



Universidade Federal do Maranhão - UFMA
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação - PPGBC

**Estudo fitossociológico como estratégia para bioprospecção e
conservação de espécies de área de restinga**

Luciana Belfort

São Luís/MA
2018

LUCIANA BELFORT

**Estudo fitossociológico como estratégia para bioprospecção e
conservação de espécies de área de restinga**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão, como parte das exigências do Programa para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Bezerra de Almeida Jr.

São Luís/MA

2018

Belfort, Luciana

Estudo fitossociológico como estratégia para bioprospecção e conservação de espécies de área de restinga / Luciana Belfort – São Luís: MA, 2018.

58 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão,
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, 2018.

LUCIANA BELFORT

**Estudo fitossociológico como estratégia para bioprospecção e
conservação de espécies de área de restinga**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão, como parte das exigências do Programa para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

Aprovada em: 22 de março de 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Eduardo Bezerra de Almeida Jr. (Coorientador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dra. Flavia Maria Mendonça do Amaral (1º Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Reinaldo Farias Paiva de Lucena (2º Examinador)
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra (1º Suplente)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Luciano Mamede de Freitas Junior (2º Suplente)
Instituto Florence de Ensino Superior

Dedico este trabalho à minha amada Mãe, Ana Rita de Cássia Belfort, por ser minha referência de Mulher, Mãe e Amiga. E principalmente, porque com ela aprendi/aprendo a Amar. Dedico também ao meu Pai, Luciano Belfort (*In memoriam*) por ter sido o melhor pai que eu poderia ter. O tempo que passamos juntos foi pouco, mas o meu amor por ele é eterno.

AGRADECIMENTOS

É com muita alegria e verdadeiro sentimento de Gratidão que tento expressar com palavras meu carinho a todas as pessoas e instituições que confiaram e me deram forças para executar este trabalho. Talvez minhas palavras não sejam o suficiente, mas gostaria que todos soubessem que sou eternamente grata:

A Deus e à Sagrada Família, pelo dom da vida, pelo Amor incondicional e por guiarem meus passos me conduzindo no caminho da felicidade.

À minha Família, de modo especial aos meus pais, Ana Rita do Livramento Belfort e Luciano Belfort (*In memoriam*), pela criação, educação, incentivo, amor e por não medirem esforços para minha formação pessoal e profissional. A eles devo tudo o que sou. Obrigada mãe por ter sido uma verdadeira intercessora para que este trabalho acontecesse e por ter dividido suas refeições comigo todos os dias. Orgulho de ser sua filha.

Aos meus irmãos Leonardo Belfort e Joyce dos Santos Belfort por me ensinarem a viver em comunidade, de forma saudável, a dividir com o próximo, e a amar e ser amada. Também deixo meus agradecimentos a minha avó, Carmina do Livramento Belfort, e minha tia, Lucimar do Livramento Belfort, pois elas também foram fundamentais no meu processo de formação cristã e profissional, respectivamente.

Ao meu namorado, José Samuel da Costa Neto, por ser meu fiel companheiro, verdadeiro amigo, e por toda paciência, compreensão e amor. Agradeço por ter participado diretamente deste trabalho me ajudando com transporte para a coleta; indo em final de semana para a UFMA me ajudar a organizar folhas coletadas; instalando programas no meu computador; além de ter sido apoio e conforto nas horas difíceis.

À minha orientadora, Flávia Nascimento, pela oportunidade de ingressar no mestrado sob sua orientação. Obrigada por ter aberto as portas de um mundo que, até então eu não conhecia. Agradeço pelo companheirismo, incentivos e por ensinar com uma simplicidade apaixonante que deixa o estudo prazeroso. Obrigada por toda atenção que me deu e, sobretudo, por ter acreditado neste trabalho.

Ao meu orientador, Eduardo de Almeida Jr. Sei que minhas palavras serão poucas para lhe agradecer, mas um abraço pode complementar (risos). Ao senhor, meus sinceros agradecimentos por todos os ensinamentos durante esses dois anos, por ter me mostrado de forma clara como é a vida acadêmica, e que o importante não é ser o melhor, mas dar o seu

melhor. Obrigada pela confiança, respeito, parceria, incentivo, paciência e compreensão, principalmente nos momentos mais difíceis. Obrigada também pelos momentos de descontrações, risadas e por ter sido peça fundamental para o desenvolvimento desta dissertação. Gratidão por sua amizade.

Aos meus amigos de turma (2016.1) Ana Cássia, Gustavo, Ingrid, Muryllo, Susane, Keila, Yure, Jardeane, Francisco, Leandro, Nathália, Beldo e Carlos, juntos passamos pelas mesmas tensões, preocupações, fomos turma teste em novas metodologias do Programa, mas soubemos aproveitar cada momento e acredito que tudo valerá a pena. Que venham as publicações.

Aos amigos da minha mãe que também se tornaram meus amigos. Agradeço a Cecília, Silvana, Magno, Natanael, Edna e Sâmea por todos os momentos de risos e conversas que trouxeram mais alegrias aos meus dias e tornaram o ambiente acadêmico mais agradável. De modo especial agradeço à Mamãe, Cecília e Silvana que todos os dias dividiram comigo suas refeições e deliciosas sobremesas. Me fizeram um grande bem. Que Deus lhes pague em dobro.

Aos meus amigos e amigas do Laboratório de Estudos botânicos (LEB), meu mestrado não teria sido tão prazeroso, tão proveitoso, se não tivesse contado com o companheirismo, respeito, carinho, ensinamentos, parceria (no dia a dia e nas coletas), abraços e gostosas risadas de vocês. Obrigada porque apesar de sermos diferentes conseguimos viver em harmonia e respeito. Obrigada Aline, Ana Cássia, Ariade, Aryana, Brenda, Bruna, Bruno, Camila, Catherine, Flávia, Gabriela, Gustavo, Hynder, Ingrid Amorim, Ingrid Santana, Jailson, Jéssica, Kauê, Luana, Luann, Luciano, Maira, Mariana, Marina, Marlla, Michelle, Monielle e Stella.

Ao Laboratório de Imunofisiologia (LIF) por todo suporte dado para a execução deste trabalho, tanto com recursos materiais quanto com pessoas qualificadas que muito me ensinaram, auxiliaram nos experimentos e tiraram minhas dúvidas. Obrigada à Carlene, André Vale e Douglas Silva, vocês foram fundamentais.

Ao Laboratório de Estudos Avançados em Fitomedicamentos (LEAF), na pessoa da Professora Cláudia Quintino da Rocha. Professora, sou muito grata por toda sua disponibilidade em colaborar com meu estudo e por mostrar que, apesar das dificuldades, se houver força de vontade, foco e compromisso com a ciência, é sim possível fazer um trabalho

de qualidade. Obrigada também a todos os seus orientandos, por toda recepção e atenção para solucionar meus problemas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação (PPGBC) que tornou possível esse mestrado, proporcionando ótimos Professores, amigos e a oportunidade crescer profissionalmente.

À secretária do PPGBC, Ana Lúcia, pela disponibilidade, simpatia, gentileza e por sempre nos acolher com um sorriso sincero. Obrigada por tudo.

À FAPEMA pelo incentivo e valorização da pesquisa por meio da concessão de bolsa de mestrado, tornando possível a aquisição de dados e confecção desse trabalho.

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para essa conquista em minha vida, meus sinceros agradecimentos. Que Deus continue nos abençoando.

RESUMO

As restingas estendem-se ao longo de toda região litorânea brasileira compondo um mosaico de estratos de composição herbácea, arbustiva e arbórea. Devido à diversidade vegetal, extensão territorial e constantes ameaças à biodiversidade, intensificaram-se estudos para conhecer a riqueza, diversidade e o arranjo estrutural da vegetação das restingas por meio de estudos fitossociológicos. A vegetação de restinga é constantemente submetida às condições ambientais que favorecem o aumento da produção de bioativos de importância farmacológica. Por isso acredita-se que o uso do parâmetro de Valor de Importância (VI) ecológica seja uma estratégia interessante para a seleção de espécies para a bioprospecção. A presente dissertação traz um capítulo que trata sobre avaliação tóxica e atividade tumoricida das espécies vegetais de maior VI de uma área de restinga. Para atender às análises propostas foi realizado um levantamento fitossociológico para determinação das espécies de maior VI, através do método de pontos-quadrantes. Após o *ranking*, com as folhas das cinco espécies selecionadas foram preparados extratos hidroetanólicos para realização dos testes *in vitro* pelo ensaio com brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2.5 difeniltetrazólio (MTT). A toxicidade dos extratos foi determinada pela viabilidade de macrófagos da linhagem Raw 264.7 e a atividade tumoricida foi determinada pela viabilidade de células tumorais humanas de próstata (DU-145) e de mama (MCF-7), ambas com células incubadas em presença de extratos nas concentrações de 65.5, 125, 250 e 500 µg/mL durante 24h. As espécies que se destacaram na estrutura da comunidade com maior VI, e, portanto, selecionadas para bioprospecção foram *Astrocaryum vulgare* Mart., *Attalea speciosa* Mart. ex Spreng., *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel, *Chamaecrista ramosa* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby e *Eugenia biflora* (L.) DC., que representaram 75.5% do total do VI para a área. Os resultados da viabilidade das células Raw 264.7 mostraram que, de modo geral, as folhas das espécies selecionadas apresentaram baixa toxicidade para macrófagos murinos e não apresentaram atividade significativa contra células tumorais humanas *in vitro*. Apesar dos resultados de atividade biológica não terem sido estatisticamente significativos, a estratégia de seleção de espécies vegetais testada neste trabalho mostrou-se útil para escolha de espécies promissoras para investigações bioprospectivas. Por fim, considerando o valor de importância, as espécies que, apesar de serem dominantes em restinga, estão expostas às ameaças à biodiversidade, comuns a este ecossistema, devem subsidiar novas análises para contribuir com a conservação e manutenção desse ecossistema.

Palavras-chave: Valor de Importância ecológica, Citotoxicidade, *In vitro*

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APG	Grupo de Filogenia das Angiospermas (do inglês <i>Angiosperm Phylogeny Group</i>)
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CDB	Convenção sobre Diversidade Biológica
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DoR	Dominância Relativa
DR	Densidade Relativa
DU-145	Linhagem celular de câncer de próstata
FR	Frequência Relativa
GM07492A	Linhagem de células humanas normais (Fibroblastos de pulmão)
H'	Índice de Shannon-Wiener
HAW	<i>Ham's F12 Nutrient Mixture</i>
IC ₅₀	Concentração Inibitória Média
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LCPI	Índice de Prioridade para Conservação
MAR	Herbário do Maranhão
MCF-7	Linhagem celular de câncer de mama
mL	Mililitros
MTT	Brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
Ni	Número de indivíduos
PAS	Perímetro à Altura do Solo
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS/HCL	Dodecil Sulfato de Sódio/Ácido clorídrico
SFB	Soro Fetal Bovino
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
VI	Valor de Importância
µg	Microgramas

Sumário

CAPÍTULO I	12
1.1 Introdução.....	13
1.2 Revisão bibliográfica.....	14
1.2.1 Estudos fitossociológicos em restingas	14
1.2.2 Bioprospecção	15
1.2.3 Produtos naturais e desenvolvimento de fármacos.....	18
1.2.4 Câncer e produtos naturais	20
1.3 Objetivo geral	22
1.4 Objetivos específicos.....	22
Referências	23
CAPÍTULO II	29
INTRODUÇÃO.....	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
RESULTADOS	36
DISCUSSÃO.....	40
CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS	43
DADOS SUPLEMENTARES.....	50
CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
ANEXO	55

CAPÍTULO I

1.1 Introdução

A diversidade de plantas é uma fonte de recursos para bioprospecção, pois atende necessidades que vão desde alimentação até produção de medicamentos (MINDELL, 2009). No Brasil, botânicos já identificaram mais de 350 mil espécies de plantas, porém, somente aproximadamente 10 mil espécies possuem estudos de validação de qualidade, segurança e eficácia (BENTO et al., 2016). Este contexto torna necessário ampliar as pesquisas sobre plantas dos distintos ecossistemas brasileiros com o propósito de identificar e indicar a melhor forma de uso das plantas (CALIXTO, 2005).

A produção de novos fármacos é uma vertente de destaque dentro do exercício de bioprospecção. No entanto, são necessários de 10 a 15 anos para um medicamento ficar pronto para comercialização. Esse longo processo inicia-se com a seleção de espécies que é direcionada para rastrear metabólitos promissores na atividade de interesse (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVEIRA, 2010).

No caso das plantas, estudos mostram que fatores externos podem interferir na produção de metabólitos secundários, tais como altas temperaturas, elevada salinidade, prolongada exposição ao sol e estresse hídrico (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Diante disso, plantas dos ecossistemas de restinga, por exemplo, apresentam grande potencial bioprospectivo, pois estão constantemente submetidas a condições ambientais limitantes (MAGNAGO et al., 2012; SANTOS-FILHO et al., 2013).

A restinga é um ecossistema que se desenvolve sobre planícies arenosas datadas do período do Quaternário (SOUZA et al., 2008), caracteriza-se por suas diferentes formações fisionômicas, com plantas herbáceas, arbustivas a arbóreas (ALMEIDA Jr. et al., 2009; MEDEIROS et al., 2010). Apesar de todas as plantas de ambiente de restinga estarem submetidas às condições citadas anteriormente, existem aquelas que são mais resistentes às condições limitantes, como as espécies de maior valor de importância ecológica, ou seja, com maiores valores de frequência, densidade e dominância relativas (FELFILI et al., 2011).

O emprego de estudos fitossociológicos e dados ecológicos, como o valor de importância, por exemplo, pode ser uma alternativa promissora para o rastreamento de espécies com potencial para produção de novos fármacos, inclusive para o tratamento de doenças como o câncer, maior causa de mortalidade em todo o mundo e com tratamentos convencionais que ainda apresentam resultados bastante insatisfatórios (INCA, 2018).

Diante do exposto, foi realizado um levantamento fitossociológico em uma área de restinga do litoral do Maranhão e as espécies com maior valor de importância ecológica foram selecionadas para avaliação quanto à toxicidade e atividade tumoricida *in vitro*.

1.2 Revisão bibliográfica

1.2.1 Estudos fitossociológicos em restingas

As restingas estendem-se ao longo de toda região litorânea brasileira compondo um mosaico de estratos vegetais herbáceo, arbustivo e arbóreo, perfazendo o total de 50% de cobertura da costa brasileira (SUGUIO; TESSLER, 1984, BRAZ et al., 2013). Todavia, a biodiversidade das restingas está sendo degradada por intensas atividades antrópicas que ocupam as regiões costeiras com o turismo, instalações de portos e, principalmente, exploração imobiliária (BRAZ et al., 2013).

Devido à diversidade vegetal, extensão territorial e constantes ameaças à biodiversidade, intensificaram-se estudos para conhecer a riqueza, diversidade e o arranjo estrutural da vegetação das restingas (ZICKEL et al., 2015). Nesse contexto, os estudos fitossociológicos fornecem dados que auxiliam no entendimento da estrutura de comunidades vegetais e contribuem de forma eficaz para elaboração de medidas de regeneração, manejo e conservação da flora dos ecossistemas litorâneos (VELAZCO et al., 2015; MARTINS et al., 2017).

A fitossociologia envolve o estudo de todos os fenômenos que se relacionam com a vida das plantas dentro das unidades sociais, retratando o complexo vegetação, solo e clima (CHAVES et al., 2013). O estudo fitossociológico sugere possíveis afinidades entre espécies ou grupos de espécies, de forma descritiva, direta e simples, permitindo o acesso a elementos e conhecimentos adicionais sobre a flora, sua organização e uma série de características ecológicas (SILVA et al., 2002; WALTER et al., 2015).

Além disso, estudos fitossociológicos de comunidades vegetais lenhosas ao longo de áreas de restinga do litoral brasileiro têm fornecido conhecimento sobre a organização estrutural da vegetação, subsidiando desta forma a elaboração de projetos futuros para a conservação dos ecossistemas litorâneos (ALMEIDA Jr. et al., 2011; VICENTE et al., 2014; ZICKEL et al., 2015). Silva e Menezes (2012), ao descreverem a florística e composição estrutural de uma restinga do litoral norte da Bahia, indicaram áreas prioritárias para criação de Unidade de Conservação, visto que registraram as espécies *Poecilanthe itapuana*

G.P.Lewis e *Bactris soeiroana* Noblick ex A.J.Hend. como endêmicas para o litoral norte da Bahia. Antes disso, além dessas duas espécies, *Allagoptera brevicalyx* Morais e *Brodriguesia santosii* R.S. Cowan também foram observadas como endêmicas para o litoral da Bahia (MENEZES et al., 2009), confirmando a necessidade de conservação da área em questão.

