

Prospecção fitoquímica e avaliação das atividades biológicas das frações do extrato bruto da espécie *Scleronema micranthum*

Gabriele Oliveira da Silva¹
Profa. Dr. Odinéia do Socorro Pamplona²
Prof. Dr. Daniel Tarciso Martins Pereira³
Maria Raimunda Magalhães Mendes⁴
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

E-mail para contato: gabios.qi@gmail.com¹
odineiarj@yahoo.com.br²
dtarciso@ufam.edu.br³

Eixo Temático: 2.1.1 Ciências Exatas e da Terra

Categoria: comunicação oral

RESUMO

Este trabalho objetivou o estudo fitoquímico e biológico de *S. micranthum*, analisar qualitativamente classes de metabólitos secundários utilizando as metodologias da prospecção fitoquímica e cromatografia em camada delgada, bem como avaliar as atividades citotóxicas e antimicrobiana dos extratos dos galhos, resíduos da madeira e das frações. Na prospecção química foi possível evidenciar nos extratos, alcoólicos dos galhos e resíduos, a presença de leucoantocianidinas, catequinas, flavonas, saponinas, flavonoides, antocianidinas e chalconas. O ensaio citotóxico realizado para a espécie, resultou em valores de $DL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$, considerado ativo em frente microcrustáceo *Artemia salina* Leach, por este motivo o extrato bruto foi classificado como citotóxico. No teste antimicrobiano para o extrato dos galhos da espécie, foram detectados halos de inibição fracos frente à bactéria *Morganella morgani* na concentração de 0,050 mg/mL e 0,100 mg/mL; na concentração de 0,100 mg/mL frente à bactéria *Pseudomonas fluorescens*. Com frações reunidas através da CC, no teste antimicrobiano com o microorganismo *Morganella morgani*, houve inibição fraca nas concentrações de 0,100 mg/mL, para F_{80-86} , e nas concentrações de 0,050 mg/mL e 0,100 mg/mL para F_{87-92} . Estes resultados contribuirão principalmente com a Química da espécie e à escassa literatura da espécie *S. micranthum*.

Palavras-chave: *S. micranthum*, antimicrobiano, citotóxico.

1. INTRODUÇÃO

As plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído, ao longo dos anos, para a obtenção de vários fármacos (FLOGIO, 2006). O Brasil tem quase um terço da flora mundial, e

mesmo diante de tamanha riqueza e ampla utilização das plantas medicinais pela população, estimativas apontam que apenas 0,4% das pesquisas científicas envolvem a flora nacional (GRANATO et al., 2013). É interessante que se desenvolva pesquisas com o objetivo de descobrir novos princípios ativos e também aprimorar as descobertas de novas atividades farmacológicas de substâncias já conhecidas e oriundas de plantas (FIRMO et. al., 2011).

A família Malvaceae, é uma família pantropical, com maior diversidade no continente americano, distribuídas preferencialmente em florestas úmidas (DUARTE et al., 2007). Em estudos farmacológicos com espécies desta família, foram detectadas atividades antiespasmódica, anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana (BRITO FILHO et. al., 2014).

A *Scleronema micranthum* (Ducke), é uma espécie da família Malvaceae. É uma árvore de porte médio a grande é comumente encontrada no Estado do Amazonas principalmente nos arredores de Manaus e no Baixo Rio Negro; nativa da floresta Amazônica (OLIVEIRA et al, 2016; ESTEVES, 2005). Estudo fitoquímico das folhas, sugeriram a presença de fenóis, leucoantocianidinas, flavonas, saponinas e flavonoides; enquanto que o dos resíduos sugeriu os seguintes metabólitos secundários: taninos condensados e catequinas (MARQUES, 2016; CUNHA e ABREU, 2014).

Os estudos realizados por Marques (2016) e Cunha e Abreu (2014), limitaram-se apenas a investigação química e biológica dos extratos alcoolicos (resíduo e folhas). Neste estudo, além da análise química e biológica, foi realizado o fracionamento cromatográfico, atividade antimicrobiana e citotóxica, tanto nos extratos como nas frações, visando contribuir com as linhas de pesquisas de plantas medicinais encontradas na Amazônia, principalmente com inserção de novos dados oriundos desse trabalho à escassa literatura da espécie *S. micranthum*.

