

**Metodologia de coleta e extração de DNA da Acariquara-Branca  
(*geissospermum urceolatum* a.h. Gentry, 1984), no município de Manacapuru,  
km 60 – comunidade Nova Esperança**

**Methodology of collection and extraction of Acariquara-Branca DNA  
(*geissospermum urceolatum* a.h. Gentry, 1984), in the municipality of  
Manacapuru, km 60 - comunidade Nova Esperança**

DOI:10.34117/bjdv6n9-383

Recebimento dos originais: 11/08/2020

Aceitação para publicação: 15/09/2020

**Suzana da Silva de Oliveira Martins - Autora**

Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Universidade do Estado do Amazonas - UEA

Docente na Comissão de Ética na Utilização de Animais – CEUA/UEA

Endereço: Av. Carvalho Leal – Manaus, Amazonas - Brasil

E-mail: suzana.martins.oliveira.1974@gmail.com

**Andrezza Miná Barbosa – Co-autora**

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Pesquisadora no Núcleo de Pesquisa Experimental e Clínica em Cardiologia - NUPECC

Endereço: Campus I - Lote Cidade Universitária, - João Pessoa, Paraíba - Brasil

E-mail: andrezzamina@yahoo.com.br

**RESUMO**

*Geissospermum urceolatum* é uma Apocynaceae conhecida popularmente como acariquara-branca, acariquara, quinarana, acariubarana, acarirana, pereira, pau-pereira e pau-forquilha. Além da qualidade da madeira, a infusão de sua casca amarga é comumente usada na medicina popular da região amazônica para o tratamento de dor de estômago, febre e malária. Porém, não há relatos científicos desta espécie confirmando essas ações. A extração de DNA puro é um pré-requisito para qualquer análise molecular. Existem diversas metodologias disponíveis para o isolamento do DNA vegetal, mas na prática, esses procedimentos são empíricos em função da variabilidade e na composição do tecido vegetal utilizado. Os métodos convencionais de extração de DNA, não são necessariamente reproduzíveis para todas as espécies, sendo necessárias adaptações e modificações. O objetivo do trabalho foi estabelecer um método simples e eficiente de coleta e o armazenamento das folhas da espécie *Geissospermum urceolatum* para obtenção de DNA de boa qualidade. As diferentes variáveis testadas, consistiram no teor de umidade da folha (seca ou úmida) x tempo de armazenamento (24h ou 48h) x condição do ambiente (T° ambiente ou 4°C) x uso de sílica no recipiente de armazenamento de folhas (com ou sem sílica). Foram utilizados controles, onde as folhas coletadas e armazenadas em gelo ou N<sub>2</sub> líquido, para serem submetidas à extração de DNA logo após a coleta. O DNA extraído teve sua concentração e integridade determinada em gel de agarose 1% e CTAB 2X. A qualidade e quantificação do DNA extraído, foi comparado com as concentrações de 50, 100 e 200 ng/μL, conhecidas de DNA do fago lambda (λ). Os resultados indicaram que a utilização da sílica utilizada como forma de coleta e armazenamento das folhas no tempo mínimo de 24h, foram favoráveis à oxidação das amostras, resultando em um DNA de baixa qualidade. No entanto a extração do DNA de alta qualidade

passível de ser utilizado em PCR, foi viável quando folhas frescas foram coletadas e armazenadas em sacos plásticos e resfriadas em isopor com gelo por 24h à 48h, antes do início do procedimento da extração. E que o método de extração de DNA que utiliza o CTAB 2X, testados pelo protocolo Doyle et al. (1997), com modificações, foram eficazes para obtenção de DNA de *Geissospermum urceolatum*.

