



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

RANGGEL CARVALHO SIMÕES

PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICA, LARVICIDA E ANTIBACTERIANA
DAS CASCAS DO CAULE DE *Pseudoxandra cuspidata* Maas
(ANNONACEAE)

Macapá
2016

RANGGEL CARVALHO SIMÕES

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICA, LARVICIDA E ANTIBACTERIANA
DAS CASCAS DO CAULE DE *Pseudoxandra cuspidata* Maas
(ANNONACEAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - PPGCF da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, como requisito final para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Biologia Farmacêutica

Orientadora: Profa. Dra. Sheylla Susan
Moreira da Silva de Almeida.

**Macapá
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

615.537

S593p Simões, Rangel Carvalho.

Prospecção fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante, citotóxica, larvicida e antibacteriana das cascas do caule de *Pseudoxandra cuspidata* Maas (Annonaceae) / Rangel Carvalho Simões; orientador, Sheylla Susan Moreira da Silva de Almeida. – Macapá, 2016.

91 f.

Dissertação (mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Plantas medicinais. 2. Fitoquímica. 3. *Pseudoxandra cuspidata*. I. Almeida, Sheylla Susan Moreira da Silva de, orientador. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

RANGGEL CARVALHO SIMÕES

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICA, LARVICIDA E ANTIBACTERIANA
DAS CASCAS DO CAULE DE *Pseudoxandra cuspidata* Maas
(ANNONACEAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Data da Avaliação:

BANCA AVALIADORA:

Sheylla Susan Moreira da Silva de Almeida

Profa. Dra. Sheylla Susan Moreira da Silva de Almeida
(PPGCF-UNIFAP/Presidente)

Elizabeth Viana Moraes da Costa

Prof. Dra. Elizabeth Viana Moraes da Costa
(UNIFAP/Membro Titular)

Mayara Tânia Pinheiro

Prof. Dra. Mayara Tânia Pinheiro
(UNIFAP/Membro Titular)

**Macapá
2016**

Dedico essa conquista à Deus, aos meus familiares, à Mirely Gabriely da Silva Medeiros e in memoriam a Antônio Gomes dos Santos

AGRADECIMENTOS

Mais que um aprendizado, essa jornada acadêmica faz-se notar a importância das pessoas que estão a sua volta, influenciando diariamente nas suas atividades, pesquisas e discussões, meus sinceros agradecimentos:

À Deus por me guiar a cada passo rumo ao meu sonho, nunca me faltando amor, alegria, afeto e sabedoria. “Em seu coração o homem planeja o seu caminho, mas o Senhor determina os seus passos” (Provérbios 16:9).

A Universidade Federal do Amapá e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela estrutura física ofertada, professores qualificados e pela oportunidade de desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço também o CAPES pela bolsa de demanda social que forneceu todo subsídio financeiro para que pudesse me dedicar de forma exclusiva ao programa;

À minha orientadora, Profa. Dra. Sheylla Susan de Almeida, que sempre acreditou no meu potencial como aluno, da graduação ao mestrado. Alguém que guardo carinho, respeito e profunda admiração.

Aos professores Raimundo Nonato Souto, Ledayane Barbosa, Ricardo Ferreira e técnico Rodrigo pela disponibilidade e aprendizagem no laboratório de Artropologia.

Aos professores Francisco Fábio Oliveira de Sousa, Aldo Proietti Junior e Mayara Amoras Teles Fujishima pela disponibilidade dos laboratórios e dos materiais para a realização dos experimentos. Agradeço também as técnicas Luciana e Franczy pela ajuda e transmissão dos conhecimentos práticos.

Aos colegas de turma do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelos diálogos, discussões e enriquecimento de pesquisa durante o período em sala de aula.

Aos companheiros de Laboratório de Farmacognosia e Fitoquímica Alex Bruno Lobato, Ana Luzia Farias, Erica Rabelo, Ryan Ramos e Rosany Lopes Martins, mais que amigos, irmãos que terão um futuro brilhante.

Agradeço a minha família: Lucinete Tavares de Carvalho, Izadora Carvalho Guimarães, Hara de Carvalho dos Santos, Luma Tavares de Carvalho e Antonio Miguel Santos dos Santos pelo amor, paciência, alegria de cada dia e pela força para chegar até a conclusão dessa etapa.

“Nós somos feitos de poeira das estrelas”
(CARL SAGAN)

RESUMO

As plantas medicinais da Amazônia brasileira são uma alternativa importante do ponto de vista econômico e social, a exploração de seus recursos de forma sustentável corrobora com a atribuição valor e ratifica a importância de sua preservação e conservação. Dentre as plantas medicinais amazônicas está a *Pseudoxandra cuspidata* Maas (1983), pertencente à família Annonaceae, conhecida popularmente como “lamuci”, “envira”, “amarela”, “envira preta”, envireira da folha miúda”; usada como remédio antimalárico, anti-inflamatório e antifúngico, estimulando a avaliação do seu potencial. O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de grupos orgânicos, avaliar potencial antioxidante, citotóxico, larvicida e antibacteriano dos extratos concentrados das cascas do caule de *Pseudoxandra cuspidata* Maas. Na prospecção fitoquímica o extrato aquoso-ácido apresentou resposta positiva para alcaloides e ácidos orgânicos; o extrato bruto etanólico exibiu através do teste a presença de alcaloides, açúcares redutores, fenóis totais, glicosídeos cardíacos, catequinas e antraquinonas. Sobre a atividade antioxidante frente ao radical DPPH, o extrato bruto etanólico apresentou capacidade antioxidante de 95,32% e concentração inibitória de 50% em 326,85 µg/ml, corroborando com a presença de determinados grupos orgânicos positivados na prospecção fitoquímica com ação antioxidante, enquanto que o extrato aquoso ácido apresentou capacidade antioxidante de 64%, com concentração Inibitória em 50% de 53,14 mg/mL, ambos devem ser submetidos a outras metodologias para a definição desse potencial. Sobre a análise citotóxica com *Artemia salina* (Salmoura camarão) o extrato bruto etanólico apresentou concentração letal em 50% em 1191,12 µg/mL; o extrato aquoso ácido demonstrou uma concentração letal em 50% em 667,99 µg/mL, ambos os resultados classificam os extratos como de baixa toxicidade à atóxico. Em relação larvicida contra *A. aegypti*, a concentração letal em 50% do extrato bruto etanólico para 24 horas foi de 436,72 ppm e para 48 horas foi de 305,288 ppm; o extrato aquoso ácido apresentou concentração letal em 50% após 24 horas de 450,41 ppm e após 48 horas de 322,92 ppm, caracterizando ambos os extratos contendo ação larvicida efetiva. A atividade Antimicrobiana foi avaliada através da concentração inibitória mínima e da concentração bactericida mínima dos extratos contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Em relação ao *S. aureus*, o extrato bruto etanólico apresentou diferença significativa em relação ao crescimento bacteriano ao controle negativo na concentração mínima de 6,25 mg/mL e na concentração de 100 mg/mL não observou-se crescimento bacteriano, sendo essa concentração estabelecida como bactericida. O extrato aquoso ácido apresentou diferença significativa quanto à inibição do crescimento bacteriano na concentração de 6,25 mg/mL e não apresentou atividade bactericida contra esse microrganismo. Em relação a *P. aeruginosa* o extrato bruto etanólico apresentou inibição com diferença significativa na concentração de 1,562 mg/mL e ação bactericida contra a cepa em 100 mg/mL. O extrato aquoso ácido inibiu significativamente o crescimento em 3,125 mg/mL e ação bactericida na concentração de 100 mg/mL. Essa pesquisa abriu perspectivas quanto ao uso da *P. cuspidata* para atividades biológicas diferentes das alegadas pelo conhecimento tradicional, devendo em estudos posteriores ser feita análise qualitativa e quantitativa dos componentes desses extratos concentrados e buscar outros potenciais associados aos experimentos realizados nessa pesquisa.

Palavras-chave: *Pseudoxandra cuspidata*, Antioxidantes, Toxicidade, Inseticida, Antibacterianos.

ABSTRACT

The medicinal plants of the Brazilian Amazon are an important alternative of point view social and economic, the exploitation of resources on sustainably corroborates with value assignment and justifies its preservation and conservation. Among the Amazonian medicinal plants is *Pseudoxandra cuspidata* Maas (1983), belonging to the Annonaceae family, popularly known as “lamuci”, “envira”, “yellow”, “black envira”, “envira lamuci”, “littleleaf envireira”; its decoction is used for antimalarial treatment, anti-inflammatory and antifungal, stimulating evaluation of potential this specie. The objective of this study was to evaluate the presence of organic groups, assess potential antioxidant, cytotoxic, larvicide and antibacterial of concentrated extracts of the stem bark of *Pseudoxandra cuspidata* Maas (Annonaceae). In result of phytochemical prospection the aqueous acid extract demonstrated positive response to alkaloids and organic acids; the crude ethanol extract exhibited positivity for the presence of alkaloids, reducing sugars, total phenols, cardiac glycosides, catechins and anthraquinones. For the antioxidant activity against the DPPH radical, the crude ethanol extract demonstrated antioxidant capacity of 95.32% and inhibitory concentration in 50% of 326.85 µg/mL, confirming the presence of certain organic groups positivized in screening phytochemical with antioxidant action, while the aqueous-acid extract showed antioxidant capacity of 64%, with inhibitory concentration in 50% of 53,14 mg/mL against radical DPPH, the ethanol extract presented higher antioxidant activity; both must be submitted to other methodologies to define this potential. About the toxicity bioassay in *Artemia salina* (Brine Shrimp), the extract ethanolic crude demonstrated lethal concentration in 50% of 1191,12 µg/mL, while for extract aqueous-acid showed lethal concentration in 50% of 667.99 µg/mL, equivalent low toxicity low or not toxic. Regarding the biocide effect on larvae of *Aedes aegypti*, the results are expressed in lethal concentration in 50%, time 24 and 48 hours; the extract ethanolic crude exhibited 436,72 ppm for 24 hours and 305,288 ppm for 48 hours; the extract aqueous-acid showed 450,41 ppm in 24 hours and 322,92 ppm for 48 hours, thus both considered effective. The antimicrobial activity were featured by two parameters: the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration tested strains in microorganisms *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, a statistically significant difference was measured between the negative control and concentrations tested, to determine whether there was inhibition of growth. For *S. aureus*, the extract ethanolic crude demonstrate inhibitory concentration in 6.25 mg/mL and bactericidal concentration in 100 mg/mL; The extract aqueous-acid exhibited minimum inhibition in 6.25 mg/mL and not presented bactericidal action for that microorganism. Regarding for *P. aeruginosa* the extract ethanolic demonstrate minimum inhibition in 1.562 mg/mL and bactericide action in 100 mg/mL; for the extract aqueous acid the concentration 3.125 mg/mL it was the lowest and presented bactericide action in 100 mg/mL. This research opened perspectives for the use of *P. cuspidata* for other biological activities and should be made in future studies qualitative and quantitative analysis of the components of these extracts in addition to the search for other potential that it may present.

Keywords: *Pseudoxandra cuspidata*, Antioxidants, toxicity, Insecticides, Anti-Bacterial Agents.

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
[]	Concentração
ATCC	American Type Culture Collection
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CL _{50%}	Concentração Letal para a morte de 50% dos indivíduos
cm	Centímetro
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
EAA	Extrato Aquoso Ácido
EBC	Extrato Bruto Concentrado
EBE	Extrato Bruto Etanólico
g	Grama
H ₃ PO ₄	Ácido Fosfórico
HCl	Ácido Clorídrico
x	Contra
mg	Miligrama
MHA	Ágar Mueller-Hinton
MHB	Miller-Hinton Bronth
mL	Militro
nm	Nanometro
PNPIC	Plano Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
°C	Grau Celsius
°GL	Grau Gay-Lussac
ppm	Parte por milhão
SNC	Sistema Nervoso Central
SPSS	Statistical Package for Social Science
UFC/mL	Unidade Formadora de Colónia por mililitro
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)
λ	Comprimento de onda

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Biossíntese dos metabólitos secundários.....	18
Figura 2 - Ciclo de vida do <i>A. aegypti</i>	25
Figura 3 – Cloridrato de Berberina.....	31
Figura 4 – Curva Analítica de DPPH (“spline”)	40
Figura 5 - Relação entre as concentrações testadas e capacidade antioxidante (%) do EBE de <i>P. cuspidata</i> pelo método de regressão linear.....	42
Figura 6 - Relação da mortalidade (%) em probit x concentrações do EBE em 24 horas	43
Figura 7 – Taxa de mortalidade (%) em 48 horas x concentrações do EBE.....	44
Figura 8 – % Mortalidade (in Probit) do EBE frente <i>A. salina</i>	53
Figura 9 – Teste de sensibilidade (CIM) do EBE da <i>P. cuspidata</i> contra <i>P. aeruginosa</i>	54
Figura 10 – Teste de sensibilidade (CIM) do EBE da <i>P. cuspidata</i> contra o <i>S. aureus</i>	55
Figura 11 –CBM do EBE frente as bactérias <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i>	56
Figura 12 – Resposta em Probit da mortalidade (%) do EAA frente <i>A. salina</i>	67
Figura 13 – Resultados da mortalidade em Regressão Probit frente <i>A. aegypti</i> após de 24 horas	68
Figura 14 - Resultados da mortalidade em Regressão Probit frente <i>A. aegypti</i> após de 48 horas	69
Figura 15 - EAA da <i>P. cuspidata</i> no teste de sensibilidade contra <i>S. aureus</i>	70
Figura 16 - EAA da <i>P. cuspidata</i> no teste de sensibilidade contra <i>P. aeruginosa</i>	70
Figura 17 – Teste CBM para EAA de <i>P. cuspidata</i> em <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i>	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média e desvio padrão do percentual de atividade antioxidante do extrato bruto etanólico de <i>Pseudoxandra cuspidata</i>	41
Tabela 2 – Média e desvio padrão do percentual de atividade antioxidante de soluções de menor concentração do extrato bruto etanoico de <i>Pseudoxandra cuspidata</i>	41
Tabela 3 - Relação da mortalidade e concentrações no período de 24 e 48 horas do EBE da <i>P. cuspidata</i>	43
Tabela 4 - Prospecção Fitoquímica do Extrato Bruto Etanólico de <i>Pseudoxandra cuspidata</i>	51
Tabela 5 - Prospecção Fitoquímica do Extrato Aquoso-ácido de <i>Pseudoxandra cuspidata</i>	65
Tabela 6 - Capacidade Antioxidante do EAA (alcaloides totais) de <i>Pseudoxandra cuspidata</i>	66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
3 REFERÊNCIAL TEÓRICO	16
3.1 PLANTAS MEDICINAIS	16
3.2 METABOLISMO VEGETAL	17
3.3 ESPÉCIE <i>Pseudoxandra cuspidata</i> Maas (1983)	20
3.4 POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE PLANTAS MEDICINAIS	22
3.5 ATIVIDADE LARVICIDA E <i>A. aegypti</i>	23
3.6 ENSAIO TOXICOLÓGICO E PLANTAS MEDICINAIS	29
3.7 PLANTAS MEDICINAIS E AÇÃO ANTIMICROBIANA	30
4 CAPÍTULO 1 ANÁLISE FITOQUÍMICA, POTENCIAL ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICO, LARVICIDA E ANTIMICROBIANO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DAS CASCAS DO CAULE DE <i>Pseudoxandra cuspidata</i> Maas.....	35
Article 1: Larvicide and antioxidant activity of the ethanol crude extract from the stem bark of <i>Pseudoxandra cuspidata</i> (ANNONACEAE).....	36
1 INTRODUCTION	37
2 EXPERIMENTAL SECTION	38
2.1 Plant Material.....	38
2.2 Sample preparation and obtaining the EBE.....	38
2.3 Evaluation of antioxidant activity of EBE against the kidnapping of free radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH).....	38
2.4 Larvicidal activity of EBE front of larvae in the L3 stage of <i>Aedes aegypti</i>.....	39
3 RESULTS AND DISCUSSION	40
3.1 Antioxidant activity of EBE from <i>P. cuspidata</i>.....	40
3.2 Larvicidal Activity of crude ethanoic extract <i>P. cuspidata</i>	42
4 CONCLUSION.....	45
REFERENCES.....	46
Article 2: Phytochemistry Prospection, Cytotoxic and Antimicrobial Activity of Ethanol Crude Extract of the <i>Pseudoxandra cuspidata</i> (ANNOACEAE).....	47
1 INTRODUCTION	48
2 MATERIAL AND METHODS	49

2.1 Phytochemistry Prospection	49
2.2 Cytotoxicity in <i>A. salina</i>	50
2.3 Antimicrobial activity	50
3 RESULTS AND DISCUSSION	51
4 CONCLUSION	56
REFERENCES	57
5 CAPÍTULO 2 ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE, LARVICIDA E ANTIMICROBIANO DO EXTRATO AQUOSO ÁCIDO de <i>Pseudoxandra cuspidata</i>	61
Article: Antioxidant, cytotoxic and larvicidal potential and antimicrobial activity of the watery-acid of <i>Pseudoxandra cuspidata</i> Extract (ANNONACEAE)	62
1. INTRODUCTION	63
2 INVESTIGATIONS AND RESULTS	64
2.1 Biotoxicological Assay in <i>Artemia salina</i>	66
2.2 Larvicide Activity of EAA <i>P. cuspidata</i>	67
2.3 Antimicrobial Activity of EAA <i>P. cuspidata</i>	69
3. DISCUSSION	71
4 CONCLUSION	72
5. EXPERIMENTAL	73
5.1 Components of experiments	73
5.2 Study Object	74
5.3 Methods Used for experiments	74
5.4 Statistical Methods	76
REFERENCES	77
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
REFERÊNCIAS	81
ANEXO	92

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a conservação, uso racional e proteção da natureza são grandes desafios mundiais, especialmente para países tropicais, detentores de considerável biodiversidade de espécies animais e vegetais. Dentre esses países encontra-se o Brasil, conhecido por sua megabiodiversidade, com foco em sua floresta amazônica. A riqueza natural Amazônica abriga expressivo conjunto de povos indígenas e populações tradicionais que ao longo do tempo aprenderam a conviver com ambientes diversificados (LIMA; FERREIRA-COELHO; SANTOS, 2014; VÁSQUEZ; MENDONÇA; NODA, 2014).

A Amazônia brasileira possui dentre suas riquezas naturais plantas medicinais ainda não estudadas ou pouco estudadas. As plantas medicinais são capazes de biossintetizar metabólitos secundários, que desempenham funções variadas como: proteção contra predadores, atratores voláteis (aromatizantes), fornecem coloração a determinada parte da planta: frutos ou flores (facilitando a polinização), dentre outras funções ao vegetal. Os metabólitos secundários caracterizam plantas que possuem capacidade de adaptação e propagação; exemplos de metabólitos secundários: alcaloides, terpenos, flavonoides, cumarinas, ácidos orgânicos, saponinas espumídicas, fenóis simples, taninos, entre outros (SILVA, 2010; SILVA et al., 2014). Há uma vastidão de atividades biológicas descritas para estas classes de metabólitos secundários como: ação antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana, antiparasitária, antiviral, entre outras (BESSA et al., 2013). Destacam-se nesse grupo os alcaloides (do árabe: “*alquali*”), que possuem atividade biológica relacionada à sua afinidade pelo sistema nervoso central, como atividade anti-inflamatória, diurética, anticolinérgico, anti-hipertensivo, estimulante e outras ainda não exploradas (SIMÕES et al., 2010), em estudos anteriores foi relatada a presença de alcaloides na espécie *Pseudoxandra cuspidata* (ROUMY, 2007).

A espécie *Pseudoxandra cuspidata* Maas (1983) é conhecida popularmente como lamuci, envira, amarela, envira preta, envira lamuci, envireira da folha miúda, é uma árvore de 5 a 25 m de altura, 5 a 20 cm de diâmetro, encontrada em florestas com baixa altitude, com floração em maio e outubro e frutificação de abril à maio e de agosto à dezembro. Referida pelo conhecimento empírico (tribos indígenas e ribeirinhos) contendo atividade anti-inflamatória, antifúngica e antimalárica (MAAS e WESTRA, 2003; ROUMY, 2007; TRIGO et al. 2007).

As espécies vegetais que possuem em sua constituição substâncias com potencial antioxidante são cada vez mais estudadas (NASCIMENTO et al., 2011; PEREIRA e

CARDOSO, 2012; SÁ et al., 2012; ARAKAKI, 2015). Substâncias antioxidantes podem proteger o organismo de danos causados pelos radicais livres, ou seja, previnem ou adiam o início de inúmeras doenças, como cardiopatias, doenças crônicas, neoplasias, entre outras (COSTA et al., 2012; DUNDARÓZ et al., 2013; JANÍQUES et al. 2014; ONDEI; TERESA; BONINI-DOMINGOS, 2014). Não há relatos sobre a ação antioxidante ou estudo do potencial antioxidante da espécie vegetal *P. cuspidata*.

As plantas medicinais possuem substâncias com potencial inseticida, biocida ou larvicida (formas intermediárias) que podem ser utilizados para o controle de populações *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L.), em especial a população resistente; plantas que apresentem essa atividade biológica em diferentes fases do desenvolvimento do vetor possuem maior potencial e podem ser utilizadas como base de um novo produto (extrato) ou de forma isolada, como a *P. cuspidata* (TORRES et al. 2014; MATOS et., 2014; GUARDA et al., 2016).

O método biotóxico utilizando *Artemia salina* é utilizado de forma preliminar na análise de produtos naturais. A partir do mesmo é possível a determinação da concentração letal 50% (CL_{50%}) de componentes ativos de extratos vegetais em um meio salino. Esse organismo pode ser utilizado como um controle para a citotoxicidade de produtos naturais, como na utilização da *P. cuspidata* em forma de chá ou produto medicinal (PEREIRA et al., 2015).

No quadro atual de resistência bacteriana a medicamentos antimicrobianos cria-se um ambiente de busca contínua de produtos com esse potencial. A crescente resistência bacteriana aos fármacos sintéticos gera elevada taxa de morbi-mortalidade e respondem pela maior parte das infecções nosocomiais (PALUMBO et al., 2015). Esses fatores estão relacionados adaptabilidade intrínseca de cada microrganismo bem como o uso indiscriminado dos fármacos antimicrobianos (BOSCARIOL, 2013). Justificando-se a busca do potencial antimicrobiano da *P. cuspidata*.

A partir desses pressupostos, este estudo possui como objetivo a prospecção fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante, citotóxica, larvicida e antibacteriana de extratos brutos concentrados oriundos das cascas do caule de *Pseudoxandra cuspidata* Maas (Annonaceae). Observa-se uma escassez de informações químicas, biológicas e farmacológicas associadas à espécie vegetal *Pseudoxandra cuspidata*. Estudos podem incentivar a utilização da espécie e de outras plantas medicinais da biodiversidade vegetal da floresta amazônica, tornando-se uma alternativa para países em desenvolvimento, como o Brasil. Sem contar com a possível extinção de espécies vegetais da Amazônia devido a mudanças climáticas e pela falta de condições biológicas (FONSECA e CUNHA, 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar prospecção fitoquímica e avaliar o potencial antioxidante, citotóxico, larvicida e antibacteriano dos extratos concentrados de *Pseudoxandra cuspidata* Maas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter os extratos brutos etanólico (EBE) e aquoso-ácido (EAA – Fração de Alcaloides Totais);
- Obter resposta a quais grupos orgânicos presentes nos extratos através de prospecção fitoquímica;
- Avaliar potencial antioxidante dos EBE e EAA frente ao sequestro do radical DDPH;
- Avaliar toxicidade em meio salino com *A. salina* dos EBE e EAA e determinar CL_{50%} para cada extrato;
- Avaliar atividade larvicida do EBE e EAA em relação a cepas de larvas de *A. aegypti* e determinar CL_{50%} em 24 e 48 horas para cada extrato.
- Avaliar atividade antibacteriana frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) determinando Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PLANTAS MEDICINAIS

O homem tem atrelado a sua origem a busca por recursos naturais que possam melhorar suas condições de sobrevivência, como o uso de plantas medicinais. Em torno de 15 mil espécies vegetais possuem reconhecimento sobre suas potencialidades e são comercializadas como fitoterápicos, fármacos ou como fonte de novos fármacos (BENTO et al., 2016). O estudo de plantas medicinais está caracterizado como um estudo etnobotânico onde se faz uma relação entre o conhecimento científico e o conhecimento tradicional, e pode resultar numa abordagem que leve ao uso sustentável das espécies vegetais, beneficiamento e até criando uma nova alternativa econômica (SILVA et al.; 2015). As potencialidades ligadas à utilização terapêutica de determinadas espécies vegetais possui vínculo com o repassar da informação entre gerações (BOSCOLO, 2013).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80 % da população de países em desenvolvimento, devido ao alto custo ou ao difícil acesso a medicina moderna, dependem essencialmente de plantas para os primeiros cuidados da saúde. Entretanto, menos de 10% das plantas medicinais utilizadas possuem estudos científicos para a validação de sua qualidade, segurança e eficácia. No Brasil pesquisas demonstram que mais de 90% da população já fez uso de alguma planta medicinal (CORRÊA e ALVES, 2008). Em países desenvolvidos como Canadá, França, Alemanha e Itália, o uso de produtos da medicina tradicional é igualmente significativo ao de substâncias sintéticas, onde 70% a 90% de sua população utilizam esses recursos da medicina tradicional sob as denominações: complementar, alternativa ou não convencional (RODRIGUES, 2016).

