

Estudo fitoquímico, microbiológico, citotoxicidade e antioxidante do látex *Brosimum parinarioides* spp. *parinarioides* Ducke (Moraceae) com o *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke (Apocinaceae)

Everson dos Santos David¹, Érica de Menezes Rabelo², Rosany Lopes Martins³, Sheylla Susan Moreira da Silva de Almeida⁴

1. Biólogo e Mestrando em Ciências Farmacêuticas (Universidade Federal do Amapá, Brasil).

everson.david@hotmail.com

<http://lattes.cnpq.br/1991828425569953>

<http://orcid.org/0000-0002-9636-9974>

2. Bióloga (Universidade Estadual Vale do Acaraú, Brasil). Doutoranda em Biodiversidade e Biotecnologia (Universidade Federal do Amapá, Brasil).

ericamrabelo@gmail.com

<http://lattes.cnpq.br/3578943835154555>

3. Bióloga (Universidade Federal do Pará, Brasil). Doutoranda em Biodiversidade e Biotecnologia (Universidade Federal do Amapá, Brasil). Professora da Universidade Estadual do Amapá, Brasil.

rosyufpa@gmail.com

<http://lattes.cnpq.br/6956422614062151>

4. Farmacêutica (Universidade Federal do Pará). Doutora em Química (Universidade Federal de São Carlos). Professora da Universidade Federal do Amapá, Brasil.

sheyllasusan@yahoo.com.br

<http://lattes.cnpq.br/5096255590649678>

<http://orcid.org/0000-0002-7687-8288>

RESUMO

As espécies de *Brosimum parinarioides* spp. *parinarioides* Ducke (amapá doce) e o *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke (amapá amargo) são nativas da Amazônia. A sua tradição vem do uso do látex para a alimentação como fortificante nutricional em mingau, e no uso medicinal para tratamento de doenças pulmonares. O objetivo desta pesquisa foi realizar o estudo comparativo fitoquímico, microbiológico, citotoxicidade e de potencial antioxidante das duas espécies. O screening fitoquímico visando à presença dos principais metabólitos secundários presentes no látex ocorreu por técnicas de reações padrão de coloração e precipitação. O estudo microbiológico foi realizado pela determinação da Concentração Inibitória Mínima por técnica de microdiluição em placas de poliestireno. A toxicidade em fase aguda foi avaliada em *A. salina* L. empregando-se diferentes concentrações dos produtos testes. O potencial antioxidante foi avaliado através da técnica do sequestro do radical do DPPH. No screening fitoquímico foi possível detectar no látex das espécies do amapá a presença de alcaloides, com variação de outras classes de metabólitos secundários. Não houve atividade antibacteriana do extrato frente as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella sp*, as espécies mostraram-se atóxica, pois não foi possível a determinação da LC_{50} sobre *Artemia salina*. Para o potencial antioxidante o látex *B. parinarioides* apresentou coeficiente de correlação (r^2) = 0,3110 e de *P. amapa* (r^2) = 0,8904 apresentando baixa atividade antioxidante.

Palavras-chave: Látex; Metabolitos Secundários; Microdiluição; Bactérias e Não-tóxico.

Phytochemical, microbiological, cytotoxicity and antioxidant study of latex *Brosimum parinarioides* spp. *parinarioides* Ducke (Moraceae) with the *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke (Apocinaceae)

ABSTRACT

The species of *Brosimum parinarioides* spp. *parinarioides* Ducke (amapá doce) and *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke (amapá amargo) are native to the Amazon. Their tradition comes from the use of latex for food as a nutritional fortifier in porridge, and in medicinal use for the treatment of pulmonary diseases. The objective of this research was to carry out the comparative study of phytochemical, microbiological, cytotoxicity and antioxidant potential of both species. Phytochemical screening for the presence of the main secondary metabolites present in the latex occurred by techniques of standard staining and precipitation reactions. The microbiological study was performed by determining the Minimum Inhibitory Concentration by microdilution technique in polystyrene plates. Acute phase toxicity was evaluated in *A. salina* L. using different concentrations of test products. The antioxidant potential was evaluated by the radical sequestering technique of DPPH. In the phytochemical screening, it was possible to detect in the latex of the amapá species the presence of alkaloids, with a variation of other classes of secondary metabolites. There was no antibacterial activity of the extract against the bacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella sp*, the species showed to be nontoxic, because it was not possible to determine the LC_{50} on *Artemia salina*. For the antioxidant potential, the latex *B. parinarioides* presents correlation coefficient (r^2) = 0.3110 and *P. amapa* (r^2) = 0.8904 presenting low antioxidant activity.