**Palavras-chave:** acariquara-branca, *Geissospermum urceolatum*, DNA, Plantas Medicinais.

## ABSTRACT

*Geissospermum urceolatum* is an Apocynaceae popularly known as acariquara-branca, acariquara, quinarana, acariubarana, acarirana, pear, pau-pereira and pau-forquilha. In addition to the quality of the wood, the infusion of its bitter bark is commonly used in folk medicine in the Amazon region to treat stomach pain, fever and malaria. However, there are no scientific reports of this kind confirming these actions. Extraction of pure DNA is a prerequisite for any molecular analysis. There are several methodologies available for the isolation of plant DNA, but in practice, these procedures are empirical due to the variability and composition of the plant tissue used. Conventional methods of DNA extraction are not necessarily reproducible for all species, and adaptations and modifications are necessary. The objective of the work was to establish a simple and efficient method of collecting and storing the leaves of the species *Geissospermum urceolatum* to obtain good quality DNA. The different variables tested consisted of the leaf moisture content (dry or wet) x storage time (24h or 48h) x environmental condition (T° environment or 4°C) x silica use in the leaf storage container (with or without silica). Controls were used, where the leaves were collected and stored on ice or liquid N<sub>2</sub>, to be subjected to DNA extraction right after collection. The extracted DNA had its concentration and integrity determined in 1% agarose gel and CTAB 2X. The quality and quantification of the extracted DNA was compared with the concentrations of 50, 100 and 200 ng / μL, known from lambda phage (λ) DNA. The results indicated that the use of the silica used as a way of collecting and storing the leaves in a minimum time of 24h, was favorable to the oxidation of the samples, resulting in a low quality DNA. However, the extraction of high quality DNA that can be used in PCR, was feasible when fresh leaves were collected and stored in plastic bags and cooled in polystyrene with ice for 24h to 48h, before the extraction procedure started. And that the DNA extraction method that uses CTAB 2X, tested by the protocol Doyle et al. (1997), with modifications, were effective in obtaining DNA from *Geissospermum urceolatum*.

**Keywords:** acariquara-branca, *Geissospermum urceolatum*, DNA, Medicinal Plants.

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas são fontes vantajosas de medicamentos utilizados na farmacoterapia. Soejarto et al. (1989), citam que há pelo menos 47 fármacos importantes que foram desenvolvidos a partir de plantas encontradas nas florestas tropicais, como, por exemplo, o curare, a pilocarpina, o quinino, a ipeca e a codeína (BARRETO, 1994). Poucas foram estudadas com os critérios internacionais que definem as etapas do estudo de um medicamento, antes da aplicação pela primeira vez na espécie humana, seguindo a Resolução RE 90/2004, que caracteriza “o guia para os estudos de toxicidade de medicamentos fitoterápicos” (BRASIL, 2004).

Brasil (2008), define o Fitoterápico (Plantas Medicinais) como “todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado empregando-se exclusivamente matérias primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário (Portaria nº 6, 1995). No entanto, esta definição de Fitoterápico se confunde, portanto, com a definição de medicamento: “Produto farmacêutico tecnicamente obtido ou elaborado com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico” - Resolução RDC 48/2010 (BRASIL, 2010).

Nos últimos 10 anos, o desenvolvimento de novos medicamentos com as técnicas usuais de triagem farmacológica de muitos produtos sintéticos, não tem dado os resultados esperados (SAMS-DODD, 2005). A diminuição do número de novos compostos promissores é preocupante em todas as áreas, mas as doenças negligenciadas seriam as mais afetadas em vista do baixo retorno econômico esperado.

*Geissospermum urceolatum* é uma Apocynaceae conhecida popularmente como acariquara-branca, acariquara, quinarana, acariubarana, acarirana, pereira, pau-pereira e pau-forquilha. Além da qualidade de suas madeiras, a casca da espécie possui um gosto amargo sendo utilizada comumente na forma de infusões pela medicina popular da Região Amazônica para tratamento de dores no estômago, tontura, febre e malária (RIBEIRO et al., 1999). Esta espécie não conta com trabalhos científicos confirmando essas ações

A importância do estudo taxonômico de plantas usadas na medicina popular fundamenta-se em certas considerações: 1) as referidas plantas, geralmente apresentando muitos nomes vulgares, podem corresponder a espécies totalmente diferentes, causando confusão e dificultando o seu estudo (CAMINHOÁ, 1984). 2) os aspectos morfológicos e taxonômicos em geral ficam desatualizados e quase sempre não documentados. Salientando que muitas espécies corriqueiramente usadas e bem conhecidas pela população amazônica, não são citadas na literatura etnobotânica (HIDALGO, 1999). 3) os estudos sobre a variabilidade genética de diversos acessos da espécie geram importantes informações para subsidiar diferentes práticas de coletas, estudos farmacológicos e manejo de bancos de germoplasma nas etapas iniciais de seleção e melhoramento genético (FALEIRO, 2007).