No Brasil, mais de 350 mil espécies de plantas foram identificadas e cerca de 10 mil possuem alguma propriedade medicinal conhecida, ratificando a necessidade de investimento em pesquisas nessa área (BENTO et al., 2016). A megabiodiversidade vegetal brasileira contribuiu para que a utilização das plantas medicinais seja considerada uma área estratégica para o país, pois contém em torno de 23% das espécies vegetais existentes em todo o planeta (CORRÊA e ALVES, 2008).

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada nº 26 de 2014, planta medicinal é a espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos, ou seja, planta que possui atividade biológica, com constituintes fitoquímicos potencialmente úteis à saúde.

Enquanto que fitoterapia pode ser definida como a prática de utilizar medicamentos, suplementos e chás a base destas plantas medicinais (BRASIL, 2014).

Os tratamentos medicinais de origem vegetal são amplamente utilizados no Brasil como prática integrativa terapêutica (PNPIC), principalmente em tratamento de doenças crônicas e fazendo associações com outros medicamentos. Embora existam vários estudos a respeito do uso, da toxicidade e da eficácia das plantas medicinais, há poucos dados em literatura, devendo haver uma capacitação dos profissionais para o melhor desenvolvimento desta atividade integrativa do SUS (SANTOS et al., 2011).

Como medida de incentivo ao uso e produção de plantas medicinais, há o Plano Nacional de Plantas Medicinais; possui como objetivo a ampliação das opções terapêuticas e melhoria da atenção à saúde aos usuários do SUS, uso sustentável da biodiversidade brasileira, a valorização e preservação do conhecimento tradicional das comunidades e povos tradicionais, fortalecimento da agricultura familiar, crescimento com geração de emprego e renda, redutor das desigualdades regionais, desenvolvimento tecnológico e industrial, inclusão social e redução das desigualdades sociais e participação popular e controle social (BRASIL, 2007).

A relação nacional de plantas medicinais de interesse do SUS (RENISUS) foi criada com a finalidade da lista 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 determinada doença. Atualmente, são oferecidos fitoterápicos derivados de espinheira santa, para gastrites e úlceras, e de guaco, para tosses e gripes. Foram selecionadas espécies vegetais com potencial de avançar nas etapas da cadeia produtiva e de gerar produtos de interesse ao SUS e ao Ministério da Saúde. Logo estudos promissores com determinada espécie vegetal pode levar a inclusão da mesma na lista (SANTOS et al., 2011).

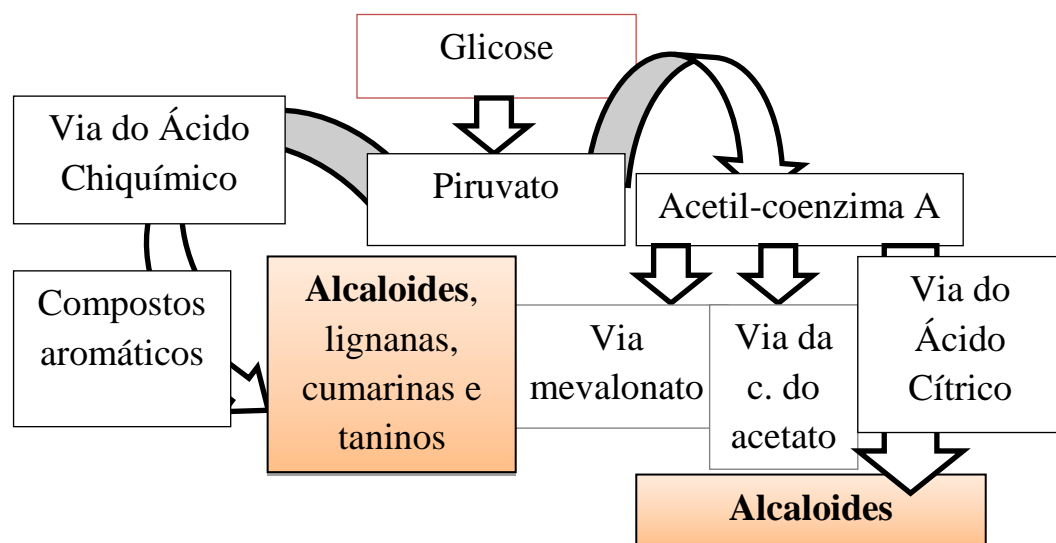
3.2 METABOLISMO VEGETAL

O metabolismo é o conjunto das reações químicas que ocorrem num organismo vivo com o fim de promover a satisfação de necessidades estruturais e energéticas. Os carboidratos, gorduras e proteínas são produtos de alto conteúdo energético ingerido pelos animais, para os quais constituem a única fonte energética e de compostos químicos para a construção de células. Estes compostos seguem rotas metabólicas diferentes, que têm como finalidade produzir compostos finais específicos e essenciais para a vida (BIESEK; ALVES, GUERRA, 2015).

O metabolismo vegetal dependente dos processos fotossintéticos, a partir deles obtém-se as substâncias do metabolismo primário, e os metabólitos secundários são derivados dessas substâncias. As reações de fotossíntese podem ser agrupadas em: fase luminosa (Reação de Hill) e fase bioquímica (Reação de Calvin). Na fase luminosa a energia solar é absorvida por moléculas de clorofila e transferida destas para moléculas armazenadoras de energia (adenosina trifosfato - ATP e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato - NADPH). Na fase seguinte, bioquímica ou “escura”, a molécula de ATP serve como fonte de energia e a molécula de NADPH serve como força redutora no processo de fixação do dióxido de carbono (CO₂), o qual é convertido principalmente em glicose (OOTANI et al., 2013).

O metabolismo da glicose é o principal para a formação de praticamente todos os metabólitos primários e secundários. A glicose convertida em ácido pirúvico segue por duas vias distintas. Na primeira via, o piruvato entra na via do ácido chiquímico para formação dos metabólitos secundários aromáticos (alcaloides indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos, ligninas e lignanas, cumarinas e taninos hidrossolúveis) (SIMÕES, 2010). Na segunda via, o piruvato é oxidado até a formação de moléculas de acetil-coenzima A (acetil-coA), que podem seguir três vias diferentes: via do ácido cítrico, via do mevalonato e a via da condensação do acetato. Sendo que na via do ciclo do ácido cítrico, serão formados os alcalóides pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piperidínicos e quinolizidínicos (BASER e BUCHBAUER, 2012; OOTANI et al., 2013), biossíntese ilustrada na Figura 1.

Figura 1 – Biossíntese dos metabólitos secundários



Fonte: OOTANI et al., 2013.

3.2.1 Metabólitos secundários

Os metabólitos secundários ou produtos naturais oriundos de plantas medicinais são um grupo diversificado compostos envolvidos na adaptação das plantas e seu ambiente, porém não participam dos caminhos bioquímicos primários de crescimento e de reprodução celular (metabolismo primário). Fatores antinutricionais e xenobióticos são essências em relação aos metabólitos secundários de plantas superiores (BASER e BUCHBAUER, 2012). São mais de 24.000 estruturas, incluindo compostos antinutricionais e tóxicos, não incluindo compostos polifenólicos oligoméricas, como a pro-antocianidinas, etaninos, hidrolisáveis, que estão em processo de determinação e aumentaram o número para milhares (BASER e BUCHBAUER, 2012). Dentre os produtos naturais encontrados em plantas medicinais estão inibidores da protease, lecitinas, alcaloides, aminoácidos não proteínas, glicosídeos, cianogênicos, saponinas e taninos. Essas substâncias estão envolvidas na defesa do vegetal contra herbívoros e patógenos, manutenção da simbiose, influência sobre a germinação de sementes, inibição de espécies de plantas (alelopatia) e são integrantes das interações de espécies vegetais superiores em comunidades vegetais e animais, e demonstram a adaptação das plantas ao seu ambiente (OOTANI, 2013).

3.2.1.1 Biossíntese de metabólitos secundários

Os eventos relativos à produção de metabólitos secundários estão relacionados à especificidade com que cada planta produz seus metabólitos, como as condições, se favoráveis ou não, a características do solo, temperatura, incidência de luz solar, humidade e proximidade ao lençol freático, rios, lagos, mar, características edafoclimáticas.

3.2.1.2 Alcaloides

Um grupo especial de metabólitos secundários é dos alcaloides, extratos de plantas medicinais contendo alcaloides são utilizados como medicamentos, venenos e poções mágicas desde o desenvolver do intelecto humano. Dessa forma torna-se difícil determinar a origem correta da descoberta destas substâncias (ALMEIDA et al., 2009). Há registros de uso de ópio a mais de 4000 a.C. devido sua atividade saporífica e analgésica.

O pai da química de alcaloides, o farmacêutico alemão Friedrich Wilhelm Sertürner (1783-1841) isolou a morfina, como antes isolada por Armand Séquin, e a experimentou em seu cão, demonstrando as propriedades narcóticas desse alcaloide. Culturas

americanas, Asteca, Maya, Inca, Olmeca e Tolteca apresentaram a civilização a quina, a ipecacuanha, coca e outras drogas com princípios ativos alcaloides (ALMEIDA et al., 2009).

A palavra alcaloide deriva do árabe: “*alquali*” (básico, alcalino) e “oide” (semelhante a), são substâncias orgânicas nitrogenadas com características básicas, podem ser encontrados principalmente em vegetais, porém já foi relatada a presença em fungos, bactérias, artrópodes, etc.; além disso, podem ser obtidos por síntese. Amplamente utilizados na indústria farmacêutica, por ser uma fonte de princípio ativo, sendo considerado um dos grupos orgânicos de ocorrência vegetal de maior importância no ponto de vista econômico-social (LIMA, 2016).

Esse grupo de metabólitos secundários possui sua atividade biológica atrelada a sua relação com o sistema nervoso central, como atividades anti-inflamatória, diurética, anticolinérgica, anti-hipertensiva, ação anestésica, neurodepressora, analgésica, psicoestimulante, antimicrobiana, relaxante muscular, entre outras atividades farmacológicas (SIMÕES, 2010; LIMA, 2016).

3.3 ESPÉCIE *Pseudoxandra cuspidata* Maas (1983)

Segundo a Classificação filogenética das Angiospermas (2009) a espécie vegetal *Pseudoxandra cuspidata* pertence ao reino Plantae, divisão ou filo Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Magnoliales, família Annonaceae e gênero *Pseudoxandra*.

O filo Magnoliophyta ou Angiospermas, os vegetais pertencentes são caracterizados pela presença de óvulos fechados numa cavidade oclusa formatada por um ou vários carpelos separados ou unidos. Os grãos de pólen são depositados não diretamente sobre micrópilo do óvulo, mas sobre a superfície do estigma, que é capaz, não só de receber o pólen, mas também de auxiliar no desenvolvimento do tubo de pólen; Os gametófitos femininos e masculinos são desprovidos de gametangia (anterídio e archegonia), são extremamente simplificados e especializados; nesses vegetais ocorre a fusão tripla: um dos dois gametas masculinos funde-se com a célula do ovo, E o outro fica com dois núcleos polares livres ou já fundidos da célula central do gametófito; como resultado da fusão tripla um zigoto diploide e núcleo primário triploides do endosperma são formados; a fusão tripla é uma característica da magnoliófitas, tornando-as distintas dos outros vegetais (TAKHTAJAN, 2009).

A classe Magnoliopsida também denominada de Dicotiledônia ou Eudicotiledônea possui como características que a definem plantas com flor cujo embrião

(semente) contém dois ou mais cotilédones, uma raiz axial, folhas com nervação reticulada, partes florais que podem ser pentâmeras, tetrâmeras, trímeras ou monômeras (APG, 2003).

A ordem Magnoliales se estende por cerca de 20 famílias e 5.600 espécies. As famílias desta ordem são: Winteraceae, Magnoliaceae, Annonaceae, Monimiaceae, Cannellaceae, Myristicaceae, Hernandiaceae e Lauraceae. Elas evoluíram independentemente, apresentando muitas características primitivas, como estames numerosos, eixofloral alongado, ovário dialicarpelar e polinização cantarófila (KIILL e COSTA, 2003).

A família Annonaceae possui cerca de 2.500 espécies e 135 gêneros em todo o mundo (CHATROU et al., 2012). No Brasil, ocorrem 386 espécies, distribuídas em 29 gêneros. A Amazônia abriga três quartos da diversidade de Annonaceae do Brasil, com 27 gêneros e 280 espécies, o restante se concentra na Mata Atlântica (15 gêneros e 91 espécies) (MAAS; RAINER; LOBÃO, 2013). Possui maior número de espécies entre as Magnoliales, classificada em quatro subfamílias: Ambavioideae, Anaxagoreoideae, Annonoideae e Malmeoideae. A família Annonaceae se caracteriza por ser pantropical.

O gênero *Pseudoxandra* é composto por 14 espécies no Brasil, a maioria Amazônica. Há apenas duas espécies na Mata Atlântica capixaba e baiana, *P. spiritus-sancti* Maas e *P. bahiensis* Maas, respectivamente. As “Pseudoxandras” são árvores caracterizadas pelas folhas com nervura primária proeminente na face superior, pedicelo curto e articulado, com duas a várias brácteas, nenhuma a cima, e várias a abaixo da articulação, botões globosos, pétalas imbricadas, arredondadas e côncavas, carpelos pontudos com um óvulo marginal e carpídios livres e globosos com uma semente achatada, com sulco equatorial (MAAS e WESTRA, 2003). A *Pseudoxandra cuspidata* é uma árvore de até 30 m de altura com um tronco não superior a 30 cm de diâmetro. As hastes são cobertas com pelos brancos longos quando jovens, transformando-se rapidamente e tornam-se sem pelos com a idade. Os frutos amadurecem entre abril e julho, são bagas subglobosas 10-20 mm de diâmetro, com apícula, de lado verde e do outro amarelo-laranja, tornar-se negro na secagem. O estipe (com a fruta) é de 15 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro. Ela cresce em floresta de terra com baixa altitude (ROUMY, 2007). Pode ser encontrada no Brasil nos estados do Pará e comumente encontrada no estado do Amapá (TRIGO et al., 2007), sendo endêmica também na Guiana, Guiana Francesa, e encontrada em algumas regiões da Colômbia (MAAS e WESTRA, 2003; FUNK, 2007).

Tradicionalmente, na Guiana Francesa é utilizada a casca preparada em decocção (200g em meio litro de água fervida durante 15 minutos) para tratamento da malária. As

tribus Wayãpi e Palikur são os principais grupos étnicos que utilizam esse decocto contra a malária (ROUMY, 2007).

Um estudo relacionado com a presença de constituintes químicos presentes nos óleos essenciais da *P. cuspidata* observou-se elevados teores dos monoterpenos presentes nas folhas e nos frutos (TRIGO et al., 2007). Em uma pesquisa relacionada com espécies de *Pseudoxandra*, foram isolados alcaloides isoquinolínicos da casca do caule dessas espécies: *P. lucida* e *P. sclerocarpa* (CORTES, 1985; 1986).

Um estudo realizado por Roumy (2007), com o objetivo de isolamento dos alcaloides responsáveis pela ação antimalárica (anti-plasmódica) alegada pelas comunidades tradicionais da Guiana Francesa, observou que o pó das cascas do caule da espécie caracteriza-se pela grande quantidade de fibras longas, com nódulos de células escleróticas vinculados por túbulos e com o súber aglomerado de células do parênquima. Ele isolou as substâncias presentes no decocto da espécie por métodos cromatográficos e identificou por métodos espectroscópicos, RMN C^{13} e H^1 e CG-EM. A extração dos alcaloides foi realizada em dois processos extrativos, posteriormente os compostos isolados foram caracterizados. O composto 1 foi identificado como a Rodiasine, composto 2 identificado como 1'S O-metilpunjabine, composto 3 o 1-aza-7,8,9,10-tetrametil-4-metil-2-oxo1,2-di-hidroantraceno (descoberto nessa pesquisa), e o último, o composto 4: O-metil-moscalina. Os alcaloides e outros grupos orgânicos foram definidos em bisbenzilisquinolonas, antracenos, aporfinas, ciclo-hexonona alquilada.

3.4 POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais com potencial antioxidante são cada vez mais estudadas por pesquisadores dos ramos alimentício, farmacêutico e cosmético, com objetivo de fornecer ao consumidor produtos funcionais, que possam contribuir na redução de riscos de diversas doenças por meio da dieta e utilização de compostos antioxidantes (VANIN, 2015).

3.4.1 Radical livre

Os radicais livres são espécies químicas que contêm um elétron desemparelhado em sua órbita atômica, com isso torna-se altamente reativo. Esses compostos reativos estão envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação de crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias importantes para homeostase do corpo. A oxidação é um

processo metabólico natural que ocorre principalmente durante a produção de energia. Faz parte da vida aeróbica e do metabolismo humano, são produzidos naturalmente ou em quadros de disfunção biológica (PRIOR e WU, 2013; VANIN, 2015).

3.4.2 Substancias antioxidantes

São substâncias que em baixas concentrações retardam ou previnem a oxidação de um substrato. Compostos antioxidantes são responsáveis pela inibição e redução de lesões causadas pelos radicais livres nas células (ARAKAKI, 2015).

3.4.2.1 DPPH

O DPPH, composto 2,2- difenil-1-picril-hidrazila é um radical estável utilizado em metodologias para estimar a capacidade antioxidante em frutas, vegetais, algas, entre outros (VANIN, 2015). A forma estável possui uma coloração púrpura e apresenta absorvância em 517 nm. O método baseia-se na redução do DPPH a difenil-picrilhidrazina, pela ação de um ou vários compostos antioxidantes presentes no extrato vegetal ou complexo de substância testado, há a mudança de coloração de roxo para uma coloração amarelada, com conseguinte redução da absorção. Após a realização do ensaio, determina-se a porcentagem de capacidade antioxidante (% CA) ou sequestradora de radicais livres. A porcentagem de capacidade antioxidante da planta corresponde à quantidade de DPPH consumida, porém o antioxidante deve degradar ao menos 50% da concentração inicial de DPPH, denominado concentração eficiente (CE), ou seja, quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE50 e maior a sua capacidade antioxidante. A determinação da capacidade antioxidante de vários tipos de espécies vegetais usando DPPH é comparável a outros métodos. A eficiência antioxidante é mensurada à temperatura ambiente, logo o risco associado à degradação térmica das moléculas testadas é praticamente extinto (GÜLÇIN, 2012; BARBOSA, 2015).

3.5 ATIVIDADE LARVICIDA E *A. aegypti*

A atividade larvicida sobre cepas de *A. aegypti* é uma importante alternativa quando nos referimos à prevenção de transmissão viral (arboviroses), pois uso de plantas medicinais com esse potencial leva em longo prazo: a não formação de cepas resistentes e

economia, tanto ao evitar uso de biocidas sintéticos (onerosos) como reduzindo morbimortalidade em hospitais.

3.5.1 Espécie *A. aegypti*

O *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L.) é um importante vetor relacionado à saúde pública, transmissor da dengue, febre amarela, chikungunya e zika, possui ampla distribuição geográfica, nas áreas tropicais e subtropicais situadas entre os paralelos de latitudes 45° Norte e 40° Sul e nas zonas isotermais intermediadas a 20°C. O mosquito possui hábito antropofílico, apresenta grande capacidade de adaptação a criadouros artificiais o que possibilita o aumento de sua população, o que leva ao aparecimento de epidemias, como as da dengue (BESERRA et al., 2006; ZARA et al., 2016).

3.5.1.1 Ciclo de vida do *A. aegypti*

O ciclo de vida do *A. aegypti* é constituído por quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto. O desenvolvimento ocorre por meio de metamorfose completa (Holometabolía). As fases de ovo, larva e pupa ocorrem na água, enquanto a fase adulta é terrestre (NUNES, 2015).

O ovo do *A. aegypti* possui contorno alongado e fusiforme, com comprimento médio de 1 a 0,44 mm são depositados pela fêmea sobre superfície da água, são depositados individualmente, são brancos e se tornam de coloração preta e brilhante. O embrião se desenvolve em 48 horas, na ausência de água (secos) ficam ávidos num período de até 450 dias (NUNES et al.; GUIMARÃES et al., 2015).

Na fase larval (4 estádios – 5 à 10 dias) ocorre a alimentação e o crescimento. Para a alimentação a larva usa o material orgânico presente no criadouro, fatores como temperatura, quantidade de alimento e de larvas determinam o período até a próxima fase. A larva é dividida em cabeça, tórax e abdômen (8 segmentos). No abdômen há brânquias que são responsáveis pela regulação osmótica e o sifão usado para respiração larvária, essa respiração que ocorre nas superfícies da água, as larvas se deslocam forma de S e possuem fotofobia (CASTRO JUNIOR et al., 2013; NUNES et al., 2015).

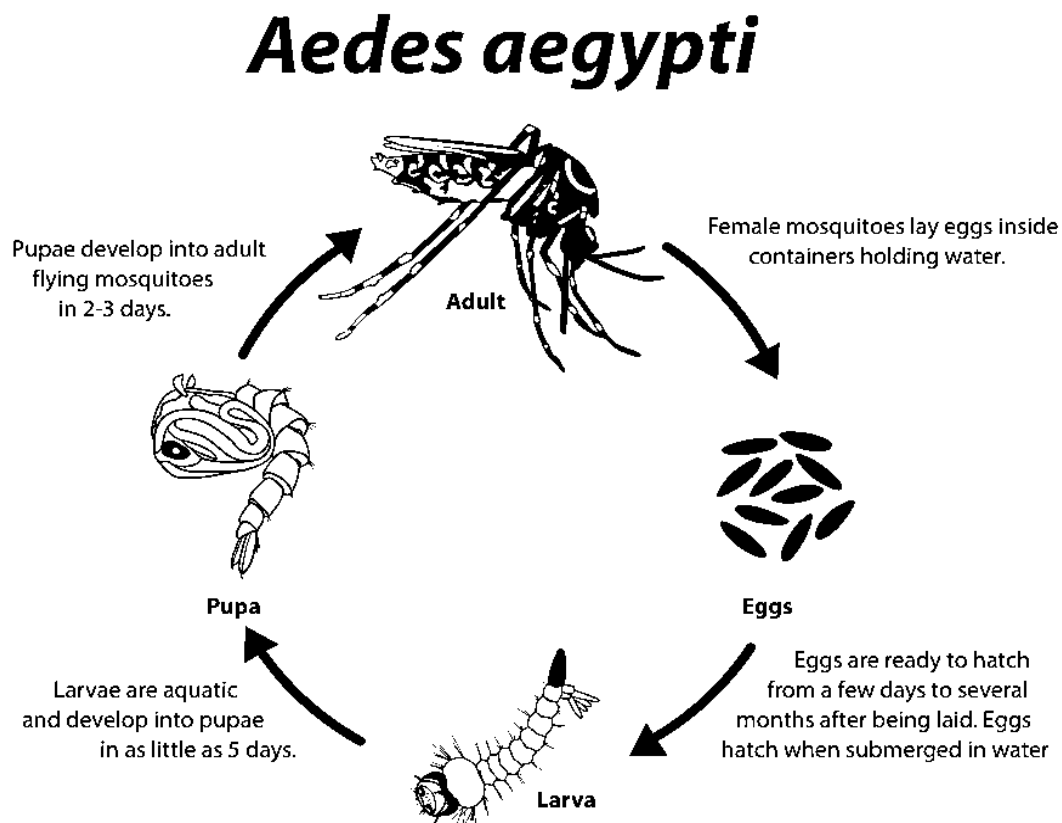
A fase de pupa (2 a 3 dias) sendo ela transitória, não há necessidade de alimentação nesse período, o corpo se divide em cefalotórax e abdômen, fazendo um formato de vírgula, sendo que a respiração é mantida através de trombetas, como o ovo, a pupa de cor

branca se torna enegrecida. O mosquito adulto emerge aos poucos até atingir a superfície da água (NUNES et al., 2015).

Após 24 horas da mudança para mosquito os órgãos reprodutivos tornam-se aptos, tanto do macho quanto da fêmea já podem cruzar. A primeira da inseminação da fêmea é a última também (CASTRO JUNIOR et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2015).

O tamanho do *A. aegypti* adulto mede em torno de 5mm e possui o corpo segmentado. No exoesqueleto recoberto de quitina predomina a coloração negra, mas nas pernas apresenta manchas brancas e os segmentos tarsais são listrados de cor branco/prateado. Outra característica marcante é o desenho em forma de lira no tórax (CANTIONÍLIO e SILVA, 2013; CASTRO JUNIOR et al., 2013). O resumo das etapas do ciclo de vida do *A. aegypti* pode ser observado na figura 2.

Figura 2 – Ciclo de vida do *A. aegypti*



3.5.1.2 Atividade larvicida

Compostos são investigados para constatação de atividade larvicida contra o *A. aegypti*. As características de determinados grupamentos químicos estruturais desses compostos ou a combinação entre eles podem conferir aumento ou redução da atividade larvicida, bem como a presença de determinados grupos orgânicos. A área de pesquisa vem despertando interesse, devido a necessidade de produzir inseticidas eficazes e seguros para a população e para o meio ambiente, e que não promovam cepas resistentes. Compostos mais lipofílicos apresentam maior atividade larvicida contra o *A. aegypti*. Os biocidas botânicos são considerados inofensivos, por seu mecanismo de ação utilizar componentes nas formas maduras ou imaturas do mosquito. Importante destacar que esses novos compostos, com ação larvicida devem demonstrar um efeito residual prolongado nos depósitos onde são aplicados. Essa é uma característica importante para a adoção de um determinado composto em atividades de campanha de saúde pública (ZARA et al.; RIBEIRO et al., 2016).