Keywords: Latex; Secondary Metabolites; Microdilution; Bacteria and Non-toxic.

Introdução

Os estudos científicos a respeito das espécies de *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke, conhecida popularmente como amapá-amargo, e o *Brosimum parinarioides* spp. *parinarioides* Ducke, conhecida como amapá-doce, são pouco significativa em relação a sua vasta importância para as comunidades tradicionais, no qual o seu uso podem correspondem a eficácia nutricional e o seu uso fitoterápico em doenças respiratórias e gastrointestinais (MATTIETTO et al., 2008).

As espécies de *P. amapa*, e o *B. parinarioides*, apresentam um látex que pode ser entendido como uma suspensão que se difere da seiva elaborada, pela sua origem e função, podendo variar sua composição de acordo com a espécie, são encontrados ceras, resinas, proteínas, óleos essenciais, mucilagens, amidos, sais, ácidos orgânicos, alcaloides, açúcares e taninos, componentes pertinente à caracterização farmacológica da espécie (SALLES, 2013).

A espécie *P. amapa*, pertencente à família Apocinaceae,

possue cerca de 3.700 espécies, distribuídas em 335 gêneros, a sua ocorrência é principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (SALLES, 2013). É constituída por árvores, lianas e ervas, as vezes suculentas e com aspectos de cactos, floema interno presente. As características anatômicas da Apocynaceae, permite a produção do látex de amapá, que possivelmente é local, a partir de células laticíferas não articuladas, indicando que os laticíferos se desenvolvem a partir de uma única célula, que se alonga consideravelmente, tornando o potencial laticífero restrito a uma determinada área (SILVA et al., 2010).

A espécie de *P. amapa* é uma árvore frutífera de grande ocorrência no Estado do Amapá, é popularmente conhecida como "amapa" ou "amapazeiro". Distribuída em planaltos e florestas inundadas da Amazônia, é considerada de grande porte, e pode atingir entre 40 e 50 metros de altura. Seus frutos (grandes e comestíveis) servem de alimento para espécies de macacos que habitam as copas das árvores (SILVA et al., 2016).

A espécie *B. parinarioides*, pertencente à família Moraceae,

que são compostas por árvores, arbustos, lianas ou, raramente ervas, com laticíferos e látex leitoso distribuídos em todos os tecidos parenquimatosos, presença de cristólitos, em geral globosos, muitas vezes com taninos. Pêlos simples e com paredes celulares mineralizadas. Folhas alternas, com frequência dísticas, mas em pouca ocorrência espiraladas ou opostas, geralmente simples, as vezes lobadas, inteiras a serreadas, com venação peninérvea a palmada, lâmina com base cordada ou assimétrica, estípulas geralmente presentes, pequenas à expandidas e deixando uma cicatriz circular no ramo (JUD, 2009). Inclui cerca de 50 gêneros e 1.500 espécies, apresentando distribuição predominante em clima tropical e subtropical. No Brasil ocorrem 18 gêneros e 200 espécies aproximadamente, sendo a maioria na região Amazônica (SOUZA, 2012).

O gênero *Brosimum* é um dos principais representantes da família das Moráceas, que em resultados de estudos anteriores indicam que as espécies deste gênero são ricas em proteínas, lipídeos, vitaminas e minerais, sendo que apresentam um alto teor calórico, o seu consumo é aceitável moderadamente como fonte alternativa (PALHETA et al., 2015).

O látex da espécie de *B. parinarioides* (amapá doce) apresenta um líquido branco e viscoso que segundo pesquisas apontam a presença de alcaloides, antraquinonas, derivados de cumarina, purinas, esteroides e triterpenoides. Contém cálcio, ferro, magnésio e proteínas atribuindo propriedades nutricionais (SALLES, 2013).

B. parinarioides (amapá-doce) é usado na alimentação e na medicina popular, que por apresentar um sabor doce, é ingerido substituindo o leite de vaca, e misturado juntamente com mingau, com mel de abelha, mastruz e entre outras formas, dependendo da gravidade do problema, podendo ser ingerido duas e três vezes ao dia, com o intuito de bem aproveitar o uso do leite, para inflamações, fraqueza, desnutrição, hemorroidas e diarreia (FREITAS; FERNANDES, 2006).

Para as análises das espécies de *P. amapa*, e o *B. parinarioides*, os testes fitoquímicos, os metabólitos secundários, geralmente de estrutura complexa, baixo peso molecular, possuem atividades biológicas marcantes e, diferentemente dos metabólitos primários, apresentam-se em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas (SILVA; LIMA, 2016).

