

QUI-01

SCREENING BIOMONITORADO E AVALIAÇÃO QUÍMICA DE ESPÉCIES VEGETAIS AMAZÔNICAS SEM PRÉVIO RELATO NA LITERATURA - “THE RANDOM SCREENING”. CONSTRUÇÃO DE BANCO DE EXTRATOS.

Alexandre M. Alecrim⁽¹⁾ Sergio M. Nunomura⁽²⁾ Adrian M. Pohlit⁽³⁾ Etienne Quignard⁽²⁾

⁽¹⁾Bolsista CNPq/PIBIC/INPA ⁽²⁾Pesquisador bolsista ⁽³⁾Pesquisador/CPN

A Amazônia é um ecossistema megadiverso que detêm aproximadamente 10% da biodiversidade mundial. Em 1980, Gottlieb & Mors estimaram que apenas 1% da flora amazônica havia sido estudada quimicamente. A região apresenta uma grande riqueza de informações etnobotânicas e etnofarmacológicas que freqüentemente são utilizadas como justificativa da escolha de uma ou outra espécie vegetal como objeto para estudos fitoquímicos. Uma abordagem possível envolve o estudo fitoquímico de plantas escolhidas de uma forma aleatória e portanto, sem base no uso tradicional dessas espécies. Por outro lado, vários bioensaios simples, tais como o teste *in vitro* para atividade antimalárica contra *Plasmodium falciparum* e o testes *in vitro* para toxicidade para *Artemia franciscana*, permitem a detecção de atividade biológica de extratos de plantas. Num processo conhecido como “peneiragem” (em inglês, *screening*), os extratos são testados com bioensaios e os mais ativos são selecionados para futuro fracionamento. A peneiragem é a primeira etapa no caminho da descoberta e do isolamento de substâncias bioativas de uma forma racional, pois permite o monitoramento do trabalho químico até o isolamento das substâncias ativas (biomonitoramento). Entre os objetivos desse estudo estão: (1) a preparação de extratos a partir de plantas amazônicas coletadas aleatoriamente e (2) a avaliação dos extratos e das frações preparadas a partir desses últimos para atividade biológica (contra *P. falciparum* e *A. franciscana*).

Para esse estudo, amostras de material vegetal foram coletadas aleatoriamente e identificadas pelo pesquisador Niro Higuchi (CPST/INPA) como parte dos seus estudos sobre a biomassa das espécies vegetais na Reserva ZF-2/INPA. O material vegetal foi secado à sombra, picotado e moído, fornecendo a serragem, que foi acondicionado em sacos plásticos rotulados para armazenamento. A seguir, duas porções de cada serragem foram pesadas e uma dessas foi extraída com água desionizada fervente (400 mL) por infusão (15 min), seguida de filtração a quente (lavagem com 200 mL água quente). Uma outra porção de serragem sofreu extração contínua com metanol em aparelhagem de Soxhlet (3 extrações, 6 horas cada, trocando o solvente). Os extratos aquosos e metanólicos gerados foram concentrados

utilizando a evaporação rotatória *in vacuo* e em seguida liofilizados. Após a liofilização, cada extrato foi pesado e o teor de extrativos [teor (%)] foi calculado utilizando a seguinte relação: $\text{Teor (\%)} = 100 \times \text{massa extrato (g)}/\text{massa serragem (g)}$. As massas de extratos e os teores obtidos estão apresentados nas Tabelas 1 e 2. Posteriormente uma alíquota de 0,80 g de cada extrato metanólico foi redissolvida em 6,0 mL de metanol:água (1:2) e em seguida sofreu partições consecutivas com éter dietílico e acetato de etila, resultando em três frações. Após a remoção dos solventes dessas frações, por evaporação rotatória seguida de liofilização, a massa e a percentagem de partição [P (%)] de cada fração foram determinados (Tabela 3). Para essas frações, a percentagem de partição foi avaliada da seguinte maneira: $\text{P (\%)} = 100 \times \text{massa fração (g)}/0,80 \text{ (g)}$.