2. METODOLOGIA

2.1 Coleta do Material Vegetal

Em 2014, Cunha e Abreu (2014)), iniciaram no LPAA (Laboratório de preparo de amostras e análise) os estudos com a espécie *S. micranthum*. A espécie foi coletada pelo engenheiro florestal (Marcos Antônio Silva de Souza), da empresa Mil Madeireira. O corte de lote de única espécie por semana e cada

tora da madeira que vai para o corte vem com uma numeração da árvore que a originou e toda as informações de manejo que a espécie passou (como ano de plantio, diâmetro e altura, ano e mês que foi realizado a coleta) (CUNHA e ABREU, 2014). A espécie foi identificada por Teresa Bessa sob o número de identificação 06 e sua exsicata foi depositada no herbário 2051 da Universidade Estadual do Amazonas (UEA) (MATOS, 2016).

Nos registros do LPPA consta protocolo de extração dos constituintes químicos da espécie. Os extratos foram obtidos através da extração à quente com o solvente etanol. Grande parte desse material botânico (extrato) encontra-se disponível, extrato bruto, armazenado sob refrigeração no LPAA, do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (ICET) aguardando continuidade do estudo com a espécie.

2.2 Fracionamento do Material Botânico

A cromatografia em coluna (CC) foi realizada através da metodologia descrita por Aquino Neto e Nunes et. al. (2003). Os solventes hexano (HEX), cloreto de metileno (DCM), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) foram destilados para serem utilizados na corrida cromatográfica. Uma alíquota do extrato bruto de *S. micrathum* (4,955 g) foi incorporado a 2,0 g de sílica gel com DCM/AcOEt 8:2, formando uma pastilha. Após evaporação do solvente foi adicionada ao topo da coluna, empacotada com 20 g de sílica gel. Submeteu-se então a amostra a eluição com solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros e em misturas. Obteve-se cento e dezesseis frações que depois de recolhidas e colocadas para evaporação e posterior pesagem (figura 1).

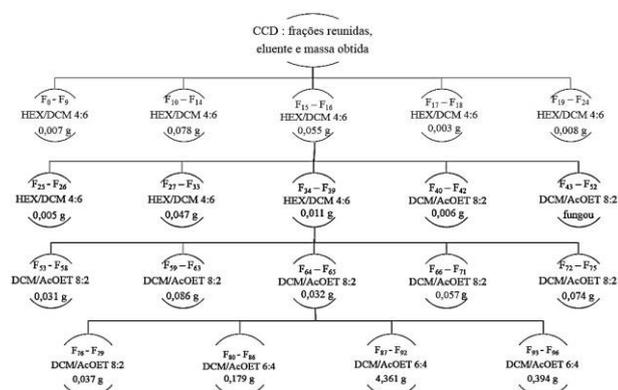


Figura 1. Fluxograma com as frações reunidas, sistemas de eluentes e massa obtida

2.3 Perfil Cromatográfico em Cromatografia de camada delgada dos extratos brutos e frações

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada através da metodologia descrita por Aquino Neto e Nunes et. al. (2003), o estudo do perfil químico das frações coletadas ocorreu por cromatofolhas atuando como fase estacionária. E como fases móveis foram utilizadas misturas de eluentes de diferentes polaridades. Na câmara escura, com auxílio da lâmpada ultravioleta, foi possível visualizar/revelar as placas, e as manchas cromatográficas foram delineadas com lápis e reunidas em frações. Após esse procedimento, as placas foram reveladas utilizando solução de $Ce(SO_4)_2$ a 2% em ácido sulfúrico, seguido de aquecimento.