Do mesmo modo, os estudos filogenéticos, a metodologia de coleta, tratamento e conservação de amostras de plantas para estudos moleculares tem sido intensamente debatida (DOYLE et al., 1987; CHASE et al., 1991; SYTSMA et al., 1993; TAYLOR et al., 1994; DESSAUER et al., 1996). Facilitando, a obtenção de DNA de boa qualidade como passo fundamental para o sucesso das análises moleculares.

A extração de DNA puro, é pré-requisito para qualquer análise molecular. Existem várias metodologias disponíveis para o isolamento de DNA de plantas, mas, na prática, esses procedimentos são empíricos em função da variabilidade existente na composição do tecido vegetal utilizado (ARAS et al., 2003). Os métodos convencionais simples de extração de DNA não são necessariamente reproduzíveis para todas as espécies, sendo necessárias adaptações e modificações.

A diferença básica entre os protocolos de extração de DNA de plantas está na composição do tampão de extração que, normalmente integra um agente tamponante para estabilizar o pH em torno de 8,0; um sal para dissociar as proteínas do DNA; um detergente para solubilizar as membranas e auxiliar na inativação de algumas enzimas; e um inibidor de DNases para proteger o DNA (BERED, 1998). Dellaporta et al. (1983), usaram dodecil sulfato de sódio (SDS) como detergente, enquanto, Doyle et al. (1997), usaram o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e Cheung et al. (1993), o sarcosyl. Demonstrando que os protocolos são modificados, conforme as necessidades e as particularidades de partes das plantas a serem analisadas (LIMA, et al., 2020). Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi testar a qualidade e o nível de pureza do DNA obtido de amostras de folhas de *Geissospermum urceolatum*, coletadas na Comunidade Nova Esperança, no Município de Manacapuru-Manaus/AM, utilizando o método CTAB 2X (brometo de cetiltrimetilamônio) de Doyle et al. (1997), com modificações.