Os testes com *A. franciscana* foram realizados no Laboratório de Farmacologia da CPPN. No teste, um número determinado de larvas (no segundo estágio) de *A. franciscana* foi exposto ao extrato (ou fração) numa concentração de 500 µg de extrato/mL de meio de cultura em placas de teste. Paralelamente foi realizado um controle, utilizando um grupo de larvas que não recebeu extrato, mas um volume equivalente de meio de cultura. Após 24 horas, foi realizada a contagem das larvas vivas e esse número foi comparado ao número de larvas vivas antes de aplicar o extrato. Esse procedimento nos permitiu estabelecer as percentagem de sobrevivência ($S\% = 100 \times \text{no. larvas vivas após 24 h}/\text{no. larvas iniciais}$) e percentagem de mortalidade ($M\% = 100 - S\%$) para cada extrato (Tabelas 1-3).

Durante o decorrer do projeto foram gerados 9 extratos aquosos e 20 extratos metanólicos, destes, 15 foram fracionados por partições por solventes orgânicos originando 45 frações. Foi observado que os teores extrativos dos extratos metanólicos (entre 3-15 %) foram bem mais elevados que os teores dos extratos aquosos (entre 4-8 %).

O bioensaio com *A. franciscana* é um bom indicador de atividade biológica, pois esse teste permite determinar bioatividades que possuem paralelo com a toxicidade geral, não específica. Diversos extratos e frações apresentaram mortalidade (M %) para a *A. franciscana* de acordo com as tabelas 1-3, indicando uma potencial bioatividade dos mesmos.

Em especial, os extratos metanólicos das raízes de breu vermelho, tapurá e piãozinho, apresentaram uma mortalidade elevada (90-100). Após as partições, observou-se que as frações menos polares desses extratos concentravam as substâncias bioativas. Tal fato está de acordo com a mortalidade observada (valores inferiores) para os respectivos extratos aquosos. O extrato metanólico de Abiurana branca mostrou-se pouco ativo, porém a fração

hidroalcoólica concentrou os constituintes tóxicos, indicando o potencial de bioatividade dessa fração (ver tabela 3).

Tanto os extratos quanto as frações foram depositadas no banco de extratos que vem sendo mantido pelo grupo para que sejam realizados estudos futuros.

Tabela 1. Dados da extração metanólica e a mortalidade (M%) dos extratos frente a *A. franciscana*.

Nome comum	Nome científico	Família	Extrato(g)	Teor (%)	M %
Abiurana abiu	<i>Pouteria guyanensis</i>	Sapotaceae	1,37	7,8	13
Abiurana branca	<i>Micropholis venulosa</i>	Sapotaceae	5,87	10,3	8
Araçá bravo	<i>Cassipourea guianensis</i>	Rhizophoraceae	2,90	4,7	25
Branquinha	<i>Rinorea racemosa</i>	Violaceae	3,30	5,1	0
Breu branco	<i>Protium heptaphyllum</i>	Burseraceae	1,08	3,0	—
Breu vermelho	<i>Protium aracuchili</i>	Burseraceae	1,98	1,6	100
Envira amarela	<i>Guatteria procera</i>	Annonaceae	3,19	4,4	0
Envira surucucu	<i>Bocageopsis multiflora</i>	Annonaceae	5,49	13,3	0
Falsa cupiúba	<i>Rinorea guianensis</i>	Violaceae	1,66	2,4	3
Matamatá amarelo	<i>Escheweilera bracteosa</i>	Lecythidaceae	2,79	10,8	6
Mucurão	<i>Amphirshox surinamensis</i>	Violaceae	3,28	6,7	12
Mututi	<i>Swartzia pronacensis</i>	Leguminosae	1,80	5,6	2
Pau marfim	<i>Agonandra brasiliensis</i>	Opiliaceae	6,12	8,0	5
Piãozinho	<i>Micrandropsis scleroxylon</i>	Euphorbiaceae	1,06	3,9	95
Ripeiro	<i>Corytophora alta</i>	Lecythidaceae	8,76	15,1	20
Seringarana	<i>Micrandra rossiana</i>	Euphorbiaceae	3,22	4,6	5
Sucupira	<i>Bowdichia nitida</i>	Leguminosae	3,46	4,0	0
Tapurá	<i>Tapura amazonica</i>	Dichapetalaceae	1,55	6,3	100
Taquiri	<i>Couratari sp.</i>	Lecythidaceae	2,04	5,5	—
Uxi de morcego	<i>Ouratea sp.</i>	Ochnaceae	2,05	3,7	—

Tabela 2. Dados sobre os extratos aquosos e a mortalidade (M%) dos extratos frente a *A. franciscana*..