Medeiros et al. (2014) ratificaram que o conhecimento sobre a organização estrutural da vegetação fornece dados capazes de subsidiarem projetos futuros conservacionistas e auxiliarem na escolha de espécies cujas populações mereçam estudos mais detalhados. Isso acontece na medida em que são sugeridas áreas prioritárias para conservação (SILVA; MENEZES, 2012) e populações são destacadas pelos altos valores de importância (VI) ecológica na comunidade (ALMEIDA Jr.; ZICKEL, 2012; SANTOS-FILHO et al., 2015; MACHADO, 2016).

O VI ecológica representa a soma dos valores de frequência, densidade e dominância relativas de cada espécie, indicando quais são dominantes e, portanto, mais resistentes às condições do meio onde se estabeleceram (FELFILI et al., 2011). Geralmente, este parâmetro é utilizado em estudos fitossociológicos, nos quais os autores baseiam-se em características morfológicas e fisiológicas das espécies de plantas para justificarem suas dominâncias e discutir o papel ecológico de cada uma para a área amostrada (ALMEIDA Jr. et al., 2011; VICENTE et al., 2014).

Além de serem utilizados em estudos de caracterização estrutural, os parâmetros ecológicos também têm sido empregados para avaliar a biodisponibilidade local de plantas citadas em trabalhos etnobotânicos, e para determinar o índice de prioridade para conservação (LCPI) das espécies, associando etnobotânica com conservação e biodiversidade (ALBUQUERQUE et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007; SOUZA et al., 2017). O parâmetro de valor de importância também é utilizado, nesta perspectiva, ao ser empregado como fator para o cálculo do LCPI de espécies de uso medicinal (RIBEIRO et al., 2013) e ao subsidiar em medidas de uso sustentável dos recursos vegetais (ALBUQUERQUE et al., 2009).

1.2.2 Bioprospecção

Bioprospecção ou prospecção da biodiversidade envolve a aplicação de tecnologias avançadas para desenvolver valiosos produtos a partir da diversidade biológica (ARTUSO, 2002). A biodiversidade pode ser compreendida como a riqueza de vida na terra e a herança genética que ela detém, assim como as relações estabelecidas entre os complexos

ecossistemas que possibilitam a construção e a manutenção do meio ambiente (PRIMACK; RODRIGUES, 2001). Bioprospecção é entendida como a exploração da biodiversidade para extração de informações, bem como, genéticas, bioquímicas e sobre matérias-primas que possam ter potencial e/ou valor econômico para desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, agroquímicos, cosméticos, alimentares, entre outros (ARTUSO, 2002; AZEVEDO, 2003).

No exercício da bioprospecção a utilização da biodiversidade com fins econômicos pode aliar-se às políticas de comando e controle no esforço para conservação. Isso ocorre na medida em que parte da renda gerada serve como aporte de recursos para o gerenciamento ambiental, ao mesmo tempo em que fornece alternativas a populações que se veem impelidas a degradar os ecossistemas de sua região na busca pela sobrevivência (SACCARO, 2011).

A atividade de bioprospecção é regulamentada, mundialmente, pela Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB) assinada na cidade do Rio de Janeiro em junho de 1992. A CDB, da qual o Brasil é signatário, regulamenta a exploração e fluxo mundial dos recursos da biodiversidade e tem como principais objetivos a conservação da diversidade biológica, a utilização sustentável de seus componentes e a repartição justa e equitativa dos benefícios derivados da utilização dos recursos genéticos (CDB, 2017; MMA, 2017).

Os recursos naturais de origem vegetal representam importante fonte de matéria-prima para bioprospecção por apresentarem ampla variedade e complexidade de metabólitos de potencial valor medicinal (FUMAGALI et al., 2008).

A expressiva quantidade de plantas torna a busca por novos compostos bioativos um desafio para pesquisas bem-sucedidas (MELO et al., 2017). Os metabólitos secundários são compostos bioativos derivados de plantas que possuem importantes propriedades farmacológicas, por isso provocam investigações sobre características morfofisiológicas das plantas e fatores externos que podem interferir no metabolismo secundário (VERMA; SHUKLA, 2015).

Para rastrear os metabólitos secundários são empregadas diferentes abordagens de seleção de espécies para bioprospecção, tais como as abordagens químico-ecológicas e etnodirigidas (etnobotânica e etnofarmacológica). A abordagem químico-ecológica baseia-se nas aparências das plantas (herbáceas ou lenhosas) para indicar quais apresentam potenciais atividades farmacológicas. Donaldson e Cates (2004), assumiram que plantas lenhosas de ecossistemas áridos apresentam maior percentagem de inibição e o maior número de extratos

ativos contra as células de câncer do que plantas herbáceas. Isso porque as plantas lenhosas tendem a produzir compostos quantitativos, como taninos, na defesa contra herbívoros, atuando como inibidores da digestão. Na abordagem etnodirigida, a seleção de espécies é baseada no conhecimento de uso popular do recurso natural por determinadas comunidades locais. Nessa vertente incluem-se a etnobotânica e a etnofarmacologia. A primeira ocupa-se da relação entre pessoas e plantas, incluindo todas as formas de uso e percepção dos recursos vegetais, enquanto, a segunda, tem como foco somente preparos tradicionais utilizados em sistemas de saúde, incluindo, de maneira especial, as plantas medicinais (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006).

Independente do tipo de abordagem utilizada, estudos mostram que fatores abióticos como estresse hídrico, elevada salinidade, alta temperatura e prolongada exposição a luz solar influenciam para o aumento da biossíntese e acumulação de alguns metabólitos secundários. No entanto, a influência desses fatores abióticos sobre os metabólitos secundários é relatada apenas para espécies comercialmente importantes, podendo não representar as plantas de ambiente natural (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; VERMA; SHUKLA, 2015).

Considerando a influência desses fatores ambientais para o aumento de metabólitos secundários, pode-se sugerir que espécies que se desenvolvem em áreas de condições limitantes, como as restingas, por exemplo, são potenciais fontes de recursos bioativos. As restingas são ecossistemas adjacentes ao mar, reconhecidas pelas características abióticas adversas, que coincidem com as que são favoráveis para aumento da produção de metabólitos secundários (MAGNAGO et al., 2012; SANTOS-FILHO et al., 2013; MARTINI et al., 2014). Ao compararem a anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. coletadas em áreas de restinga e de floresta, Donato e Morretes (2007) observaram que folhas provenientes da restinga apresentaram maior produção de óleos essenciais e demais substâncias associadas aos seus efeitos terapêuticos, ou seja, as condições ambientais da restinga podem interferir na produção de compostos. Neste caso, os autores atribuíram o maior conteúdo oleífero das folhas à baixa precipitação pluviométrica das restingas, pois quanto menor a precipitação média anual, maior é o número de glândulas oleíferas.

Acredita-se que dados ecológicos de estrutura da vegetação, como o VI, possa ser um critério promissor para a seleção de espécies a serem bioprospectadas em áreas de restinga, pois as espécies com maiores VI são consideradas dominantes no local onde se estabeleceram (FELFILI et al., 2011).

A potencialidade bioprospectiva de algumas espécies vegetais de restinga pode ser comprovada em estudos que indicaram propriedades antibacteriana, antifúngica (SALVADOR et al., 2004), anti-inflamatória (RAUH et al., 2011), antitumoral (BUSKUHL et al., 2010; FRONZA et al., 2017), antioxidante (BOSCOLO et al., 2007; KUKI et al., 2008; FERRERA et al., 2014), acaricida (PONTES et al., 2007) e bioinseticida (GONZALEZ et al., 2014). Além disso, estudos de análises fitoquímicas (SALVADOR; DIAS, 2004; JARDIM et al., 2005; DUTRA et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2013; RÊGO; KIKUCHI, 2015) e estudos etnobotânicos (SANTOS et al., 2010; SANTOS et al., 2013) sugerem espécies para avaliações biológicas. No entanto, os estudos citados acima não contemplam avaliação toxicológica das plantas analisadas, indispensável para a geração de um bioproduto (BEDNARCZUK et al., 2010).

Desta forma, trabalhos sobre atividades biológicas de espécies de região litorânea são importantes, pois são os primeiros passos para o desenvolvimento de um bioproduto economicamente lucrativo e consequente geração de renda capaz de contribuir para a conservação das restingas, áreas constantemente degradadas (BRAZ et al., 2013).

1.2.3 Produtos naturais e desenvolvimento de fármacos

A utilização da biodiversidade vegetal com fins econômicos envolve o uso de compostos bioativos vegetais na fabricação de fármacos, para isso, são exigidos estudos de validação que comprovem a segurança, eficácia e qualidade do uso das espécies vegetais (NEIVA et al., 2011). O desafio na busca por novos fármacos está atrelado às doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes, câncer, entre outras, que têm atingido patamares alarmantes no mundo, aumentando a busca por novas alternativas terapêuticas (CSERMELY et al., 2013).

Estima-se que 70-80% das pessoas no mundo dependem do uso de plantas com potencial medicinal para atenção primária à saúde (WHO, 2000; WHO, 2004). Em 2011, o mercado mundial de fitoterápicos movimentou US\$ 26 bilhões, aproximadamente 3,2% da cifra mundial foi referente à comercialização de medicamentos, sendo que 30% do mercado encontra-se na Europa e 5% da movimentação na América Latina. No Brasil, o mercado de fitoterápicos obteve uma movimentação de R\$ 1,1 bilhão neste mesmo ano (ALVES, 2013; SOBOTA; PINHO; OLIVEIRA, 2016). A descoberta de novos fármacos no Brasil encontra-

se no paradoxo de pouca participação do país no mercado mundial, apesar de ser um dos países de maior biodiversidade do planeta (MMA, 2002).

Para o desenvolvimento de novos fármacos há duas grandes fases: pré-clínica, ou descoberta, na qual moléculas com atividade biológicas são identificadas, caracterizadas e avaliadas seus efeitos *in vitro* e *in vivo* até descoberta de compostos químicos com potencial desenvolvimento clínico; e fase clínica, ou de desenvolvimento, que consiste na investigação detalhada da eficácia, segurança e uso dos compostos químicos em humanos, tanto em indivíduos saudáveis, quanto em pessoas com a doença alvo, e somente após teste com milhares de pacientes é que o novo medicamento para tratamento da doença pode ser utilizado com segurança (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVEIRA, 2010).

Antes do início da primeira fase é de fundamental importância a correta identificação taxonômica da planta a ser utilizada, assim como sua inclusão em herbário, seguindo os procedimentos padronizados desde herborização até identificação, garantindo a documentação da espécie e acesso para consulta, correção e/ou atualização de dados (FUNK et al. 2005; HILDRETH et al., 2007; PEIXOTO; MAIA, 2013).

Na etapa pré-clínica a avaliação do potencial bioprospectivo de uma espécie pode se dar pela análise da toxicidade da mesma. Toxicidade refere-se aos efeitos nocivos decorrentes das interações de substâncias químicas com o organismo (RUPPENTHAL, 2013). Espécies vegetais consideradas tóxicas produzem compostos orgânicos que pela inalação, ingestão ou contato direto podem causar alterações patológicas em homens e animais e, em alguns casos, podem levar à sérios distúrbios no organismo e até mesmo ao óbito (VASCONCELOS et al., 2009; JESUS; SUCHARA, 2013).

No contexto de toxicidade, o teste de citotoxicidade corresponde ao uso de cultivo de células *in vitro* para análises da toxidez de biomateriais em nível celular. Este é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos (ISO, 2009), e no processo de descoberta de novos fármacos é o primeiro teste a ser realizado *in vitro* na fase pré-clínica.

O estudo da citotoxicidade *in vitro* é importante porque contribui para o fortalecimento da indicação de vegetais com finalidades de exploração comercial (BARCELLOS et al., 2010). Testes com culturas celulares podem ser utilizados com sucesso, pois são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para a execução do estudo de biocompatibilidade *in vitro*. Além disso, representam uma importante etapa no

desenvolvimento de novos produtos para avaliação dos efeitos toxicológicos em células (SEHNEM et al., 2012).

Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, o teste *in vitro* se faz necessário como pré-requisito para testes *in vivo* (ROGERO et al., 2003). Somente depois de comprovada a não toxicidade *in vitro* é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade em ensaios com animais de laboratório, considerando-se os 3Rs de redução (*Reduction*), refinamento (*Refinement*) e substituição (*Replacement*) (ROGERO et al., 2003; MOURA et al., 2012).

1.2.4 Câncer e produtos naturais

A descoberta de novos fármacos torna-se crucial para o tratamento de doenças como o câncer, que apresenta um número expressivo e crescente de novos casos. São mais de 12,7 milhões de pacientes diagnosticados com câncer a cada ano no mundo todo. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou em cerca de 600 mil casos novos de câncer, no biênio 2016-2017 (COSTA-LOTUFO et al., 2010; INCA, 2018), reforçando a magnitude deste problema de saúde pública.

O uso de produtos naturais na pesquisa de agentes anticâncer é bem-sucedido, pois 60% dos fármacos anticâncer introduzidos nas últimas décadas têm origem nos produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2007; HARVEY, 2008). O interesse pelos compostos químicos naturais para o tratamento de câncer intensificou a partir da comprovação científica de moléculas bioativas com potencial para o tratamento de câncer, como, por exemplo, o taxol, que atua no processo de divisão celular, provocando apoptose em células com elevada taxa de divisão (ITOKAWA et al., 2008). A partir de então, estudos foram realizados para compreender e relacionar a estrutura química das plantas com ações contra tipos específicos de câncer (IQBAL et al., 2017).

O câncer se caracteriza pelo crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Considerado um problema de saúde pública, estando entre as principais causas de mortalidade em todo o mundo (SIEGEL et al., 2017). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), ao desconsiderar os tumores de pele não melanomas, o câncer de próstata é o mais incidente entre os homens em todas as regiões do Brasil (INCA, 2015). Nas mulheres, o câncer mais frequente é o de mama, exceto na região norte do país, onde é o segundo mais incidente (INCA, 2015).

O tratamento convencional para tais doenças envolve cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou uma combinação destes tratamentos (MANUAL DE BASES TÉCNICAS DA ONCOLOGIA, 2015). A alta taxa de mortalidade em decorrência do câncer associada aos efeitos colaterais graves dos tratamentos convencionais levou a procura de alternativas complementares para o tratamento. As plantas têm se mostrado importante fonte na busca de produtos anticâncer (COSTA-LOTUFO et al., 2010; GALLEGO et al., 2017), no entanto, a maioria delas precisam ser melhor exploradas para que se alcance fármacos eficazes no tratamento do câncer (SHAH et al., 2013).

Uma forma de avaliar o potencial anticâncer das espécies vegetais é por meio de testes *in vitro* utilizando linhagens antitumorais (MESQUITA et al., 2009; GALLEGO et al., 2017). Um exemplo prático de potencial anticâncer é a espécie vegetal *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers., coletada em área de restinga. Estudo *in vitro* com o extrato das folhas desta espécie demonstrou efeitos tóxicos contra células tumorais provenientes da linhagem Hela (BUSKUHL et al., 2010). Posterior a isso, estudo *in vivo* mostrou que extrato das folhas da mesma espécie foi capaz de induzir a diminuição do tamanho do tumor sólido em camundongos e eliminou o tumor ascítico, sem alterar o peso corporal dos animais (FRONZA et al., 2017). Entretanto, os estudos de avaliação de atividade tumoricida de espécies vegetais de restinga ainda são escassos, cabendo assim, mais pesquisas direcionadas para as espécies vegetais de ambientes naturais.

1.3 Objetivo geral

Realizar levantamento fitossociológico e bioprospecção das plantas de maior valor de importância de uma área de restinga do litoral do Maranhão, Brasil.

1.4 Objetivos específicos

- ✓ Realizar o levantamento fitossociológico do estrato lenhoso de uma área de restinga;
- ✓ Analisar os parâmetros fitossociológicos da vegetação amostrada;
- ✓ Avaliar a toxicidade *in vitro* das espécies de maior importância ecológica;
- ✓ Avaliar o potencial tumoricida *in vitro* das espécies de maior importância ecológica.

