

ALISSON ANDRADE ALMEIDA

**BIOPROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS ANTITUMORAIS EM COLEÇÃO
DE EXTRATOS DE ESPÉCIES ARBÓREAS DA MATA ATLÂNTICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

A447b
2015 Almeida, Alisson Andrade, 1986-
Bioprospecção de produtos naturais antitumorais em
coleção de extratos de espécies arbóreas da Mata Atlântica /
Alisson Andrade Almeida. – Viçosa, MG, 2015.
x, 67f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: João Paulo Viana Leite.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Plantas medicinais. 2. Extratos vegetais. 3. Tumores.
4. Mata Atlântica. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de
Pós-graduação em Bioquímica Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 581.634

ALISSON ANDRADE ALMEIDA

**BIOPROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS ANTITUMORAIS EM COLEÇÃO
DE EXTRATOS DE ESPÉCIES ARBÓREAS DA MATA ATLÂNTICA.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 8 de Julho de 2015.

Gustavo Costa Bressan

Marcelo Henrique dos Santos

Anésia Aparecida dos Santos

João Paulo Viana Leite
(Orientador)

*A Deus, pela vida;
Aos meus pais, pelo amor;
Ao meu irmão, pelo apoio;
À minha namorada, pelo carinho;
e aos sinceros amigos.*

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível devido à colaboração e dedicação de várias pessoas. Gostaria de deixar os meus sinceros agradecimentos...

Ao prof. João Paulo Viana Leite, pela orientação e acompanhamento durante toda pesquisa, pela captação dos recursos financeiros e pelas correções sugeridas no material escrito;

Ao prof. Gustavo Costa Bressan, pelas sugestões feitas na realização dos ensaios antitumorais, por ter me conduzido ao seu grupo de pesquisa e pela disponibilidade;

Ao Marcos Vinícius Ribeiro de Castro, pela identificação taxonômica das espécies vegetais, herborização das exsiccatas, georreferenciamento das espécies em campo e pelo companheirismo de sempre;

À Marcela Costa Escudeiro, pela determinação na coleta do material vegetal e pela ajuda no georreferenciamento das espécies;

À Izabela Galvão Fernandes, pela constância e persistência no preparo dos extratos;

Ao Jean Silva Rezende, pela dedicação na liofilização dos extratos;

À Gabriela Alves, pelos ensinamentos que possibilitaram o cultivo das células tumorais;

Ao Raoni Paes Siqueira, pela competência no planejamento dos experimentos;

À FAPEMIG pelo auxílio financeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada (PPGBA).

BIOGRAFIA

ALISSON ANDRADE ALMEIDA, filho de Elizabeth de Andrade Almeida e Antônio José de Almeida, nasceu em São João Evangelista – Minas Gerais, em 04 de julho de 1986.

Em março de 2008, iniciou o curso de Bacharelado em Bioquímica na Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa – Minas Gerais, concluindo-o em julho de 2013.

Em agosto de 2013, ingressou no Programa de Mestrado em Bioquímica Agrícola na UFV, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Magister Scientiae*, defendendo a dissertação em julho de 2015.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1 – Construção de uma coleção de extratos de plantas da Mata Atlântica para pesquisa de bioprospecção farmacêutica	2
RESUMO	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUÇÃO	5
1.1. Biodiversidade e a Convenção sobre Diversidade Biológica	5
1.2. Bioprospecção de produtos naturais bioativos	7
1.3. Bioprospecção de produtos naturais antitumorais	9
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo geral	12
2.2. Objetivos específicos	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. Acesso à biodiversidade	13
3.2. Levantamento florístico na EPTEA Mata do Paraíso	14
3.3. Desenvolvimento da Plataforma MAPA	14
3.4. Placas de identificação das árvores	15
3.5. Secagem do material vegetal	15
3.6. Pulverização da Droga Vegetal	16
3.7. Produção dos extratos vegetais	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1. Espécies Arbóreas Acessadas na EPTEA Mata do Paraíso	18
4.2. Registros da Plataforma Mapa	18
4.4. Importância do Sistema de Informação Geográfica (SIG) na Bioprospecção por Produtos Naturais	23
4.5. Obtenção dos Extratos	23
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

CAPÍTULO 2 – Bioprospecção de produtos naturais antitumorais em coleção de extratos de espécies arbóreas da Mata Atlântica.....	34
RESUMO	35
ABSTRACT	36
1. INTRODUÇÃO	37
2. MATERIAIS E MÉTODOS	40
2.1. Material Vegetal.....	40
2.2. Produção dos Extratos.....	40
2.3. Diluição dos Extratos em DMSO.....	40
2.4. <i>Screening in vitro</i> em células tumorais.....	41
2.4.1. Cultivo das células.....	41
2.4.2. Tripsinização.....	41
2.4.3. Contagem do número de células viáveis.....	42
2.4.4 Ensaio de citotoxicidade do DMSO e concentração de células plaqueadas por poço ..	42
2.4.5. Atividade antiproliferativa de extratos pelo método do MTT	43
2.4.6. Cálculo do IC ₅₀	44
2.4.7. Cálculo do Índice de Seletividade (SI).....	44
2.4.8. Análise de dados.	44
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.1. Triagem preliminar da atividade antiproliferativa dos extratos frente a linhagens de células tumorais	46
3.2. Resultado do IC ₅₀ dos extratos ativos	49
4. CONCLUSÃO	53
5. CONCLUSÃO FINAL.....	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
7. ANEXO 1	60

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1:** Sistematização de informações do banco de dados BIOPROS 21
- Tabela 2:** Rendimento (%) dos extratos orgânicos e aquosos produzidos a partir de folhas e galhos de espécies arbóreas da EPTEA Mata do Paraíso. 25

CAPÍTULO 2

- Tabela 1:** Inibição do Crescimento celular (%) de extratos de espécies arbóreas da Mata Atlântica frente a três linhagens de células tumorais. 47
- Tabela 2:** Atividade antiproliferativa (IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$) de extratos vegetais e do controle positivo (Podofilotoxina) em culturas de linhagens celulares. 50
- Tabela 3:** Índice de seletividade para os extratos com atividade citotóxica moderada. 52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Espécie identificada com o número ID MAPA na EPTEA Mata do Paraíso	15
Figura 2: Esquema do processo de produção dos extratos	17
Figura 3: Representação das famílias mais numerosas na EPTEA Mata do Paraíso	18
Figura 4: Logotipo da Plataforma MAPA	19
Figura 5: Modelo do Número de Identificação da Amostra ID MAPA	19
Figura 6: Imagens do website da Plataforma MAPA.....	20
Figura 7: O bando de dados da Plataforma MAPA pode direcionar estratégias de bioprospecção a determinados extratos armazenados na BioPROS <i>Extracts Library</i>	22

RESUMO

ALMEIDA, Alisson Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2015. **Bioprospecção de produtos naturais antitumorais em coleção de extratos de espécies arbóreas da Mata Atlântica.** Orientador: João Paulo Viana Leite.

O câncer é a segunda enfermidade com maior letalidade em todo o mundo. A descoberta de novas drogas anticâncer de origem vegetal tem incentivado a avaliação da atividade antiproliferativa de extratos vegetais. A Mata Atlântica possui cerca de 20.000 espécies vegetais, muitas delas ainda desconhecida pela ciência. O objetivo desta pesquisa foi construir uma coleção de extratos (BIOPROS *Extracts Library*) oriundos de árvores nativas do bioma Mata Atlântica e avaliar a atividade anticâncer *in vitro* destes extratos frente a 3 linhagens de células tumorais, MCF-7 (mama), B16-F10 (melanoma murino) e HepG2 (fígado) pelo ensaio de redução do MTT. Os extratos foram obtidos a partir do material vegetal pulverizada pelo processo de maceração com solvente orgânico e sequencialmente com solvente aquoso. Em seguida, os solventes foram removidos obtendo-se os extratos secos, que foram acondicionados em frascos de vidro devidamente identificados e armazenados à temperatura de -20 °C. No ensaio biológico, todos os extratos foram testados inicialmente na concentração de 100 µg/mL. Os extratos que inibiram o crescimento celular acima de 75% (GI₇₅) foram testados novamente em diferentes concentrações dentro da faixa (3,125 – 200 µg/mL) para calcular o IC₅₀. A seletividade destes extratos foi avaliada em células da linhagem VERO. A BIOPROS *Extracts Library* tem 196 extratos de 49 espécies acessadas. Os extratos orgânicos de folhas (EOF) das espécies *Casearia sylvestris* Sw. e *Aureliana velutina* Sendtn. inibiram o crescimento celular da linhagem B16-F10 (IC₅₀ = 3,81 µg/mL e 6,22 µg/mL, respectivamente). Já o EOF de *Acnistus arborescens* (L.) Schldl. mostrou atividade citotóxica contra HepG2 (IC₅₀ = 5,01 µg/mL). Esses extratos foram citotóxicos para as células VERO apenas em altas concentrações, sugerindo seletividade. Estes resultados sugerem que estas espécies podem ser fontes de substâncias com potente atividade antitumoral.

ABSTRACT

ALMEIDA, Alisson Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Bioprospecting antitumor natural products in collection of extracts of tree species of the Atlantic Forest.** Adviser: João Paulo Viana Leite.

Cancer is the second disease to higher mortality worldwide. The discovery of new anticancer drugs of plant origin has encouraged the evaluation of the antiproliferative activity of plant extracts. The Atlantic Forest has about 20,000 plant species, many of them still unknown to science. The objective of this research was to build a collection of extracts (BIOPROS Extracts Library) come from native trees of the Atlantic Forest biome and evaluate the anticancer activity *in vitro* such forward extracts the 3 tumor cell lines, MCF-7 (breast), B16-F10 (murine melanoma) and HepG2 (liver) by MTT reduction assay. The extracts were obtained from the pulverized plant material by steeping process sequentially with organic solvent and aqueous solvent. Then, the solvents were removed obtaining the dry extracts, which were placed in labeled glass vials and stored at -20 °C. In biological assay, all extracts were tested initially at a concentration of 100 µg/mL. The extracts inhibited cell growth above 75% (GI₇₅) were retested at different concentrations within the range (3.125 - 200 µg/mL) to calculate the IC₅₀. The selectivity of these extracts was evaluated in VERO cell line. The BIOPROS Extracts Library has 196 extracts of 49 species accessed. The leaves of organic extracts (EOF) of species *Casearia sylvestris* Sw. and *Aureliana velutina* Sendtn. inhibited cell growth in B16-F10 strain (IC₅₀ = 3.81 µg/mL and 6.22 µg/mL, respectively). But the EOF *Acnistus arborescens* (L.) Schltdl. showed cytotoxic activity against HepG2 (IC₅₀ = 5.01 µg/mL). These extracts were toxic to VERO cells only at high concentrations, suggesting selectivity. These results suggest that these species can be sources of substances with potent antitumor activity.

INTRODUÇÃO GERAL

Este trabalho científico foi dividido em 2 capítulos: o Capítulo I trata da construção da coleção de extratos BIOPROS *Extracts Library* e o Capítulo II descreve a prospecção de potenciais extratos com atividade antitumoral por triagem *in vitro* acessando o banco de extratos BIOPROS *Extracts Library* frente a diferentes linhagens de células tumorais. Os dois capítulos fazem parte do Programa de Bioprospecção e Uso Sustentável da Biodiversidade (BIOPROS), que dentre os seus projetos, está à construção de um acervo com centenas de extratos, oriundos de diferentes famílias botânicas da Mata Atlântica, para servir de fonte para a busca de potenciais extratos com atividade biológica. A Mata Atlântica possui uma grande biodiversidade ainda pouco estudada quanto ao potencial biológico de suas espécies. Além disso, a ciência tem comprovado o importante papel desempenhado pelos produtos naturais bioativos de origem vegetal na busca de novos fármacos para o tratamento do câncer. As moléculas que já foram isoladas de plantas e hoje são usadas como medicamentos na terapia anticâncer atuam em vias bioquímicas centrais do complexo processo de divisão celular levando as células tumorais à morte por apoptose. Dessa forma, o bioma Mata Atlântica é uma importante fonte para a busca de novas moléculas de interesse para a medicina, constituindo um valioso repositório ainda pouco explorado na pesquisa de bioprospecção molecular.

CAPÍTULO 1

Construção de uma coleção de extratos de plantas da Mata da Atlântica para a pesquisa de bioprospecção farmacêutica.

RESUMO

A Mata Atlântica possui cerca de 20.000 espécies vegetais, muitas delas ainda desconhecida pela ciência. A construção de uma coleção informatizada e georreferenciada de extratos de espécies nativas da Mata Atlântica seguem as diretrizes propostas pela Conferência sobre a Diversidade Biológica (CDB) que visa a conservação e uso sustentável de biodiversidade. O objetivo desta pesquisa foi construir uma coleção de extratos (BIOPROS *Extracts Library*) em interface a uma plataforma virtual (Plataforma MAPA), que contém dados da coleção *in situ* das espécies arbóreas georreferenciadas por GPS (*Global Positioning System*) em fragmento de Mata Atlântica. A partir da família, gênero e espécie, a Plataforma MAPA criou o código de identificação (ID MAPA) de cada árvore, sendo este usado para monitorar a pesquisa de bioprospecção por moléculas bioativas no bioma. Os extratos foram obtidos a partir do material vegetal pulverizada pelo processo de maceração com solvente orgânico e sequencialmente com solvente aquoso. Em seguida, os solventes foram removidos obtendo-se os extratos secos, que foram acondicionados em frascos de vidro devidamente identificados e armazenados à temperatura de -20 °C. Até o momento, 230 espécies representando 57 famílias botânicas e 140 gêneros fazem parte da coleção *in situ*, sendo taxonomicamente identificadas, georreferenciadas e plaqueadas com o código ID MAPA. A Plataforma MAPA é uma ferramenta que permite a rastreabilidade e identificação das espécies dentro do fragmento da Mata Atlântica. A BIOPROS *Extracts Library* tem 196 extratos de 49 espécies acessadas com perspectiva de chegar a mais de 900 extratos. A Plataforma MAPA permite o acesso às exsicatas depositadas no herbário, permissão governamental de acesso ao patrimônio genético e dados de interesse para a bioprospecção, como informações química, farmacológica e etnobotânica. Esses extratos estão disponíveis para serem testados em ensaios biológicos rápidos e eficientes em diferentes alvos, como triagem antitumoral, antibacteriana, etc.

ABSTRACT

The Atlantic Forest has about 20.000 plant species, many of them still unknown to science. The construction of a computerized and georeferenced collection of extracts of native species of the Atlantic Forest follows the guidelines proposed by the Conference on Biological Diversity (CBD) which aims at conservation and sustainable use of biodiversity. The objective of this research was to build a collection of extracts (BIOPROS *Extracts Library*) interface to a platform (Plataforma MAPA) containing data from *in situ* collection of tree species georeferenced by GPS (Global Positioning System) in Atlantic Forest fragment. From the family, genus and species, the Plataforma MAPA created the identification code (ID MAPA) of each tree, which is used to monitor bioprospecting research of bioactive molecules in the biome. The extracts were obtained from the plant material pulverized by maceration process with organic solvent and, sequentially, aqueous solvent. Then, the solvents were removed to give the dry extracts, which were placed in labeled glass vials and stored at -20 °C. These extracts were diluted in dimethylsulfoxide (DMSO) and released in 96-well plates for biological assays. Until now, 230 species representing 57 botanical families and 140 genera are part of the collection *in situ*, being taxonomically identified, georeferenced and plated with the ID MAPA code. The Plataforma MAPA is a tool that has allowed the traceability and identification of species within the fragment of the Atlantic Forest. The BIOPROS *Extracts Library* has 196 extracts from 49 species accessed with a perspective to reaching more than 900 extrats. The Plataforma MAPA is allowed access to the voucher specimen deposited in the herbarium, government permission to access to genetic resources and data of interest to bioprospecting, as chemical information, pharmacological and ethnobotany. These extracts are available for testing in rapid and efficient biological assays on different targets such as antitumor, antibacterial, etc.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biodiversidade e a Convenção sobre Diversidade Biológica

O termo biodiversidade refere-se à variabilidade genética encontrada em espécies, populações, comunidades, habitats e ecossistemas (Boero, 2010). Estima-se que existam aproximadamente 8,7 milhões de espécies de seres vivos no planeta; destas, apenas 1,2 milhões já foram taxonomicamente descritas pela ciência (Mora et al., 2011).

No Brasil, as estimativas mais conservadoras indicam que o país possui entre 15 a 20% das espécies já descritas pela ciência (Lewinsohn e Prado, 2006) e cerca de 55 mil espécies de plantas superiores - de um total de 250 mil espécies -, distribuídas na maior cobertura de florestas tropicais remanescentes do mundo (Lewinsohn e Prado, 2006; Machado et al., 2008).

A Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB) preconiza a conservação da diversidade biológica, assim como seu uso sustentável e a repartição justa e equitativa dos bens provenientes da utilização dos recursos genéticos. Em seu artigo 7º, a CDB (1992) estabeleceu que os países signatários devem “identificar os componentes da diversidade biológica importantes para sua conservação e sua utilização sustentável; monitorar, por meio de levantamento de amostras e outras técnicas, os componentes da diversidade biológica e manter e organizar, por qualquer sistema, dados derivados de atividades de identificação e monitoramento”.

Uma das principais diretrizes proposta pela iniciativa global para a conservação da biodiversidade, trata-se da documentação da flora, fauna e diversidade microbiana com cotas detalhadas das espécies das mais diversas regiões e o desenvolvimento de um sistema interativo de informações integradas (Neelakandan et al., 2006; Yadav et al., 2013). Neste sentido, o uso de técnicas de monitoramento remoto, como o georreferenciamento por GPS (*Global Positioning System*) vem auxiliando o estudo da conservação e o monitoramento da biodiversidade, pois além de fornecer informações quantitativas precisas e com alta resolução espacial e temporal, tornou-se importante ferramenta no estudo da biodiversidade e no georreferenciamento de unidades florestais (Hyypä et al., 2000;

Foody et al., 2003).

Ao assinar a Agenda 21 da Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento, o Brasil assumiu o compromisso de conservar e utilizar de forma sustentável a sua biodiversidade. Neste contexto, algumas iniciativas na legislação têm sido feitas, porém, quando se mensura o número de espécies vegetais nativas que apresentam estudos científicos de investigação de suas propriedades farmacológicas, percebe-se um grande atraso que pode comprometer o aproveitamento sustentável de nossa biodiversidade (Brasil, 2001).

A Mata Atlântica é formada por um conjunto de formações florestais e ecossistemas associados como as restingas, manguezais e campos de altitude, que se estendem originalmente por aproximadamente 1.300.000 km². Considerada um *hotspot* mundial, a Mata Atlântica abriga uma rica biodiversidade, porém muito devastada pelas ações antrópicas, advindas dos ciclos econômicos da história de nosso país, como a exploração do pau-brasil, mineração e o ciclo do café. Mais recentemente, a Mata Atlântica vem sendo reduzida devido à ocupação demográfica das áreas urbanas das grandes cidades do país. Hoje, as suas áreas remanescentes de vegetação nativa estão reduzidos a cerca de 8% de sua cobertura original (Fundação SOS Mata Atlântica & INPE).

Neste contexto, faz-se importante buscar novos modelos de uso dos recursos naturais da Mata Atlântica, que concilie o desenvolvimento econômico e o manejo sustentável da biodiversidade. Entre os seus potenciais usos, os recursos vegetais podem fornecer alimento e servir de matéria prima para a descoberta e desenvolvimento de cosméticos e medicamentos.

Atualmente, os bioprospectores, para selecionar as espécies vegetais que terão suas propriedades farmacológicas investigadas, utilizam diferentes estratégias como, por exemplo, inventariando o conhecimento tradicional associado a uma determinada espécie (etnofarmacologia); bioprospectando uma determinada planta que pertence a um gênero ou família botânica (estudos quimiosistemáticos); e criando grandes coleções de extratos de plantas acessadas de forma randômica para triagem em alvos biológicos (Donaldson & Gates, 2004).

A pesquisa de bioprospecção tem avançado devido à possibilidade de construção de grandes coleções de extratos, aos avanços nas técnicas de

metabolômica, que auxiliam na identificação química dos metabólitos secundários e na introdução do HTS (*High Throughput Screening*) na triagem da atividade biológica de moléculas em diferentes alvos (Harvey et al., 2015).

As extratotecas são construídas com o intuito de se obter a maior diversidade possível de classes de moléculas químicas. No caso de coleções oriundas de plantas, os extratos são feitos a partir de diferentes partes da planta (folhas, galhos, frutos, etc), utilizando solventes com diferentes polaridades. Estes extratos ficam devidamente armazenados e estão disponíveis para a realização dos mais diversos tipos de ensaios biológicos, que são rápidos e eficientes para a identificação de novas moléculas bioativas (McCloud, 2010; Harvey et al., 2015).

1.2. Bioprospecção de produtos naturais bioativos

Os produtos naturais são metabólitos secundários biologicamente ativos biossintetizados a partir dos metabólitos primários (carboidratos, lipídeos, nucleotídeos e aminoácidos) em reações enzimáticas que ocorrem no interior das células de plantas, bactérias, fungos, protozoários, insetos e animais (Leite, 2009). Fatores genéticos, nutricionais, competições interespecies e infecções são alguns dos estímulos que levam a produção destes compostos (Strohl, 2000).

A humanidade vem utilizando substâncias orgânicas originadas de fontes naturais há muitos anos na forma de chás, macerações, infusões e decocções para o tratamento de diversas doenças (Brandão et al., 2010). As estruturas químicas destas substâncias podem servir de modelo para o desenvolvimento de agentes terapêuticos para o tratamento de várias doenças, entre elas o câncer (Khazir et al., 2014).