2.4 Prospecção fitoquímica

A prospecção fitoquímica foi realizada para caracterização dos metabólitos secundários presentes no extrato bruto e frações. Esta análise foi feita através da metodologia descrita por Matos (2009). Foram pesados 0,500g do extrato bruto em um béquer. Retirou-se a clorofila da amostra com clorofórmio (o suficiente para cobrir todo o extrato), em seguida o sobrenadante foi descartado, e o precipitado que ficou no béquer foi solubilizado com metanol a 70%. A solução hidrometanólica foi transferida para um balão volumétrico, e completado até que atingisse a marca de 50mL. A solução foi padronizada com pH = 4. Todos os ensaios desta análise fitoquímica foram realizados a partir da solução estoque e em triplicata. Os resultados basearam-se na mudança de coloração após a reação, quando comparados com os brancos positivo (T0 - somente solução estoque) e negativo (reagente mais água destilada).

2.5 Avaliação da Citotoxicidade

O ensaio de toxicidade frente ao microcrustáceo *A. salina* foi realizado conforme descrito por Meyer et. al. (1982). Os cistos de *A. salina* foram incubados em um aquário de vidro contendo solução salina (10 mg de cistos/ 100 mL de solução), sob iluminação artificial a 28 °C e com uma bomba de ar funcionando durante todo o processo. Após 48 horas de incubação, os náuplios já eclodidos foram pescados com uma pipeta Pasteur e colocados em frascos

de vidro contendo 4,5 mL de solução salina. Para preparar as soluções do extrato bruto de *Scleronema micrathum* foram pesados 0,05 mg do extrato bruto. Depois de pesados acrescentou-se 1,0 mL de DMSO (dimetil sulfóxido) para o extrato e também 1,0 mL para as frações, agitou-se a solução, e então, aplicou-se nos frascos contendo a solução salina com a *A. salina*, obtendo-se as concentrações para extrato bruto e frações que foram de 500 a 1000 µg/mL (de 50 a 50 µg/mL). Depois de aplicada a solução esperou-se 24 horas para então fazer a contagem das larvas de *A. salina*. Foram contados o número de mortos e vivos.

2.6 Atividade Antibacteriana

O teste para determinação da atividade antimicrobiana foi realizado através do método de difusão em Ágar, utilizando discos contendo os extratos Clorofórmio e MANQ, em diferentes concentrações, conforme descrição original de Bauer et al. (1966). Separou-se os tubos com as suspensões das bactérias ativadas *Edwardsiella tarda*, *Morganella Morgani*, *Pseudomonas fluoramas*, as placas de Petri com o meio sólido já vertido (Ágar Muller Hinton), o disco de antibiótico Amicacina, e as 3 amostras com a solução a ser testada. As placas foram identificadas de acordo com as suspensões bacterianas e amostras que seriam utilizadas. Após a semeadura das respectivas suspensões bacterianas, foram feitas placas controle para cada cepa. Separou-se a placa ao meio e nela incluiu-se de um lado o disco de Amicacina e no outro inseriu-se um disco com a solução de DMSO, com o auxílio de uma micropipeta 16µL. Nas outras placas foi inserido um disco para ensaio, em seguida pipetou-se 16 µL de extrato a ser testada para cada suspensão bacteriana. Após isso encubou-se as placas vertidas na estufa à temperatura de 37°C para que acontecesse o crescimento. Após 24 horas, retirou-as, observou-se os resultados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Detecção dos constituintes químicos no extrato bruto e frações por CCD

Segundo Aquino Neto e Nunes (2003), a situação ideal da posição de um determinado soluto de interesse é quando seu R_f (fator de retenção) = 0,5. Assim outros componentes da amostra teriam possibilidades (em função de suas características) de se separar acima ou abaixo do mesmo.

A análise das frações e do extrato em CCD no eluente Hex/DCM (6:4) utilizando como revelador solução de sulfato cérico, $Ce(SO_4)_2$, mostrou nas cromatoplasmas manchas de coloração rosa ($R_f = 0,685$). No sistema de DCM/Hex 8:2, apresentou manchas distribuídas desuniformes ao longo da placa de coloração rosas de tons claros e escuros, lilás, laranja ($R_f \sim 0,7875$), roxo e ainda tons azuis. No sistema de solvente DCM/AcOEt 6:4, a cromatografia apresentou manchas mais marrons, pouco desprendidas da base da placa, e na borda superior manchas levemente azuis ($R_f \sim 0,8852$). Na câmara escura, com auxílio da lâmpada de ultravioleta λ 365nm, foi possível visualizar manchas fluorescentes de cor azul e verde, laranja e rosa.