Referências

- ALBUQUERQUE, U.P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325-354, 2007.
- ALBUQUERQUE, U.P. et al. How ethnobotany can aid biodiversity conservation: reflections on investigations in the semi-arid region of NE Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 18, p. 127-150, 2009.
- ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. Ethnodirected research in the discovery of new drugs of medical and pharmaceutical interest: flaws and perspectives. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678–689, 2006.
- ALMEIDA JR, E.B. et al. Caracterização da vegetação de restinga da RPPN de Maracaípe, PE, Brasil, com base na fisionomia, flora, nutrientes do solo e lençol freático. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 36–48, 2009.
- ALMEIDA JR, E.B.; ZICKEL, C.S. Análise fitossociológica do estrato arbustivo-arbóreo de uma floresta de restinga no Rio Grande do Norte. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 7, n. 2, p. 286–291, 2012.
- ALMEIDA JR., E.B. et al. Structural characterization of the woody plants in restinga of Brazil. **Journal of Ecology and the Natural Environment**, v. 3, n. 3, p. 95-103, 2011.
- ALVES, L.F. Production of Phytotherapeutics in Brazil: History, Problems and Perspectives. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 450–513, 2013.
- ARTUSO, A. Bioprospecting, benefit sharing, and biotechnological capacity building. **World Development**, v. 30, n. 8, p. 1355–1368, 2002.
- AZEVEDO, M.C.A. Bioprospecção: coleta de material biológico com a finalidade de explorar recursos genéticos. Caderno 17 (2ª edição); **Série Ciência e Pesquisa**; Conselho da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, 35p. 2003.
- BARCELLOS, P.S. et al. Avaliação Bioquímica e toxicológica do extrato dos frutos de *Euterpe oleracea* Martius (açai). **Rev. Ciênc. Saúde**, São Luís, v. 12, n. 2, p. 91-96, 2010.
- BEDNARCZUK, V.O. et al. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v. 11, n.2, p. 43-50, 2010.
- BENTO, E.B. et al. Estudo etnofarmacológico comparativo na região do Araripe da *Annona muricata* L. (Graviola). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 21, n. 1, p. 9-19, 2016.
- BOSCOLO. O.H. et al. Potencial antioxidante de algumas plantas de restinga citadas como medicinais. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.9, n.1, p.8-12, 2007.
- BRASIL. **Biodiversidade brasileira**. Ministério do Meio Ambiente. Brasília: MMA/SBF, 404 p., 2002.
- BRASIL. **Convenção da Diversidade Biológica**. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/convencao-da-diversidade-biologica>>. Acesso em: 10 maio 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de bases técnicas da oncologia – SIA/SUS - sistema de informações ambulatoriais, 21ª Edição, 135p, 2015.
- BRAZ, D.M. et al. Restinga de Paia das Neves, ES, Brasil: Caracterização fitofisionômica, florística e conservação. **Biota Neotropica**, v. 13, n. 3, p. 315–331, 2013.

- BUSKUHL, H. et al. Sesquiterpene lactones from *Vernonia scorpioides* and their in vitro cytotoxicity. **Phytochemistry**, v. 71, n. 13, p. 1539–1544, set. 2010.
- CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1–2, p. 131–134, 2005.
- CDB, History of the Convention. Disponível em: <<https://www.cbd.int/history/>>. Acesso em: 10 maio 2017.
- CHAVES, A.C.G. et al. A importância dos levantamentos florístico e fitossociológico para a conservação e preservação das florestas. **Agropecuária Científica no Semiárido**, Paraíba, v. 9, n. 2, p. 42-48, 2013.
- COSTA-LOTUFO, L.V. et al. A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47–58, 2010.
- CSERMELY, P. et al. Structure and dynamics of molecular networks: A novel paradigm of drug discovery: A comprehensive review. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 138, n. 3, p. 333-408, 2013.
- DONALDSON, J.R.; CATES, R.G. Screening for Anticancer Agents from Sonoran Desert Plants: A Chemical Ecology Approach. **Archives Of Physiology And Biochemistry**, v. 42, n. 7, p. 478–487, 2004.
- DONATO, A.M.; MORRETES, B.L. Foliar anatomy of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) from restinga and forest areas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 426–443, 2007.
- DUTRA, L.M. et al. Chemical constituents from the leaves of *Annona pickelii* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 41, p. 115–118, 2012.
- ESTIMATIVA 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015.
- FELFILI J.M. et al. Fitossociologia no Brasil: métodos e estudos de casos. Viçosa: Editora UFV; 2011.
- FERREIRA, R.O. et al. Distribution of metabolites in galled and non-galled leaves of *Clusia lanceolata* and its antioxidant activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 6, p. 617–625, 2014.
- FRONZA A.S. et al. Antitumoral activity of sesquiterpene lactone diacetylptocarphol in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, p. 262–267, fev. 2017.
- FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627–641, 2008.
- FUNK, V.A. et al. The importance of vouchers. **Taxon**, v. 54, n. 1, p. 127–129, 2005.
- GALLEGO, A. et al. Viability-reducing activity of *Coryllus avellana* L. extracts against human cancer cell lines. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 565–572, 2017.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374, 2007.

- GONZALEZ, M.S. et al. Effects of essential oil from leaves of *Eugenia sulcata* on the development of agricultural pest insects. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 4, p. 413–418, 2014.
- GUIDO, R.V.C.; ANDRICOPULO, A.D.; OLIVEIRA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v.24, n.70, p.81-98, 2010.
- GUIMARÃES, A.L.A. et al. Characterisation of the effects of leaf galls of *Clusiamyia nitida* (Cecidomyiidae) on *Clusia lanceolata* Cambess. (Clusiaceae): Anatomical aspects and chemical analysis of essential oil. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 208, n. 3, p. 165–173, 2013.
- HARVEY, A. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19–20, p. 894–901, 2008.
- HILDRETH, J. et al. Standard operating procedure for the collection and preparation of voucher plant specimens for use in the nutraceutical industry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 1, p. 13–17, 2007.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em: <www.inca.gov.br> Acessado em: 03 de jan. de 2018.
- IQBAL, J. et al. Plant-derived anticancer agents: A green anticancer approach. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 12, p. 1129–1150, 2017.
- ISO DOCUMENT 10993-5, **Biological evaluation of medical devices**, Part 5, Tests for Cytotoxicity: *In Vitro* Methods, 2009.
- ITOKAWA, H. et al. Plant-derived natural product research aimed at new drug Discovery. **Journal of Natural Medicine**, v. 62, n. 3, p. 263-280, 2008.
- JARDIM, M. A.G. et al. Fitoterapia popular e metabólitos secundários de espécies vegetais da Ilha de Algodão, Município de Maracanã, Estado do Pará, Brasil - Resultados preliminares. **Rev. Bras. Farm.**, v. 86, n. 3, p. 117-118, 2005.
- JESUS, N.A.; SUCHARA, E.A. Cultivo de plantas tóxicas e a ocorrência de intoxicações em domicílios no município de Barra do Graças. **Revista Eletrônica da UNIVAR**, v. 2; n. 10, p.89-95, 2013.
- KUKI, K.N. et al. Effects of simulated deposition of acid mist and iron ore particulate matter on photosynthesis and the generation of oxidative stress in *Schinus terebinthifolius* Raddi and *Sophora tomentosa* L. **Science of The Total Environment**, v. 403, n. 1–3, p. 207–214, 2008.
- MACHADO, M.A. **Caracterização estrutural e fatores edáficos da vegetação lenhosa da restinga da Ilha de Curupu, Raposa – MA**. 63f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Conservação) - Universidade Federal do Maranhão, Maranhão, 2016.
- MAGNAGO, L.F.S. et al. Restinga forests of the Brazilian coast: richness and abundance of tree species on different soils. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n. 3, p. 807–822, 2012.
- MARTINI, A.M.Z. et al. Restinga e Ecologia. In: Azevedo, NH; Martini, A.M.Z.; Oliveira, A.A.; Sca Rpa, DL; Petrobras: USP, IB, LabTrop/BioIn (org.). Ecologia na restinga: uma sequência didática argumentativa. 1ed. São Paulo: Edição dos autores, Janeiro de 2014. 140p.

- MARTINS P.J. et al. Dinâmica da vegetação arbórea em floresta ombrófila mista montana antropizada. **Floresta e Ambiente**, v. 24, p. e00097014, 2017.
- MEDEIROS, D.P.W. et al. Estrutura do componente lenhoso de uma restinga no litoral sul de Alagoas, Nordeste, Brasil. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 3, n. 3, p. 146–150, 2010.
- MEDEIROS, D.P.W. et al. Riqueza e caracterização da estrutura lenhosa da vegetação de restinga de Baía Formosa, RN, Brasil. **Pesquisas, Botânica**, n. 65, p. 183-199, 2014.
- MELO, J. G. et al. Cytotoxicity of plants from the Brazilian semi-arid region: A comparison of different selection approaches. **South African Journal of Botany**, v. 113, p. 47–53, 2017.
- MENEZES, C.M. et al. Florística e fitossociologia do componente arbóreo do município de Conde, Bahia, Brasil. **Revista Biociências**, v. 15, n. 1, p. 44-55, 2009.
- MESQUITA, M.L. et al. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 439–445, 2009.
- MINDELL, D.P. Humans Need Biodiversity, **Science**, v. 323, n. 5921, p. 1562-1563, 2009.
- MOURA, N.S. et al. Ensaio toxicológicos: um estudo sobre a utilização de testes *in vivo* e *in vitro*. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 1945-1959, 2012.
- NEIVA, V.A. et al. Estudos pré-clínicos de atividade giardicida de *Chenopodium ambrosioides* L. e a padronização dos extratos na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos. **Rev. Ciênc. Saúde**, São Luís, v.13, n.2, p. 155-165, 2011.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of natural products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.
- OLIVEIRA, R.L.C. et al. Conservation priorities and population structure of woody medicinal plants in an area of caatinga vegetation (Pernambuco state, NE Brazil). **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 132, p. 189-206, 2007.
- PEIXOTO, A.L.; MAIA, L.C. Manual de procedimentos para herbários. **INCT-Herbário virtual para a Flora e os Fungos. Editora Universitária UFPE, Recife**, 2013.
- PONTES, W.J.T. et al. Atividade acaricida dos óleos essenciais de folhas e frutos de *Xylopia sericea* sobre o ácaro rajado (*Tetranychus urticae* Koch). **Química Nova**, v. 30, n. 4, 2007.
- PRIMACK, R.B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Londrina: Gráfica Editora Midiograf, 328p, 2001.
- RAUH, L.K. et al. Effectiveness of *Vernonia scorpioides* ethanolic extract against skin inflammatory processes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n. 2, p. 390–397, 2011.
- RÊGO, M.S.C.; KIKUCHI, T.Y.S. Estruturas secretoras em folhas de *Clusia fockeana* miq. e *Clusia hoffmannseggiana* Schltdl. (Clusiaceae): distribuição e anatomia. **Enciclopédia biosfera**, v.11 n.22; p. 2993-3008, 2015.
- RIBEIRO, D.A. et al. Prioridade de conservação para espécies medicinais lenhosas em uma área de caatinga, Assaré, Ceará, Brasil. **Cadernos de Cultura e Ciência**, v. 12, n. 1, p. 46-57, 2013.
- ROGERO, S.O. et al. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317–320, 2003.

- RUPPENTHAL, J.E. **Toxicologia**. Universidade Federal de Santa Maria, Colégio Técnico Industrial de Santa Maria; Rede e-Tec Brasil, 2013.
- SACCARO JR, N.L. A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil. **Ambiente & Sociedade**, v. 14, n. 1, p. 229–244, 2011.
- SALVADOR, M.J. et al. Comparative study of antibacterial and antifungal activity of callus culture and adult plants extracts from *Alternanthera maritima* (Amaranthaceae). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 1–2, p. 131–136, jun. 2004.
- SALVADOR, M.J.; DIAS, D.A. Flavone C-glycosides from *Alternanthera maritima* (Mart.) St. Hil. (Amaranthaceae). **Biochemical systematics and ecology**, 2004.
- SANTOS, M.F.G. et al. Major components in oils obtained from Amazonian palm fruits. **Grasas y Aceites**, v. 64, n. 3, p. 328–334, 30 jun. 2013.
- SANTOS, M.G. et al. Recursos vegetais da Restinga de Carapebus, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista de Biologia Neotropical**, v. 6, n. 1, p. 35–54, 13 dez. 2010.
- SANTOS-FILHO, F.S. et al. Flora and Woody Vegetation Structure in an Insular Area of Restinga in Brazil. **International Journal of Ecology and Environmental Sciences**, v. 41, n. 3–4, p. 147–160, 2015.
- SANTOS-FILHO, F.S.; ALMEIDA JR, E.B.; ZICKEL, C.S. Do edaphic aspects alter vegetation structures in the Brazilian restinga? **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, n. 3, p. 613–623, 2013.
- SEHNEM, D.P. et al. Métodos alternativos para avaliação da citotoxicidade de biomateriais. **Revista Rede de Cuidados em Saúde**, v.1, n.1, p. 1-12, 2012.
- SHAH, U. et al. Novel anticancer agents from plant sources. **Chinese journal of natural medicines**, v. 11, n. 1, p. 16–23, 2013.
- SIEGEL R.L., et al. Colorectal cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2017; v. 67, n 3, p.177-93, 2017.
- SILVA, L.O. et al. Levantamento Florístico e Fitossociológico em duas áreas de cerrado sensu stricto no parque estadual da serra de Caldas Novas, Goiás. **Acta Botânica Brasílica**, Brasília, v. 16, n. 1, p. 43-53, 2002.
- SILVA, V.Í.S.; MENEZES, C.M. Contribuição para o conhecimento da vegetação de restinga de Massarandupió, Município de Entre Rios, BA, Brasil. **Revista da Gestão Costeira Integrada**, v. 12, n. 2, p. 239–251, 2012.
- SOBOTA, J.F.; PINHO, M.G.; OLIVEIRA, V.B. Physical-chemical profile and antioxidant activity of the calyx of the species *Hibiscus sabdariffa* L. from the aqueous and alcoholic extract obtained by infusion and decoction. **Revista Fitos**, v. 10, n. 1, p. 33–46, 2016.
- SOUZA, A.S. et al. Temporal evaluation of the Conservation Priority Index for medicinal plants. **Acta Botanica Brasilica**, v. 31, p. 169-179, 2017.
- SOUZA, C.R.G. et al. **Restinga: Conceitos e empregos do termo no Brasil e implicações na Legislação Ambiental**. São Paulo: Instituto Geológico, 104p, 2008.

- SUGUIO, K.; TESSLER, M.G. Planícies de cordões litorâneos quaternários do Brasil: origem e nomenclatura. In: LACERDA, L.D.; ARAÚJO, D.S.D.; CERQUEIRA, R.; TURCQ, B. (orgs.). **Restingas: origem, estrutura e processos**. Niterói – RJ: CEUFF, p. 15-25. 1984.
- VASCONCELOS, J. et al. Plantas tóxicas: conhecer para prevenir. **Revista Científica da UFPA**, v.7, n.1, p.1-10, 2009.
- VELAZCO, S.J.E. et al. Florística e Fitossociologia de uma Floresta Estacional Semidecidual, Reserva Privada Osununú-Misiones, Argentina. **Floresta e Ambiente**, v. 22, p. 1–12, 2015.
- VERMA, N.; SHUKLA, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, n. 4, p. 105–113, 2015.
- VICENTE, A. et al. Composição estrutural da vegetação lenhosa da restinga de Cabedelo, Paraíba. **Revista de Geografia**, v. 31, n. 1, p. 183–196, 2014.
- WALTER, B.M.T. et al. Fitofisionomias do cerrado: classificação, métodos e amostragens fitossociológicas. In: EISENLOHR, P.V.; FELFILI, J.M.; MELO, M.M.R.F. ANDRADE, L.A.; MEIRA NETO J.A.A. (Org.). **Fitossociologia no Brasil: métodos e estudos de casos**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2ªed., Cap.8, p. 183-212, 2015.
- WHO. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine World Health Organization. **World Health Organization (WHO)**, p. 1–73, 2000.
- WHO. WHO guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems. **World Health Organisation, Geneva**, p. 82, 2004.
- ZICKEL, C.S. et al. Vegetação lenhosa de uma restinga em Pernambuco: descrição estrutural e similaridade. **Pesquisas. Botânica**, n. 68, p. 271-285, 2015.

