

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA**  
**Escola Superior de Ciências da Saúde - ESA**  
**Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais - MBT**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA  
POTENCIALIDADE FARMACOLÓGICA DE  
EXTRATOS DE *CRATEVA BENTHAMII*  
(CAPPARACEAE)**

**Raimundo Carlos Pereira Junior**

**Manaus – Amazonas**  
**2005**

**RAIMUNDO CARLOS PEREIRA JUNIOR**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA POTENCIALIDADE  
FARMACOLÓGICA DE EXTRATOS DE *CRATEVA BENTHAMII*  
(CAPPARACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, pela Universidade do Estado do Amazonas.

Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Lúcia Maria Alencar Maia  
Co-Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Cecília Verônica Nuñez

Manaus – Amazonas  
2005

**RAIMUNDO CARLOS PEREIRA JUNIOR**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA POTENCIALIDADE  
FARMACOLÓGICA DE EXTRATOS DE *CRATEVA BENTHAMII*  
(CAPPARACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, pela Universidade do Estado do Amazonas.

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Utilização Sustentável dos Recursos da Biodiversidade.**

**DATA DA APROVAÇÃO:** \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA:**

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

PEREIRA JUNIOR, Raimundo Carlos

Estudo fitoquímico e avaliação da potencialidade farmacológica de extratos de *Crateva benthamii* Eichler (CAPPARACEAE) / Raimundo Carlos Pereira Junior – Manaus, 2005.

101 p.: ilustr.

Dissertação de Mestrado – UEA, 2005.

1. *Crateva benthamii*. 2. Triterpenos 3. Lupeol. 4. Germanicol. 5. Anti-fúngico. 6. Anti-bacteriano. 7. Óleo essencial. 8. Biotecnologia

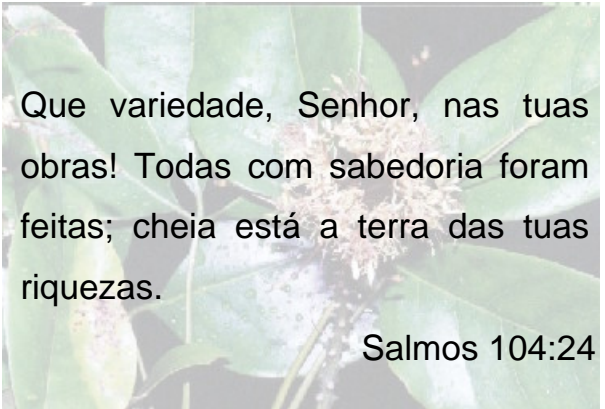
**Sinopse:**

Este trabalho apresenta o estudo fitoquímico e avaliação da potencialidade farmacológica de extratos de *Crateva benthamii* através de algumas substâncias químicas encontradas na casca e folha desta espécie.

**Palavras-chave:** 1. *Crateva benthamii*. 2. Triterpenos 3. Lupeol. 4. Germanicol. 5. Anti-fúngico. 6. Anti-bacteriano. 7. Óleo essencial. 8. Biotecnologia

## **DEDICATÓRIA**

Ao grande Deus do Universo, o Supremo Criador e Mantenedor de tudo e de todos e a minha família, dedico-lhes essa conquista como gratidão.



Que variedade, Senhor, nas tuas obras! Todas com sabedoria foram feitas; cheia está a terra das tuas riquezas.

Salmos 104:24

## AGRADECIMENTOS

- A Deus, pelo dom da vida concedido, pelo infinito amor e cuidado sempiterno que Ele cada dia demonstra para comigo.
- A Universidade do Estado do Amazonas – UEA, pela oportunidade de cursar em suas dependências um curso de tão elevada importância para o crescimento de nosso Estado.
- Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, que através da parceria existente com a UEA, forneceu materiais para a realização da pesquisa, além de permitir a utilização dos laboratórios e da Biblioteca, para a realização do presente estudo.
- A Suframa, pelos recursos financeiros empregados para a capacitação de massa crítica em nosso estado.
- As Dras. Fátima Bigi e Marlene Freitas, por todo o empenho e esforço demonstrados ao corpo de alunos do curso.
- A todo o corpo docente e administrativo do curso de Pós – Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais, por compartilharem conosco, todo o conhecimento armazenado por anos de dedicação à pesquisa e ao ensino.
- A minha Orientadora, Dra. Lúcia Alencar Maia, pela orientação, amizade, dedicação e paciência ao longo da realização do trabalho.
- A minha Co-orientadora, Dra. Cecília Verônica Nuñez, pela orientação, dedicação e pelos ensinamentos durante a realização do estudo.
- Aos Drs. Rúbens Piedade, Orlando Libório e Ézio Sargentini pela utilização do laboratório da Coordenação de Pesquisas em Produtos Naturais (CPPN) do INPA.
- Aos Drs. Massayoshi Yoshida, Sergio Nunomura e Ademir Castro, pela mão amiga em momentos precisos da pesquisa, saibam professores que vossa dedicação à ciência nos inspira a sermos bons profissionais.
- Aos meus pais, Raimundo e Zaíra, por dedicarem suas vidas a cuidar de mim, pelo amor, carinho e estímulo que me ofereceram. Aos demais

membros de nossa família: Paulo, Jorge, Fernando, Viviane, Aparecida, Dorothy e Cássia, pela paciência e cuidado que tiveram por mim, ao longo da realização deste trabalho, vossos sorrisos iluminam minha vida.

- A minha namorada Meyre Socorro, pelos momentos de compreensão, amor e apoio durante os momentos difíceis na realização deste trabalho.
- Às minhas amigas Ângela, Laura, Francisca e Hyelen, pelos conselhos, orientações, estímulo e ombro amigo nos momentos de desânimo e de tristeza. Que Jesus continue como o único guia de vossas vidas.
- Aos demais amigos do curso de mestrado, Naímy, Cynara, Vanderlita, Cilene, Anilton, Wilson, Marcelo, Jhanssem, Nora, Cléber, Cleomir, Cesário, Sônia, Suélida e Romildo.
- Aos amigos e colegas do INPA, Denny William, Madson, Érica Gomes, Rubens (Rubão), Ananias, Lúcio Batalha, Melissa, Fiorella, Leocinira, Vagner, José Guedes, Felipe e Priscila, pelo auxílio nas coletas e processamento de dados.
- A secretaria do Curso, na pessoa da Iselma da Silva Texeira, por sua presteza, cordialidade e sorriso sempre constante ao atender os alunos.
- A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADO!**

**“No final, conservaremos somente o que amamos,  
amaremos somente o que compreendemos,  
compreenderemos somente o que nos é ensinado.”**  
**(Baba Dioum)**



## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Capparaceae e sua distribuição geográfica.....	19
2.2 Morfologia das Capparaceas.....	20
2.3 Aspectos morfológicos de <i>Crateva benthamii</i> na Amazônia.....	21
2.4 Importância Sócio-econômica das Plantas Medicinais.....	23
2.5 Metabolismo Secundário.....	26
2.6 Terpenóides.....	28
2.7 Triterpenos pentacíclicos – Lupeol.....	32
2.8 Estruturas químicas e atividades biológicas do gênero <i>Crateva</i> .....	34
2.9 Óleos essenciais.....	39
2.10 Inibidores de fungos de madeira.....	42
2.11 Propriedades antimicrobianas de extratos vegetais.....	44
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	48
3.1 Materiais e métodos .....	48
3.1.1 Área de coleta de <i>Crateva benthamii</i> .....	48
3.1.2 Identificação e preparo de amostras.....	49
3.1.3 Metodologia química.....	50
3.1.3.1 Materiais.....	50
3.1.3.1.1 Equipamentos e acessórios de laboratório.....	50
3.1.3.2 Cromatografia.....	51
3.1.3.3 Métodos espectroscópicos.....	52
3.1.3.3.1 RMN.....	52
3.1.3.3.2 CG/EM.....	53
3.1.3.4 Reagentes e Solventes.....	53
3.1.3.4.1 Extração por solventes.....	53
3.1.3.4.2 Cálculo de Teores extrativos.....	55
3.1.3.5 Fracionamento cromatográfico do extrato diclorometano.....	55
3.1.3.6 Extração do Óleo essencial das folhas.....	56
3.1.3.6.1 Análise do óleo essencial das folhas secas de <i>C. benthamii</i> .....	57
3.1.4 Metodologia de ensaios biológicos.....	58
3.1.4.1 Materiais.....	58
3.1.4.1.1 Equipamentos e acessórios de laboratório.....	58
3.1.4.2 Preparação do meio de cultura para testes antifúngicos.....	59
3.1.4.2.1 Inoculação dos fungos xilófagos.....	60
3.1.4.2.2 Avaliação da ação fungitóxica das soluções extrativas.....	60

3.1.4.2.3 Tratamento estatístico.....	61
3.1.4.2.3.1 Teste F, comparação de médias.....	61
3.1.4.2.3.2 Teste T , observações pareadas.....	61
3.1.4.3 Determinação da atividade antibacteriana.....	61
3.1.4.3.1 Preparação das cepas bacterianas utilizadas.....	62
3.1.4.3.2 Preparo do extrato para uso microbiológico.....	62
3.1.4.3.3 Ensaio microbiológicos “in vitro”.....	63
3.1.4.3.4 Procedimentos dos ensaios microbiológicos.....	63
3.1.4.3.5 Método de difusão disco-placa.....	63
3.1.4.3.6 Método de difusão cavidade placa.....	64
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
4.1 Rendimento extrativo.....	65
4.2 Ensaio antibacteriano.....	65
4.3 Ensaio antifúngico.....	66
4.4 Análise do óleo essencial.....	70
4.5 Análise por RMN <sup>13</sup> C do extrato diclorometânico.....	73
4.6 Análise por RMN <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H da fração CB1.14 do extrato diclorometânico.....	76
4.7 Análise por RMN <sup>1</sup> H da frações CB1.30 do extrato diclorometânico.....	77
5 CONCLUSÕES.....	78
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
7 ANEXOS: ESPECTROS DE RMN DE <sup>13</sup> C E <sup>1</sup> H.....	90

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Família Capparaceae e os principais gêneros.....	20
Tabela 2.	Atividades biológicas do Lupeol.....	33
Tabela 3.	Metabólitos secundários isolados em espécies de <i>Crateva</i> : a classe de substância, a estrutura molecular, a substância isolada e as atividades biológicas dos metabólitos isolados...	35
Tabela 4.	Propriedades farmacológicas de alguns óleos essenciais.....	41
Tabela 5.	Extrato da casca de <i>C. benthamii</i> : valores de rendimento do extrato (R) e a quantidade de material moído (S).....	65
Tabela 6.	Velocidade de crescimento micelial do fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i> em função do tempo.....	69
Tabela 7.	Índice de retenção de Kovat's e porcentagem por área dos cromatogramas de íons totais identificados no óleo essencial de folhas de <i>C. benthamii</i> .....	70
Tabela 8.	Estruturas químicas e atividades biológicas das substâncias identificadas no óleo.....	71
Tabela 9.	Dados de RMN <sup>13</sup> C do extrato diclorometânico de <i>C. benthamii</i> .....	74

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Distribuição geográfica da família Capparaceae.....	19
Figura 2.	<i>Cleome hasleriana</i> (detalhe da flor).....	21
Figura 3.	<i>Capparis grandipetala</i> (detalhe da flor e do fruto).....	21
Figura 4.	Árvore de <i>Crateva benthamii</i> .....	21
Figura 5.	Inflorescência de <i>Crateva benthamii</i> .....	22
Figura 6.	Fruto maduro de <i>Crateva benthamii</i> .....	22
Figura 7.	Mesocarpo e sementes de <i>Crateva benthamii</i> .....	23
Figura 8.	Diferentes fontes de agentes terapêuticos.....	25
Figura 9.	Esquema da biossíntese dos terpenos.....	30
Figura 10.	Fungo causador da podridão parda.....	43
Figura 11.	Fungo causador da podridão branca.....	43
Figura 12.	Imagem de satélite da Ilha da Marchantaria.....	49
Figura 13.	Crescimento micelial do <i>Pycnoporus sanguineus</i> em diferentes concentrações do extrato bruto de <i>Crateva benthamii</i> .....	67
Figura 14.	Crescimento micelial do <i>Pycnoporus sanguineus</i> na concentração de 0,1 g/mL.....	68
Figura 15.	Relação linear do avanço micelial em função do tempo de crescimento nas várias concentrações de extrato de <i>C. benthamii</i> .....	69
Figura 16.	Germanicol.....	75

## RESUMO

*Crateva benthamii* (Capparaceae), espécie arbórea, comum em áreas de várzea da Amazônia, pode alcançar de 6 a 12 m de altura. Há relatos da utilização de suas cascas, pelos povos ribeirinhos da Amazônia, como anti-sépticas e contra o veneno de cobra; das raízes e das folhas como tônicas, para problemas do estômago e de uso tópico como auxiliares na recuperação do reumatismo. Objetivando avaliar as potencialidades farmacológicas e biotecnológicas dos extratos de *C. benthamii*, este estudo relata os resultados obtidos na avaliação do extrato metanol/água (80:20) das cascas de *C. benthamii* nos testes antifúngicos contra o fungo xilófago *Pycnoporus sanguineus*; dos extratos metanol/água (80:20) e diclorometano das cascas, nos testes antibacterianos contra as espécies *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella london*, *Shigella sonni*, *Shigella paratyphi*, *Shigella tryphimurium*, bem como a caracterização das substâncias que compõem o óleo essencial extraído de sua folhas. O extrato metanol/água (80:20) nos ensaios antibacterianos se mostrou ativo para a espécie de bactéria *Staphylococcus aureus* na concentração de 1,20 mg/mL tanto pelo método de difusão cavidade placa (CP) quanto pelo método de disco placa (DP), enquanto que o extrato diclorometano não se mostrou ativo para nenhuma das espécies de bactérias estudadas. No ensaio onde se avaliou a atividade antifúngica do extrato contra *P. sanguineus*, o extrato metanol/água mostrou atividade inibitória moderada do crescimento micelial do fungo na concentração de 0,1 g/mL, dados estatísticos mostraram que o aumento da concentração pode levar a uma completa inibição do crescimento micelial. A análise do espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^{13}\text{C}$  do extrato diclorometano apresentou Lupeol e o Germanicol como triterpenos majoritários e o fracionamento cromatográfico deste resultou no isolamento e identificação do Lupeol, além de uma substância não identificada que se mostrou na forma de um óleo de coloração amarelada, com odor agradável, cujo espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  sugere que seja um éster de  $\alpha$ -amirina. Na análise por CG/EM do óleo essencial, identificaram-se oito substâncias sendo o *trans*-cariofileno um dos compostos majoritários.

## ABSTRACT

*Crateva benthamii* (Capparaceae), a common tree species in the Amazonian floodplain areas, may reach from 6 to 12 m in height. There are reports on it being used by the people inhabiting the riverside, on account of its bark being used as antiseptic and against snake poison, its roots and leaves being used as tonics for stomachic problems and its topical use as auxiliaries in the recovery of the rheumatism. Aiming to evaluate the pharmacological and biotechnological potentialities of the *C. benthamii* extracts, the present study reports on the findings obtained on the evaluation of the methanol/water extract (80:20) of the *C. benthamii* bark, on the antifungal tests against the xylophagous fungus *Pycnoporus sanguineus* and on the methanol/water (80:20) and dichloromethane extracts of the bark on the antibacterial tests against species *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella london*, *Shigella sonni*, *Shigella paratyphi*, *Shigella tryphimurium*, as well as the characterization of the substances that compose the essential oil extracted of its leaves. The methanol/water extract (80:20) on the antibacterial assays showed to be active to *Staphylococcus aureus* bacterium species on 1.20 mg/mL concentration both by plate cavity diffusion (CP) as plate discus (DP) method, while the dichloromethane extract did not show activity for others bacteria studied. On the assay to evaluate the antifungal extract activity against *P. sanguineus* the methanol/water extract on the concentration of 0,1 g/mL showed moderate inhibitor activity on micelial growth. Statistical data showed that the concentration increase may inhibit micelial growth. The  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum analyses of the dichloromethane extract showed Lupeol and Germanicol as majority triterpenes. Chromatographic fraction resulted on the Lupeol isolation and identification in addition to another not identified substance similar to yellowish-coloured oil, with a pleasant odour, whose  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum suggests being a  $\alpha$ -amirin ester. In the essential oil CG/EM analysis eight substances were identified, with the *trans*-caryophyllene being one of the major compounds.