No período pós-segunda guerra mundial, houve grande avanço na descoberta dos novos produtos naturais, principalmente de agentes antibiológicos (antibacteriano, anticâncer, antifúngicos e antiparasitários), porém, nas últimas duas décadas, sua relevância diminuiu devido às dificuldades de competir com as substâncias sintéticas, presentes em maior número e com estruturas químicas conhecidas e com menor complexidade estrutural (Strohl, 2000).

Felizmente, nos últimos anos, os programas de descobrimento de novas

drogas voltaram a investir nos produtos naturais, que passaram a competir em vantagem com as substâncias sintéticas. Isso foi possível porque os produtos naturais são substâncias com grupos farmacofóricos com grande diversidade estrutural, estereoquímica específica e maior facilidade de interações com as proteínas transportadoras (Harvey et al., 2015).

Além disso, a relevância biológica dos produtos naturais é maior quando comparado com as substâncias sintéticas. Existem aproximadamente 22 milhões de substâncias sintéticas disponíveis nos bancos de dados para serem testadas, dessas cerca de 70% apresentam propriedades *Drug-like*, ou seja, compartilham algumas características, como tamanho, forma e solubilidade, com outras moléculas que atuam como drogas. Por outro lado, as coleções de produtos naturais são bem mais modestas (160 mil compostos), porém 80% destes metabólitos apresentam propriedades *Drug-like*. Esta observação pode ser explicada pelo processo de evolução, que conservou os “esqueletos” dos produtos naturais de acordo com os domínios das proteínas, que levam esses compostos aos seus sítios de ação (Harvey et al., 2015).

No descobrimento de novas drogas, os produtos naturais representam fonte abundante e inesgotável de novas substâncias. Em um levantamento feito entre 1981 a 2010, foi analisada a origem de mais de 1000 novas moléculas bioativas aprovadas nos Estados Unidos pela FDA (*Food and Drug Administration*), chegando-se a conclusão de que 6% eram produtos naturais isolados de organismos vivos, 28% derivados de produtos naturais e 5% correspondiam a produtos sintéticos, cujos grupos farmacofóricos eram baseados em estruturas de produtos naturais. As substâncias sintéticas representavam 36% dessas novas drogas (Cragg e Newman, 2013).

Um dos principais focos de pesquisa das indústrias farmacêuticas e agroquímicas tem sido o estabelecimento de métodos eficientes para detecção de compostos bioativos, de forma a acelerar a descoberta de novas moléculas protótipas para obtenção de fármacos. Nos últimos 50 anos, cerca de 70 novos medicamentos foram colocados no mercado apenas para o tratamento de câncer (Abel, 2002; Ito et al., 2011; Onur et al., 2013). Uma das maiores dificuldades enfrentadas pelos pesquisadores que trabalham com produtos naturais de origem

vegetal para o desenvolvimento de medicamentos é a baixa concentração destes compostos encontrada nas plantas. No entanto, este fato pode ser contornado aumentando o teor destas substâncias bioativas através de técnicas de cultivo celular associada à biologia molecular, que utiliza ferramentas da metabolômica e a genômica (Carvalho, 2006; Brandão et al., 2010; Harvey et al., 2015).

O desenvolvimento de metodologias que propiciem uma investigação mais racional e objetiva de produtos naturais bioativos oriundos de espécies nativas de biomas brasileiros torna-se estratégico para uso sustentável da biodiversidade (Yadav e Mishra, 2013) e descoberta de novos compostos bioativos. Buscando desenvolver um método inovador de acesso a biodiversidade na busca de componentes bioativos da Mata Atlântica, a presente pesquisa científica de caráter interdisciplinar, propõe a produção de um banco de extratos vegetais (extratoteca) de plantas coletadas em um fragmento de Mata Atlântica pertencente à Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa (MG), integrado a uma plataforma informatizada com informações farmacológicas das plantas e com dados de georreferenciamento. Esta extratoteca será utilizada em pesquisas científicas que visam descobrir potenciais produtos naturais bioativos em diferentes alvos, principalmente na inibição da atividade proliferativa em linhagens de células tumorais.

1.3. Bioprospecção de produtos naturais antitumorais

O uso das plantas medicinais na terapêutica acontece desde os primórdios da humanidade. A partir do século XX, visando otimizar a busca de novas substâncias bioativas de origem vegetal, os bioprospectores começaram a desenvolver coleções de extratos da imensa biodiversidade inexplorada cientificamente. Atualmente, menos de 10% das espécies de plantas superiores tem estudos fitoquímicos ou foram investigadas quanto ao potencial biológico (Zhang, 2002; Carvalho, 2006; McCloud, 2010; Eisenberg et al., 2011).

Na década de 50, o Departamento de Produtos Naturais do Instituto Nacional do Câncer (NCI-Frederick), nos Estados Unidos, foi pioneiro ao iniciar o programa para a implantação de uma coleção de extratos de plantas coletadas em regiões temperadas do mundo. A partir da década de 90, com o desenvolvimento de técnicas

mais rápidas e eficientes de triagem de novas drogas, a coleção de extratos de plantas do NCI se expandiu para regiões tropicais, além de agregar extratos de organismos marinhos e fungos (Cragg e Newman, 2005). Atualmente, o NCI tem uma das mais completas coleções de extratos do mundo com cerca de 230.000 amostras (McCloud, 2010). A análise da atividade antitumoral destes extratos, frações e substâncias puras levou ao descobrimento de novas drogas, como taxanos e camptotecinas (Cragg e Newman, 2005).

Entre 1999 e 2006, pesquisadores da África do Sul em parceria com o NCI avaliaram a atividade anticâncer de 7.500 extratos de plantas em 3 linhagens de células tumorais (Fouche et al., 2008). A partir de 2006, cientistas da Escola Médica de Harvard (HMS), da Universidade Chinesa de Medicina (BUCM) e da Universidade Batista de Hong Kong embarcaram na construção do protótipo de uma biblioteca com 202 espécies botânicas autenticadas e totalmente documentadas baseada na Medicina Tradicional Chinesa (TCM). Esta biblioteca passou a servir para futuros estudos científicos baseados na Medicina Tradicional (Eisenberg et al., 2011). Na América do Sul, o Escritório Sul-Americano para o Desenvolvimento de Drogas Anticâncer (SOAD), vem testando extratos, frações e substâncias purificadas para verificar o potencial antitumoral de plantas medicinais da América do Sul (Dennis et al., 2000).

No Brasil, a Universidade Federal de Pernambuco iniciou no ano de 1952 seu programa de triagem de extratos vegetais. Desde então, mais de 130 espécies vegetais do bioma caatinga foram testadas, sendo que 37% destas apresentaram atividade citotóxica em linhagens de células tumorais. Entre as espécies que se destacaram neste estudo tem-se *Croton mucronifolius*, cujo extrato hidroalcoólico foi ativo em inibir o crescimento celular e reduzir a frequência de metástase; *Croton regelianus*, tradicionalmente utilizada por populações indígenas no tratamento de tumores malignos, inibiu 75% do crescimento celular e *Tabebuia avellandae*, cuja casca apresenta a substância lapachol que apresentou grande atividade antineoplásica e foi testada em modelo animal seguido de testes clínicos em humanos (Pessoa et al., 2006).

No estado de Minas Gerais, pesquisadores verificaram a atividade biológica de extratos metanólicos das folhas de 51 espécies coletadas no sul do estado. Esses

extratos tiveram o seu potencial antitumoral analisado em 4 linhagens de células tumorais. Como resultado, as espécies *Lantana fucata*, *Copaifera langsdorffii* e *Momordica charantia* foram consideradas promissoras (Júnior et al., 2009).

Pesquisadores do CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas) avaliaram a atividade antiproliferativa de vários extratos oriundos de espécies do Cerrado e da Floresta Amazônica. Como resultado, eles verificaram que extratos oriundos de espécies do Cerrado, que apresentam maior diversidade química, se mostraram mais eficientes na inibição da proliferação de células tumorais quando comparado com espécies da região Amazônica (Carvalho, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Construir uma coleção de extratos de espécies arbóreas da Mata Atlântica direcionada para a bioprospecção farmacêutica (BIOPROS *Extracts Library*).

2.2. Objetivos específicos

- Identificar, georreferenciar e plaquetear espécies vegetais nativas em fragmento de Mata Atlântica da EPTEA Mata do Paraíso para constituir a coleção *in situ* da BIOPROS *Extracts Library*;

- Identificação botânica das espécies e depósito de exsicata em Herbário Fiel Depositário;

- Regularização jurídica junto ao CNPq para o acesso e remessa de amostras do patrimônio genético;

- Produção e herborização das exsicatas das espécies arbóreas;

- Desenvolvimento de um banco virtual de dados (Plataforma MAPA) que tenha informações (etnofarmacológicas, etnobotânicas, fitoquímicas e de testes biológicos) das espécies vegetais cujos extratos compõem a BIOPROS *Extracts Library*, associados aos dados de georreferenciamento (coordenadas de GPS e mapas temáticos de distribuição das espécies arbóreas) e das exsicatas;

- Desenvolver e padronizar método de produção de extratos vegetais, direcionados ao acervo da coleção;

- Desenvolver e padronizar o procedimento para a obtenção e utilização de placas de 96 poços contendo extratos visando à pesquisa de bioprospecção.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Acesso à biodiversidade

As espécies arbóreas utilizadas para constituir a coleção *in situ* da BIOPROS *Extracts Library* foram acessadas por processo de amostragem (randômica) em expedições ao fragmento de Mata Atlântica da Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental (EPTEA) Mata do Paraíso.

A Mata do Paraíso, pertencente à Universidade Federal de Viçosa (UFV), localiza-se no município de Viçosa, Zona da Mata de Minas Gerais, e possui uma área de cerca de 200 hectares. Abrigando diversas espécies da fauna e flora ameaçadas de extinção, a Mata do Paraíso também protege as nascentes do Córrego Santa Catarina, importante afluente do Ribeirão São Bartolomeu, fonte de parte do abastecimento de água da cidade de Viçosa. Caracteriza-se como um fragmento de Mata Atlântica de extrema importância regional, já que é uma das poucas áreas com grande extensão de floresta nativa. Sua vegetação consiste de matas de topo, de encosta e de baixadas, possibilitando, assim, a conservação de alta biodiversidade. A vegetação da EPTEA Mata do Paraíso foi classificada como Floresta Estacional Semidecidual Submontana (Veloso, et al., 1991; Oliveira et al., 2007).

Apesar da Mata do Paraíso ser uma área natural protegida, ela não se enquadra em nenhuma categoria pertencente ao SNUC, mas possui objetivos semelhantes aos das unidades de conservação, como proteção da flora e da fauna, preservação dos recursos naturais, pesquisa científica, treinamento e desenvolvimento de atividades de interpretação e educação ambiental.

Essa floresta, no passado, sofreu intensa atividade antrópica, como a retirada de madeira, exploração de uma pedreira e atividades agrícolas arcaicas com cultura cafeeira e pastagens (Volpato, 1994). Atualmente, os seus 200 hectares encontram-se em estágio de regeneração e é considerada, por muitos, um laboratório a céu aberto, onde estudantes e professores da UFV desenvolvem suas atividades de pesquisa, ensino e extensão.

O acesso ao patrimônio genético assim como a remessa de amostras para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico foram autorizados pelo

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (nº 010134/2014-0), credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 246 de 27 de agosto de 2009.

3.2. Levantamento florístico na EPTEA Mata do Paraíso

No ano de 2013, foi iniciado levantamento florístico na EPTEA Mata do Paraíso pela equipe de pesquisadores do Departamento de Engenharia Florestal da UFV. As exsiccatas foram confeccionadas coletando-se ramos de cada espécie contendo os órgãos vegetativos e reprodutivos; uma das exsiccatas foi depositada no herbário VIC da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e a outra foi depositada no Herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (PAMG/EPAMIG), em Belo Horizonte. Este último está registrado, desde 1979, no *Index herbariorum* com o acrônimo PAMG. Em 2003, o herbário PAMG/EPAMIG foi credenciado junto ao Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) como fiel depositário de amostras do patrimônio genético nacional.

Todas as espécies arbóreas foram georreferenciadas com auxílio de GPS (*Global Positioning System*).

3.3. Desenvolvimento da Plataforma MAPA

A Plataforma MAPA vem sendo desenvolvida desde 2010 para permitir o acesso aos registros e uma série de análises através da produção de mapas e relatórios dinamicamente.

A construção da Plataforma MAPA, fazendo a interface entre banco de dados químico-farmacêutico e os dados de localização geográfica das espécies dentro do fragmento de Mata Atlântica, objetivou dar suporte científico aos bioprospectores no acesso guiado ao patrimônio genético.

Para a construção do banco de dados sobre as espécies da coleção *in situ*, informações sobre uso etnofarmacológico e dados científicos sobre propriedades farmacológicas, toxicológica e sobre composição fitoquímica foram levantadas em banco de dados especializados como o Scifinder, Periódicos da Capes e Science

Direct. Informações sobre o emprego destas espécies na medicina popular foram levantadas em livros da área e de registros de naturalistas que atuaram em área de abrangência da Mata Atlântica, como por exemplo, no livro “Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas”, do naturalista Pio Corrêa. No banco de dados, registros das exsicatas depositadas no Herbário VIC da UFV referentes a espécies da coleção foram digitalizadas e estão disponíveis na Plataforma MAPA. Cada espécie arbórea recebeu uma placa de identificação contendo o código gerado pela Plataforma MAPA.

A Plataforma MAPA utiliza o sistema PHP “*Hipertext Preprocessor*”. As coordenadas geográficas obtidas por GPS e as demais informações sobre as espécies arbóreas identificadas na EPTEA Mata do Paraíso foram armazenadas em um banco de dados do tipo MySQL.

3.4. Placas de identificação das árvores

A partir da família, gênero e espécie, a Plataforma MAPA gerou o número de identificação ID MAPA de cada árvore, que seguem o seguinte critério separado por ponto: os três primeiros números são referentes à família, os três próximos informam o gênero e os últimos três números indicam a espécie. Este número foi grifado manualmente em placas de aço inox, que foram fixadas nas árvores da Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental (EPTEA) Mata do Paraíso (**Figura 1**).



Figura 1: Espécie identificada com o número ID MAPA na EPTEA Mata do Paraíso.

3.5. Secagem do material vegetal

O material vegetal (folhas e galhos) das espécies arbóreas acessadas, após

chegar da EPTEA Mata do Paraíso, foi imediatamente processado e pesado no laboratório de Biodiversidade do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB-UFV). Posteriormente, o material vegetal foi seco em desidratador de plantas. As folhas foram destacadas manualmente e os galhos foram triturados em pequenos pedaços com o auxílio de uma tesoura de poda. A quantidade de galhos e folhas frescas foram em média 300 e 200 gramas, respectivamente. O tempo de secagem das folhas frescas e dos galhos triturados no desidratador foi de aproximadamente 48 horas à temperatura de 40 °C.

3.6. Pulverização da Droga Vegetal

As folhas e os galhos após serem desidratados foram pulverizados em moinho de facas com peneira de 40 mesh. Após a trituração de cada amostra, realizou-se a limpeza do equipamento para evitar contaminação entre as diferentes amostras vegetais.

3.7. Produção dos extratos vegetais

O processo de extração foi previamente definido e padronizado seguindo metodologia adotada por McCloud (2010) com algumas modificações. A droga vegetal pulverizada de cada amostra foi submersa em um béquer contendo 500 mL de solvente orgânico - diclorometano (DCM) e metanol (MeOH) na proporção de (1:1).

Posteriormente, a droga vegetal embebida foi colocada no percolador e ficou em repouso por aproximadamente 15 horas. Depois, o extrato líquido foi drenado uma única vez e o solvente foi removido em evaporador rotatório para a obtenção do extrato orgânico. A torta que permaneceu no percolador foi extraída com 500 mL de solvente aquoso - água destilada - que ficou embebendo a droga vegetal por mais 15 horas. Após esse período, o percolado foi drenado e o água foi retirada pelo processo de liofilização para a obtenção do extrato aquoso seco (**Figura 2**).

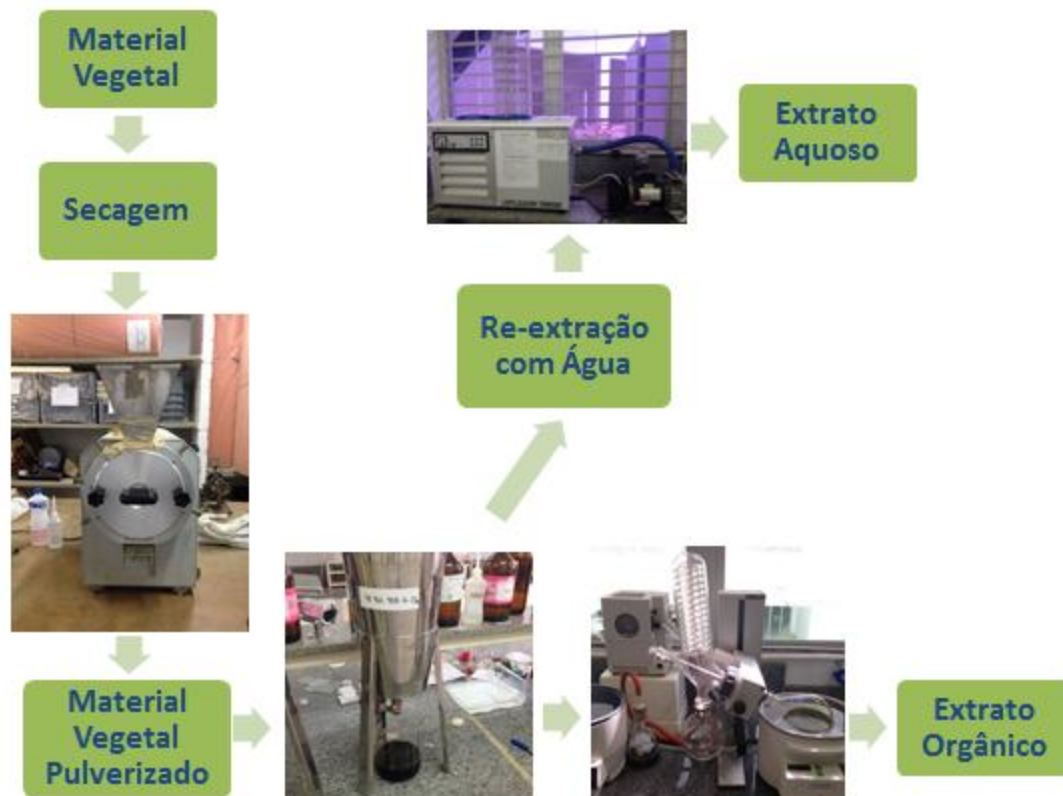


Figura 2: Esquema do processo de produção dos extratos.

Os extratos produzidos foram colocados em frascos de penicilina hermeticamente fechados e armazenados em freezer a - 20 °C.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Espécies Arbóreas Acessadas na EPTEA Mata do Paraíso

Do levantamento florístico realizado na EPTEA Mata do Paraíso, foram identificadas 230 espécies arbóreas, distribuídas em um total de 57 famílias e 140 gêneros. O **anexo 1** (final da dissertação) traz a relação dessas espécies com os códigos de identificação (ID MAPA) e os números de depósito das exsicatas. As famílias com maior número de espécies estão representadas abaixo (**Figura 3**).

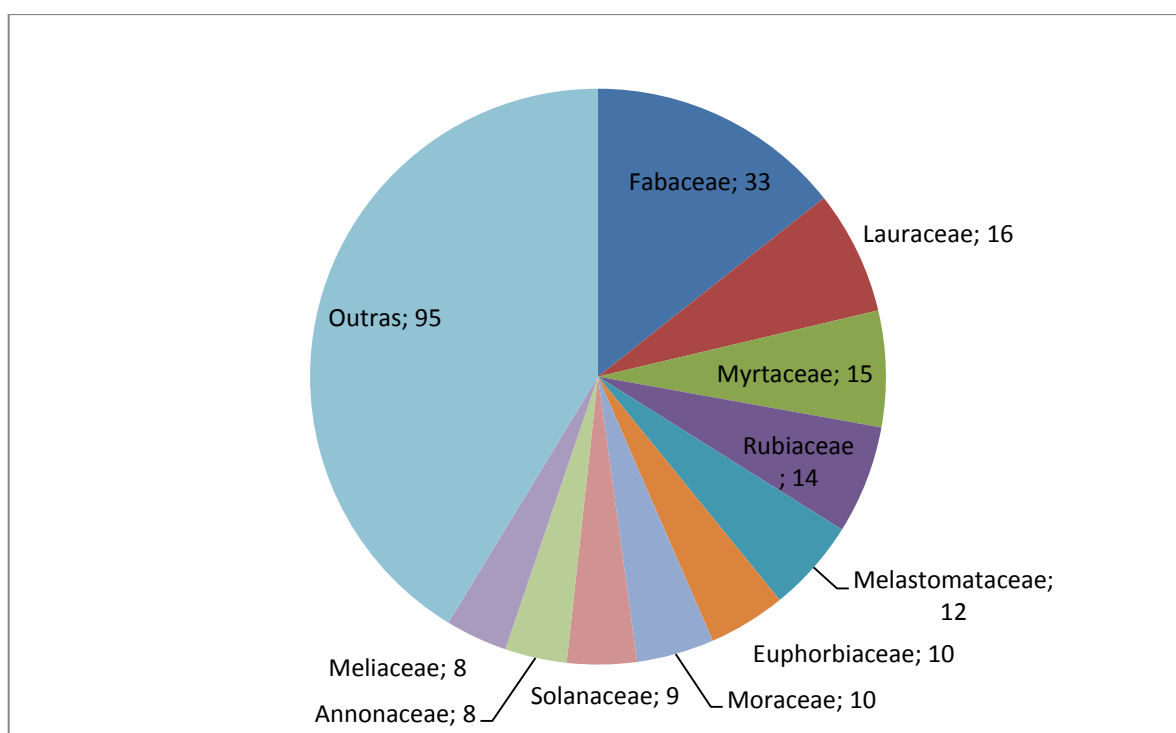


Figura 3: Representação das famílias mais numerosas na EPTEA Mata do Paraíso.