CAPÍTULO II

**Estudo fitossociológico da restinga do Maranhão, Brasil:
uma estratégia para seleção de espécies vegetais com
potencial para bioprospecção**

Artigo a ser enviado ao periódico:

BMC *COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE*



Estudo fitossociológico da restinga do Maranhão, Brasil: uma estratégia para seleção de espécies vegetais com potencial para bioprospecção

Luciana Belfort^{1*}, Eduardo Bezerra de Almeida Jr.², Flávia Raquel Fernandes do Nascimento³

RESUMO

Antecedentes: As condições ambientais limitantes de áreas de restingas, tais como estresse hídrico, elevada salinidade, alta temperatura e prolongada exposição a luz solar são favoráveis para o aumento da produção de bioativos de importância farmacológica. Por isso se acredita que o uso do parâmetro de Valor de Importância (VI) ecológica seja uma estratégia interessante para a seleção de espécies para a bioprospecção. Tais espécies podem ser opções para o tratamento do câncer, um dos principais problemas de saúde pública. O presente estudo teve como objetivo realizar um levantamento fitossociológico em área de restinga e avaliar, *in vitro*, a toxicidade em macrófagos murinos e atividade tumoricida dos vegetais de maior VI.

Métodos: Foi realizado levantamento fitossociológico em uma área de restinga do litoral do Maranhão, Brasil, pelo método de pontos-quadrantes, e as espécies de maior VI foram selecionadas para o estudo. A toxicidade e atividade tumoricida, *in vitro*, dos extratos das folhas dos vegetais foi determinada pelo ensaio MTT, com células incubadas em presença de extratos nas concentrações de 65.5, 125, 250 e 500 µg/mL durante 24h. A toxicidade dos extratos foi determinada pela viabilidade de macrófagos da linhagem Raw 264.7. A atividade tumoricida foi determinada pela viabilidade de células tumorais humanas de próstata (DU-145) e de mama (MCF-7). O tratamento estatístico foi por análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste Tukey ($p \leq 0.05$), para macrófagos Raw 264.7, e teste Dunn ($p \leq 0.05$), para células tumorais. A concentração inibitória média (IC₅₀) foi analisada por regressão não linear.

Resultados: As espécies de maiores VI foram *Astrocaryum vulgare* Mart. (61.1%), *Attalea speciosa* Mart. ex Spreng. (58.2%), *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (44.2%), *Chamaecrista ramosa* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby (32.1%) e *Eugenia biflora* (L.) DC. (30.8%). De modo geral, as folhas das espécies *A. speciosa*, *C. ramosa* e *E. biflora* são menos tóxicas quando comparadas com as de *A. vulgare* e *H. drasticus*. Os valores de IC₅₀ variaram entre as concentrações 167.2 µg/mL (*H. drasticus*) e 306.4 µg/mL (*A. speciosa*). Os extratos dos vegetais selecionados não apresentaram atividade tumoricida significativa *in vitro*, a IC₅₀ mínima foi 142 µg/mL (*E. biflora*) e a máxima foi 353.8 µg/mL (*A. vulgare*).

Conclusão: O presente trabalho apresentou o estudo fitossociológico como uma nova estratégia metodológica a ser utilizada na busca por compostos bioativos; e valorizou o potencial de espécies vegetais dominantes em área de restinga que são promissoras para investigações bioprospectivas.

Palavras-chave: Valor de Importância ecológica, Citotoxicidade, *In vitro*

^{1*}lucibelfort@hotmail.com. Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, s/n, Bacanga, 65085580, São Luís, Maranhão, Brasil.

²ebaj25@yahoo.com.br. Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, s/n, Bacanga 65085580, São Luís, Maranhão, Brasil.

³nascimentofrf@yahoo.com.br. Departamento de Patologia, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, s/n, Bacanga 65085580, São Luís, Maranhão, Brasil.

INTRODUÇÃO

A expressiva quantidade de espécies vegetais torna a busca por novos compostos bioativos um desafio para pesquisas bem-sucedidas [1]. Os metabólitos secundários são compostos derivados de plantas que possuem importantes propriedades farmacológicas, por isso provocam investigações sobre características morfofisiológicas das plantas e fatores externos que podem interferir na produção de metabólitos e sinalizar a presença de potenciais substâncias bioativas [2].

Estudos mostram que fatores abióticos como estresse hídrico, elevada salinidade, alta temperatura e prolongada exposição a luz solar influenciam positivamente para o aumento da biossíntese e acumulação de metabólitos secundários [2,3]. A partir desta informação, pode-se sugerir que espécies que se desenvolvem em áreas de condições limitantes, como as restingas, por exemplo, são potenciais fontes de recursos bioativos [4–6].

Espécies dominantes em ambiente de restinga merecem destaque por apresentarem maior Valor de Importância (VI) ecológica, ou seja, maiores valores da soma de frequência, densidade e dominância em uma determinada área [7], portanto, são espécies mais adaptadas às condições do meio onde se estabeleceram. Deste modo, acredita-se que dados ecológicos de estrutura da vegetação, tal como o VI, possa ser uma estratégia promissora para a seleção de espécies com potencial para produção de novos fármacos, assim como *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. Estudos *in vitro* e *in vivo* com *Vernonia scorpioides*, coletada em área de restinga, mostraram que a planta apresentou efeitos tumoricidas *in vitro*, e diminuição do tamanho do tumor sólido em camundongos [8,9].

A avaliação da toxicidade *in vitro* de uma planta garante a segurança no uso do vegetal, sendo indispensável para a geração de um bioproduto [10]. Estudos *in vitro*, utilizando linhagens antitumorais, tem sido uma estratégia usada para identificar espécies com compostos capazes de atuarem contra o câncer [11,12], maior causa de mortalidade em todo o mundo e com alguns tratamentos convencionais que ainda apresentam resultados insatisfatórios [13].

Além disso, estudos sobre ações farmacológicas das plantas podem contribuir para conservação de ecossistemas ameaçados, servindo como justificativa para manutenção dessas áreas, assim como foi demonstrada a relação entre conhecimento tradicional sobre plantas medicinais e sua relação com preservação ambiental na Amazônia brasileira [14].

Devido às ameaças à diversidade vegetal das restingas [15] que apresentam condições ambientais favoráveis para o aumento da produção de compostos bioativos em plantas, faz-se necessário criar estratégias para sua conservação por meio da bioprospecção, na qual há preocupação com conservação da biodiversidade [16]. O presente estudo teve como objetivo realizar um levantamento fitossociológico em uma área de restinga e avaliar, *in vitro*, a toxicidade em macrófagos murinos e atividade tumoricida dos vegetais de maior Valor de Importância (VI).

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

A amostragem da vegetação foi executada em uma área de restinga na praia de Panaquatira (02°28'23"S 044°03'13.8"W), localizada no município de São José de Ribamar, Maranhão. A praia de Panaquatira possui 5,6 km de extensão com topografia plana sendo banhada pela baía de São José [17]. Conforme classificação de Köppen (1948) a região apresenta clima tropical do tipo Aw. As temperaturas na Ilha do Maranhão variam ao longo do ano de 25.5 °C a 28.6 °C, com índice pluviométrico médio em torno 2.000 mm/ano [18].

Levantamento fitossociológico

A avaliação fitossociológica foi realizada pelo método de pontos-quadrantes [19], onde foram instaladas cinco transecções paralelas, de 100m cada. Em cada transecção foram alocados 10 pontos quadrantes, espaçados 10m entre si. Foram incluídos na amostragem os indivíduos lenhosos vivos com perímetro à altura do solo (PAS) \geq 10cm. De cada indivíduo foi medido o perímetro do caule, a altura e a distância da planta até o centro do quadrante.

As espécies amostradas foram coletadas conforme as técnicas usuais em botânica [20]. A identificação do material vegetal foi realizada com o auxílio do Prof. Eduardo Bezerra de Almeida Jr. seguindo a classificação do APG IV [21]. Pelo menos uma amostra de cada espécie foi depositada, como material testemunho, no acervo do Herbário do Maranhão (MAR) [22] da Universidade Federal do Maranhão, Brasil.

A estrutura da vegetação foi analisada a partir dos parâmetros fitossociológicos de cada espécie amostrada. Foram determinados os parâmetros de frequência relativa (FR), densidade relativa (DR) e dominância relativa (DoR) que somados resultam no valor de

importância (VI), além do índice de Shannon-Wiener (H'), por meio do pacote FITOPAC 2.1 [23].

Seleção de espécies para bioprospecção

A seleção de espécies para bioprospecção foi baseada no parâmetro fitossociológico de valor de importância (VI) ecológica das espécies vegetais da restinga amostrada. As cinco espécies com maiores VI's foram selecionadas e foi realizado levantamento teórico sobre bioprospecção. Aquelas que não apresentavam material teórico sobre toxicidade de extratos das folhas e que não estivessem em listas de perigo extinção foram analisadas. É importante ressaltar que ainda não foram registrados estudos etnobotânicos para a área de restinga de Panaquatira, portanto, não há informação local sobre possíveis usos das plantas avaliadas neste trabalho.

Material vegetal

As folhas das espécies selecionadas foram utilizadas, uma vez que sua coleta é relativamente menos prejudicial para a planta [1] e por constituir um recurso de maior disponibilidade durante todo o ano. As folhas foram coletadas em maio de 2017, seguindo os procedimentos adequados para este tipo de coleta [24].

Preparação de extratos hidroetanólicos

As folhas foram secas em temperatura ambiente, trituradas, pesadas (100g de cada espécie) e submetidas ao processo extrativo por maceração em etanol a 70%; a cada dois dias o solvente foi trocado, durante oito dias. As soluções extrativas foram filtradas, concentradas em rotaevaporador, secas em estufa a 30°C e conservadas em geladeira até o momento de uso [25]. Os rendimentos dos extratos foram calculados pela expressão: $\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa do extrato seco (g)} / \text{massa do material vegetal (g)}) \times 100$ [26]. As espécies selecionadas para a bioprospecção apresentaram os seguintes rendimentos dos extratos foliares: 10%, 7%, 23%, 15% e 9.8%, seguindo a ordem de classificação fitossociológica.

Cultura de células

Os macrófagos murinos da linhagem Raw 264.7 foram mantidos em garrafas de cultura em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino a 10% em estufa com atmosfera

úmida de 5% CO₂, à 37°C, com passagens a cada 3 ou 4 dias conforme a convergência do crescimento celular.

Células tumorais humanas de próstata (DU-145) e mama (MCF-7) e células de linhagem normal (GM07492A) foram cultivadas em solução 1:1 dos meios Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) e Ham's F12 Nutrient Mixture (HAW), suplementadas com 1% de aminoácidos não essencial humano e 10% de soro fetal bovino, e mantidas em estufa com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C.

Teste de citotoxicidade

A citotoxicidade das cinco espécies foi avaliada por estimativa da viabilidade pelo ensaio com brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2.5 difeniltetrazólio (MTT) [27]. As células foram semeadas em microplacas de 96 poços (1x10⁶ células/mL) e tratadas com os extratos nas concentrações de 65.5, 125, 250 e 500 µg/mL durante 24h. Para o controle negativo, foram incubadas células na presença do meio RPMI (células Raw 264.7) e DMEM (células tumorais). Após 24h 10 µL da solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionado à cada poço da placa. O MTT reagiu com as células durante 3h a 37°C e após esse tempo de incubação os cristais de formazan incorporados em células viáveis foram solubilizados com 100 µL de dodecil sulfato/ácido clorídrico (SDS/HCL), a placa ficou em temperatura ambiente por 12h.

Como controle positivo deste trabalho foi usado SDS/HCL, que matou cem por cento das células em 24h. O dimetil sulfóxido (DMSO) foi utilizado como controle do solvente dos extratos, nas concentrações de 0.6, 1.25, 2.5 e 5% com uma IC₅₀ de 2.376%.

A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Dynatech Laboratories Inc.) a 540 nm de comprimento de onda. Para a realização dos experimentos, os extratos foram solubilizados com DMSO a 5%, portanto foi testado um controle paralelo com as células incubadas em DMSO.

Análise estatística

Os resultados dos testes biológicos *in vitro* foram expressos como média ± desvio padrão. O tratamento estatístico foi por análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste Tukey ($p \leq 0.05$), para macrófagos Raw 264.7, e teste Dunn ($p \leq 0.05$), para células tumorais. A concentração inibitória média (IC₅₀) foi calculada por meio de análise de regressão não linear. Todas as análises foram realizadas no software GraphPad Prism 6.0.

RESULTADOS

Avaliação fitossociológica em área de restinga

Os indivíduos da vegetação de restinga amostrada pertencem a 22 espécies, 18 gêneros e 14 famílias de plantas arbustivas e arbóreas nativas do Brasil (Tabela 1). O índice de diversidade de Shannon foi 2.40 nat/indivíduos.

As espécies que mais contribuíram para a estrutura da comunidade com maior VI, e, portanto, selecionadas para bioprospecção foram: *Astrocaryum vulgare*, *Attalea speciosa*, *Himatanthus drasticus*, *Chamaecrista ramosa* e *Eugenia biflora*, as quais, juntas, representaram 75.5% do total do VI (Tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros fitossociológicos das espécies vegetais amostradas na área de restinga na praia de Panaquatira, São José de Ribamar, Maranhão.

Espécies vegetais ^a	Famílias	VI ^b (%)	Ni ^c	FR ^d (%)	DR ^e (%)	DoR ^f (%)	Voucher MAR
<i>Astrocaryum vulgare</i> Mart.	Arecaceae	61.1	23	12.1	11.5	37.5	9336
<i>Attalea speciosa</i> Mart. ex Spreng.	Arecaceae	58.2	33	14.8	16.5	26.9	9337
<i>Himatanthus drasticus</i> (Mart.) Plumel	Apocynaceae	44.2	35	18.1	17.5	8.6	9328
<i>Chamaecrista ramosa</i> (Vogel) H.S. Irwin & Barneby	Fabaceae	32.1	33	11.4	16.5	4.1	9320
<i>Eugenia biflora</i> (L.) DC.	Myrtaceae	30.8	27	12.8	13.5	4.6	9324
<i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) Kunth	Malpighiaceae	14.0	7	4.7	3.5	5.8	9319
<i>Myrcia multiflora</i> (Lam.) DC.	Myrtaceae	8.9	8	4.0	4.0	0.9	9332
<i>Matayba guianensis</i> Aubl.	Sapindaceae	8.1	7	4.0	3.5	0.6	9731
<i>Ouratea hexasperma</i> (A.St. Hil.) Baill.	Ochnaceae	6.2	5	3.4	2.5	0.3	9331
<i>Anacardium occidentale</i> L.	Anacardiaceae	5.8	1	0.7	0.5	4.7	9317
<i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk.	Sapotaceae	5.4	1	0.7	0.5	4.2	9726
<i>Andira surinamensis</i> (Bondt) Splitg. ex Amshoff	Fabaceae	3.9	3	2.0	1.5	0.4	9318
<i>Myrcia cuprea</i> (O.Berg) Kiaersk.	Myrtaceae	3.9	3	2.0	1.5	0.3	9333
Combretaceae	Combretaceae	3.7	3	2.0	1.5	0.1	9322
<i>Ouratea fieldingiana</i> (Gardner) Engl.	Ochnaceae	3.6	3	2.0	1.5	0.1	9330
<i>Guapira</i> sp.	Nyctaginaceae	2.4	2	1.3	1.0	0.1	9728
<i>Eugenia stictopetala</i> Mart. ex DC.	Myrtaceae	1.5	1	0.7	0.5	0.3	9326
<i>Coccoloba ramosissima</i> Wedd.	Polygonaceae	1.4	1	0.7	0.5	0.3	9732
<i>Chomelia obtusa</i> Cham. & Schltdl.	Rubiaceae	1.3	1	0.7	0.5	0.1	9733
<i>Guettarda angelica</i> Mart. ex Müll. Arg.	Rubiaceae	1.2	1	0.7	0.5	0.03	9327
<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand	Burseraceae	1.2	1	0.7	0.5	0.03	9329
<i>Coccoloba latifolia</i> Lam.	Polygonaceae	1.2	1	0.7	0.5	0.03	9321

^aEspécies ordenadas por VI, ^bValor de Importância (VI), ^cNúmero de indivíduos (Ni), ^dFrequência Relativa (FR), ^eDensidade Relativa (DR), ^fDominância Relativa (DoR)

Determinação da toxicidade dos extratos vegetais

Para determinar se os extratos dessas plantas apresentavam toxicidade, diferentes concentrações de extratos foram testadas em macrófagos murinos da linhagem Raw 264.7. Os resultados da viabilidade celular mostraram que, de modo geral, as folhas das espécies *A. speciosa*, *C. ramosa* e *E. biflora* são menos tóxicas quando comparadas com as de *A. vulgare* e *H. drasticus* (Figura 1).