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM), é um método da micro diluição acessível devido ao seu baixo custo financeiro, que tem reprodutibilidade de 30 vezes mais sensível. Pois requer pequena quantidade de amostra, e possibilita um maior número de réplicas, aumentando a confiabilidade dos resultados. As menores concentrações sem crescimento são definidas como as concentrações que inibem o crescimento de bactérias (OSTROSKY et al., 2008).

A citotoxicidade foi avaliada frente a *Artemia salina*, um microcrustáceo amplamente usado em aplicações toxicológicas e pesquisas para estabelecer a toxicidade de produtos químicos e naturais através da estimativa da concentração letal média, valor da CL_{50} como parâmetro da avaliação da atividade biológica. Dentre as vantagens deste método está a facilidade de execução, baixo custo, reprodutibilidade, rapidez, disponibilidade comercial dos ovos, a não exigência de equipamentos especiais e ainda a necessidade de pequenas quantidades da amostra-teste para a realização dos experimentos (ARAÚJO et al., 2010).

A atividade antioxidante é avaliada diante do consumo de 2,2 -difetil-1-picril-hidrazila (DPPH), um radical livre estável devido a deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula, o que confere uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 520 nm. Este teste se refere à capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina. A ação de uma determinada substância agindo como doadora de átomos de hidrogênio adicionada a uma solução de DPPH, se obtém a hidrazina, ocorrendo a mudança simultânea

na coloração de violeta a amarelo pálido (ALVES et al., 2010).

O estudo do látex das distintas espécies se apresenta em uma diversidade de características morfológicas que tendem a despertar o interesse de seus estudos para uma abordagem científica, isto é, que venha contribuir para o melhoramento e a divulgação deste produto, com o compromisso de apresentar resultados salutareos e coerentes, associando a importância do saber empírico para o saber científico. Sendo assim, o estudo do látex de *B. parinarioides* (amapá doce) e do *P. amapa* (amapá amargo) tem como objetivo realizar a comparação fitoquímica, microbiológica, citotóxica e antioxidante, tendo como referências os seus distintos efeitos apontados na literatura (SALLES, 2013).

Material e Métodos

Área de estudo

A coleta do látex das espécies de *B. parinarioides* e o *P. amapá*, ocorreu na comunidade rural de Piquiá (1°52'40.74"S e -50°58'11.52"W) no Município de Amapá à 302 km da capital Macapá.

Técnica de coleta

A coleta do látex de ambas espécies foi realizada manualmente como de costume local, realizando golpes no tronco das duas espécies, e coletando-os em garrafas de polietileno - PETI (SALLES, 2013). Em seguida foram misturados com água para manter a sua consistência e conservação, como cita Mattietto et al. (2008) que a durabilidade do leite *in natura* em temperatura de 29°C é de três dias, possibilitando assim o transporte seguro, até o armazenamento em refrigerador, onde é possível a sua conservação.

Análise Fitoquímica

A análise fitoquímica foi realizada visando à identificação dos principais metabólitos secundários presentes através das técnicas de coloração e precipitação. Com os látex de *B. parinarioides* e do *P. amapa* foram realizados os seguintes testes para: ácidos orgânicos, açúcares redutores, alcaloides, antraquinonas, catequinas, depsídeos e depsidonas, derivados de cumarina, fenóis e taninos, flavonoides, polissacarídeos, proteínas e aminoácidos, purinas, saponina espumídica, sesquiterpenolactonas e outras lactonas (SIMÕES; ALMEIDA, 2015).

Atividade antimicrobiana

O perfil de susceptibilidade das bactérias *Escherichia coli* (ATCC® 25922-MINI-PACK™), *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538-MINI-PACK™) e *Salmonella enterica* (ATCC® 14028-MINI-PACK™) frente aos extratos brutos do látex de *Brosimum parinarioides* spp. *parinarioides* e do *Parahancornia amapa* foram avaliados pelo método de microdiluição em caldo Müeller-Hinton (MHC) (Himedia® Laboratories). Todos os isolados foram cultivados em Müeller-Hinton Agar (MHA) (Himedia® Laboratories) em aerobiose a 37°C durante 24 h. Para cada isolado preparou-se um inóculo em solução salina 0,9%, ajustado para a escala 0,5 de McFarland, posteriormente diluído em MHC e testado na concentração $1,5 \times 10^7$ UFC/mL. A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) foram determinadas em conformidade com as diretrizes da Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico do Clinical Laboratory Standards Institute (NCCLS, 2013).