## INTRODUÇÃO

Estima-se que o Brasil seja detentor de 20% de todo o patrimônio genético da biodiversidade mundial (PINTO et al., 2002). O país possui a maior diversidade genética vegetal do mundo, são cerca de 55 mil espécies vegetais, 22% do total registrado no planeta (DIAS, 1996; PINTO et al., 2002).

De um total aproximado de 250 mil espécies de plantas superiores no mundo, cerca de 100 mil crescem na América Latina (SIQUEIRA, 2001). Estima-se que, na Amazônia Legal, crescem, no mínimo, 30 mil espécies vasculares (GENTRY, 1982; SIQUEIRA, 2001) incluídos todos os hábitos de crescimento, árvores, arbustos, ervas, cipós, hemiepifitas, epífitas e parasitas, sendo sem dúvida, um das regiões com o maior potencial genético florístico do planeta (MAIA, 2001). Inúmeras drogas em uso clínico no mundo são derivadas de produtos naturais da Amazônia (HOSTETTMANN, QUEIROZ e VIEIRA, 2003).

A espécie estudada (*Crateva benthamii* Eichler) é típica das florestas de várzea e abundante no Amazonas (KLINGE, ADIS e WORBES, 1995; WALDORFF & MAIA, 2000; MAIA & CHALCO, 2002). A medicina popular utiliza o extrato das

folhas aplicando externamente contra reumatismo, suas raízes e flores são consideradas tônica e estomáquica (MORS, RIZZINI & PEREIRA, 2000) e a entrecasca é utilizada contra o veneno de cobra (ALBUQUERQUE, 1989; MORS, RIZZINI & PEREIRA, 2000; VIEIRA, 1992).

Desde tempos remotos a humanidade aprendeu a utilizar as propriedades biológicas das plantas, na cura de doenças ou mesmo como veneno. Muitos dos componentes químicos destas plantas foram identificados, posteriormente, como substâncias ativas, através do estudo químico detalhado da planta (SCHENKEL, GOSMANN & PETROVICK, 2003). O estudo químico consiste em isolar o principal componente da planta, elucidar sua estrutura química, caracterizar suas propriedades e então obter derivados com maior índice de similaridade estrutural com o produto natural que apresente as propriedades desejáveis, podendo assim chegar ao desenvolvimento de um novo fármaco (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998; MONTANARI & BOLZANI, 2001).

O conhecimento preciso e acurado das propriedades físico-químicas é de importância fundamental num estudo químico farmacológico (PINTO et al., 2002). Muitos laboratórios de Produtos Naturais têm inserido dentro de suas rotinas de isolamento, purificação e elucidação estrutural, diversos ensaios biológicos simples, no intuito de selecionar e monitorar o estudo fitoquímico de extratos de plantas na procura de substâncias bioativas (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998, HOSTETTMANN, QUEIROZ & VIEIRA, 2003). Várias espécies vegetais são capazes de fornecer substâncias, importantes para a fabricação de produtos



farmacêuticos e nutricionais, ou constituem uma parte integrante dos sistemas vitais dos quais dependemos (BRISKIN, 2000; SIMÕES & SCHENKEL, 2001).

Estudos mostraram que o gênero *Crateva* apresenta algumas espécies que podem ser utilizadas como antiinflamatório, anti-bacteriana, inseticida e na redução de leucócitos (MORS, RIZZINI & PEREIRA, 2000; GEETHA, VARALAKSMI & LATHA, 1998). Da casca de *C. benthamii* foi extraído com éter de petróleo e isolado o triterpeno lupeol (AYNILIAN, FARNSWORTH & PERSINOS, 1972), substância esta freqüentemente encontrada em vegetais e que tem sido estudada pelos seus efeitos inibidores, atuando como anticorpo e mediador celular de respostas imunológicas (JUNGES et al. 2000; MONTE, OLIVEIRA & FILHO, 2001; PATOCKA, 2003).

Segundo Patočka (2003) terpenóides são um amplo grupo de compostos naturais com considerável significância prática. No dia-a-dia, encontramos direta ou indiretamente vários terpenóides, tais como mono e sesquiterpenos componentes de óleos essenciais, os quais contribuem para o aroma das plantas.

Triterpenos de diferentes tipos estão presentes em todas as plantas superiores, são compostos extremamente importantes na defesa do vegetal, como exemplos de importância ecológica podem ser citados, os quassinóides, as cucurbitacinas, que servem de defesa contra herbívoros e as saponinas que são tóxicas para os animais de sangue frio (ROBBERS, SPEEDIE & TYLER, 1997).

Há um crescente interesse em triterpenos naturais gerado pelo amplo espectro de atividades biológicas a eles relacionadas. Os triterpenos são bactericidas, fungicidas, anti-viral, citotóxicos, analgésicos, anti-câncer, espermicidas e antialérgicos. Recentemente vários estudos têm sido realizados com três compostos deste grupo, especialmente: lupeol, ácido betulínico e betulina (PATOCKA, 2003; ROBBERS, SPEEDIE & TYLER, 1997; ZUCO et al., 2002).

Apesar do recente interesse pelo lupeol, motivado pelas propriedades biológicas a ele associadas, ressalta-se que, muitos estudos ainda necessitam ser realizados para o melhor conhecimento deste composto e verificação de sua presença em vegetais no Brasil. Neste contexto, um grande número de espécies amazônicas que apresentam valores nutricionais, farmacológicos e econômicos agregados a seus produtos e subprodutos, ainda permanecem desconhecidas, ficando o seu conhecimento e benefícios limitados a poucas comunidades ou grupos indígenas, detentores durante milênios de um vasto conhecimento.

Assim, em decorrência da demanda de informações sobre o lupeol e suas potencialidades de utilização, buscou-se neste trabalho realizar o estudo fitoquímico e avaliar a potencialidade farmacológica dos extratos de *C. benthamii*, através da extração do lupeol com solvente diclorometano e metanol de cascas do tronco; a caracterização química do óleo essencial das folhas; como também, verificar por meio de ensaios preliminares a atividade biológica do extrato como inibidor de fungos (*Pycnoporus sanguineus*) e bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella london*, *Shigella sonni*, *Shigella paratyphi*, *Shigella tryphimurium*).

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Capparaceae e sua Distribuição Geográfica.

A família Capparaceae é composta por aproximadamente 50 gêneros e 700 espécies, ocorrendo nos Trópicos e Subtrópicos de ambos os hemisférios e no Mediterrâneo (Fig. 1). É representada no Brasil por aproximadamente 9 gêneros e 46 espécies. (RIBEIRO, 1999). Na tabela 1 estão representados os principais gêneros.

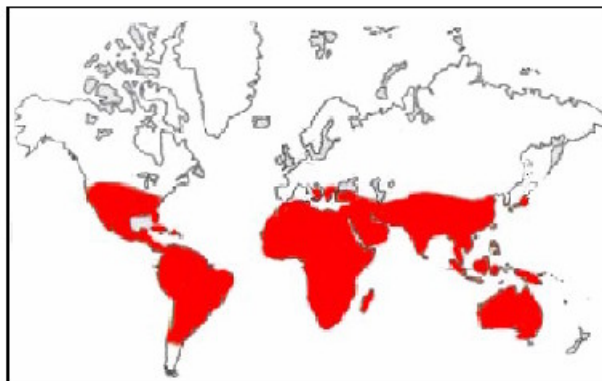


Figura 1: Distribuição geográfica da família Capparaceae  
Fonte: Guia de Consultas Botânicas II, 2004.

Tabela 1

Família Capparaceae e os principais gêneros.

CAPPARACEAE		
GÊNEROS		
<i>Apophyllum</i> F.Muell.	<i>Cristatella</i> Nutt.	<i>Oxystylis</i> Torr. & Frem.
<i>Atamisquea</i> Miers	<i>Dactylaena</i> Schrad.	<i>Pentadiplandra</i> Baill.
<i>Bachmannia</i> Pax	<i>Dhofaria</i> A.G.Mill.	<i>Podandrogynne</i> Ducke
<i>Beautempsia</i> Gaudich.	<i>Dipterygium</i> Decne.	<i>Poilanedora</i> Gagnep.
<i>Belencita</i> H.Karst.	<i>Euadenia</i> Oliv.	<i>Polanisia</i> Raf.
<i>Borthwickia</i> W.W.Sm.	<i>Forchhammeria</i> Liebm.	<i>Puccionia</i> Chiov.
<i>Boscia</i> Lam.	<i>Haptocarpum</i> Ule	<i>Ritchiea</i> R.Br. ex G.Don
<i>Buchholzia</i> Engl.	<i>Isomeris</i> Nutt.	<i>Setchellanthus</i> Brandegees
<i>Buhsia</i> Bunge	<i>Koeberlinia</i> Zucc.	<i>Steriphoma</i> Spreng.
<i>Cadaba</i> Forssk.	<i>Maerua</i> Forssk.	<i>Stixis</i> Lour.
<i>Capparis</i> L.	<i>Morisonia</i> L.	<i>Thilachium</i> Lour.
<i>Cladostemon</i> A.Braun & Vatke	<i>Neothorelia</i> Gagnep.	<i>Tirania</i> Pierre
<i>Cleome</i> L.	<i>Neocalyptrocalyx</i>	<i>Wislizenia</i> Engelm.
<i>Cleomella</i> DC.	<i>Niebuhrria</i> DC.	.
<i>Crateva</i> L.	<i>Oceanopapaver</i> Guillaumin	

FONTE: Royal Botanic Gardens, Kew, 2004.

## 2.2 Morfologia das Capparaceas

A família inclui espécies herbáceas, arbustivas, arbóreas, raramente lianas, com folhas geralmente alternas, simples e palmadamente compostas. As flores são vistosas, com sépalas e pétalas livres, de coloração verde, amarela, branca, rosa ou lilás, com gineceu crescendo sobre um ginóforo (haste alongada segurando o pistilo). Os frutos são siliquis, bagas, cápsulas ou drupas (RIBEIRO et al., 1999).



Figura 2: *Cleome hasleriana*  
(detalhe da flor)



Figura 3: *Capparis grandipetala*  
(detalhe da flor e do fruto)



Dentre os grupos de substâncias químicas encontradas na família Capparaceae há relatos que indicam a presença de glucosinolatos, glicosídeos cianogênicos, alcalóides, saponinas e o triterpeno lupeol (GIBBS, 1974).

### 2.3 Aspectos morfológicos de *C. benthamii* na Amazônia

*Crateva benthamii* Eichler popularmente conhecida como caravari, catoré, trapiá, catauarí, catauré, tapiá, cotore, treriá é uma árvore de 6 a 12 m de altura, cujo habitat é a mata de várzea, podendo eventualmente ser encontrada no igapó. A sua distribuição geográfica na Amazônia abrange as florestas do Peru e Brasil (MAIA, 2001). A figura 4 apresenta a árvore adulta na fase terrestre da floresta inundada.



Figura 4: Árvore de *C. benthamii*.  
Foto: Maia, 2001

A espécie apresenta como características anatômicas folhas alternas, digitadas, trifolioladas, pecíolo com cerca de 11,0 cm de comprimento e inflorescência em corimbo terminal com pétalas lanceoladas, cremes, ginóforo e filete roxos e cálice verde. A figura 5 mostra a inflorescência com flores e botões.



Figura 5: Inflorescência de *Crateva benthamii*.  
Foto: Maia, 2001

Seu fruto é uma baga que apresenta forma globosa, com pontuações brancas, com cerca de 9 cm de comprimento e 8 cm de largura. Suas sementes são escuras, globosas, possuem de 0,8 a 1,0 cm de diâmetro com testa dura e lenhosa. As figuras 6 e 7 apresentam o fruto maduro, o mesocarpo e as sementes, respectivamente.



Figura 6: Fruto maduro de *C. benthamii*  
Foto: Maia, 2001

Foi observado que *C. benthamii* floresce entre julho e novembro, frutifica de outubro a julho e apresenta o máximo de frutificação entre abril e julho.



Figura 7: Mesocarpo com sementes de *C. benthamii*  
Foto: Maia, 2001

Algumas espécies de peixes como, por exemplo, a Matrinxã (*Brycon cephalus*), o Pacu (*Metynnis sp.*, *Mylesinus sp.*, *Myleus sp.*, *Mylossoma sp.*) e o Tambaqui (*Colossoma macropomum*) se alimentam com os frutos de *C. benthamii*.

## 2.4 Importância Sócio-econômica das Plantas Medicinais

As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos, contudo, estudos indicam que somente 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos metabólitos (GARCIA et al, 1996). Uma análise de dados já obtidos revela que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (SOEJARTO, 1996).

A biodiversidade de plantas medicinais da Amazônia tem importância sócio-econômica para a região, dados etnobotânicos revelam que foram catalogadas mais de 300 espécies de fitoterápicos (REVILLA, 2000). Estas plantas são usadas popularmente contra doenças infecciosas e parasitárias, vetores, problemas crônico-degenerativos, emagrecimento, regulação da menstruação, procedimento abortivo e como antídoto ao veneno de cobra.

As plantas medicinais se apresentam como único recurso terapêutico para uma grande parcela da população brasileira e de mais de 2/3 da população mundial, sendo que o mercado mundial de fitoterápicos movimenta cerca de US\$ 22 bilhões anualmente, sendo um dos setores que a cada ano ganha mais adeptos. (PINTO et al., 2002)

Dados revelam que no período de 1983-1994, 6% dos medicamentos aprovados mundialmente foram extraídos diretamente de vegetais, 24% foram de produtos derivados e 9% foram desenvolvidos através da modelagem molecular, onde a estrutura molecular dos compostos isolados servia de protótipos nos processos de sínteses químicas. (ALVES, 2001)



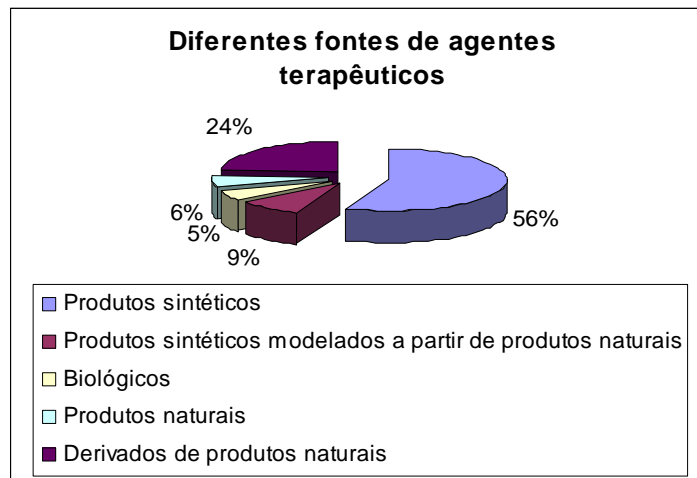


Figura 8: Diferentes fontes de agentes terapêuticos  
 Fonte: Cragg et al., 1997

Um terço dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo foram desenvolvidos a partir de produtos naturais e que no caso das drogas anticancerígenas e dos antibióticos esse percentual atinge cerca de 70 % (CRAIG, NEWMAN & SNADER, 1997).