O sulfato cérico é um revelador utilizado em CCD para a detecção de terpenóides e flavonóides. As cores rosa, azul, amarelo e laranja, apresentadas tanto na placas reveladas com a lâmpada de UV, bem como com o $Ce(SO_4)_2$, confirmando a presença de terpenos e compostos fenólicos (CHAVES, 1997).

Embora no ensaio de prospecção fitoquímica não tenha sido detectado a presença de terpenos, visto que este ensaio é baseado na análise visual, faz se necessário a elucidação estrutural para que sejam confirmadas a presença dos metabólitos na espécie.

3.2 Prospecção Fitoquímica

Os ensaios de prospecção fitoquímica dos extratos da *S. micranthum* possibilitou a avaliação qualitativa dos seus metabólitos secundários, contribuindo com os escassos dados sobre a espécie.

Tabela 1. Classes de metabólitos secundários do extrato bruto dos galhos de *S. micranthum* em comparação com os dados encontrados na literatura.

Metabólicos secundários	<i>Scleronema micratum</i> (galhos)	<i>Scleronema micratum</i> (resíduo)	<i>Scleronema micratum</i> (resíduo) (Cunha e Abreu, 2014)	<i>Scleronema micratum</i> (folhas) (Matos et al. 2016)
Fenóis	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
Taninos	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
Leucoantocianidinas	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
Catequinas	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
Flavonas	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo

Saponinas	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
Flavonóides	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Antocianidinas	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
Chalconas	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo

Os flavonóides são estruturas polifenólicas de baixo peso molecular encontradas naturalmente nas plantas. Possuem atividade antioxidante, ação inibitória de enzimas, atua como agente quelante e como “scavenging” de radicais de oxigênio (ROS), uma vez que a presença destes tem sido relacionada a certas doenças crônicas (Araújo et. al. 2007).

As leucoantocianidinas, chalconas, antocianidinas e catequinas, são metabólitos de origem sintética, que pertencem à classe dos flavonoides e por isso mesmo podem apresentar as mesma propriedades deste grupo como já citado anteriormente.

Às saponinas são atribuídas propriedades detergentes e surfactantes, com funções de regulação do crescimento, defesa contra insetos e patógenos, revelando a importância desses compostos na adaptação e sobrevivência vegetal (PEREIRA e CARDOSO, 2012). Plantas que apresentam saponinas são citadas com determinadas ações farmacológicas, tais como antiinflamatória, larvicida, hipocolesterolemiantes, expectorante, ventrópica, moluscicida e cicatrizante (BESSA, 2013).

3.3 Atividade citotóxica frente ao microcústáceo *Artemia salina* Leach

Hyacienth e Almeida (2015), afirmam que o “teste de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach é um ensaio biológico amplamente utilizado devido ser rápido, confiável e de baixo custo”.

O software BIOSTAT® 2009 é um programa de análise estatística (análise PROBIT), que avalia se a concentração é capaz de matar 50% da população de animais testados e com isso consegue-se estimar dose críticas em testes do tipo dose-resposta. Neste programa foram inseridos a quantidade de náuplios vivos e mortos para a obtenção dos valores da dose letal (DL₅₀) (FARIAS et. al., 2009).

O ensaio citotóxico testado para a espécie em estudo, resultou em valores de DL₅₀ < 100 µg/mL (tabela 2) indicando que o extrato etanólico dos resíduos

apresentara uma alta atividade toxicológica, mostrando-se muito promissor para futuros estudos de possíveis classes de compostos bioativos. Este resultado está em consonância com o apresentado no trabalho de Marques (2016), feitos com as folhas.

Tabela 2. Valores de LD₍₅₀₎ referente ao extrato etanólico da espécie *S. micrathum*.