A determinação da CIM foi realizada através da técnica de microdiluição em placas de poliestireno (TPP/ISSO 9001/Switzerland). As placas contendo 96 poços em forma de U. Para os testes realizaram-se quatro controles para todos os microorganismos: 1) meio de cultura inoculado de bactérias, com o objetivo de avaliar o crescimento microbiano; 2) meio de cultu-

ra inoculado de bactéria crescido de DMSO 4% (v/v), como controle negativo; 3) meio de cultura sem inocular, com o objetivo de testar a eficácia da esterilização do meio e 4) meio de cultura inoculado com bactéria crescido de amoxicilina 50mg/mL, como controle positivo. A CIM foi considerada a menor concentração do extrato onde não houvesse crescimento bacteriano visível. Os experimentos foram desenvolvidos em duplicata e as placas foram incubadas por 24h a 37°C. (OSTROSKY et al., 2008).

Para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM), 10µL de cada cultura sem crescimento aparente usada na determinação da CIM foram transferidos para o MHA. A incubação, leitura e interpretação foram realizadas conforme especificado para CIM. A CBM foi determinada como a menor dose que visualmente apresentou inibição de crescimento e que na subcultura também não apresentou crescimento bacteriano (SUFFREDINI et al., 2007).

Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade frente *Artemia salina* L. foi baseado na técnica de Araújo et al., (2010). Inicialmente, foram preparados 250 mL da solução sal marinho sintético (35,5 g/L) para incubação de 25mg de ovos de *A. salina*, no qual foram expostas a luz artificial em período de 24 h para eclosão das lavas (metanúplios), em seguida os metanúplios foram separados e colocados em ambiente escuro por período de 24h para alcançarem estágio de núprios. A solução mãe foi preparada contendo 62,5 mg do látex de *B. parinarioides* spp. *parinarioides* Ducke e igualmente para o *P. amapa* (Huber) Ducke, adicionados 28 mL da solução de sal marinho sintético e 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) para facilitar a solubilização do mesmo.

Posteriormente, ao término do período em escuro os mesmos foram selecionados e divididos em 7 grupos com 10 indivíduos em cada tubo de ensaio, em cada grupo foi adicionado uma alíquota da solução mãe (3000µL a 100 µL) e completado o volume para 5 mL com solução de sal marinho sintético, obtendo-se soluções finais com de concentrações variando de 1000 µg/mL a 1 µg/mL, dessa forma os grupos foram designados de acordo com sua respectiva concentração e todos os testes foram realizados em triplicatas.

Atividade Antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante foi baseada na metodologia proposta por Sousa et al. (2007), Lopes-Lutz et al. (2008) e Andrade et al. (2012) diante do consumo de 2,2 - difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) com algumas modificações.

Foi preparada uma solução metanólica de DPPH na concentração de 40 µg.mL⁻¹. Os extratos brutos foram diluídos em metanol nas concentrações (5; 1; 0,75, 0,50; e 0,25 mg.mL⁻¹). Para a avaliação, foram adicionados em um tubo de ensaio 2,7 mL da solução estoque de DPPH, seguido da adição de 0,3 mL da solução do extrato bruto. Paralelamente, foi preparado o branco, sendo esta uma mistura de 2,7 mL de metanol e a solução metanólica dos compostos avaliados. Após 30 minutos foram realizadas leituras em espectrofotômetro (Biospectro SP-22) no comprimento de onda de 517 nm. E o resultado foi calculado pela seguinte equação:

$$(\%AA) = 100 - \left\{ \frac{(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) \cdot 100}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \right\}$$

%AA – porcentagem de atividade antioxidante
Abs_{amostra} – Absorbância da amostra
Abs_{branco} – Absorbância do branco
Abs_{controle} – Absorbância do controle

Resultados e Discussão

Análise Fitoquímica

O resultado dos testes fitoquímicos com o extrato bruto do látex de *B. parinarioides*, indicado pelas iniciais LAD (leite do

amapá doce) se apresentaram positivamente a presença de alcaloides e de derivados de cumarina. E com o extrato bruto do *P. amapa*, indicado pelas iniciais LAA (leite de amapá amargo) pode ser observado as presenças de ácidos orgânicos, alcaloides, antraquinonas, depsídeos e depsidonas, e de purinas. Apresentados na Tabela 1:

Tabela 1. Resultados fitoquímicos dos extratos bruto do látex de *B. parinarioides* (LAD) e do *P. amapa* (LAA). / **Table 1.** Phytochemical results of crude latex extracts of *B. parinarioides* and *P. amapa*.