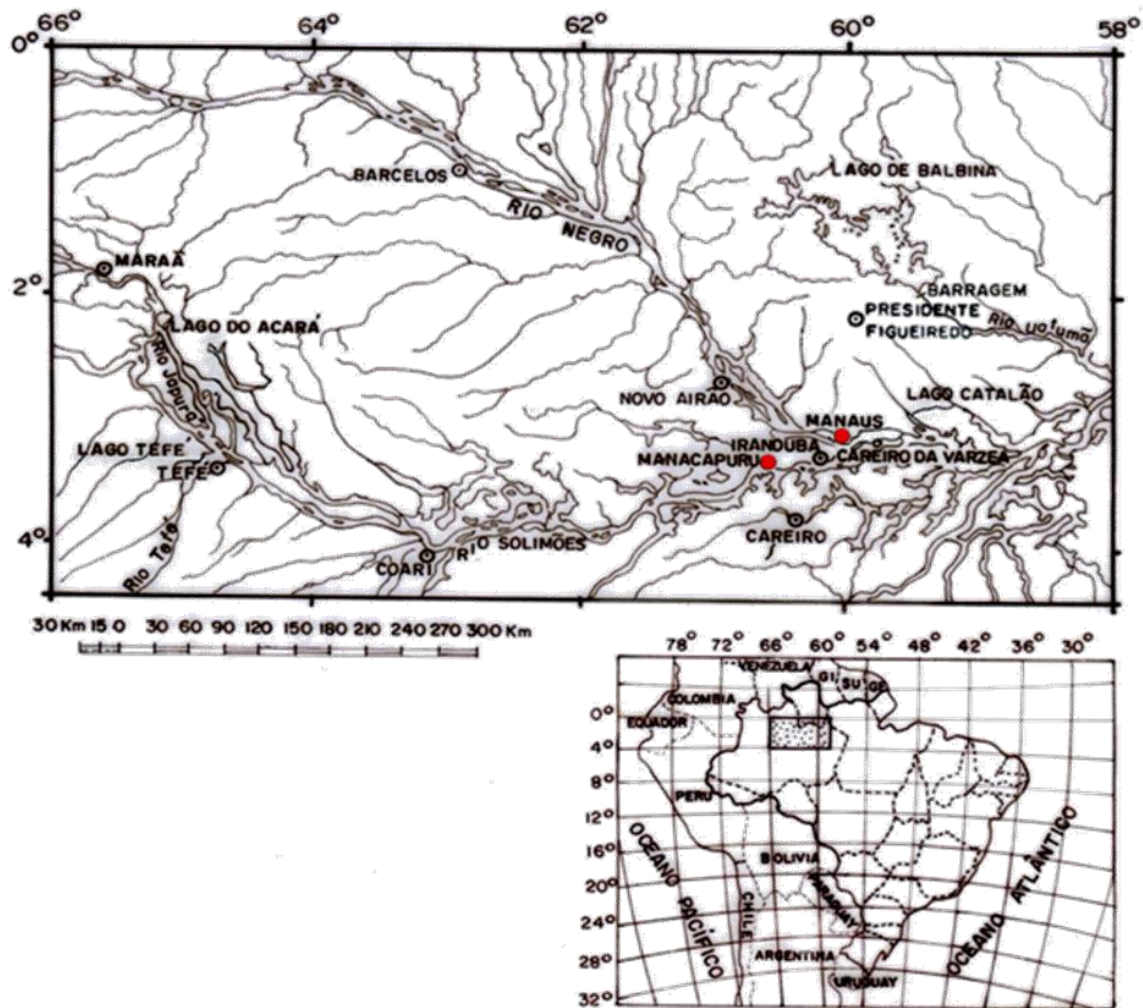
## **2 OBJETIVO**

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi testar a qualidade e o nível de pureza do DNA obtido de amostras de folhas de *Geissospermum urceolatum*, coletadas na Comunidade Nova Esperança, Manacapuru-Am, utilizando o método CTAB 2X (brometo de cetiltrimetilamônio) de Doyle et al. (1997), com modificações.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 MATERIAL BOTÂNICO**

Para a avaliação das diferentes metodologias de coletas e conservação do material vegetal, foi utilizada a espécie *Geissospermum urceolatum*, cultivada na área de estudo da Reserva Ambiental da Universidade Federal do Amazonas, localizado no Município de Manacapuru, km 60 – Comunidade Nova Esperança, Manaus/AM. Latitude: 3°16'28" e Longitude: 60°32'53" (Figura 1).

Figura 1 Mapa de localização da região de coleta das folhas da espécie *Geissospermum urceolatum*

Fonte: Teixeira, A. S.; Martins, S.S. O. 2010

A coleta das folhas foram realizadas no período da manhã, antes do nascer do sol. Na primeira etapa das avaliações, amostras de folhas frescas, secas ou úmidas e desidratada com sílica foram coletadas, identificadas e acomodadas em caixas de isopor e transportadas para o laboratório de Biologia Molecular e Extração do Centro de Biotecnologia do Amazonas-CBA, para extração do DNA (Figura 2). O material vegetal foi identificado, classificado e incorporado ao acervo do herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA, sob registro n° 224976.



Figura 2 Métodos de coleta das folhas para extração de DNA e identificação taxonômica da espécie *Geissospermum urceolatum*



Durante os métodos de coletas foram combinados os fatores como, umidade da folha (seca ou úmida) x tempo de armazenamento (24h e 48h) x condição do ambiente ( $T^{\circ}\text{C}$  ambiente ou  $4^{\circ}\text{C}$ ) x utilização de sílica no recipiente de armazenamento da folha (com ou sem sílica). Foram utilizados controles, onde as folhas coletadas foram armazenadas em gelo e  $\text{N}_2$  líquido, sendo submetidas à extração do DNA, logo após a chegada do material no laboratório (Tabela 1).