Em termos financeiros o custo de produção de fitomedicamentos é sem dúvida alguma muito mais viável, como é expresso pelo texto:

Comparado ao desenvolvimento de um novo medicamento sintético, que envolve vultosas somas de recursos (cerca de US\$ 350 milhões a US\$ 800 milhões e cerca de 10 a 15 anos de pesquisa), o desenvolvimento de um fitomedicamento requer muito menos recursos, e também menor tempo de pesquisa. Com base no vasto conhecimento popular já existente para o uso de muitas plantas medicinais, estima-se que os custos para o desenvolvimento de um fitomedicamento (fitoterápicos) não devem ultrapassar 2 a 3% daquele previsto para o desenvolvimento de um novo medicamento sintético (CALIXTO, 2004).

Se considerarmos a imensa biodiversidade brasileira podemos facilmente afirmar que as potencialidades de uso das plantas medicinais encontram-se longe

de estarem esgotadas, tal fato é ressaltado nas palavras de Schenkel, Gosmann & Petrovick (2003):

Novos conhecimentos e novas necessidades certamente encontrarão no reino vegetal, soluções através da descoberta e desenvolvimento de novas moléculas com atividade terapêutica, ou com aplicações na tecnologia farmacêutica ou no desenvolvimento de fitoterápicos com maior eficiência de ação.

## **2.5 Metabolismo Secundário**

Denomina-se Metabolismo Secundário o conjunto de reações químicas que ocorrem no interior de cada célula, reações essas direcionadas por enzimas específicas que dão origem as denominadas rotas metabólicas, nos vegetais em especial, as substâncias químicas formadas (metabólitos) podem ser divididas em dois grandes grupos (SANTOS, 2003).

No primeiro grupo encontram-se as substâncias que são produzidas, degradadas ou até mesmo transformadas com a função de suprir diretamente as necessidades vitais da espécie (energia e macromoléculas celulares). Ao segundo grupo pertencem as que são produzidas, transformadas ou acumuladas não necessariamente relacionadas às necessidades vitais, mas que garantem vantagens na sobrevivência e na manutenção da espécie (SANTOS, 2003). Ao primeiro grupo de substâncias, denomina-se de Metabólitos primários e ao segundo grupo de Metabólitos secundários ou Metabólitos especiais (GOTTLLIEB et al. 1996).

Uma outra forma de diferenciar-se o metabolismo primário do metabolismo secundário é quanto a sua distribuição nos vegetais, enquanto o metabolismo

primário é distribuído universalmente nos vegetais, ou seja, todos os vegetais realizam tais reações, o metabolismo secundário não apresenta distribuição universal, de acordo com a necessidade de cada espécie (fatores bióticos e abióticos) as substâncias produzidas serão diferenciadas, tal característica pode ser utilizada inclusive em estudos taxonômicos (quimiosistemática) onde cada espécie vai apresentar uma ou mais substâncias características da família ou grupo taxonômico ao qual pertence. (GOTTLIEB, 2003)

Por serem fatores de interação entre organismos os metabólitos especiais frequentemente apresentam atividades biológicas interessantes (ELISABETSKY & SOUZA, 2003). Sua importância comercial reside em três grandes áreas: a farmacêutica, a nutracêutica e as aplicações industriais diversas (PERES, 2003).

Na farmacêutica os metabólitos especiais têm demonstrado sua importância pelo fato de que tais substâncias podem ser empregadas como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos e como fonte de matérias – primas farmacêuticas para a fabricação de fitofármacos ou de fitoterápicos (SIMÕES & SCHENKEL, 2003).

O que se tem observado é que os metabólicos secundários responsáveis pela defesa do vegetal através de atividade citotóxica contra patógenos podem ser utilizados na medicina como agentes antimicrobianos, os que atuam através de atividades neurológicas, podem ser empregados como anestésicos, antidepressivos ou sedativos (BRISKIN, 2000).

A nutracêutica, área que combina a nutrição com a prevenção de doenças, setor emergente que se ocupa na busca dos alimentos funcionais, encontra nos metabólitos especiais muitas substâncias com propriedades antioxidantes que são capazes de prevenir várias doenças (PERES, 2003).

Quanto às aplicações industriais podem-se citar exemplos da utilização dos metabólitos especiais, no setor de cosméticos, que emprega os denominados óleos essenciais, que nada mais são do que uma mistura de metabólitos secundários com baixo peso molecular e por isso muito voláteis, obtidos a partir da extração por arraste a vapor de partes dos vegetais (SIMÕES & SPITZER, 2003), substâncias essas muito apreciadas por seus aromas e propriedades biológicas, até o setor de corantes naturais, que também se beneficia das propriedades organolépticas de determinadas substâncias para dar tonalidades de cor a seus produtos (ARAÚJO, 2001).

## **2.6 Terpenóides**

Os terpenóides são definidos como substâncias naturais cuja estrutura pode ser dividida em unidades de isopreno ( $C_5H_8$ ), tais unidades são biogeneticamente formadas a partir do acetato por via do ácido mevalônico ou pela via mais recentemente descoberta denominada de mevalonato–independente ou via dioxilulose fosfato, que provavelmente é a mais utilizada na natureza (ROBBERS, SPEEDIE & TYLER 1997; CROTEAU, KUTCHAN & LEWIS, 2000; DEWICK, 2002).

Segundo Robbers, Speedie & Tyler (1997) o número aproximado de terpenóides isolados de compostos naturais é cerca de 20 mil, um número muito alto se comparado ao de qualquer outra classe de compostos de produtos naturais. O mesmo autor expressa a importância biológica dos terpenóides da seguinte forma:

Os terpenóides vegetais têm papel proeminente nas discussões sobre ecologia química, pois desempenham funções importantes como fitoalexinas, insetifugos, repelentes de insetos, agentes de atração polínica, agentes de defesa contra herbívoros, feromônios, aleloquímicos, hormônios vegetais e moléculas de sinalização.

Santos (2003) descreve o processo inicial da biossíntese dos terpenos a partir do acetato pela via do ácido mevalônico com as seguintes palavras:

O mevalonato é formado da condensação de uma unidade de acetoacetil-CoA com uma molécula de acetil-CoA. Após a condensação aldólica, ocorre uma hidrólise originando a 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) que é reduzida a mevalonato, numa reação irreversível, a redução da HMG-CoA depende do fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) e é catalisado pela HMGCoA-redutase. O mevalonato é então convertido em isopentenil-pirofosfato (IPP), ou *isopreno ativo*, a unidade básica na formação dos terpenos e esteróides.

Por sua vez Rohdich, Hecht, Bacher & Eisenreich (2003) descrevem o processo de formação dos precursores dos terpenos a partir da via do mevalonato-independente ou via dioxixulose fosfato da seguinte forma:

O piruvato reage com D-gliceraldeído 3-fosfato que após um processo de descarboxilação gera o 1-dioxi-D-xilulose-5-fosfato que mediante a ação de NADPH se transforma em 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato que após isso é convertido em 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato pela ação de enzimas específicas. O ciclo difosfato é reduzido em 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato que pode ser convertido em IPP.

A figura 9 mostra a biossíntese dos terpenos, o isopreno é representado no esquema seguinte como uma unidade básica. A junção de uma unidade de isopreno

ou isopentenilpirofosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil-pirofosfato (DMAPP) forma o geranylpirofosfato (GPP), que é o precursor dos monoterpenos. Quando mais uma unidade de IPP é acoplada gera o farnesilpirofosfato (FPP), que é o precursor dos sesquiterpenos. A adição de mais um IPP a um FPP origina o geranylgeranylpirofosfato (GGPP), sendo este o precursor dos diterpenos. A junção de duas unidades de FPP gera os triterpenos e de duas unidades de GGPP gera os tetraterpenos (SANTOS, 2003)

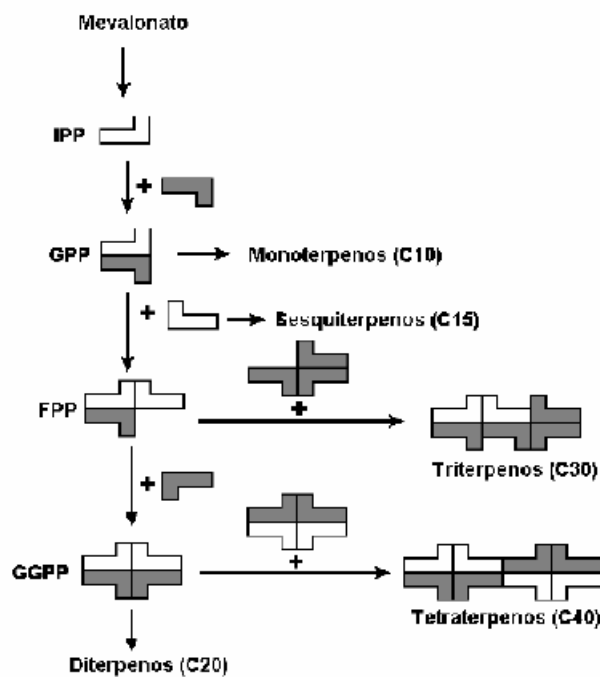


Figura 9: Esquema da biossíntese dos terpenos

As plantas possuem mecanismo que possibilitam a ocorrência das duas vias metabólicas para a formação de terpenos, contudo, as enzimas da via do ácido mevalônico estão localizadas no citosol e as da via da dioxixilulose fosfato estão localizadas nos cloroplastos. Por isso, triterpenos e esteróides (produtos citosolicos) são formados pela via do ácido mevalônico e os outros terpenóides formados nos cloroplastos são originados da via da dioxixilulose fosfato (DEWICK, 2002).

Atualmente são conhecidos mais de mil monoterpenos, e devido às características de volatilidade e odor pungente, estas substâncias são bastante procuradas pelas indústrias de cosméticos e de alimentos. Contudo, a subclasse de terpenos mais abundantes é a dos sesquiterpenos, sendo os mesmos bastante difundidos no reino vegetal, alguns inclusive, de origem marinha. Os sesquiterpenos apresentam variadas atividades biológicas relatadas, dentre elas podemos citar a atividade antimicrobiana e antitumoral, sendo alguns muito tóxicos para os mamíferos (ROBBERS, SPEEDIE & TYLER, 1997; CROTEAU, KUTCHAN & LEWIS, 2000). Dentre os primeiros sesquiterpenos isolados de fontes naturais estavam o  $\beta$ -cadineno e o  $\beta$ -cariofileno.

Os diterpenos não são voláteis e podem ser encontrados tanto em vegetais, quanto em fungos, organismos marinhos e alguns insetos. Em geral são tóxicos aos herbívoros, contudo, são detentores de muitas atividades biológicas, como por exemplo, a atividade anticancerígena demonstrada pelo taxol, a atividade reguladora de crescimento vegetal das giberelinas e a atividade inseticida dos ácidos resínicos da madeira de coníferas. (CROTEAU, KUTCHAN & LEWIS, 2000).

Os triterpenos em sua grande maioria são constituídos por álcoois que quando combinados com açúcares formam glicosídeos, como é o caso das saponinas. Os que se apresentam na forma livre são componentes de resinas, do látex ou da cutícula das plantas (CROTEAU, KUTCHAN & LEWIS, 2000; ROBBERS, SPEEDIE & TYLER, 1997). Podem ser classificados dentro desse grupo os esteróides ( $C_{27}$ ), que são formados nos estágios finais da biossíntese dos triterpenos, onde pequenos fragmentos contendo carbono podem ser retirados para

formar compostos com menos de 30 átomos de carbono (ROBBERS, SPEEDIE & TYLER, 1997).

Os triterpenos atualmente são bastante procurados em decorrência de suas propriedades como inseticidas (limonóides), como interruptores da metamorfose de insetos (fitoecdisonas) ou como medicamentos (glicosídeos) (ROBBERS, SPEEDIE & TYLER, 1997).

Os carotenóides são substâncias bastante difundidas na natureza, são responsáveis por algumas das cores amarelas, vermelhas, alaranjadas e púrpuras observadas em muitos seres vivos, atualmente são conhecidos em torno de 600 carotenóides naturais e é grande o potencial do mercado para o uso de carotenóides pela indústria de alimentos, ração animal, cosméticos e agentes farmacêuticos (ROBBERS, SPEEDIE & TYLER, 1997; DEWICK, 2002).

## **2.7 Triterpenos Pentaciclíco: Lupeol**

Os triterpenos pentaciclícos segundo seu esqueleto básico podem ser divididos em três grupos principais:  $\beta$  – amirina (Oleananos),  $\alpha$  – amirina (Ursanos) e Lupeol (Lupanos). No lupeol a estereoquímica entre os anéis A/B, B/C, C/D e D/E é *trans*, além disso, o seu quinto anel é formado por 5 carbonos, não possuindo estrutura hexagonal como nos outros triterpenos. Outros tipos de grupos mais raramente encontrados incluem: friedelano, taraxastano e hopano (SCHENKEL, GOSMANN & ATHAYDE, 2003). A tabela 2 mostra as atividades biológicas do lupeol.



**Tabela 2**

Atividades biológicas do Lupeol

Atividade Biológica	Referência
Antiinflamatório (inibidor seletivo da proteína cAK)	HASMEDA et al, 1998.
Antiinflamatório e antiartrite (inibidor da peroxidação de lipídios)	GEETHA, VARALAKSMI & LATHA, 1998.
Antiurólítica (anticalciúria e antioxálúria)	ANAND et al., 1995.
Citotóxica (inibidor da topoisomerase II) para os tumores Hep-GZ, A-431 e H411E	MORIARITY, 1998.
Antiinflamatório (inibidor seletivo da Serina protease)	RAJIC et al., 1999.
Citotóxica ( contra as linhagens de células Vero, B <sub>16</sub> F <sub>10</sub> e Hep-2)	BADAMI et al., 2003.
Antiinflamatório e antiartrite (teste em edema de pata, granuloma e artrite induzida)	AGARWAL, 2003.

Segundo Moreno (2004) em termos biológicos os triterpenos são importantes na manutenção da fluidez da membrana celular, além de participarem como elementos nas ceras epicuticulares (defesa) e quando estão glicosilados (saponinas) podem funcionar como agentes emulsificadores (transporte).

Enquanto agentes de defesa da planta, os triterpenos são importantes por que os insetos dependem de esteróides para seu processo de muda, contudo, são incapazes de biosintetizar esteróides, por isso, são completamente dependentes da ingestão de precursores de esteróides em sua dieta. Como os triterpenos são descarboxilados até a formação dos esqueletos dos esteróides e apresentam uma parte da estrutura semelhante, por isso não podem ser distinguidos pelos receptores

de esteróides das células do inseto e ao ingerirem tais triterpenos estes se mostram extremamente tóxicos para muitas espécies de insetos (BOLILLA 9, 2003).

## **2.8 Estruturas Químicas e Atividades biológicas do gênero *Crateva*.**

De acordo com Aynilian, Farnsworth & Persinos (1972) o extrato de *Crateva religiosa* apresenta atividade antidiarréica e inseticida e a população das Philipinas o utiliza contra ataques convulsivos, há relatos que na África a casca é empregada como estimulante de apetite e na Índia como laxante. Lorenzi (2003) e Aynilian, Farnsworth & Persinos. (1972) afirmam que o extrato de *Crateva tapia* apresenta atividade cardiorespiratória e oxitóxica, além de que sua casca é utilizada como amargo-tônica e febrífuga e que índios da Amazônia Ocidental, consideram o chá de suas folhas um estomáquico muito eficaz, além de utilizarem a seiva da planta contra dores reumáticas. Por sua vez Geetha et al. (1998) e Anand et al. (1995) mostram que o extrato de *Crateva nurvala* apresenta atividades antiinflamatória, antiartrite, laxativa, antihelmintico, antipirético e antiurolítica.