Classes Metabólicas	LAD	LAA
Ácidos orgânicos	-	+
Açúcares redutores	-	-
Alcaloides	+	+
Antraquinonas	-	+
Catequinas	-	-
Depsídeos e depsidonas	-	+
Derivados de cumarina	+	-
Fenóis e taninos	-	-
Flavonoides	-	-
Polissacarídeos	-	-
Protéínas e aminoácidos	-	-
Purinas	-	+
Saponina espumídica	-	-
Sesquiterpenolactonas e outras lactonas	-	-

Legenda: (+) Presente; (-) Ausente

Os derivados de cumarina possuem fluorescência azul, realçada no ultravioleta, em meio alcalinizado (umbeliferona, esculetina, skimina, etc.), são sensíveis à ácidos e bases. Porém, a cumarina pura não é fluorescente (COSTA, 2000). A sua ocorrência na família Moraceae, justifica a presença deste metabólito secundário no leite de *B. parinarioides* (amapá doce), apresentando baixa toxicidade em mamíferos, eficácia fortificante, e outras inúmeras propriedades farmacológicas tendo destaque atividade anti-inflamatória e vasodilatadora (SIMÕES et al., 2007), esta última justificando o uso para problemas respiratório pelas comunidades tradicionais locais.

No extrato bruto do *P. amapa* (amapá amargo) ocorreu a presença de ácidos orgânicos, antraquinonas, depsídeos e depsidonas, e purinas.

Os ácidos orgânicos são utilizados como conservantes atuando como agente antimicrobiano e antioxidante. Na indústria alimentícia, como agentes de processamento, são adicionados para controlar a alcalinidade de produtos podendo agir como substância tampão ou ainda como agente neutralizante (HYACIENTH; ALMEIDA, 2015). Além de serem substâncias com grande utilização na indústria de alimentos, são de grande importância na indústria de cosmético, ativam os mecanismos biológicos que estimulam a renovação e o crescimento celular; potencial presente em cosméticos de rejuvenescimento facial, de espoliante da pele, onde promove sua escamação superficial (SANTOS; ALMEIDA, 2015).

As antraquinonas são uma classe de substâncias possuídas de atividade laxante. Comumente, a maioria das especialidades farmacêuticas que contém compostos antraquinônicos, com condição de laxante, consiste em associações de vários extratos vegetais, até mesmo substâncias ativas de origem não-vegetal (SIMÕES; ALMEIDA, 2015).

Os depsídeos e depsidonas integram o grupo de compostos fenólicos, e são obtidos a partir do acetyl-CoA, por este meio ocorre a produção do ácido hidroxibenzóico, que dar origem aos depsídeos que será utilizado como precursor na síntese de depsidonas. Possuem atividades antioxidante, antiviral, antitumoral, analgésico e antipirético (SANTOS; ALMEIDA, 2015).

As purinas são responsáveis pela elevação do ácido úrico no organismo humano, que devido a sua ampla presença nos alimentos ingeridos constantemente eleva o ácido úrico no sangue, causando assim, doenças renais. Além de fazerem parte das moléculas de DNA e RNA, estrutura comum aos seres vivos (GUYTON; HALL, 2011).

Os alcaloides foram os únicos metabólitos à apresentar resultado positivo para as ambas espécies de leite do amapá, possuem diversas propriedades biológicas, entre elas estão

antibacteriana, antifúngica, antiplasmódica, e antitumoral (HYACIENTH; ALMEIDA, 2015). É utilizados no tratamento de diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias e problemas renais, tem a função de repelentes de herbívoros, amebicida, emético, antimalárico, antitumoral, antitussígenos, hipoanalgésico e miorelaxante (BITENCOURT; ALMEIDA, 2014).

Os alcaloides formam um grupo heterogêneo de substâncias nitrogenadas, a maioria das vezes são de origem vegetal, onde são encontrados predominantemente na forma combinada com ácidos orgânicos, e em concentração menor, na forma livre, sendo insolúveis em meio aquoso e solúveis em solventes orgânicos como clorofórmio, éter e benzeno, na forma de sal, a solubilidade é inversa, e apresentam acentuada ação farmacológica em animais (SIMÕES et al., 2007).

A literatura aponta para a presença de alcaloides indólicos nas espécies da família Apocynaceae, com a descrição de atividade biológica, muitas plantas que possuem este metabólito são evitadas por insetos e outros animais, a sua dosagem deve ser quase sempre em dosagens purificada para o consumo humano, devido a sua toxicidade e a maioria possui um gosto amargo, características comum com a espécie de *Parahancornia amapa* conhecido popularmente de amapá amargo (SIMÕES et al., 2007). Para Santos et al. (2013), as análises histoquímicas e da espectrometria de absorção na região do ultravioleta-visível confirmam a importante participação dos alcaloides na função de defesa da espécie contra herbívoros, microrganismos e para selar ferimentos através do látex.