Tabela 1 Tipos de coletas e conservação das amostras de folhas da espécie *Geissospermum urceolatum* para a extração de DNA, adaptado por Pereira et al. (2009), com modificações.

	Descrição dos tipos de coletas	Temperatura °C	Tempo (h)
01	Folha fresca envolvida em papel toalha, acondicionada em saco plástico com fecho hermético, mantida ao abrigo da luz.	temperatura ambiente	24 h
02	Folha desidratada em sílica gel, acondicionada em saco plástico com fecho hermético, mantida ao abrigo da luz.	temperatura ambiente	24 h
03	Folha fresca armazenada em saco plástico com fecho hermético e mantida resfriada em isopor com gelo.	trocas do gelo	48 h
04	Folha fresca macerada em nitrogênio líquido e armazenada, mantida ao abrigo da luz.	(-70 °C)	24 h
05	Folha armazenada em saco plástico com fecho hermético, embrulhada em papel jornal e mantida resfriada em isopor com gelo.	trocas do gelo	24 h
06	Folha seca armazenada em saco plástico com fecho hermético, embrulhada em papel jornal e mantida resfriada em isopor com gelo.	temperatura ambiente	48 h
07	Folha seca e úmida envolvida em papel toalha, acondicionada em saco plástico com fecho hermético, mantida ao abrigo da luz.	temperatura ambiente	24 h
08	Folha acondicionada em saco plástico com fecho hermético e imediatamente congelada em freezer.	(-20 °C)	24 h

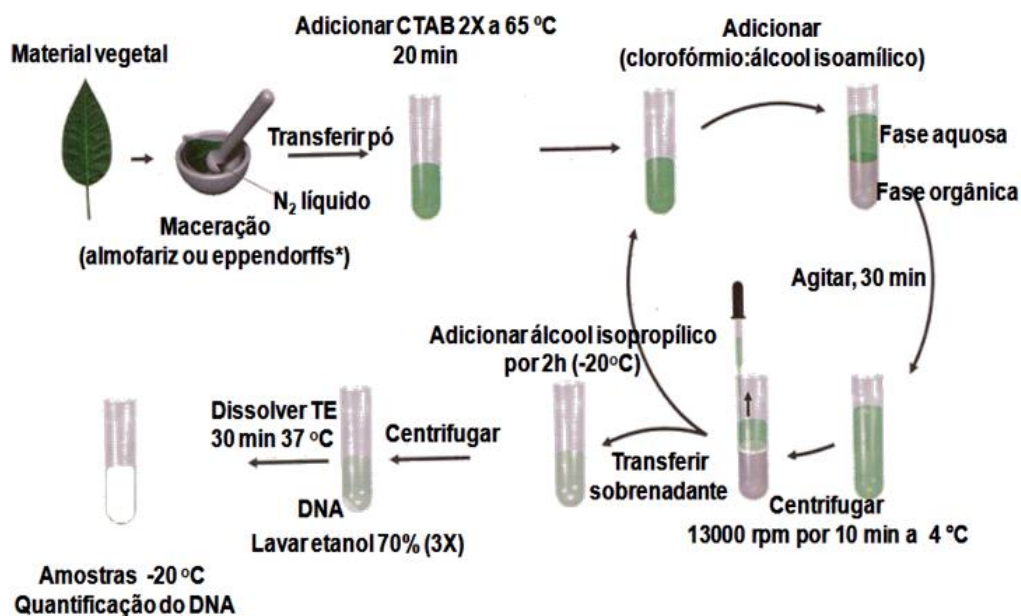
### 3.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA

A coleta das folhas foram realizadas no período da manhã, antes do nascer do sol. A extração ocorreu no período de 24h e 48h após a chegada do material vegetal no laboratório, sendo acondicionadas a -20°C. O isolamento e extração de DNA total da espécie *Geissospermum urceolatum*, foi realizado pelo método CTAB 2X, tendo como protocolo Doyle et al. (1997), com modificações. Seguindo as especificidades de cada um dos protocolos de coletas testados, ao final de cada extração, obtiveram-se amostras de DNA, as quais foram analisadas por meio de quantificação e visualização gel de agarose 1%.