4.2. Registros da Plataforma Mapa

A Plataforma MAPA, cujo logotipo é mostrado na **Figura 4**, foi projetada de forma a integrar informações químico-farmacêuticos das espécimes da coleção *in situ* com imagens associadas, seja da exsicata depositada no herbário ou de sua localização em campo, voltada para o monitoramento da pesquisa de bioprospecção. Dessa forma, mapas bases inicialmente gerados pela representação gráfica dos

fragmentos de Mata Atlântica podem ser usados para a produção de mapas temáticos de interesse para o acesso ao patrimônio genético visando a pesquisa de bioprospecção farmacêutica.



Figura 4: Logotipo da Plataforma MAPA

Atualmente a Plataforma MAPA consiste em 230 registros, referentes às 230 espécies de árvores taxonomicamente identificadas e codificadas com placas que trazem o código de identificação ID MAPA. O ID MAPA de cada espécie foi gerado pela Plataforma MAPA mediante o cadastro da espécie. O número do ID MAPA refere à família, gênero e espécie cadastrada.

O Número de Identificação (ID MAPA) de cada espécie cadastrada foi formado pela combinação dos números registrados no banco de dados da Plataforma MAPA referentes à família, gênero e espécie.

O Número de Identificação da Amostra é o mesmo ID MAPA da espécie acrescido de uma letra no final, que corresponde à parte da planta coletada e depositada em exsiccata. As partes das plantas normalmente coletadas são folhas (F) e galhos (G), porém outras partes podem ser coletadas, como frutos, inflorescência, raiz, etc.

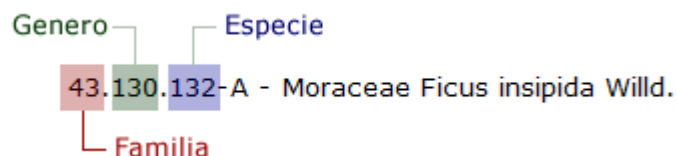
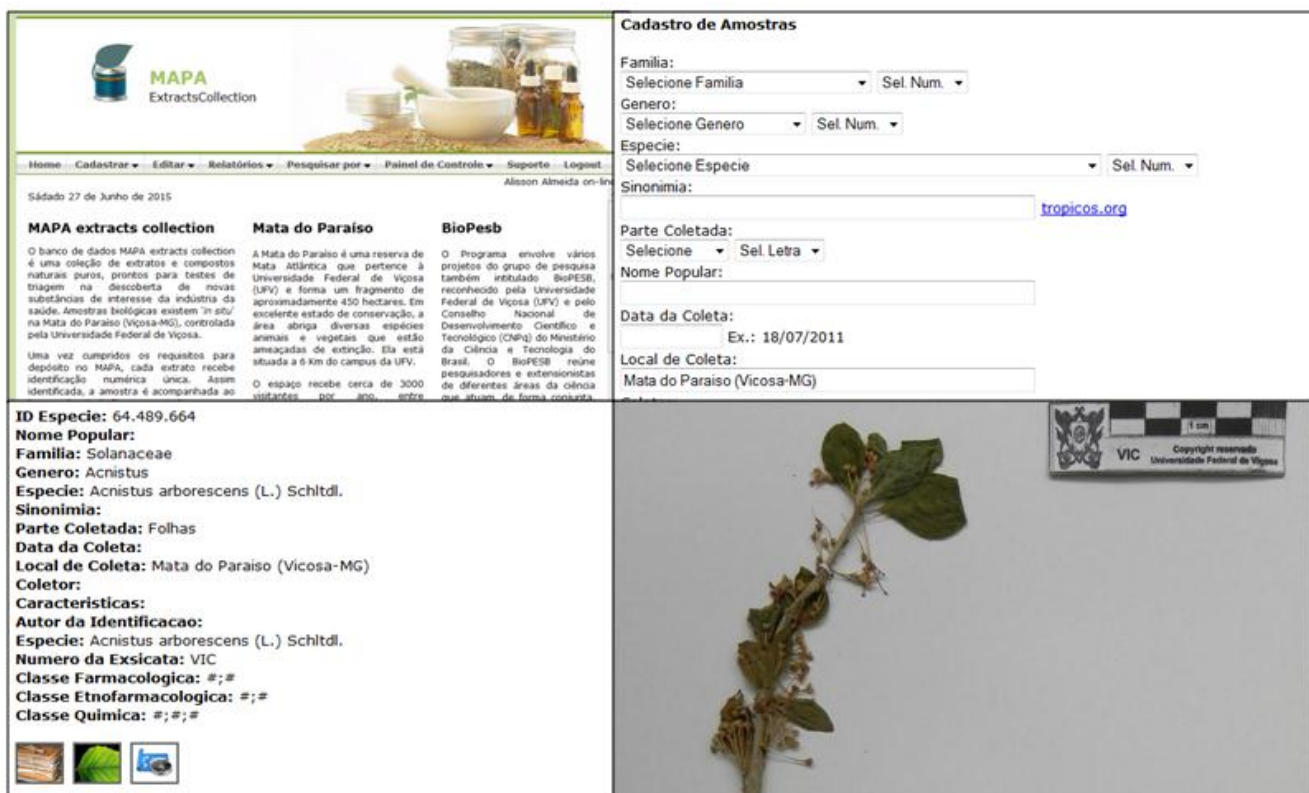


Figura 5: Modelo do Número de Identificação da Amostra ID MAPA

As informações química, farmacológica, toxicológico e de uso popular levantadas na literatura foram sistematizadas em categorias visando a sistematização do instrumento de busca da Plataforma (**Figura 6**).



MAPA ExtractsCollection

Sábado 27 de Junho de 2015

MAPA extracts collection
 O banco de dados MAPA extracts collection é uma coleção de extratos e compostos naturais puros, prontos para testes de triagem na descoberta de novas substâncias de interesse da indústria da saúde. Amostras biológicas existem 'in situ' na Mata do Paraíso (Viçosa-MG), controlada pela Universidade Federal de Viçosa.
 Uma vez cumpridos os requisitos para depósito no MAPA, cada extrato recebe identificação numérica única. Assim identificadas, a amostra é acompanhada ao

Mata do Paraíso
 A Mata do Paraíso é uma reserva de Mata Atlântica que pertence à Universidade Federal de Viçosa (UFV) e forma um fragmento de aproximadamente 450 hectares. Em excelente estado de conservação, a área abriga diversas espécies animais e vegetais que estão ameaçadas de extinção. Ela está situada a 6 km do campus da UFV.
 O espaço recebe cerca de 3000 visitantes por ano, entre

BioPesb
 O Programa envolve vários projetos do grupo de pesquisa também intitulado BioPESB, reconhecido pela Universidade Federal de Viçosa (UFV) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do Ministério da Ciência e Tecnologia do Brasil. O BioPESB reúne pesquisadores e extensionistas de diferentes áreas da ciência que atuam de forma conjunta

Cadastro de Amostras

Familia: Seleccione Família Sel. Num.
 Genero: Seleccione Genero Sel. Num.
 Especie: Seleccione Especie Sel. Num.
 Sinonimia: tropicos.org
 Parte Coletada: Seleccione Sel. Letra
 Nome Popular:
 Data da Coleta: Ex.: 18/07/2011
 Local de Coleta: Mata do Paraíso (Viçosa-MG)

ID Especie: 64.489.664
Nome Popular:
Familia: Solanaceae
Genero: Acnistus
Especie: Acnistus arborescens (L.) Schlttl.
Sinonimia:
Parte Coletada: Folhas
Data da Coleta:
Local de Coleta: Mata do Paraíso (Viçosa-MG)
Coletor:
Características:
Autor da Identificação:
Especie: Acnistus arborescens (L.) Schlttl.
Numero da Exsicata: VIC
Classe Farmacológica: #;#
Classe Etnofarmacológica: #;#
Classe Química: #;#;#

VIC Copyright reservado Universidade Federal de Viçosa

Figura 6: Imagens do website da Plataforma MAPA.

A criação de título de busca para cada categoria permite que os usuários possam reduzir drasticamente o tempo de procura das informações de interesse para o acesso a biodiversidade, como: busca por táxon botânico, classe de metabólitos secundários, dado farmacológico e dado etnofarmacológico. A partir da análise dos dados etnofarmacológicos, as espécies foram organizadas em nove categorias de uso medicinal, adaptadas de Abkli et al., (1999), como descrito na **Tabela 1**.

Tabela 1: Sistematização de informações do banco de dados BIOPROS.

Tipo de informação Táxon	Categoria Família Gênero	Relatos na literatura
Classe de metabólitos secundários	Acetogenina	
	Alcaloide	Alcaloides, metilxantinas
	Cardiotônicos	Heterosídeos cardiotônicos
	Cumarina	Cumarinas
	Fenólico simples	
	Flavonoide	Geninas e heterosídeos flavônicos
	Óleo essencial	Monoterpeno, sesquiterpeno, fenilpropanoide
	Quinona	Benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas
	Saponinas	Saponinas triterpênicas e esteroidais
Terpeno/esteroide	Diterpenos, sesterpenos, triterpenos, esteroides	
Tanino	Taninos hidrolisáveis e condensáveis	
Dado farmacológico	Antitumoral	Testes <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> frente à células tumorais
	Antimicrobiano	Ação frente à bactérias, fungos e vírus
	Antioxidante	Testes <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> frente
	Tratamento de doenças negligenciadas Outros	de Malária, doença de Chagas, leishmaniose, febre amarela, esquistossomose
Uso etnofarmacológico (doenças associadas)	Aparelho gastrointestinal	Fígado, estômago, intestino
	Aparelho respiratório	Gripe, tosse, bronquite
	Aparelho urinário	Rins, bexiga, diurético
	Condições dermatológicas	Cicatrizante, machucado, verruga
	Doenças parasitárias	Diarreia, verme, micose, malária, leishmanina
	Inflamação e dor	Dor de cabeça, dor de coluna, inflamação
	Sistema nervoso	Calmante, estimulante
	Sistema cardiovascular	Pressão
Problema ginecológico	Menopausa	

Valendo-se das ferramentas da Plataforma MAPA, os pesquisadores poderão obter a exata localização das espécies de interesse, auxiliando, dessa forma, o acesso ao material vegetal. Além disso, a Plataforma MAPA está integrada ao banco de extratos, permitindo a manipulação de dados para subsidiar as estratégias de acesso à biodiversidade, como também permitir a rastreabilidade dos extratos usados nos testes biológicos (**Figura 7**).

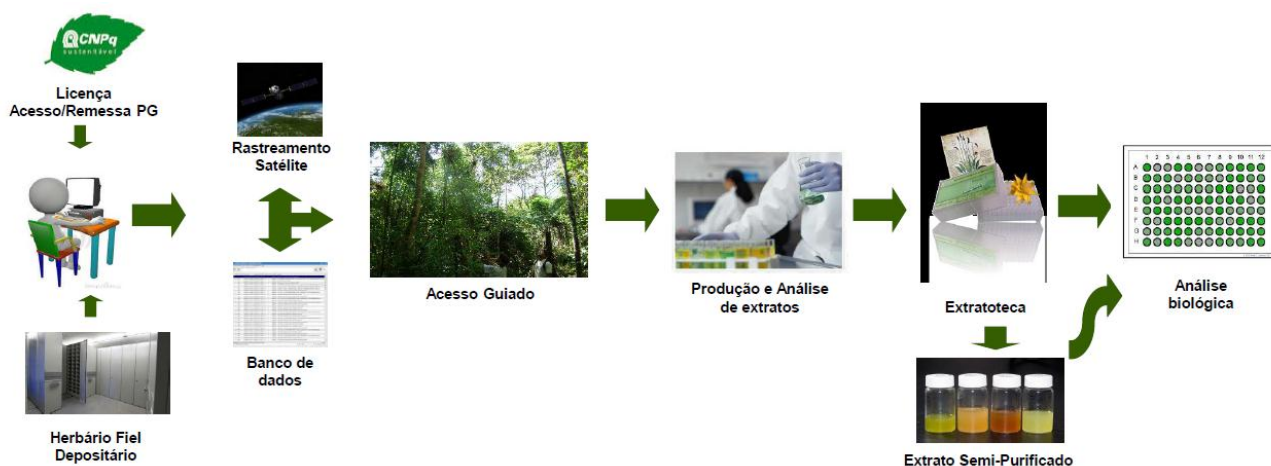


Figura 7: O banco de dados da Plataforma MAPA pode direcionar estratégias de bioprospecção a determinados extratos armazenados na BIOPROS *Extracts Library*.

4.4. Importância do Sistema de Informação Geográfica (SIG) na Bioprospecção por Produtos Naturais

Nas pesquisas de bioprospecção farmacêutica, o Sistema de Informação Geográfica (SIG) pode ser usado como instrumento de auxílio ao acesso ao material vegetal, análise da disposição espacial de grupos de espécies de interesse farmacêutico e rastreabilidade das espécies potencialmente bioativas. Estas informações podem ser fornecidas através de mapas que auxiliam a utilização dos recursos naturais das áreas monitoradas, ao mesmo tempo promovendo a conservação e preservação da riqueza biológica (Roy et al., 2002; Yadav et al., 2013).

O emprego do sistema GPS permite a obtenção de informações sobre a posição geográfica global de qualquer local, indivíduo ou ponto localizado sobre o globo terrestre utilizando uma rede de satélites. Essa técnica tem grande potencial na conservação e gestão da biodiversidade, bem como em muitos outros ramos relacionados a estudos de biodiversidade, que exijam localizações geográficas dos indivíduos.

A integração do GPS com o SIG atuaria como uma ferramenta poderosa para mapear as características geográficas dos sistemas ecológicos e analisar a disposição dos recursos biológicos para estudos de bioprospecção (Yadav et al., 2013). Este recurso ainda é pouco utilizado para pesquisa de investigação química e farmacológica de plantas.

4.5. Obtenção dos Extratos

Uma enorme variedade de substâncias com naturezas químicas diferentes são encontradas nas plantas. Devido à diferença de polaridade dessas substâncias, é sabido que o uso de um único tipo de solvente no processo de extração não seria suficiente para extrair todas essas substâncias encontradas em uma planta (McCloud, 2010). Portanto, surge a necessidade de se trabalhar com mais de um tipo de solvente no processo de extração: o primeiro orgânico (baixa polaridade) e o segundo aquoso (alta polaridade). Esses solventes foram escolhidos por garantir

maior rendimento aos extratos, cujas moléculas tenham natureza química diferente.

Além da polaridade do solvente utilizado, outros fatores como o tempo de extração e a quantidade da droga vegetal em pó que foi extraída são importantes para que se obtenha uma extração com bom rendimento, preserve a atividade biológica das moléculas e que seja adaptado para a obtenção de um grande número de amostras que irão constituir a coleção. Todas as amostras foram submetidas às mesmas condições de extração.

Após a secagem do material vegetal foi obtido em média 100 g de folhas secas e 100 g de galhos secos. A pulverização da droga vegetal tem a função de aumentar o rendimento do processo de extração com solvente químico para a preparação dos extratos. O tamanho das partículas da droga vegetal após a moagem é muito importante e deve ter uma granulometria que varia entre 1,0-2,8 mm. Partículas muito pequenas dificultam a passagem do solvente e partículas muito grande dificultam o processo de extração do solvente químico. Estudos realizado, indicam que o DCM/MeOH (1:1) é uma mistura de solventes que consegue extrair a maior quantidade de substâncias de uma droga vegetal pulverizada em comparação com outras misturas de solventes (McCloud, 2010).

Os solventes foram drenados apenas uma vez. Esse método possui a finalidade de reduzir o tempo e os custos com solventes no processo de extração, sem afetar a quantidade final do extrato bruto, pois de acordo com McCloud (2010), drenagens sucessivas com o mesmo solvente praticamente não aumentam significativamente a quantidade final do extrato.

O rendimento (*R*) do extrato pode ser calculado através da relação entre a quantidade de extrato produzido pela quantidade de droga pulverizada.

$$R(\%) = \frac{\text{Massa Extrato}}{\text{Massa Droga em Pó}} \times 100(\%)$$

Como mostrado na **Tabela 2**, o rendimento médio dos diferentes extratos da BIOPROS *Extracts Library* foram semelhantes ao rendimento médio dos extratos vegetais produzidos pelo Programa de Descobrimento de Produtos Naturais do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI-Frederick), que possui uma das mais completas coleções de extratos do planeta (McCloud, 2010).

Tabela 2: Rendimento (%) dos extratos orgânicos e aquosos produzidos a partir de folhas e galhos de espécies arbóreas da EPTEA Mata do Paraíso.

Material Vegetal	Folhas		Galhos	
	Orgânico	Aquoso	Orgânico	Aquoso
Tipo de Extrato ^a				
Rendimento Médio (%) ^b	6,4%	3,3%	3,3%	2,8%
Rendimento Médio NCI ^c	6,8%	3,9%	3,4%	2,2%

^aOrgânico: Diclorometano/Metano (1:1); Aquoso: água destilada.

^bMédia calculado do rendimento dos respectivos extratos.

^cMcCloud, 2010. NCI (Instituto Nacional do Câncer, EUA).

A produção dessa grande quantidade de extratos em um curto intervalo de tempo foi possível devido à eficiência na logística de acesso ao material vegetal e ao processo de extração.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A Mata Atlântica é considerada um dos biomas mais importantes e ao mesmo tempo mais ameaçado do mundo. Isso se deve ao seu alto índice de biodiversidade e endemismo de espécies, que há muitos anos vem sendo ameaçada pela ocupação e exploração dos recursos naturais de forma desordenada. Os maiores pólos industriais e as maiores cidades brasileiras que abrigam cerca de 70% da população estão inserida neste bioma (MMA, 2002).

Para os Institutos de pesquisa e indústrias farmacêuticas, a criação de coleções de extratos de espécies vegetais ainda pouco conhecidas para a ciência é bastante estratégico. O principal motivo é a grande diversidade de estruturas químicas disponíveis para serem testadas em diferentes alvos, seja em células, seja em moléculas isoladas, como enzimas.

Para se chegar a substâncias biologicamente ativas, é preciso começar a triagem com um grande número de compostos, que no decorrer do processo vão sendo “filtrados” pelas propriedades *Drug-like*, que considera características como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade das moléculas (Harvey, 2015).

Em uma triagem inicial de uma coleção de extratos em um alvo biológico, a substância responsável pela atividade biológica do extrato pode estar em baixa concentração subestimando os resultados. Além disso, compostos interferentes podem contribuir para resultado falso negativo. A solução seria isolar cada substância, o que torna o processo final de triagem caro, trabalhoso e ineficiente (Harvey, 2015).

Porém, a eficiência dos testes biológicos com extratos vegetais pode ser alcançada por meio de técnicas simples de fracionamento cromatográfico ou através de pré-tratamentos capazes de “limpar” os extratos vegetais ao retirar grupos de substâncias que poderiam mascarar os resultados, com a clorofila (encontrada em extratos orgânicos de folhas) e os taninos (presentes nos extratos aquosos de cascas), que podem se complexar com enzimas (Pickeret al., 2014). A clorofila que dificulta a solubilidade dos extratos em meio hidrofílico pode ser retirada pelo processo de extração em fase sólida (EFS) utilizando cartucho C-18.

Processos biotecnológicos que utilizam tratamentos com enzimas antes do processo de extração vêm obtendo extratos, cuja atividade antiproliferativa aumenta, devido à concentração de metabólitos secundários bioativos. Taffarello e colaboradores (2013) conseguiram enriquecer o teor de antocianidinas em extratos das folhas de *Arrabidaea chica* previamente fermentadas pela enzima xilanase. Além disso, foi observado que os extratos tratados por hidrólise enzimática diminuíram a concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular em um painel de 9 linhagens celulares tumorais

Os avanços das técnicas de fracionamento cromatográfico, pré-tratamentos, isolamento e elucidação estrutural de substâncias associada a métodos de *screening* biológicos eficientes, como o sistema robotizado HTS (*High Throughput Screening*), que permite testar *in vitro* milhares de substâncias em alvos biológicos específicos em curto intervalo de tempo, tem propiciado o aumento no número de produtos naturais que apresentam potencial farmacológico, ao mesmo tempo, servindo de modelos químicos para a síntese de novas drogas utilizadas no tratamento de diversas doenças, como o câncer (Drews, 2000; Pessoa et al., 2006; Brandão et al., 2010).

A diversidade das coleções de extratos abrange tanto a diversidade de famílias e espécies, quanto a diversidade de substâncias presentes nos extratos testados. A diversidade de uma extratoteca é mais importante que a quantidade de extratos que a compõe (Harvey, 2015).

A BIOPROS *Extracts Library* pretende aumentar e consolidar as pesquisas de bioprospecção na EPTEA Mata do Paraíso. Para isto, novas espécies serão avaliadas quanto à atividade biológica; avaliar o aumento da eficiência dos testes biológicos com extratos vegetais ao adotar técnicas de *Clean up*; fracionar, purificar e identificar estruturalmente substâncias presentes nos extratos biologicamente ativos empregando técnicas espectrométricas como LC-MS (Cromatografia Líquida acoplada ao Espectrômetro de Massas).