Na espécie de *B. parinarioides* (amapá doce), não está diretamente clara a classificação dos alcaloides, estudos seriam necessários para o isolamento destes metabólitos, apesar dos estudos afirmarem a sua presença no gênero *Brosimum*, e confirmarem a presença de alcaloides na espécie de amapá doce ressaltando a sua eficácia em doenças respiratórias (SALLES, 2013).

A confirmação através dos testes fitoquímicos da presença destes metabólitos no látex das espécies de *B. parinarioides* (amapá doce) e *P. amapa* (amapá amargo), estão de acordo com estudos anteriores, assim como a sua utilização empírica, porém são apenas evidências, afim de fornecerem informações relevantes sobre a presença de metabólitos secundários destas distintas espécies, para que assim possa chegar ao isolamento de princípios ativos importantes na produção de novos fitoterápicos (SILVA et al., 2010).

Atividade antimicrobiana

Os extratos de *B. parinarioides* (amapá doce), e o de *P. amapa* (amapá amargo) não apresentaram efeito bacteriostático. Não apresentando ação inibitória na menor concentração frente as bactérias *Escherichia coli* (ATCC[®] 25922-MINI-PACK[™]), *Staphylococcus aureus* (ATCC[®] 6538-MINI-PACK[™]) e *Salmonella enterica* (ATCC[®] 14028-MINI-PACK[™]) nas concentrações testadas. Assim como antibiótico amoxicilina usado como controle, que apresentou inibição para todas as bactérias testadas.

Estudos anteriores não comprovaram a atividade bacteriostática e bactericida do látex da espécie de *B. parinarioides* (amapá doce), para Palheta et al. (2015), concluiu que em relação à atividade biológica antioxidante e antimicrobiana está relacionado com o teor de fenóis totais, como taninos e flavonoides, sendo que a presença destes compostos bioativos nos extratos de metanol (430 µg) em equivalente ácido tânico; já no extrato hexânico, os mesmos não foram detectados.

Nas análises das cascas do caule da espécie *P. amapa* (amapá amargo), realizada por Santos (2013) com utilização das mesmas bactérias, resultou na incapacidade de inibição do crescimento microbiano, porém o autor não excluiu a possibilidade de ação do extrato como antimicrobiano, por não ser uma substância isolada e sim um extrato bruto, que é um conjunto

de diversas substâncias, incluindo metabólitos primários inativos e metabólitos secundários bioativos de *P. amapa*. Nos estudos de Henrique (2012), o extrato das cascas do *P. amapa* interferiram no crescimento da bactéria *S. aureus*. A análise das cascas do caule tem uma grande relação com o látex, uma vez que é onde estão localizadas as células laticíferas, responsáveis pela secreção do látex (SANTOS et al., 2013).

Na literatura não há registros de atividade antimicrobiana no látex das espécies de *B. parinarioides* (amapá doce), e o de *P. amapa* (amapá amargo), os estudos podem ter base nos testes fitoquímicos, que comprovam a contribuição de metabólitos que apresentam atividade antimicrobiana, como a confirmação de alcaloides. Certamente pode se inferir uma baixa concentração dos metabólitos, devido à utilização do extrato bruto e a alta concentração hídrica.

Citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade do látex de *B. parinarioides* (amapá doce), e o de *P. amapa* (amapá amargo), frente a *A. salina*, não apresentaram a ocorrência total de morte de indivíduos que pudessem atribuir um índice de risco à saúde, resultando na confirmação da sua ingestão sem riscos de toxicidade. O ensaio foi realizado em triplicata, tendo como controle positivo uma solução de DMSO, onde se observou a sobrevivência de todos os indivíduos, tornando válido o resultado, que nas demais concentrações testadas com o extrato diluído, ocorreu a conferência do número de vivas e mortas de *Artemia salina* (ARAÚJO et al., 2010).

O índice de citotoxicidade do látex de *B. parinarioides* (amapá doce) frente a *A. salina*, conforme pode ser visualizado na tabela 2, o tratamento que apresentou algum nível de toxicidade foi a de concentração 1000 µg/mL, que obteve 13,13 %, apresentadas em ordem decrescente de toxicidade.

Tabela 2. Índice de citotoxicidade do látex de *B. parinarioides* (amapá doce) frente a *A. salina*. / Table 2. Cytotoxicity index of latex of *B. parinarioides* (sweet amapá) against *A. salina*.

Concentração (µg/mL)	Índice de mortalidade (%)
1000	13,13%
750	0%
500	0%
250	0%
100	0%
50	0%

Nos resultados apresentados por Palheta et al. (2015), em relação aos ensaios de toxicidade frente *Artemia salina*, se mostrou que o extrato obtido do látex não apresentou toxicidade, pois não houve mortalidade dos microcrustáceos, indicando que o látex de *B. parinarioides*, pode ser considerado seguro na forma de uso pelas comunidades tradicionais.