3.5.1.3 Alcaloides e potencial larvicida

As plantas medicinais que possuem alcaloides em sua constituição possuem potencial biológico e farmacológico para inúmeras atividades. Em um estudo realizado por Saxena e colaboradores (1993) os Alcaloides da espécie vegetal *Annona Squamosa* (ANNONACEAE) apresentaram ação larvicida contra *Anópheles stephensi*. Em outro estudo onde a composição majoritária da espécie vegetal (*Paullinea cupana*) era de alcaloides a ação larvicida foi comprovada para intermediários do *Culex quinquefasciatus* (RIBEIRO NETO et al., 2012).

Em um estudo realizado por Sukari e colaboradores (2013) alcaloides isolados da espécie vegetal *Murraya koenigii* pertencente à família Rutaceae, apresentaram ação larvicida em baixas concentrações (3 µg/mL) contra cepas de *A. aegypti*.

3.5.2 Uso de biocidas naturais

A utilização de uma vasta gama de inseticidas sintéticos tem sido restrito recentemente, devido ao alto custo, ambiental prejudicial efeitos, a sua natureza não biodegradável, e aumentar a resistência à inseticida. Inseticidas como organoclorados e

organofosforados são prejudiciais à saúde por contaminar o ar, à água e os alimentos, enquanto que produtos derivados de plantas medicinais não promovem tamanha contaminação e tornam-se importantes alternativas para o controle de insetos resistentes. Os extratos de plantas com propriedades inseticidas devem ser disponibilizados aos agricultores, uma vez que as formulações à base de plantas medicinais são facilmente disponíveis, pois são utilizados de maneira simples e sustentável (ZARA et al.; NIROUMAND et al., 2016).

Os medicamentos fitoterápicos têm sido usados por milhares de anos como fontes de bioativos e substâncias terapêuticas com fins industriais e agrícolas. As plantas medicinais e seus derivados (ou extratos) podem ser utilizados para diferentes estratégias de controle de pragas, como com ação tóxica, letal, repelente, atividade inibidora de alimentação, fumigante, regulação do crescimento e efeitos dissuasores sobre qualquer estágio de desenvolvimento do *A. aegypti*. Além disso, apesar de inseticidas convencionais, são baseados em um único composto ativo, inseticidas botânicos contendo misturas de compostos químicos podem afetar mais de um processo comportamental e fisiológico. Assim, a possibilidade de desenvolvimento de resistência por meio do mosquito para tais substâncias é muito baixa (NIROUMAND et al., 2016).

3.5.3 Arboviroses

As doenças acometidas pelo Arbovírus (de “arthropod borne virus”) são vírus que podem ser transmitidos ao homem por vetores artrópodes, ou seja, vírus mantidos na natureza através da transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados suscetíveis por artrópodes hematófagos, ou por transmissão transovariana e possivelmente venérea em artrópodes (WHO, 2016).

3.5.3.1 Dengue

A dengue é uma doença viral que pode ocorrer em quase todas as regiões do mundo. O vírus da dengue pertence a família Flaviviridae, possui 4 sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. O vírus dengue possui genoma de RNA de fita simples com polaridade positiva, contendo 11000 pares de base que codifica uma poliproteína de aproximadamente 3400 aminoácidos, a qual é posteriormente clivada por proteases virais e celulares em três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). O genoma encontra-se protegido por um capsídeo de simetria

icosaédrica circundado por um envelope lipídico formando uma partícula com 40-50 nm (MURI, 2014).

A infecção provoca sintomas semelhantes à gripe e, ocasionalmente, se desenvolve em uma complicação potencialmente letal chamada dengue grave. A incidência global da dengue cresceu dramaticamente nas últimas décadas. Cerca de metade da população do mundo está agora em risco (1/3). O mosquito *A. aegypti* é encontrado em climas tropicais e sub-tropicais em todo o mundo, principalmente em áreas urbanas e semi-urbanas. A dengue grave é uma das principais causas de morte entre crianças em alguns países asiáticos e latino-americanos. Não há tratamento específico para a dengue/dengue grave, mas a detecção precoce e acesso a cuidados médicos adequados reduzem as taxas de mortalidade para abaixo de 1%. A prevenção e controle da dengue dependem de medidas eficazes de controle de vetor. A vacina contra a dengue foi licenciada por várias Autoridades Reguladoras Nacionais para uso em pessoas 9-45 anos de idade que vivem em áreas endêmicas (GUY et al., 2011).

Estimativa recente indica 390 milhões de infecções por dengue por ano (95% intervalo de credibilidade 284-528 milhões), dos quais 96 milhões possuem manifestação clínica (com qualquer gravidade da doença). Estima-se que 3,9 bilhões de pessoas, em 128 países, estão em áreas endêmicas do vírus (BRADY et al., 2012; WHO, 2016a).

3.5.3.2 Chikungunya

A Chikungunya é uma doença viral transmitida por mosquitos descrita pela primeira vez no sul da Tanzânia, durante um surto em 1952. O vírus chikungunya (CHIKV) possui genoma de RNA positivo de fita simples, pertence ao gênero Alphavirus da família Togaviridae. O nome "chikungunya" deriva de uma palavra na língua Kimakonde, que significa "tornar-se contorcido", e se refere à aparência curvada dos pacientes acometidos, demonstrando dor nas articulações (artralgia). A Chikungunya provoca febre e dor articular grave, em alguns casos, sintomas incluem dor muscular, dor de cabeça, náuseas, fadiga e erupção cutânea. A dor nas articulações é debilitante e pode durar de períodos curtos a anos. A doença compartilha alguns sinais clínicos com dengue, e pode ser diagnosticada em áreas onde a dengue é comum. Não há cura para a doença. O tratamento é focado no alívio dos sintomas. A proximidade dos locais de reprodução do mosquito para a habitação humana é um fator de risco significativo para a infecção pela Chikungunya (WHO, 2016c).

3.5.3.3 Zika

O nome Zika está atrelado a sua origem na floresta de Zika perto de Entebbe, capital da República de Uganda. O Zika vírus é do gênero *Flavivirus*, ele é composto de nucleocapsídeo associado ao código genético viral que é uma molécula de RNA de fita simples positivo (RNAfs +). O sequenciamento é baseado no gene de proteínas não estruturais NS5, os vírus da Zika são agrupados em duas linhagens: a estirpe africana e a asiática. O genoma do vírus da Zika apresenta a organização característica do genoma de outros *Flavivirus*, codificando três proteínas estruturais e sete não estruturais. A doença Zika possui poucas complicações, em estudos atuais há indícios de o vírus ser o responsável por microcefalia congênita (MAI, 2013; TETRO, 2015; CDC, 2016). Em relação doença microcefalia associada ao Zika, em 2 de janeiro 3.174 casos suspeitos, incluindo 38 mortes, foram identificados no Brasil. Os casos estão distribuídos em 684 municípios de 21 unidades federais. A região Nordeste continua a apresentar o maior número de casos suspeitos (WHO, 2016b).

O Zika vírus está associado à Síndrome de Guillain-Barré (CAO-LORMEAU et al., 2016). Considerada uma arboviroses emergente, devido à sua expansão área geográfica, seu desfecho após infecção normalmente é benigno, semelhante à gripe com erupção cutânea, sem necessidade de hospitalização, porém em um estudo realizado por Oehler e colaboradores (2014), foi descrito o primeiro caso de síndrome de Guillain-Barré que ocorre imediatamente após uma infecção por vírus Zika na Polinésia Francesa.

3.6 ENSAIO TOXICOLÓGICO E PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais podem apresentar efeitos tóxicos decorrente da presença dos seus metabólitos secundários, esses vegetais utilizados inadequadamente ou utilizados sendo ignorado quanto esse efeito, mesmo apresentando eficácia terapêutica, torna-se um risco a saúde. Portanto, a investigação do potencial tóxico de plantas medicinais pode esclarecer importantes aspectos farmacológicos de seus constituintes, propiciando uma utilização segura respeitando os riscos toxicológicos (SILVA et al., 2016).

A letalidade de organismos simples é um importante resultado utilizado para um monitoramento rápido e simples da resposta biológica, onde o parâmetro envolvido é a morte ou vida. Então deve-se submeter os dados de mortalidade a procedimentos estatísticos seguros e que possam fornecer confiabilidade nas respostas obtidas, como R^2 próximo a 1, e p-valor

<0,05. O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade geral, sendo considerado primordial como bioensaios toxicológico preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica (SILVA et al., 2016; PEREIRA et al., 2015)

3.6.1 Microcrustáceo *A. salina* (brine shrimp)

A espécie *A. salina* pertence ao reino Animalia, filo Artropoda, subfilo Crustacea, classe Branchiopoda, ordem Anostraca, família Artemiidae, gênero *Artemia* (LINNAEUS, 1758). A *Artemia salina* é uma espécie de microcrustáceo, muito utilizada como bioindicador em testes de laboratório, principalmente por seu baixo custo. O seu hábito alimentar é do tipo filtrador, pois ele se alimenta de bactérias, algas unicelulares, pequenos protozoários e detritos dissolvidos no meio salino. Estudos recentes comprovam a ação tóxica de várias substâncias naturais nestes pequenos animais.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), são consideradas tóxicas substâncias que apresentam valores de DL50% (CL50%) abaixo de 1000ppm em *Artemia salina* (MEYER et al., 1982). Os testes de toxicidade preliminar são elaborados no intuito de avaliar ou prever os efeitos tóxicos em sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa de substâncias isoladas ou presentes em extratos (PEREIRA et al., 2015). Este ensaio é utilizado como triagem para outras ações biológicas como: anticancerígena, inseticida, moluscicida e antifúngica (BESSA et al., 2013).

3.7 PLANTAS MEDICINAIS E AÇÃO ANTIMICROBIANA

Os antibióticos são medicamentos utilizados para prevenir e tratar infecções bacterianas. A resistência aos antibióticos ocorre quando cepa bacteriana sofrem uma mutação espontânea ou recombinação gênica ao entrar em contato com antibióticos, posteriormente começam a produzir proteínas que impedem a ação do mesmo antibiótico. Estas “super” bactérias ao infectar o homem tornam-se menos susceptíveis a antimicrobianos de alto espectro, necessitando substâncias de ultima geração, em caso de permanência da infecção, torna-se cada vez mais difícil à reversão do quadro infeccioso, com o agravamento do quadro a sepsis, e a perda do paciente. O aparecimento de resistência a antibióticos e outras drogas antimicrobianas tende a ser um dos grandes problemas da medicina moderna, pois a variabilidade genética e a mutação espontânea atuam na seleção natural, fornecendo

vantagens aos mais aptos. As drogas atuam como agentes seletivos (LEISNER; JØRGENSEN; MIDDELBOE, 2016).

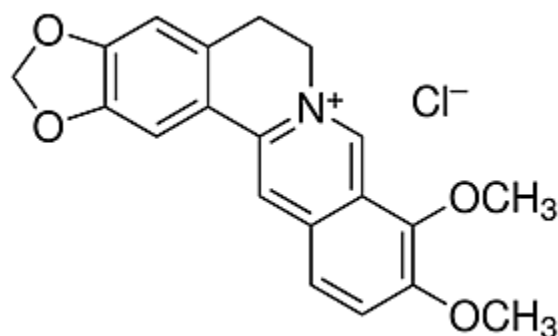
3.7.1 Metabólitos secundários com ação antimicrobiana

Os metabólitos secundários como ácidos orgânicos, alcalóides, flavonóides, compostos fenólicos, terpenos, taninos condensados, antraquinonas, esteroides e triterpenóides, são conhecidos por apresentar efeitos antimicrobianos (TINTINO et al., 2015).

3.7.1.1 Alcaloides antibacterianos

Um exemplo de alcaloide com ação antibacteriana é o composto Berberina (Figura 3). Suas atividades farmacológicas incluem inibição metabólica de determinados organismos, a inibição de formação de enterotoxina bacteriana, a inibição da acumulação de fluido intestinal e secreção de íons, inibição da contração muscular-lisa, redução da inflamação, da inibição da agregação plaquetária, elevação da contagem de plaquetas em certos tipos de trombocitopenia, a estimulação da bÍlis e secreção da bilirrubina e inibição taquirritmia ventricular. Pode ser encontrada nas espécies *Hydrastis canadenses*, *Coptis chinensis*, *Berberis aquifolium*, *Berberis vulgaris* e *Berberis aristata* (SANTOS, 2013; SAHA et al., 2013; KHAN, 2016).

Figura 3 – Cloridrato de Berberina



Fonte: [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure3/\[...\]](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure3/[...])

3.7.2 Mecanismo de ação antimicrobiana

O mecanismos de ação de compostos naturais estão relacionados a desintegração da membrana citoplasmática, desestabilização da força próton motriz (FPM), fluxo de elétrons, transporte ativo e coagulação do conteúdo da célula (TORTORA et al., 2012). Nem todos os mecanismos de ação agem em alvos específicos, extratos vegetais tendem a ter mais efeito sobre mais de um sítio de ação, em consequência outros mecanismos envolvidos (SILVA, 2010).

3.7.3 Resistencia antimicrobiana

A resistência antimicrobiana acontece quando os microrganismos (tais como bactérias, fungos, vírus, parasitas e) alteração quando são expostos a medicamentos antimicrobianos (tais como antibióticos, antifúngicos, antivirais, antimaláricos, anti-helmínticos e). Os microrganismos que se desenvolvem resistência aos antimicrobianos são muitas vezes referidos como "superbactérias". Como resultado, os medicamentos tornar-se ineficazes e infecções persistir no corpo, aumentando o risco de contaminação de outras pessoas. Novos mecanismos de resistência estão surgindo e se espalhando globalmente, ameaçando a nossa capacidade para tratar doenças infecciosas comuns, resultando em prolongada doença, invalidez e morte. Sem antimicrobianos eficazes para a prevenção e tratamento de infecções, procedimentos médicos, como transplantes de órgãos, quimioterapia do cancro, diabetes gestão e cirurgia de grande porte (por exemplo, cesarianas ou substituições de quadril) se tornar muito alto risco. A resistência antimicrobiana aumenta o custo dos cuidados de saúde com estadias mais longas em hospitais e cuidados mais intensivos necessários (WHO, 2016)

Os pacientes com infecções causadas por bactérias resistentes aos medicamentos estão em maior risco de piores desfechos clínicos e morte, e consomem mais recursos de cuidados de saúde do que os pacientes infectados com cepas não resistentes das mesmas bactérias.

3.7.4 Bactérias patogênicas

Os microrganismos *P. aeruginosa* e *S. aureus* estão entre as principais bactérias responsáveis por infecções oportunistas em feridas e sangue em hospitais brasileiros, tornando-se um desafio para os profissionais de saúde (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2016).

3.7.4.1 *Pseudomonas aeruginosa*

A *P. aeruginosa*, é uma bactéria gram-negativa, aeróbia, baciliforme, considerada um patógeno oportunista, esta associado a diversas infecções nosocomiais, principalmente no trato respiratório e urinário, em queimaduras, feridas, olhos, dentre outras (QUATRIN et al., 2015). O microrganismo se adere e propaga em dispositivos médicos como cateter, lentes de contato e próteses. Atualmente é um dos principais patógenos responsáveis por infecções respiratórias agudas em pacientes portadores de ventilação mecânica ou imunocomprometidos, além de infecções crônicas, como a fibrose cística. As taxas de mortalidade por pneumonia associada ao uso de ventilação mecânica aumentaram de 42,1% para 87%, em infecções por *P. aeruginosa*. Este microrganismo também está associado a mais de 80% da morbidade e mortalidade em pacientes com fibrose cística (FUJITANI et al., 2011). As cepas multirresistentes à drogas de *P. aeruginosa* (MDR) provocam infecção através da corrente sanguínea, foi descrito apenas em pacientes com fibrose e em surtos isolados na unidade de cuidados intensivos (UCI) ou neoplásica pacientes (TACCONELLI et al., 2002; QUATRIN et al., 2015).

As bactérias Gram-negativas, como a *P. aeruginosa*, possuem múltiplos mecanismos de resistência a várias classes de antibióticos. Linhagens multirresistentes expressam enzimas capazes de provocar alterações na estrutura do antibiótico levando a perda de sua funcionalidade através de reações como a acetilação, poliadenilação e fosforilação. Algumas bactérias apresentam também mecanismos como bomba de efluxo, que expulsa o antibiótico do o espaço periplasmático, impedindo sua ligação com *in locu*. As porinas, da membrana plasmática bacteriana, são proteínas que formam canais com água; controlam a entrada de alguns elementos, e de antibióticos, alterações conformacionais podem levar a membrana externa a não permitir a passagem desses agentes para o espaço periplásmico (entre as membranas) (AQUINO et al., 2016). A coloração azulada do pus pós-infecção da *P.*

aeruginosa é caracterizado pela presença da piocianina, um alcaloide oriundo desse microrganismo.

3.7.4.2 *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus*, é um coco gram-positivo, anaeróbio facultativo, agrupado em cachos, não forma esporos, mesófilos e produzem enterotoxinas, coagulase-positiva, é normalmente encontrado na pele e fossas nasais, patógeno oportunista, está relacionado a infecções nosocomiais e a quadros graves de resistência aos medicamentos e está entre as causas de infecções graves em unidades de saúde e da comunidade. Promove infecções importantes, bacteremia, endocardites e infecções do trato respiratório (SILVA, 2010).

As pessoas com cepas de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) possuem 64% mais probabilidade de morrer do que as pessoas com uma forma não-resistentes da infecção (WHO, 2016).

CAPÍTULO 1

Análise Fitoquímica, Potencial Antioxidante, Citotóxico, Larvicida e Antimicrobiano do Extrato Bruto Etanólico das cascas do caule de *Pseudoxandra cuspidata* Maas.



Research Article

ISSN : 0975-7384
CODEN(USA) : JCPRC5

Larvicide and antioxidant activity of the ethanol crude extract from the stem bark of *Pseudoxandra cuspidata* (Annonaceae)

Rangel Carvalho S.¹, Rosany Lopes M.¹, Erica de Menezes R.², Alex Bruno Lobato R.², Ana Luzia Ferreira F.², Ryan da Silva R.², Ricardo Marcelo dos Anjos F.³, Raimundo Nonato Picanço S.³ and Sheylla Susan Moreira da Silva de A.^{1,2}

¹Department of biological and health sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Post Graduate Program in Pharmaceutical Sciences (PPGCF), Federal University of Amapá, Macapá –Amapá – Brazil.

²Laboratory of Pharmacognosy and Phytochemistry of the Federal University of Amapá

³Laboratory of Arthropoda of the Federal University of Amapá

ABSTRACT

In Brazil, there is an epidemiological crisis scenario in relation to arboviruses like dengue, Chikungunya, and Zika, where all have in common vector, *Aedes aegypti*. The species *Pseudoxandra cuspidata* Maas (1983), is belongs Annonaceae family, popularly known as Lamuci, Envira, Amarela, Envira Preta, Envira Lamuci, and is referred to by traditional medicine with anti-inflammatory, antifungal and antimalarial; It is endemic in the north, but little studied in relation to its biological potential and its chemical constituents. The *Pseudoxandra cuspidata* following the chemotaxonomic profile of the Annonaceae family is rich in alkaloids. Based on these assumptions, this study has to analyze the potential larvicide with *Aedes aegypti* and antioxidant activity of the crude ethanol extract of *P. cuspidata*. In relation to the antioxidant activity of the crude ethanolic extract, $CL_{50\%} = 326.85 \mu\text{g/ml}$ and in relation to larvicidal activity against *Aedes aegypti* intermediate stage of $CL_{50\%}$ for 24 hours was 437.79 ppm for 48 hours and concentration was 270.85 ppm. In both activities, the result was significant, starting new possibilities of using the ethanol crude extract *Pseudoxandra cuspidata*.

Keywords: Medicine Plants, *P. cuspidata*, Antioxidant, Larvicidal Activity.

1 INTRODUCTION

In Brazil, there is an epidemiological crisis scenario in relation to arboviruses such as Dengue, Zika, and Chikungunya, which all have in common vector, the *Aedes aegypti*, so natural products that contribute to the elimination or control early stages, intermediate or repellency have great value for the health of the population [1].

One of the ways to encourage the protection is sustainable use, making it possible the economic development of the region and use of forest resources in the Brazilian Amazon [2]. The family Annonaceae has about 2,500 genera and 135 species worldwide. In Brazil, there are 386 species distributed in 29 genera. The Amazon region has three-quarters of the Annonaceae of Brazil, with 27 genera and 280 species [3,6].

The gender *Pseudoxandra* sp. has 14 species in Brazil, most in Amazon forest. There are only two species in the Atlantic forest, *P. spiritus-sancti* Maas, and *P. bahiensis* Maas. The *Pseudoxandra*'s group are trees characterized by leaves with prominent primary rib on the upper face, short and articulate pedicel with two to several bracts below the joint and none above, globular buttons, imbricated, rounded and concave petals, carpels pointed to a marginal egg and globose with a flat seed with equatorial groove [4,7].

The medicinal plants that have special metabolites also called natural active principles or secondary metabolites are typically classified from their biosynthetic route.

The main families of secondary metabolites are phenolic compounds, terpene compounds, steroids, and alkaloids. The alkaloids are defined as compounds having nitrogenous organic bases, they have a nitrogen in its formation, originating linked to amino acids (similar to proteins) and pharmacologically active [11,12]. The *Pseudoxandra cuspidata* following chemotaxonomic profile family Annonaceae is rich in alkaloids, in particular, aporphinoids [13].

Due to climatic conditions found in the state of Amapá (Brazil), which favor the development and proliferation of *A. aegypti* (vector of diseases known as arboviruses), it is the better look for alternatives for vector control, as the search for new insecticides agents from concentrated extracts.

Based on these assumptions, this study has to analyze the potential larvicide with *Aedes aegypti* and antioxidant activity of the crude ethanol extract of *Pseudoxandra cuspidata*.

2 EXPERIMENTAL SECTION

2.1 Plant Material

Study featured how qualitative and quantitative, based on knowledge empirical, experimental and exploratory. The plant species was collected in a particular field in Pedra Branca, a municipality which is located 188 km away from the state capital (Macapá - Amapá - Brazil). Vegetable leaves were removed (for botanical analysis) and the bark of the stem (for the preparation of extracts). The voucher specimen of the species was cataloged by a specialist in the field, in the Herbarium of the Federal University of Amapá, registration number: 458.

2.2 Sample preparation and obtaining the EBE

The husks were dried at 45 ° C for four days, then they were milled in a knife mill, TE-625 model. The dry milled material was used to prepare the crude ethanol extract (EBE) following the methodology proposed by Carvalho (2011) [14], macerated for 7 days, the solvent used was ethanol at 96 °GL, the ratio was 1:3 with respect to the raw material, the extraction solution was homogenized every 24 hours. It was filtered, and the solvent evaporated on rotaevaporator.

2.3 Evaluation of antioxidant activity of EBE against the kidnapping of free radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH)

It was performed according to the methodology proposed by Souza et al. (2007) [15] Lopez-Lutz et al. (2008) [16] and Pitaro et al., (2012) [17] and as validation of the method, a calibration curve was prepared to evaluate the DPPH modifications during the change of concentration. It was prepared a DPPH solution of 40 µg/mL and some solutions with the EBE concentrations of 5; 2.5; 1; 0.75; 0.5 mg/mL and 0.25 mg/mL in methanol separately. After 30 minutes the decline of radical concentration was monitored by spectrophotometry visible at $\lambda = 517$ nm. Absorbance measurements were made in a spectrophotometer Biospectro SP-22. The experiment was performed in triplicate and the mean absorption was analyzed for each concentration and the positive control. The percentage of antioxidant activity was calculated according to Sousa et al. (2007) [15].

$$AA (\%) = \{ 100 - [(Abs_{\text{sample}} - Abs_{\text{white}} \times 100) / Abs_{\text{control}}] \}$$

AA (%) = Percentage of antioxidant activity

Abs sample = absorbance of the sample

Abs white = white Absorbance

Abs control = control Absorbance

2.4 Larvicidal activity of EBE front of larvae in the L3 stage of *Aedes aegypti*

The larvae of *Aedes aegypti* used in bioassays are from the insectarium's Laboratory Arthropoda from the Federal University of Amapá, all strain Rockfeller, the 3rd young stage. The biological tests were conducted in a room (3m x 4m) with controlled climatic conditions: temperature 25 ± 2 ° C, relative humidity of $75 \pm 5\%$, 12-hour photoperiod.

The methodology followed the standard protocol of the World Health Organization [18], with adaptations, such as the modification of the test container. After analyzing preliminary test series concentrations were selected: 500, 400, 300, 200 and 100 ppm of EBE of the stem bark of *P. Cuspidata*.