Estes extratos, no futuro, poderão ser disponibilizados em placas de 96 poços devidamente identificados e rastreados e, na forma de parcerias com outros centros de pesquisas, serem cedidos para a avaliação de suas potenciais atividades, como antimicrobiano, antiviral, anti-helmíntico e inibidores de enzimas de interesse para a

busca de novos fármacos e agroquímicos.

Até o momento, a BIOPROS *Extracts Library* conta com 196 extratos oriundos de 49 espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica. A logística de acesso ao patrimônio genético e o processo de produção dos extratos foram padronizados com o objetivo de preservar a atividade biológica das moléculas; além de otimizar o processo. A BIOPROS *Extracts Library* tem o potencial de ter até 920 extratos, a partir das 230 espécies arbóreas que já foram identificadas na EPTEA Mata do Paraíso. A diversidade química dos extratos que compõem a BIOPROS *Extracts Library* guarda um arsenal de moléculas promissoras para serem testadas em diferentes alvos biológicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abel, U., Koch, C., Speitting, M., Hansske, F.G. (2002). Modern methods to produce natural product libraries. *Current Opinion in Chemical Biology* 6, 453-458.

Boero, F. (2010). The study of species in the era of biodiversity: a tale of stupidity. *Diversity* 2, 115-126.

BRASIL (2001). Medida provisória n.º 2.186-16 de 23 de agosto de 2001. Regulamenta o inciso I do § 1º e o § 4º do art. 225 da Constituição, os arts. 1º, 8º, alínea "j", 10, alínea "c", 15 e 16, alíneas 3 e 4 da Convenção sobre Diversidade Biológica, dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado, a repartição de benefícios e o acesso à tecnologia e transferência de tecnologia para sua conservação e utilização, e dá outras providências. República Federativa do Brasil, Poder executivo, Brasília, DF 23 de agosto de 2001.

CDB (Convenção sobre Diversidade Biológica). (1992). A Convenção sobre Diversidade Biológica. Ministério do Meio Ambiente - MMA, BRASIL. Ministério do Meio Ambiente.

Carvalho, J.E. (2006). Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese. *Revista Multiciência* 7, 1-18.

Cragg, G.M., Newman, D.J. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 72-79.

Cragg, G.M., Newman, D.J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830, 3670-3695.

Dennis, R.A., Mans, A.B., Da Rocha, G.S. (2000). Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *The Oncologist* 5, 185-198.

Donaldson, J. R.; Gates, R. G. (2004). Screening for anticancer agents from Sonoran Desert Plants: a chemical ecology approach. *Pharmaceutical Biology*, 42(7): 478-487.

Drews, J. (2000). Drug discovery today - and tomorrow. *DDT* 5, 2-3.

Eisenberg, D.M., Harris, E.S., Littlefield, B.A., Cao, S., Craycroft, J.A., Scholten, R., Bayliss, P., Fu, Y., Wang, W., Qiao, Y., Zhao, Z., Chen, H., Liu, Y., Kaptchuk, T., Hahn, W.C., Wang, X., Roberts, T., Shamu, C.E., Clardy, J. (2011). Developing a library of authenticated Traditional Chinese Medicinal (TCM) plants for systematic

biological evaluation--rationale, methods and preliminary results from a Sino-American collaboration. *Fitoterapia* 82, 17-33.

Farnsworth, N. R.; Soejarto, D. D.; (1991). Global importance of medicinal plants. In: Akerele, O.; Heywood, V.; Synge, H.; Eds., *Conservation of Medicinal Plants*. Cambridge, UK, Cambridge University Press, pp. 1-40.

Foody, G.M., Boyd, D.S., Cutler, M.E.J. (2003). Predictive relations of tropical forest biomass from Landsat TM data and their transferability between regions. *Remote Sensing of Environment* 85(4), 463-474.

Fouche, G.; Cragg, G.M.; Pillay, P.; Kolesnikova, N. (2008). In Vitro Anticancer Screening of South African Plants. *Journal of Ethnopharmacology* 119, 455-461.

Fundação SOS Mata Atlântica & INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais). 2001. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica e ecossistemas associados no período de 1995–2000. Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, São Paulo.

Harvey, A.L., Edrada-Ebel, R., Quinn, R.J. (2015). The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery* 14, 111-129.

Hyyppä, J., Hyyppä, H., Inkinen, M., Engdahl, M., Linko, S., Zhu, Y. (2002). Accuracy comparison of various remote sensing data sources in the retrieval of forest stand attributes. *Forest Ecology and Management* 128, 109-120.

Ito, T., Odake, T., Katoh, H., Yamaguchi, Y., Aoki, M. (2011). High-throughput profiling of microbial extracts. *Journal of Natural Products*, 74(5), 983-988.

Júnior, H.M.S., Oliveira, D.F., Carvalho, D.A., Pinto, J.M.A., Campos, V.A.C., Mourão, A.R.B., Pessoa, C., Moraes, M.O., Costa-Lotufo, L.V. (2010). Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. *Journal of Natural Medicines* 64, 231-238

Khazir, J., Mir, B.A., Pilcher, L., Riley, D.L. (2014). Role of plants in anticancer drug discovery. *Phytochemistry Letters* 7, 173-181.

Leite, J.P.V. (2009). *Fitoterapia: Bases Científicas e Tecnológicas*. São Paulo. Ed. Atheneu.

Lewinsohn, T.M.; Prado, P.I. (2006). Síntese do conhecimento atual da

biodiversidade brasileira. In: Lewinsohn, T.M. (org.). Avaliação do estado do conhecimento da biodiversidade brasileira. Brasília: MMA., v. I , 269p.

Machado, A.B.M., Drummond, G.M., Paglia, A.P. (2008). Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção; Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2008.

Mann, J. (2002). Natural products in cancer chemotherapy, past, present and future. *Nature Reviews (Cancer)* 2, 143-148.

Mans, D.R.A., Rocha, A.B., Schwartzmann, G. (2000). Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *The Oncologist* 5, 185-198.

McCloud, T.G. (2010). High throughput extraction of plant, marine and fungal specimens for preservation of biologically active molecules. *Molecules* 15, 4526-4563.

Melo, J.G., Araújo, T.A.S., Castro, V.T.N.A., Cabral, D.L.V., Rodrigues, M.D., Nascimento, S.L., Amorim, E.L.C., Albuquerque, U.P. (2010). Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. *Molecules* 15, 8534-8542.

Mesquita, J.R.B., Paula, J.E., Pessoa, C., Moraes, M.O., Costa-Latuf, L.V., Grougnet, R., Michel, S., Tillequin, F., Espinhola, L.S. (2009). Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology* 123, 439-445.

MMA (Ministério do Meio Ambiente). (2002). Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. Brasília: MMA/SBF, 404 p.

Mora, C., Tittensor, D., Adl, S., Simpson, A.G.B., Worm, B. (2011). How many species are there on the earth and in the ocean? *PLoS Biology* 9(8), 1-8.

Neelakandan, V.N., Mohanan, C.N., Sukumar, B. (2006). Development of a biogeographical Information Systems for Conservation Monitoring of Biodiversity. *Current Science* 90 (3), 444-450.

Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M. (2003). Natural Products as source of new drugs over the period 1981-2002. *Journal Natural Products* 66, 1022-37.

Newman, D.J.; Cragg, G.M. (2012). Natural Products as source of new drugs over the 30 years from 1981-2010. *Journal Natural Products* 75, 311-335.

Onur, S.O., Stöckmann, H., Zenthoefer, M., Piker, L., Döring, F. (2013). The Plant Extract Collection Kiel in Schleswig-Holstein (PECKISH) Is an Open Access Screening Library. *Journal of Food Research* 2(4), 101-106.

Pessoa, C., Costa-Lotufo, L. V., Leyva, A., De Moraes, M. E. A., De Moraes, M. O. (2006). Anticancer potential of northeast brazilian plants. *Lead Molecules from Natural Products: discovery and new trends*, 197-211.

Picker, P., Vogl, S., Micknnonn, R., Mihaly-Bison, J., Binder, M., Atanasov, A.G., Fukhrudin, N., Grzywacz, A.M., Heiss, E.H., Zehl, M., Saukel, J., Wawnosch, C., Schinkovitz, A., Bauer, R., Rollinger, J. M., Stuppner, H., Dirsch, V. M., Bochkov, V. N., Reznicek, G., Kopp, B. (2014). Plant extracts in cell-based anti-inflammatory assays - pitfalls and consideration related to removal of activity masking bulk components. *Phytochemistry Letters*, 686: 1-7.

Souza, M.V.N. (2004). Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. *Química Nova* 27(3), 308-312.

Strohl, W.R. (2000). The role of natural products in a modern drug discovery program. *DDT* 5(2), 39-41.

Taffarello, D., Jorge, M.P., Sousa, I.M.O., Duarte, M.C.T., Figueira, G.M., Queiroz, N.C.A., Rodrigues, R.A.F., De Carvalho, J.E., Goes, A.L.T.R., Foglio, M.A., Riveros, J.M., Eberlin, M.N., Cabral, E.C. (2013). Atividade de extratos de *Arrabidaea chica* (Humb e Bonpl.) Verlot obtidos por processos biotecnológicos sobre a proliferação de fibroblastos e células tumorais humanas. *Química Nova* 36(3), 431-436.

Veloso, H.P., Rangel Filho, A.L.R., Lima, J.C.A. (1991). Classificação da vegetação brasileira, adaptação a um sistema universal. Rio de Janeiro, Brasil. Ed. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

Volpato, M.M.L. (1994). Regeneração natural de uma floresta secundária no domínio da Mata Atlântica: uma análise fitossociológica. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

Yadav, P.K., Sarma, K., Dookia, S. (2013). The review of biodiversity and conservation study in India using geospatial technology. *International Journal of Remote Sensing and GIS* 2(1), 1-10.

Yadav, S.K., Mishra, G.C. (2013). Biodiversity Management Open Avenues for Bioprospecting. *International Journal of Agriculture Food Science & Technology* 4(6),

635-642.

Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggon, P., Mcphail, A.T. (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and the structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. Journal American Chemical Society 93, 2325-2327.

World Health Organization. Cancer. Acessado em: 12/03/15. Disponível em: www.who.int/cancer/en/.

Zhang, J.T. (2002). New Drugs Derived from Medicinal Plants. Therapie 57(2), 137-50.

CAPÍTULO 2

Bioprospecção de Produtos Naturais Antitumorais em Coleção de Extratos de Espécies Arbóreas da Mata Atlântica.

Almeida, A. A.^{a,*}; Castro, M. V. R.^b; Fernandes, I. G.^a; Rezende, J. S.^a; Escudeiro, M. C.^b; Alves, G.^a; Siqueira, R. P.^a; Bressan, G. C.^a; Leite, J. P. V.^a.

^aUniversidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Av. P. H. Rolfs, s/n, 36570-000, Viçosa, MG, Brasil.

^b Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Engenharia Florestal, Av. P. H. Rolfs, s/n, 36570-000, Viçosa, MG, Brasil.

* Correspondência autor:

Tel.: 31 8943 3522

Endereço de e-mail: alisson.almeida@ufv.br

RESUMO

O câncer é a segunda enfermidade com maior letalidade em todo o mundo. Estimativas indicam que entre os anos de 2005 e 2015, cerca de 84 milhões de pessoas morreram vítimas desta doença. A descoberta de novas drogas anticâncer de origem vegetal, como os alcaloides isolados da *Vinca rosea*, tem incentivado a avaliação da atividade antiproliferativa de extratos vegetais em diversas linhagens de células tumorais. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade anticâncer *in vitro* de uma coleção de extratos oriundos de árvores nativas do bioma Mata Atlântica brasileiro (BIOPROS *Extracts Library*) frente a 3 linhagens de células tumorais, MCF-7 (mama), B16-F10 (melanoma murino) e HepG2 (fígado) pelo ensaio de redução do MTT. Em uma triagem inicial, todos os extratos foram testados na concentração inicial de 100 µg/mL. Os extratos que inibiram o crescimento celular acima de 75% (GI₇₅) foram testados novamente em diferentes concentrações dentro da faixa (3,125 – 200 µg/mL) para calcular o IC₅₀. A seletividade destes extratos foi avaliada em células da linhagem VERO. Extratos com valores de IC₅₀ abaixo de 10 µg/mL foram considerados bastante promissores nos ensaios citotóxicos. Seguindo este parâmetro, os extratos orgânicos de folhas (EOF) das espécies *Casearia sylvestris* Sw. e *Aureliana velutina* Sendtn. inibiram o crescimento celular de B16-F10 (IC₅₀ = 3,81 µg/mL e 6,22 µg/mL, respectivamente). Já o EOF de *Acnistus arborescens* (L.) Schltdl. mostrou atividade citotóxica contra HepG2 (IC₅₀ = 5,01 µg/mL). Esses extratos foram citotóxicos para as células VERO apenas em altas concentrações, sugerindo seletividade. Estes resultados sugerem que estas espécies podem ser fontes de substâncias com potente atividade antitumoral.

Keywords: Atividade antitumoral, BIOPROS *Extracts Library*, extratos vegetais, Mata Atlântica.

ABSTRACT

Cancer is the second disease to higher mortality worldwide. Estimates indicate that between the years 2005 and 2015, about 84 million people died because this disease. The discovery of new anticancer drug of plant origin, such the alkaloids isolated from *Vinca Rosea*, has encouraged the evaluation of the antiproliferative activity of plant extracts on various tumor cell lines. The aim of this study was to evaluate the anticancer activity *in vitro* of a collection of extracts derived from native trees in the Brazilian Atlantic Forest (BIOPROS *Extracts Library*) against three human cancer cell lines, MCF-7 (breast), B16-F10 (murine melanoma) and HepG2 (liver) by MTT assay. In an initial screening, all extracts were tested at a concentration of 100 µg/mL. The extracts that inhibited cell growth above 75% (GI_{75}) were tested at different concentrations (3.125 to 200 µg/mL) to calculate the IC_{50} . The selectivity of these extracts was evaluated in VERO cells. Extract with IC_{50} values below 10 µg/mL are considered promising in cytotoxic assays. Following this parameter, the organic extracts of the leaves of the species *Casearia sylvestris* Sw. and *Aureliana velutina* Sendtn. inhibited cell growth of B16-F10 (IC_{50} = 3.81 µg/mL and 6.22 µg/mL, respectively). The organic extracts of leaves of *Acnistus arborescens* (L.) Schlttdl. showed antiproliferative activity against HepG2 (IC_{50} = 5.01 µg/mL). These extracts were toxic to VERO cells only at high concentrations, suggesting selectivity. These results suggest that these species can be sources of substances with potent anticancer activity.

Keywords: Anticancer activity, Atlantic Forest, BIOPROS *Extracts Library*, plant extracts.

1. INTRODUÇÃO

O câncer representa a segunda causa de morte da população mundial, superado apenas pelas doenças cardiovasculares. Segundo a Sociedade Americana de Câncer (ACS), de cada oito mortes que ocorrem no planeta, uma é devido ao câncer. Só nos Estados Unidos são mais de 1 milhão de novos casos por ano. No ano de 2015, 14 milhões de novos casos serão diagnosticados em todo o mundo, sendo que 8 milhões de pessoas provavelmente morrerão (ACS, 2015).

Estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA) indica que em 2015 ocorreram aproximadamente 576 mil novos casos de câncer no Brasil. Os tipos de cânceres que mais acometem os homens são os de próstata e pulmão, enquanto que nas mulheres, os tipos mais comuns são os de mama e útero (INCA, 2014). O aumento do número de casos diagnosticados deve-se ao aumento da expectativa de vida da população, pois o envelhecimento favorece o aparecimento desta doença (Cairns, 1981; Carvalho, 2006).

Para a Organização Mundial da Saúde (OMS), câncer, tumor maligno, ou neoplasia maligna são termos utilizados para definir um grande número de doenças que acometem diferentes órgãos do corpo humano. Atualmente, são conhecidos mais de 100 tipos de cânceres. Esta doença aparece quando as células normais perdem a capacidade de controle do próprio ciclo celular devido alterações genéticas, resultando na perda da função celular e proliferação exacerbada das células com formação do tumor e metástase (Carvalho, 2006). Quando detectados precocemente, a chance de cura com tratamento aumenta consideravelmente (WHO, 2015).

A quimioterapia antineoplásica consiste na destruição das células tumorais por meio da ação de compostos químicos. Os produtos naturais de origem vegetal desempenham importante papel na busca por novos agentes bioativos direcionados para o tratamento do câncer (Georgaki et al., 2009; Brandão et al., 2010; Anatole et al., 2013). A relevância dos produtos naturais é tanta que cerca de 60% de drogas anticâncer disponíveis no mercado são diretamente ou indiretamente oriundas das plantas. (Cragg e Newman, 2005; Cragg e Newman, 2009).

Entre as principais drogas derivadas das plantas e clinicamente utilizadas no combate ao câncer, têm-se os vinca alcalóides (vimblastina, vincristina, vindesina,

vinflunina e vinorelbina) isolados de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, utilizada tradicionalmente pela população de Madagascar no tratamento do diabetes (Johnson, et al., 1963; Cragg e Newman, 2005; Khazir et al., 2014); taxanos (paclitaxel e docetaxel), isolados das cascas do caule da espécie *Taxus brevifolia* Nutt., (Wani et al., 1971; Cragg e Newman, 2005; Khazir et al., 2014); camptotecina isolada da árvore ornamental chinesa *Camptotheca acuminata* Decne., que devido sua alta toxicidade renal e ineficiência farmacológica em testes *in vivo* levou a semi-síntese de dois derivados (topotecan e irinotecan); etoposídeo e teniposídeo, drogas derivadas de síntese parcial da podofilotoxina, lignana isolada de *Podophyllum peltatum*, espécie utilizada por populações tradicionais da América do Sul no tratamento de verrugas (Mann, 2002; Carvalho, 2006; Brandão et al., 2010) entre outras.

O paclitaxel (taxol[®]), produto proveniente do *screening* realizado pelo NCI em milhares de extratos vegetais, foi isolado das cascas do teixo do Pacífico (*Taxus baccata* e *Taxus brevifolia*) em 1971. Após 20 anos de desenvolvimento, esta droga foi aprovada e liberada na década de 90 para o tratamento dos cânceres de mama e ovário, resistentes a terapia utilizada na época. O longo período de desenvolvimento do paclitaxel ocorreu porque esta substância era encontrada em pequenas concentrações nas cascas da espécie ameaçada de extinção *Taxus brevifolia*; o isolamento de poucas gramas levaria a destruição de centenas de árvores. Além disso, a estrutura química do paclitaxel é extremamente complexa, com vários carbonos quirais, demandando o desenvolvimento da síntese química e a descoberta de precursores isolados de fontes renováveis, como as folhas de *Taxus baccata*. (Souza, 2004; Carvalho, 2006; Brandão et al., 2010; Cragg e Newman, 2013).

O mecanismo de ação da maioria dos quimioterápicos derivados de plantas envolve a interação com o DNA, inibição de enzimas importantes no processo de replicação, como as DNA topoisomerases I e II e interação com outras proteínas, como as tubulinas, tudo isso visando interromper as fases do ciclo celular (Brandão et al., 2010). Porém, os efeitos tóxicos dos quimioterápicos são muitos, considerando que a maioria das drogas supressoras do crescimento das células malignas são genotóxicas, ou seja, produzindo danos ao DNA e mutações que podem induzir o surgimento de tumores tardios. As drogas antineoplásicas mais promissoras são aquelas que induzem a apoptose das células tumorais, sem afetar o metabolismo das

células normais (INCA, 1993; Carvalho, 2006).

A Mata Atlântica possui alto índice de biodiversidade e endemismo de espécies vegetais, porém, muitas delas ainda são desconhecidas quanto as suas propriedades farmacológicas. Além disso, essas espécies há muitos anos vem sendo ameaçadas pela ocupação e exploração dos recursos naturais de forma desordenada (MMA, 2002). A BIOPROS *Extracts Library* é uma coleção de extratos de espécies arbóreas da Mata Atlântica que apresenta um banco informatizado de dados. Atualmente, a BIOPROS *Extracts Library* contem 196 extratos oriundos de 49 espécies nativas da Mata Atlântica distribuídas em 25 famílias. A diversidade da BIOPROS *Extracts Library* abrange tanto a diversidade de famílias e espécies, quanto à diversidade de substâncias presentes nos extratos que podem ser testadas frente a diferentes alvos biológicos. A BIOPROS *Extracts Library* pode ser considerada a primeira coleção de extratos georreferenciada e em interface com um bando de dados virtual de espécies nativas da Mata Atlântica.

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade citotóxica *in vitro* dos extratos da BIOPROS *Extracts Library* na busca por novos agente bioativos direcionados ao tratamento do câncer.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal

Todas as espécies vegetais foram coletadas em área de Mata Atlântica, no estado de Minas Gerais, Brasil. As espécies foram taxonomicamente identificadas e as exsiccatas foram depositadas no Herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (PAMG/EPAMIG). A autorização do acesso pelo governo brasileiro foi obtida pelo CNPq (n° 010134/2014-0).

2.2. Produção dos Extratos

No processo de extração, folhas e galhos secos de cada espécie foram pulverizados em moinho de facas e submetidos à maceração com solvente orgânico (diclorometano e metanol 1:1) por 15 horas. Após a drenagem do solvente orgânico, foi adicionado solvente aquoso (água destilada) a torta de cada material que permaneceu no percolador, ficando em repouso por mais 15 horas. O solvente orgânico foi recuperado no evaporador rotatório, enquanto que o solvente aquoso foi removido no liofilizador. Os extratos secos foram colocados em frascos de vidro e armazenados em baixa temperatura (-20 °C) até a realização dos ensaios biológicos.