A tabela 3 mostra os metabólitos secundários isolados em espécies de *Crateva*, a classe de substâncias, a estrutura molecular, a substância isolada e as atividades biológicas dos metabólitos isolados.

**Tabela 3**

Metabólitos secundários isolados em espécies de *Crateva*: a classe de substância, a estrutura molecular, a substância isolada e as atividades biológicas dos metabólitos isolados.

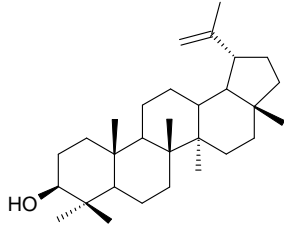
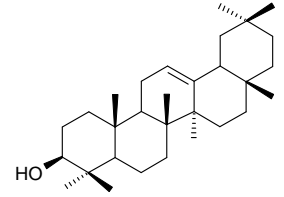
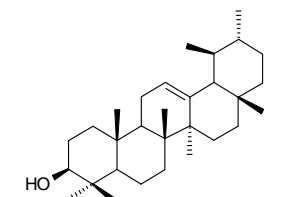
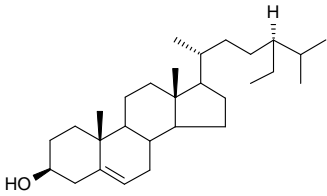
Espécie	Classe de Substância	Estrutura molecular	Substância Isolada	Atividade biológica
<i>C. nurvala</i>	Terpenóides		lupeol	Ver Tab. 2
			$\beta$ -amirina	Atividade anticancerígena contra o Sarcoma 180 (MARQUES et al., 2002).
			$\alpha$ -amirina	Atividade anticancerígena contra sarcoma UMR 106 (MONTE, OLIVEIRA & BRAZ FILHO, 2001; SETZER & SETZER, 2003)
	Esteróides		$\beta$ -sitosterol	Redução dos níveis de colesterol do sangue e redução da dilatação da próstata (hiperplasia prostática) (LIMA, 2005; OVESNA, VACHALKOVA & HORVATHOVA, 2004; LÁSZLÓ, 2005)

Tabela 3 – Cont.

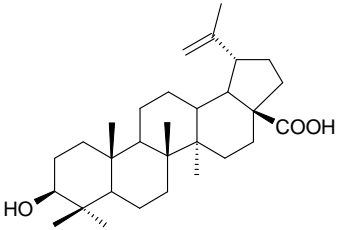
Espécie	Classe de Substância	Estrutura molecular	Substância Isolada	Atividade biológica
<i>C. tapia</i>	Terpenóides	Ver <i>C. nurvala</i>	lupeol	Ver Tab. 2
		Ver <i>C. nurvala</i>	$\beta$ -amirina	Ver <i>C. nurvala</i>
			ácido betulínico	Atividade antitumor, atividade antiviral <i>in vitro</i> contra o HIV (PATOCKA, 2003).

Tabela 3 – Cont.

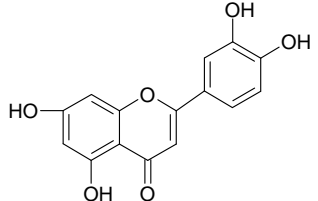
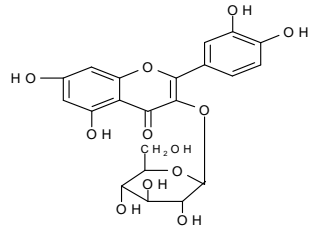
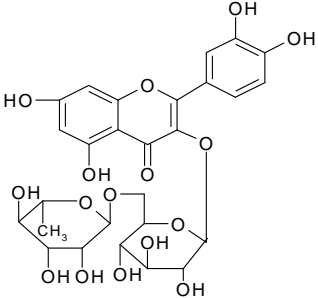
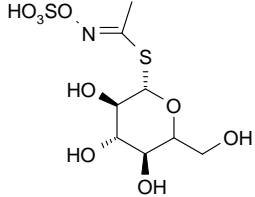
Espécie	Classe de Substância	Estrutura molecular	Substância Isolada	Atividade biológica
<b><i>C. religiosa</i></b>	Terpenóide	<b>Ver <i>C. nurvala</i></b>	<b>lupeol</b>	<b>Ver Tab. 2</b>
	Esteróides	Ver <i>C. nurvala</i>	$\beta$ -sitosterol	Ver <i>C. nurvala</i>
	<b>Flavonóides</b>		<b>quercetina</b>	Atividade virucida contra vírus envelopados: vírus herpético simples do tipo 1, vírus respiratório sincial, pseudo-raiva, parainfluenza 3 e sinbis (KAUS, MIDDLETON & OGRA, 1985; MUSCI & PRAGA, 1985), atividade antioxidante (LARSON, 1988), antiinflamatória (DUWIEJUA & ZEITLIN, 1993), antimicrobiana e antiúlcera (BEIL et al., 1995), e antitumoral (FORMICA & REGELSON, 1995), Atividade moluscicida sobre a <i>Biomphalaria glabrat</i> (CARVALHO, 2005).
		<b>isoquercitrina</b>	Antiviral (MUCSI e PRAGAI, 1985).	
		<b>rutina</b>	Antioxidante (LARSON, 1988), usada no tratamento de fragilidade capilar (ROBBERS, SPEEDIE e TYLER, 1997), Atividade moluscicida sobre a <i>Biomphalaria glabrat</i> (CARVALHO, 2005).	

Tabela 3 – Cont.

Espécie	Classe de Substância	Estrutura molecular	Substância Isolada	Atividade biológica
<i>C. roxburghii</i>	Terpenóide	Ver <i>C. nurvala</i>	lupeol	Ver Tab. 2
			<b>glucocaparina</b>	Comunicação inter-espécies, que abrangem desde repelência química até estimulação da ovoposição (DHAR et al., 1996; FRANCIS et al., 2001), irritante local e emético, externamente, é rubefaciente e vesicante (MITHEN et al., 2000).

## 2.9 Óleos essenciais

A International Standard Organization (ISO) define óleos voláteis ou essenciais como os produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos (SIMÕES & SPITZER, 2003).

O que se tem observado é que dependendo da família botânica os óleos essenciais podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como pêlos capilares (Lamiaceae), células parenquimais modificadas (Piperaceae), tubos oleaginosos chamados *vittae* (Apiaceae), ou canais lisígenos ou esquizógenos (Pinaceae, Rutaceae), podendo ainda ser formados diretamente pelo protoplasma, pela decomposição da camada de resina da parede celular, ou pela hidrólise de certos glicosídeos (ROBBERS, SPEEDIE & TYLER, 1997)

As substâncias químicas que compõem os óleos essenciais podem ser quimicamente classificadas em dois grandes grupos, com base na biossíntese que lhes deu origem: derivados de fenilpropanóides, formados através da via ácido chiquímico, e derivados de terpenos, formados da via da dioxilulose fosfato (DEWICK, 2002). Segundo Simões & Sptizer (2003) os derivados de terpenóides são as substâncias que preponderam.

Todos os órgãos de uma planta podem acumular óleos essenciais, contudo, sua composição pode variar de acordo com a localização, por isso,

óleos essenciais obtidos de diferentes órgãos de uma mesma planta podem apresentar composição bem distintas (SIMÕES & SPITZER, 2003).

Cabe ressaltar que óleos obtidos de um mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal, podem apresentar composição química variável, de acordo com a época de coleta, condições climáticas e de solo (SIMÕES & SPITZER, 2003)

Segundo Teuscher *apud* Simões & Spitzer (2003) “a composição química de um óleo volátil de uma planta é determinada geneticamente, sendo geralmente específica para um determinado órgão e característica para o seu estágio de desenvolvimento”.

A importância biológica de tais óleos está nas propriedades que os mesmos apresentam como inibidores da germinação, na proteção contra predadores, na atração de polinizadores, na proteção contra a perda de água e aumento da temperatura, entre outras (CRAVEIRO & MACHADO; HARBORNE *apud* SIMÕES & SPITZER, 2003)

Economicamente, tais óleos são bastante procurados pelas indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêuticos. A indústria de alimentos busca em tais óleos produtos que poderiam ser empregados como aromatizantes de alimentos, de bebidas ou como condimentos. Já a indústria de cosméticos, tem como alvo principal, produtos que poderiam ser usados na fabricação de perfumes e produtos de higiene. A indústria farmacêutica, por sua vez, visa



aproveitar as propriedades farmacológicas que tais óleos possuem (ROBBERS, SPEEDIE & TYLER, 1997; SIMÕES & SPITZER, 2003). As propriedades farmacológicas de alguns óleos estão bem estabelecidas, e podem ser verificadas na tabela 4.

Tabela 4  
Propriedades farmacológicas de alguns óleos essenciais

PROPRIEDADES	AÇÃO	ESPÉCIE VEGETAL
Carminativa	Anestesia sobre a cárdia, provocando a expulsão do ar do trato gastrointestinal.	Funcho, Erva-doce, Camomila, Menta.
Antiespasmódica	Relaxamento da musculatura lisa intestinal, diminuindo ou suprimindo cólicas.	Camomila, Macela, Alho, Sálvia.
Estimulante do apetite	Estimula a produção de secreções do aparelho digestivo	Gengibre, Genciana, Zimbro.
Cardiovascular	Aumento do ritmo cardíaco e da pressão arterial.	Sálvia, Canforeira.
Age sobre o SNC	Estimulante, convulsivo em doses elevadas.	Losna, Erva-de-santa-maria, Sálvia, Canela
Anestésico local	Analgésico local.	Cravo-da-índia.
Antiinflamatório	Antiinflamatório.	Camomila
Anti-séptico (uso externo)	Inibe o crescimento de bactérias e fungos.	Cravo-da-índia

FONTE: Simões e Spitzer, 2003.

## 2.10 Inibidores de fungos de madeira

Na Amazônia encontram-se as maiores reservas de florestas tropicais do planeta, e devido a isso, o desenvolvimento da atividade madeireira tem crescido de forma acelerada, fazendo com que a região seja o maior produtor de madeira processada (GERWING et al, 2001). Pesquisas mostram que as exportações brasileiras de madeira e manufaturas, só no ano de 2000, alcançaram US\$ 1,478 milhões. Sendo que essa quantia supera em 6,3 % as exportações do setor no ano anterior (MDIC, 2000).

Os estoques de madeiras possuem importância econômica para a Amazônia e para o Brasil e é essencial controlar a sua degradação causada por fungos (xilófagos) e por térmitas (JESUS, 2003). Dentre os fungos, destacam-se os causadores da podridão branca e da podridão parda, distinguidos por Oliveira (1986):

Os causadores da podridão parda são capazes de degradar, principalmente a celulose e a hemicelulose, resultando na perda da resistência e a madeira tende a colapsar parcialmente. Os fungos da podridão branca possuem um sistema enzimático que os tornam capazes de degradar, particularmente a lignina e ou celulose e hemicelulose, sendo que a madeira torna-se esponjosa, fibrosa ou laminada e com coloração esbranquiçada.



Figura 10: Fungo causador da podridão parda



Figura 11: Fungo causador da podridão branca

Tratamentos preservantes de madeira tem sido a melhor forma de combater os fungos xilófagos, contudo, tem se procurado produtos que aliem fatores como: eficiência, economia, segurança, adaptabilidade à mudança de resistência dos fungos e preservação ambiental, ou seja, produtos preservativos alternativos e ecológicos (JESUS, 2003)

Com vista a alcançar tais produtos é que constituintes bioativos, isolados de madeiras altamente resistentes, produtos não madeireiros e de fungos com atividade antifúngica e, ou térmitas não tóxicos ao meio ambiente, vêm sendo explorados e propostos como preservantes ou agentes no tratamento preventivo e efetivo aos fungos xilófagos (JESUS, 2003).

De acordo com McChesney *apud* Jesus (2003) a importância dos produtos naturais reside no fato que tais produtos apresentam grande diversidade estrutural, além de que suas moléculas relativamente pequenas apresentam múltiplas propriedades farmacológicas e biotecnológicas.

O que se sabe é que dependendo da espécie de madeira a ser trabalhada, irão se encontrar diferentes níveis de suscetibilidade a insetos e fungos. A família Burseraceae, por exemplo, apresenta espécies altamente resistentes a fungos e por isso, seus constituintes químicos são bastante pesquisados como fungicidas, seu perfil químico mostra claramente a presença de terpenos, lignanas e flavonóides, e se atribui a tais substâncias a propriedade biológica demonstrada por seus membros (JESUS et al., 1994; KHALID, 1983).

### **2.11 Propriedades antimicrobianas de extratos vegetais**

A descoberta de substâncias que apresentam atividades antimicrobianas ou antibióticas representa talvez, um dos maiores avanços da Farmacoterapia das últimas cinco décadas (LIMA, 2001; ROBBERS, SPEEDIE & TYLER, 1997). Pois através de tais substâncias pôde-se fazer o controle efetivo de muitos microorganismos patogênicos que durante muitos anos provocaram e provocam a incapacidade prolongada ou a morte de seres humanos, micróbios que nunca fizeram restrições de faixa etária, situação financeira, ou estado de saúde da pessoa contaminada (ROBBERS, SPEEDIE & TYLER, 1997).

Para que uma determinada substância seja classificada como um antibiótico, a mesma deve possuir as seguintes propriedades: atividade letal ou inibitória contra microorganismos, prevenir o desenvolvimento de microorganismos resistentes, ausência de efeitos indesejáveis ao hospedeiro, estabilidade química, entre outras (AMATO NETO et al., 1994).

A título de esclarecimento, atualmente os termos antibiótico e antimicrobiano podem ser usados indiferentemente, sem considerações sobre a origem do composto, podendo ser ela, oriunda de seres vivos, microorganismos ou vegetais, como também aqueles sintetizados em laboratório (ROBBERS, SPEEDIE & TYLER, 1997; AMATO NETO et al., 1994)

As plantas através da produção de metabólitos secundários desenvolvem vários compostos, com propriedades de importância vital para a espécie vegetal que a produz. Dentre essas propriedades tem-se a de defesa contra predadores, como fungos, bactérias, vírus, parasitas, insetos, moluscos e animais superiores (HAENEN, 1985), que uma vez estudada pode vir a ser empregada em benefício do homem. Contudo, devido a muitos problemas associados ao uso de diversos antibióticos o conhecimento sobre determinadas espécies vegetais com propriedades antimicrobianas têm sido revisto e ampliado (RECIO et al., 1989).

Recio et al. (1989) fizeram uma avaliação concreta sobre a atividade antimicrobiana de extratos, óleos essenciais e de substâncias obtidas de

plantas contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e espécies fúngicas, tal avaliação destaca a atividade antibiótica demonstrada pelos óleos essenciais, alcalóides, cumarinas, triterpenos, citral, mirceno, timol, xantanol e ácido caurênico.

Sabe-se que a partir de 1940 iniciaram-se os trabalhos relacionados à atividade antimicrobiana de plantas e até 1970, grande parte desses trabalhos referia-se apenas as propriedades antimicrobianas de extratos brutos ou totais (LIMA, 2001).

Contudo, há a necessidade de estudos mais aprofundados nesses trabalhos com extratos vegetais, estudos que visem tanto à determinação de compostos ativos, quanto à observação da existência de efeitos sinérgicos que expliquem a atividade antimicrobiana dos mesmos. Uma vez que os agentes antimicrobianos podem manifestar sua atividade através de vários mecanismos, tais como: lesão da parede celular, alterações da permeabilidade celular, alterações das moléculas de proteínas e ácidos nucléicos e inibição da síntese de ácidos nucléicos (LIMA, 2001)

As propriedades bacteriostáticas e bactericidas, e fungistáticas e fungicidas a partir de produtos vegetais, são geralmente estudadas, avaliadas e confirmadas através de ensaios biológicos “*in vitro*” – testes de susceptibilidade ou sensibilidade. Tais ensaios são técnicas padronizadas, que incluem os métodos de diluição em tubos e difusão em meio sólido – disco, cavidade ou cilindro (MIMS et al., 1995; AMATO NETO et al., 1994)

Para a espécie vegetal *Crateva benthamii*, ainda não há estudos científicos que relatem à confirmação de propriedades antimicrobianas, entretanto, os povos ribeirinhos utilizam à infusão das folhas como anti-séptico de uso local.

## PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 3.1 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1.1 Área de coleta de *C. benthamii*

O material foi coletado na Ilha da Marchantaria, localizada no lago do Camaleão (AM), rio Solimões, no município de Iranduba, aproximadamente 20 km da cidade de Manaus, na Amazônia Central, 3°15' Sul e 59°58' Oeste (Figura 12). A vegetação é denominada de floresta de várzea e tem como principal característica a flutuação cíclica dos rios, que podem atingir até 14 m, entre as estações de seca e enchente, provocando com isso inundações periódicas de grandes áreas ao longo de suas margens (JUNK, 1993). Tais flutuações provocam uma série de adaptações em plantas, animais e nas próprias populações humanas que vivem nestes ecossistemas (JUNK, 1993; FERREIRA, 2004).



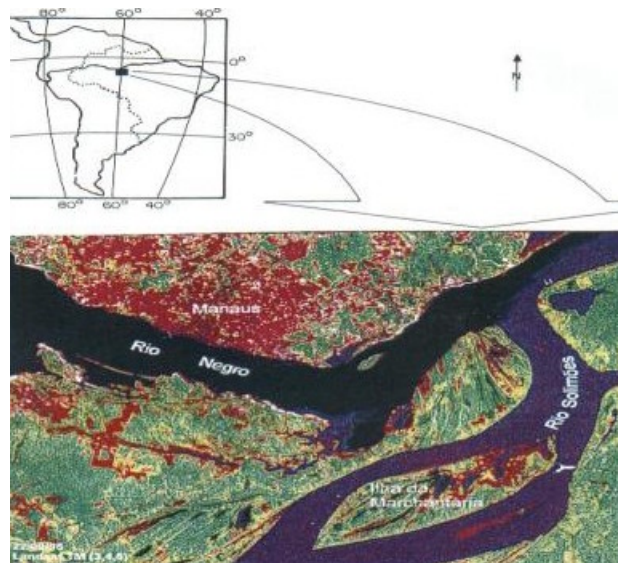


Figura 12: Imagem de satélite da Ilha da Marchantaria.  
Fonte: INPE, IMAGEM LANDSAT TM; 05.12.1999.

### 3.1.2 Identificação e preparo das amostras

Foram coletadas amostras férteis de *C. benthamii* para a identificação taxonômica, através de comparação com material no Herbário INPA (Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia) e uma exsicata foi incorporada ao acervo do referido herbário, sob o registro no 16.118. As amostras de casca para as análises químicas foram secas em estufa a 35 °C com circulação forçada (estufa ventilada) Mod.-320-SE-FANEM por 72 horas. As cascas foram moídas em moinho de facas, para obtenção do material vegetal em pó.

### **3.1.3 METODOLOGIA QUÍMICA**

#### **3.1.3.1 Materiais**

##### **3.1.3.1.1 Equipamentos e Acessórios de Laboratório**

Os equipamentos e acessórios abaixo citados foram empregados durante a realização do trabalho:

- Balanças analíticas e semi – analíticas.
  - Mettler – Toledo Modelo AB204
  - Quimis – Modelo QISA 210
- Evaporador rotativo Fisatom 802, modelo 550.
- Banho ultra-som (Cleaner – Thornton)
- Cabine de UV modelo CC – 20 (Ultra-violet products Chromato – VUE).
- Liofilizador marca Christ modelo Beta 1-8 K.
- Moinho de facas
- Chapa de aquecimento
- Aplicador de sílica tipo “Camag” para preparação de placas comparativas
- Estufa

### 3.1.3.2 Cromatografia

- Cromatografia em camada delgada comparativa (CCD): foram realizadas em dois tipos de placas de vidro.
  1. Para a preparação de 12 placas de vidro com tamanho de 5 x 10 cm, utilizou-se 30g sílica gel 60 G - F<sub>254</sub> da Merck e 60 mL de água destilada, a mistura foi agitada com bastão de vidro até não existirem mais bolhas no interior do gel. Esta mistura foi aplicada com espalhador (graduado para a espessura de camada igual a 0,25 mm) nas placas bem limpas (desengorduradas) e niveladas. Após evaporação da água em temperatura ambiente, foram aquecidas e ativadas a 120 ° C em estufa por 2 horas.
  2. As cromatoplasmas comparativas em fase normal preparadas sobre folhas de alumínio e cortadas para tamanho de 5 x 5 cm, de sílica gel com indicador de fluorescência F<sub>254</sub> foram adquiridas da empresa Merck.
- Cromatografia de adsorção em coluna aberta (CCA): para fracionar em coluna cromatográfica os extratos e as frações, foi utilizada como fase estacionária sílica gel 60 (70 – 230 mesh) da Merck. A coluna foi empacotada por via úmida, com o cuidado de sempre se evitar a formação de bolhas e rachaduras. Isso foi evitado por que se adicionou primeiro o eluente à sílica

para em seguida preencher à coluna. A proporção utilizada para a relação amostra / sílica foi de 1:10 para a primeira separação do extrato e de 1:30 para os fracionamentos subseqüentes. Utilizou-se coluna de vidro com um pequeno pedaço de algodão na extremidade inferior, para evitar o escoamento da sílica. Após a coluna ser empacotada adicionou-se a amostra dissolvida no menor volume possível do primeiro eluente e foi colocado um pedaço de algodão na extremidade superior da coluna para se evitar a agitação do material à medida que se fosse adicionando o eluente.

- Revelação das placas de CCD: para visualização das substâncias presentes nos extratos e frações aplicadas nas placas cromatográficas foram utilizados: luz UV (254 nm e 365 nm); vapor de iodo a temperatura ambiente; solução de sulfato cérico ( $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ ) - que após nebulização sobre a placa a mesma foi aquecida até a observação de manchas sobre a placa e vapor de hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) à temperatura ambiente.

### **3.1.3.3 Métodos Espectroscópicos**

#### **3.1.3.3.1 Ressonância Magnética Nuclear - RMN**

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foram registrados no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, em espectrômetros Bruker AC200 operando, respectivamente, a 200 e 50,3 MHz e Varian Inova-300 operando, respectivamente, a 300 e 75 MHz, utilizando como solvente  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna, os deslocamentos químicos são registrados em ppm.

### **3.1.3.3.2 CG/EM**

Os espectros de massas, foram obtidos na Central Analítica do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA), empregando um sistema CG/EM da Shimadzu, modelo QP2010 (quadrupolo), com sistema de ionização por impacto de elétrons (70 ev).

### **3.1.3.4 Reagentes e Solventes**

Os solventes empregados na extração do material vegetal e nas técnicas de separações cromatográficas de CCD e CCA, foram de grau de pureza P.A. Os solventes utilizados na análise do óleo essencial por CG/ EM, foram de grau de pureza HPLC, todos da marca Merck.

#### **3.1.3.4.1 Extração por Solventes**

O material vegetal foi pesado e dividido em três vidros de Mariotte, acrescentando-se em seguida o solvente diclorometano aos frascos, até que o volume do solvente cobrisse o material vegetal, ficando em torno de 5 cm acima. Em seguida os vidros foram colocados em banho ultra-som por 20 min, depois de decorrido esse tempo o líquido obtido foi filtrado em algodão para um erlenmeyer (1000 mL) e o processo repetido por 3 vezes consecutivas sempre fazendo a adição de solvente aos frascos que continham o material vegetal pulverizado.

O extrato obtido apresentou uma coloração turva, devido à presença de partículas sólidas dispersas no líquido que após algum tempo precipitaram, clareando a coloração do extrato. Devido à presença desse precipitado o extrato foi novamente filtrado, porém, em papel de filtro com uma pequena porção de algodão ao fundo.

Após esse processo o extrato foi concentrado no evaporador rotativo, a uma temperatura branda (40 °C) e uma rotação de 60 rpm. O material concentrado foi então recolhido em um vidro de boca larga para facilitar a evaporação total do solvente dentro da capela.

Para se efetuar a extração com a mistura de solventes Metanol – Água (8:2), colocou-se o material vegetal presente no Mariotte para secar dentro dos próprios frascos e em seguida acrescentou-se um volume da mistura metanol/água (8:2) suficiente para além de submergir o material, formar uma camada de aproximadamente 5 cm acima do material vegetal.

Após a aplicação de ultra-som, por processo idêntico ao descrito nos parágrafos anteriores, o material foi filtrado e o extrato concentrado até o menor volume possível, após isso, o volume obtido foi recolhido em frascos e colocado para solidificar no congelador, para em seguida ser levado ao liofilizador, onde seria retirada a água presente no sistema, o volume de líquido presente em cada frasco a ser levado ao liofilizador não deve ultrapassar um terço do volume do frasco.

#### **3.1.3.4.2 Cálculo de Teores Extrativos ( T.E )**

Utilizou-se a fórmula  $T.E (\%) = R / S \cdot 100$ , para expressar a porcentagem de teores extrativos obtidos nos processos de extração, e onde **R** = rendimento do extrato e **S** = quantidade de material moído.

#### **3.1.3.5 Fracionamento cromatográfico do extrato de diclorometano**

Uma fração do extrato de diclorometano (10,0038 g) foi fracionada através de CCA, em uma coluna de vidro com 32 cm de comprimento e 3,2 cm de diâmetro, empacotada com sílica gel 60 (100 g) com gradiente de Hexano/Acetato de etila.

Foram recolhidas quarenta e nove frações de 250 mL, que após concentração em evaporador rotativo, foram analisadas por CCD empregando diversos sistemas de eluentes, sendo as placas reveladas com luz ultravioleta (254 e 365 nm), vapores de iodo,  $Ce(SO_4)_2$  e  $NH_4OH$ .

Após análise cromatográfica por CCD das frações recolhidas, as mesmas foram reunidas de acordo com as respostas cromatográficas semelhantes, resultando num total de vinte frações resultantes.

### 3.1.3.6 Extração de óleo essencial das folhas

O óleo essencial de *C. benthamii* foi extraído de folhas secas. As folhas foram coletadas na Ilha da Marchantaria, no período da manhã (03.12.2004). A área de coleta não estava alagada.

As folhas foram selecionadas, evitando-se as que estavam necrosadas, atacadas por insetos ou apresentavam contaminação por fungos. Estas foram secas à temperatura ambiente, separadas do pecíolo, picotadas e pesadas. Utilizou-se 74 g de folhas seca, que foram colocadas em um balão de fundo redondo (1000 mL) e adicionado água destilada até que o volume de água estivesse nivelado ao volume de folhas presentes no balão. Acrescentou-se ao balão 3 pedaços de cerâmica porosa, para que a ebulição dentro do balão fosse regular. Deixou-se o sistema de hidrodestilação em ebulição por 4 h.

Após decorrido as 4 horas o óleo foi separado do hidrolato em um funil de separação, através da adição de pentano (2 alíquotas de 50 mL). A fase aquosa foi desprezada e a fase composta por óleo/pentano foi rotaevaporada em condições brandas para eliminação de uma parte do solvente, sendo acrescentado em seguida Sulfato de sódio anidro para eliminação da água residual. O restante do solvente foi evaporado em temperatura ambiente.



### 3.1.3.6.1 Análise do óleo essencial das folhas secas de *C. Benthamii*.

Para a análise do óleo essencial das folhas secas de *C. benthamii* foram utilizadas as seguintes condições experimentais: Temperatura do Injetor igual a 240 °C, com uma programação da temperatura de 60 °C - 240 °C (3 °C/min), a temperatura da interface igual a 230 °C, o fluxo de gás na coluna igual a 1 mL/min, o gás de arraste foi Hélio (He), o modo de injeção foi Split com uma razão de 1/20 e o volume injetado foi de 1 µL. A coluna capilar utilizada foi uma DB-5MS (25m x 0,25mm; 0,25µm filme) 95% dimetil e 5% difenil polisiloxano, fase apolar.

A análise qualitativa das substâncias foi realizada através do cálculo do índice de retenção de Kovat's ( $IR_k$ ) que comparado ao registrado na literatura (ADAMS, 1995) e Pino, Marbot e Rosado (2002). O padrão de hidrocarboneto utilizado ( $C_8 - C_{20}$ ) para coinjeção com a amostra é da marca Fluka.

$$IR_k = 100. n ((TR_{subs} - TR_{hidant}) / (TR_{hidpost} - TR_{hidant})) + 100. n^o C_{hidant}$$

Onde:

$IR_k$  = Índice de retenção de Kovat's

n = Diferença entre o número de Carbonos imediatamente anterior e posterior a substância que se quer determinar

$TR_{subs}$  = Tempo de retenção da substância

$TR_{hidant}$  = Tempo de retenção do hidrocarboneto anterior

$TR_{hidpost}$  = Tempo de retenção do hidrocarboneto posterior

$n^o C_{hidant}$  =  $n^o$  de carbonos do hidrocarboneto anterior

### **3.1.4 METODOLOGIA DE ENSAIOS BIOLÓGICOS**

#### **3.1.4.1 Materiais**

##### **3.1.4.1.1 Equipamentos e Acessórios de Laboratório**

Os equipamentos e acessórios abaixo citados foram empregados durante a realização do trabalho:

- Balanças analíticas e semi – analíticas.
  - Mettler – Toledo Modelo AB204
  - Quimis – Modelo QISA 210
- Chapa de aquecimento
- Câmara de fluxo laminar
- Estufa
- Autoclave
- Placas de Petri

### 3.1.4.2 Preparação do Meio de Cultura para testes antifúngicos

Dissolveu-se 20 g de malte (Acumedia), 20 g de agar agar puro (Vetec), 20 g de Dextrose anidra P.A (Dinâmica) e ½ cápsula de ampicilina (500 mg da Medquímica), empregada para inibir o crescimento de bactérias, em um erlenmeyer completando-se o volume para 1000 mL de água destilada. A mistura foi aquecida em chapa e agitada com bastão de vidro até sua completa dissolução.

Utilizou-se um tampão feito com algodão envolto em papel alumínio e fixado com fita crepe, apropriada para autoclave. O recipiente com o material foi colocado em autoclave vertical (CS – Primatec) para esterilizar o meio de cultura a 120° C, por 15 min., e deixado para esfriar até uma temperatura adequada para manuseio.

Após isso, em câmara asséptica (Câmara de fluxo laminar – Quimis, mod. Q-216F21) três alíquotas de 60 mL do meio de cultura foram transferidas para erlenmeyers de 100 mL onde foram acrescentados quantidades distintas (6, 0,6 e 0,06g) do extrato metanol-água (8:2) da casca do tronco de *C. benthamii*, sendo a concentração final de cada meio de cultura igual a 0,1; 0,01; 0,001 g/mL, respectivamente.

Em seguida, 20 mL de cada mistura foram vertidos em placas de Petri, previamente esterilizadas. Os tratamentos do tipo inteiramente

casualizados foram realizados em triplicata. A testemunha consistiu de meio sem o acréscimo de extrato.

#### **3.1.4.2.1 Inoculação dos fungos xilófagos**

Solidificado o meio de cultura, à temperatura ambiente, inoculou-se no centro da placa de Petri, cerca de 10 mm de micélio do fungo PIC 07 (*Pycnoporus sanguineus*), em ambiente estéril. O mesmo procedimento foi usado para as culturas-testemunha, onde inoculou-se o fungo em placas contendo somente o meio de cultura original, isto é, sem solução extrativa.