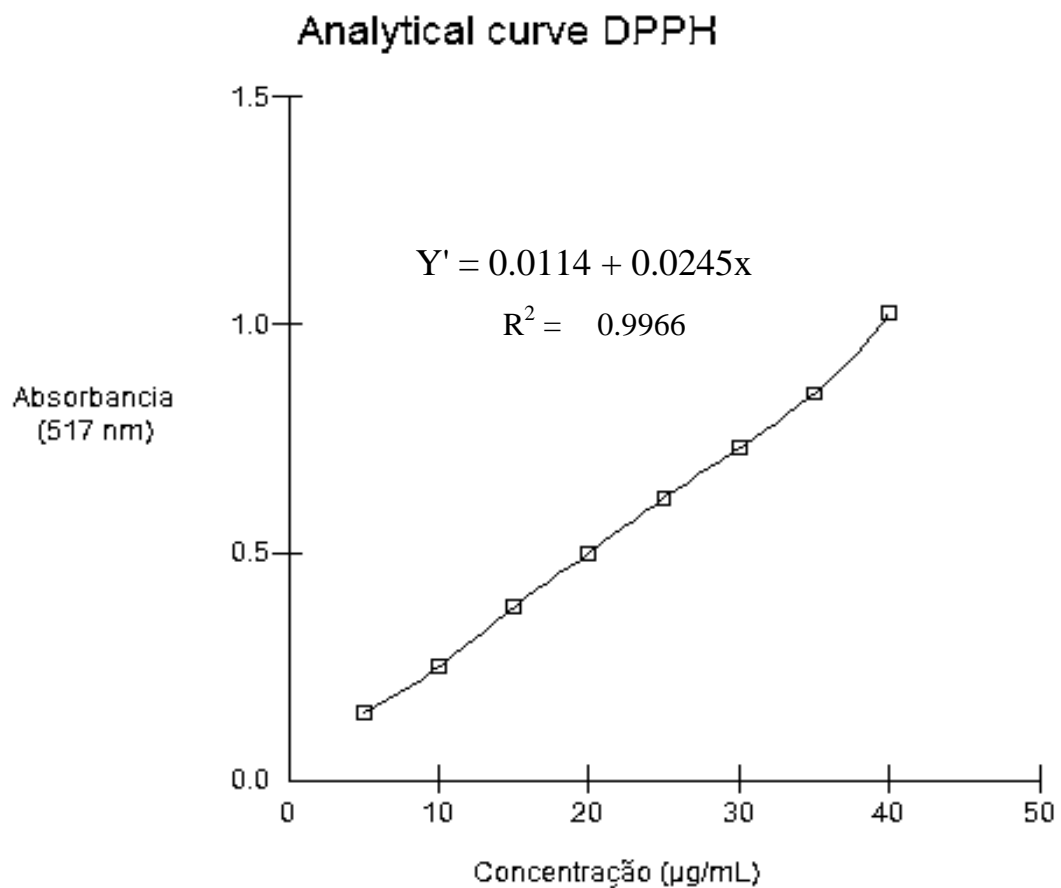
A solution was prepared with 465 mg of EBE, and pre-solubilized in Tween 80 and dissolved in 93 ml of water to obtain the concentration of 5000 ppm. From this stock solution, serial dilutions were prepared to obtain concentrations of 500, 400, 300, 200 and 100 ppm. For each replicate of a treatment, it was used 10 larvae of *Aedes aegypti*, pipetted into a beaker containing 100 ml distilled water. During the experiment, the average temperature of the water was 25 °C. After 24 and 48 hours dead larvae were counted, all those being considered dead that did not move after stirring for a period of at least 1 minute. The Obtained data of mortality (%) x concentration (ppm) were analyzed by SPSS in Probit graph to determine the lethal concentration which causes 50% mortality of the population ($CL_{50\%}$). The variation of the mean in biological assays was evaluated by the variance (ANOVA) with 95% confidence intervals.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Antioxidant activity of EBE from *P. cuspidata*

For the validation of the analytical method was prepared an analytical curve for analyzing variations of DPPH and calibration of equipment, targeting specificity, precision and accuracy of the results obtained, as can be seen in Figure 4.

Figura 4 - Analytical Curve DPPH (“spline”)



The DPPH has free radical scavenging activity based on electron transfer; it is used during the test as a control to determine antioxidant activity [19]. In Table 1 is presenting the percentage of antioxidant activity for the EBE *Pseudoxandra cuspidata*.

Tabela 1 - Mean and standard deviation of the percentage of antioxidant activity of crude ethanol extract *Pseudoxandra cuspidata*

Concentration (mg/mL)	Capacity Antioxidant (%)
5	95.321 ± 1.22 ^a
2.5	94.541 ± 0.31 ^b
1	94.444 ± 0.42 ^b
0.75	94.086 ± 0.22 ^{bc}
0.5	93.859 ± 0.45 ^{cd}
0.25	93.421 ± 0.31 ^d

Vertically, values (% AA) followed by the same letter do not differ significantly for ANOVA (p <0.05)

The big valor presented was 95,321 % of capacity antioxidant; It was observed that the extract at lower concentrations obtained 93.421% of capacity antioxidant, being necessary to reduce the concentrations tested to determine the inhibitory concentration 50% (CI_{50%}). The concentration of the solution was reduced to 5 mg/mL to 1 mg/mL (1000 µg/mL) and this solution at concentrations solutions were made at 500, 250, 150, 75 and 50 µg/mL, the results are Table 2.

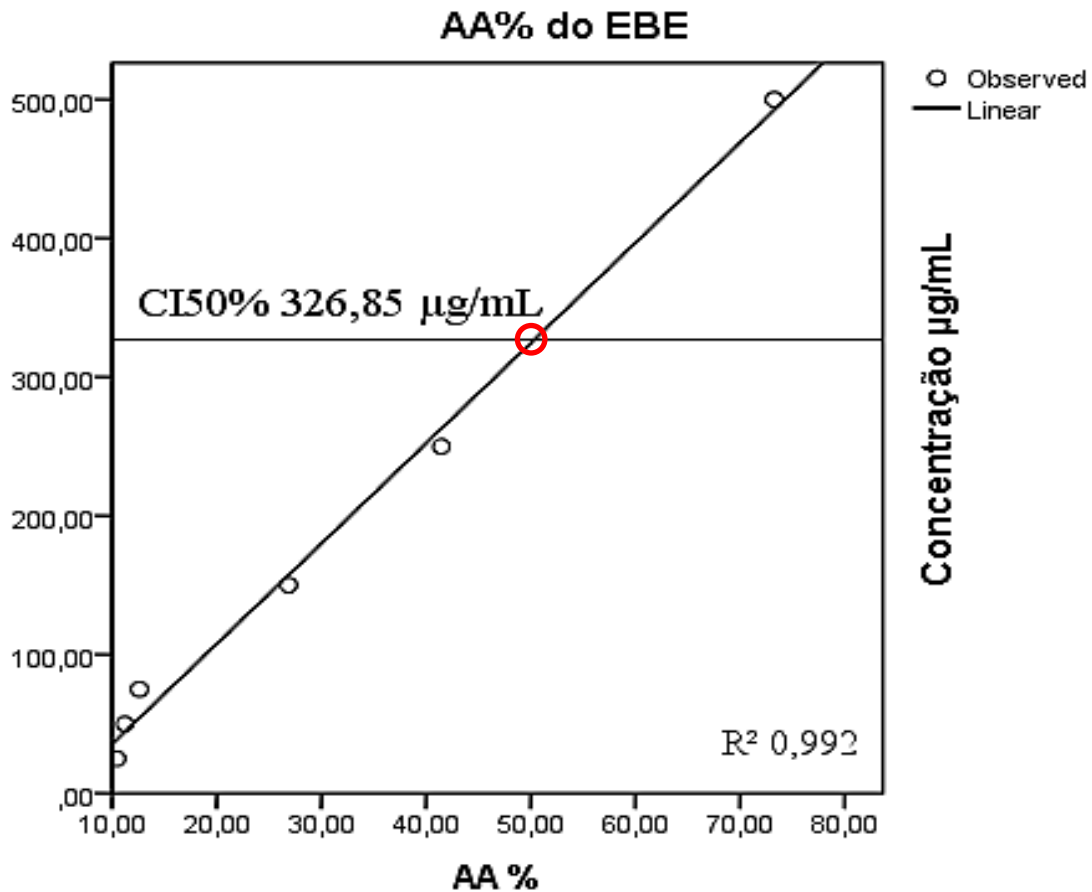
Tabela 2 - Mean and standard deviation of the percentage of antioxidant activity of lower solutions concentration of Ethanoic crude extract of *P. cuspidata*.

concentration (µg/mL)	Capacity Antioxidant (%)
500	73.278 ± 4.87 ^a
250	41.471 ± 1.2 ^b
150	26.869 ± 0.95 ^c
75	11.223 ± 1.21 ^d
50	10.457 ± 1.07 ^d

Vertically, values (% AA) followed by the same letter do not differ significantly for ANOVA (p <0.05)

Using the SPSS software was observed that the results are in congruence with the largest linear regression through it was possible to obtain the CI_{50%} 326.85 µg/ml of the EBE *Pseudoxandra cuspidata*, which was established by linear regression, where R² determination coefficient was 0.992 as shown in Figure 5.

Figura 5 - Relationship between the tested concentrations and antioxidant capacity in% of EBE *P. cuspidata* for Method Linear Regression.



3.2 Larvicidal Activity of crude ethanoic extract *P. cuspidata*

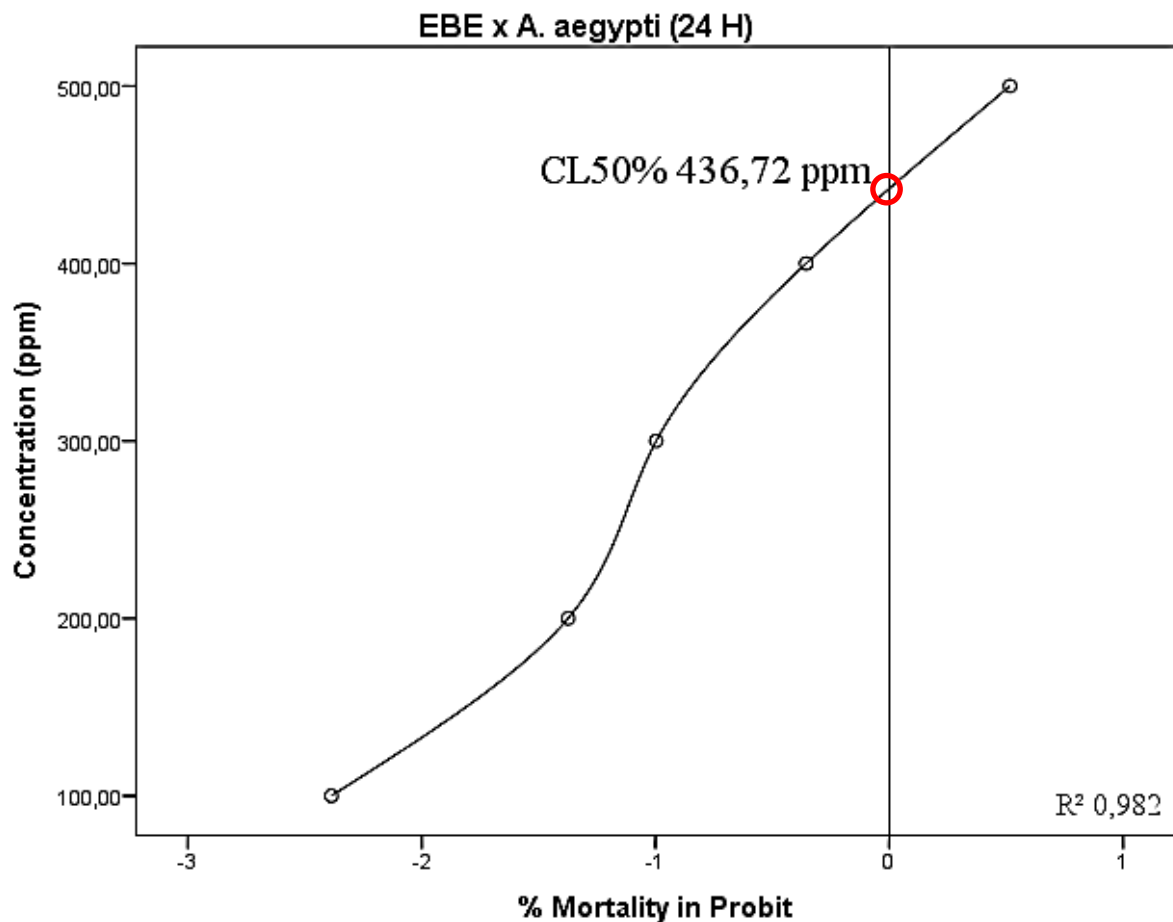
In the survey assessed the potential of the EBE *Pseudoxandra cuspidata* regarding the larvicidal activity against strains of *Aedes aegypti*. During larvicidal activity observed the contact extract (EBE) at different concentrations during the 24 and 48 hours, characterizing acute or delayed larvicidal action. In Table 3 shows the relationship of mortality with contractions.

Tabela 3 - Correlation of mortality and concentrations within 24 and 48 hours EBE *P. cuspidata*.

Mortality %					
concentrations	100 ppm	200 ppm	300 ppm	400 ppm	500 ppm
24 Hours	0.85	8.47	15.94	36.10	69.71
48 Hours	17.06	32.03	47.73	64.80	84.08

To determine $CL_{50\%}$ during the first 24 hours of exposure was performed analyzing the relationship between the data obtained from the mortality (%) x concentration (ppm) in SPSS program in Probit graph to determine the lethal concentration that causes death 50% of the population ($CL_{50\%}$). Significant differences were observed between the means in ANOVA test and confirmed by the Tukey test, where $p < 0.05$ and the results are in the range of 95% confidence interval logo are statistically significant. The $CL_{50\%}$ of EBE for 24 hours was 436,72 ppm, established through regression Probit, as can be seen in Figure 6.

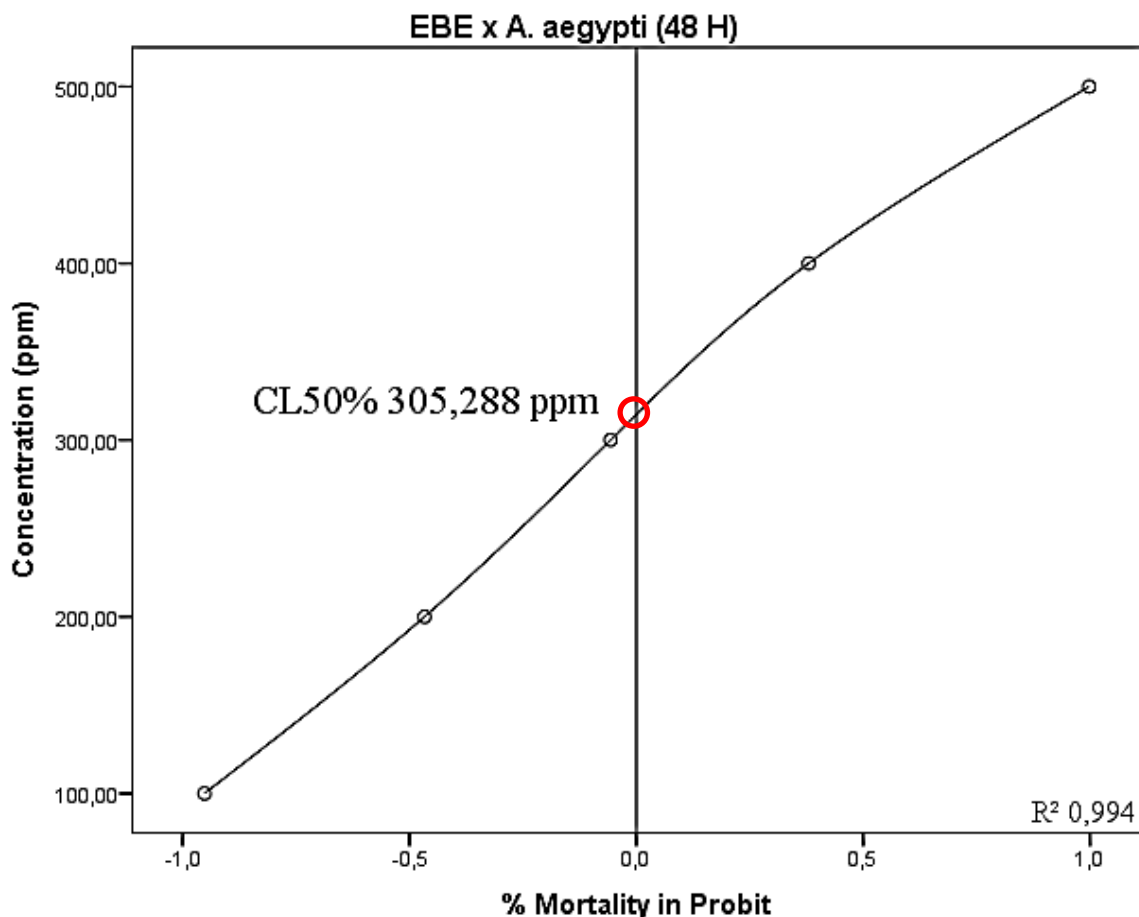
Figura 6 - Relationship of % mortality in probit x EBE's concentrations in 24 hours.



According determination coefficient (R^2) the statistical method has explained the result. The use of Probit aims is to predict the likelihood of an event for any value of stress in the experimental group (at different concentrations), especially for him to make a binary analysis (life and death) as is the case with the larvicidal potential study.

To obtain the $CL_{50\%}$ within 48 hours added to the same period of waiting, just for the larvicidal activity extended were tested. The $CL_{50\%}$ value calculated by Probit regression of EBE was 305.288 ppm as shown in Figure 7.

Figura 7- Mortality rate (%) in 48 hours x EBE concentrations.



It was observed that the EBE increased its larvicide action with 24 hours increased contact with the larvae, featuring prolonged larvicidal action. The presence of alkaloids in its constitution may be presumed as responsible for the larvicidal activity because they possess interactivity with the nervous system [10,11]. In other studies where the majority

of plant species composition was alkaloid action larvicide was proven to *Culex quinquefasciatus* [20].

According to Cheng criteria (2003) [22], the sample is considered potential larvicidal when their $CL_{50\%}$ is below 100 ppm within 48 hours, but it takes into account pure fractions or essential oils with high content purified and low contaminant substances or purpose of substances not shown, soon to plant extracts should review the criteria for characterization of the biocidal potential. At the moment the most affordable and economically viable control of arboviruses is the elimination of the vector through natural biocidal products, elimination of breeding. The biggest problem in relation to chemical insecticides that is caused by use over the production of resistant and/or high rate of adaptability strains, a super-tough vector creates a higher viability for transmission of the virus [17, 23].

The search for alternative methods to be used for controlling the *Aedes* is in evidence, and these methods should provide efficiency, be economically viable, biodegradable and selective. Among the main botanical insecticides are highlighted by the Brazil hold great biodiversity, making the potential in this area of research.

Through the observed results can highlight the antioxidant action against the radical DPPH, other methods of analysis of antioxidant activity should be tested so that it can be established which can involve mechanism of action, and thus demonstrate that the inhibition of oxidative activity can be by primary (a natural product) or synergistic action of various compounds (such as alkaloids). While fighting oxidative stress and free radicals coming from the same EBE also fights intermediate stages of *Aedes aegypti*.

4 CONCLUSION

From the results obtained, it is concluded that the EBE from stem bark of *Pseudoxandra cuspidata* has in its chemical constitution promising secondary metabolites with antioxidant action. The extract showed potential activity larvicide in *Aedes aegypti*, having necessity explore others biological activities and isolation of substances of extract for characterization of the chemical profile.



Acknowledgement

Postgraduate program in Pharmaceutical Sciences – PPGCF (UNIFAP)

Research program for the Brazilian Unified Health System – PPSUS
National Counsel of Technological and Scientific Development – CNPQ

REFERENCES

- [1] C Guarda; JA Lutinski; WA Roman-Junior; MA Busato, *Interciência*, **2016**, 41 (4), 243.
- [2] APB Batista; WCS Aparício; PS Aparicio; VSS Santos; RB Lima; JM Melo, *Pesquisa Florestal Brasileira*, **2015**, 35(81), 21-33.
- [3] LW Chatrou; H Rainer; PJM Maas, *Flowering Plants of the Neotropics*, **2004**, 18- 20.
- [4] PJM Maas; H Rainer; AQ Lobão, *Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*, **2013**.
- [5] JC Lopes; R Mello-Silva, *Revista Brasileira de Fruticultura*, **2014**, 36, 125-131.
- [6] G Gottsberger, *Acta Botanica Brasilica*, **2016**, 1-13.
- [7] PJM Maas; LYT Westra, *Blumea*, **2003**, 48(2), 201-259.
- [8] PJM Maas, *Taxon*, **1983**, 32 (3), 528-529.
- [9] JR Trigo; J Oliveira; EHA Andrade; MGB Zoghbi, *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **2007**, 9(3), 113-116.
- [10] V Roumy, *L'institut National Polytechnique de Toulouse*, **2008**, 1-168.
- [11] COM Simões; EP Schenkel; G Gosmann et al.; Farmacognosia da planta ao medicamento, 5th edition, UFSC/UFRGS publishers, Porto Alegre/Florianopolis, **2010**.
- [12] JC Silva; RG Oliveira Junior; ARPF Ribeiro; MRMC Santos; LJ Quintans Junior; JRGS Almeida, *Revista GRINTEC*, **2015**, 5 (3), 2284-2295.
- [13] ASSC Lúcio, *Universidade Federal da Paraíba*, **2011**, 121.
- [14] GHF Carvalho, *Universidade Federal de Goiás*, **2011**, 54.
- [15] TM Souza; RRD Moreira; RCLR Pietro; VL Isaac, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **2007**, 17(1), 71-75.
- [16] D Lopes-Lutz; DS Alviano; CS Alviano; PP Kolodziejczyk. *Phytochemistry*, **2008**, 69, 1732-1738.
- [17] SP Pitaro; LV Fiorani; N Jorge. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **2012**, 14(4), 686-691.
- [18] WHO World Health Organization. *Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. **2009**.
- [19] GLS Oliveira. *Revista brasileira de plantas mediciniais*. **2015**, 17(1), 36-44.
- [20] JA Ribeiro Neto; JL Teixeira; PJ Gaspar Junior; SN Alves. *Revista Eletrônica de Ciências*. **2012**, 5 (1), 66-74.
- [21] RA Borges; W Arruda; ESF Oliveira; GM Cavasin; HHG Silva; IG Silva. *Revista de Patologia Tropical*. **2012**, 41(2), 222-232.
- [22] SS Cheng; HT Chang; ST Chang; KH Tsai; WJ Chen. *Bioresource Technol*, **2003**, 89, 99-102.

	<p>King Saud University</p> <p>Arabian Journal of Chemistry</p> <p>www.ksu.edu.sa www.sciencedirect.com</p>	
<p>Phytochemistry Prospection, Cytotoxic and Antimicrobial Activity of Ethanol Crude Extract of the <i>Pseudoxandra cuspidata</i> (ANNOACEAE).</p>		
<p>Rangel Carvalho Simões^{1*}; Rosany Lopes Martins¹; Erica de Menezes Rabelo¹; Alex Bruno Lobato Rodrigues¹; Ana Luzia Ferreira Farias¹; Ryan Ramos da Silva¹; Sheylla Susan Moreira da Silva de Almeida²</p>		
<p>¹Department of biological and health sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Post Graduate Program in Pharmaceutical Sciences (PPGCF), Federal University of Amapá, Macapá –Amapá – Brazil.</p>		
<p>²Laboratory of Pharmacognosy and Phytochemistry of the Federal University of Amapá. Federal University of Amapá - Rodovia Juscelino Kubistchek, KM-02. Jardim Marco Zero - Macapá-AP, Brazil</p>		

ABSTRACT

The *Pseudoxandra cuspidata* is popularly known as Lamuci, Envira Lamuci, Black Envira, Yellow and Yellow Envira. It is an arboreal species located in the international Amazon region belonging to the Annonaceae family, it has few reports on its chemical constituents and of their biological potential. The objective of this research was to qualitatively assess the Ethanol Crude Extract of *P. cuspidata*, perform toxicological screening determining its Lethal Concentration in 50% against *Artemia salina* and evaluate the potential antimicrobial against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, determining the CIM and CBM. In the Phytochemical screening of Extract Concentrated, there was a positive result for reducing sugars, phenols, and tannins, alkaloids, purines, cardiac glycosides, catechins and anthraquinones. The lethal concentration in 50% of Ethanol Crude Extract during the cytotoxicity assay with nauplii was 2,565.14 µg/mL, featuring extract as non-toxic or of low toxicity. In relation to the antimicrobial activity, Extract Ethanolic against Gram-positive bacteria *P. aureus* the forehead CIM of 6.25 mg/mL and CBM 100 mg/mL, while for *P. aeruginosa* demonstrated CIM of 1.562 mg/mL and CBM 100 mg/mL, then the same presented antimicrobial activity and bactericidal and bacteriostatic at the concentrations tested. In short, the Ethanol Crude Extract has low toxicity to organisms composed with pharmacological potential, antimicrobial activity, then in subsequent studies should fractionate the extract, and evaluating substances in isolation, in addition, perform tests for antimicrobial activity to other pathogenic bacterial strains.

Keywords: *P. cuspidata*, toxicological, antibacterial, *P. aeruginosa*, *S. aureus*.