O índice de citotoxicidade do látex de *P. amapa* (amapá amargo) frente a *A. salina* pode ser visualizado na Tabela 3, as substâncias que apresentaram algum nível de toxicidade que variou em todas as concentrações, de 10% à 1,6%, apresentadas em ordem decrescente de toxicidade.

Tabela 3. Índice de citotoxicidade do látex de *P. amapa* (amapá amargo) frente a *A. salina*. / Table 3. Cytotoxicity index of *P. amapa* latex (bitter amapá) against *A. salina*.

Concentração (µg/mL)	Índice de mortalidade (%)
1000	10,0%
750	5,0%
500	3,3%
250	2,5%
100	2,0%
50	1,6%

Para o látex da espécie *P. amapa* (amapá amargo), não foram encontradas referências em estudos anteriores relacionado com testes de citotoxicidade frente a *A. salina*, porém há registros de um estudo realizado por Silva et al. (2016) com as cascas do caule da mesma espécie, onde não houve toxicidade, mas se prevê possível bioatividade. Esta relação destes distintos estudos pode ser importante para se estabelecer avanços

para a investigação destas espécies, sendo que preliminarmente os resultados apontam para a ingestão moderada do látex sem danos à saúde.

Atividade Antioxidante

Os valores médios da porcentagem de atividades antioxidante (%AA) do látex das espécies *B. parinarioides* (amapá doce), e o de *P. amapa* (amapá amargo), podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4. Percentual de atividades antioxidantes. / Table 4. Percentage of antioxidant activities.

Espécies	% AA						CI ₅₀
	Concentração (mg.mL ⁻¹)						
	0,25	0,50	0,75	1	2,5	5	
<i>B. parianoideides</i>	15,74	16,40	15,84	16,78	16,63	16,86	191,21
<i>P. amapa</i>	15,80	15,87	16,56	16,22	18,62	19,48	41,61

Diante destes resultados é possível afirmar que o látex do *Brosimum parianoideides* não possui um potencial de atividade antioxidante elevado, com o coeficiente de correlação (R^2) de 0,3110. O látex de *Parahancornia amapa* também não apresentou atividade antioxidante, com o coeficiente de correlação (R^2) de 0,8904.

Para Salles (2013), o resultado negativo de atividade antioxidante do látex da espécie *B. parianoideides* descarta a possibilidade de atividade anti-inflamatória relacionada com atividade antioxidante, porém não se pode descartar a possibilidade de investigar através de outros mecanismos de ação.

Conclusão

O resultado positivo para alcaloides e de derivados de cumarina no látex da espécie de *B. parinarioides* (leite do amapá doce), e de ácidos orgânicos, alcaloides, antraquinonas, depsídeos e depsídonas, e de purinas no látex da espécie *P. amapa*, (leite de amapá amargo), comprova a sua utilização moderado no tratamento de cicatrizes e hematomas, no combate a problemas respiratórios como asma e bronquite, na utilização como fortificante, no tratamento de distúrbios gastrointestinais, anti-sífilis, entre outras.

Apesar dos resultados negativos para atividades antimicrobiana, citotóxica e antioxidante, não se descarta a possibilidade da realização de testes específicos que visem entrar em acordo com o resultado fitoquímico, que apontam para testes positivos.

Agradecimentos

Fundação Amapá de Apoio à Pesquisa (FAPEAP).

Ao Programa de Pesquisa do SUS - PPSUS - Ministério da Saúde.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) / Ministério da Educação (MEC).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ.

Ao Laboratório de Microbiologia (LEMA) sob a responsabilidade do Prof. Aldo Proietti Aparecido Júnior.

Universidade Federal do Amapá - UNIFAP. Pró-reitor de pesquisa e pós-graduação - PROPESPG.

Referências Bibliográficas

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Química Nova*, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; MALLETT, A. C. T.; MACHADO, S. M. F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. *Revista Ciência Agronômica*, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.

ARAÚJO, M. G. F.; CUNHA, W. R.; VENEZIANI, R. C. S. Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St-Hill (Solanaceae). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 31, n. 2, p. 205-209, 2010.

BITENCOURT, A. P. R.; ALMEIDA, S. S. M. S. Estudo fitoquímico, toxicológico e microbiológico das folhas de *Costus spicatus* Jacq. *Biota Amazônia*, v. 4, n. 4, p. 75-79, 2014.

COSTA, A. F. *Farmacognosia*. 3 ed. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, 2000.