Foram utilizadas nove amostras em duplicata, conforme extração padrão do método utilizado e adaptado por Lima et al. (2007), com 2g material vegetal (pó). O tecido foliar foi macerado dentro do microtubo, sendo adicionados 700 µL de tampão CTAB (NaCl 1,4M; Tris-HCl pH 8,0 100 mM; EDTA 20 mM; CTAB 2%; β-Mercaptoetanol 0,2% e água Milli-Q), preaquecido a aproximadamente 65°C. Incubou-se em banho-maria com circulação a essa temperatura, entre 20 minutos e uma hora, agitando-se a cada 10 minutos. Ao homogeneizado foram adicionados 600 µL de clorofórmio:álcool:isoamílico (24:1) e agitou-se manualmente por cinco minutos; em seguida, centrifugou-se por dez minutos a 13000 x g. Em novos tubos identificados transferiu-se a fase aquosa (fase superior). Nesta solução adicionaram-se 400 µL de isopropanol gelado na temperatura de -20°C, misturando-se suavemente por inversão dos tubos, várias vezes. As amostras foram então submetidas à temperatura de -20°C por 30 minutos, para

formação do sedimentado. Centrifugaram-se as amostras por 20 minutos a 13000 x g e se descartou o sobrenadante. O precipitado foi lavado duas vezes com 1mL de etanol 70%, por cinco a dez minutos e uma vez com etanol absoluto, por três minutos. Secou-se o precipitado, deixando os tubos em câmara de fluxo laminar. O DNA extraído foi ressuspendido em 150  $\mu$ L de TE (TrisHCl 1M, EDTA 500 mM) pH 8,0 com RNase (10  $\mu$ g/mL) e incubou-se a 37°C, por 30 minutos por 2h (Figura 3). O teste de qualidade e quantificação do DNA, foi realizado por eletroforese e compara com concentrações conhecidas de DNA do fago lambda ( $\lambda$ ) (50, 100 e 200 ng/ $\mu$ L) para confirmar a integridade das amostras.

Figura 3 Esquema representativo das etapas de extração de DNA de plantas pelo método de CTAB 2X. Adaptado por Lima et al. (2007).



## 4 RESULTADOS

A análise de integridade e qualidade do DNA extraído, verificada pela eletroforese em gel de agarose 1%, combinada à diferentes tipos de coletas e armazenamentos como umidade, tempo de armazenamento, condição do ambiente e utilização do dessecante (sílica), apresentaram uma boa qualidade e as concentrações foram bem variáveis.

Considerando-se as amostras do teste, as quais permaneceram armazenadas durante 24 horas antes da moagem, observamos que os pellets 1 e 3 da amostra 01 (folhas frescas envolvidas em papel, mantidas à temperatura ambiente) tiveram excelente conservação e quantificação de DNA. Na amostra 02 (folhas coletadas e desidratadas em sílica gel), observamos que os pellets 5