1 INTRODUCTION

Medicinal plants synthesize a variety of substances with antimicrobial potential, with a diversity of chemical structures and the specific molecular targets present in pathogenic bacteria (Guimarães et al. 2010). Secondary metabolites of medicinal plants as simple phenols, terpenes, alkaloids, tannin, catechin, coumarin, flavonoid, quinolones and others have this potential, and this could be exploited to the extent that there is a presence of these in the plant extract (Silva, 2010; Silva et al. 2014).

In the current context of bacterial resistance to antimicrobial drugs to search for products with this potential becomes still. Bacterial resistance to synthetic drugs generates high mortality rate and account for the majority of nosocomial infections (Palumbo et al., 2015). These factors are related intrinsic adaptability of each microorganism and the indiscriminate use of antimicrobial drugs (Boscariol, 2013).

The *Pseudomonas aeruginosa* is a gram-negative bacilli causing nosocomial infections and related care health, this disease is related to the respiratory tract, urinary tract, wound and even infections through central venous catheters (Cardinal et al. 2015; Antunes et al. 2016). *Staphylococcus aureus* is a eubacteria, positive in the Gram stain, it has the highest incidence in a hospital environment, its predominant resistance mechanism is the production of beta-lactamases, particularly penicillinase, in which the main target degraded by these enzymes are amoxicillin and staphylococci (Malik et al. 2015). It is part of the resident microflora of the human skin, under normal conditions, it is not pathogenic, but in cases where there is breakage of the skin barrier or reduced immunity can cause skin infections, subcutaneous, postsurgical infections, osteomyelitis, pneumonia, septicemia, bacteremia, myocarditis and toxic shock syndrome (Koneman, 2012; Palumbo; Santos, 2015). Both microorganisms have the resilience to treatment with conventional antibiotics. As an alternative to search for potential new antibiotics, there is a sensitivity test. The same test when used as the protocol, may be used to determine the potential of plant extracts or isolated compounds usable for the antimicrobial treatment of resistant strains (Rocha et al. 2013; CLSI, 2015).

The biotoxicological *Artemia salina* method is used preliminary to an analysis of the natural products. From it is possible to determine the lethal concentration 50% (CL_{50%}) of active compounds of plant extracts in a saline environment. This body may be used as a control for cytotoxicity of natural products (Pereira et al. 2015). The assay allows evaluating the overall toxicity requiring further studies to determine the degree of toxicity to humans.

The *Pseudoxandra cuspidata*, is popularly known as Lamuci, Envira Lamuci, Black Envira, Yellow and Yellow Envira is a shrubby species located in the international Amazon region, belongs to the Annonaceae family, there are few reports of its chemical constituents and their biological activities. Traditional knowledge gives it anti-inflammatory action, anti-malarial and anti-fungal (Maas, 1983; Roumy, 2007).

In this study, we sought to qualitatively evaluate the chemical profile of plant species under study to evaluate toxicity determining the $CL_{50\%}$ and the antimicrobial potential against *P. aeruginosa* and *S. aureus*, determining the CIM and CBM of Ethanol Crude Extract from the bark of stem *Pseudoxandra cuspidata* Maas.

2 MATERIAL AND METHODS

This study possessed qualitative and quantitative character and exploratory nature. The plant species was collected in a particular field in Pedra Branca - Amapá - Brazil. The voucher specimen of the species was cataloged by specialist area, in the Herbarium of the Federal University of Amapá, registration number: 458.

The stem bark collected was stored in an oven at 45 °C for four days, subsequently milled in a knife mill (Model TE-625). The dry milled material was used to prepare the crude ethanol extract (EBE) following the methodology proposed by Carvalho (2011), by maceration for 5 days, the solvent used was ethanol at 96 °GL, the ratio was 1:3 with respect to the raw material, the extractive solution was homogenized every 24 hours. From the filtrate, the solvent was removed by rota-evaporation apparatus.

2.1 Phytochemistry Propection

Preliminary phytochemical analysis followed the methodology proposed by Matos (1997), Simões (2010) and Rose (2016) with adaptations, where it was submitted to phytochemical screening for detection of the major classes of secondary metabolites through chemical reactions and physicochemical that result in color changes, phase formation and/or characteristic form precipitate for every organic class.

2.2 Cytotoxicity in *A. salina*

For the assessment of cytotoxicity of EBE front of larvae of *Artemia salina* Leach microcrustacean the methodology was based on the work of Araújo et al., Lobo et al. (2010) and Szabo (2015). A synthetic sea salt solution with a concentration of 3.5 g/L to 25 mg of incubation brine shrimp eggs Leach was prepared. Subsequently, the solution was exposed to artificial light for 24 hours to hatch and migration (photosensitivity) of nauplius, the larvae were then separated into a dark room for 24 hours to reach the nauplius stage. The nauplii were divided into 6 groups of 10 subjects in each test tube, each group aliquots were added 2500, 1900, 1250, 625, 250, 125 μ L of EBE solution comprising 62.5 mg of plant sample, 28 mL of synthetic sea salt and 2 mL of Tween 80 (5%), then the volume was made up to 5 mL with artificial sea solution. The test was performed in triplicate, counting the number of surviving and dead considering totally immobilized individuals for a period of 10 seconds to determine the $CL_{50\%}$. The results were submitted to analysis Probit, Software IBM SPSS Statistics 20, with 95% confidence intervals.

2.3 Antimicrobial activity

For the evaluation of antimicrobial activity, the microorganisms *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) were used for experiments. The results were expressed by Minimum Inhibitory Concentration (CIM) and Minimum Bactericidal Concentration (CBM). The CIM was determined by dilution method on microplates (96 wells) according to the methodology described according to standard M7-A10 manual adjustments to 38 of CLSI (2015). Analyses were performed in triplicate. To each well was added 100 μ l of Mueller-Hinton broth. Then, in the first well was added 50 μ L of their statement with known concentration a serial dilution of well A1 to A12 pit being performed successively. Subsequently, to each well was added 50 μ L of the inoculum into the wells, innocuous presented in nephelometric turbidity to 0.5 McFarland is equivalent to $1.5 \cdot 10^8$ CFU/mL. As positive control was used amoxicillin (50 mg/ml). On 4 well plate made up the control culture (no antimicrobial agent). In other 4 became the agar sterile control Mueller-Hinton (MHA), in others the control of the solvent system used to extract and solubilization of microorganisms and another control extract. The microplates were incubated for 24 hours at 35 ± 2 °C. The reading was performed in a microplate reader Elisa, the readings were performed after the preparation of the plates (time 0) and after 24 hours with

the absorbance measurements at wavelength 630 nm, post analysis the minimal concentration with difference significant for control negative (DMSO + Sol. saline) will be the CIM. To determine the Minimum Bactericidal Concentration (CBM), plating was carried out on the sample concentrations showed no turbidity in CIM (4 concentrations) using the sterile bacteriological loop. The plates were incubated at $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ for 24 hours, being considered the CBM concentration at which no bacterial growth. The results were submitted for ANOVA posttest Bonferroni.

3 RESULTS AND DISCUSSION

Through preliminary phytochemical analysis was performed to identify classes of secondary metabolites of pharmacological interest present in the extract in the study. Below have the table with the phytochemical screening of EBE (Table 4).

Tabela 4 - Phytochemistry prospecting of gross ethanol extract of *Pseudoxandra cuspidata*.

Organic acids	-
Reducing Sugars	+
Polysaccharides	-
Proteins and amino acids	-
Phenols and Tannins	+
Flavonoids	-
Alkaloids	+
Purines	+
Cardiac glycosides	+
Catechins	+
Sequiterpenolactones and other lactones	-
Anthraquinones	+
Depsidones and Depsidonas	-

Sign (+) the response was positive, Sign (-) negative response.

The ethanol extract of *P. cuspidata* presented as positive important groups that may be related to the cytotoxic and/or antimicrobial activity. The test positive for reducing sugars is related to the presence of glucose, lactose, maltose, galactose, among other sugars commonly found in establishment of plants, they are formed after breaking a ring, making it amenable to react or oxidize (Brasil, 1986; Silva et al. 2014).

For the presence of phenols group, relates mainly antioxidant activity, but because they have variable structure are considered multifunctional (Sartori et al. 2014). The phenolic groups are divided into simple phenols, phenolic acids, coumarins, flavonoids, stilbenes, tannins, lignans and their activity is linked to inhibition of lipoxygenase and lipid peroxidation (Sá et al. 2012).

The *P. cuspidata* well as *Pseudoxandra* genus are rich in alkaloids, this group of secondary metabolites derived from amino acids has affinity for the central nervous system by linking such compounds to the activities such as anti-inflammatory, analgesic, diuretic, acetylcholinesterase, among others (Simões et al. 2010).

The presence of purines or purine bases whether, or not nitrogenous bases such as adenine and guanine, which are present in the production and incorporation of the nucleic acids, highlights the massive presence of nitrogenous compounds in the EBE, and may have other compounds as hypoxanthine, xanthine, theobromine, caffeine, uric acid, important in the metabolism (Sawynok, 2011; Tavares and Sakata, 2012).

There were a positive result for cardiac glycosides, they are also known as digitalis, have as main feature the cardiotonic action, as the main representative of the group Digoxin arising from the *Digitalis purpurea* (Pérez-Alonso et al. 2014) among other studies of these compounds have also antitumor activity (Oliveira et al. 2013).

Other compounds present in EBE are the catechins, colorless organic compounds, water soluble, having organoleptic characteristic and providing bitterness and astringency when it is (Matsubara and Rodriguez-Amaya, 2006). The catechins are known for their strong antioxidant activity, prevention of diabetes mellitus, viral infections, heart disease, inflammation and degenerative diseases (Teixeira et al. 2009; Castro et al. 2013).

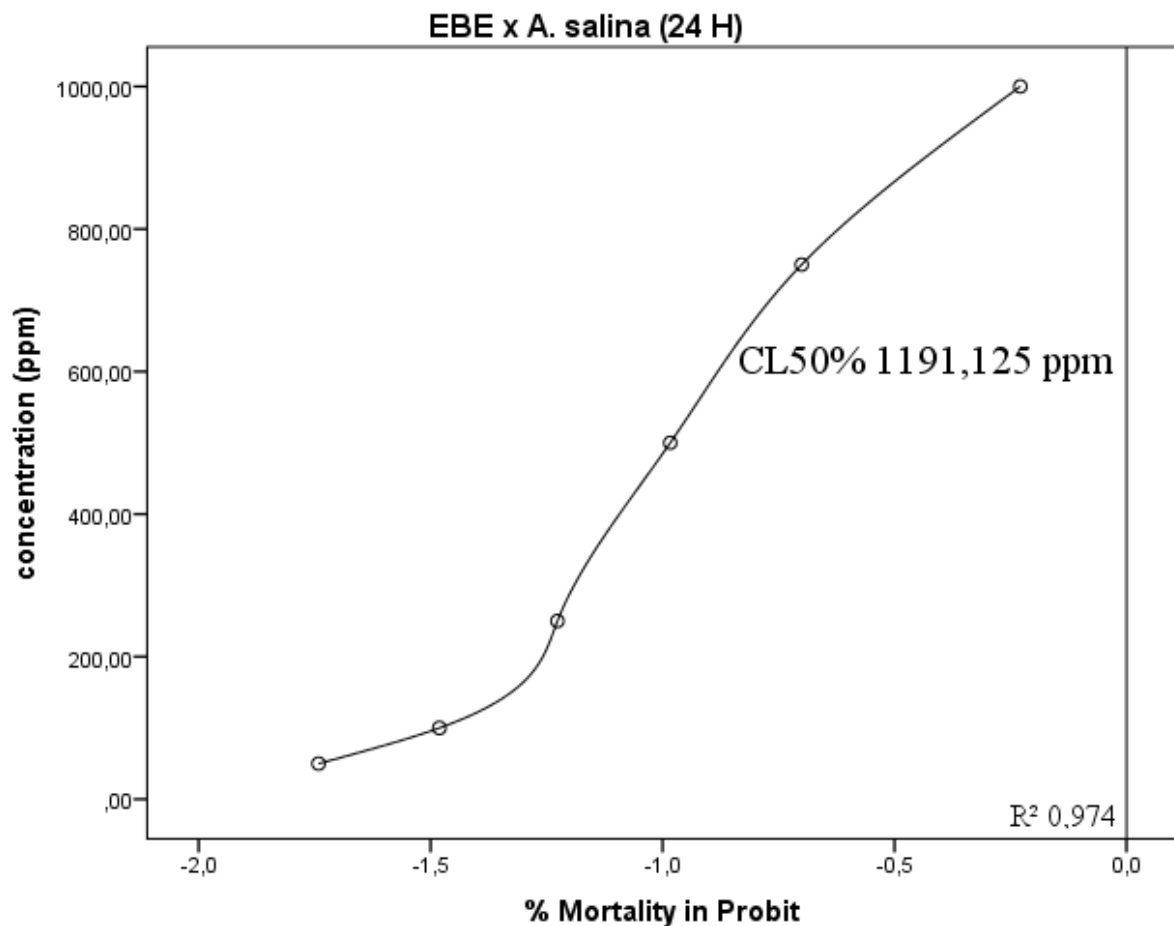
The test was positive for anthraquinone, which are phenolic compounds derived from anthracenes, have laxative action and cathartic (Rosario and Almeida, 2016), there are no reports in the literature of the presence of most of these organic groups in the constitution of this plant species.

Subsequently, there was made the EBE cytotoxicity assay, where it was added at different concentrations in contact with the nauplii for 24 hours, the mortality rate was

calculated and the value of $CL_{50\%}$ was determined by regression Probit, taking into consideration the odds of life and death thereof. To analyze the results, it was used as parameter values established by Amarante et al. (2011), where it related to the degree of toxicity $CL_{50\%}$. The $CL_{50\%}$ considered of low toxicity the found value is $> 500 \mu\text{g/mL}$, for the toxicity is considered moderate value should lies between $500 \mu\text{g/mL} - 100 \mu\text{g/mL}$ and to be held with high toxicity levels $<100 \mu\text{g/mL}$.

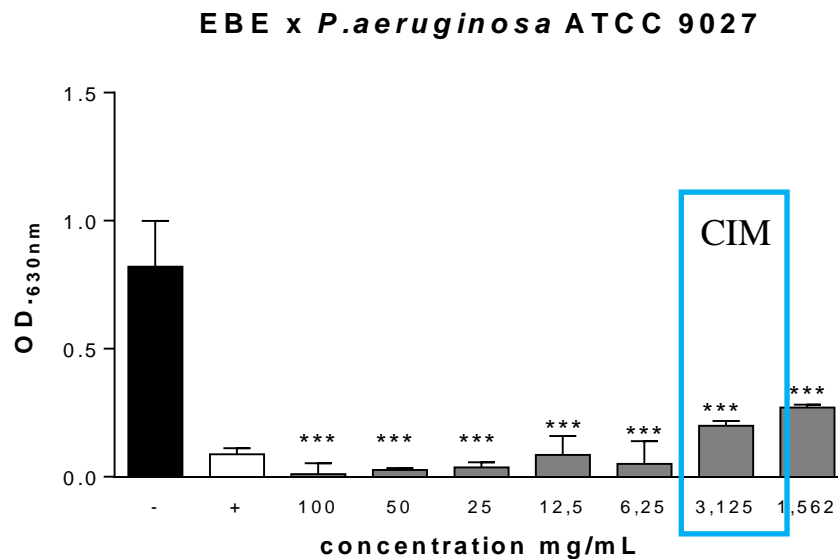
The $CL_{50\%}$ for EBE was $1191.125 \mu\text{g/mL}$ against the nauplii of *Artemia salina* featuring the plant extract with low toxicity and do not represent imminent risk to health or the environment. In the chart below you can see the behavior of mortality in relation to the increased concentration (Figure 8).

Figura 8 - Mortality % (in Probit) of EBE against *A. salina*.



According determination coefficient (R^2) the statistical method has explained the result. On antimicrobial activity readings were performed after preparation of microplates and 24 hours after exposure to microorganisms, was then measured difference of the absorbance at a wavelength of 630 nm in Elisa reader, the difference was used for determining the concentration minimum inhibitory (CIM).

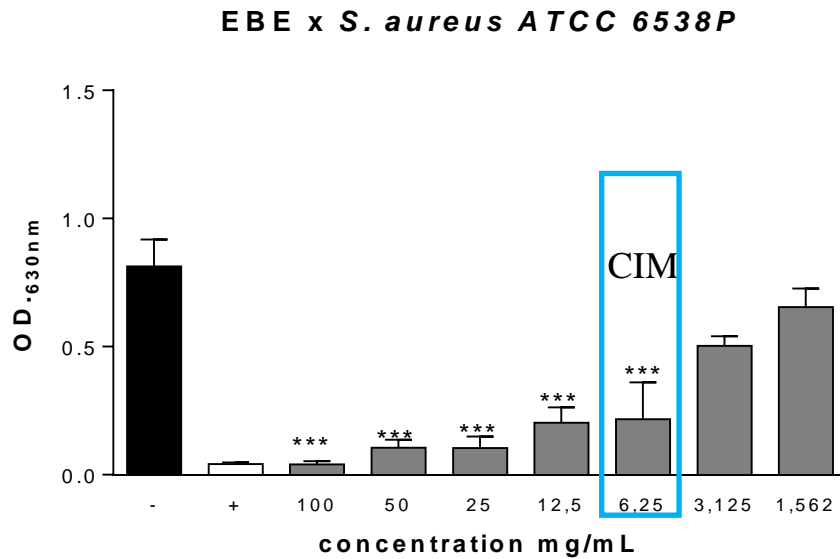
Figura 9 - Sensitivity Test (CIM) EBE of *P. cuspidata* against the *P.*



aeruginosa.

In figure 9, is possible observed effect of the EBE at different concentrations on the bacterial growth of *P. aeruginosa*, AMH with 4% DMSO (negative Control) and Amoxicillin (Positive control). With * concentrations where there was statistically significant difference compared to the negative control ($P < 0.001$). It was observed that at concentrations 1,562 mg/mL to 100 mg/mL of the EBE was no significant difference compared to the negative control according to ANOVA Bonferroni. About bacteria *S. aureus* the CIM was 6,25 mg/mL, demonstrated in Figure 10.

Figura 10 – Sensibility Test CIM of EBE *P. cuspidata* against the *S. aureus*.

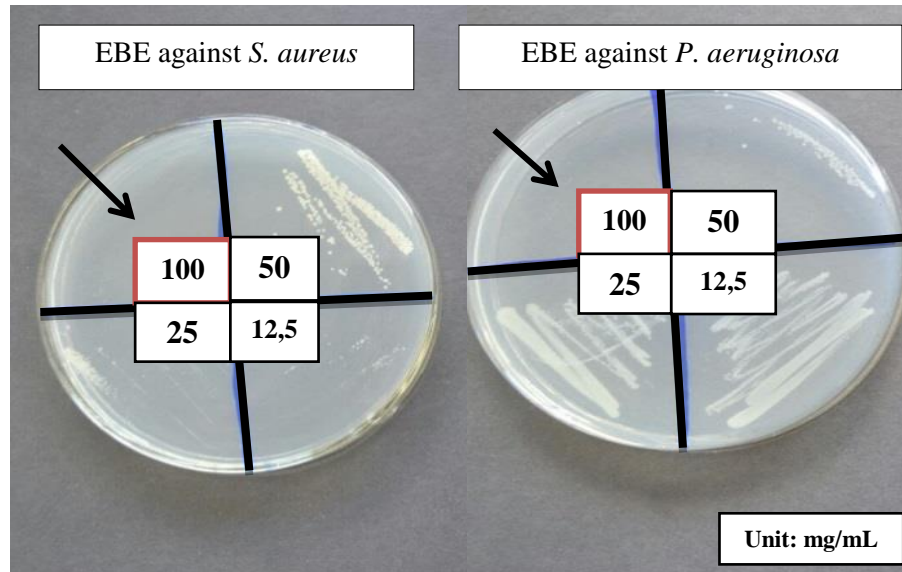


The results entrusted to this plant species are valid in search of natural antibiotics. It was observed that the CIM of the EBE against *P. aeruginosa* in was 1,562 mg/mL. At low concentrations there was an inhibition to bacterial growth characterizing the EBE has in its constitution substances that promote this type of activity.

It was observed that at a concentration of 6.25 mg/mL there was a significant difference in bacterial growth as characterizing the concentration CIM of EBE for *S. aureus*. This difference between the highest activity (inhibition) against a gram-negative bacteria and lower facing the gram-positive, may be related to its possible mechanism of action because there is a morphological difference. While in a substance, there is an outdoor phospholipid layer (ie, dual) and between them, a thin layer of peptidoglycan plus lipopolysaccharide layer (connected to the outer layer) to another has no outer layer, it has a large thick layer of peptidoglycan a phospholipid layer (Tortora et al., 2012). So it is possible that these substances, which inhibit bacterial growth have a tropism for gram-negative bacterial receptors such as lipopolysaccharides, membrane proteins, porins, and thus able to perform locking in one of the stages of bacterial growth.

About CBM, dilutions were selected with no turbidity view, at the concentrations of 100, 50, 25 and 12.5mg/mL. After replacing MH Agar, and 24 hour of incubation (35 ° C) revealed no growth at a concentration of 100 mg/mL being established as it CBM of EBE *P. cuspidata*, as can be seen in Figure 11.

Figura 11 –CBM of EBE front bacteria *P. aeruginosa* in and *S. aureus*.



Source: Author's collection

Antimicrobial drugs act through bactericidal and bacteriostatic. The bactericidal activity leads to cell lysis of prokaryotic cells through various action mechanisms such as inhibition of cell wall synthesis, inhibition of protein synthesis, replication, inhibition of nucleic acids and transcription, damage to the plasma membrane and/or synthesis inhibition essential metabolites. Since the bacteriostatic action is related to bacteriostasis, where the host organism itself via phagocytosis or antibody production destroys the invading organism (Tortora et al. 2012). After setting the bactericidal and bacteriostatic action of EBE *P. cuspidata* suggested in other studies there is the investigation of the mechanism of action of this extract or isolated substances of plant species.

The antimicrobial action of the EBE is related to the presence of several positive organic groups in phytochemical screening that corroborate the results, such as phenols, terpenes, alkaloids, anthraquinones, heart catechins and glycosides that other studies were tested for antimicrobial activity (Schmitz, 2005; FIB, 2010; Farias, 2013).

4 CONCLUSION

Antimicrobial activity associated with low toxicity makes the EBE of *P. cuspidata* promising in preclinical studies, which must be subjected to other tests seeking to fully exploit its potential and to launch the development of a product based on *P. cuspidata* or natural products from this plant species. In further studies chromatographic and spectroscopic

analyses of purified fractions will be performed in addition increase a number of bacterial strains to be tested.

Acknowledgements

Research Program for Health System - PPSUS

National Counsel of Technological and Scientific Development – CNPQ

Funding Sources

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

REFERENCES

Amarante, C. B., Müller, A.H., Póvoa, M.M., Dolabela, M.F. 2011. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). Acta Amaz. 41, 431–434.

Antunes, T.V., Freitas, R.F., Royo, V. A. 2016. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas de *Petiveria alliaceae* L. (Phytolacaceae). Rev. Uni. Val. R. Ver. 14, 448-457.

Araújo, M. G., Cunha, W.R., Veneziani, R.C.S. 2010. 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). Rev. Ciê. Farm. Bás. Apli. 31, 205-209.

Boscariol, R. 2013. Resistência Bacteriana: Avaliação do conhecimento em profissionais farmacêuticos no estado de São Paulo. http://farmacia.uniso.br/prod_discente/2013/pdf/Rodrigo_Boscariol.pdf (Accessed 21.07.2016)

Brasil, Ministério da Agricultura, 1986. Portaria nº 76 de 26 de novembro de 1986. Dispõe sobre os métodos analíticos de bebidas e vinagre. [http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Laborat%C3%B3rios/Metodos%20IQ A/BEV/Ferm%20Alcoolicos/FERM%20ALC%20-%202005%20ACIDEZ%20TOTAL%20OU%20TITULAVEL.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Laborat%C3%B3rios/Metodos%20IQ%20A/BEV/Ferm%20Alcoolicos/FERM%20ALC%20-%202005%20ACIDEZ%20TOTAL%20OU%20TITULAVEL.pdf) (Accessed 09.07.2016)

Cardinal, L.S.M., Cruz, F.A.F., Meneses, J.P., Furtado, G.H. 2015. Análise da terapia antimicrobiana empírica em infecção de corrente sanguínea por *Pseudomonas aeruginosa* em um hospital universitário. Rev. Soc. Bras. Clin. Med. 13, 257-261.

Carvalho, G.H.F. 2011. Atividade Inseticida do Extrato Bruto Etanólico de *Persea americana* (LAURACEAE) sobre larvas e pupas de *Aedes aegypti* (DIPTERA, CULICIDAE). <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tde/1811> (Accessed 09.07.2016)

Castro, V.D., Gualtieri, K.A., Saito, A.Y., Tatakihara, R.I., Oda, J.M.M., Custódio, L.A., Dionizio Filho, P.S.R., Tonon, J., Fujita, T.C., Lopes, L.F., Amarante, M.K. 2013. Análise dos efeitos da epigalocatequina-3-galato (EGCG) de *Camellia sinensis* (chá verde) em modelo de hepatotoxicidade química experimental induzida pela Dietilnitrosamina (DEN). Sem.: Cie. Bio. Sau. 34, 215-228.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2015. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, In: CLSI document M07-A10 (ISBN 1-56238-987-4), Clinical and Laboratory Standards. Pennsylvania, pp 89.