Os macrófagos cultivados em presença de *A. vulgare* e *H. drasticus* mostraram diminuição significativa da viabilidade, de forma dose-dependente, sendo que na maior concentração (500 µg/mL) a viabilidade reduziu para 21.3% e 22.5%, respectivamente. (Figura 1A, 1C).

As células expostas às concentrações de 62.5, 125 e 250 µg/mL de *A. speciosa* se mostraram viáveis após 24h de cultura, sem diferença significativa ao serem comparadas com o grupo controle (Figura 1B).

Para *C. ramosa* os resultados não mostraram diferença significativa na viabilidade celular em concentração de 125 µg/mL após incubação durante 24h, em comparação com o controle (Figura 1D). Enquanto que para a espécie *E. biflora* foram observadas diferenças significativas na viabilidade celular para todas as concentrações (Figura 1E).

Os valores de IC₅₀ variaram entre as concentrações 167.2 µg/mL (*H. drasticus*) e 306.4 µg/mL (*A. speciosa*) (Figura 1).

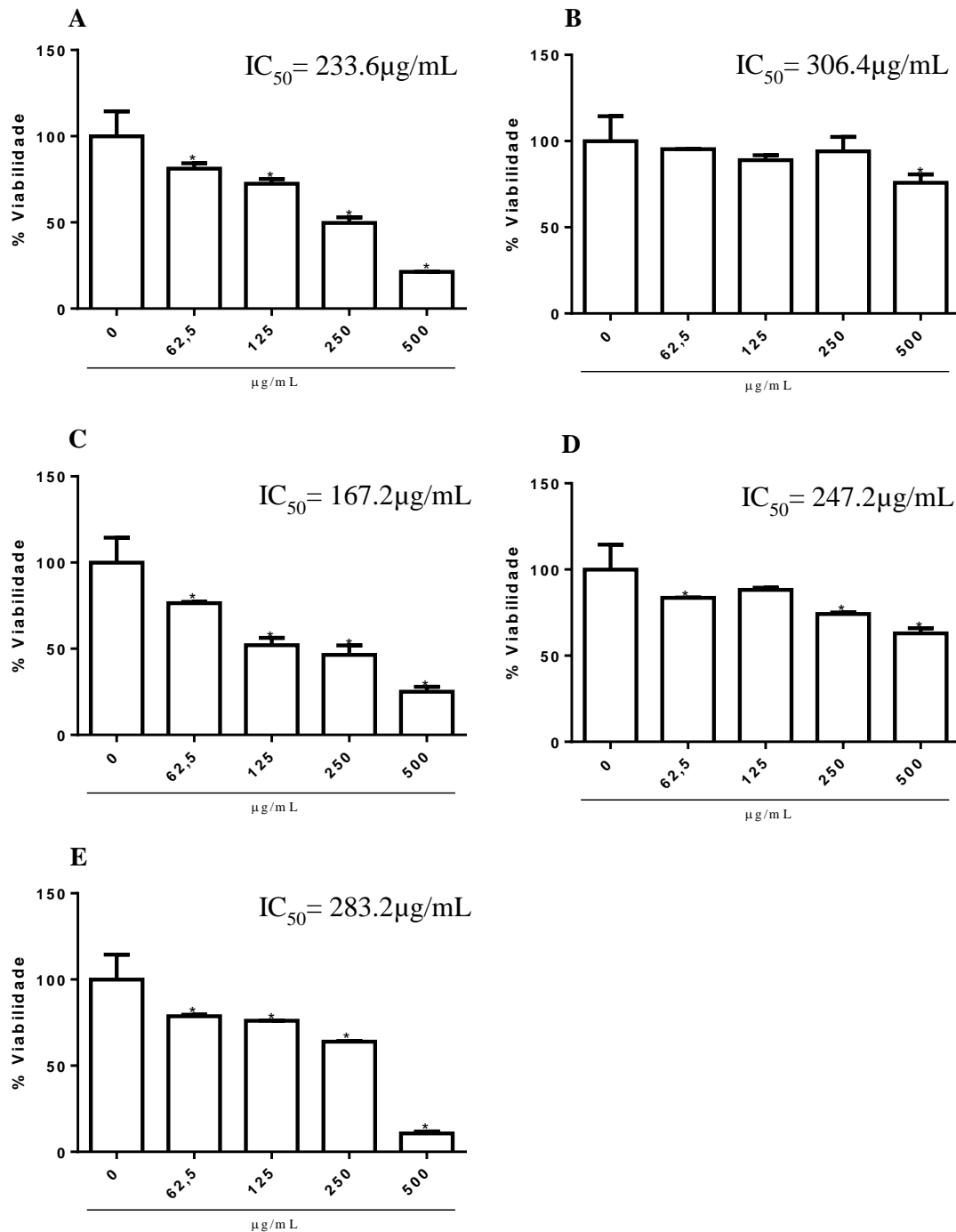


Figura 1. Avaliação de extratos de vegetais de uma área de restinga sobre a viabilidade de macrófagos murinos. Macrófagos da linhagem Raw 264.7 foram incubados por 24 horas em presença de extratos de folhas das espécies *Astrocaryum vulgare* (A); *Attalea speciosa* (B); *Himatanthus drasticus* (C); *Chamaecrista ramosa* (D); *Eugenia biflora* (E). * $p < 0.05$ quando comparados aos grupos de macrófagos cultivados sem extrato

Os extratos dos vegetais selecionados não apresentaram atividade tumoricida significativa *in vitro*

Ao expor as células de linhagem de câncer de próstata em presença dos cinco extratos foliares testados, observou-se que apenas *A. vulgare* e *A. speciosa* apresentaram diferença significativa em algumas concentrações quando comparadas ao grupo controle. O extrato das folhas de *A. vulgare* apresentou citotoxicidade sobre as células DU-145 nas concentrações de 62.5 e 125 µg/mL. Enquanto que para o extrato de *A. speciosa* foi registrada citotoxicidade nas concentrações de 65.5 a 250 µg/mL. Porém, quando avaliada a IC₅₀, verificou-se que *A. vulgare*, *H. drasticus* e *E. biflora* apresentaram IC₅₀ menor que o controle (Tabela 2).

As células MCF-7 tratadas com os extratos foliares das plantas de restinga sobreviveram após 24 horas de exposição, indicando que os extratos não possuem efeitos citotóxicos sobre as células MCF-7, exceto para a concentração de 500 µg/mL da espécie *A. vulgare* que apresentou diferença significativa do grupo controle ao matar 37% das células tumorais. Os resultados de IC₅₀ indicaram que apenas *E. biflora* apresentou IC₅₀ menor que o controle (Tabela 2).

Entretanto, apesar de diferenças pontuais, os resultados obtidos demonstraram que as espécies vegetais testadas não apresentaram atividade tumoricida *in vitro*. Esta afirmação foi baseada nos critérios do Instituto Nacional do Câncer que afirma que para um extrato ser promissor precisa ter uma IC₅₀ menor que 30 µg/mL [28]. Na tabela 2 podem ser observadas as IC₅₀ dos extratos contra linhagem não tumoral e linhagens tumorais.

Tabela 2: Efeitos inibitórios dos extratos foliares de cinco plantas de restinga sobre o crescimento de células de linhagem humana normal e de linhagens tumorais.

Espécies	IC ₅₀ (µg/mL)		
	GM07492A ^a	DU-145 ^b	MCF-7 ^c
<i>Astrocaryum vulgare</i>	352,9	191.9	353.8
<i>Attalea speciosa</i>	244.8	296.1	267.1
<i>Himatanthus drasticus</i>	352.8	181.7	276.3
<i>Chamaecrista ramosa</i>	194.5	222.8	255.8
<i>Eugenia biflora</i>	352.9	176.0	142.0

^aLinhagem de células humanas normais (Fibroblastos de pulmão)

^bLinhagem celular de câncer de próstata

^cLinhagem celular de câncer de mama

DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que extratos foliares de plantas de maior valor de importância ecológica de área de restinga são importantes fontes para investigações terapêuticas, visto que, de modo geral as cinco espécies apresentam elevados valores de IC₅₀, permitindo que algumas concentrações do extrato sejam utilizadas com segurança. Porém, na determinação da atividade tumoricida dos extratos vegetais não foi observada ação citotóxica nas concentrações avaliadas.

A diversidade vegetal encontrada para a área de estudo foi similar aos valores observados para outras áreas de restinga do Brasil [29–31]. Estes valores de diversidade podem ser atribuídos as condições ambientais das restingas, caracterizadas por solos pobres em nutrientes, alta radiação solar e ventos fortes nos quais poucas espécies conseguem se manter [31]. No entanto, outras áreas de restingas sob essas mesmas condições apresentam diversidade com valores de índice de Shannon entre 3.33 e 3.55 nat/indivíduos [32,33]. O que pode ser justificado pelas particularidades inerentes às restingas, como fatores abióticos diferenciados ou diferentes níveis de antropização.

No âmbito da bioprospecção, espécies que compõem a diversidade vegetal das restingas têm se mostrado como potenciais fontes de recursos bioativos. E diversos estudos comprovam propriedades antioxidante [34–36], antibacteriana, antifúngica [37] acaricida [38] e bioinseticidas [39], além de análises fitoquímicas [40–43] e estudos etnobotânicos [44,45] que sugerem espécies para avaliações biológicas. Porém, esses estudos não contemplam avaliação tóxica das plantas, que é indispensável para a geração de um bioproduto [10].

Estudos que investigaram a toxicidade de *Vernonia scorpioides*, coletada em área de restinga, demonstraram a importância da avaliação toxicológica para prosseguimento com pesquisas sobre ações farmacológicas da espécie. Testes, *in vitro* e *in vivo*, com extratos das folhas de *Vernonia scorpioides* mostraram que a planta apresentou efeitos tóxicos contra células tumorais, e induziu a diminuição do tamanho do tumor sólido em camundongos [8,9].

Na perspectiva de avaliar a toxicidade de plantas submetidas a condições ambientais extremas, tal como as restingas, utilizou-se neste trabalho o valor de importância das espécies como critério. A vantagem na utilização deste parâmetro é o destaque dado para as espécies mais dominantes na área, evidenciando que são espécies resistentes e que se desenvolvem bem sob as condições do meio onde se estabeleceram.

Para a área de restinga estudada as espécies dominantes foram *Astrocaryum vulgare*, conhecido popularmente como tucumã, tucunzeiro e/ou tucum-bravo [46]; *Attalea speciosa*, palmeira nativa do Brasil conhecida popularmente como babaçu [47]; *Himatanthus drasticus*, chamado de janaúba [48]; *Chamaecrista ramosa* e *Eugenia biflora*, ambos não apresentam nomes vernaculares na região.

As três primeiras colocadas quanto ao valor de importância, *A. vulgare*, *A. speciosa* e *H. drasticus*, são espécies dominantes capazes de se desenvolver em solos pobres, resistirem ao fogo e ter facilidade de regeneração [49–51]. A resistência diante das condições limitantes do ambiente de restinga, dominância nesses espaços e porte arbustivo-arbóreo [52] das cinco espécies selecionadas para este estudo podem indicar a produção de compostos bioativos valorosos para bioprospecção.

Algumas atividades biológicas destas espécies já foram investigadas, muito embora, a maioria deles seja com outras partes vegetais que não as folhas. Por exemplo, o óleo do fruto de *A. vulgare*, apresentou propriedades anti-inflamatórias [53,54]; o extrato aquoso do mesocarpo de *A. speciosa* demonstrou atividade imunomoduladora com relevantes perspectivas na atividade antitumoral [55–58]; o látex de *H. drasticus* possui efeitos antitumoral e anti-inflamatório [59,60]. No caso de *H. drasticus* foi demonstrado que o extrato das folhas de *H. drasticus* demonstrou atividade antimicrobiana contra *Klebsiella pneumoniae*, causando danos à membrana bacteriana, e não foi citotóxico para células mononucleadas de sangue periférico humano [61].

Para as espécies de *C. ramosa* e *E. biflora* não foram encontrados estudos sobre suas possíveis atividades farmacológicas, o que reforça a necessidade de desenvolver estudos com estas espécies. Em especial porque existem pesquisas para espécies do mesmo gênero taxonômico, como *Chamaecrista nictitans* (L.) Moench [62] e *Eugenia uniflora* L. [63,64]. Segundo a abordagem de seleção de quimiotaxonomia isso é um indício de que *C. ramosa* e *E. biflora* também apresentam potencial terapêutico, pois essa abordagem assume que plantas da mesma família botânica geralmente sintetizam compostos de classes similares e, portanto, caminhos biossintéticos parecidos [65]. Estes trabalhos são importantes, pois demonstram que as espécies deste estudo apresentam compostos químicos de interesse farmacológico, e mesmo para *C. ramosa* e *E. biflora* é possível prever atividade biológica por serem similares a espécies já estudadas.

A avaliação da viabilidade celular é importante para indicar plantas com possíveis ações para o tratamento de infecções bacterianas, fúngicas e possíveis compostos antitumorais [66]. No presente estudo, os valores de IC₅₀ encontrados variaram entre 167,2 µg/mL (*H. drasticus*) e 306,4 µg/mL (*A. speciosa*), são valores altos quando comparados com outros trabalhos. Em estudo de avaliação da toxicidade de espécies selecionadas pela abordagem etnofarmacológica na Nigéria, a maior IC₅₀ (88.23 µg/mL) foi para extrato da espécie *Macaranga barteri* Mull-Arg. sobre células normais de próstata humana [67]. Estudo realizado com uma espécie de restinga, *Passiflora mucronata* Lam., mostrou que a maior IC₅₀ sobre células Raw 264.7 foi 56,52 µg/mL [68]. Porém, no trabalho de Figueiredo et al. (2017) ao utilizar células mononucleadas de sangue periférico humano a IC₅₀ do extrato das folhas de *H. drasticus* ficou entre 1560 e 3125 µg/mL, ou seja, quando em comparação com este trabalho os valores de IC₅₀ obtidos no presente estudo são baixos. As diferenças nos valores de IC₅₀ podem ser em decorrência de vários fatores, tais como as concentrações de extratos testadas e dos tipos de linhagens celulares utilizadas nos experimentos.

Quanto aos testes tumoricidas nenhuma das cinco espécies apresentou capacidade de inibir o crescimento celular das linhagens testadas. O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos considera que um extrato bruto tem potencial composto natural anticâncer quando o IC₅₀ é no máximo 30 µg/mL [28]. Mesmo com altas concentrações a investigação detalhada sobre ação antitumoral para as espécies só valeria a pena se as IC₅₀ das células normais fossem superiores as das células tumorais, tal como foi observado em estudo que avaliou a toxicidade da espécie *Indigofera cassioides* Rottl. ex. DC. [69].

Avaliação da toxicidade das plantas é uma forma de rastrear metabólitos secundários e otimizar os esforços para buscas bem-sucedidas. Pesquisas com esse propósito são realizadas direta ou indiretamente com a preocupação de também contribuir para a conservação das áreas ambientais, principalmente em regiões da Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica, que apresentam alta riqueza e diversidade, apesar de estarem constantemente sendo degradadas por ações antrópicas [14,70,71].

Entre os diversos ecossistemas brasileiros as áreas de restinga destacam-se por suas peculiares características ambientais, as quais as plantas estão submetidas e por sofrerem com intensa especulação imobiliária, turismo e instalações de portos, que provocam degradação e perdas irreparáveis à diversidade vegetal, sendo necessária a implementação de efetivas unidades de conservação para proteção deste ambiente e dos seus recursos bioativos [72,73].