2.3. Diluição dos Extratos em DMSO

Uma solução estoque dos extratos foi feita diluindo-se 40 mg de cada extrato em 1 mL de dimetilsulfóxido puro (DMSO). Para facilitar a diluição, os *eppendorfs* foram colocados no ultrassom por aproximadamente 10 minutos. A solução estoque ficou armazenada em *freezer* na temperatura de - 20 °C até os ensaios de citotoxicidade celular.

2.4. Screening *in vitro* em células tumorais

2.4.1. Cultivo de células

Foram utilizadas 3 linhagens de células tumorais, MCF-7 (carcinoma de mama humano), B16-F10 (melanoma murino) e HepG2 (hepatocarcinoma); e uma linhagem de células normais oriundas do rim do macaco verde africano (VERO). Estas linhagens foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com Soro Fetal Bovino inativado (SFB, 10%), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). Para evitar a contaminação por microrganismos e preservar as propriedades de substâncias orgânicas termosensíveis, o meio de cultivo foi filtrado em membrana de acetato de celulose (porosidade de 0,22 µm) com o auxílio de bomba a vácuo. As células cresceram em garrafas de cultivo celular de poliestireno (25 cm² e 75 cm²), que ficaram incubadas em estufa de gás carbônico a 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de ar e 100% de umidade relativa. As células utilizadas nos ensaios estavam em fase de crescimento logarítmico. O meio de cultivo foi trocado periodicamente e o crescimento celular foi avaliado por meio do microscópio de luz invertida. Toda vidraria para o cultivo celular (pipetas graduadas, béqueres e frascos de vidro) foi esterilizada em autoclave a temperatura de 121 °C por 20 minutos e seca em estufa a 80 °C.

2.4.2. Tripsinização

A tripsinização é o processo que consiste em desprender as células aderentes a parede da garrafa de cultura com o auxílio de enzimas (proteases) que digerem as proteínas de adesão. Para isso, o meio de cultura foi descartado e a cultura de células lavada com PBS 1X; depois foi adicionado 1 mL de solução de tripsina (0,25%) em cada garrafa. As garrafas foram incubadas em estufa de gás carbônico (37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa) por 10 minutos. A reação de tripsinização foi interrompida adicionando-se 1 mL de SFB e 5,0 mL de meio de cultivo. A suspensão celular foi transferida para um tubo falcon de 15,0 mL e centrifugada a 1500 r.p.m. por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em meio RPMI. Esse processo também é utilizado para o repique

celular ou para a contagem do número de células na câmara de Neubauer para o teste de viabilidade celular.

2.4.3. Contagem do número de células viáveis

Após a tripsinização, uma pequena alíquota (50 µL) da suspensão celular foi incubada com 10 µL do corante Azul de Tripán (0,2%, Merck) e 140 µL de meio de cultivo RPMI 1640 para obter uma diluição de 1:4. Depois de misturar bem os conteúdos, uma alíquota foi retirada com pipeta e dispersada na borda da lamínula preenchendo toda a câmara de Neubauer. A contagem do número de células foi feita em microscópio de luz invertida. O número de células obtido na contagem foi utilizado para determinar o volume do inoculo.

2.4.4. Ensaio de citotoxicidade do DMSO e concentração de células plaqueadas por poço

Para determinar a concentração de DMSO não tóxico e a quantidade de células plaqueadas por poço para cada linhagem celular, foi adicionado suspensão celular em concentrações que variaram de 1×10^4 a 1×10^5 células nos poços de uma microplaca. O tempo de incubação em estufa de CO₂ foi de 24 horas. Passado o tempo de acomodação celular, foi acrescentado alíquotas de DMSO diluído nas seguintes concentrações: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 2,0%. Após 48 horas, a viabilidade celular foi avaliada adicionado 10 µL de brometo-3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) dissolvido em tampão PBS (1X) na concentração de 5 mg/mL. Após a remoção do meio RPMI e do MTT vertendo-se a placa em descarte apropriado, foi adicionado em cada poço 100 µL de DMSO (100%). A leitura da placa foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. Os testes foram realizados em triplicata.

2.4.5. Atividade antiproliferativa de extratos vegetais pelo método do MTT

Todos os extratos produzidos foram avaliados quanto à atividade antitumoral. Para isto, uma alíquota de 100 µL da solução celular de cada linhagem foi plaqueada em microplacas de 96 poços. O número de células por poço variou de acordo com a linhagem celular: [MCF-7 (1×10^5); B16-F10 (1×10^4); Hep G2 (5×10^4)]; assim como o tempo de incubação em estufa de CO₂ antes da adição dos extratos: [MCF-7 (48 hs); B16-F10 (24 hs); HepG2 (24 hs)]. As condições da estufa de CO₂ necessárias para as células aderirem a matriz e proliferarem foram: 5% de CO₂, 95% ar, 100% de umidade relativa e a temperatura de 37 °C.

Na triagem inicial, as culturas celulares foram tratadas com os extratos diluídos em DMSO/RPMI/SFB 10% na concentração de 100 µg/mL. Para isto, foi retirada uma alíquota de 5 µL da solução estoque (40 mg/mL) e transferida para um segundo tubo *ependorf* com 995 µL de meio de cultivo RPMI suplementado com SFB (10%). Depois, 100 µL do segundo *ependorf* foi transferido para cada poço da microplaca previamente incubada e plaqueada com 100 µL de solução celular (meio RPMI, 10% de SFB). Como controle negativo, foi adicionado 100 µL de meio RPMI suplementado com SFB (10%) e DMSO (0,25%). A concentração final do DMSO em cada poço da microplaca foi de 0,25%, não afetando a viabilidade celular. Experimentos preliminares estabeleceram que concentrações de DMSO variando de 0,2 a 1,0% não causaram danos às linhagens células utilizadas.

Após a adição do extrato vegetal, as placas foram incubadas por 48 horas em estufa de CO₂, sobre as mesmas condições citadas acima. Terminado o período de incubação, 10 µL de MTT (5 mg/mL) diluído em PBS (1X) foi adicionado em cada poço para avaliar a atividade citotóxica dos extratos (Mosmann, 1983). Depois de adição do MTT, a microplaca foi colocada em estufa por 3 horas. O sobrenadante foi descartado e adicionado 100 µL de DMSO em cada poço para solubilizar os cristais de Formazan. A citotoxicidade dos extratos foi estabelecida pela comparação entre os valores de absorvância dos poços que receberam tratamento com a absorvância do controle negativo (DMSO, 0,25%).

A proliferação celular foi determinada pela quantificação espectrofotométrica por absorvância em 540 nm. O controle positivo utilizado neste experimento foi a podofilotoxina, avaliada em concentrações que variaram de 1,5625 – 100 µg/mL. A

Inibição Crescimento Celular (GI%, no inglês *Growth Inhibition*) foi calculado de acordo com a fórmula $GI\% = [100 - (T/C) \times 100\%]$; onde T foi a absorvância na presença de extrato e C a absorvância do controle negativo (0,25% de DMSO). Todas as medidas foram feitas em triplicata.

2.4.6. Cálculo do IC₅₀ dos extratos que apresentaram maior inibição do crescimento celular

Os extratos que apresentaram inibição do crescimento celular foram novamente testados em 7 concentrações diferentes, que variaram de 3,125 – 200 µg/mL. O ensaio de viabilidade celular foi realizado como descrito no item anterior. A citotoxicidade destes extratos foi avaliada em células VERO (células não tumorais originadas do rim de macaco verde africano). Para o cálculo do IC₅₀, os experimentos foram realizados em triplicada e em três repetições com intervalos de tempo diferentes, calculando os desvios padrões.

2.4.7. Cálculo do Índice de Seletividade (SI)

O Índice de Seletividade (SI, do inglês, *Selectivity index*) é um critério adotado para se determinar o quanto um composto é efetivo. O SI foi calculado dividindo-se o valor do IC₅₀ encontrado para o extrato em células (VERO) pelo valor do IC₅₀ encontrado pelo mesmo extrato nas células cancerosas.

2.4.8. Análise dos dados

A partir da curva de proliferação celular em função da concentração dos extratos para cada linhagem celular foi calculados o IC₅₀ (concentração de extrato necessário para causar 50% de inibição do crescimento celular) através da análise da regressão não linear utilizando o programa PRISM (*GraphPad 5.01 Software*). A atividade dos extratos pode ser calculada pela média dos valores do logaritmo de IC₅₀ encontrado para as linhagens tumorais. Este parâmetro é adotado pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI-Frederick) para a classificação de extratos em I (inativo): média de log IC₅₀ > 1,5; F (atividade fraca): média de log de IC₅₀ entre 1,1-1,5; M

(atividade moderada): média de log de IC_{50} entre 0-1,1; P (atividade potente): média de log de $IC_{50} < 0$ (Fouche et al., 2008; Motta et al., 2013; Savietto et al., 2013).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Triagem preliminar da atividade antiproliferativa dos extratos frente a linhagens de células tumorais

Na triagem inicial, todos os extratos da BIOPROS *Extracts Library* foram testados quanto à atividade citotóxica frente diferentes linhagens de células tumorais em uma concentração única (100 µg/mL). Estes extratos foram produzidos a partir de 49 espécies nativas da Mata Atlântica, representando um total de 25 famílias. Os extratos orgânicos foram feitos a partir da mistura de solventes (Diclometano/metanol, 1:1), que produziu extratos com bom rendimento e que vem apresentado bons resultados na inibição do crescimento de várias linhagens de células tumorais em outros estudos (Fouche et al., 2008; McCloud, 2010; Motta et. al., 2013; Savietto et. al., 2013).

A viabilidade celular foi quantificada pelo ensaio de redução do MTT, que é baseado na redução do sal tetrazólico (amarelo em solução aquosa) pela enzima desidrogenase succínica presente nas mitocôndrias das células tumorais viáveis, com a formação do sal Formazan, que é um produto insolúvel em água e possui coloração violácea. Quanto maior a respiração celular, maior a viabilidade celular e maior a quantidade de Formazan formado. O Formazan é solúvel em DMSO e pode ser quantificado por espectrofotometria (Mosmann, 1983; Stern e Potter, 2010).

A **Tabela 1** apresenta os resultados da atividade antiproliferativa obtida a partir dos 196 extratos da BIOPROS *Extracts Library* frente a 3 linhagens tumorais: B16-F10 (melanoma murino), HepG2 (hepatocarcinoma) e MCF-7 (carcinoma de mama humano).

Tabela 1: Inibição do Crescimento celular (%) dos extratos das espécies arbóreas da Mata Atlântica frente a três linhagens de células tumorais na concentração de 100 µg/mL.

Família	Espécie	Voucher	Parte Plant	Tipos Celulares GI(%) ^a ; Extratos ^a					
				B16-F10		HepG2		MCF-7	
				EO	EA	EO	EA	EO	EA
Anacardiaceae	<i>Schinus terebintifolius</i> Raddi	VIC40.349	Folha	24%	NI	NI	15%	NI	NI
Anacardiaceae	<i>Schinus terebintifolius</i> Raddi	VIC40.349	Galho	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Annonaceae	<i>Annona sylvatica</i> A. S.-Hil.	VIC40.574	Folha	69%	55%	27%	23%	35%	37%
Annonaceae	<i>Annona sylvatica</i> A. S.-Hil.	VIC40.574	Galho	17%	24%	22%	NI	43%	NI
Annonaceae	<i>Guatteria australis</i> A. S.-Hil.	VIC40.511	Folha	50%	49%	23%	19%	23%	18%
Annonaceae	<i>Guatteria australis</i> A. S.-Hil.	VIC40.511	Galho	72%	NI	11%	21%	18%	35%
Annonaceae	<i>Xilopia sericea</i> A. S.-Hil.	VIC40.432	Folha	62%	29%	NI	NI	15%	NI
Annonaceae	<i>Xilopia sericea</i> A. S.-Hil.	VIC40.432	Galho	17%	NI	NI	NI	18%	11%
Apocynaceae	<i>Tabernaemontana hystrix</i> Steud.	VIC40.521	Folha	56%	45%	NI	NI	17%	38%
Apocynaceae	<i>Tabernaemontana hystrix</i> Steud.	VIC40.521	Galho	92%	27%	75%	NI	49%	42%
Asteraceae	<i>Vernonanthura discolor</i> (Spreng.) H. Rob.	VIC40.381	Folha	NI	NI	22%	20%	44%	28%
Asteraceae	<i>Vernonanthura discolor</i> (Spreng.) H. Rob.	VIC40.381	Galho	NI	NI	NI	NI	57%	42%
Asteraceae	<i>Vernonanthura phosphorica</i> (Vell.) H. Rob.	VIC40.383	Folha	77%	NI	75%	NI	NI	NI
Asteraceae	<i>Vernonanthura phosphorica</i> (Vell.) H. Rob.	VIC40.383	Galho	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Bignoniaceae	<i>Cybistax antisiphilitica</i> (Mart.) Mart.	VIC40.528	Folha	NI	NI	13%	16%	NI	24%
Bignoniaceae	<i>Cybistax antisiphilitica</i> (Mart.) Mart.	VIC40.528	Galho	NI	NI	NI	NI	32%	29%
Cannabaceae	<i>Trema micrantha</i> (L.) Blume	VIC40.364	Folha	33%	NI	20%	21%	14%	NI
Cannabaceae	<i>Trema micrantha</i> (L.) Blume	VIC40.364	Galho	NI	NI	19%	19%	NI	NI
Celastraceae	<i>Maytenus aquifolia</i> Mart.	VIC40.427	Folha	31%	30%	NI	26%	27%	13%
Celastraceae	<i>Maytenus aquifolia</i> Mart.	VIC40.427	Galho	48%	18%	24%	27%	13%	16%
Euphorbiaceae	<i>Alchornea glandulosa</i> (Casar.) Secco	VIC40.484	Folha	32%	15%	NI	NI	15%	31%
Euphorbiaceae	<i>Alchornea glandulosa</i> (Casar.) Secco	VIC40.484	Galho	NI	13%	NI	22%	34%	40%
Euphorbiaceae	<i>Aparisthium cordatum</i> (A. Juss.) Baill.	VIC40.483	Folha	NI	NI	30%	NI	NI	72%
Euphorbiaceae	<i>Aparisthium cordatum</i> (A. Juss.) Baill.	VIC40.483	Galho	NI	NI	NI	NI	30%	57%
Euphorbiaceae	<i>Croton celtidifolius</i> Baill.	VIC40.568	Folha	37%	NI	NI	21%	NI	NI
Euphorbiaceae	<i>Croton celtidifolius</i> Baill.	VIC40.568	Galho	75%	12%	25%	20%	17%	NI
Euphorbiaceae	<i>Joannesia princeps</i> Vell.	VIC40.481	Folha	35%	NI	NI	NI	33%	NI
Euphorbiaceae	<i>Joannesia princeps</i> Vell.	VIC40.481	Galho	NI	14%	23%	NI	NI	24%
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum citrifolium</i> A. S.-Hil.	VIC40.612	Folha	58%	19%	22%	24%	32%	28%
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum citrifolium</i> A. S.-Hil.	VIC40.612	Galho	53%	28%	18%	NI	NI	24%
Fabaceae	<i>Anadenanthera peregrina</i> (L.) Speg.	VIC40.206	Folha	NI	NI	NI	NI	13%	NI
Fabaceae	<i>Anadenanthera peregrina</i> (L.) Speg.	VIC40.206	Galho	10%	NI	NI	NI	NI	NI
Fabaceae	<i>Bauhinia fortificata</i> Link.	VIC40.549	Folha	26%	NI	23%	20%	NI	NI
Fabaceae	<i>Bauhinia fortificata</i> Link.	VIC40.549	Galho	34%	NI	25%	29%	NI	34%
Fabaceae	<i>Dalbergia nigra</i> (Vell.) Allemão ex Benth.	VIC40.498	Folha	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Fabaceae	<i>Dalbergia nigra</i> (Vell.) Allemão ex Benth.	VIC40.498	Galho	52%	NI	NI	NI	20%	30%
Fabaceae	<i>Inga cylindrica</i> (Vell.) Mart.	VIC40.209	Folha	62%	43%	11%	NI	13%	23%
Fabaceae	<i>Inga cylindrica</i> (Vell.) Mart.	VIC40.209	Galho	61%	37%	17%	NI	16%	NI
Fabaceae	<i>Piptadenia gonoacantha</i> J. F. Macbr	VIC40.225	Folha	NI	52%	NI	NI	NI	24%
Fabaceae	<i>Piptadenia gonoacantha</i> J. F. Macbr	VIC40.225	Galho	47%	15%	NI	12%	NI	NI
Fabaceae	<i>Senna macranthera</i> (DC. ex C.) H.S.Ir. & Bar.	VIC40.533	Folha	NI	NI	21%	19%	34%	20%
Fabaceae	<i>Senna macranthera</i> (DC. ex C.) H.S.Ir. & Bar.	VIC40.533	Galho	28%	NI	NI	NI	40%	30%
Lamiaceae	<i>Aegiphilla integrifolia</i> (Jacq.) Moldenke	VIC40.539	Folha	NI	11%	25%	25%	NI	NI
Lamiaceae	<i>Aegiphilla integrifolia</i> (Jacq.) Moldenke	VIC40.539	Galho	52%	11%	24%	27%	11%	20%
Lauraceae	<i>Endlicheria paniculata</i> (Spreng.) J. F. Mac.	VIC40.253	Folha	NI	NI	NI	25%	NI	NI
Lauraceae	<i>Endlicheria paniculata</i> (Spreng.) J. F. Mac.	VIC40.253	Galho	NI	13%	NI	NI	41%	12%
Lauraceae	<i>Nectandra oppositifolia</i> Nees & Mart.	VIC40.227	Folha	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Lauraceae	<i>Nectandra oppositifolia</i> Nees & Mart.	VIC40.227	Galho	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Malvaceae	<i>Ceiba speciosa</i> (A. St.-Hil.) Ravenna	VIC40.342	Folha	NI	NI	NI	16%	NI	NI
Malvaceae	<i>Ceiba speciosa</i> (A. St.-Hil.) Ravenna	VIC40.342	Galho	NI	NI	21%	23%	NI	22%
Malvaceae	<i>Luehea grandiflora</i> Mart.	VIC40.338	Folha	59%	24%	20%	24%	NI	16%
Malvaceae	<i>Luehea grandiflora</i> Mart.	VIC40.338	Galho	58%	NI	26%	24%	NI	35%
Melastomataceae	<i>Miconia latecrenata</i> (DC.) Naudin	VIC40.396	Folha	23%	NI	NI	NI	NI	NI
Melastomataceae	<i>Miconia latecrenata</i> (DC.) Naudin	VIC40.396	Galho	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Melastomataceae	<i>Miconia petropolitana</i> Cogn.	VIC40.397	Folha	54%	NI	NI	NI	30%	NI
Melastomataceae	<i>Miconia petropolitana</i> Cogn.	VIC40.397	Galho	27%	57%	22%	25%	38%	41%
Meliaceae	<i>Trichilia pallida</i> Sw.	VIC40.286	Folha	NI	NI	25%	21%	12%	15%
Meliaceae	<i>Trichilia pallida</i> Sw.	VIC40.286	Galho	NI	NI	42%	22%	19%	7%
Moraceae	<i>Clarisia ilicifolia</i> (Spreng.) L. & Rossberg	VIC40.265	Folha	36%	46%	NI	11%	31%	NI
Moraceae	<i>Clarisia ilicifolia</i> (Spreng.) L. & Rossberg	VIC40.265	Galho	43%	18%	NI	NI	NI	NI
Moraceae	<i>Ficus eximia</i> Schott	VIC40.263	Folha	NI	NI	21%	NI	NI	NI