Farias, E.T.N, 2013. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato etanólico de *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae). <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede/handle/tede2/4518> (accessed 07.07.16)

Food Ingredients Brasil (FIB), 2010. Agentes antimicrobianos químicos e naturais. <http://www.revista-fi.com/materias/155.pdf> (accessed 07.07.16).

Guimarães, D.O., Momesso, L.S., Pupo, M.T. 2010. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. Qui. Nov. 33, 667-679.

Koneman, E. W., 2012. Diagnóstico microbiológico texto e atlas colorido, Sixth ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Lôbo, K.M.S., Athayde, A.C.R., Silva, A.M.A., Rodrigues, F.F.G., Lobô, I.S., Bezerra, D.A.C., Costa, J.G.M. 2010. Avaliação da Atividade Antibacteriana e Prospecção Fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. e *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples do Semiárido Paraibano. Rev. Bras. Plant. Med. 12, 227-233.

Maas, P.J.M. 1983. Project Systematics of Annonaceae. Tax. 32, 528-9.

Malik, A., Bai, S., Taneja, R., Dalal, S. 2015. *In vitro* Screening of Some Indian Medicinal Plants for Their Activity against Extended Spectrum Beta Lactamases. Brit. Biotech. Journ. 8, 1-10.

Matos, F. J., 1997. Introdução à fitoquímica experimental. Second ed. UFC Editions, Fortaleza.

Matsubara, S., Rodriguez-Maya, D. 2006. Teores de Catequinas e Teaflavinas em chás comercializados no Brasil. Cie. Tecn. Alim. 26, 401-407.

Oliveira, G.C., Ferreira, L.G.R., Neves, L.D.R., Grego, S.L.A., Villar, J.A.F.P., Barbosa, L.A. 2013. Verificação de efeito antiproliferativo de novos glicosídeos cardíacos. Biochem. Biotech. Rep. 2, 136-139.

Palumbo, J. M. C., Carvalho, R. S., Siqueira, J. M., Magalhães, J. C., Ferreira, J. M. S. 2015. Avaliação *in vitro* da atividade da subfração e substância obtidas das raízes de

Cochlospermum regium em bactérias causadoras de infecções nosocomiais. *Bluc. Bioch. Proc.* 1, 66-67.

Pereira, E.M., Leite Filho, M.T., Mendes, F.A.; Martins, A. N.A.; Rocha, A.P.T. 2015. Potencial toxicológico frente *Artemia salina* em plantas condimentares comercializadas no município de Campina Grande-PB. *Rev. Ver.* 10, 52–56.

Pérez-Alonso, N. L., Labrada, F. A., Pérez, A. C., Pérez, A. P., Sosa, R., Molline, A., González, E. J. 2014. Estimulación de cardenólidos en brotes de *Digitalis purpurea* L. cultivados in vitro mediante elicitores. *Rev. Colom. Biotec.* 16, 51-61.

Rocha, E. A. L. S. S., Carvalho, A. V. O. R., Andrade, S. R. A., Trovão, D. M. M. B., Medeiros, A. C., Costa, E. M. M. B. 2013. Atividade Antimicrobiana “In Vitro” de Extratos Hidroalcoólicos de Plantas Medicinais do Nordeste Brasileiro em Bactérias do Gênero *Streptococcus*. *Pesq. Bras. Odonto. Cli. Integ.* 13, 233-238.

Roumy, V. 2007. Étude Phytochimique de Plantes Amazoniennes D’activité Antiplasmodiale, dont *Pseudoxandra cuspidata* Maas et *Tapirira guianensis* Aubl. <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00000598> (accessed 31.08.2016).

Rosa, R.C.A., Ribeiro, L.R. R., Souza, A. M. G., Fonseca, T. A. 2016. Triagem Fitoquímica dos Extratos Aquosos de *Bauhinia candicans*, *Foeniculum vulgare*, *Mentha pulegium* e *Morus nigra*. *Rev. Con. Cie.* 11, 44-51.

Rosário, A. C. A., Almeida, S. S. M. S. 2016. Análise fitoquímica da espécie *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra). *Est. Cien. UNIFAP.* 6, 35-41.

Sá, P.G.S., Guimarães, A. L., Oliveira, A. P., Siqueira Filho, J. A., Fontana, A. P., Damasceno, P. K. F., Branco, C. R. C., Branco, A., Almeida, J. R.G. S. 2012. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). *Rev. Cie. Farm. Bas. Apl.* 33, 561-566.

Santos, L.S., 2015. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina adquirido na comunidade (CA-MRSA). repositorio.uniceub.br/bitstream/235/6864/1/21234857.pdf (Accessed 21.07.16)

Sartori, C. J., Fonsêca, A. H. C., Mori, F. A. 2014. Teores de Fenóis Totais e Taninos nas Cascas de Angico-vermelho (*Anadenanthera peregrina*). *Flor. e Amb.* 21, 394-400.

Sawynok, J., 2011. Methylxanthines and pain. *Handbook of Experimental Pharmacology.* 200, 311-329.

Schmitz, W. O. Atividades antimicrobiana e quimioprotetora do extrato etanólico de chá verde (*Camellia sinensis*). <http://www.bibliotecadigital.uel.br/document/?code=vtls000147337> (Accessed 20.07.16)

Silva, N.C.C. Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas. www.ibb.unesp.br/posgrad/teses/bga_me_2010_nathalia_silva.pdf (Accessed 20.07.16).

Silva, V. P., Ferreira, D. N., Souza, N. G. G., Alexandre, A. M., Gomes, I. F. A. Moreira, R. T. 2014. Desenvolvimento de sorvetes à base de caldo de cana e avaliação sensorial com crianças. Sem.: Cie. Agr. 35, 813-824.

Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G. et al., 2010. Farmacognosia da Planta ao Medicamento. Sixth ed. Editora Universidade (UFRGS), Porto Alegre.

Szabo, M. E. Estudo fitoquímico e atividades biológicas (antioxidante, antimicrobiana, tóxica e hemolítica *in vitro*) de *Cestrum intermedium* Sendtn. (Solanaceae). acervodigital.ufpr.br/handle/1884/37612 (Accessed 15.06.16).

Tavares, C., Sakata, R. K. 2012. Cafeína para o Tratamento de Dor. Rev. Bras. Anestes. 62, 387-401.

Teixeira, S.S., V. Zancanaro, V., Santos, P. 2009. Eficácia da utilização crônica de infusão de chá verde (*Camellia sinensis*) na redução do colesterol total, colesterol – LDL plasmático e índice de massa corporal em pacientes com hipercolesterolemia. ÁG. Rev. Div. Cient., 16, 662-672.

Tortora, G.J., Funck, B.R., Case, C.L., 2012. Microbiologia, tenth ed. Artmed, Porto Alegre.

CAPÍTULO 2

**Análise do Potencial Antioxidante, Larvicida e Antimicrobiano do Extrato Aquoso-
Ácido de *Pseudoxandra cuspidata* Maas (ANNONACEAE)**

Antioxidant, cytotoxic, and larvicidal Potential and antimicrobial activity of the Watery-acid Extract of *Pseudoxandra cuspidata* (ANNOACEAE)

Simões RC, Martins RL, Rabelo EM, Rodrigues ABL, Farias ALF, Ramos RS, Souto RNP, Almeida SSMS*.

ABSTRACT

The Medicinal Plants are presented as alternative medicine use to treat various diseases, including having an incentive to use by the world health organization. The Annonaceae family has 2,500 species and 135 genera, among them is the gender *Pseudoxandra*, which has about 14 representatives species in Brazil, including the *Pseudoxandra cuspidata*. There are few reports about its chemical constituents and biological activities. The objective of this research was the study of aqueous acid extract (fraction of total alkaloids) of *P. cuspidata* evaluating its antioxidant, larvicide, antimicrobial and cytotoxic potential. The preliminary phytochemical analysis was positive for two organic groups: organic acids and alkaloids. The EBE Demonstrated low antioxidant capacity for test with DPPH, 65% inhibition (concentration 5 ml/mL) and $CI_{50\%}$ was 53,14 mg/mL, but more experiments need be realized for potential definition. The EAA presented against *A. salina* nauplii $CL_{50\%}$ of 600.79 mg/mL for a period of 24 hours. Regarding the larvicidal activity of intermediaries of *Aedes aegypti*, the EAA introduced the $CL_{50\%}$ in 24 hours 475.91 ppm and 290.73 ppm in 48 hours. About the antimicrobial action, EAA showed CIM of 3,125 mg/mL for *P. aeruginosa* and CBM at 100 mg/mL, and submitted for *S. aureus* CIM of 6, 25 mg/mL and showed no CBM. Through this research, we observed the presence of alkaloids and organic acids in the aqueous acid extract of *P. cuspidata*. This extract showed low toxicity compared to *A. saline* microcrustacean, the larvicidal action was classified as an effective and antimicrobial action bacteriostatic for both bacterial strains and bactericidal antimicrobial action only against the microorganism *P. aeruginosa*.

1. INTRODUCTION

Nowadays, much of the world's population uses medicinal plants as an alternative medicinal use to treat various diseases (Carneiro et al., 2014). The World Health Organization (WHO) has estimated that between 65% and 80% of the populations of the developing countries currently use medicinal plants as medicines (WHO, 2011). Furthermore, the development of new products from natural sources should also be encouraged, for about 300,000 species of plants in the world that there are only 15% were studied pharmacologically. Research with the purpose of demonstrating the efficacy and importance of the use of medicinal plants are being carried out worldwide (Palhares et al, 2015; Rovendder et al. 2016.).

The Annonaceae family has approximately 2,500 species and 135 genera, and it can be divided into four subfamilies: Ambavioideae, Anaxagoreoideae, Annonoideae and Malmeoideae (Chatrou et al. 2012.). Most of these species have pharmacological action, as antinociceptive activity due to its greater interaction with the central nervous system, demonstrated in rodents (Diniz et al. 2013). They are usually found in tropical areas of the Americas, Africa, and Asia. Around 900 species can be found in the Neotropics (South America, Central America, parts of Mexico and the Caribbean) (Lopes Mello and Silva; Oliveira Junior et al. 2014).

The *Pseudoxandra* genus belongs to the Malmeoideae subfamily, represented in Brazil by Malmeeae tribe characterized by flowers with imbricated sepals, fruits with free carpídios and an ovum by Carpel (Chatrou et al. 2012) it has about 14 species in Brazil, mostly in the Amazon . They are trees with leaves showing prominent primary rib on top, small and articulate pedicel, and two or more several bracts below the joint and none of the above, also globular buttons, imbricated, rounded and concave petals, and pointed carpels with a marginal ovule and free and globular carpídios, his seed is flat and has equatorial groove (Maas and Westra, 2003). There are few reports about its chemical constituents. Cortes and colleagues (1985-1986) isolated stem bark of isoquinoline alkaloids of two species of *Pseudoxandra*, *P. lucida*, and *P. sclerocarpa*, both found in Colombia.

The plant species *Pseudoxandra cuspidata* Maas (1983) is commonly found in the state of Amapá (Trigo et al. 2007). It has a small number of reports of its chemical constituents and biological potential. In its essential oils were identified 39 constituents and of these, 53% are monoterpenes, 42% sesquiterpenes, and 1 are phenylpropanoid alcohol.

Roumy (2007) isolated and determined 4 stem constituent compounds of *P. cuspidata* and tested its antiplasmodial activity.

Researchers seek plant extracts with antioxidants justifying the fact that they fight free radicals, organic or inorganic molecules, and atoms that contain one or more unpaired electrons, highly unstable and reactive precursors of diseases such as arthritis, cataracts, cancer, diabetes, brain dysfunction, atherosclerosis, cardiac and neurological diseases (Oliveira, 2015; Rodrigues, 2016).

The toxicology bioassay with *Artemia salina* Leach is often used for plant extracts toxicity test. The microcrustacean used is saltwater cosmopolitan, it has simple reproduction, favoring its use in toxicological tests, serves as a screening test for other biological actions such as anticancer, insecticide, molluscicide and antifungal (Rosa et al. 2016).

The control about population of *A. aegypti* was a challenge in developing countries such as Brazil (Zara et al., 2016). The mosquito *A. aegypti* (Linnaeus, 1762) is the vector of arboviruses such as dengue, chikungunya, and zika (Vasconcelos, 2015). The *A. aegypti* develops through complete metamorphosis (holometabolism) going through the stages of egg, larva (4 stages), pupa and adult (Zara et al. 2016; Ribeiro et al. 2016). The fight against mosquitoes occurs mainly in larval stages, when this most vulnerable (Zara et al. 2016; Guarda et al. 2016).

The medicinal plants, such as *P. cuspidata* are of scientific interest as an alternative therapy, particularly against microorganism resistant frame, the possibility of them being used as pesticides (Dutra et al. 2016). The increased control and use without antimicrobials lead to a process of artificial selection of mutant pathogens that exhibit resistance to chemicals commonly used, making the use of antimicrobial agents from natural sources and an effective cost alternative. Thus, antibacterial properties of plant extracts and/or compounds isolated from plants are of great importance in the scientific point of view and public health (Dutra et al. 2016). The objective of this research was the study of aqueous-acid extract (EAA) *P. cuspidata* evaluating its antioxidant potential, larvicide, antimicrobial and cytotoxic.

2. INVESTIGATIONS AND RESULTS

Preliminary phytochemical analysis was positive for two organic groups: organic acids and alkaloids, how can be observed in Table 5; previous studies have reported the presence of these organic groups in phytochemical constitution *P. cuspidata* (Roumy, 2007),

the extraction method was selective and specific, should soon be used as standard as alkaloid extraction march of species.

Tabela 5 - Phytochemical prospection of aqueous-acid extract of *Pseudoxandra cuspidata*.

Organic acids	+
Redutors Sugar	-
Polissacarides	-
Protein e amino-acidos	-
Phenoys and Tannins	-
Flavonoids	-
Alkaloids	+
Purines	-
Cardiac glycosides	-
Catequinas	-
Sequisterpenolactones and other lactones	-
Antraquinones	-
Depsidones and Depsidonas	-

Result positive (+) and negative (-)

The DPPH has free radical scavenging activity based on electron transfer, justifying its use during the test as a control to determine antioxidant activity (Oliveira, 2015). Table 6 is demonstrated the percentage of antioxidant activity for EAA *Pseudoxandra cuspidata*.

Tabela 6 - Antioxidant Capacity of EAA (total alkaloids) of *Pseudoxandra cuspidata*.

Concentration (mg/mL)	Antioxidant capacity (%)
5	64,269 ± 0,9 ^a
2.5	51,994 ± 3,03 ^b
1	37,975 ± 1,85 ^c
0.75	34,623 ± 1,08 ^d
0.5	30,751 ± 2,05 ^d
0.25	25,147 ± 2,19 ^e

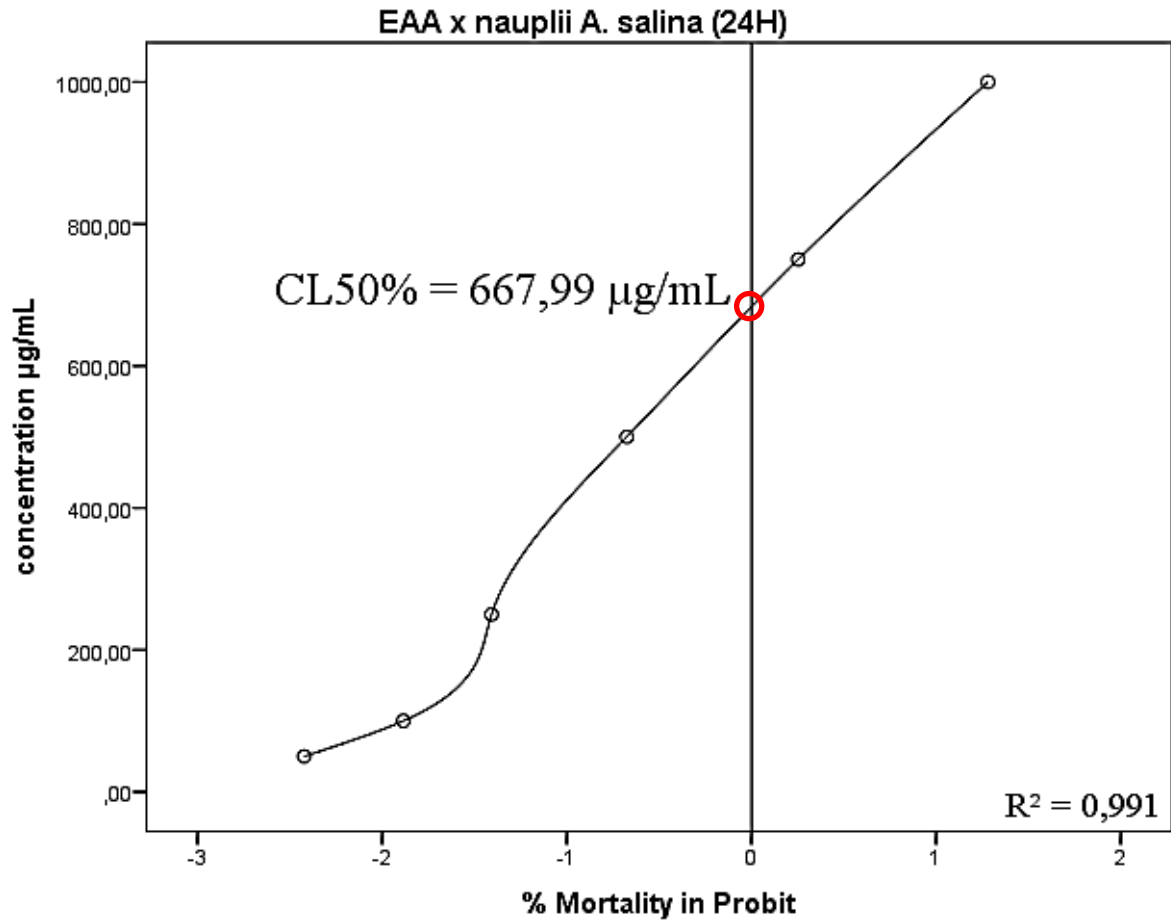
In the vertical, (% AA) values followed by the same letter do not differ significantly for Anova ($p < 0.05$) and Tukey.

The results for regression linear ($Y' = a + bx$) for determination $CI_{50\%}$ observed valor 53, 14 mg/mL, according coefficient of determination (R^2) 0,947 for EAA inhibition of DPPH radical.

2.1. Biotoxicological Assay in *Artemia salina*

The toxicity assay with *Artemia salina* nauplii is based on the amount of dead (mortality rate) tested in different concentrations, posttest It was obtained graphic analysis in probit regression how can observed in the Figure 12.

Figura 12 - Answers to Probit % mortality EAA front *A. salina*.



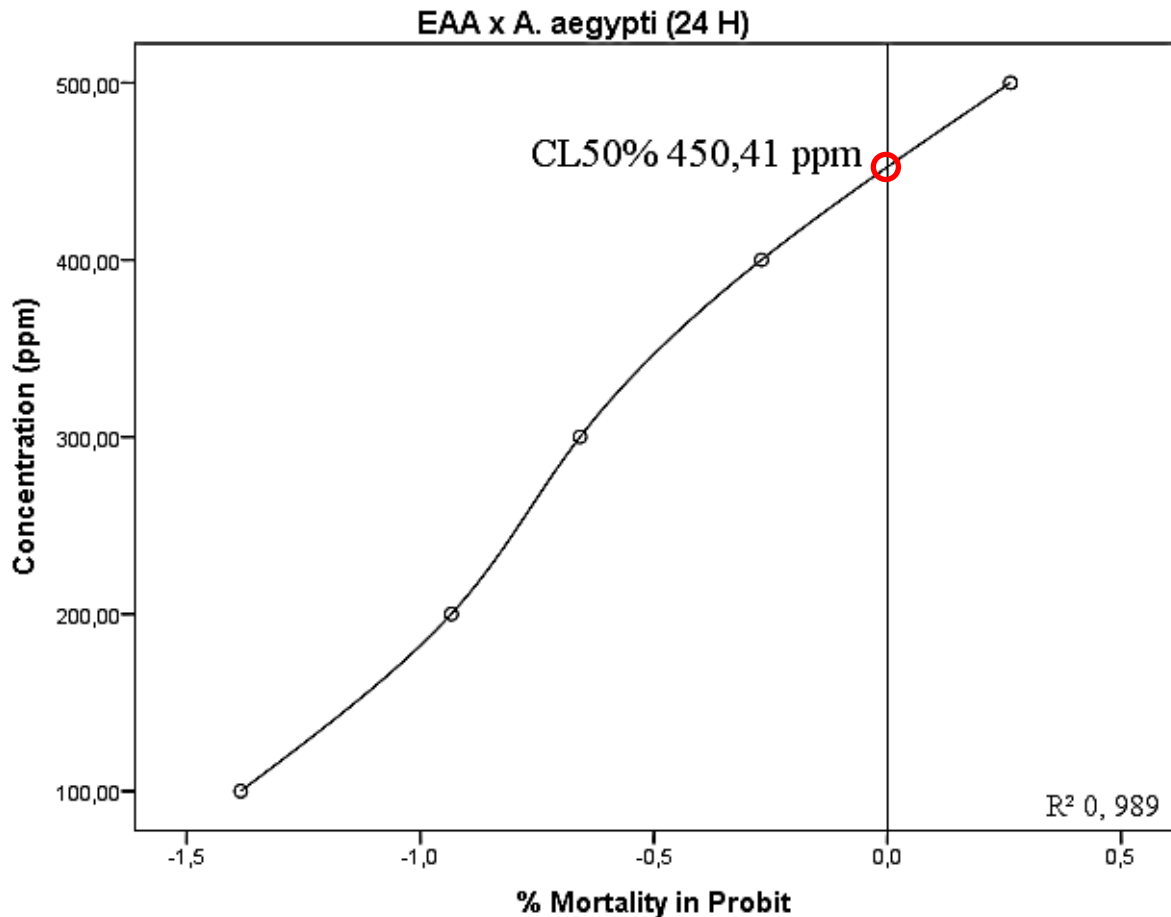
The cytotoxicity of EAA *P. cuspidata* in *A. Salina* obtained was CL_{50%} to 667,99 µg/mL for a period of 24 hours under controlled conditions, the mean mortality was analyzed in Probit the SPSS program, the means being subjected to analysis of variance (ANOVA), there were significant differences, where $p < 0.05$.

2.2. Larvicide Activity of EAA *P. cuspidata*

The chemical control of vectors is as important as vaccines and drug treatments, acting mainly in the prevention of endemic arboviruses in Brazil (Zara et al. 2016). The Insecticides organic or inorganic origin are used as vector control in Public Health (Braga and Valle, 2007; Paumgarten and Delgado 2016). Substances with larvicidal action in immature *A. aegypti* become economically important because it can be a low-cost alternative to population, or may benefit and/or be incorporated into dosage forms leading to the generation of new products (Zara et al. 2016).

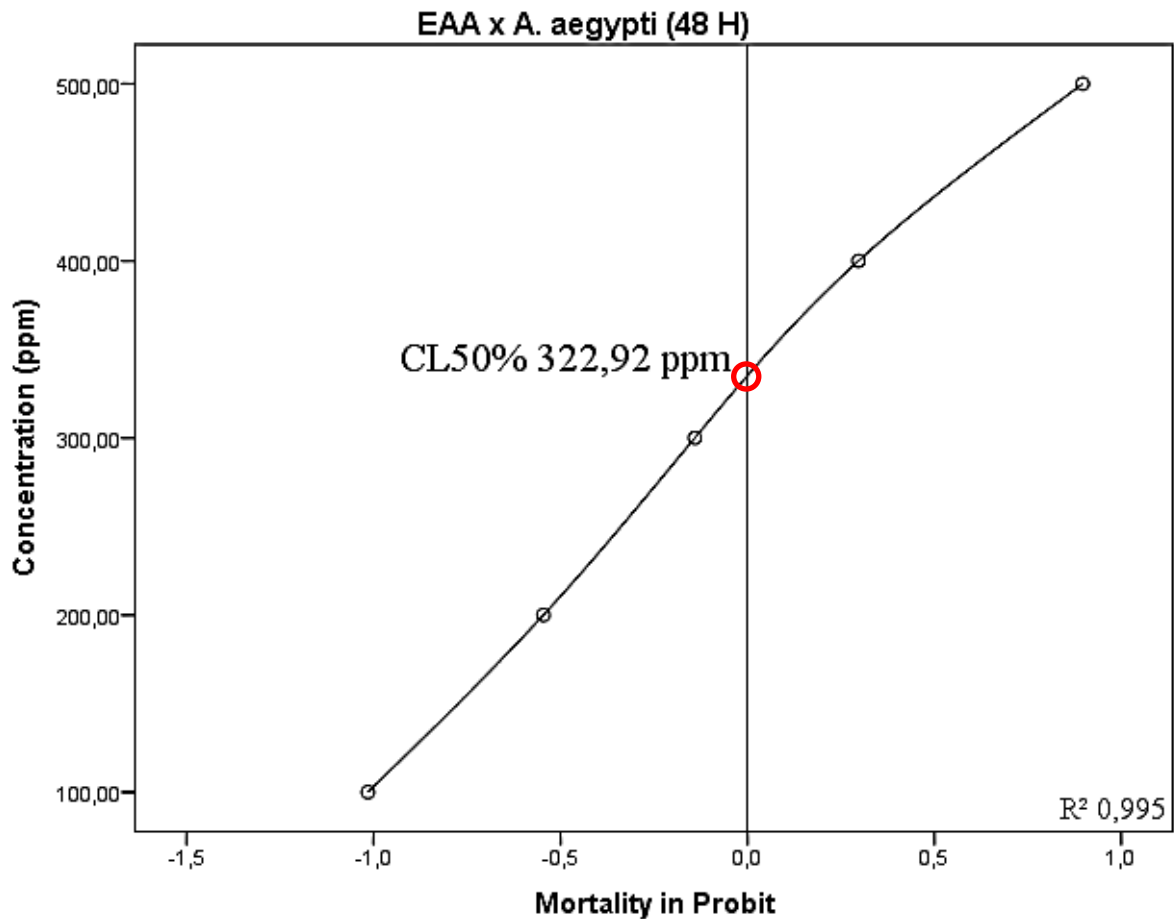
About experiment, the $CL_{50\%}$ in time 24 hours was 450,41 ppm of extract aqueous-acid, in figure 13 is possible observed an relationship between % mortality of larvaes L3 and EAA's concentrations.