Após essa etapa, as placas de Petri foram vedadas com fita Parafilm e deixadas à temperatura ambiente ( $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) por um período de 8 dias.

#### **3.1.4.2.2 Avaliação da ação fungitóxica das soluções extrativas**

A avaliação do crescimento fúngico foi feita pela mensuração do diâmetro da fronteira micelial. As medidas foram tomadas em uma única direção, comparando-se à cultura – testemunha. Essas medições foram feitas todos os dias, em um horário fixo, durante o período estipulado.

### **3.1.4.2.3 Tratamento Estatístico**

#### **3.1.4.2.3.1 Teste F, comparação das médias**

Para a comparação das médias de crescimento micelial no teste antifúngico através de cálculos estatísticos, utilizou-se o **teste F**, que é feito através de uma análise de variância, que separa a variabilidade devido aos 4 tratamentos (0,1 g/mL; 0,01 g/mL; 0,001 g/mL e Testemunha) empregados da variabilidade residual, isto é, devido ao acaso (VIEIRA, 1980).

#### **3.1.4.2.3.2 Teste T, observações pareadas**

O teste T para observações pareadas foi empregado para testar o efeito dos tratamentos aplicados, contudo, somente as médias de crescimento micelial da concentração 0,1 g/mL do extrato metanol-água (80:20) foi utilizada, uma vez que apresentava um efeito inibidor visível no crescimento micelial do fungo, com isso comparou-se as médias de crescimento da concentração 0,1 g/mL com as médias de crescimento da amostra testemunha, a um nível de significância de 5%.

#### **3.1.4.3 Determinação da atividade antibacteriana**

Os ensaios para determinação de atividade bacteriana foram realizados pela Coordenação de Pesquisa em Ciências da Saúde – CPCS do INPA.

Foram utilizadas as seguintes cepas bacterianas da coleção de bactérias do laboratório de microbiologia de alimentos do INPA: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella london*, *Shigella sonni*, *Shigella paratyphi*, *Shigella tryphimurium* .

#### **3.1.4.3.1 Preparação das cepas bacterianas utilizadas**

As cepas bacterianas utilizadas foram inoculadas em 3 mL de caldo de nutriente em um tubo de ensaio estéril. Em seguida, adicionou-se a cepa bacteriana previamente cultivada. O tubo de ensaio foi incubado a temperatura de 37<sup>0</sup> C por 24 horas. Após esse período, as cepas bacterianas foram utilizadas nos testes microbiológicos. O conteúdo do tubo de ensaio deve corresponder ao tubo n<sup>o</sup> 5 da escala de Mac Farland, caso a turbidez não seja correspondente ao tubo de escala, pode-se ajustar, utilizando-se água destilada ou caldo de nutriente.

#### **3.1.4.3.2 Preparo do extrato para uso Microbiológico**

Dos extratos, foram testadas as solubilidades em solventes orgânicos e inorgânicos, para adicionar o veículo de inoculação (DMSO,H<sub>2</sub>O). Para o biomonitoramento, os extratos ou substâncias químicas isoladas foram testados, numa mesma concentração e os percentuais de mortalidades foram comparados.

### **3.1.4.3.3 Ensaio Microbiológicos “IN VITRO”**

Para a determinação “*in vitro*” da atividade antibacteriana dos extratos, foram utilizados métodos difusão disco-placa (Antibiograma) e difusão cavidade-placa de acordo com Bauer.

Para todos os testes foram utilizados os meios de cultura Mueller Hinton (Difco), o caldo nutritivo (Merck) e disco de controle bacteriano (Sensibiodisc–Cecon). Os Solventes utilizados foram o DMSO (Dimetilssulfoxido) para os extratos hidrofóbicos e água destilada para os extratos hidrofílicos.

### **3.1.4.3.4 Procedimentos dos ensaios microbiológicos.**

Em placa de Petri estéreis, com auxílio de uma micropipeta, foram colocados 150 µL do inóculo bacteriano, adicionando-se 15 mL de meio de cultura fundido. Homogeniza-se vigorosamente a placa de Petri durante alguns minutos, mantendo-a em repouso até a solidificação. Cada teste foi repetido pelo menos três vezes contra cada microorganismo, evitando dúvidas nos resultados quanto à presença de atividade antibacteriana.

### **3.1.4.3.5 Método de difusão disco – placa.**

Os extratos foram testados pelo método do antibiograma que consiste em discos de papéis estéreis com dimensão de 8 mm de diâmetro, contendo

1,20 mg/mL dos extratos testados. Com auxílio de uma pinça estéril, são colocados sobre a placa em pontos eqüidistantes tendo ao centro o disco de papel industrializado servindo como controle do crescimento bacteriano. A placa é invertida e incubada em estufa microbiológica à temperatura de 37° durante 24 horas.

#### **3.1.4.3.6 Método de difusão cavidade-placa**

Os testes realizados pela difusão cavidade-placa, foram realizados com auxílio de um sistema composto por uma pipeta Pasteur estéril conectada em sua extremidade com pêra de plástico sugadora, através deste sistema de sucção, os orifícios foram formados em placa em pontos eqüidistantes, os quais, posteriormente, foram inoculados os extratos vegetais. Ao centro da placa, coloca-se o disco controle, a placa não é invertida e é incubada à temperatura de 37° C durante 24 h. Após este período, foram realizadas leituras das placas, obtendo-se os primeiros resultados.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 RENDIMENTO EXTRATIVO

A tabela 5 apresenta os valores de rendimento de cada extrato (R) e a quantidade de material moído (S) utilizado.

Tabela 5

Extrato da casca de *C. benthamii*: valores de rendimento do extrato (R) e a quantidade de material moído (S).

Solvente	R (g)	S (g)	% T.E
Diclorometano	11,378	678,873	1,676
Metanol/Água (8:2)	25,0899	678,873	3,696

### 4.2 ENSAIO ANTIBACTERIANO

Na concentração testada (1,20 mg/mL) o extrato diclorometano da casca de *C. benthamii* se mostrou inativo para as cepas de bactérias empregadas no ensaio antibacteriano (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia*

*coli* , *Salmonella london* ,*Shigella sonni*, *Shigella paratyphi* , *Shigella tryphimurium*). Contudo, o extrato metanol – água (80:20) das cascas de *C. benthamii* se mostrou ativo frente a espécie *Staphylococcus aureus*, tanto pelo método de difusão cavidade placa (CP) quanto pelo método de disco placa (DP).

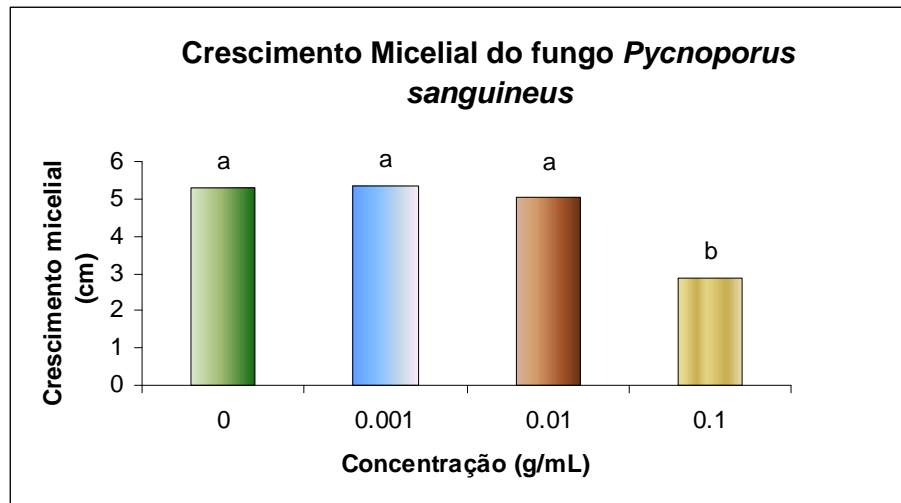
O resultado é bastante promissor, tendo em vista que quando observamos estudos como os de Cardoso e Santos apud Lima (2001) em que foi feita a avaliação dos extratos de 100 plantas, usadas na terapêutica medicamentosa, como cicatrizantes ou antiinflamatórias, somente 5 extratos apresentaram atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus*. Ressalta-se que tal bactéria causa infecções como: septicemia, endocardite, osteomielite, pneumonia, intoxicação alimentar, furunculose e infecções em feridas (ROBBERS, SPEEDIE & TYLER, 1997)

#### **4.3 ENSAIO ANTIFÚNGICO (XILÓFAGOS)**

A figura 13 mostra os valores do crescimento micelial do fungo xilófago *Pycnoporus sanguineus*, obtidos no ensaio antifúngico com o extrato metanol – água (80:20) das cascas de *C. benthamii*.

O crescimento micelial nos tratamentos 0,01 g/mL e 0,001 g/mL e Testemunha mostraram valores médios similares para o crescimento. Por outro lado, para a concentração de 0,1 g/mL observa-se um valor médio do

crecimento bem abaixo daqueles observados para as outras concentrações e a testemunha. Visualmente também se observa essa diferença.



**Nota: Letras iguais significam que não existe diferença significativa ao nível de 5% de significância.**

Figura 13. Crescimento micelial do *P. sanguineus* em diferentes concentrações do extrato bruto de *C. benthamii*.

Utilizou-se o teste F para a comparação das médias e verificou-se, ao nível de significância de 5%, que as médias são estatisticamente diferentes. Para testar o efeito do tratamento aplicou-se o teste T para observações pareadas, com isso, comparando as médias de crescimento da concentração 0,1 g/mL com as médias de crescimento da amostra testemunha, a um nível de significância de 5%. Verificou-se que o tratamento (0,1 g/mL) tem efeito ao nível de significância estabelecido.

As análises estatísticas revelaram que para a inibição total do crescimento micelial do fungo *Pycnoporus sanguineus* seria necessário uma concentração maior do extrato da casca de *C. benthamii*. A figura 14 mostra o

crescimento micelial do *P. sanguineus* na concentração de 0,1 g/mL. Nessa concentração o fungo apresentou uma coloração mais intensa possivelmente em função da maior concentração do(s) princípio(s) ativo(s) encontrados no extrato bruto. Urge a necessidade de estudos mais detalhados para se confirmar tal suposição.



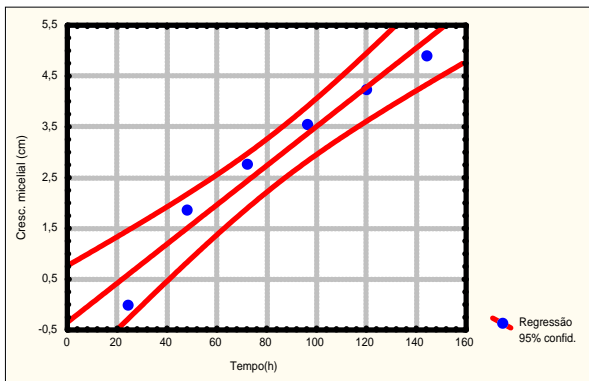
Figura 14: Cresc. micelial do *P. sanguineus* na conc. de 0,1 g/mL.

Existe uma relação linear entre o avanço da fronteira micelial e o tempo de crescimento do fungo nos tratamentos (figura 15). Em função disso é possível calcular a velocidade de crescimento (cm/h) em determinado intervalo de tempo (tabela 6) . A velocidade de crescimento do fungo mostra-se constante nas concentrações testadas, com exceção da concentração de 0,1 g/mL onde o fungo apresentou um valor médio menor para a velocidade de crescimento. Nesta concentração já se observa um efeito regulador dos compostos químicos no crescimento do fungo *P. sanguineus*.

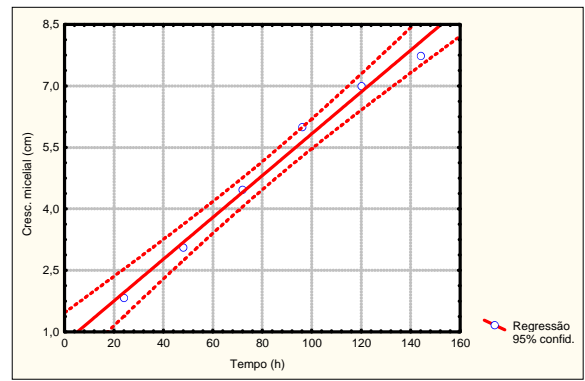
Tabela 6

Velocidade de crescimento micelial do fungo *P. sanguineus* em função do tempo

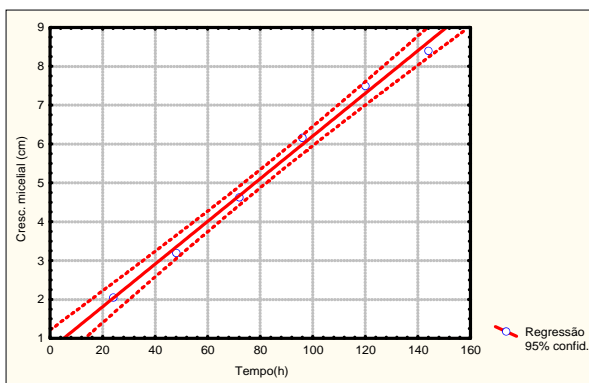
Concentração (g/mL)	Velocidade (cm/h)	Velocidade com efeito lag phase
0,1	0,048	0,036
0,01	0,067	0,042
0,001	0,074	0,044
Testemunha	0,073	0,044



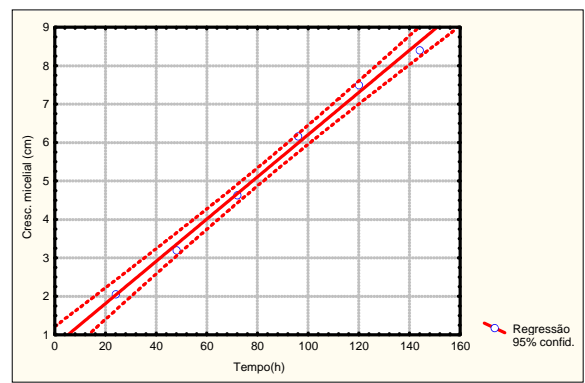
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 15. Relação linear do avanço micelial em função do tempo de crescimento nas várias concentrações de extrato de *C. benthamii*. (A) 0,1 g/mL. (B) 0,01 g/mL. (C) 0,001 g/mL. (D) Testemunha.

#### 4.4 ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo retirado da folha seca apresentou coloração amarela, odor forte e irritante. O rendimento foi de 0,0292 %.

Foram encontrados 13 substâncias, sendo que destas somente 8 foram identificadas. O percentual por área obtido através da técnica de integração dos picos utilizada, mostra que as substâncias *trans*-Cariofileno e Linalol são as substâncias que se apresentam com um maior teor no óleo extraído. A tabela 7 mostra o índice de retenção de Kovat's e a porcentagem por área dos cromatogramas de íons totais dos compostos químicos identificados no óleo essencial extraído de folhas secas de *C. benthamii*.

Tabela 7

Índice de retenção de Kovat's e porcentagem por área dos cromatogramas de íons totais identificados no óleo essencial de folhas de *C. benthamii*.

Pico	Substância	% Área	IR <sub>Exp</sub>	IR <sub>Lit</sub> <sup>1</sup>
1	Linalol	11,49	1090,26	1098
3	α - Terpineol	2,60	1193,19	1189
4	2,3 Diidro-benzofurano <sup>2</sup>	7,34	1212,07	1224
6	Geraniol	1,85	1247,05	1255
8	<i>trans</i> -Cariofileno	21,33	1413,41	1418
11	α - Humuleno	5,81	1449,09	1454
12	<i>trans</i> - β-Ionona	1,94	1472,08	1485
13	Óxido de cariofileno	7,61	1574,04	1581
<b>Total</b>	<b>8 compostos</b>	<b>59,97</b>		

1. Adams, 1995; 2. PINO, MARBOT e ROSADO, 2002.

Das substâncias identificadas é importante ressaltar a importância do Linalol para a industrial de cosméticos (KALIL FILHO e LUZ, 2000; BITTNER et al., 2001), bem como a atividade enquanto larvicida e moluscicida do Geraniol (SIMAS et al.,2004) e do *trans*-Cariofileno (CARVALHO, 2005), além da atividade antimicrobial e antifúngica do  $\alpha$  – Humuleno e do Óxido de Cariofileno (BAILAC et al., 2000; VELICKOVIC et al., 2002; DÍAZ et al., 2003; BENEVIDES, YOUNG & BOLZANI, 2000).