A viabilidade das células submetidas à presença dos diferentes extratos hidroetanólicos pode ser justificada pela composição química das folhas de cada planta, por isso esta pesquisa terá continuidade com investigações sobre caracterização fitoquímica das folhas analisadas.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho possibilitam o emprego de uma estratégia metodológica a ser utilizada na busca por compostos com atividades biológicas; valoriza o potencial de espécies vegetais promissoras para investigações bioprospectivas, que apesar de serem dominantes em restinga estão expostas às ameaças à biodiversidade, comuns a este ecossistema; e apresenta informações iniciais sobre as potencialidades bioativas dos extratos foliares das espécies *Astrocaryum vulgare*, *Attalea speciosa*, *Himatanthus drasticus*, *Chamaecrista ramosa* e *Eugenia biflora*, que foram submetidas a testes de citotoxicidade *in vitro*, e que subsidiarão novas análises para destacar a importância do conhecimento e conservação das áreas de restinga.

REFERÊNCIAS

1. Melo JG, Rodrigues MD, Nascimento SC, Amorim ELC, Albuquerque UP. Cytotoxicity of plants from the Brazilian semi-arid region: A comparison of different selection approaches. *South Afr J Bot.* 2017;113:47–53.
2. Verma N, Shukla S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *J Appl Res Med Aromat Plants.* 2015;2:105–13.
3. Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quím Nova.* 2007;30:374.
4. Magnago LFS, Martins SV, Schaefer CEGR, Neri AV. Restinga forests of the Brazilian coast: richness and abundance of tree species on different soils. *An Acad Bras Ciênc.* 2012;84:807–22.
5. Santos-Filho FS, Almeida Jr EB, Zickel CS. Do edaphic aspects alter vegetation structures in the Brazilian restinga? *Acta Bot Bras.* 2013;27:613–623.
6. Martini, AMZ; Castanho, CT; Rocha, MI; Stuart, PJ; Jesus, FM; Oliveira, AA. Restinga e Ecologia. In: Azevedo, NH; Martini, A.M.Z.; Oliveira, A.A.; Sca Rpa, DL; Petrobras: USP, IB, LabTrop/BioIn (org.). *Ecologia na restinga: uma sequência didática argumentativa.* 1ed. São Paulo: Edição dos autores, Janeiro de 2014. 140p.

7. Felfili JM, Eisenlohr PV, Melo MMRF, Andrade LA, Meira-Neto JAA. Fitossociologia no Brasil: métodos e estudos de casos. Viçosa: Editora UFV; 2011.
8. Buskuhl H, de Oliveira FL, Blind LZ, de Freitas RA, Barison A, Campos FR, et al. Sesquiterpene lactones from *Vernonia scorpioides* and their in vitro cytotoxicity. *Phytochemistry*. 2010;71:1539–44.
9. Alexandre Schefer F, Ricardo S, Zozula Blind CL, Luis P, de Oliveira Souza BL, Branco Filippin MF, et al. Antitumoral activity of sesquiterpene lactone diacetylptiocarphol in mice. *J Ethnopharmacol*. 2017;198:262–7.
10. Bednarczuk VO, Verdam MCS, Miguel MD, Miguel OG. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. *Visão Acadêmica*. 2010;11.
11. Mesquita ML, de Paula JE, Pessoa C, de Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Grougnet R, et al. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *J Ethnopharmacol*. 2009;123:439–45.
12. Gallego A, Metón I, Baanante IV, Ouazzani J, Adelin E, Palazon J, et al. Viability-reducing activity of *Coryllus avellana* L. extracts against human cancer cell lines. *Biomed Pharmacother*. 2017;89:565–72.
13. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <www.inca.gov.br> Acessado em: 03 de jan. de 2018.
14. Pedrollo CT, Kinupp VF, Shepard G, Heinrich M. Medicinal plants at Rio Jauaperi, Brazilian Amazon: Ethnobotanical survey and environmental conservation. *J Ethnopharmacol*. 2016;186:111–24.
15. Braz DM, de Lima Jacques E, Somner GV, da Silva Sylvestre L, da Rosa MMT, Pereira-Moura MVL, et al. Restinga de Praia das Neves, ES, Brasil: caracterização fitofisionômica, florística e conservação/Sandy coastal plains (restinga) of Praia das Neves, ES, Brazil: phytophysiology characterization, flora and conservation. *Biota Neotropica*. 2013;13:315.
16. CBD, History of the Convention. Disponível em: <<https://www.cbd.int/history/>>. Acesso em: 10 maio 2017.
17. Souza UV, Pereira M, Silva A, Feitosa A. Caracterização geomorfológica e costeira de Panaquatira, município de São José de Ribamar – MA, 2006. Disponível em: <<http://www.labogef.iesa.ufg.br/links/sinageo/articles/255.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2016.
18. IMESC. Instituto Maranhense de Estudos Socioeconômicos e Cartográficos. Situação Ambiental da Ilha de São Luís. São Luís; 2011.
19. Cottam G, Curtis J, The Use of Distance Measures in Phytosociological Sampling. *Ecology* 1956; 37 (3) 451–460.
20. Peixoto AL, Maia LC. Manual de Procedimentos para herbários. INCT-Herbário virtual para a Flora e os Fungos. Editora Universitária UFPE, Recife, 2013.

21. Angiosperm Phylogeny Group (APG) IV. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* 2016; 181: 1-20.
22. Almeida Jr EB. Herbário do Maranhão, Maranhão (MAR). *Unisantia Biosci.* 2015;4:129–132.
23. Shepherd GJ. *Fitopac 2: manual do usuário Programa Fitopac 2: Campinas, UNICAMP; 2009.*
24. Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr V, Grynberg NF, Echevarria A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quím Nova.* 2002;25:429–438.
25. BRASIL. *Farmacopéia Brasileira, volume 2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 546p., 2010.*
26. Rodrigues TS, Guimarães SF, RODRIGUES-DAS-DÔRES R, Gabriel JV. Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo). *Rev Bras Plantas Med Botucatu.* 2011;13.
27. ISO DOCUMENT 10993-5, Biological evaluation of medical devices, Part 5, Tests for Cytotoxicity: *In Vitro* Methods, 2009.
28. Suffness M, Pezzuto JM. Assays related to cancer drug discovery. *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity.* 1990;6:71–133.
29. Almeida Jr EB, Zickel CS. Análise fitossociológica do estrato arbustivo-arbóreo de uma floresta de restinga no Rio Grande do Norte. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 2012; 7: 286–291.
30. Castro ASF, Moro MF, Menezes MOT de. O complexo vegetacional da zona litorânea no Ceará: Pecém, São Gonçalo do Amarante. *Acta Bot Bras.* 2012;
31. Santos-Filho FS, de Almeida Jr EB, Soares CJ dos RS, Zickel CS. Flora and woody vegetation structure in an Insular area of restinga in Brazil. *Int J Ecol Environ Sci.* 2015;41:147–160.
32. Medeiros DPW, Santos-Filho FS, Almeida Jr. EB, Pimentel RMM, Zickel CS. Estrutura do Componente Lenhoso de uma Restinga no Litoral Sul de Alagoas, Nordeste, Brasil. *Revista Brasileira de Geografia Física* 2010; 3: 146–150.
33. Almeida Jr EB, Santos-Filho FS, Araújo EL, Zickel CS. Structural characterization of the woody plants in restinga of Brazil. *Journal of Ecology and the Natural Environment* 2011; 3: 95–103.
34. Boscolo OH et al. Potencial antioxidante de algumas plantas de restinga citadas como medicinais. *Rev. Bras. Pl. Med.* 2007;9:1:8-12.
35. Kuki KN, Oliva MA, Pereira EG, Costa AC, Cambraia J. Effects of simulated deposition of acid mist and iron ore particulate matter on photosynthesis and the generation of oxidative

stress in *Schinus terebinthifolius* Radii and *Sophora tomentosa* L. *Sci Total Environ*. 2008;403:207–14.

36. Ferreira RO, Junior AR de C, da Silva TMG, Castro RN, da Silva TMS, de Carvalho MG. Distribution of metabolites in galled and non-galled leaves of *Clusia lanceolata* and its antioxidant activity. *Rev Bras Farmacogn*. 2014;24:617–25.

37. Rodrigues FG, Rodrigues FG, Almeida SX, Campos A, Oliveira LS, Saraiva M, et al. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves. *Pharmacogn Res*. 2012;4:161.

38. Pontes WJT, de Oliveira JCS, da Câmara CAG, Junior M, de Oliveira JV, Schwartz MOE. Atividade acaricida dos óleos essenciais de folhas e frutos de *Xylopia sericea* sobre o ácaro rajado (*Tetranychus urticae* Koch). *Quím Nova*. 2007;30:838.

39. Leitão SG, Oliveira DR de. The modern pharmacognosy and the ethnopharmacological approach on natural products research. *Rev Bras Farmacogn*. 2014;24:97–8.

40. Jardim MAG, Neto C, Villar S, Silva JC da. Fitoterapia popular e metabólitos secundários de espécies vegetais da Ilha de Algodal, Município de Maracanã, Estado do Pará, Brasil- Resultados preliminares. 2005;

41. Dutra LM, Costa EV, Moraes VR de S, Nogueira PC de L, Vendramin ME, Barison A, et al. Chemical constituents from the leaves of *Annona pickelii* (Annonaceae). *Biochem Syst Ecol*. 2012;41:115–8.

42. Guimarães AL de A, Bizarri CHB, Barbosa LS, Nakamura MJ, de Souza Ramos MF, de Macêdo Vieira AC. Characterisation of the effects of leaf galls of *Clusiamyia nitida* (Cecidomyiidae) on *Clusia lanceolata* Cambess. (Clusiaceae): Anatomical aspects and chemical analysis of essential oil. *Flora - Morphol Distrib Funct Ecol Plants*. 2013;208:165–73.

43. Rêgo M de SC, Kikuchi TYS. Estruturas secretoras em folhas de *Clusia fockeana* Miq. e *Clusia hoffmannseggiana* Schltdl. (Clusiaceae): Distribuição e anatomia. *Enciclopédia Biosf*. 2015;11:2993–3008.

44. Santos MG, Fevereiro PCA, Reis GL, Barcelos JI. Recursos vegetais da restinga de Carapebus, Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Biol Neotropical*. 2009;6:35–54.

45. Santos ACB, Silva MAP, Santos MAF, Leite TR. Ethnobotanical, chemical and pharmacological survey of Apocynaceae Juss. Species occurring in Brazil. *Rev Bras Plantas Med*. 2013;15:442–458.

46. Kahn F. El género *Astrocaryum* (Arecaceae). *Rev Peru Biol*. 2008;15:31–48.

47. Lorenzi, H. *Flora Brasileira: Arecaceae (Palmeiras)*. 1ª ed. Nova Odessa, SP. Instituto Plantarum, 2010.

48. Luz HS, Santos ACG, Lima, F.C., Machado KRG. Prospecção fitoquímica de *Himatanthus drasticus* Plumel (Apocynaceae), da mesorregião leste maranhense. Rev Bras Plantas Med. 2014;16:657–62.
49. Shanley PG, Medina G. Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica. CIFOR: Imazon, Belém; 2005.
50. Mitja D, Ferraz I. Establishment of Babassu in pastures in Pará, Brazil. Palms 2001; 45: 138-147
51. Moro MF, Castro ASF, de Araújo FS. Composição florística e estrutura de um fragmento de vegetação savânica sobre os tabuleiros pré-litorâneos na zona urbana de Fortaleza, Ceará. Rodriguésia-Inst Pesqui Jard Botânico Rio Jan. 2011;62.
52. Donaldson JR, Cates RG. Screening for Anticancer Agents from Sonoran Desert Plants:A Chemical Ecology Approach. Arch Physiol Biochem. 2004;42:478–87.
53. Bony E, Boudard F, Brat P, Dussossoy E, Portet K, Poucheret P, et al. Awara (*Astrocaryum vulgare* M.) pulp oil: Chemical characterization, and anti-inflammatory properties in a mice model of endotoxic shock and a rat model of pulmonary inflammation. Fitoterapia. 2012;83:33–43.
54. Michel A, Brat P, Boudard F, Giaimis J, Barouh N, Piombo G, et al. Chemical composition and anti-inflammatory activities of an unsaponifiable fraction of pulp oil from awara (*Astrocaryum Vulgare* M.). III Int Symp Hum Health Eff Fruits Veg-FAVHEALTH 2009 1040. 2009. p. 43–48.
55. Fortes TS, Fialho ÉMS, reis AS, Assunção, AKM, Pinheiro MT et al. Desenvolvimento do tumor de Ehrlich em camundongos após incubação *in vitro* com mesocarpo de babaçu. Rev. Ciênc. Saúde. 2009;11:1:11-18.
56. Araújo EMM, de Almeida CSC, Junior JMFG, do Nascimento FRF. Ativação *in vitro* do sistema complemento como mecanismo imunomodulador induzido pelo mesocarpo de babaçu. Rev Ciênc Saúde. 2013;15.
57. Almeida CSC, dos Santos APSA, Júnio JMFG, da Cunha TSF, do Nascimento FRF. Indução da resposta imune com células tumorais mcf7 pré-tratadas com mesocarpo de babaçu. Cad Pesqui. 2014;30–39.
58. Leticia PPP, Josemar MFGJ, Elza M, Diego SA, Caroline SCA, Mayara CP, et al. Sensitization with babassu mesocarp induces activation of murine splenocytes against tumor cells. J Med Plants Res. 2016;10:585–94.
59. Lucetti DL, Lucetti EC, Bandeira MAM, Veras HN, Silva AH, Leal LKA, et al. Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. J Inflamm. 2010;7:60.
60. Mousinho KC, Oliveira C de C, Ferreira JR de O, Carvalho AA, Magalhães HIF, Bezerra DP, et al. Antitumor effect of laticifer proteins of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel – Apocynaceae. J Ethnopharmacol. 2011;137:421–6.

61. Figueiredo C, Branco Santos J, Castro Junior J, Wakui V, Rodrigues J, Arruda M, et al. *Himatanthus drasticus* Leaves: Chemical Characterization and Evaluation of Their Antimicrobial, Antibiofilm, Antiproliferative Activities. *Molecules*. 2017;22:910.
62. Mateos-Martín ML, Fuguet E, Jiménez-Ardón A, Herrero-Urbe L, Tamayo-Castillo G, Torres JL. Identification of polyphenols from antiviral *Chamaecrista nictitans* extract using high-resolution LC–ESI–MS/MS. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406:5501–6.
63. Cunha FAB, Waczuk EP, Duarte AE, Barros LM, Elekofehinti OO, Matias EFF, et al. Cytotoxic and antioxidative potentials of ethanolic extract of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) leaves on human blood cells. *Biomed Pharmacother*. 2016;84:614–21.
64. Denardin CC, Parisi MM, Martins LAM, Terra SR, Borojevic R, Vizzotto M, et al. Antiproliferative and cytotoxic effects of purple pitanga (*Eugenia uniflora* L.) extract on activated hepatic stellate cells: Purple pitanga induces cytotoxicity in hscs. *Cell Biochem Funct*. 2014;32:16–23.
65. Ntie-Kang F, Lifongo LL, Mbaze LM, Ekwelle N, Owono LCO, Eugene Megnassan E et al. Cameroonian medicinal plants: a bioactivity versus ethnobotanical survey and chemotaxonomic classification.. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2013, 13:147
66. Taiwo BJ, Fatokun AA, Olubiyi OO, Bamigboye-Taiwo OT, van Heerden FR, Wright CW. Identification of compounds with cytotoxic activity from the leaf of the Nigerian medicinal plant, *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae). *Bioorg Med Chem*. 2017;25:2327–35.
67. Ogbole OO, Segun PA, Adeniji AJ. In vitro cytotoxic activity of medicinal plants from Nigeria ethnomedicine on Rhabdomyosarcoma cancer cell line and HPLC analysis of active extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2017;17:494.
68. Araujo MH de, Silva ICV da, Oliveira PF de, Barreto ARR, Konno TUP, Esteves F de A, et al. Biological activities and phytochemical profile of *Passiflora mucronata* from the Brazilian restinga. *Rev Bras Farmacogn*. 2017;27:702–10.
69. Kumar RS, Rajkapoor B, Perumal P. In vitro and in vivo anticancer activity of *Indigofera cassioides* Rottl. Ex. DC. *Asian Pac J Trop Med*. 2011;4:379–385.
70. Albuquerque UP, Ramos MA, Melo JG. New strategies for drug discovery in tropical forests based on ethnobotanical and chemical ecological studies. *J Ethnopharmacol*. 2012;140:197–201.
71. Ribeiro RV, Bieski IGC, Balogun SO, Martins DT de O. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2017;205:69–102.
72. Rocha CFD, Bergallo HG, Van Sluys M, Alves MAS, Jamel CE. The remnants of restinga habitats in the Brazilian Atlantic Forest of Rio de Janeiro state, Brazil: habitat loss and risk of disappearance. *Braz J Biol*. 2007;67:263–273.