Figura 13 - Results mortality % in probit regression of EAA front *A. aegypti* after 24 hours.



After 24 hours there was the analysis of the EAA mortality precisely to determine whether action can be considered acute or waste, it may be that with the time of addition there is higher mortality, which was observed during the test (Figure 14) as the $CL_{50\%}$ was lower (322,92 ppm), characterizing this statement as a biocide effect.

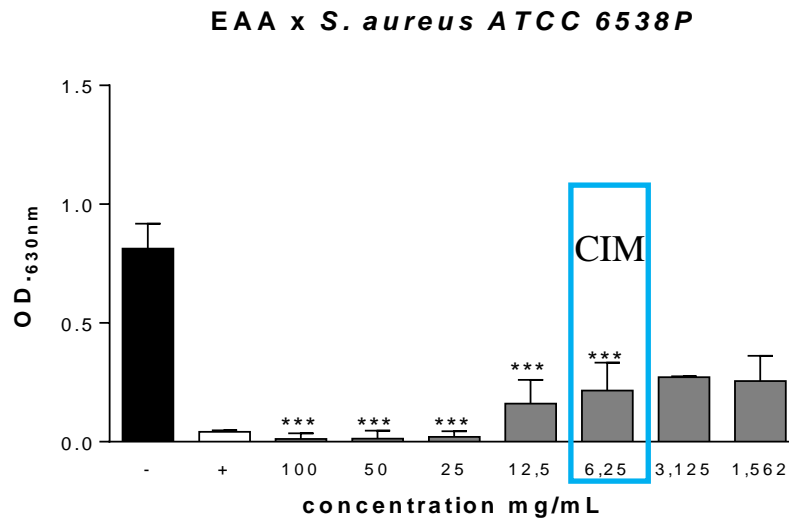
Figura 14 - Results mortality % in probit regression of EAA front *A. aegypti* after 48 hours.



2.3. Antimicrobial Activity of EAA *P. cuspidata*

About analysis antimicrobial of EAA, be defining through the CIM and CBM against microorganisms *S. aureus* and *P. aeruginosa*. It is observed that the EAA dilutions demonstrated significant differences compared to negative control, characterization of inhibition microbial growth. In Figure 15 is exposed the inhibition of the main EAA concentrations in the microtiter plate against *S. aureus*.

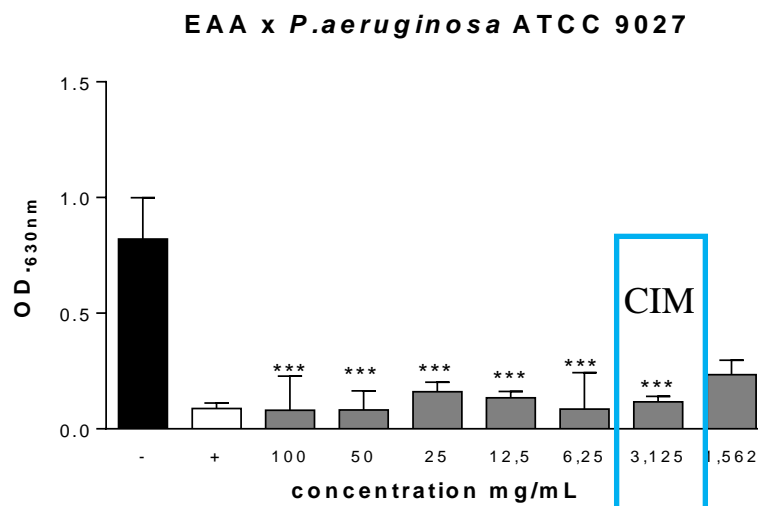
Figura 15 - The EAA *P. cuspidata* sensitivity test against *S. aureus*.



In figure 15, was possible observed effect of the EAA at different concentrations on the bacterial growth of *S. aureus*, the negative control composed by AMH with 4% DMSO and Amoxicillin was positive control. With * concentrations where there was statistically significant difference compared to the negative control ($P < 0.001$). It was observed that at concentrations 6, 25 mg/mL was CIM of EAA, the result demonstrated significant difference compared to the negative control according to ANOVA Bonferroni.

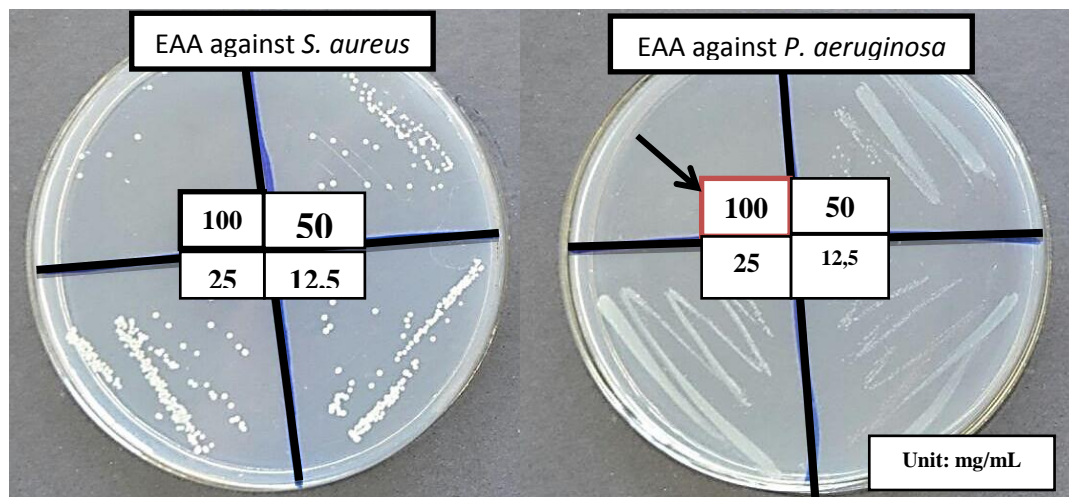
For microorganism *P. aeruginosa*, following the methods for other bacteria, when the CIM was 3,125 mg/mL, expressed in Figure 16.

Figura 16 - The EAA sensitivity test against *P. aeruginosa*.



About the Minimum bactericidal concentration (CBM) were withdrawn of the aliquots concentrations that showed no turbidity in microplates which were the first four (100, 50, 25, 12.5 mg/mL). The result is demonstrated in Figure 6.

Figura 17 - CBM test for EAA of *P. cuspidata* in *S. aureus* and *P. aeruginosa*.



Source: author's collection.

3. DISCUSSION

The *Pseudoxandra cuspidata* species presented presence in your chemical constituent's alkaloids and organic acids. The presence these groups organics is importance for pharmaceutical industry, natural plant alkaloids can be antimalarial agents, for example, quinine and chloroquine, or anticancer agents, how Taxol, Vinblastine and vincristine, or agents promoting blood circulations in brain, how Vincamine, confirming the results of phytochemical screening (Aniszewski, 2015). About organic acids have importance in food industry.

Based on the parameters set by Amarante et al. (2011), where it has a relationship to the degree of toxicity at $CL_{50\%}$. The $CL_{50\%}$ of low toxicity value is above or equal to 500 mg/mL; moderate toxicity value must be between 500 mg/mL to 100/mL and high toxicity is attributed to values under 100 mg/mL.

The $CL_{50\%}$ for EAA characterized the statement with the fraction of total alkaloid with low toxicity (greater than 500 mg/mL), demonstrated that it does not pose an imminent risk to health and the environment and should only have a specialized management (for

professional area) as to its preparation in "potions" or medicinal teas. In the long term, should be performed to control the EAA of the dose-response avoiding cases of poisoning or misuse.

According to Komalamisra and colleagues (2005) classified the larvicidal activity of medicinal plant extracts as effective, moderate or high, depending on the value of CL_{50%} of the extract. larvicidal activity is considered effective when the CL_{50%} of the extract is less than 750 ppm, moderate when between 50-100 ppm and high activity when lower than 50 ppm. In this sense, the EAA presented themselves as effective in periods of 24 and 48 hours of contact with the immature stages of *A. aegypti*.

Monitoring and resistance management and the use of substances with modes of action different from conventional chemical insecticides are of paramount importance for any vector control program. Soon the greater the amount of plant species or synthetic substances with insecticide and great variability action them, bigger and better are the fight against vector. Botanical pesticides are considered important in components of the integrated control (BRAGA and VALLE, 2007).

About results of analysis Antimicrobial, the EAA of *P. cuspidata* inhibited at concentration of 6,25 mg/mL the bacterial growth of *S. aureus*, this is minimum concentration characterized the extract how as bacteriostatic, it prevents the growth letting and its own host organism via phagocytosis or the production of antibodies destroys the invading organism (Tortora et al. 2012). However EAA showed no concentration at which there lysis of gram-positive bacteria *S. aureus* in concentrations, may be related to morphological difference of the bacterial cell wall, altering its specificity to a binding site.

The EAA of *P. cuspidata* against *P. aeruginosa* demonstrated CIM 3,125 mg/mL and showed CBM 100 mg/mL, then showed bactericidal and bacteriostatic action. The bactericidal action can occur by different mechanisms of action such as inhibition of cell wall synthesis, inhibition of protein production, replication, inhibition of nucleic acids and transcription, damage to the plasma membrane and/or inhibition of synthesis of essential metabolites (Tortora et al. 2012; Hoerr et al., 2016).

Another species of Annonaceae family (*Guatteria elliptica* R. E. Fries) rich in alkaloids demonstrated antimicrobial activity by turbidimetric method (Rajca-Ferreira, 2016). So even if the organic group is not known for antimicrobial action, there may be species rich in alkaloids and this activity. Soon further studies should qualify and quantify the alkaloids and organic acids present in the EAA *P. cuspidata* and evaluate new potential biological activities.

4 CONCLUSION

Through this study it was characterized the presence of alkaloids and organic acids present in the aqueous acid extract of *P. cuspidata*. The extract showed low toxicity in relation to the microcrustacean *A. salina*, it showed antioxidant capacity, but he need others methods for chacacterize the potencial antioxidant. From larvicidal action, the extract was classified as an effective and antimicrobial action and bacteriostatic for both bacterial strains and bactericidal antimicrobial action only against the microorganism *P. aeruginosa*.

5. EXPERIMENTAL

5.1. Components of experiments

5.1.1. Extract

The preparation of the raw material and extract followed the criteria of quality control. The bark of the stem of species *Pseudoxandra cuspidata* Maas (1983) was conditioned in an oven at 45 °C for three days, subsequently milled in a knife mill (Model TE-625). Then the extraction was performed of total alkaloids in acid (EAA) following the methodology proposed Simões (2010). During this method the plant drug was pulverized and extracted directly using an acidic aqueous solution (HCl 1 mol/L, H₃PO₄ 0.1 mol/L). The alkaloids were precipitated as free bases by alkalization of the medium with ammonia and extracted with an immiscible organic solvent (petroleum ether).

5.1.2. Larvae conditions

The larvae of *Aedes aegypti* used for analysis are from the insectarium of the Laboratory Arthropoda Federal University of Amapá, all generation Rockefeller in 3 young stage. The biological tests were carried out under controlled conditions of light, temperature and humidity.

5.2. Study's Object

This study of exploratory owned qualitative and quantitative nature. Baseaded in Etnopharmacological studies, used especies vegetable of region Noth of Brazil, with little study with potential for atividades experimentalments tested. The plant species was collected in the municipality of Pedra Branca, in the interior of Amapa State - Brazil. The voucher specimen of the plant species cataloged by specialist area, in the Herbarium of the Federal University of Amapá, registration number: 458.

5.3. Methods Used for Experiments

5.3.1. Preliminary prospecting Phytochemistry

It was done in order to determine which organic groups are present in the EAA based on physico-chemical and chemical reaction resulting in color change, formation of precipitates, phase formation, among other characteristics. The tests were performed according to the methodology proposed by Simões (2010).

5.3.2. Antioxidant capacity of the EAA *P. cuspidata* against radical DPPH

The analysis was performed according to the methodology proposed by Souza et al. (2007) Pitaro et al., (2012) with modifications. Preparation of A solution of DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) 40 mg / ml and solutions with concentrations of 5 EAA; 2.5; 1; 0.75; 0.5 and 0.25 mg / ml in methanol. After 30 minutes of contact of the extract with the inducing agent activity observed the decline of the radical concentration monitored by spectrophotometry in the visible region at $\lambda = 517$ nm. Absorbance measurements were made in a spectrophotometer Biospectro SP-22. The experiment was performed in triplicate and the average absorption was analyzed for each concentration and the positive control. The percentage of antioxidant activity was calculated according to Sousa et al. (2007).

$$AA (\%) = \{ 100 - [(Abs_{\text{sample}} - Abs_{\text{white}} \times 100) / Abs_{\text{control}}] \}$$

AA (%) = Percentage of antioxidant capacity

Abs_{sample} = absorbance of the sample

Abs_{white} = white Absorbance

Abs_{control} = control Absorbance

5.3.3. Preliminary toxicology test of the EAA in *A. salina*

For the assessment of EAA cytotoxicity front of *Artemia salina* Leach, the methodology was based on research of Araújo et al., Lobo et al. (2010) and Szabo (2015). Thus, one synthetic sea salt solution was prepared with a concentration of 3.5 g/L to 25 mg to incubation of *Artemia salina* Leach cysts. Subsequently, the solution was exposed to artificial light for 24 hours to hatch and migration metanauplius then the larvae were separated into a dark (dark phase) for 24 hours to reach the nauplius stage. The nauplii were divided into 6 groups of 10 subjects in each test tube. In each group were added aliquots of 2500, 1900, 1250, 625, 250, 125 μ L of EAA solution comprising 62.5 mg of sample, 28 ml of synthetic sea salt and 2 ml of Tween 80 (5%), then the volume was made up to 5 ml with artificial sea solution. The test was performed in triplicate, counting the number of surviving and dead considering totally immobilized individuals for a period of 10 seconds, to thereby determine the CL_{50%} (lethal concentration of 50 %). The results were submitted to Probit analysis with confidence intervals in 95%.

5.3.4. Larvicidal activity of the EAA *P. cuspidata*

The methodology followed the standard protocol of the World Health Organization (2009) with adaptations. Assays were carried out at concentrations of 500, 400, 300, 200 and 100 ppm of EAA *P. cuspidata*. A stock solution of 465 mg of EAA was solubilized in Tween 80 and dissolved in 93 ml of water to obtain the concentration of 5000 ppm. The solution was diluted to obtain concentrations of 500, 400, 300, 200 and 100 ppm. It was used 10 *Aedes aegypti* larvae in each aliquot. After 24 and 48 hours dead larvae were counted, all those being considered dead that did not move after stirring for a period of 1 minute. The Obtained data of mortality (%) x concentration (ppm) were analyzed using SPSS ® in Probit analysis to determine the CL_{50%}.

5.3.5. Antimicrobial activity of the EAA *P. cuspidata*

For the evaluation of antimicrobial activity, *Pseudomonas aeruginosa* microorganisms were used (ATCC 9027) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P). The results were expressed by Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (CBM). The MIC was determined by dilution method on microplates (96 wells) according to the methodology described and in accordance with the standard M7-A10 Manual 38 CLSI (2015) with some adjustments. The analyses were performed in triplicate. To each well was added 100 μ l broth Mueller-Hinton broth. Then, in the first well was added 50mL of its statement with known concentration, and then conducted to a serial dilution of well A1 to A12 well, successively. Subsequently, to each well was added 50mL of the inoculum into the wells, the innocuous presented in nephelometric turbidity to 0.5 McFarland, which is equivalent to $1,5 \cdot 10^8$ CFU/ml. As a positive control was used amoxicillin (50 mg/mL). On 4 well plate was made up the control culture (no antimicrobial agent). In other 4 was done the agar sterile control Mueller-Hinton (MHA), in others the control of the solvent system used to extract and solubilization of microorganisms and another control extract. The microplates were incubated for 24 hours at 35 ± 2 ° C. The reading was performed in a microplate reader Elisa, after 24 hours with the absorbance measured at 630 nm. To determine the Minimum Bactericidal Concentration, a plating was carried out on the sample concentrations and showed no turbidity in MIC (4 concentrations) using a sterile bacteriological loop. The plates were incubated at 35 °C \pm 2 for 24 hours being considered CBM the lowest concentration that had no bacterial growth.

5.4. Statistical Methods

The statistical methods used were according to the needs of each methodology. While for analysis of antioxidant activity was used a precise and accurate method such as linear regression, to the methodologies involving biological species (*Artemia salina* and *Aedes aegypti*) the method used to take into account the biological variability, life and death, in a probabilistic method applied to determination of a lethal concentration of 50% which was the probit regression. And for all the tests the test normality was verified, it was checked whether the application should be made using parametric and nonparametric methods, and the results were performed by analysis of variances to observe significant differences, and when necessary was subjected to the test Tukey and the results are within the 95% confidence

interval ($p < 0.05$). For statistical analysis utilized program IBM SPSS Statistic 20®, BioEstat 5.3 and GraphPad Prism 6.

Contributions: Faculty and technicians laboratories Arthropoda, Environmental Health and Quality Control of the Federal University of Amapá for mutual cooperation to carry out this research, and the availability of reagents and materials, also teaching that contributed to the production of this article.

Acknowledgements: Postgraduate program in Pharmaceutical Sciences – PPGCF (UNIFAP)
Research program for the Brazilian Unified Health System – PPSUS
National Counsel of Technological and Scientific Development – CNPQ

REFERENCES

- Amarante CB, Müller AH, Póvoa, MM, Dolabela MF (2011) Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). Acta Amaz 41: 431–434.
- Araújo MG, Cunha WR, Veneziani RCS (2010) 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). Rev Cie Farm Bas and Apli 31: 205-209.
- Carneiro FM, Silva JMP, Borges LL, Albernaz LC, Costa JDP (2014) Tendências dos Estudos com Plantas Medicinais no Brasil. Rev Sapiê soc sab and prá educ 3: 44-75.
- Chatrou LW, Pirie MD, Erkens RHJ, Couvreur TLP, Neubig KMJ, Abbott R, Mols JB, Maas JW, Saunders RMK, Chase MW (2012) A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. Bot Journ Lin Soc 169: 5-40.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. In: CLSI document M07-A10 (ISBN 1-56238-987-4), 10th ed., Pennsylvania, p.89.
- Cortes, D. et al. (1986) Alkaloids of Annonaceae LXIV: Minor Alkaloids of the Bark of *Pseudoxandra sclerocarpa*. J Nat Prod, 49:854-8.
- Cortes, D. et al. (1985) Alkaloids of Annonaceae LIII: Alkaloids of *Pseudoxandra* aff *lucida*. J Nat Prod 48: 76-85.
- Diniz TC, Araújo CS, Silva JC, Oliveira Junior RG, Lima-Saraiva SRG, Quintans-Junior LJ, Nunes XP, Almeida JRGS (2013) Phytochemical screening and central nervous system effects of ethanolic extract of *Annona vepretorum* (Annonaceae) in mice. J Med Plant Res 7: 2729-2735.

- Guarda C, Lutinski JA, Roman-Junior WA, Busato MA (2016) Atividade larvicida de produtos naturais e avaliação da susceptibilidade ao inseticida temefós no controle do *A. aegypti* (Diptera: Culicidae), Interc, 41: 243-247.
- Hoerr V, Duggan GE, Zbytnuik L, Poon KKG, Große C, Neugebauer U, Methling K, Löffler B, Vogel HJ (2016) Characterization and prediction of the mechanism of action of antibiotics through NMR metabolomics. *Bio Med Cent* 16: 14.
- Komalamisra N, Trongtokit Y, Rongsriyam Y, Piwathnasorn C (2005) Screening for larvicidal activity in some Thai plants against four mosquito vector species. *Sout Asi Journ Trop Med and Pub Hea* 36: 1412-1422.
- Lôbo KMS, Athayde ACR, Silva AMA, Rodrigues FFG, Lobô IS, Bezerra DAC, Costa JGM (2010) Avaliação da Atividade Antibacteriana e Prospecção Fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. e *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples do Semiárido Paraibano. *Rev Bras Plant Med*, 12: 227-233.
- Lopes JC, Mello-Silva R (2014) Annonaceae da Reserva Natural Vale Linhares. *Rodrig* 65: 599-635.
- Maas PJM, Westra LYT (2003) Revision of the neotropical genus *Pseudoxandra*. *Blumea* 48: 201-259.
- Oliveira Junior RG, Rabelô SV, Araújo CS, Silva JC, Diniz TC, Almeida JRGS (2014) Prospecção tecnológica do gênero *Annona* (ANNONACEAE). *Rev GEINTEC* 4: 850-858.
- Oliveira GLS (2015) Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH•: estudo de revisão. *Rev bras plant med* 17: 36-44.
- Paumgarten FJR, Delgado IF (2016) Repelentes de mosquitos, eficácia para prevenção de doenças e segurança do uso na gravidez. *Rev Vigil Sanit deb* 4: 97-104.
- Pitaro SP, Fiorani LV, Jorge N (2012) Potencial antioxidante dos extratos de manjeriço (*Ocimum basilicum* Lamiaceae) e orégano (*Origanum vulgare* Lamiaceae) em óleo de soja. *Rev Bras Plant Med* 14: 686-691.
- Rajca-Ferreira AK (2016) Análise Química e atividades biológicas de *Guatteria elliptica* R. E. Fries (Annonaceae). Available at <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9138/tde-19052016-150855/pt-br.php>. Accessed September 04, 2016.
- Ribeiro LP, Ansante TF, Vendramim JD (2016) Efeito do extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* no desenvolvimento e comportamento alimentar de *Spodoptera frugiperda*. *Brag* 75: 322-330.
- Rodrigues PSM (2016) Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e antineoplásica dos extratos etanólicos da casca e folhas da *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc (COMBRETACEAE). Available at <http://repositorio.uft.edu.br/handle/11612/250>. Accessed September 04, 2016.

Rosa RCA, Ribeiro LRR, Souza AMG, Fonseca TA (2016) Triagem Fitoquímica dos Extratos Aquosos de *Bauhinia candicans*, *Foeniculum vulgare*, *Mentha pulegium* e *Morus nigra*. Rev Conex Ciê 11: 44-51.

Roumy V (2007) Étude Phytochimique de Plantes Amazoniennes D'activité Antiplasmodiale, dont *Pseudoxandra cuspidata* Maas et *Tapirira guianensis* Aubl. Available at <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00000598/01/roumy.pdf>. Accessed September 04, 2016.

Rovendder APM, Piazza EM, Thomas PA, Felker RM, Hummel RB, Farias JA (2016) Potential medicinal use of forest species of the Deciduous Seasonal Forest from Atlantic Forest Biome, South Brazil. Brazi Arch Biol and Tech 59:11.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G et al. (2007) Alcaloids: generalidades e aspectos básicos. In: Farmacognosia da Planta ao Medicamento. 6th ed., Porto Alegre, p. 1104.

Souza TM et al. (2007) Avaliação da Atividade Antisséptica de Extrato Seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de Preparação Cosmética Contendo este Extrato. Rev Bras Farmacogn 17: 71-75.

Szabo ME (2015) Estudo fitoquímico e atividades biológicas (antioxidante, antimicrobiana, tóxica e hemolítica *in vitro*) de *Cestrum intermedium* Sendtn. (Solanaceae). Available at acervodigital.ufpr.br/handle/1884/37612. Accessed September 04, 2016.

Tortora GJ, Funkr BR, Case CL (2012) Microbiologia. In: Tortora GJ, 10th Ed. Porto Alegre, p. 553-565.

TRIGO, J.R. et al. (2007) Óleos essenciais de espécies de Annonaceae que ocorrem no Pará: *Guatteria schomburgkiana* Mart. e *Pseudoxandra cuspidata* Maas. Revi Bras Plant Med 9: 113-116.

Vasconcelos PFC (2015) Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas?. Rev Pan-Amaz Sau 6: 9-10.

WHO World Health Organization (2009). *Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. Available at <http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>. Accessed September 04, 2016.

Zara ALSA, Santos SM, Oliveira-Fernandes ES, Carvalho RG, Coelho GE (2016) Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. Epidem and Serv Saú 25: 391-404.