Família	Espécie	Voucher	Parte Plant	Tipos Celulares GI(%) ^b ; Extratos ^a					
				B16-F10		HepG2		MCF-7	
				EO	EA	EO	EA	EO	EA
Moraceae	<i>Ficus eximia</i> Schott	VIC40.263	Galho	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Moraceae	<i>Maclura tinctoria</i> (L.) D. Don ex Steud	VIC40.267	Folha	82%	NI	44%	NI	42%	NI
Moraceae	<i>Maclura tinctoria</i> (L.) D. Don ex Steud	VIC40.267	Galho	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Myrtaceae	<i>Eugenia florida</i> DC.	VIC40.304	Folha	NI	NI	18%	19%	NI	NI
Myrtaceae	<i>Eugenia florida</i> DC.	VIC40.304	Galho	66	NI	NI	NI	NI	NI
Myrtaceae	<i>Marlierea teuscheriana</i> (O. Berg) D. Legrand	VIC40.300	Folha	40%	54%	40%	35%	NI	NI
Myrtaceae	<i>Marlierea teuscheriana</i> (O. Berg) D. Legrand	VIC40.300	Galho	NI	13%	26%	19%	NI	NI
Myrtaceae	<i>Myrciaria glazioviana</i> (K.) G. M. B. ex Sobral	VIC40.310	Folha	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Myrtaceae	<i>Myrciaria glazioviana</i> (K.) G. M. B. ex Sobral	VIC40.310	Galho	62%	52%	NI	NI	NI	NI
Myrtaceae	<i>Syzygium jambos</i> (L.) Alston	VIC40.312	Folha	58%	75%	NI	11%	14%	NI
Myrtaceae	<i>Syzygium jambos</i> (L.) Alston	VIC40.312	Galho	63%	17%	NI	NI	13%	32%
Nyctaginaceae	<i>Guapira opposita</i> (Vell.) Reitz	VIC40.277	Folha	26%	23%	25%	23%	NI	NI
Nyctaginaceae	<i>Guapira opposita</i> (Vell.) Reitz	VIC40.277	Galho	54%	20%	NI	NI	NI	NI
Phytolaccaceae	<i>Seguiera langsdorffii</i> Moq.	VIC40.410	Folha	NI	NI	24%	33%	33%	21%
Phytolaccaceae	<i>Seguiera langsdorffii</i> Moq.	VIC40.410	Galho	34%	34%	18%	17%	11%	13%
Primulaceae	<i>Myrsine coriacea</i> (Sw.) R. Br. ex R. & Schult.	VIC40.421	Folha	NI	NI	26%	27%	NI	NI
Primulaceae	<i>Myrsine coriacea</i> (Sw.) R. Br. ex R. & Schult.	VIC40.421	Galho	37%	NI	21%	18%	NI	38%
Rubiaceae	<i>Bathysa nicholsonii</i> K. Schum	VIC40.638	Folha	NI	NI	28%	NI	NI	NI
Rubiaceae	<i>Bathysa nicholsonii</i> K. Schum	VIC40.638	Galho	NI	NI	20%	NI	NI	NI
Rubiaceae	<i>Psychotria vellosiana</i> Benth.	VIC40.282	Folha	23%	32%	21%	NI	43%	38%
Rubiaceae	<i>Psychotria vellosiana</i> Benth.	VIC40.282	Galho	20%	NI	NI	NI	39%	46%
Salicaceae	<i>Casearia decandra</i> Jacq.	VIC40.392	Folha	NI	37%	19%	NI	18%	39%
Salicaceae	<i>Casearia decandra</i> Jacq.	VIC40.392	Galho	NI	NI	22%	NI	NI	NI
Salicaceae	<i>Casearia sylvestris</i> Sw.	VIC40.390	Folha	85%	81%	85%	80%	62%	54%
Salicaceae	<i>Casearia sylvestris</i> Sw.	VIC40.390	Galho	34%	NI	30%	NI	NI	NI
Sapindaceae	<i>Allophylus sericeus</i> (Cambess.) Radlk.	VIC40.331	Folha	NI	NI	21%	NI	NI	NI
Sapindaceae	<i>Allophylus sericeus</i> (Cambess.) Radlk.	VIC40.331	Galho	NI	12%	NI	24%	36%	17%
Siparunaceae	<i>Siparuna guianensis</i> Aubl.	VIC40.408	Folha	NI	NI	NI	15%	NI	NI
Siparunaceae	<i>Siparuna guianensis</i> Aubl.	VIC40.408	Galho	NI	NI	39%	17%	NI	NI
Solanaceae	<i>Acnistus arborescens</i> (L.) Schltld.	VIC40.327	Folha	91%	35%	76%	18%	75%	34%
Solanaceae	<i>Acnistus arborescens</i> (L.) Schltld.	VIC40.327	Galho	26%	20%	18%	20%	NI	NI
Solanaceae	<i>Aureliana velutina</i> Sendtn.	VIC40.313	Folha	84%	44%	75%	25%	68%	27%
Solanaceae	<i>Aureliana velutina</i> Sendtn.	VIC40.313	Galho	77%	22%	75%	21%	48%	NI
Solanaceae	<i>Solanum cernuum</i> Vell.	VIC40.323	Folha	30%	30%	NI	NI	31%	38%
Solanaceae	<i>Solanum cernuum</i> Vell.	VIC40.323	Galho	38%	26%	NI	12%	30%	28%
Verbenaceae	<i>Aloysia virgata</i> (Ruiz & Pav.) Juss.	VIC40.582	Folha	NI	NI	17%	NI	40%	NI
Verbenaceae	<i>Aloysia virgata</i> (Ruiz & Pav.) Juss.	VIC40.582	Galho	NI	NI	NI	NI	33%	NI

^aForam produzidos 2 extratos (EO: Extrato Orgânico; EA: Extrato Aquoso) utilizando diferentes partes das árvores (Folhas e Galhos). Solvente orgânico: Diclorometano/Metanol (1:1); Solvente aquoso: água destilada.

^bInibição Crescimento Celular (GI%, do inglês *Growth Inhibition*) foi calculado de acordo com a fórmula $GI\% = [100 - (T/C) \times 100\%]$; onde T foi a absorvância na presença de extrato e C a absorvância do controle negativo (0,25% de DMSO). NI = Não houve inibição da proliferação celular.

Foi considerado ativo o extrato que inibiu o crescimento celular em 75% ou mais (GI₇₅, *Growth Inhibition*, do inglês) em pelo menos duas linhagens tumorais (Fouche et al., 2008). A partir deste critério, 7 extratos foram selecionado. Estes extratos pertencem a 5 espécies de 4 famílias: *Tabernaemontana hystrix* Steud. (Apocynaceae); *Vernonanthura phosphorica* (Vell.) H. Rob. (Asteraceae); *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae), *Acnistus arborescens* (L.) Schltld. (Solanaceae) e *Aureliana velutina* Sendtn. (Solanaceae).

A família Solanaceae é conhecida pela presença de espécies ricas em alcaloides. Fouche e colaboradores (2008) realizaram triagem com mais de 7000 extratos e verificaram que as espécies vegetais que apresentaram maior atividade

antitumoral eram das seguintes famílias: Asteraceae, Solanaceae e Apocynaceae. A família Apocynaceae se destaca na busca de novos compostos antitumorais devido à espécie *Cataranthus roseus*, cujas folhas foram isolados os alcaloides vimblastina e vincristina (Johnson et al., 1963).

Em geral, os extratos orgânicos foram mais ativos que os extratos aquosos, pois dos 7 extratos que atingiram 75% de inibição do crescimento celular ou mais (GI_{75}), apenas 1 era aquoso (**Tabela 1**). Em pesquisa com plantas do gênero *Croton* realizada por Motta e colaboradores (2013), também foi encontrado maior atividade de inibição do crescimento celular em extratos com menor polaridade, pelo fato destes solventes extraírem compostos ativos como os diterpenos e esteróides.

Estes extratos foram testados novamente em sete concentrações diferentes, que variaram de 3,125 – 200 $\mu\text{g/mL}$ para calcular o IC_{50} .

3.2. Resultado do IC_{50} dos extratos ativos

A **Tabela 2** mostra os resultados de IC_{50} (concentração do extrato que causa 50% da inibição do crescimento celular) de 7 extratos representado 5 espécies e 4 famílias. A podofilotoxina foi usada como controle positivo. Este produto natural bioativo foi isolado da espécie vegetal *Podophillum peltatum*, que era utilizada por populações tradicionais da América do Sul para o tratamento de verrugas. A podofilotoxina apresentou alta citotoxicidade nos testes iniciais, por isso foi quimicamente modificada para melhorar sua eficiência farmacológica, resultando nos produtos comerciais etoposídeo e teniposídeo (Mann, 2002)

Pelo critério adotado pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI-Frederick) foi analisada a média do logaritmo de IC_{50} para classificar a atividade citotóxica dos extratos em: I, inativo, média de $\log IC_{50} > 1,5$; F, atividade fraca, média de $\log IC_{50}$ entre 1,1 – 1,5; M, atividade moderada, média $\log IC_{50}$ entre 0 – 1,1; P, atividade potente, média $\log IC_{50} < 0$. Os valores de IC_{50} para as células VERO não entraram no cálculo da Média $\log IC_{50}$, por não tratar-se de célula tumoral (Fouche, et al., 2008; Motta et al., 2013; Savietto et al., 2013).

As espécies *Casearia sylvestris* Sw., *Acnistus arborescens* (L.) Schlttdl. e *Aureliana velutina* Sendtn. apresentaram atividade antiproliferativa moderada (M) contra as linhagens tumorais testadas (média de $\log IC_{50} = 1,03$; 1,03 e 1,09,

respectivamente) (**Tabela 2**).

Tabela 2: Atividade citotóxica (IC₅₀, µg/mL) de extratos vegetais e do controle positivo (Podofilotoxina) em culturas de linhagens celulares.

Materiais testados ^a	Linhagens celulares ^b				Média log IC ₅₀ ^c
	B16-F10	HepG2	MCF-7	VERO	
Podofilotoxina	37,00 ± 4,24	26,53 ± 4,90	64,45 ± 4,59	7,00 ± 4,25	1,60 I
<i>Tabernaemontana hystrix</i> ; EOG	33,67 ± 4,05	24,02 ± 16,30	41,59 ± 8,73	115,00 ± 7,07	1,50 F
<i>Vernonanthura phosphorica</i> ; EOF	47,67 ± 8,59	57,30 ± 11,73	175,0 ± 35,35	124,00 ± 7,42	1,89 I
<i>Casearia sylvestris</i> ; EOF	3,81 ± 0,97	12,60 ± 6,03	26,34 ± 3,56	48,51 ± 2,10	1,03 M
<i>Casearia sylvestris</i> ; EAF	9,00 ± 1,41	53,17 ± 11,06	52,41 ± 2,37	98,34 ± 289	1,47 F
<i>Acnistus arborescens</i> ; EOF	13,34 ± 7,69	5,01 ± 0,73	18,75 ± 3,34	45,35 ± 5,97	1,03 M
<i>Aureliana velutina</i> ; EOF	6,22 ± 2,92	17,34 ± 4,47	18,45 ± 6,07	75,20 ± 18,24	1,09 M
<i>Aureliana velutina</i> ; EOG	27,50 ± 3,53	90,06 ± 14,05	242,0 ± 11,31	95,00 ± 7,07	1,92 I

^aNome da espécie, tipo de extrato: EOF (Extrato Orgânico de Folhas); EOG (Extrato Orgânico de Galhos); EAF (Extrato Aquoso de Folhas); EAG (Extrato Aquoso de Galhos).

^bB16-F10, melanoma murinho; HepG2, carcinoma hepático; MCF-7, carcinoma mamário; VERO, células epiteliais normais de rim de macaco verde Africano.

^cCritérios adotados pelo NCI (Fouche, et al., 2008; Motta et al., 2013; Savietto et al., 2003): I, inativo, média de log IC₅₀ > 1,5; F, atividade fraca, média de log IC₅₀ entre 1,1 – 1,5; M, atividade moderada, média log IC₅₀ entre 0 – 1,1; P, atividade potente, média log IC₅₀ < 0. Os valores de IC₅₀ para as células VERO não entraram no cálculo da Média log IC₅₀, por não tratar-se de célula tumoral.

Além disso, os extratos dessas 3 espécies apresentaram IC₅₀ abaixo de 10 µg/mL em pelo menos uma linhagem de células tumoral testada, por isso sendo considerados promissores (Manthey e Guthrie, 2002; Motta et al., 2013; Savietto et al., 2013).

Os extratos orgânicos de folhas (EOF) de *Casearia sylvestris* e *Aureliana velutina* apresentaram alta seletividade contra B16-F10 (IC₅₀ = 3,81 µg/mL; 6,22 µg/mL, respectivamente; Tabela 2). O melanoma representa apenas 2% dos tipos de cânceres de pele, embora seja o mais agressivo e o mais mortal (SCF, 2015; Taylor, 2015).

Popularmente conhecida como “Guaçatonga”, *Casearia sylvestris* é encontrada na América do Sul. Macerações hidroetanólicas das folhas desta espécie tem sido usada por populações indígenas para o tratamento de várias doenças, incluindo

tumores malignos (Hartwell, 1971; Mans et al., 2000; Mesquita, et al., 2009). Por isso, o uso tradicional desta planta vem incentivando a avaliação do potencial antitumoral e a bioprospecção por moléculas bioativas. Acredita-se que diterpenos, como a casearina, encontrada em frações derivadas de extratos orgânicos das folhas de *Casearia sylvestris* seja a substância responsável pela sua atividade (Oberlies et al., 2002; Felipe et al., 2014). O óleo essencial extraído das folhas, que é rico em sesquiterpenos (β -cariofileno, α -zingibereno e α -humuleno), também apresentou atividade antiproliferativa em várias linhagens de células tumorais (Bou et al., 2013).

Felipe e colaboradores (2014) mostraram que a fração em clorofórmio do extrato hidroetanólico de folhas de *Casearia sylvestris*, que é rica em casearina, inibiu o crescimento celular de MCF-7 em baixas concentrações devido à ação destes compostos em proteínas envolvidas no controle do ciclo de divisão celular, causando fragmentação e dano ao DNA. Essa fração também foi ativa ao diminuir tumores em modelo animal.

O EOF de *Acnistus arborescens* apresentou alta atividade citotóxica ao inibir o crescimento das células cancerosas de fígado HepG2 ($IC_{50} = 5,01 \mu\text{g/mL}$; Tabela 2). A alta taxa de mortalidade de pacientes com câncer de fígado (aproximadamente 5% dos pacientes sobrevivem até 5 anos após o diagnóstico) pode ser explicada pela agressividade deste tipo de câncer, que vem se tornando resistente aos agentes quimioterápicos disponíveis no mercado (Honda e. al., 1998; Al-Qubaisi et al., 2011).

A atividade antiproliferativa de *Acnistus arborescens* foi atribuída a withafisalininas, que interagem com as proteínas dos microtúbulos, impedindo sua despolimerização (Kupchan et al., 1965; Veras et al., 2004). Esse é o mesmo efeito causado pelo paclitaxel, molécula de origem natural isolada da árvore *Taxus brevifolia* (Cragg e Newman, 2013). Rocha e colaboradores (2012) mostrou que o mecanismo de ação da withafisalina-F induz morte celular por apoptose.

Os extratos aquosos não têm sido muito explorados pelo bioprospectores nos últimos anos para o descobrimento de novas drogas, embora alguns pesquisadores defendam o seu uso pela presença de moléculas potencialmente bioativas (McCloud, 2010). Neste sentido, no presente trabalho, o EAF de *Casearia sylvestris* foi seletivo para a linhagem B16-F10 ($IC_{50} = 9,00 \mu\text{g/mL}$; SI = 10,9), porém apresentando atividade citotóxica fraca para a linhagem MCF-7 ($IC_{50} = 52,41 \mu\text{g/mL}$ e SI = 1,8).

Usando o critério estabelecido pelo NCI apenas para a linhagem B16-F10, o EAF de *Casearia sylvestris* apresentou atividade antiproliferativa moderada ($\log IC_{50} = 0,95$).

Nos últimos anos, as pesquisas por novos anticancerígenos têm sido direcionadas para a busca de compostos seletivos que apresentam atividade antiproliferativa em baixa concentração para células tumorais, porém se tornando citotóxicos em altas concentrações para linhagens de células normais (Al-Qubaisi et al., 2010; Brandão et al., 2010; Rocha et al., 2012; Felipe et al., 2014). Todos os extratos que apresentaram atividade moderada ($\log IC_{50} = M$) mostraram-se seguros, pois só foram citotóxicos para células VERO em altas concentrações. Os EOF(s) de *Casearia sylvestris* e *Aureliana velutina* apresentaram valor de Índice de Seletividade (SI) para a linhagem B16-F10 acima de 12. Já EOF de *Acnistus arborescens* apresentou SI igual a 9 para a linhagem HepG2 (**Tabela 3**).

Tabela 3: Índice de seletividade para os extratos com atividade citotóxica moderada.

Material vegetal	IC ₅₀ célula tumoral	IC ₅₀ célula VERO	SI
EOF <i>Casearia sylvestris</i>	3,8 (B16-F10)	48,5	12
EOF <i>Aureliana velutina</i>	6,2 (B16-F10)	75,2	12
EOF <i>Acnistus arborescens</i>	5,0 (HepG2)	45,3	9

SI = $IC_{50}(\text{VERO}) / IC_{50}(\text{célula tumoral})$.

Uma taxa de acerto de 6,1% foi obtida baseada no número de espécies que apresentaram atividade antiproliferativa moderada (3) como porcentagem do número total de espécies testadas (49). Fouche e colaboradores (2008) encontraram porcentagem semelhante (5,9%) ao investigar a atividade antiproliferativa de 700 espécies vegetais coletadas em toda África do Sul.

4. CONCLUSÃO

Os produtos naturais isolados de plantas podem ser utilizados no tratamento de diversos tipos de cânceres. Na triagem antitumoral *in vitro* com os extratos da BIOPROS *Extracts* Library, três extratos apresentaram atividade citotóxica moderada ($\log IC_{50} < 1,10$) com valores de IC_{50} abaixo de 10 $\mu\text{g/mL}$ em pelo menos uma linhagem tumoral. Além disso, estes extratos foram citotóxicos contra células VERO apenas em altas concentrações, sugerindo seletividade. Os resultados apresentados para *Casearia sylvestris* Sw. e *Acnistus arborescens* (L.) Schltdl. estão de acordo com estudos anteriores que comprovam a atividade antitumoral destas espécies. Porém, foi reportada pela primeira vez a atividade citotóxica da espécie *Aureliana velutina* Sendtn. Este trabalho reforça a importância da biodiversidade encontrada na Mata Atlântica, cujas espécies vegetais ainda são pouco estudadas quanto ao potencial antitumoral.

5. CONCLUSÃO FINAL

Na triagem realizada com os extratos de 49 espécies vegetais da Mata Atlântica, 3 espécies apresentaram promissora atividade antitumoral. Isso dá uma taxa de acerto de 6,1%; porcentagem parecida à obtida por pesquisadores da África do Sul que investigaram o potencial antiproliferativo de 700 espécies. Até o momento, apenas 1/5 do total de espécies arbóreas identificadas na EPTEA Mata do Paraíso passaram por triagem antitumoral *in vitro*. Nesse sentido, a BIOPROS *Extracts Library* tem o potencial de aumentar o seu acervo em até 5 vezes, passando dos atuais 196 extratos para mais de 900 extratos. Essa expansão será facilitada pela logística de acesso às espécies identificadas na mata com auxílio de GPS e pelo processo de extração rápido e eficiente padronizado no laboratório. Os resultados preliminares encontrados nos ensaios antitumorais atestaram para a preservação das propriedades químicas das moléculas bioativas dos extratos da BIOPROS *Extracts Library*. Estratégias quimiotaxonômicas poderão ser adotadas a fim de direcionar a bioprospecção em espécies de gêneros e famílias com maiores potenciais bioativos. Avanços na parte química poderão acontecer pelo emprego de processos de fracionamento, purificação e elucidação estrutural, utilizando técnicas de LC-MS (Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas). Paralelamente, pretende-se elucidar o mecanismo de ação dos compostos presentes nestes extratos empregando técnicas modernas da biologia molecular, que nos permite, por exemplo, saber qual fase do ciclo celular estes compostos inibem; quais proteínas chave do controle do ciclo celular foram afetadas; verificar a integridade da membrana celular; análise da despolarização do potencial da membrana mitocondrial, que é uma sinalização de ativação da via de morte celular por apoptose e avaliação se o mesmo efeito antitumoral verificado *in vitro* continua ocorrendo em modelo animal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abel, U., Koch, C., Speitting, M., Hansske, F.G. (2002). Modern methods to produce natural product libraries. *Current Opinion in Chemical Biology* 6, 453-458.

Al-Qubaise, M., Rozita, R., Yeap, S-K., Omar, A-R., Ali, A-M., Alitheen, N.B. (2011). Selective cytotoxicity of goniotalamin against hepatoblastoma HepG2 cells. *Molecules* 16, 2944-2959.

Ammerman, N.C., Beier-Sexton, M. (2008). Growth and maintenance of Vero cell lines. *Current Protocol Microbiology* 10, 1-10.

Anatole, P.C., Guru, S.K., Bathelemy, N., Jeanne, N., Brushan, S., Murayama, T., Saxena, A.K. (2013). Ethyl acetate fraction of *Garcinia epunctata* induces apoptosis in human promyelocytic cells (HL-60) through the ROS generation and G0/G1 cell cycle arrest: A bioassay-guided approach. *Environment toxicology and pharmacology* 36, 865-874.

ACS (American Cancer Society). "Cancer Facts and Statistics." (2015). Acessado em: 25/03/2015. Disponível em: <http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/index>

Bou, D.D., Lago, J.H., Figueiredo, C.R., Matsuo, A.L., Guandagnin, R.C., Soares, M.C., Sartorelli, P. (2013). Chemical composition and cytotoxicity evaluation of essential oil from leaves of *Casearia sylvestris*, its main compound alfa-zingiberene and derivatives. *Molecules* 18, 9477-9487.

Cairns, J. (1981). The origin of the human cancers. *Nature* 289, 353-357.

Carvalho, J.E. (2006). Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese. *Revista Multiciência* 7, 1-18.

Cragg, G.M., Newman, D.J. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 72-79.

Cragg, G.M., Newman, D.J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830, 3670-3695.

Dennis, R.A., Mans, A.B., Da Rocha, G.S. (2000). Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *The Oncologist* 5, 185-198.

Drews, J. (2000). Drug discovery today - and tomorrow. *DDT* 5, 2-3.

Felipe, K.B., Kwiecinski, M.R., Silva, F.O, Bucker, N.F., Farias, M.S., Castro, L.S.E.P.W., Grinevicius, V.M.A.S., Motta, N.S., Correia, J.F.G., Rossi, M.H., Pedrosa, R.C. (2014). Inhibitor of tumor proliferation associated with cell cycle arrest caused by extracts and fraction from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 155, 1492-1499.

Fouche, G.; Cragg, G.M.; Pillay, P.; Kolesnikova, N. (2008). In Vitro Anticancer Screening of South African Plants. *Journal of Ethnopharmacology* 119, 455-461.

Georgaki, S., Skopelite, M., Tsiatas, M., Nicolaou, K.A. Ioannou, K., Husband, A., Bamias, A., Dimopoulos, M.A., Constantinou, A.I., Tsitsilonis, O.E. (2009). Phenoxodiol an anticancer isoflavene, induces immunomodulatory effects *in vitro* and *in vivo*. *Journal Cells Molecular Medicine* 13(9), 3929-3938.