73. Monte Braz D, de Lima Jacques E, Vieira Somner G, da Silva Sylvestre L, Teixeira da Rosa MM, Pereira-Moura MVL, et al. Restinga de Praia das Neves, ES, Brasil: caracterização fitofisionômica, florística e conservação. *Biota Neotropica*. 2013;13.

DADOS SUPLEMENTARES

1. Imagens das espécies de uma área de restinga da praia de Panaquatira, Maranhão, selecionadas para avaliação quanto à toxicidade e atividade tumoricida.

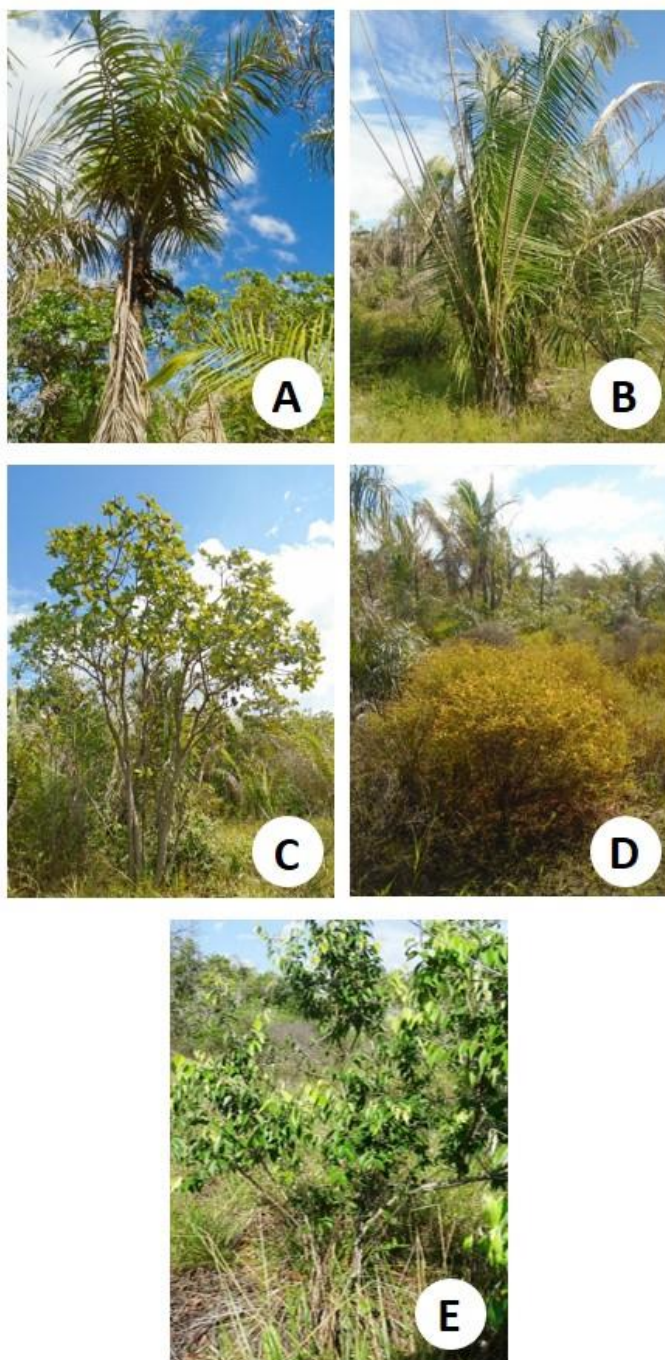


Figura 1s. Espécies vegetais de uma área de restinga selecionadas para o presente estudo. *Astrocaryum vulgare* Mart. (A), *Attalea speciosa* Mart. ex Spreng. (B), *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (C), *Chamaecrista ramosa* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby (D) e *Eugenia biflora* (L.) DC. (E)

2. Os extratos dos vegetais selecionados não apresentaram atividade tumoricida significativa, *in vitro*, em presença das linhagens GM07492A (Figura 2s), DU-145 (Figura 3s) e MCF-7 (Figura 4s).

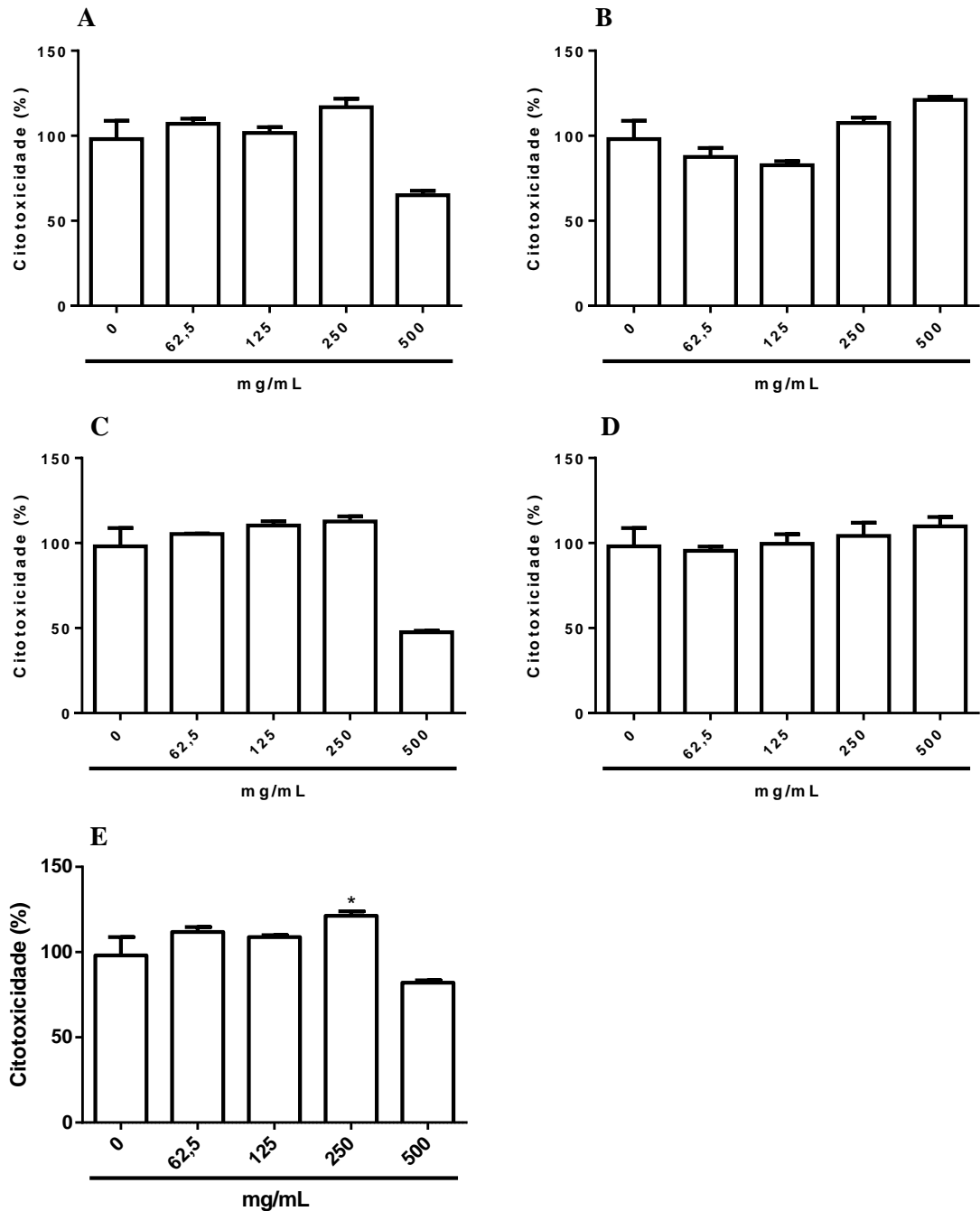


Figura 2s. Viabilidade das células humanas normais (GM07492A) incubadas por 24 horas em presença de extratos hidroalcoólicos de folhas de plantas de restinga das espécies *Astrocaryum vulgare* (A); *Attalea speciosa* (B); *Himatanthus drasticus* (C); *Chamaecrista ramosa* (D); *Eugenia biflora* (E). * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo controle

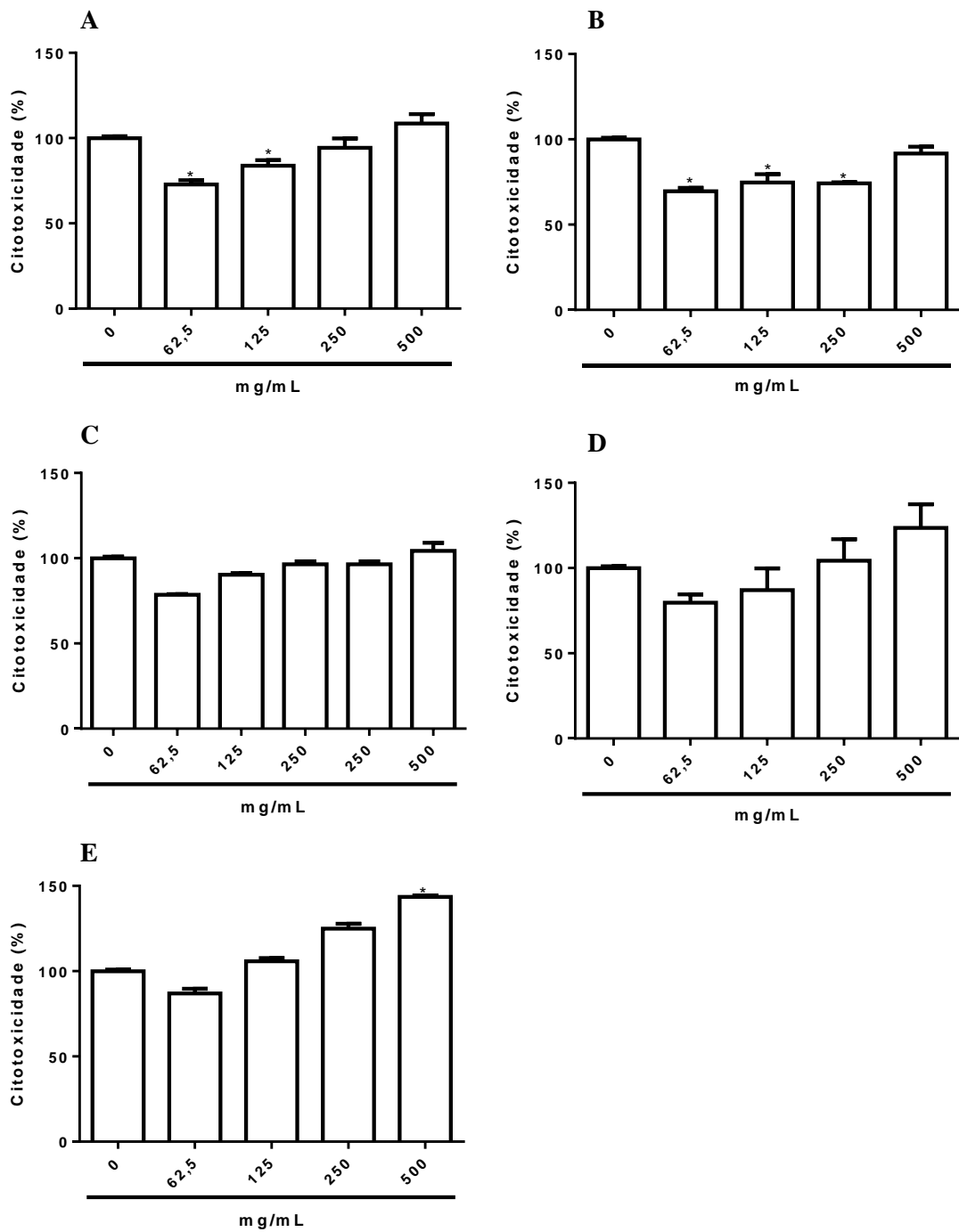


Figura 3s: Efeito dos extratos hidroalcoólicos de plantas de restinga sobre a viabilidade de células tumorais. Células tumorais da linhagem DU-145 foram incubados por 24 horas em presença de extratos de folhas das espécies *Astrocaryum vulgare* (A); *Attalea speciosa* (B); *Himatanthus drasticus* (C); *Chamaecrista ramosa* (D); *Eugenia biflora* (E). * $p < 0,05$ quando comparados aos grupos de células tumorais cultivadas sem extrato

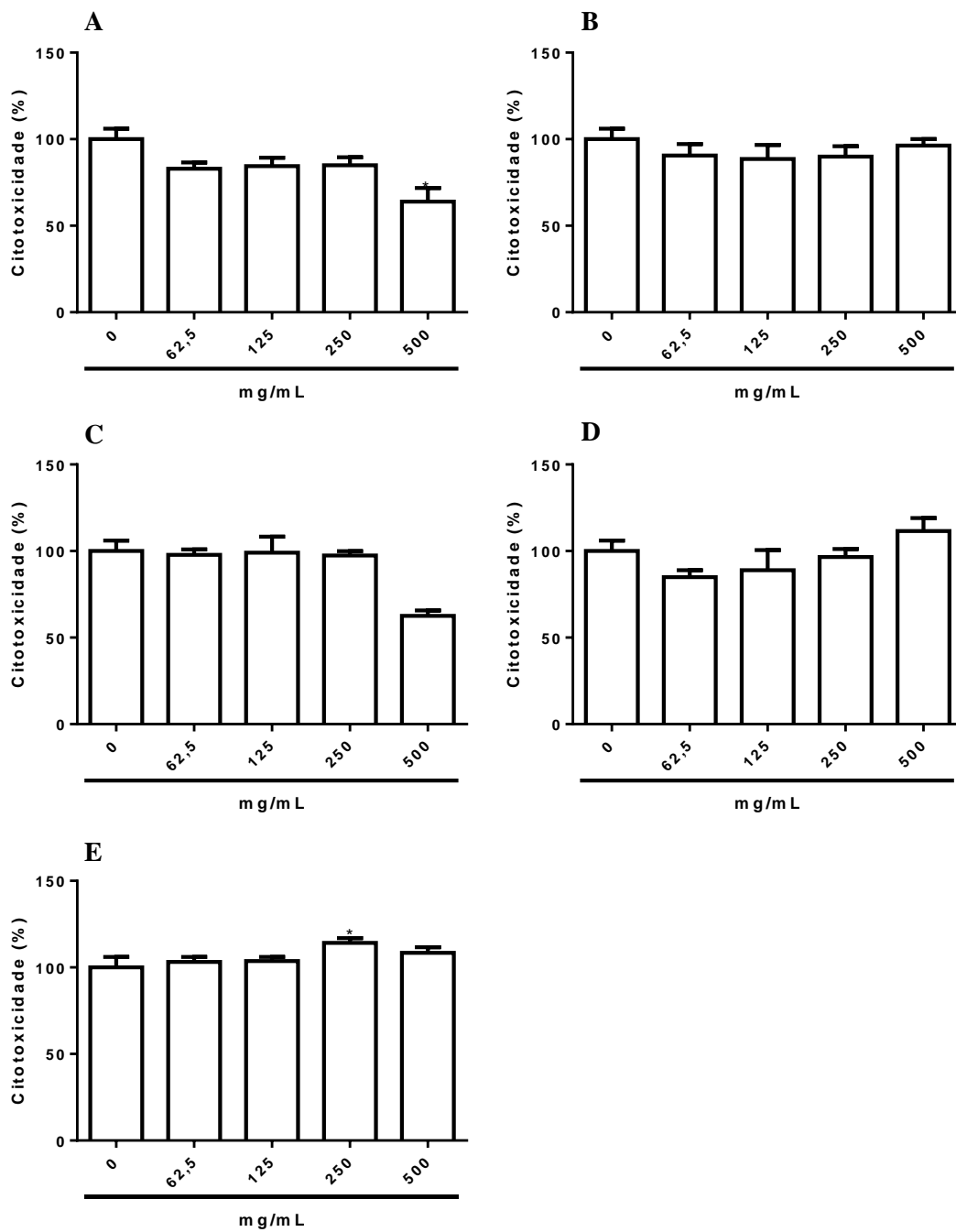


Figura 4s: Efeito de diferentes concentrações de extratos de plantas de uma área de restinga em células tumorais. Células tumorais da linhagem MCF-7 foram incubados por 24 horas em presença de extratos de folhas das espécies *Astrocaryum vulgare* (A); *Attalea speciosa* (B); *Himatanthus drasticus* (C); *Chamaecrista ramosa* (D); *Eugenia biflora* (E). * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo controle

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos procedimentos metodológicos adotados, nesse estudo, como estratégia para seleção de espécies para bioprospecção, a fitossociologia mostrou-se útil para a escolha de espécies promissoras. Por meio da análise da estrutura da vegetação lenhosa foi possível conhecer as espécies mais dominantes na área de restinga. Visto que o ecossistema de restinga apresenta características ambientais que favorecem o aumento da produção de compostos bioativos com importantes ações farmacológicas. Nesta perspectiva, a avaliação da toxicidade das espécies de maior Valor de Importância (VI), *Astrocaryum vulgare* Mart., *Attalea speciosa* Mart. ex Spreng., *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel, *Chamaecrista ramosa* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby e *Eugenia biflora* (L.) DC., mostrou que a maioria delas não são tóxicas nas concentrações testadas, e que apesar dos resultados de atividade tumoricidade não terem sido significativos a estratégia de seleção de espécies vegetais testada neste trabalho mostrou-se útil para escolha de espécies promissoras para investigações bioprospectivas.