Nome comum	Nome científico	Família	Extrato (g)	Teor (%)	M %
Abiurana abiu	<i>Pouteria guyanensis</i>	Sapotaceae	1,04	4,93%	5
Branquinha	<i>Rinorea racemosa</i>	Violaceae	1,59	3,46%	0
Breu vermelho	<i>Protium aracuchili</i>	Burseraceae	3,07	7,76%	46
Matamatá amarelo	<i>Escheweilera bracteosa</i>	Lecythidaceae	1,72	8,10%	0
Mucurão	<i>Amphirshox surinamensis</i>	Violaceae	1,44	5,56%	—
Mututi	<i>Swartzia pronacensis</i>	Leguminosae	1,58	3,87%	0
Piãozinho	<i>Micrandropsis scleroxylon</i>	Euphorbiaceae	1,02	2,95%	0
Seringarana	<i>Micrandra rossiana</i>	Euphorbiaceae	1,57	3,54%	0
Tapurá	<i>Tapura amazonica</i>	Dichapetalaceae	2,52	7,73%	85

Tabela 3. Dados sobre a partição dos extratos metanólicos e a mortalidade (M%) *A. franciscana*

Extrato	Frações											
	Extrato Metanólico			Etérea			Acetato			Hidroalcoólica		
Nome comum	m (g)	T (%)	M (%)	m (g)	P (%)	M (%)	m (g)	P (%)	M (%)	m (g)	P (%)	M (%)
Abiurana abiu	1,36	7,8	13	0,10	13	0	0,09	11	0	0,55	69	—
Abiurana branca	5,86	10,3	8	0,05	7	0	0,15	18	8	0,59	74	51
Breu vermelho	1,98	1,6	100	0,11	14	97	0,28	34	4	0,36	46	41
Envira amarela	3,19	4,4	0	0,09	11	—	0,08	11	—	0,59	73	—
Envira surucucu	5,48	13,3	0	0,19	24	—	0,09	11	—	0,65	82	—
Falsa cupiúba	1,66	2,4	3	0,10	12	0	0,08	10	16	0,64	80	0
Matamatá amarelo	2,79	10,8	6	0,05	6	0	0,05	6	0	0,34	42	0
Mututi	1,80	5,6	2	0,15	19	—	0,17	21	—	—	—	—
Pau marfim	6,12	8,0	5	0,10	13	—	0,07	9	—	0,62	78	—
Piãozinho	1,06	3,9	95	0,14	18	85	0,17	21	81	0,50	62	15
Ripeiro	8,75	15,1	20	0,06	8	—	0,16	20	—	0,55	68	—
Seringarana	3,21	4,6	5	0,13	16	0	0,80	100	0	0,60	76	0
Sucupira	3,46	4,0	0	0,19	24	—	0,06	8	—	0,52	65	—
Tapurá	1,55	6,3	100	0,21	26	100	0,06	7	94	0,39	49	0
Uxi de morcego	2,05	3,7	—	0,07	9	—	0,04	5	—	0,68	85	—

m = massa do extrato T (%) = teor de extrativos P (%) = percentagem de partição M (%) = mortalidade

Corrêa, M.P. (1984) Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro.

Dahlgren, R.M.T. (1980) A revised system of classification of the angiosperms. *Botanical Journal of the Linnean Society* 80: 91-124.

Gottlieb, O.R. e Mors, W. (1980) Potential Utilization of Brazilian Wood Extractives. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 28, 196-215.

Matos, F.J.A. (1997) Introdução à Fitoquímica Experimental. 2ª edição Edições UFC, Fortaleza, p. 52.

Milliken, W. (1997) Plants for Malaria. Plants for Fever. Medicinal species in Latin America – a bibliographic survey. The Royal Botanical Gardens, Kew.

Silva, M.F., Lisbôa, P.L.B. e Lisbôa, R.C.L. (1977) Nomes Vulgares de Plantas Amazonicas, INPA, Belém.

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., Mesquista, M.R. e 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, INPA DFID*, p. 181-183.