Hartwell, J.L. (1971). Plants used against cancer. A survey. *Lloydia* 34, 386-425

Harvey, A.L., Edrada-Ebel, R., Quinn, R.J. (2015). The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery* 14, 111-129.

Honda, K., Sbisà, E., Tullo, A., Papeo, P.A., Saccone, C., Poole, S., Pignatelli, M., Mitry, R.R., Ding, S., Isla, A., Davies, A., Habib, N.A. (1998). p53 mutation is a poor prognostic indicator for survival in patients with hepatocellular carcinoma undergoing surgical tumour ablation. *Brazilian Journal Cancer* 77, 776-782.

Hunchareck, M., McGarry, R., Kupelnick, B. (2001). Impact of intravesical chemotherapy on recurrence rate of recurrent superficial transitional cell carcinoma of the bladder: results of a meta-analysis. *Anti Cancer Research* 21, 765-769.

INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva), (2014). "Estimativas 2014 - Incidência de Câncer no Brasil." (2014). Acessado em: 25/01/15. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>

INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva), (1993). Controle de câncer: uma proposta de integração ensino e serviço. Rio de Janeiro, Pró-Onco. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=100

Ito, T., Odake, T., Katoh, H., Yamaguchi, Y., Aoki, M. (2011). High-throughput profiling of microbial extracts. *Journal of Natural Products*, 74(5), 983-988.

Johnson, I. S., Armstrong, J. G., Gorman, M., Burnett, J.P. (1963). The vinca alkaloids: a new class of oncolytic agents. *Cancer Research* 23, 1390-1427.

Júnior, H.M.S., Oliveira, D.F., Carvalho, D.A., Pinto, J.M.A., Campos, V.A.C., Mourão, A.R.B., Pessoa, C., Moraes, M.O., Costa-Lotufo, L.V. (2010). Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. *Journal of Natural Medicines* 64, 231-238

Khazir, J., Mir, B.A., Pilcher, L., Riley, D.L. (2014). Role of plants in anticancer drug discovery. *Phytochemistry Letters* 7, 173-181.

Kupchan, S.M., Doskotch, R.W., Bollinger, P., MsPhail, A.T., Sim, G.A. Renaud, J.A.S. (1965). The isolation and structural elucidation of a novel steroidal tumor inhibition from *Acnistus arborescens*. *Journal American Chemistry Society* 87, 5805-5806.

Mann, J. (2002). Natural products in cancer chemotherapy, past, present and future. *Nature Reviews (Cancer)* 2, 143-148.

Mans, D.R.A., Rocha, A.B., Schwartzmann, G. (2000). Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *The Oncologist* 5, 185-198.

Manthey, J.A., Guthrie, N. (2002). Antiproliferative activities of *Citrus* flavonoids against six human cancer cells line. *Journal Agriculture Food Chemistry* 50, 5837-5843.

McCloud, T.G. (2010). High throughput extraction of plant, marine and fungal specimens for preservation of biologically active molecules. *Molecules* 15, 4526-4563.

Melo, J.G., Araújo, T.A.S., Castro, V.T.N.A., Cabral, D.L.V., Rodrigues, M.D., Nascimento, S.L., Amorim, E.L.C., Albuquerque, U.P. (2010). Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. *Molecules* 15, 8534-8542.

Mesquita, J.R.B., Paula, J.E., Pessoa, C., Moraes, M.O., Costa-Lotufo, L.V., Grougnet, R., Michel, S., Tillequin, F., Espinhola, L.S. (2009). Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology* 123, 439-445.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 16, 693-697.

Motta, L.B., Furlan, C.M., Santos, D.Y.A.C., Salatino, G.N., De Carvalho, J.E., Monteiro, P.A., Ruiz, A.L.T.G., Caruzo, M.B., Salatino, A. (2013). Antiproliferative activity and constituents of leaf extracts of *Croton sphaerogynus* Baill.

(Euphorbiaceae). *Industrial Crops and Products* 50, 661-665.

Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M. (2003). Natural Products as source of new drugs over the period 1981-2002. *Journal Natural Products* 66, 1022-37.

Newman, D.J.; Cragg, G.M. (2012). Natural Products as source of new drugs over the 30 years from 1981-2010. *Journal Natural Products* 75, 311-335.

Oberlies, N.H., Burgess, J.P., Navarro, H.A., Pinos, R.E., Fairchild, C.R., Peterson, R.W., Soerjato, D.D., Farnsworth, N.R.; Kinghorn, A.D. Wani, M.C., Wall, M.E. (2002). Novel bioactive clerodane direrpenoids from leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. *Journal of Natural Products* 65, 95-99.

Onur, S.O., Stöckmann, H., Zenthoefer, M., Piker, L., Döring, F. (2013). The plant extract collection kiel in schleswig-holstein (PECKISH) is an open access screening library. *Journal of Food Research* 2(4), 101-106.

Pessoa, C., Costa-Lotufo, L. V., Leyva, A., De Moraes, M. E. A., De Moraes, M. O. (2006). Anticancer potential of northeast brazilian plants. *Lead Molecules from Natural Products: discovery and new trends*, 197-211.

Picker, P., Vogl, S., Micknnonn, R., Mihaly-Bison, J., Binder, M., Atanasov, A.G., Fukhrudin, N., Grzywacz, A.M., Heiss, E.H., Zehl, M., Saukel, J., Wawnosch, C., Schinkovitz, A., Bauer, R., Rollinger, J. M., Stuppner, H., Dirsch, V. M., Bochkov, V. N., Reznicek, G., Kopp, B. (2014). Plant extracts in cell-based anti-inflammatory assays - pitfalls and consideration related to removal of activity masking bulk components. *Phytochemistry Letters*, 686: 1-7.

Ram, V.J., Kumaris, S. (2001). Natural products of plant origin as anticancer agents. *Drug News Perspective* 14, 465-482.

Rocha, D.D., Balgi, A.; Maia, A.I.V., Pessoa, O.D., Silveira, E.R., Costa-Lotufo, L.V., Roberge, M., Pessoa, C. (2012). Cell cycle arrest through inhibition of tubulina polymerization by withphysalin F, a bioactive compound isolated from *Acnistus arborescens*. *Investigational New Drugs* 30, 959-966

Salatino, A., Salatino, M. L. F., Negri, G. (2007). Tradicional Uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* Species (Euphorbiaceae). *Journal Brazilian Chemistry Society* 18, 11-33.

SCF (Skin Cancer Foundation). (2015). "Informações sobre o câncer de pele". Acessado em: 14/05/15. Disponível em: www.skincancer.org/skin-cancer-information.

Souza, M.V.N. (2004). Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. *Química Nova* 27(3), 308-312.

Stern, S.T., Potter, T.M. (2010). Hep G2 hepatocarcinoma cytotoxicity assay. protocol of nanotechnology characterization laboratory. National Cancer Institute-Frederick, MD 21702. Version 1.1, 11 p.

Strohl, W.R. (2000). The role of natural products in a modern drug discovery program. *DDT* 5(2), 39-41.

Taylor, J.S. (2015). The Dark Side of Sunlight and Melanoma. *Science* 347(6224), 824p.

Veras, M.L., Bezerra, M.Z.B., Lemos, T.L.G., Uchoa, D.E.A, Braz-Filho, R., Chai, H.B., Cordell, G.A., Pessoa, O.D.L. (2004). Cytotoxic withaphysalins from leaves of *Acnistus arborescens*. *Journal Natural Products* 67, 710-713..

Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggon, P., Mcphail, A.T. (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and the structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal American Chemical Society* 93, 2325-2327.

World Health Organization. Cancer. Acessado em: 12/03/15. Disponível em: www.who.int/cancer/en/.

Zhang, J.T. (2002). New Drugs Derived from Medicinal Plants. *Therapie* 57(2), 137-50.

7. ANEXO 1: Espécies arbóreas identificadas na EPTEA Mata do Paraíso.

ID MAPA	Família	Gênero	Espécie	Autor	Nº Herbário VIC
114.500.451	Achariaceae	<i>Carpotroche</i>	<i>brasiliensis</i>	(Raddi) A Gray	40.420
4.540.304	Anacardiaceae	<i>Schinus</i>	<i>terebintifolius</i>	Raddi	40.413
4.540.304	Anacardiaceae	<i>Schinus</i>	<i>terebintifolius</i>	Raddi	40.349
4.247.343	Anacardiaceae	<i>Tapirira</i>	<i>guianensis</i>	Aubl.	40.350
4.247.455	Anacardiaceae	<i>Tapirira</i>	<i>obtusa</i>	(Benth.) J. D. Mitch.	40.442
5.473.429	Annonaceae	<i>Annona</i>	<i>cacans</i>	Warm.	40.504
5.473.457	Annonaceae	<i>Annona</i>	<i>dolabripetala</i>	Raddi	40.507
5.473.457	Annonaceae	<i>Annona</i>	<i>dolabripetala</i>	Raddi	40.505
5.473.457	Annonaceae	<i>Annona</i>	<i>dolabripetala</i>	Raddi	40.503
5.473.457	Annonaceae	<i>Annona</i>	<i>dolabripetala</i>	Raddi	40.506
5.473.458	Annonaceae	<i>Annona</i>	<i>sylvatica</i>	A. St. - Hil.	40.508
5.473.458	Annonaceae	<i>Annona</i>	<i>sylvatica</i>	A. St. - Hil.	40.574
5.139.459	Annonaceae	<i>Guatteria</i>	<i>australis</i>	A. St. - Hil.	40.511
5.139.459	Annonaceae	<i>Guatteria</i>	<i>australis</i>	A. St. - Hil.	40.510
5.139.460	Annonaceae	<i>Guatteria</i>	<i>sellowiana</i>	Schtdl	40.500
5.139.432	Annonaceae	<i>Guatteria</i>	<i>villosissima</i>	A. St. - Hil.	40.512
5.266.439	Annonaceae	<i>Xylopia</i>	<i>brasiliensis</i>	Spreng.	40.514
5.266.439	Annonaceae	<i>Xylopia</i>	<i>brasiliensis</i>	Spreng.	40.444
5.266.372	Annonaceae	<i>Xylopia</i>	<i>sericea</i>	A. St. - Hil.	40.432
6.559.466	Apocynaceae	<i>Aspidosperma</i>	<i>parvifolium</i>	A. DC.	40.465
6.518.467	Apocynaceae	<i>Himatanthus</i>	<i>lancifolius</i>	(Mull.Arg.) Woodson	40.520
6.245.468	Apocynaceae	<i>Tabernaemontana</i>	<i>hystrix</i>	Steud.	40.611
6.245.468	Apocynaceae	<i>Tabernaemontana</i>	<i>hystrix</i>	Steud.	40.517
6.245.468	Apocynaceae	<i>Tabernaemontana</i>	<i>hystrix</i>	Steud.	40.521
6.245.468	Apocynaceae	<i>Tabernaemontana</i>	<i>hystrix</i>	Steud.	40.519
6.245.468	Apocynaceae	<i>Tabernaemontana</i>	<i>hystrix</i>	Steud.	40.518
87.560.469	Araliaceae	<i>Schefflera</i>	<i>morototoni</i>	(Aubl.) Maguire et al.	40.523
109.513.470	Arecaceae	<i>Euterpe</i>	<i>edulis</i>	Mart.	40.356
109.513.470	Arecaceae	<i>Euterpe</i>	<i>edulis</i>	Mart.	40.357
15.496.472	Asteraceae	<i>Austrocritonia</i>	<i>velutina</i>	(Gardner) R.M.King & H.Rob.	40.461
15.393.264	Asteraceae	<i>Piptocarpha</i>	<i>macropoda</i>	(DC.) Baker	40.384
15.553.474	Asteraceae	<i>Vernonanthura</i>	<i>discolor</i>	(Spreng.) H. Rob	40.381
15.553.474	Asteraceae	<i>Vernonanthura</i>	<i>discolor</i>	(Spreng.) H. Rob	40.382
15.553.475	Asteraceae	<i>Vernonanthura</i>	<i>phosphorica</i>	(Vell.) H. Rob.	40.383
9.107.476	Bignoniaceae	<i>Cybistax</i>	<i>antisiphilitica</i>	(Mart.) Mart.	40.529
9.516.477	Bignoniaceae	<i>Handroanthus</i>	<i>chrysothrichus</i>	(Mart. ex DC.) Mattos	40.526

9.149.478	Bignoniaceae	<i>Jacaranda</i>	<i>macrantha</i>	Cham.	40.531
9.516.477	Bignoniaceae	<i>Jacaranda</i>	<i>macrantha</i>	Cham.	40.425
9.149.156	Bignoniaceae	<i>Jacaranda</i>	<i>puberula</i>	Cham.	40.530
9.237.333	Bignoniaceae	<i>Sparattosperma</i>	<i>leucanthum</i>	(Vell.) K. Schum.	40.527
81.463.423	Burseraceae	<i>Protium</i>	<i>warmingianum</i>	Marchand	40.547
78.19.20	Caesalpinioideae	<i>Apuleia</i>	<i>leiocarpa</i>	(Vogel) J. F. Macbr.	40.532
78.82.54	Caesalpinioideae	<i>Cassia</i>	<i>ferruginea</i>	(Schrad.) Schrad. ex DC.	40.536
78.82.54	Caesalpinioideae	<i>Copaifera</i>	<i>langsдорffii</i>	Desf.	40.535
78.541.511	Caesalpinioideae	<i>Schizolobium</i>	<i>parahyba</i> var. <i>parahyba</i>	(Vell.) Blake	40.537
78.227.307	Caesalpinioideae	<i>Senna</i>	<i>macranthera</i>	(DC. ex Collad.) H. S. Irwin & Barneby	40.533
78.227.307	Caesalpinioideae	<i>Senna</i>	<i>macranthera</i>	(DC. ex Collad.) H. S. Irwin & Barneby	
78.227.308	Caesalpinioideae	<i>Senna</i>	<i>multijulga</i>	(Rich.) H. S. Irwin & Barneby	40.557
78.483.441	Caesalpinioideae	<i>Tachigali</i>	<i>friburgensis</i>	(Harms) L. G. Silva & H. C. Lima	40.554
88.523.484	Calophyllaceae	<i>Kielmeyera</i>	<i>lathrophyton</i>	Saddi	40.343
110.503.485	Cannabaceae	<i>Celtis</i>	<i>pubescens</i>	(Kunth) Spreng.	40.585
110.251.348	Cannabaceae	<i>Trema</i>	<i>micrantha</i>	(L.) Blume	40.566
110.251.348	Cannabaceae	<i>Trema</i>	<i>micrantha</i>	(L.) Blume	40.364
110.251.348	Cannabaceae	<i>Trema</i>	<i>micrantha</i>	(L.) Blume	
12.460.487	Celastraceae	<i>Maytenus</i>	<i>aquifolia</i>	Mart.	40.565
12.460.487	Celastraceae	<i>Maytenus</i>	<i>aquifolia</i>	Mart.	
78.30.38	Cercideae	<i>Bauhinia</i>	<i>forficata</i>	Link	40.549
78.30.39	Cercideae	<i>Bauhinia</i>	<i>longifolia</i>	(Bong.) Steud.	40.550
78.30.39	Cercideae	<i>Bauhinia</i>	<i>longifolia</i>	(Bong.) Steud.	40.548
89.519.488	Chrysobalanaceae	<i>Hirtella</i>	<i>hebeclada</i>	Moric. ex DC.	40.578
89.519.488	Chrysobalanaceae	<i>Hirtella</i>	<i>hebeclada</i>	Moric. ex DC.	40.543
76.561.489	Clusiaceae	<i>Garcinia</i>	<i>gardneriana</i>	(Planch. & Triana) Zappi	40.445
76.561.489	Clusiaceae	<i>Garcinia</i>	<i>gardneriana</i>	(Planch. & Triana) Zappi	40.344
76.561.489	Clusiaceae	<i>Garcinia</i>	<i>gardneriana</i>	(Planch. & Triana) Zappi	40.345
76.561.489	Clusiaceae	<i>Garcinia</i>	<i>gardneriana</i>	(Planch. & Triana) Zappi	
90.549.490	Combretaceae	<i>Terminalia</i>	<i>mameluco</i>	Pickel	40.552
90.549.490	Combretaceae	<i>Terminalia</i>	<i>mameluco</i>	Pickel	40.430
91.525.491	Cunoniaceae	<i>Lamanonia</i>	<i>ternata</i>	Vell.	40.422
91.525.491	Cunoniaceae	<i>Lamanonia</i>	<i>ternata</i>	Vell.	40.466
92.544.492	Elaeocarpaceae	<i>Sloanea</i>	<i>guianensis</i>	(Aubl.) Benth.	40.558
92.544.492	Elaeocarpaceae	<i>Sloanea</i>	<i>guianensis</i>	(Aubl.) Benth.	40.569
22.125.116	Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum</i>	<i>citrifolium</i>	A. St. - Hil.	40.571
22.125.117	Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum</i>	<i>pelleterianum</i>	A. St. - Hil.	40.562

23.10.496	Euphorbiaceae	<i>Alchornea</i>	<i>glandulosa</i> subsp. <i>Iricurana</i>	(Casar.) Secco	40.484
23.10.496	Euphorbiaceae	<i>Alchornea</i>	<i>glandulosa</i> subsp. <i>Iricurana</i>	(Casar.) Secco	40.485
23.10.496	Euphorbiaceae	<i>Alchornea</i>	<i>glandulosa</i> subsp. <i>Iricurana</i>	(Casar.) Secco	40.486
23.17.18	Euphorbiaceae	<i>Aparisthimium</i>	<i>cordatum</i>	(A. Juss.) Baill.	40.483
23.17.18	Euphorbiaceae	<i>Aparisthimium</i>	<i>cordatum</i>	(A. Juss.) Baill.	40.487
23.104.83	Euphorbiaceae	<i>Croton</i>	<i>celtidifolius</i>	Baill.	40.568
23.104.430	Euphorbiaceae	<i>Croton</i>	<i>floribundus</i>	Spreng.	40.471
23.104.500	Euphorbiaceae	<i>Croton</i>	<i>urucurana</i>	Baill.	40.561
23.522.501	Euphorbiaceae	<i>Joannesia</i>	<i>princeps</i>	Vell.	40.481
23.522.501	Euphorbiaceae	<i>Joannesia</i>	<i>princeps</i>	Vell.	40.482
23.472.403	Euphorbiaceae	<i>Mabea</i>	<i>fistulifera</i>	Mart.	40.477
23.527.503	Euphorbiaceae	<i>Manihot</i>	<i>pilosa</i>	Pohl	40.476
23.527.503	Euphorbiaceae	<i>Manihot</i>	<i>pilosa</i>	Pohl	40.478
23.484.443	Euphorbiaceae	<i>Pera</i>	<i>glabrata</i>	(Schott) Poepp. ex Baill.	40.475
23.478.427	Euphorbiaceae	<i>Sapium</i>	<i>glandulosum</i>	(L.) Morong	40.559
23.478.427	Euphorbiaceae	<i>Sapium</i>	<i>glandulosum</i>	(L.) Morong	40.575
78.110.92	Faboideae	<i>Dalbergia</i>	<i>nigra</i>	(Vell.) Alemão ex Benth.	40.498
78.110.92	Faboideae	<i>Dalbergia</i>	<i>nigra</i>	(Vell.) Alemão ex Benth.	40.499
78.124.518	Faboideae	<i>Erythrina</i>	<i>falcata</i>	Benth.	40.497
78.124.518	Faboideae	<i>Erythrina</i>	<i>falcata</i>	Benth.	40.496
78.124.518	Faboideae	<i>Erythrina</i>	<i>falcata</i>	Benth.	40.495
78.143.148	Faboideae	<i>Hymenolobium</i>	<i>janeirense</i> var. <i>janeirense</i>	(N. Mattos) Lima	
78.351.521	Faboideae	<i>Machaerium</i>	<i>androvillosum</i>	Filardi & Lima	40.488
78.351.520	Faboideae	<i>Machaerium</i>	<i>brasiliense</i>	Vogel	40.491
78.351.522	Faboideae	<i>Machaerium</i>	<i>hirtum</i>	(Vell.) Stellfeld	40.362
78.535.525	Faboideae	<i>Platymiscium</i>	<i>pubescens</i>	Micheli	40.493
97.552.544	Humiriaceae	<i>Vantanea</i>	<i>compacta</i>	(Schnzl.) Cuatrec	40.433
98.505.545	Hypericaceae	<i>Vismia</i>	<i>martiana</i>	Mart.	40.435
30.341.158	Lacistemataceae	<i>Lacistema</i>	<i>pubescens</i>	Mart.	40.438
77.490.547	Lamiaceae	<i>Aegiphilla</i>	<i>integrifolia</i>	(Jacq.) Moldenke	40.369
77.490.547	Lamiaceae	<i>Aegiphilla</i>	<i>integrifolia</i>	(Jacq.) Moldenke	40.370
70.520.548	Lamiaceae	<i>Hyptidendron</i>	<i>aspermum</i>	(Spreng.) Harley	40.371
77.556.549	Lamiaceae	<i>Vitex</i>	<i>polygama</i>	Cham.	40.368
31.511.550	Lauraceae	<i>Endlicheria</i>	<i>paniculata</i>	(Spreng.) J. F. Macbride	40.199
31.511.550	Lauraceae	<i>Endlicheria</i>	<i>paniculata</i>	(Spreng.) J. F. Macbride	40.253
31.511.550	Lauraceae	<i>Endlicheria</i>	<i>paniculata</i>	(Spreng.) J. F. Macbride	40.252
31.511.550	Lauraceae	<i>Endlicheria</i>	<i>paniculata</i>	(Spreng.) J. F. Macbride	40.237

