem ser identificadas conforme modelo abaixo.

Ichikawa, M.; Ogura, M. e Iijima, T. 1986. Antiallergic flavone glycoside from *Kalanchoe pinnatum*. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP* 61,118,396, apud *Chemical Abstracts* 105: 178423q.

2.13.3.10 Leis, Resoluções e demais documentos

BRASIL 2003 – Decreto nº 4.946 de 31 de dezembro de 2003. Altera, revoga e acrescenta dispositivos ao Decreto no 3.945, de 28 de setembro de 2001, que regulamenta a Medida Provisória no 2.186-16, de 23 de agosto de 2001.

2.13.3.11 Banco/Base de Dados

BIREME. Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde. *Lilacs - Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde*. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxis-lind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&base=LILACS&lang=p>>. Acesso em: 27 ago. 2009.

2.13.3.12 Homepage/Website

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza and other Influenza Viruses. 20 August 2009. 91 p. Disponível em: <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_guidelines_pharmaceutical_mngt.pdf>. Acesso 28 ago. 2009.

2.14 Nomenclatura

Devem ser observadas as regras de nomenclatura botânica e zoológica, assim como abreviaturas e convenções adotadas em disciplinas especializadas.

3. Submissão de Artigos

3.1 Os artigos deverão ser encaminhados para submissão através do site <http://revistafitos.far.fiocruz.br/>, com indicação da área do conhecimento à qual o artigo pertence (Agroecologia, Botânica, Etnofarmacologia, Farmacologia, Inovação, Química e Monografia).

3.2 Todos os manuscritos serão submetidos à apreciação de consultores ad hoc, cujos nomes permanecerão em sigilo absoluto, e que dispõem de plena autoridade para decidir sobre a pertinência de sua aceitação, podendo, inclusive, rerepresentá-los aos autores com sugestões para que sejam feitas as alterações necessárias e/ou para que os mesmos sejam adequados às normas editoriais da Revista. Os trabalhos que não forem selecionados para publicação serão devolvidos aos autores.

3.3 Os artigos aceitos para a publicação deverão ser devolvidos ao Editor Coordenador com as recomendações feitas pelos referees no prazo máximo de dois meses, caso contrário a aceitação do mesmo será cancelada.