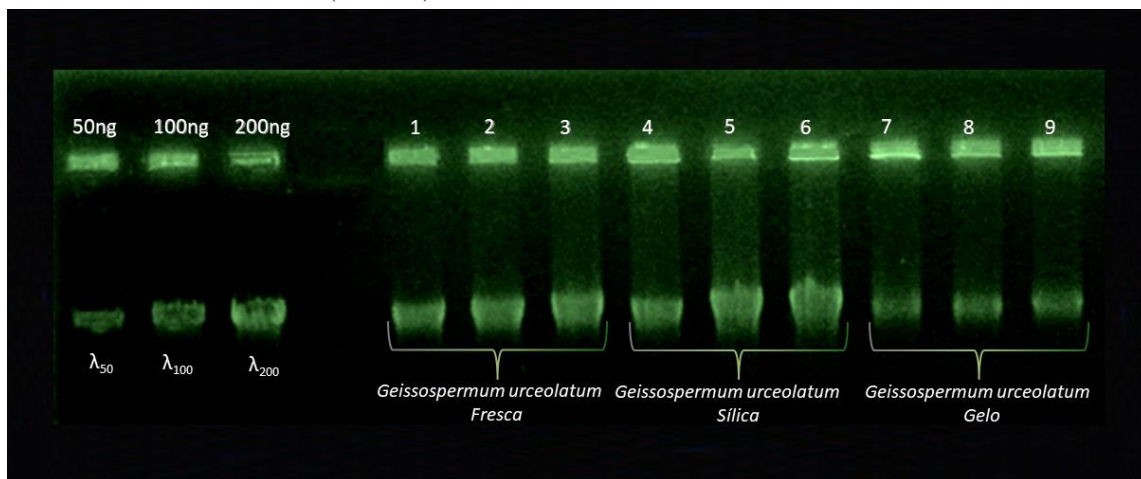


e 6 evidenciaram um rastro visível, indicando a ocorrência de oxidação do DNA e interferindo na integridade das folhas. Durante a coleta fora observado que as folhas coletadas em sílica, secaram em menos de 12 horas, indicando o processo de desidratação das amostras e ocorrendo a degradação do DNA. Na amostra 03 (folhas frescas envolvidas em papel, resfriadas em isopor com gelo), observamos que os pellets 7, 8 e 9 resultaram no DNA de alta qualidade.

Analisando-se as amostras da segunda etapa dos testes com 48 horas, observamos que as amostras exibiram melhor condições de conservação (folhas envolvidas em papel, resfriadas em isopor com gelo ou mantidas à temperatura ambiente, respectivamente). No entanto, algumas apresentaram elevado grau de degradação, evidenciado pela coloração extremamente escura da folha (folhas coletadas e desidratadas em sílica gel).

Os resultados demonstraram que o método de extração de DNA que empregam CTAB 2X testados pelo protocolo Doyle et al. (1997), com modificações, foram eficazes para obtenção de DNA de *Geissospermum urceolatum* (Figura 4).

Figura 4 Quantificação de DNA das amostras de folhas da espécie *Geissospermum urceolatum* em gel de agarose 1%, revelado com brometo de etídio. A extração do DNA foi combinado com os fatores variáveis como umidade da folha x tempo de armazenamento x condição do ambiente x utilização de sílica no recipiente de armazenamento da folha. Os padrões de fago lambda ( $\lambda$ ) correspondem a 50, 100 e 200 ng/ $\mu$ L, respectivamente. Amostra 01 - (Fresca), Amostra 02 - Sílica e Amostra 03 - Gelo (controle).



## 5 CONCLUSÕES

Os resultados indicaram que a utilização da sílica utilizada como forma de coleta e armazenamento das folhas no tempo mínimo de 24h, foram favoráveis à oxidação das amostras, resultando em um DNA de baixa qualidade. No entanto a extração do DNA de alta qualidade passível de ser utilizado em PCR, foi viável quando folhas frescas foram coletadas e armazenadas em sacos plásticos e resfriadas em isopor com gelo por 24h à 48h, antes do início do procedimento

da extração.

Embora existam vários protocolos de isolamento de DNA de planta, no presente trabalho, foi possível padronizar a extração de DNA para *Geissospermum urceolatum* nativa da Amazônia, que devido a importância que a espécie vem ganhando nos últimos anos pelos pesquisadores nos estudos de plantas medicinais, demonstrou-se eficiente e tornando-o viável a sua amplificação em PCR;

### REFERÊNCIAS

ARAS, S.; DURAN A.; YENILMEZ, G. Isolation of DNA for RAPD analysis from dry leaf material of some *Hesperis* L. specimens. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 21, p. 461a-461f, 2003.

BARRETO, M. A.; ALVES, V.F.G.; NEVES, L. J. Contribuição ao estudo de *Vernonia condensata* Baker. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 75, n. 3, p.54-58, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE 90. Dispõe sobre o Guia para os estudos de toxicidade de medicamentos fitoterápicos. DOU, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria nº 6 de 1995. Lista de Medicamentos Fitoterápicos de Registro Simplificado. DOU, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC 48. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. DOU, 2010.