A tabela 8 apresenta as estruturas químicas e as atividades biológicas das substâncias identificadas no óleo essencial extraído das folhas secas de *C. benthamii*.

Tabela 8

Estrutura química e atividade biológica das substâncias identificadas no óleo essencial das folhas secas de *C. benthamii*

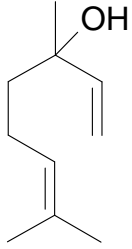
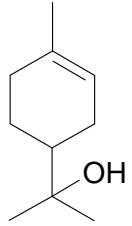
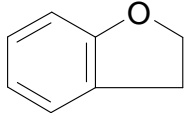
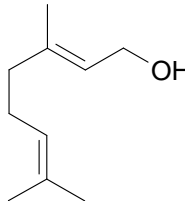
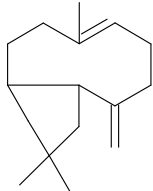
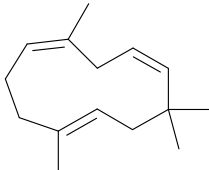
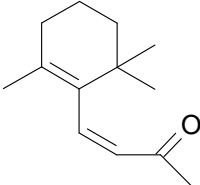
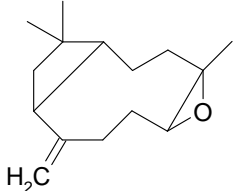
Estrutura química das substâncias	Substância	Atividade biológica
	Linalol	Fixador de Perfume (FILHO, KALIL e LUZ, 2000), atividade larvicida (SIMAS et al.,2004)
	$\alpha$ - Terpineol	Causa irritação na mucosa das membranas, ataxia, hipotermia e afeta o SNC. Efeito inseticida (CALDERONE, et al., 1991).

Tabela 8 – Cont.

	2,3 diidro-benzofurano	Ratos expostos à substância apresentaram danos nos rins, fígado, pulmão e estômago (ATSDR, 1995).
	Geraniol	Flavorizante, Ferormônio utilizado pelas abelhas para comunicação, atividade larvicida (SIMAS et al., 2004), antimicrobial (DÍAZ et al., 2003)
	<i>trans</i> - cariofileno	Atividade moluscicida sobre a <i>Biomphalaria glabrata</i> (CARVALHO, 2005), atividade antiespasmolítica, anestésica local e antiinflamatória (LIMBERGER, 2004).
	$\alpha$ - Humuleno	Atividade antimicrobial (BAILAC et al., 2000; VELICKOVIC et al., 2002; DÍAZ et al., 2003), antifúngico (BENEVIDES, YOUNG e BOLZANI, 2000).
	<i>trans</i> - $\beta$ - Ionona	Quando presente nas moléculas de carotenóides ativa a função de pró- vitamina A dos carotenóides. (PAULA, PERES e CARMO, 2004)
	Óxido de cariofileno	Atividade antimicrobial (BAILAC et al., 2000; VELICKOVIC et al., 2002; DÍAZ et al., 2003), antifúngico (BENEVIDES, YOUNG e BOLZANI, 2000).

É importante ressaltar que não há trabalhos onde conste análise de constituintes de óleo essencial de *C. benthamii*, por isso, era um óleo sem caracterização química. Onde um estudo sobre a sazonalidade de produção ainda deve ser realizado.



#### 4.4 ANÁLISE POR RMN DE $^{13}\text{C}$ DO EXTRATO DICLOROMETÂNICO

O extrato diclorometânico após ser analisado por CCD e revelado com  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  mostrou manchas lilás características de triterpenos. Com base nesse fato, o extrato foi analisado por RMN de  $^{13}\text{C}$  (Anexos A a A6) o qual mostrou sinais da presença de dois triterpenos majoritários, cuja identificação foi baseada inicialmente nos deslocamentos químicos dos sinais relativos às ligações duplas sendo atribuído posteriormente os demais sinais (NUNEZ, 2000).

A substância **1** apresentou deslocamentos químicos em 150,9 ppm e 109,3 ppm característicos do grupo olefínico C-20 e C-29 dos triterpenos com esqueleto **lupano**. A substância **2** apresentou deslocamentos químicos em 142,5 e 129,6 pertencentes ao grupo olefínico C-18 e C-19 dos triterpenos com esqueleto **olean-18-enos**. As duas substâncias se mostram majoritárias no extrato diclorometânico, fato esse comprovado pela análise relativa da intensidade dos picos registrados.

Os demais deslocamentos químicos (ppm), observados para os carbonos das substâncias químicas mencionadas, foram comparados com os valores da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994) e mostraram-se compatíveis com o Lupan-**20(29)-3 $\beta$ -ol (Lupeol)** e **Olean-18(19)- 3 $\beta$ -ol** (Germanicol, Fig. 16). A tabela 9 apresenta os valores individuais observados por RMN de  $^{13}\text{C}$  e os provenientes da literatura.

Tabela 9

Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  do extrato diclorometânico de *C.benthamii*

Posição	Lupeol		Germanicol	
	Observado	Literatura*	Observado	Literatura*
1	38,7	38,7	38,7	38,7
2	27,4	27,4	27,4	27,4
3	79,0	78,9	78,9	78,9
4	38,8	38,8	38,8	38,8
5	55,3	55,3	55,3	55,3
6	18,3	18,3	18,3	18,3
7	34,1	34,2	34,2	34,2
8	40,8	40,8	40,8	40,8
9	50,4	50,4	50,4	51,3
10	37,1	37,1	37,3	37,3
11	20,95	20,9	20,95	21,2
12	25,1	25,1	25,6	26,2
13	38,09	38,0	38,8	39,0
14	42,8	42,8	43,0	43,4
15	27,4	27,4	27,4	27,6
16	35,6	35,5	37,1	37,7
17	43,0	43,0	34,3	34,4
18	48,3	48,0	142,5	142,8
19	47,9	47,9	129,6	129,8
20	150,9	150,9	31,9	32,3
21	29,8	29,8	34,0	33,4
22	40,0	40,0	37,1	37,4
23	27,99	28,0	27,9	28,0
24	15,3	15,4	15,3	15,4
25	16,1	16,1	15,9	16,1
26	15,9	15,9	16,1	16,7
27	14,5	14,5	14,5	14,6
28	18,8	18,0	25,5	25,3
29	109,3	109,3	31,7	31,3
30	19,3	19,3	29,3	29,3

\*FONTE: MAHATO &amp; KUNDU, 1994

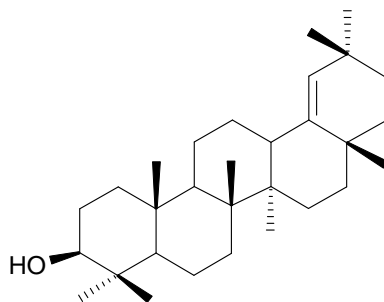


Figura 16: Germanicol

Estudos indicam que o germanicol apresenta atividade anti-HIV contra o vírus tipo I, possuindo efeitos inibidores para a enzima transcriptase reversa, com uma  $IC_{50}$  – concentração inibitória a 50%, de 45  $\mu$ M (AKIHISA et al., 2001), além de possuir atividade antitumoral e antiinflamatória. Os extratos que contém a presença do germanicol apresentam um forte potencial analgésico (KIM et al., 2005; ROCHA, 2002).

A presença do triterpeno Germanicol está sendo pela primeira vez relatada para a espécie *Crateva benthamii*.

## 4.6 ANÁLISE POR RMN DE $^{13}\text{C}$ E $^1\text{H}$ DA FRAÇÃO CB1.14 DO EXTRATO DICLOROMETÂNICO

As frações CB1.14 a CB1.27 após evaporação do solvente, mostraram-se sob a forma de um óleo de coloração amarela, com odor agradável. A análise por CCD mostrou que todas essas frações apresentavam uma mesma resposta cromatográfica. Quando reveladas com  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ , apresentaram uma coloração inicialmente vermelha que passou para o lilás e finalmente para o marrom, as mesmas, portanto, foram reunidas e registradas como CB1.14.

A análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Anexo B) e de  $^1\text{H}$  (Anexos C e C1) da mistura CB1.14 destaca os deslocamentos químicos 124,3 e 139,3 característicos do grupo olefínico dos triterpenos com esqueleto **urs-12-enos** (MAHATO & KUNDU, 1994; MENDES et al., 1999; LIMA, 2000; ), além de mostrar um sinal em 172,9 atribuído a carbono carbonílico de ésteres graxos (DAVID et al., 2004). Foram também observados no espectro de RMN  $^1\text{H}$  sinais característicos de substância contendo esqueleto triterpênico, o sinal em 5,3 do hidrogênio olefínico H-12 foi indicativo do esqueleto ursano (DAVID et al., 2004).

Segundo Abreu et al. (2001) a ausência do sinal de H-3 (3,25 ppm) e a presença de um duplo dubleto em 4,2 ppm sugere que a hidroxila da posição 3 do triterpeno esteja esterificada, o que é confirmado pelo intenso sinal em 1,23 ppm e os tripletos em 0,8ppm e em 2,3 ppm que caracterizam a presença de um éster graxo. Contudo, como a mistura não foi purificada,

supõe-se que o composto majoritário presente na mistura CB1.14 seja um **éster da  $\alpha$  – amirina**.

#### **4.7 ANÁLISE POR RMN $^1\text{H}$ DA FRAÇÃO CB1.30 DO EXTRATO DICLOROMETÂNICO**

A frações CB1.30 a 1.32 quando recolhidas e após evaporação do solvente se cristalizaram como sólido branco, amorfo, sem cheiro. Quando analisadas por CCD apresentaram uma mesma resposta cromatográfica além sinais de substância pura. Quando reveladas com  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  apresentaram coloração lilás, típica dos triterpenos, portanto, foram reunidas e registradas como CB1.30, rendendo uma massa de **1,63 g**. A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Anexo D) dessa amostra revelou sinais do grupo triterpênico dos **lupanos**. Os deslocamentos químicos em 3,25 ppm, 4,5 e 4,6 e 1,67 ppm, caracterizam, respectivamente, os hidrogênios H-3, H-29a e H-29b e H-30 do triterpeno **lupeol** (CARVALHO et al., 1998).

A presença majoritária do lupeol no extrato de *Crateva benthamii* atesta a eficácia no uso do extrato dessa planta, pelos povos ribeirinhos da Amazônia, como antiinflamatório, uma vez que tal atividade do lupeol é amplamente relatada na literatura científica.

## CONCLUSÕES

As análises fitoquímicas, deste estudo, revelaram que a casca de *C. benthamii* apresentou compostos majoritários, como os triterpenos pentacíclicos lupeol (1,63 g) e germanicol, que podem ser potencialmente ativos em modelos biológicos e farmacológicos.

O estudo das atividades antimicrobianas revelou que os extratos de diclorometano da casca de *C. benthamii* não apresentaram atividade inibitória sobre o desenvolvimento de cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella london*, *Shigella sonni*, *Shigella paratyphi*, *Shigella tryphimurium*. Contudo, o extrato metanol-água (80:20) se mostrou ativo para *Staphylococcus aureus*.

Para a inibição total do crescimento micelial do fungo *Pycnoporus sanguineus* seria necessário uma concentração maior do que 0,1 g/mL do extrato bruto da casca de *Crateva benthamii*.

As substâncias identificadas no óleo essencial, extraído das folhas, de *C. benthamii* indicaram esta espécie com potencial de utilização para a produção de inseticida e antibióticos.

*Crateva benthamii* pode ser uma fonte alternativa para a obtenção de compostos como lupeol, germanicol, *trans*-Cariofileno, linalol,  $\alpha$  – humuleno,  $\alpha$  – terpineol e geraniol que apresentam várias atividades biológicas, comprovadas na literatura científica. Estudos com frações com maior grau de pureza e concentrações serão capazes de fornecer substâncias de importância para as indústrias de fármacos, cosméticos e nutraceuticos, dentre outras.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A.S.; BARBOSA, P.S.; MULLER A.H.; GUILHON, G. M. S. P. Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Croton pullei* var. *glabrior* (Euphorbiaceae). Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA <http://www.ufpa.br/revistaic>, 2001, vol. 1, no. 2, p. 1-9.

ADAMS, R. P. Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured Publ Corp., Carol Stream, IL, 469 p. 1995.

AGARWAL, R.B.; RANGARI, V.D. Antiinflammatory and antiarthritic activities of lupeol and 19 $\alpha$ -H lupeol isolated from *Strobilanthes callosus* and *Strobilanthes ixiocephala* roots. Indian Journal of Pharmacology, 35, p. 384-387, 2003.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). 2,3-Benzofurano. Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública. 1995. Disponível em <[http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es\\_tfacts25.pdf](http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts25.pdf)> .Acesso em 20 de Dezembro de 2004

AKIHISA, T.; OGIHARA, J. et al. Inhibitory effects of triterpenoids and sterols on human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase. Lipids, May; 36(5), p. 507-512, 2001.

ALVES, H.M. A diversidade química das plantas como fonte de Fitofármacos. Cadernos temáticos de Química Nova na Escola, São Paulo, n. 3, 2001, 10-15p.

AMATO NETO, V.; LEVI G.C.; LOPES, H.V.; MENDONÇA, J.S.; BALDY J.L.S. Antibióticos na prática médica. 4 ed. São Paulo: Roca, 1994, p.283.

ARAÚJO, J.M.A. Química de alimentos: teoria e prática. 2.ed. Viçosa/MG: UFV, 2001.



AYNILIAN, G. H., FARNSWORTH, N. R., PERSINOS, G. J. Isolation of lupeol from *Crataeva benthamii*. Phitochemistry, England, v. 11, p. 2885 – 2886, 1972.

BAILAC, P.N.; DELLACASA, A.D.; BERNASCONI, H.; FIRPO, N.H.; PONZI, M.I. Composicion del aceite esencial y actividad antimicrobiana de *Eupatorium patens*. Boletin de la Sociedad Chilena de Química, 2000, vol.45, no.2, p.207-211.

BARATA, L. E. S. Produtos da Biodiversidade Amazônica. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/amazonia/amaz22.htm>> Acesso em: 07 fev. 2003.

BARBOSA, W. L. R. Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. Ed. rev. Belém: UFPA, 2001.

BARRETO, A.S.; CARVALHO, M.G. de; NERY, I.A.; GONZAGA, L.; KAPLAN, M.A.C. Chemical Constituents from *Himatanthus articulata*. Journal Brazil Chemical Society. 1998, vol.9, no.5, p.430-434.

BEIL, W.; BIRKHOLZ, C.; SEWING, K.F.R. Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and *Helicobacterpylori* growth. Arzneimittelforschung, Germany, jun., 45 (6), p. 697-700, 1995.

BENEVIDES, P.J.C.; YOUNG, M.C.M.; BOLZANI, V.S. Composição química e atividade antifúngica do óleo essencial de *Psychotria spectabilis* L. (RUBIACEAE). Resumos. 23<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2000. Poços de Caldas, MG, PN-0131. Disponível em <<http://www.sbg.org.br/ranteriores/23/resumos/0131.html>>. Acesso em 18 de Dezembro de 2004.