Este estudo valorizou o potencial bioprospectivo de espécies vegetais de ambientes de restinga que são áreas constantemente degradadas e carentes de ações políticas para conservação à biodiversidade. Portanto, recorrer às práticas de bioprospecção tem sido uma estratégia utilizada para que as espécies possam ser valoradas, utilizadas de modo sustentável e para que a renda gerada sirva como aporte de recursos para o gerenciamento ambiental.

ANEXO

NORMAS DA REVISTA COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE

Os artigos de pesquisa devem informar sobre a pesquisa primária original, mas podem informar sobre revisões sistemáticas da pesquisa publicada, desde que adotem as diretrizes de relatório apropriadas, detalhadas em nossas políticas editoriais. Observe que as análises agrupadas não comissionadas de pesquisas selecionadas não serão consideradas.

Apresentação dos manuscritos (texto)

As informações abaixo detalham os cabeçalhos de seção que você deve incluir em seu manuscrito e quais informações devem estar dentro de cada seção.

Por favor, note que seu manuscrito deve incluir uma seção "Declarações", incluindo todas as subseções (veja abaixo para obter mais informações).

Folha de rosto

A página de título deve:

- apresentar um título que inclua, se for caso disso, o desenho do estudo, por exemplo:
 - "A versus B no tratamento de C: um ensaio controlado randomizado", "X é um fator de risco para Y: um estudo de controle de caso", "Qual é o impacto do fator X no assunto Y: Uma revisão sistemática"
 - ou para estudos não clínicos ou não-pesquisados, uma descrição do que o artigo informa
- liste os nomes completos, endereços institucionais e endereços de e-mail para todos os autores
 - se um grupo de colaboração deve ser listado como um autor, liste o nome do grupo como autor. Se você quiser que os nomes dos membros individuais do Grupo sejam pesquisados através de seus registros individuais do PubMed, inclua essas informações na seção "Agradecimentos" de acordo com as instruções abaixo
- indicar o autor correspondente

Resumo

O resumo não deve exceder 350 palavras. Por favor, minimize o uso de abreviaturas e não cite referências no resumo. Os relatórios de ensaios clínicos randomizados devem seguir a extensão CONSORT para resumos. O resumo deve incluir as seguintes seções separadas:

- **Antecedentes:** contexto e finalidade do estudo
- **Métodos:** como o estudo foi realizado e testes estatísticos utilizados
- **Resultados:** os principais achados
- **Conclusões:** breve resumo e implicações potenciais
- **Registro de ensaio:** se o seu artigo informar os resultados de uma intervenção de cuidados de saúde em participantes humanos, ele deve estar registrado em um registro apropriado e o número de registro e a data de registro devem ser estabelecidos nesta seção. Se não foi registrado prospectivamente (antes da inscrição do primeiro participante), você deve incluir as palavras "registrado retrospectivamente". Veja nossas políticas editoriais para obter mais informações sobre o registro de teste

Palavras-chave

Três a dez palavras-chave que representam o conteúdo principal do artigo.

Antecedentes

A seção Antecedentes deve explicar os antecedentes do estudo, seus objetivos, um resumo da literatura existente e por que esse estudo foi necessário ou sua contribuição para o campo.

Métodos

A seção de métodos deve incluir:

- O objetivo, o design e a configuração do estudo
- as características dos participantes ou a descrição dos materiais
- uma descrição clara de todos os processos, intervenções e comparações. Os nomes genéricos de drogas geralmente devem ser usados. Quando as marcas proprietárias são usadas na pesquisa, inclua as marcas entre parênteses
- o tipo de análise estatística utilizada, incluindo um cálculo de potência, se apropriado

Resultados

Isto deve incluir as conclusões do estudo, incluindo, se for caso disso, os resultados da análise estatística que devem ser incluídos no texto ou como tabelas e figuras.

Discussão

Esta seção deve discutir as implicações das descobertas no contexto da pesquisa existente e destacar as limitações do estudo.

Conclusões

Isso deve indicar claramente as principais conclusões e fornecer uma explicação da importância e relevância do estudo relatado.

Lista de abreviações

Se as abreviações forem usadas no texto, elas devem ser definidas no texto no primeiro uso, e uma lista de abreviaturas deve ser fornecida.

Declarações

Todos os manuscritos devem conter as seguintes seções sob o título "Declarações":

- Aprovação ética e consentimento para participar
- Consentimento para publicação
- Disponibilidade de dados e material
- Interesses competitivos
- Financiamento
- Contribuições dos autores
- Reconhecimentos
- Informação dos autores (opcional)

Veja abaixo os detalhes sobre as informações a serem incluídas nessas seções.

Se alguma das seções não for relevante para o seu manuscrito, inclua o cabeçalho e escreva "Não aplicável" para essa seção.

Aprovação ética e consentimento para participar

Manuscritos que relatam estudos envolvendo participantes humanos, dados humanos ou tecido humano devem:

- incluir uma declaração sobre aprovação ética e consentimento (mesmo quando a necessidade de aprovação foi dispensada)
- incluir o nome do comitê de ética que aprovou o estudo e o número de referência do comitê, se apropriado

Estudos envolvendo animais devem incluir uma declaração sobre aprovação ética.

Consulte nossas [políticas editoriais](#) para obter mais informações.

Se o seu manuscrito não informar ou envolver o uso de qualquer animal ou dados humanos ou tecido, indique "Não aplicável" nesta seção.

Consentimento para publicação

Se o seu manuscrito contiver os dados de cada pessoa em qualquer forma (incluindo detalhes individuais, imagens ou vídeos), o consentimento para publicação deve ser obtido dessa pessoa, ou no caso de crianças, seus pais ou responsáveis legais. Todas as apresentações de relatórios de casos devem ter consentimento para publicação.

Você pode usar seu formulário de consentimento institucional ou nosso [formulário de consentimento](#), se preferir. Você não deve enviar o formulário para nós na submissão, mas podemos solicitar uma cópia em qualquer etapa (inclusive após a publicação).

Consulte nossas [políticas editoriais](#) para obter mais informações sobre o consentimento para publicação.

Se o seu manuscrito não contém dados de qualquer pessoa, indique "Não aplicável" nesta seção.

Disponibilidade de dados e materiais

Todos os manuscritos devem incluir uma declaração "Disponibilidade de dados e materiais". As declarações de disponibilidade de dados devem incluir informações sobre onde os dados que suportam os resultados relatados no artigo podem ser encontrados, incluindo, quando aplicável, hiperlinks para conjuntos de dados arquivados publicamente analisados ou gerados durante o estudo. Por dados, queremos dizer o conjunto de dados mínimo que seria necessário interpretar, replicar e construir sobre os resultados relatados no artigo. Reconhecemos que nem sempre é possível compartilhar dados de pesquisa publicamente, por exemplo, quando a privacidade individual pode ser comprometida e, nesses casos, a disponibilidade de dados ainda deve ser indicada no manuscrito, juntamente com quaisquer condições de acesso.

As instruções de disponibilidade de dados podem levar uma das seguintes formas (ou uma combinação de mais de uma, se necessário, para conjuntos de dados múltiplos):

- Os conjuntos de dados gerados e / ou analisados durante o estudo atual estão disponíveis no repositório [NAME], [LINHAS WEB PERSISTENTES PARA DATASETES]

- Os conjuntos de dados utilizados e / ou analisados durante o estudo atual estão disponíveis a partir do autor correspondente em pedido razoável.
- Todos os dados gerados ou analisados durante este estudo estão incluídos neste artigo publicado [e seus arquivos de informações suplementares].
- Os conjuntos de dados gerados e / ou analisados durante o estudo atual não estão disponíveis publicamente devido [RAZÃO POR QUE OS DADOS NÃO SÃO PÚBLICOS], mas estão disponíveis a partir do autor correspondente em pedido razoável.
- O compartilhamento de dados não é aplicável a este artigo, pois nenhum conjunto de dados foi gerado ou analisado durante o estudo atual.
- Os dados que suportam os resultados deste estudo estão disponíveis a partir de [nome de terceiros], mas as restrições aplicam-se à disponibilidade desses dados, que foram utilizados sob licença para o estudo atual e, portanto, não estão disponíveis publicamente. Os dados são, no entanto, disponíveis pelos autores mediante pedido razoável e com permissão de [nome do terceiro].
- Não aplicável. Se o seu manuscrito não contiver nenhum dado, indique "Não aplicável" nesta seção.

Mais exemplos de declarações de disponibilidade de dados de modelo, que incluem exemplos de conjuntos de dados de acesso abertos e de acesso restrito, estão disponíveis [aqui](#) .

A BioMed Central também exige que os autores cite quaisquer dados publicamente disponíveis sobre os quais as conclusões do artigo se baseiam no manuscrito. As citações de dados devem incluir um identificador persistente (como um DOI) e idealmente devem ser incluídos na lista de referência. As citações dos conjuntos de dados, quando aparecem na lista de referência, devem incluir as informações mínimas recomendadas pelo DataCite e seguir o estilo do diário. Os identificadores de conjunto de dados, incluindo DOIs, devem ser expressos como URLs completas. Por exemplo:

Hao Z, AghaKouchak A, Nakhjiri N, Farahmand A. Conjuntos integrados de dados de monitoramento e previsão de sistemas de previsão (GIDMaPS). figshare. 2014. <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.853801>

Com o texto correspondente na declaração Disponibilidade de dados e materiais:

Interesses competitivos

Todos os interesses competitivos financeiros e não financeiros devem ser declarados nesta seção.

Veja nossas [políticas editoriais](#) para uma explicação completa dos interesses concorrentes. Se você não tem certeza se você ou algum de seus co-autores têm um interesse concorrente, entre em contato com o escritório editorial.

Use as iniciais dos autores para se referir aos interesses concorrentes de cada autor nesta seção.

Se você não tem interesses concorrentes, indique "Os autores declaram que não têm interesses concorrentes" nesta seção.

Financiamento

Todas as fontes de financiamento para a pesquisa relatada devem ser declaradas. O papel do organismo de financiamento na concepção do estudo e coleta, análise e interpretação dos dados e, por escrito, o manuscrito deve ser declarado.

Contribuições dos autores

As contribuições individuais dos autores para o manuscrito devem ser especificadas nesta seção. A orientação e os critérios de autoria podem ser encontrados em nossas [políticas editoriais](#) .

Por favor, use as iniciais para se referir à contribuição de cada autor nesta seção, por exemplo: "FC analisou e interpretou os dados do paciente sobre a doença hematológica e o transplante. A RH realizou o exame histológico do rim e foi um dos principais contribuintes na redação do manuscrito. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final."

Reconhecimentos

Por favor, reconheça qualquer pessoa que contribuiu para o artigo que não atende aos critérios de autoria, incluindo qualquer pessoa que tenha fornecido serviços ou materiais de redação profissional.

Os autores devem obter permissão para reconhecer de todos aqueles mencionados na seção Agradecimentos.

Veja nossas [políticas editoriais](#) para uma explicação completa de agradecimentos e critérios de autoria.

Se você não tem quem reconhecer, escreva "Não aplicável" nesta seção.

Autoria do grupo (para manuscritos envolvendo um grupo de colaboração): se você quiser que os nomes dos membros individuais de um grupo de colaboração sejam pesquisáveis através de seus registros individuais do PubMed, verifique se o título do grupo de colaboração está incluído na página de título e no sistema de submissão e também incluem nomes de autores colaboradores como o último parágrafo da seção "Agradecimentos". Por favor, adicione autores no formato Nome, inicialização (s) média (opcional), sobrenome. Você pode adicionar informações da instituição ou do país para cada autor, se desejar, mas isso deve ser consistente em todos os autores.

Tenha em atenção que os nomes individuais podem não estar presentes no registro do PubMed no momento em que um artigo publicado seja inicialmente incluído no PubMed, pois é necessário tomar mais tempo no PubMed para codificar esta informação.

Referências

Todas as referências, incluindo URLs, devem ser numeradas consecutivamente, entre colchetes, na ordem em que são citadas no texto, seguidas de qualquer tabela ou legenda. Os números de referência devem ser finalizados e a lista de referência totalmente formatada antes da submissão.

Exemplos do estilo de referência BioMed Central são mostrados abaixo. Certifique-se de que o estilo de referência seja seguido com precisão.

Exemplo de estilo de referência:

Artigo dentro de uma revista

Smith JJ. O mundo das ciências. *Am J Sci*. 1999; 36: 234-5.

Artigo dentro de um diário (sem números de página)

Rohrmann S, Overvad K, Bueno-de-Mesquita HB, Jakobsen MU, Egeberg R, Tjønneland A, et al. Consumo e mortalidade de carne - resulta da investigação prospectiva europeia sobre câncer e nutrição. *BMC Med*. 2013; 11: 63.

Artigo dentro de um diário de DOI

Slifka MK, Whitton JL. Implicações clínicas da produção de citocinas desreguladas. *Dig J Mol Med*. 2000; doi: 10.1007 / s801090000086.

Artigo dentro de um suplemento de revista

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Asplenia funcional: demonstração de atividade esplênica por varredura da medula óssea. *Sangue* 1979; 59 Suplemento 1: 26-32.

Capítulo do livro, ou um artigo dentro de um livro

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. A morte celular: o significado da apoptose. Em: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editores. *Revisão internacional de citologia*. Londres: Acadêmico; 1980. p. 251-306.

OnlineFirst capítulo em uma série (sem uma designação de volume, mas com um DOI)

Saito Y, Hyuga H. A equação de taxa aborda a amplificação do excesso enantiomérico e quebra de simetria quiral. *Top Curr Chem*. 2007. doi: 10.1007 / 128_2006_108.

Livro completo, autoria de

Blenkinsopp A, Paxton P. *Sintomas na farmácia: um guia para o tratamento de doenças comuns*. 3ª ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

Documento on-line

Doe J. Título do documento subordinado. Em: *O dicionário de substâncias e seus efeitos*. Royal Society of Chemistry. 1999. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Acessado em 15 de janeiro de 1999.

Banco de dados on-line

Healthwise Knowledgebase. *US Pharmacopeia*, Rockville. 1998. <http://www.healthwise.org>. Acessado em 21 de setembro de 1998.

Material complementar / página inicial privada

Doe J. Título do material suplementar. 2000. <http://www.privatehomepage.com>. Acessado em 22 de fevereiro de 2000.

Site da universidade

Doe, J. Título da pré-impressão. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html> (1999). Acessado em 25 de dezembro de 1999.

Site FTP

Doe, J. Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt> (1999). Acessado em 12 de novembro de 1999.

Site de organização

ISSN International Center: o registro ISSN. <http://www.issn.org> (2006). Acessado 20 de fevereiro de 2007.

Conjunto de dados com identificador persistente

Zheng LY, Guo XS, He B, Sun LJ, Peng Y, Dong SS, et al. Dados do genoma de sorgo doce e sorgo (*Sorghum bicolor*). Base de dados GigaScience. 2011. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.