FREITAS, C. F.; FERNANDES, M. E. B. Uso de plantas medicinais pela comunidade de Enfarrusca, Bragança, Pará. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Ciências Naturais*, v. 1, n. 3, p. 11-26, 2006.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Tratado de fisiologia médica*. 12ª ed. Editora Elsevier, Rio de Janeiro, 2011.

HENRIQUE, M. C. *Contribuição ao estudo químico e atividade biológica de Abuta grandifolia* (Mart.) Sandwith (Menispermaceae) e *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke (Apocynaceae). 2012. 186 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.

HYACINTH, D. C.; ALMEIDA, S. S. M.S. Estudo fitoquímico, toxicidade em *Artemia salina* Leach e atividade antibacteriana de *Pseudoxandra cuspidata* Maas. *Biota Amazônia*, v. 5, n. 4, p. 4-7, 2015.

JUD, J. M. *Sistemática vegetal: Um enfoque filogenético*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

LOPES-LUTZ, D.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; KOŁODZIEJCZYK, P. P. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*, v. 69, p. 1732-1738, 2008.

MATTIETTO, R. A.; BEZERRA, V. S.; TÁXI, C. D.; YANO, C. Y.; CORDEIRO, B. S.; TSUKUI, A. Otimização do processo de conservação do leite de amapá doce (*Brosimum parinarioides* Ducke). In: CONFERÊNCIA DO SUBPROGRAMA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - SPC&T FASE II/PPG7, 2008, Belém, PA. *Anais...* Brasília, DF: CNPq, p. 352-354, 2009.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. **NCCLS document M7-A6** [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PALHETA, R. A.; CRUZ FILHO, R. F.; CARNEIRO, A. L. B.; TEIXEIRA, M. F. S. Composição Nutricional E Controle De Qualidade Do Leite De Amapá Doce (*Brosimum Parinarioides* Ducke). *B. CEPPA*, v. 33, n. 2, p. 1-8, 2015.

SALLES, R. C. O. *Estudo químico e de atividade biológica comparativo do látex do leite de amapá extraído de duas espécies botânicas distintas*. 2013. 201 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

SANTOS, A. C. F.; DIAS, A. C. A. A.; AMARANTE, C. B.; FERREIRA, M. C. Estruturas secretoras da lâmina foliar de amapá amargo (*Parahancornia fasciculata*, Apocynaceae): histoquímica e doseamento de flavonoides. *Acta amazônica*, v. 43, n. 4, p. 407-414, 2013.

SANTOS, A. M. *Avaliação da atividade antimicrobiana e investigação do mecanismo de ação gastroprotetora do extrato metanólico das cascas do caule de Parahancornia amapa* (HUBER) (DUCKE) (APOCYNACEAE). 2013. 50 f. Dissertação (Mestrado) Fundação Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2013.

SANTOS, S. S.; ALMEIDA, S. S. M. S. Screening Fitoquímico e Avaliação da Atividade Tóxica sobre *Artemia salina* das folhas de *Vismia guianensis* (AUBL.) pers. HIPERICACEAE. *Revista de biologia e ciências da terra*, v. 15, n. 2, p. 1-8, 2015.

SILVA, A. C. O.; LIMA, R. A. Identificação das classes de metabólitos secundários no extrato etanólico dos frutos e folhas de *Eugenia uniflora* L. *REGET*, v. 20, n. 1, p. 381-388, 2016.

SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. *Scientia Plena*, v. 6, n. 2, p. 1-16, 2010.

SILVA, S. L.; NASCIMENTO, A. A.; RIBEIRO, E. F. B.; RIBEIRO, R. B.; ALVES, C. M.; SANTOS, A. M.; BURMANN, A. P. R.; MIRA NETO, R. A. Avaliação da toxicidade aguda pré-clínica do extrato metanólico das cascas do caule de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). *Acta Amazônica*, v. 46, n.1, p. 73-80, 2016.

SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELO, J. C. P. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6ª edição. Editora Universidade/UFRGS. Porto Alegre. 2007.

SIMÕES, R. C.; ALMEIDA, S. S. M. S. Estudo fitoquímico de *Bauhinia forficata* (Fabaceae). *Biota Amazônia*, v. 5, n. 1, p. 27-31, 2015.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, R. H.; VIEIRA, M. G.; AYRES, C. C. M.; COSTA, S. L. C.; ARAÚJO, S. D. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v. 30, p. 351-355, 2007

SOUZA, V. C. *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas no Brasil, baseado em APG III*. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012.

SUFFREDINI, I. B.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N. Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de três extratos vegetais antibacterianos selecionados da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica brasileiras. *Revista do Instituto de Ciências da Saúde*, v. 25, n. 2, p. 127-9, 2007.