Espécie	LD₍₅₀₎ (µg/mL)
<i>Scleronema micranthum</i>	0,766003632862073

3.4 Atividade antimicrobiana

Na concentração de 500 mg/mL frente ao micro-organismo *Morganella Morgani* foi observado halo de inibição igual a 0,166 mm, e 0,5 mm na concentração de 0,100 mg/mL do extrato da espécie, e também frente ao micro-organismo *Pseudomonas fluoramas*, apresentando halo de inibição 0,166 mm na concentração de 500 mg/mL.

Nos testes de atividade antimicrobiana para o resíduo da espécie, frente aos micro-organismos; *Edwardsiella tarda*, *Morganella morgani* e *Pseudomonas fluoramas*, não houve crescimento em nenhuma das concentrações.

As frações foram testados apenas com a bactéria *Morganella morgani*, devido ao fato de obtermos pouca quantidade de extrato e por ter apresentado maior inibição frente à esta bactéria. Na F₈₀₋₈₆ foi observado halos de inibição igual a 0,166mm na concentração de 0,50 mg/mL; já em F₈₇₋₉₂, houveram halos de 0,233 mm tanto na concentração de 0,50 mg/mL quanto na concentração de 0,100 mg/mL. No entanto, para a F₉₃₋₉₆, frente ao micro-organismo *Morganella morgani*, não apresentou atividade antibacteriana.

A *Morganella morganii* é uma bactéria gram negativo, que habita o trato gastrointestinal de humanos como parte da microbiota normal, porém também constitui importante patógeno relacionado à infecções de trato urinário, além de infecções cutâneas e de tecidos moles, como peritonite, meningite, bacteremia e sepse (PEREIRA et. al, 2016).

Embora a prospecção fitoquímica dos extratos de *S. micrathum* tenha indicado a possível presença de flavonóides que, o resultado obtido não apresentou atividade frente às bactérias testadas. Isso se deve ao fato de que

nos extratos brutos os constituintes ativos estão normalmente em pequenas concentrações (CARVALHO et al., 2014).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A prospecção fitoquímica indicou a presença de compostos fenólicos e alguns de seus derivados, detectou ainda a presença de saponinas. Nos testes realizados com a espécie *S. micranthum* foi possível observar que a mesma apresenta potencial citotóxico frente à *Artemia Salina* Leach. Estes estudo preliminar sugere que seja dado continuidade nos estudos e ensaios de citotoxicidade em linhagens de células tumorais específicas.

A atividade antibacteriana não apresentou resultados promissores, visto que os halos de inibição não foram detectados, ou quando detectados em pequenos tamanhos, isso pode ser atribuído à baixa concentração dos metabólitos caracterizados na mesma. Diante destes resultados, faz se necessário a continuação destes estudo com outros micro-organismos, ou em concentrações maiores.

É recomendável que alíquotas dos extratos sejam analisadas no RMN ¹H e RMN ¹³C, para elucidação e confirmação dos constituintes químicos presentes na espécie. A identificação dos metabólitos isolados as técnicas de espectrometria de massa e técnicas espectroscópicas com RMN em 1D e 2 D e as espectroscopias em IV e UV, faz-se necessária devido ao fato da espécie possuir atividades interessantes para a indústria farmacêutica.

4. REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, R. F.; BAGATINI, F.; SIMÕES, C. M. O.. Interações entre fármacos e medicamentos fitoterápicos à base de ginkgo ou ginseng. **Rev. bras. farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 117-126, Mar. 2008
- AMARANTE, C. B.; et. al. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazônica**, v. 41, n. 3, p. 431-434, 2011.
- AQUINO NETO, F. R.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2003. 187p.

ARAÚJO, L. L. N.; FARIA, M. J. M.; SAFADI, G. M. V. V. Prospecção fitoquímica da espécie *Justicia pectoralis* Jacq. Var. *Stenophylla leonard* pertencente à família Acanthaceae. **FASEM CIÊNCIAS: Revista eletrônica de Ciência Humanas, Saúde e Tecnologia**, v. 6, n. 2, p. 4–14, (2014), ISSN: 2238-9547. Disponível em: <http://www.fasem.edu.br/revista/index.php/fasemciencias/article/download/67/104>. Acesso: 22/06/18.