31.511.550	Lauraceae	<i>Endlicheria</i>	<i>paniculata</i>	(Spreng.) J. F. Macbride	40.228
31.511.550	Lauraceae	<i>Endlicheria</i>	<i>paniculata</i>	(Spreng.) J. F. Macbride	40.229
31.511.550	Lauraceae	<i>Endlicheria</i>	<i>paniculata</i>	(Spreng.) J. F. Macbride	40.232
31.530.551	Lauraceae	<i>Mezilauros</i>	<i>crassiramea</i>	(Meisn.) Taub. ex Mez	40.235
31.530.551	Lauraceae	<i>Mezilauros</i>	<i>crassiramea</i>	(Meisn.) Taub. ex Mez	40.238
31.179.552	Lauraceae	<i>Nectandra</i>	<i>velutina</i>	(Nees) Rohwer	40.240
31.179.553	Lauraceae	<i>Nectandra</i>	<i>membrancea</i>	(Sw.) Griseb.	40.246
31.179.209	Lauraceae	<i>Nectandra</i>	<i>oppositifolia</i>	Nees	40.233
31.179.555	Lauraceae	<i>Nectandra</i>	<i>puberula</i>	(Schott.) Nees	40.244
31.179.555	Lauraceae	<i>Nectandra</i>	<i>puberula</i>	(Schott.) Nees	40.230
31.179.556	Lauraceae	<i>Nectandra</i>	<i>reticulata</i>	(Ruiz et Pav.) Mez	40.250
31.181.557	Lauraceae	<i>Ocotea</i>	<i>corymbosa</i>	(Meisn.) Mez	40.249
31.181.558	Lauraceae	<i>Ocotea</i>	<i>firmula</i>	(Nees et Mart.) Mez	40.234
31.181.559	Lauraceae	<i>Ocotea</i>	<i>indecora</i>	(Schott) Mez	40.245
31.181.560	Lauraceae	<i>Ocotea</i>	<i>laxa</i>	(Nees) Mez	40.239
31.181.562	Lauraceae	<i>Ocotea</i>	<i>villosa</i>	Kosterm.	40.251
31.181.562	Lauraceae	<i>Ocotea</i>	<i>villosa</i>	Kosterm.	40.236
31.551.563	Lauraceae	<i>Urbanodendron</i>	<i>verrucosum</i>	(Nees) Mez	40.247
84.471.564	Lecythidaceae	<i>Cariniana</i>	<i>strellensis</i>	(Raddi) Kuntze	40.366
99.526.565	Magnoliaceae	<i>Magnolia</i>	<i>ovata</i>	(A. St.-Hil.) Spreng.	40.472
79.502.567	Malvaceae	<i>Ceiba</i>	<i>speciosa</i>	(A. St.-Hil.) Ravenna	40.342
79.157.167	Malvaceae	<i>Luehea</i>	<i>grandiflora</i>	Mart. & Zucc.	40.338
79.157.167	Malvaceae	<i>Luehea</i>	<i>grandiflora</i>	Mart. & Zucc.	40.337
79.538.570	Malvaceae	<i>Pseudobombax</i>	<i>grandiflorum</i>	(Cav.) A. Robyns	40.399
79.538.570	Malvaceae	<i>Pseudobombax</i>	<i>grandiflorum</i>	(Cav.) A. Robyns	40.340
39.172.571	Melastomataceae	<i>Miconia</i>	<i>cinnamomifolia</i>	(DC.) Naudin	40.403
39.172.574	Melastomataceae	<i>Miconia</i>	<i>brunnea</i>	DC.	40.401
39.172.445	Melastomataceae	<i>Miconia</i>	<i>budlejoides</i>	Triana	40.402
39.172.576	Melastomataceae	<i>Miconia</i>	<i>discolor</i>	DC.	40.577
39.172.444	Melastomataceae	<i>Miconia</i>	<i>latecrenata</i>	(DC.) Naudin	40.396
39.172.189	Melastomataceae	<i>Miconia</i>	<i>petropolitana</i>	Cogn.	40.397
39.172.189	Melastomataceae	<i>Miconia</i>	<i>petropolitana</i>	Cogn.	40.398
39.172.190	Melastomataceae	<i>Miconia</i>	<i>pusilliflora</i>	(DC.) Naudin	
39.172.580	Melastomataceae	<i>Miconia</i>	<i>urophylla</i>	DC.	40.400
39.172.573	Melastomataceae	<i>Miconia</i>	<i>valtheri</i>	Naudin	40.404
39.248.581	Melastomataceae	<i>Tibouchina</i>	<i>estrellensis</i>	(Raddi) Cogn.	40.394
40.498.582	Meliaceae	<i>Cabralea</i>	<i>canjerana</i> subsp. <i>canjerana</i>	(Vell.) Mart.	40.386
40.501.583	Meliaceae	<i>Cedrela</i>	<i>fissilis</i>	Vell.	40.289
40.328.448	Meliaceae	<i>Guarea</i>	<i>kunthiana</i>	A. Juss.	40.294

40.328.448	Meliaceae	<i>Guarea</i>	<i>kunthiana</i>	A. Juss.	40.291
40.328.142	Meliaceae	<i>Guarea</i>	<i>macrophylla</i>	Vahl	40.292
40.328.437	Meliaceae	<i>Guarea</i>	<i>pendula</i>	R. da Silva Ramalho, A. L. Pinheiro & T. D. Penn.	40.385
40.252.434	Meliaceae	<i>Trichilia</i>	<i>elegans</i>	A. Juss.	40.290
40.252.589	Meliaceae	<i>Trichilia</i>	<i>lepidota</i> subs. <i>schumanniana</i>	(Harms) Pennington	40.450
40.252.349	Meliaceae	<i>Trichilia</i>	<i>pallida</i>	Sw.	40.287
40.252.349	Meliaceae	<i>Trichilia</i>	<i>pallida</i>	Sw.	40.286
40.252.349	Meliaceae	<i>Trichilia</i>	<i>pallida</i>	Sw.	40.285
40.252.349	Meliaceae	<i>Trichilia</i>	<i>pallida</i>	Sw.	40.284
41.1.1	Menispermaceae	<i>Abuta</i>	<i>sellowana</i>	Eichler	40.429
	Mimosoideae	<i>Abarema</i>	<i>brachystachya</i>	(DC.) Barneby & J.W. Grimes	40.218
78.462.408	Mimosoideae	<i>Anadenanthera</i>	<i>peregrina</i> var. <i>falcata</i>	(Benth.) Altschul	40.213
78.462.408	Mimosoideae	<i>Anadenanthera</i>	<i>peregrina</i> var. <i>falcata</i>	(Benth.) Altschul	40.206
78.512.532	Mimosoideae	<i>Entetolobium</i>	<i>contortisiliquum</i>	(Vell.) Morong	40.205
78.147.533	Mimosoideae	<i>Inga</i>	<i>capitata</i>	Desv.	40.226
78.147.153	Mimosoideae	<i>Inga</i>	<i>cylindrica</i>	(Vell.) Mart.	40.454
78.147.535	Mimosoideae	<i>Inga</i>	<i>marginata</i>	Willd.	40.216
78.147.535	Mimosoideae	<i>Inga</i>	<i>marginata</i>	Willd.	40.207
78.147.537	Mimosoideae	<i>Inga</i>	<i>striata</i>	Benth.	40.441
78.147.537	Mimosoideae	<i>Inga</i>	<i>striata</i>	Benth.	40.211
78.147.537	Mimosoideae	<i>Inga</i>	<i>striata</i>	Benth.	40.215
78.202.538	Mimosoideae	<i>Piptadenia</i>	<i>gonoacantha</i>	(Mart.) J. F. Macbr.	40.225
78.202.539	Mimosoideae	<i>Piptadenia</i>	<i>paniculata</i>	Benth.	40.208
78.202.539	Mimosoideae	<i>Piptadenia</i>	<i>paniculata</i>	Benth.	40.223
78.202.539	Mimosoideae	<i>Piptadenia</i>	<i>paniculata</i>	Benth.	40.214
78.539.540	Mimosoideae	<i>Pseudopiptadenia</i>	<i>contorta</i>	(DC.) G. P. Lewis & M. P. Lima	40.220
78.243.339	Mimosoideae	<i>Stryphnodendron</i>	<i>polyphilum</i>	Mart.	40.212
42.366.205	Monimiaceae	<i>Mollinedia</i>	<i>schottianna</i>	(Spreng.) Perkins	40.431
43.38.49	Moraceae	<i>Brosimum</i>	<i>guianense</i>	(Aubl.) Huber	40.256
43.38.50	Moraceae	<i>Brosimum</i>	<i>guianense</i>	(Aubl.) Huber	40.271
43.487.450	Moraceae	<i>Clarisia</i>	<i>ilicifolia</i>	(Spreng.) Lanj. & Rossberg	40.264
43.487.450	Moraceae	<i>Clarisia</i>	<i>ilicifolia</i>	(Spreng.) Lanj. & Rossberg	40.265
43.487.450	Moraceae	<i>Clarisia</i>	<i>ilicifolia</i>	(Spreng.) Lanj. & Rossberg	40.266
43.130.131	Moraceae	<i>Ficus</i>	<i>adhatodifolia</i>	Schott ex Spreng	40.262
43.130.131	Moraceae	<i>Ficus</i>	<i>adhatodifolia</i>	Schott ex Spreng	40.257
43.130.595	Moraceae	<i>Ficus</i>	<i>arpazusa</i>	Casar.	40.259
43.130.595	Moraceae	<i>Ficus</i>	<i>arpazusa</i>	Casar.	40.260
43.130.596	Moraceae	<i>Ficus</i>	<i>eximia</i>	Schott	40.263

43.130.133	Moraceae	<i>Ficus</i>	<i>mexiae</i>	Standl.	40.258
43.130.598	Moraceae	<i>Ficus</i>	<i>organensis</i>	(Miq.) Miq.	40.261
43.162.599	Moraceae	<i>Maclura</i>	<i>tinctoria</i>	(L.) D. Don ex Steud	40.269
43.162.599	Moraceae	<i>Maclura</i>	<i>tinctoria</i>	(L.) D. Don ex Steud	40.268
43.236.601	Moraceae	<i>Sorocea</i>	<i>guilleminiana</i>	Gaudich.	40.270
43.236.601	Moraceae	<i>Sorocea</i>	<i>guilleminiana</i>	Gaudich.	40.254
101.554.602	Myristicaceae	<i>Virola</i>	<i>bicuhiba</i>	(Schott ex Spreng) Ward.	40.423
46.499.604	Myrtaceae	<i>Campomanesia</i>	<i>cf. pubescens</i>	(DC.) O. Berg.	40.299
46.499.603	Myrtaceae	<i>Campomanesia</i>	<i>guaviroba</i>	(DC.) Kiaersk	40.298
46.126.606	Myrtaceae	<i>Eugenia</i>	<i>florida</i>	DC.	40.304
46.126.607	Myrtaceae	<i>Eugenia</i>	<i>itajurensis</i>	Cambess.	40.269
46.126.608	Myrtaceae	<i>Eugenia</i>	<i>leptoclada</i>	O. Berg	40.297
46.126.449	Myrtaceae	<i>Eugenia</i>	<i>widgrenii</i>	Sond. ex O. Berg	40.309
46.126.449	Myrtaceae	<i>Eugenia</i>	<i>widgrenii</i>	Sond. ex O. Berg	40.308
46.485.610	Myrtaceae	<i>Marlierea</i>	<i>excoriata</i>	Mart.	40.295
46.485.446	Myrtaceae	<i>Marlierea</i>	<i>teuscheriana</i>	(O. Berg) D. Legrand	40.301
46.485.446	Myrtaceae	<i>Marlierea</i>	<i>teuscheriana</i>	(O. Berg) D. Legrand	40.300
46.470.612	Myrtaceae	<i>Myrcia</i>	<i>splendens</i>	(Sw.) DC.	40.302
46.531.614	Myrtaceae	<i>Myrciaria</i>	<i>glanduliflora</i>	(Kiaersk.) Mattos & D. Lagrand	40.635
46.531.615	Myrtaceae	<i>Myrciaria</i>	<i>glazioviana</i>	(Kiaersk) G. M. Barroso ex Sobral	40.584
46.531.615	Myrtaceae	<i>Myrciaria</i>	<i>glazioviana</i>	(Kiaersk) G. M. Barroso ex Sobral	40.310
46.531.613	Myrtaceae	<i>Myrciaria</i>	<i>floribunda</i>	(H. West ex Willd.) O. Berg	
46.548.618	Myrtaceae	<i>Syzygium</i>	<i>jambos</i>	(L.) Alston	40.312
47.137.140	Nyctaginaceae	<i>Guapira</i>	<i>opposita</i>	(Vell.) Reitz	40.227
47.137.140	Nyctaginaceae	<i>Guapira</i>	<i>opposita</i>	(Vell.) Reitz	40.228
49.186.620	Ochnaceae	<i>Ouratea</i>	<i>polygyna</i>	Engl.	40.567
102.558.621	Olacaceae	<i>Ximenia</i>	<i>americana</i>	L.	40.418
111.517.623	Phyllanthaceae	<i>Hieronyma</i>	<i>oblonga</i>	(Tul.) Mull. Arg.	40.410
111.517.623	Phyllanthaceae	<i>Hieronyma</i>	<i>oblonga</i>	(Tul.) Mull. Arg.	40.640
111.517.623	Phyllanthaceae	<i>Hieronyma</i>	<i>oblonga</i>	(Tul.) Mull. Arg.	40.447
111.517.623	Phyllanthaceae	<i>Hieronyma</i>	<i>oblonga</i>	(Tul.) Mull. Arg.	40.411
103.542.624	Phytolaccaceae	<i>Seguieria</i>	<i>langsдорffii</i>	Moq.	40.202
104.534.625	Picramiaceae	<i>Picramia</i>	<i>parvifolia</i>	Engl.	40.468
54.201.246	Piperaceae	<i>Piper</i>	<i>cernuum</i>	Vell.	40.378
105.178.208	Primulaceae	<i>Myrsine</i>	<i>coriacea</i>	(Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult.	40.421
105.178.208	Primulaceae	<i>Myrsine</i>	<i>coriacea</i>	(Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult.	
106.505.629	Rhamnaceae	<i>Colubrina</i>	<i>glandulosa</i>	Perkins	40.588

58.537.630	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>myrtifolia</i>	(L.) Urb.	40.201
59.476.632	Rubiaceae	<i>Amaioua</i>	<i>intermedia</i>	Mart. ex Schult. & Schult. f.	40.283
59.28.633	Rubiaceae	<i>Bathysa</i>	<i>nicholsonii</i>	K. Schum	40.273
59.28.633	Rubiaceae	<i>Bathysa</i>	<i>nicholsonii</i>	K. Schum	40.638
59.89.634	Rubiaceae	<i>Chomelia</i>	<i>brasiliانا</i>	A. Rich.	40.274
59.102.80	Rubiaceae	<i>Coutarea</i>	<i>hexandra</i>	(Jacq.) K. Schum.	40.637
59.514.637	Rubiaceae	<i>Ferdnandusa</i>	<i>elliptica</i>	(Pohl) Pohl	40.419
59.486.447	Rubiaceae	<i>Guettarda</i>	<i>viburnoides</i>	Cham. & Schltldl.	40.461
59.521.639	Rubiaceae	<i>Ixora</i>	<i>brevifolia</i>	Benth.	40.278
59.524.640	Rubiaceae	<i>Ladenbergia</i>	<i>hexandra</i>	(Pohl) Klotzsch	40.272
59.213.641	Rubiaceae	<i>Psychotria</i>	<i>carthagenensis</i>	Jacq.	40.279
59.213.642	Rubiaceae	<i>Psychotria</i>	<i>myriantha</i>	Mull. Arg	40.275
59.213.281	Rubiaceae	<i>Psychotria</i>	<i>nuda</i>	(Cham. & Schltldl.) Wawra	40.281
59.213.286	Rubiaceae	<i>Psychotria</i>	<i>vellosiana</i>	Benth.	40.282
59.215.289	Rubiaceae	<i>Randia</i>	<i>ferox</i>	(Cham. & Schltldl.) DC.	40.462
59.468.647	Rutaceae	<i>Zanthoxylum</i>	<i>rhoifolium</i>	L.	40.379
82.81.53	Salicaceae	<i>Casearia</i>	<i>arborea</i>	(Rich.) Urb.	40.388
82.81.406	Salicaceae	<i>Casearia</i>	<i>decandra</i>	Jacq.	40.389
82.81.406	Salicaceae	<i>Casearia</i>	<i>decandra</i>	Jacq.	40.392
82.81.650	Salicaceae	<i>Casearia</i>	<i>obliqua</i>	Spreng.	40.373
82.81.418	Salicaceae	<i>Casearia</i>	<i>sylvestris</i>	Sw.	40.391
82.81.418	Salicaceae	<i>Casearia</i>	<i>sylvestris</i>	Sw.	40390
82.81.414	Salicaceae	<i>Casearia</i>	<i>ulmifolia</i>	Vahl. Ex Vent.	40.372
60.492.653	Sapindaceae	<i>Allophylus</i>	<i>edulis</i>	(A. St.-Hil. Et al.) Hieron. ex Niederl.	40.334
60.492.653	Sapindaceae	<i>Allophylus</i>	<i>edulis</i>	(A. St.-Hil. Et al.) Hieron. ex Niederl.	40.440
60.492.653	Sapindaceae	<i>Allophylus</i>	<i>edulis</i>	(A. St.-Hil. Et al.) Hieron. ex Niederl.	40.204
60.492.654	Sapindaceae	<i>Allophylus</i>	<i>sericeus</i>	(Cambess.) Radlk.	40.333
60.492.654	Sapindaceae	<i>Allophylus</i>	<i>sericeus</i>	(Cambess.) Radlk.	40.332
60.492.654	Sapindaceae	<i>Allophylus</i>	<i>sericeus</i>	(Cambess.) Radlk.	40.331
60.508.655	Sapindaceae	<i>Cupania</i>	<i>emarginata</i>	Cambess.	40.329
60.508.656	Sapindaceae	<i>Cupania</i>	<i>vernalis</i>	Cambess.	40.439
60.508.656	Sapindaceae	<i>Cupania</i>	<i>vernalis</i>	Cambess.	40.636
60.508.656	Sapindaceae	<i>Cupania</i>	<i>vernalis</i>	Cambess.	
107.504.658	Sapotaceae	<i>Chrysophyllum</i>	<i>flexuosum</i>	Mart.	40.456
107.562.659	Sapotaceae	<i>Pouteria</i>	<i>caimito</i>	(Ruiz & Pav.) Radlk.	40.457
107.536.660	Sapotaceae	<i>Pradosia</i>	<i>lactescens</i>	(Vell.) Radlk.	40.354
80.232.661	Siparunaceae	<i>Siparuna</i>	<i>bifida</i>	(Poepp. & Endl.) A. DC.	40.407
80.232.662	Siparunaceae	<i>Siparuna</i>	<i>brasiliensis</i>	(Spreng.) A. DC.	40.446
80.232.662	Siparunaceae	<i>Siparuna</i>	<i>brasiliensis</i>	(Spreng.) A. DC.	40.406

80.232.319	Siparunaceae	<i>Siparuna</i>	<i>guianensis</i>	Aubl.	40.409
80.232.319	Siparunaceae	<i>Siparuna</i>	<i>guianensis</i>	Aubl.	40.408
64.489.664	Solanaceae	<i>Acnistus</i>	<i>arborescens</i>	(L.) Schltld.	40.327
64.25.28	Solanaceae	<i>Aureliana</i>	<i>fasciculata</i>	(Vell.) Sendtn.	40.321
64.25.29	Solanaceae	<i>Aureliana</i>	<i>fasciculata</i>	(Vell.) Sendtn.	40.322
64.25.666	Solanaceae	<i>Aureliana</i>	<i>velutina</i>	Sendtn.	40.313
64.234.667	Solanaceae	<i>Solanum</i>	<i>cernuum</i>	Vell.	40.323
64.234.669	Solanaceae	<i>Solanum</i>	<i>cinamomeum</i>	Sendtn.	40.325
64.234.328	Solanaceae	<i>Solanum</i>	<i>leucodendron</i>	Sendtn.	40.317
64.234.671	Solanaceae	<i>Solanum</i>	<i>lycocarpum</i>	A. St. - Hil.	40.324
64.234.442	Solanaceae	<i>Solanum</i>	<i>pseudoquina</i>	A. St. - Hil.	40.315
64.234.673	Solanaceae	<i>Solanum</i>	<i>swartzianum</i>	Roem. & Schult.	40.320
64.234.673	Solanaceae	<i>Solanum</i>	<i>swartzianum</i>	Roem. & Schult.	40.474
69.84.675	Urticaceae	<i>Cecropia</i>	<i>glaziovii</i>	Snethl.	40.589
69.84.58	Urticaceae	<i>Cecropia</i>	<i>hololeuca</i>	Miq.	40.359
69.532.677	Urticaceae	<i>Myriocarpa</i>	<i>stipitata</i>	Benth.	40.545
69.258.678	Urticaceae	<i>Urera</i>	<i>nitida</i>	(Vell.) P.Brack	40.542
71.493.679	Verbenaceae	<i>Aloysia</i>	<i>virgata</i>	(Ruiz & Pav.) Juss.	40.582
108.557.680	Vochysiaceae	<i>Vochysia</i>	<i>schwackeana</i>	Warm.	40.464
108.557.680	Vochysiaceae	<i>Vochysia</i>	<i>schwackeana</i>	Warm.	40.544