BERED, F. Extração de DNA – considerações e prática. In: MI-LACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: S.C.K. Milach, 1998. p.141.

CAMINHOÁ, J. M. **Elementos de Botânica**. Rio de Janeiro: Tipografia Nacional, 1984. p.428.

CHASE, M.W.; HILLS, H.H. Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. **Taxon** n.40, 215-220, 1991.

CHEUNG, W. Y.; HUBERT, N.; LANDRY, B. S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal, and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. **Technical Tips**, v. 3, p. 69-70, 1993.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant minipre-paration: version II. **Plant Molecular Biology Report**, v. 1, n. 4, p. 19-20, 1983.

DESSAUER, H.C.; COLE, C.J.; HAFNER, M.S. Collection and storage of tissues. In: HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. **Molecular Systematics**, 2nd. Edition. Sinauer Associates, Sunderland, Mass., p.29-47, 1996.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf

tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1997.

EMBRAPA. **Manual de Transformação Genética de Plantas. Serviço de Produção e Informação –SPI**. Brasília. 1998. p.309.

FALEIRO, F.G. **Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa, 2007. p.102.

FRANCISCON, C.H. **Manual de Herbário: Apostila de acompanhamento do Curso Internacional de Técnicas de Herbário**. Manaus. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. 2005. p. 151.

HIDALGO, A.F. Setor de Plantas Mediciniais da Faculdade de Ciências Agrárias. In: I Mostra de Produção Técnico-Científica da Universidade Federal do Amazonas, 1999, Manaus-AM. **Resumo**. Manaus-AM: Universidade Federal do Amazonas, 1999. p.42.

LIMA, R.S.N.; SANTOS, C.A.F.; RODRIGUES, M.A; BATISTA, P.P. Ajustes no Protocolo de DNA CTAB 2X para extração de DNA em diversas espécies vegetais. In: Jornada de Iniciação Científica da Embrapa. SEMI-ÁRIDO, v.2, Petrolina, **Anais**. Petrolina: Embrapa Semi-árido, 2007.

LIMA, L.D.O.; SILVA, M.R.; MAGALHÃES, L.O.; MORAIS, G. C.; SILVA, R.N.O. Comparação de protocolos de extração de DNA gnômico de *Capsicum spp*. **Brazilian Journal of Development**, v.6, n.5, p. 26419-26434, 2020.

PEREIRA, G.S.; VON PINHO, E.V.R; PADILHA, L.; RESENDE, L.; CARVALHO, B.L; VON PINHO, I.V. Coleta de folhas do cafeeiro e extração de DNA gnômico de alta qualidade. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, v.6. Vitória. Inovação Científica, Competitividade e Mudanças Climáticas: **Anais**. Vitória: Consorcio Pesquisa do Café, 2009. p. 1-4.

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.; **Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra-Firme na Amazônia Central**. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. Manaus, 1999. p. 799.

SAMS-DODD, F. Target-based drug discovery: is something wrong? **Review Article**. Lindsay Drug Discovery Today. 2005. v. 10, n. 2, p. 139-147. 2005.

SOEJARTO, D.; FARNSWORTH, N. Tropical rainforest: Potential source of new drugs? Perspectives in Biology and Medicine. v.32, 244 – 256, **Projeto MUSE**, 1989.

SYTSMA, K.; GIVNISH, T.J.; SMITH, J.F.; HAHN, W.J. Collection and storage of land plant samples for macromolecular comparisons. In: Methods in Enzymology - Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data (ZIMMER, E.A.; WHITE, T.J.; CANN, R.L.; WILSON, A.C.). **Academic Press**, San Diego. v.24, p.23-38, 1993.

## ***Brazilian Journal of Development***

TAYLOR, J.W.; SWANN, E.C. Dried Samples: Soft Tissues - DNA from Herbarium Specimens. In: Ancient DNA - Recovery and Analysis of Genetic Material from Paleontological, Archaeological, Museum, Medical, and Forensic Specimens (HERRMANN, B.; HUMMEL, S.). Springer-Verlag, New York, p.167-181, 1994.