BESSA, N.G.F.de et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde - Tocantins. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu: v. 15, n. 4, supl. 1, p. 692-707, 2013.

BRITO FILHO, S. G. de; et. al. Primeiros Triterpenos do gênero *Wissadula* (Malvaceae). **Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014.

CARVALHO, A.F.; SILVA, D.M.; SILVA, T.R.C; SCARCELLI, E.; MANHANI, M.R. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos etanólico e de ciclohexano a partir das flores de camomila (*Matricaria chamomilla* L.). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.16, n.3, p.521-526, março/2014.

CHAVES, M. H.. Análise de extratos de plantas por CCD: uma metodologia aplicada à disciplina "química orgânica". **Quím. Nova**, São Paulo, v. 20, n. 5, p. 560-562, Outubro/1997.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), 2014. **M100-S24 Publication Suggested for Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement**. v. 34, n. 1, January/2014. ISBN 1-56238-898-3.

CUNHA, M. R.; ABREU, A. da S. Estudo fitoquímico preliminar do resíduo de madeira da espécie *Scleronema micranthum*. Trabalho apresentado no I ENCONTRO DE QUÍMICA DO NORTE. **SBQNORTE**, 2014.

DUARTE, M.C.; et. al.. Phylogenetic Analyses of *Eriotheca* and Related Genera (Bombacoideae, Malvaceae). **Systematic Botany**, v. 36, n.3, p. 690-701. 2007
ESTEVES, G.L. Rodriguésia: revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Rev. do Jardim Botânico do Rio de Janeiro** v. 56, p. 115–124, 2005.

FARIAS, M.P.O; SOUSA, D.P.; ARRUDA, A.C.; WANDERLEY, A.G.; TEIXEIRA, W.C.; ALVES, L.C.; FAUSTINO, M.A.G. Potencial acaricida do óleo de

andirobora *Carapa guianensis* Aubl. Sobre fêmeas adultas ingurgitadas de *Anocentor nitens* Neumann, 1897 e *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806.

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 61: 877-882, 2009

FIRMO, W. da C. A., et. al.. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cad. Pesq.**, São Luís, v. 18, n. especial, pag 90 – 95. Dezembro/2011

FOGLIO, M. A.; et al.. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Rev. Multiciência**: construindo a história de produtos naturais #7, out/2006.

GRANATO, E. M.; GRANATO, M. M.; GERENUTTI, M.; SILVA, M. G.; FERRAZ, H. O.; VILA, M. M. D.C. Prospecção fitoquímica da espécie vegetal *Trixis antimenorhoea* (Schrank) Kuntze. ABF. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 94, n.2, p. 130-135, 2013.

HYACIENTH, D. C.; ALMEIDA, S. S. M. da S. de. Estudo fitoquímico, toxicidade em *Artemia salina* Leach e atividade antibacteriana de *Pseudoxandra cuspidata* Maas. **Biota Amazônia**, v. 5, nº 4, pag 4–7. Outubro/2015. ISSN 2179-5746

MARQUES, T. S.; PEREIRA, D. T. M.; ABREU, A. S.; SOUZA, M. A. S. de. Determinação do perfil fitoquímico e avaliação das atividades biológicas de extrato da espécie *Scleronema micranthum* da família Bombacaceae. **Revista Fitos**. v.10, n.4. p. 433-445. Rio de Janeiro. 2016. e-ISSN 2446.4775.

MATOS, F. J. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2. Ed. Fortaleza: UFC, 2001, 128 p.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; McLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for activity plant constituents. **Planta Med** 45, (1) 31-34, 1982.

OLIVEIRA, L.A.; FERNANDES, O.C.; JESUS, M.A.; BENTES, J.L.S.; Andrade, S.L.; SOUZA, A.Q.L.; SANTOS, C. **Diversidade microbiana da Amazônia**. – Manaus : Editora INPA, p. 47-57, 2016. ISBN 978-85-211-0159-8

PEREIRA, J. de A.; et. al. Infecção urinária por *Morganella morganii* em cão jovem portador de ureter ectópico. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.10, n.3, p.273-277, maio/2016.

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