Aniszewski T (2015) Definition. In: ALKALOIDS: chemistry, biology, ecology, and applications. 2nd Ed. Elsevier. 2015. p. 1-473.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Essa pesquisa abriu perspectivas quanto ao uso da *Pseudoxandra cuspidata* para atividades biológicas diferentes das alegações do conhecimento empírico. Enquanto o extrato aquoso-acido demonstrou resultados significativos quanto a atividade antimicrobiana, resultado associado a presença de alcaloides. O extrato etanólico demonstrou potencial antioxidante; o que ressalta que nas cascas do caule de *P. cuspidata* há grupos orgânicos com potenciais distintos.

Os extratos concentrados de *Pseudoxandra cuspidata* apresentaram-se como complexos fitoquímicos de grupos orgânicos de interesse químico-farmacêutico, pois ao mesmo tempo em que substâncias antioxidantes são utilizadas em produtos de beleza e para aumentar a estabilidade e o tempo médio de vida de produtos, substâncias antimicrobianas são utilizadas em medicamentos, fitoterápicos, fitofármacos, antissépticos, etc. Caracterizando que ambos os extratos apresentaram diferença significativa quanto aos resultados e potencial utilização.

Em estudos posteriores os extratos devem-se ser testados para outras atividades biológicas, principalmente aquelas ligadas aos testes realizados nessa pesquisa. Há a necessidade de caracterização fitoquímica e elucidação dos compostos orgânicos majoritários para que se possam definir quais seriam os marcadores fitoquímico e farmacológico da espécie.

Nas próximas pesquisas devem-se ser testados contra outras cepas bacterianas patogênicas a fim de determinar o espectro de ação desses compostos dos extratos, pois os resultados foram promissores para ambos os extratos, podendo estar relacionado a presença do grupo de alcaloides.

A espécie vegetal *Pseudoxandra cuspidata* pertence á vegetação silvestre da Amazônia, é uma das muitas que são recorrentes vitimas da agricultura, queimadas ou extravios madeireiros, logo a importância desse estudo se amplia sob esse ponto de vista, pois o uso de forma sustentável dessa vegetação pode atribuir valor a espécie e torna-se uma das medidas utilizáveis para justificar sua conservação.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M.R.; LIMA, J.A.; SANTOS, N.P.; PINTO, A.C. Pereirina: o primeiro alcaloide isolado no Brasil?. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, n. 4, p. 942-952, 2009.

AMARANTE, C. B.; MÜLLER, A.H.; PÓVOA, M.M.; DOLABELA, M.F. 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, n. 3, p. 431-434, 2011.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP (APG). 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, 2009.

AQUINO, P.; FIGUEIREDO, F.G.; PEREIRA, N. et al. Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica e antibacteriana do extrato metanólico das folhas de *Sideroxylon obtusifolium*. **Acta biol. Colomb.** v. 21, n.1, p. 131-140, 2016.

ARAKAKI, D.G. Atividade Antioxidante *in vitro* e *in vivo* da Polpa do Jatobá-do-Cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.). 2015. 63f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2015.

BADKE, M.R. et al. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde como o uso de plantas medicinais. **Texto&Contexto – Enfermagem**. v. 21, n. 2, p. 367-370, 2012.

BARBOSA, L.B.G. COMPOSTOS BIOATIVOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM ABÓBORAS-GILA (*Cucurbita ficifolia* Bouché). 2015. 31p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. Handbook of essential oils. **Science, technology, and applications CRC Press**, p. 994, 2012.

BECKER, F.S. Desenvolvimento, Caracterização e Atividade Antioxidante de Marmelada-De-Cachorro. 2015. 133p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015

BENTO, E.B.; MONTEIRO, A.B.; LEMOS, I.C.S.; BRITO JUNIOR, F.E.; OLIVEIRA, D.R.; MENEZES, I.R.A.; KERNTOPF, M.R. Estudo etnofarmacológico comparativo na região do Araripe da *Annona muricata* L. (Graviola). *Revista cubana de Plantas Medicinales*. v. 21, n. 1, p. 9-19, 2016.

BERNARD, E. (ed.). Inventários Biológicos Rápidos no Parque Nacional Montanhas do Tumucumaque, Amapá, Brasil. RAP Bulletin of Biological Assessment 48. Conservation International, Arlington, VA. 2008. p. 110.

BESERRA, E.B.; CASTRO JUNIOR, F.P.; SANTOS, J.W.; SANTOS, T.S.; FERNANDES, C.R.M. Biologia e Exigências Térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Provenientes de Quatro Regiões Bioclimáticas da Paraíba. **Neotropical Entomology**. v. 35, n.6, p.853-860, 2006.

BESSA, N.G.F.; BORGES, J.C.M. BESERRA, F.P.; CARVALHO, R.H.A.; PEREIRA, M.A.B.; FAGUNDES, R.; CAMPOS, S.L.; RIBEIRO, L.U.; QUIRINO, M.S.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; ALVES, A. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.4, p.692-707, 2013.

BIESEK, S.; ALVES, L.A.; GUERRA, I. Estratégias de Nutrição e Suplementação no Esporte. 3ª edição. Barueri : Editora Manole LTDA, 2015.

BOSCARIOL, R. Resistência Bacteriana: Avaliação Do Conhecimento Em Profissionais Farmacêuticos No Estado De São Paulo. 2013. 92f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Sorocaba, Sorocaba. 2013.

BOSCOLO, O. H. Para comer, para beber ou para remédio? Categorias de uso múltiplo em Etnobotânica. **Caderno UniFOA**.v.1, n.1, p.61 –67, 2013.

BRADY, J.O.; GETHING, P.W.; BHATT, S.; MESSINA, J.P.; BROWNSTEIN, J.S.; HOEN, A.G. et al. Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. **PLoS negl Trop Dis**.v.6, n.8, p. 1-15, 2012.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 10, de 09 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. ANVISA Publicações Eletrônicas. 2010. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0010_09_03_2010.html>. Acesso em 21 de setembro de 2016.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 26, de 13 de Maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. ANVISA Publicações Eletrônicas. 2014. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0026_13_05_2014.pdf/d6e5b9d7-dc13-46ce-bfaa-6af74e8a2703>. Acesso em 21 de setembro de 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde (BR). Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. 2007. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/politica_plantas_mediciniais_fitoterapia.pdf>. Acesso em 22 de Setembro de 2016.

CANTIONÍLIO, E. R.; SILVA, M. C.. Controle do *Aedes aegypti*: um tema norteador para o ensino de Biologia e Química. 2013. 87f. Monografia (Curso de Ciências da Natureza - Licenciatura em Biologia e Química) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2013.

CARNEIRO, F.M.; SILVA, J.M.P.; BORGES, L.L.; ALBERNAZ, L.C.; COSTA, J.D.P. TENDÊNCIAS DOS ESTUDOS COM PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**. v.3, n. 2, p.44-75, 2014.

CARVALHO, G.H.F. Atividade Inseticida do Extrato Bruto Etanólico de *Persea americana* (LAURACEAE) sobre larvas e pupas de *Aedes aegypti* (DIPTERA, CULICIDAE). Dissertação (Mestrado). 2011. 54f. Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

CASTRO JUNIOR, F.P.; MARTINS, W.F.S.; LUCENA FILHO, M.L.; ALMEIDA, R.P.; BESERRA, E.B. Ciclos de vida comparados de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) do semiárido da Paraíba. **Iheringia Série Zoologia**. v. 103, n. 2, 2013.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention.2016. Disponível em:<<http://www.cdc.gov/ncbddd/birthdefects/microcephaly.html>>. Acesso em: 22 de setembro de 2016.

CHATROU, L. W.; PIRIE, M.D.; ERKENS, R.H. et al. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 169, p. 5-40, 2012.

CHATROU, L.W.; RAINER, H.; MAAS, P.J.M. Annonaceae. **Flowering plants of the neotropics**. v. p.18- 20, 2004.

COA-LORMEAU, V.M.; BLAKE, A.; LASTÈRE, S. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **The lancet**. v. 387, p. 1531-1539, 2016.

CONSOLI, A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz, 228 p. 1994.

CORRÊA, C.C.; ALVES, A.F.; Plantas Medicinais como Alternativa de Negócios: Caracterização e Importância. XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Rio Branco, Acre, 2008.

CORTES, D. et al. Alkaloids of Annonaceae. LXIV. Minor Alkaloids of the Bark of *Pseudoxandra sclerocarpa*. **Journal of Natural Product**, v.49, n.5, p.854-8, 1986.

CORTES, D. et al. Alkaloids of Annonaceae.LIII. Alkaloids of *Pseudoxandra* aff. *Lucida*, Study of Antioquine and its Derivatives. **Journal of Natural Product**. v.48, n.1, p.76-85, 1985.

COSTA, D.A.; OLIVEIRA, G.A.L.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Avaliação do potencial antioxidante in vitro do composto ciano-carvona. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 33, n. 4, p. 567-575, 2012.

DUNDARUZ, R.; ERENBERKA, U.; TUREL, O.; DEMIR, A.D.; OZKAYAA, E.; EREL, O. Oxidative and antioxidative status of children with acute Bronchiolitis. **Jornal de pediatria**.v.89, n.4, p. 407-411, 2013.

FONSECA, V. M.; CUNHA, A. M. O. Amazônia Brasileira, Recursos Hídricos e o “Novo Código Florestal”: uma leitura reflexivo-crítica!. **Observatorium: Revista Eletrônica de Geografia**, v.5, n.14, p. 40-62, out. 2013.

FUJITANI, S. et al. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. Part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source. **Chest Journal**, v. 139, p. 909-919, 2011.

FUNK, V.; HOLOWELL,T.; BERRY, P. et al. Checklist of the Plants of the Guiana Shield (VENEZUELA: Amazonas, Bolivar, Delta Amacuro; GUYANA, SURINAM, FRENCH GUIANA).Department of Botany, Washington, 2007.

GUARDA, C.; LUTINSKI, J.A.; ROMAN-JUNIOR, W.A.; BUSATO, M.A. Atividade larvicida de produtos naturais e avaliação da susceptibilidade ao inseticida temefós no controle do *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE). **Interciência**, v. 41, n. 4, p. 243, 2016.

GUIMARÃES, M.G.A.; SERDEIRO, M.T.; OLIVEIRA, A.A.; MALECK, M. Desenvolvimento, Viabilidade e Mortalidade de Imaturos de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* Linnaeus, em Água de Duas Espécies de Bromélias: Estudo Bibliográfico e Experimental. **Entomo Brasilis**. v.8, n.3, p.214-221, 2015.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Arch Toxicol**, v. 86, n. 3, p. 345-391, 2012.

GUY, B.; SAVILLE, M.; LANG, J.; SIQUEIRA JUNIOR, J.B.; BRICKS, L.F. Desenvolvimento de uma vacina tetravalente contra dengue. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. v.2 n.2, 2011.

KHAN, H. Berberine: As a Therapeutic Target for Treating Obese Diabetes. **SciForschen Journal of Diabetes Research and Therapy**. v. 2, n. 1, 2016.

KIILL, L.H.P.; COSTA, J.G. Biologia floral e sistema de reprodução de *Annona squamosa* L. (Annonaceae) na região de Petrolina-PE. **Ciência Rural**. v.33, n.5, p.851-856, 2003.

LEISNER, J.J.; JØRGENSEN, N.O.G.; MIDDELBOE, M. Predation and selection for antibiotic resistance in natural environments. **Evolutionary Applications**. v. 9, n. 3, p. 427-434, 2016.

LIMA, L.I. Desenvolvimento de uma nanoformulação autoemulsificante contendo o alcaloide epiisopiloturina para melhorar sua biodisponibilidade plasmática após administração via oral. 2016.61f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

LIMA, P.G.C.; FERREIRA-COELHO, M.; SANTOS, R.S. A floresta na feira: plantas medicinais do município de Itaituba, Pará, Brasil. **Fragmentos de Cultura**. v. 24, n. 2, p. 285-301, 2014.

LOPES, J.C.; MELLO-SILVA, R. Annonaceae da Reserva Natural Vale Linhares, Espírito Santo. **Rodriguésia**. v. 65, n. 3, p. 599-635, 2014.

MAAS, P.J.M. Project Systematics of Annonaceae. **Taxon**. v.32, n.3, p.528-9, 1983.

MAAS, P.J.M.; RAINER, H.; LOBÃO, A.Q. Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110572>>. Acesso em: 8 março de 2013.

MAAS, P.J.M.; WESTRA, L.Y.T. Revision of the neotropical genus *Pseudoxandra*. **Blumea**, Holanda, v. 48, n. 2, p. 201-259, 2003.

MAI, C.T.; KUCIK, J.E.; ISENBURG, J. et al. Selected Birth Defects Data from Population-Based Birth Defects Surveillance Programs in the United States, 2006 to 2010: Featuring Trisomy Conditions. **Birth Defects Research**. Part A, p.97:709–725, 2013.

MATOS, A.P.; AMBROZIN, A.R.P.; BERNARDO, A.R.; VOLANTE, A.C.; VIERA, P.C.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F. Avaliação do Efeito dos Extratos e Frações das Folhas de *Balfourodendron riedelianum* (Rutaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Bioassay**. v. 9, n. 3, p. 1-6, 2014.

MEYER, B.N. et al. A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v.45, p.31-34, 1982.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Biodiversidade Brasileira: Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade brasileira. Brasília, Brasil. 2002.

MURI, E.M.F. Proteases virais: importantes alvos terapêuticos de compostos peptideomiméticos. **Química Nova**. v. 37, n. 2, 2014.

NASCIMENTO, J.C.; LAGE, L.F.O.; CAMARGOS, C.R.D.; AMARAL, J.C.; COSTA, L.M.; SOUSA, A.N.; OLIVEIRA, F.Q. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 92, n. 4, p. 327-332, 2011.

NIROUMAND, M.C.; FARZAEI, M.H.; KARIMPOUR-RAZKENARI, E.E.; AMIN, G.; KHANAVI, M.; AKBARZADEH, T.; SHAMS-ARDEKANI, M.R. An Evidence-Based Review on Medicinal Plants Used as Insecticide and Insect Repellent in Traditional Iranian Medicine. **Iranian Red Crescent Medical Journal**. v. 18, n. 2, p.1-8, 2016.

NUNES, F.P. Controle do mosquito *Aedes aegypti* e fungos entomopatogênicos: possibilidades de inserção de temas de biologia para ensino médio num contexto regional. 2015. 68f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, Campos dos Goyatacazes, 2015.

OEHLER, E.; WATRIN, L.; LARRE, P. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. **Eurosurveillance**. v.19, n. 9, p.1-2, 2014.

OLIVEIRA JUNIOR, J.B.; ARAÚJO, A.M.S.; SILVA, D.M.W.; LINS NETO, M.A.F.; MARANHÃO, F.C.A. Múltiplas infecções relacionadas à assistência em saúde em paciente

com doença de Crohn: Relato de caso. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**. v. 6, n. 2, 2016.

OLIVEIRA, I.S.; LIMA, J.C.S.; SILVA, R.M.; MARTINS, D.T.O. Triagem da atividade antibacteriana in vitro do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 4, p. 587-593, 2008.

ONDEI, L.S.; TERESA, F.B.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Avaliação de fatores preditivos de estresse oxidativo em pessoas saudáveis. **Biotemas**. v. 27, n. 3, p. 168-173, 2014.

OOTANI, M.A.; AGUIAR, R.W.; RAMOS, A.C.C.; BRITO, D.R.; SILVA, J.B.; CAJAZEIRA, J.P. Use of Essential Oils in Agriculture. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 4, n.2, p. 162-172, 2013.

PALHARES, R.M.; DRUMMOND, M.G.; BRASIL, B.S.A.F.; COSENZA, G.P.; BRANDÃO, M.G.L.; OLIVEIRA, G. Medicinal Plants Recommended by the World Health Organization: DNA Barcode Identification Associated with Chemical Analyses Guarantees Their Quality. **Public Library of Science**.v.10, n.5, 2015.

PALUMBO, J. M. C.; CARVALHO, R. S.; SIQUEIRA, J. M.; MAGALHÃES, J. C.; FERREIRA, J. M. S.; Avaliação *in vitro* da atividade da subfração e substância obtidas das raízes de *Cochlospermum regium* em bactérias causadoras de infecções nosocomiais. **Blucher Biochemistry Proceedings**, v.1, n.1, 2015.

PEREIRA, E.M.; LEITE FILHO, M.T.; MENDES, F.A.; MARTINS, A.N.A.; ROCHA, A.P.T. Potencial toxicológico frente *Artemia Salina* em plantas condimentares comercializadas no município de Campina Grande-PB. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. v. 10, n.1, p. 52-56, 2015.

PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PRIOR, R.L.; WU, X. Diet antioxidant Capacity: Relationships to Oxidative Stress and Health. **American Journal of Biomedical Sciences**. v. 5, n. 2, p. 126-139, 2013.

QUATRIN, P.M.; COMIM, V.M.; LOPES, L.Q.; GÜNDEL, A.; VAUCHER, R.A.; SANTOS, R.C.V. Avaliação de diferentes substratos para a formação de biofilmes in vitro de *Pseudomonas aeruginosa*. **Disciplinarum Scientia**.v. 16, n. 2, p. 191-203, 2015.

RIBEIRO NETO, J.A.; TEIXEIRA, J.L.; GASPAR JUNIOR, P.J.; ALVES, S.N. Susceptibilidade das formas imaturas de *Culex quinquefasciatus* expostas a diferentes concentrações de cafeína e pó de guaraná (*Paullinea cupana*). **VEREDAS Revista Eletrônica de Ciências**. v. 5, n.1, 66-74, 2012.

RODRIGUES, W. Competitividade e mudança institucional na cadeia produtiva de plantas medicinais no Brasil. **Interações (Campo Grande)**. v. 17, n.2, 2016.

ROSA, C.P. Estudo da Composição Química e Avaliação da Atividade Biológica de *Annona crassiflora* Mart. (ANNONACEAE). 2015. 126f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2015.

ROUMY, V. Étude Phytochimique de Plantes Amazoniennes D'activité Antiplasmodiale, dont *Pseudoxandra cuspidata* Maas et *Tapirira guianensis* Aubl. TESE (Doutorado). 2008. 168 f. Université Toulouse, Toulouse.

ROVENDDER, A.P.M.; PIAZZA, E.M.; THOMAS, P.A.; FELKER, R.M.; HUMMEL, R.B.; FARIAS, J.A. Potential medicinal use of forest species of the Deciduous Seasonal Forest from Atlantic Forest Biome, South Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 59, 2016.

SÁ, P.G.S.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, A. P.; SIQUEIRA FILHO, J. A.; FONTANA, A. P.; DAMASCENO, P. K. F.; BRANCO, C. R. C.; BRANCO, A.; ALMEIDA, J. R.G. S. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). **Revista Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**. v. 33, n. 4, p. 561-566, 2012.

SAHA, S.K.; SIKDAR, S.; MUKHERJEE, A. et al. Ethanolic extract of the Goldenseal, *Hydrastis canadensis*, has demonstrable chemopreventive effects on HeLa cells in vitro: Drug–DNA interaction with calf thymus DNA as target. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 36, n. 1, p. 202-214, 2013.

SALVADOR, J.P. Avaliação da Atividade Antioxidante e Fotoprotetora do extrato etanólico de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg. 2015. 69f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2015.

SANTOS, N.T. Nanopartículas de ouro como sistema de liberação de droga associada a Berberina : síntese e caracterização.2013. 40f. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade de Brasília, Ceilândia, 2013.

SANTOS, R.L.; GUIMARAES, G.P.; NOBRE, M.S.C.; PORTELA, A.S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.13, n.4, p.486-491, 2011.

SAXENA, R.C.; HARSHAN, V.; SAXENA, A.; SUKUMARAN, P.; SHARMA, M.C.; KUMAR, M.L. Larvicidal and chemosterilant activity of *Annona squamosa* alkaloids against *Anopheles stephens*. **Journal of the American Mosquito Control Association**. v.9, n.1, p. 84-87, 1993.

SILVA, N.C.C. Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas. 2010. 69f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

SILVA, P.H.; BARROS, M.S.; OLIVEIRA, Y.R.; ABREU, M.C. A etnobotânica e as plantas medicinais sob a perspectiva da valorização do conhecimento tradicional e da conservação ambiental. **Revista de Ciências Ambientais**. v.9, n. 67-86, 2015.

SILVA, S.L.; NASCIMENTO, A.A.; RIBEIRO, E.F.B. et al. 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.

SILVA, V. P.; FERREIRA, D. N.; SOUZA, N. G. G.; ALEXANDRE, A. M.; GOMES, I. F. A. MOREIRA, R. T. Desenvolvimento de sorvetes à base de caldo de cana e avaliação sensorial com crianças. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 35, n. 2, p. 813-824, 2014.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. et al. Farmacognosia da Planta ao Medicamento. 5ª edição. Editora Universidade/UFRGS. Porto Alegre. 2010.

SOUZA, T. M. et al. Avaliação da atividade antisséptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n.1, p. 71-75, 2007.

SUKARI, M.A.; NOOR, H.S.; BAKAR, N.H.A.; ISMAIL, I.S.; RAHMANI, M.; ABDUL, A.B. Larvicidal Carbazole Alkaloids from *Murraya koenigii* against dengue fever mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus. **Asian Journal of Chemistry**. v. 25, n. 14, p. 7719-7721, 2013.

SZABO, M. E. Estudo fitoquímico e atividades biológicas (antioxidante, antimicrobiana, tóxica e hemolítica *in vitro*) de *Cestrum intermedium* Sendtn. (Solanaceae). 2015. 108 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

TACCONELLI, E.; TUMBARELLO, M.; BERTAGNOLIO, S.; CITTON, R.; TERESA SPANU, T.; GIOVANNI FADDA, G.; CAUDA, R. Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infections: Analysis of Trends in Prevalence and Epidemiology. **Emerging Infectious Diseases**. v. 8, n. 2, 2002.

TAKHTAJAN, A. Flowering Plants. Second Ed. St. Petersburg: Springer Netherlands, 2009. p. 1-6.

TETRO, J.A. Zika and microcephaly: causation, correlation, or coincidence?. **Microbes and Infection**. v. 18, n. 3, 167-168, 2015.

TINTINO, S.R.; NETO, A.A.C.; MENEZES, I.R.A. et al. Antimicrobial Activity and Combined Effects on Antifungal and Antibacterial Drugs the Fruit of *Morinda citrifolia* L. **Acta biol. Colomb.** v.20, n.3, p.193-200, 2015.

TORRES, S.M.; CRUZ, N.L.N.; ROLIM, V.P.M.; CAVALCANTI, M.I.A.; ALVES, L.C.; SILVA-JUNIOR, V.M. Mortalidade acumulativa de larvas de *Aedes aegypti* tratadas com compostos. **Revista Saúde Pública**, v. 48, n.3, p.445-450, 2014.

TORTORA, G.J; FUNKR, B.R.; CASE, C.L. Microbiologia. In: TORTORA, G.J., 10ª Edição. Microbiologia. Porto Alegre: Artmed, 2012.p. 553-565.

TRIGO, J.R. et al. Óleos essenciais de espécies de Annonaceae que ocorrem no Pará: *Guatteria schomburgkiana* Mart. E *Pseudoxandra cuspidata* Maas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai, Botucatu**, v.9, n.3, p.113-116, 2007.

VANIN, C.R. Araçá Amarelo: Atividade Antioxidante, Composição Nutricional e Aplicação em Barra de Cereais. 2015. 177f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2015.

VÁSQUEZ, S.P.F.; MENDONÇA, M.S.; NODA, S.N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**. v. 44, n. 4, p. 457-472, 2014.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Guidelines for Laboratory And Field Testing of mosquito Larvicides. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69101/1/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf>, Acesso 1 de setembro de 2016.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Dengue and Severe Dengue. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>, Acesso 25 de setembro de 2016a.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Zika vírus and Complications. Disponível em: < <http://www.who.int/emergencies/zika-virus/en/>>, Acesso 25 de setembro de 2016b.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/>>, Acesso 25 de setembro de 2016c.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Traditional Medicine Strategy. 2014–2023.

ZARA, A.L.S.A.; SANTOS, S.M.; OLIVEIRA-FERNANDES, E.S.; CARVALHO, R.G.; COELHO, G.E. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. v. 25, n., p. 391-404, 2016.

ANEXO

1. Confirmação da submissão do Artigo 2 Qualis B1

Enc: Submission Confirmation

Entrada x

**sheylla susan**

para mim, mim

inglês

português

[Visualizar mensagem traduzida](#)

*Profa. Dra. Sheylla Susan
Coordenadora do Programa de Pós-graduação da Rede Bionorte Pólo
Universidade Federal do Amapá.
Portaria 971/2013*

Mostrar mensagem original

Em Quinta-feira, 1 de Setembro de 2016 21:40, Arabian Journal of Chemistry <e

Dear Dr. Sheylla Moreira Almeida,

We have received your article "Phytochemistry Prospection, Cytol
publication in Arabian Journal of Chemistry.

Your manuscript will be given a reference number once an editor l

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/arabic/>

2. Enter these login details:

Your username is: sheyllasusan@yahoo.com.br

If you need to retrieve password details, please go to: <http://ees.e>

3. Click [Author Login]

This takes you to the Author Main Menu.

4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Arabian Journal of Chemistry