BITTNER, M.; ALARCON, J.; AQUEVEQUE, P.; BECERRA, J.; HERNÁNDEZ, V.; HOENEISEN, M.; SILVA, M. Estudio quimico de especies de la familia Euphorbiaceae en Chile. Boletín de la Sociedad Chilena de Química, 2001, vol.46, no.4, p.419-431.

BRISKIN, D.P. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. Plant Physiology. 124: 507-514, 2000.

CALDERONE, N.W. et al. Evaluation of botanical compounds for control of the honey bee tracheal mite *Acarapis woodi*. American Bee Journal, v. 131, p. 589-591, 1991.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. Ciência e Cultura. Disponível em: <<http://www.cienciaecultura.bvs.br/pdf/cic/v55n3/a22v55n3.pdf>>. Consultado em: 24/11/2004. 37-39p.

- CARVALHO R., F.; TOLEDO DE O., T.; NAGEM, T.J.; STRINGHETA, P.C.; BRAGINE F. JUNIOR, D. Efeitos de naringenina e bixina associados com leite de cabra sobre o metabolismo lipídico de coelhos. Revista chilena. nutricion., nov. 2004, vol.31 supl.1, p.177-182.
- CARVALHO, J.M. de; MENDONÇA, R.P.C.; LIMA, M.R.F. de; SANTOS, A.F. dos; SANT'ANA, A.E.G. Avaliação da atividade moluscicida de coumarinas, quinonas, fenóis, terpenóides, cetonas, ácidos e aldeídos benzóicos. Resumos. 23<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2000. Poços de Caldas, MG, QB-0600. Disponível em <<http://www.sbg.org.br/ranteriores/23/resumos/index.html>>. Acesso em 22 de Dezembro de 2004.
- CARVALHO, M.G. de; RINCON VELANDIA, J.; OLIVEIRA, L.F. de; BEZERRA, F.B. Triterpenes isolated from *Eschweilera longipes* miers (Lecythidaceae). Química Nova, São Paulo, 1998, vol.21, n.6, p.740-743.
- CAVALCANTE, P. B. Frutas Comestíveis da Amazônia. 5. ed. Editora CEJUPE, Belém, 1991.
- CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. Química Nova, São Paulo, vol. 23, n. 5, 680-685, 2000.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. Química Nova, São Paulo, vol. 21, n. 1, 99-105, 1998.
- CLEMENT. C. R. et all. Biodiversidade Amazônica: exemplos e estratégias de utilização. 1 ed. INPA/SEBRAE, 2000.
- CORRÊA, P. M. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Ministério da Agricultura. IBAMA. J. Di Giorgio & Cia Ltda. Editores. VI volumes. 1975.
- CRAG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. Journal of Natural Products, Columbus, jan.,60 (1), 52-60, 1997.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. (2000). Natural products: secondary metabolites. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (ed), Biochemistry & Molecular Biology of Plants, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, 2000, p. 1250-1318.
- DAVID, J.P.; MEIRA, M.; DAVID, J.M.; GUEDES, M.L. da S. Triterpenos e ferulatos de alquila de *Maprounea guianensis*. Química Nova, São Paulo, 2004, vol.27, no.1, p.62-65.

- DEWICK, P.M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 2<sup>nd</sup>. ed. Wiley Ed. 507p. 2002.
- DHAR, R.; DAWAR, H.; GARG, S. et al. Effect of volatiles from neem and other natural products on gonotrophic cycle and oviposition of *Anopheles stephensi* and *A. culicifacies* (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology. v.33, n. 2, p. 195-201, 1996.
- Di STASI, L. C. (org.) Plantas Medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. 1. reimpressão. São Paulo: Unesp, 1996.
- DIAS, B. F. S. A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades. Campinas: André Tosello, 1996, 10p.
- DÍAZ, L.H; RODRÍGUES JORGE, M.; GARCÍA, D.; ALEA, J.P. Actividad antidermatofítica *in vitro* de aceites esenciales. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 2003, vol. 8, no. 02. Disponível em < [http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol8\\_2\\_03/pla04203.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol8_2_03/pla04203.htm) >.
- DUWIEJUA, M.; ZEITLIN, I.J. Plants as a source of anti-inflammatory substances. In: HARVEY, A.L. Drugs from Natural Products: Pharmaceuticals and Agrochemicals. New York: Ellis Horwood, 1993.
- ELISABETSKY, E.; SOUZA, G.C. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (org). Farmacognosia da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003.
- FERREIRA. L. V. O Uso das bacias hidrográficas transfronteiriças como uma estratégia de conservação da biodiversidade nas florestas inundadas da Amazônia. Disponível em: < <http://www.amazonia.or.br> > Acesso em 29/09/2004.
- FORERO, E. Los jardines botánicos y la conservacion de la natureza. Acta Botânica Brasílica. Vol. 3 (2): 1989.
- FORMICA, J.V.; REGELSOM, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. Food. Chemical Toxicology., v.33, p. 1061-1080, 1995.
- FRANCIS, F.; LOGNAY, G.; WATHELET, J.P.; HAUBURGE, E. Effects of allelo-chemicals from first (Brassicaceae) and second (*Myzus persicae* and *Brevicoryne brassicae*) trophic levels on *Adalia bipunctata*. Journal of Chemical Ecology. v.27, n. 2, p. 243-256, 2001.
- GARCIA, E. S. et al., Fitoterápicos. Campinas: André Tosello, 1996. 17p.
- GENTRY, A. H. Neotropical floristic diversity: phytogeographical connections between Central and South America, Pleistocene climate fluctuations, or na accident of the Andean orogeny? Ann. Missouri Botanic Garden. 1982.

GERWING, J.; VIDAL, E.; VERISSIMO, A.; UHL, C. Rendimento no processamento de Madeira no Estado do Pará. IMAZON, 2001. Série Amazônia, n. 18, Disponível em: < <http://www.imazon.org.br> >. Acesso em: 10 de Novembro de 2004.

GIBBS, R.D. Chemotaxonomy of flowering plants. London: McGill-Queen's University Press, II p. 761-834, III p. 1512, 1974.

GOTTLIEB, O.R.; BORIN, M.R. de M.B. Quimiosistemática como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (org). Farmacognosia da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003.

GOTTLIEB, O.R.; KAPLAN, M.A.C.; BORIN, M.R. de M.B. Biodiversidade, um enfoque químico-biológico. Rio de Janeiro:UFRJ, 1996.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (org). Farmacognosia da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003.

Guia de Consultas Botânicas II. Disponível em [www.biologia.edu.ar/diversidadv/fascIII/28.%20Capparaceae.pdf](http://www.biologia.edu.ar/diversidadv/fascIII/28.%20Capparaceae.pdf) . Acesso em 01 de Novembro de 2004

HAENEN, J.M. Pharmacy International., 1985, 7, p.194.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. Princípios ativos de plantas superiores. São Carlos: EdUFSCar, 2003. 152p.

JESUS, M.A. Efeito dos extratos obtidos de *Swartzia argentea* Spruce ex Benth, *S. laevicarpa* Amshoff, *S. pacoco* (Aublet) Cowan, *S. polyphylla* DC e de *S. sericea* Vogel da Amazônia Central sobre fungos degradadores de madeira. Rio Claro:UEP,2003. Tese(doutorado), Universidade Estadual Paulista,2003.

JUNGES, M. J.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. FERNANDES, M.F.G.S.; FILHO, E.R.; FRÜHAUF, M.; BARANANO, A.G. Triterpenos ursânicos e oleanânicos isolados do caule de *Eugenia florida* DC. Revista de Pesquisa e Pós-Graduação. A ciência do Novo Milênio, Erechim - RS, v. 1, n. 1, p. 13-29, 2000.

JUNK, W.J.; PIEDEDE, M.T.F. Herbaceous plants of the Amazon floodplain near Manaus: Species diversity and adaptations to the flood pulse. Amazoniana, XII (3-4): 467-488, 1993.

KALIL FILHO, A.N.; KALIL, G.P. C.; LUZ, A.R. Conservação de Germoplasma de plantas aromáticas e medicinais da Amazônia Brasileira para uso humano. Comunicado Técnico Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, n. 50, p. 1-4, 2000.

KAUL, T.N.; MIDDLETON Jr., OGRA, P.L. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *Journal of Medical Virology*, jan; 15 (1), p. 71-79, 1985.

KIM, D.K; LIM, J.P. et al. Antitumor and antiinflammatory constituents from *Celtis sinensis*. *Archives of Pharmacal Research*, jan;28(1), p. 39-43, 2005.

KLINGE, H.; ADIS, J.; WORBES, M. The vegetation of a seasonal várzea forest in the lower solimões river, brazilian amazônia. *Acta Amazônica* 25 (3/4): 201-220. 1995.

LARSON, R.A. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* 27: 969-978, 1988.

LÁSZLÓ, Fabian. O óleo de Abacate. 25 fev. 2005. Disponível em: <[http://brazil-brasil.com/index2php?option=content&task=view&id=307&pop=1 &page=o](http://brazil-brasil.com/index2php?option=content&task=view&id=307&pop=1&page=o)> Acesso em: 04/05/2005.

LIMA, E.O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (orgs.) *Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó: Argos, 2001.

LIMA, H. Fitoterapia em Hiperplasia prostática (artigos de revisão). *Urologia on-line – UNIFESP/EPM*, São Paulo, abril-junho 1997. Disponível em: <<http://www.unifesp.br/dcir/urologia/uronline/ed0397/fitohp.htm>> v.1, ed.2, Acesso em: 04/05/2005.

LIMA, M.P. Investigação fitoquímica e quimiosistemática de *Trattinnickia burserifolia*, *T. rhoifolia*, *Crepidospermun*, *Rhoifolium*, *Dacryodes sp.* (Burseraceae) e *Spathelia excelsa* (Rutaceae). Tese de doutorado, UFSC, 2000, 349p.

LIMBERGER, R.P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A.T.; MENUT, C.; BESSIÈRE, J. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. *Química Nova*, São Paulo, 2004, vol.27, n. 6, p. 916-919.

LORENZI, H. *Plantas medicinais no Brasil, nativas e exóticas*. São Paulo: ed. Plantarum, 2002.

MAHATO, S.B.; KUNDU, A.P. CNMR spectra of pentacyclic triterpenoids – A compilation and some salient features. *Phytochemistry*, vol 37, no 6, p.1517–1575, 1994.

MAIA, L. M. A.; CHALCO, F. P. Produção de frutos de espécies da floresta de várzea importantes na alimentação de peixes – Amazônia Central. *Acta Amazônica*. 32 (1): 44-45. 2002.

MAIA, L. M. A. *Frutos da Amazônia: fonte de alimento para peixes*. Manaus: INPA/SEBRAE, 2001,143P.

MARQUES, M.C.S.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, P. E.; GAVILANES, M.L.; SOUZA, J.A. de; PEREIRA, N.E.; NEGRÃO, I.O. Efeito fungitóxico dos extratos de *Cayocar brasiliense* Camb. sobre os fungos *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum truncatum* e *Fusarium oxysporum*. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. Edição, n. Especial, p. 1410-1419, 2002.

MATOS, F. J. A. Introdução a fitoquímica experimental. Fortaleza: Editora da UFC, 1980, 128p.

McLEAN, W. F. H., BLUNDER, G., JEWERS, K. Quaternary Ammonium Compounds in the Capparaceae. Biochemical Systematics and Ecology, Great Britain, v. 24, n. 5, p. 427 – 434, 1986.

MENDES, C. C.; CRUZ, F. G.; DAVID, J. M.; NASCIMENTO, I. P.; DAVID, J. P. Triterpenos esterificados com ácidos graxos e ácidos triterpênicos isolados de *Byrsonima microphylla*. Química Nova, São Paulo, 1999, vol.22, n.2, p.1-4.

MIMS, C.A.; PLAYFAIR, J.H.L.; ROITT, I.M.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. Microbiologia médica. São Paulo: Editora Manole Ltda., 1995.

MITHEN, R.F.; DEKKER, M.; VERKERK, R.; RABOT, S.; JOHNSON, I.T. The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. Journal of the Science of Food and Agriculture. v.80, n. 7, p. 967-984, 2000.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. Química Nova, São Paulo, vol. 24, n. 1, 105-111, 2001.

MORENO, P.R.H. Resposta. Mensagem pessoal. Mensagem recebida por: <myoshida@imap.iq.usp.br> em 10 de Novembro de 2004.

MORS, W.B; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N.A. Medicinal plants of Brazil. Reference Publications, Inc. Algonac, Michigan, 2000.

MONTE, F.J.Q.; OLIVEIRA, E.F. de; BRAZ FILHO, R. Triterpenóides pentacíclicos de *Mentha villosa*: identificação estrutural e atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono. Química Nova, São Paulo, vol.24, n.4, p.491-500, 2001.

MUCSI, I.; PRAGAI, B.M. Inhibition of vírus multiplication and interation of cyclic AMP level in cell cultures by flavonoids. Experientia. v.41, p. 930-931, 1985.

NUNEZ, C. V. Terpenos de *Wunderlichia crulsiana* e *Mikania sp. nov.* Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, USP, Brasil, 2000, 139p.

OLIVEIRA, F., AKISUE, G. Fundamentos de farmacobotânica. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. 178p.

OVESNA, Z., VACHALKOVA, A., HORVATHOVA, K. Taraxasterol and beta-sitosterol: new naturally compounds with chemoprotective/chemopreventive effects. *Neoplasma*, v.51, n.6, p.407-14, 2004.

PATOČKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *Journal of Applied Biomedicine*, n. 1, p.7-12, 2003.

PAULA, T.P. de; PERES, W.A.F; CARMO, M.G.T. do. Os carotenóides no tratamento e prevenção do câncer. *Revista Brasileira Nutrição Clínica.*, vol. 19, no. 2, p.100-108, 2004.

PERES, L.E.P. Metabolismo secundário. Disponível em: <<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/fisioveggradbio/metsec.pdf>> Acesso em: 07 de Fevereiro de 2003.

PINO, J.; MARBOT, R.; ROSADO, A. Volatile constituents of star apple (*Chrysophyllum cainito* L.) from Cuba. *Flavour and Fragrance Journal*, [s.l.],n. 17, p. 401-403, April. 2002.

PINTO, A.C.; SILVA; D.H.S.; BOLZANI, V.S; LOPES; N.P.; EPITANIO, R.A.; Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, São Paulo, vol. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.

RECIO, M.C.; RIOS, J.L.; VILLAR, A., *Phytotherapy Research*, 1989, 69, p.169.

REVILLA, J. Plantas da Amazônia – Oportunidades Econômicas e sustentáveis. INPA/SEBRAE, 2000.

REYMÃO, A.E.; GASPARETTO, O. Recursos madeiros e desenvolvimento sustentável na amazônia. Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br/tecnologia/revistas/artigos/PA/anareymãofinal.pdf>> Acesso: 17 de Setembro de 2002.

RIBEIRO, J.E.L. da S.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINI, A. et al. Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central. Manaus: INPA, 1999.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER.V.E. *Farmacognosia e Farmacobiotechnologia*. São Paulo:Editora Premier, 1997.

ROCHA, M.E.N. Potencialidades biodinâmicas de *Norantea brasiliensis* Choisy - Marcgraviaceae. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular. Instituto Oswaldo Cruz. 2002. Resumo. Disponível em <<http://www.157.86.113.12/teses/site/detalhamento.asp?id=BCM-M-226>> Acesso em .06 de Janeiro de 2004.

ROHDICH, F., HECHT, S.; BACHER A.; EISENREICH W. Deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. Discovery and function of



*ispDEFGH* genes and their cognate enzymes. Pure Applied. Chemistry., vol. 75, nos. 2–3, pp. 393–405, 2003.

Royal Botanic Gardens, Kew. Disponível em <[www.rbghkew.org.uk/cgi-bin/web.dbs/genlist.pl?CAPPARACEAE](http://www.rbghkew.org.uk/cgi-bin/web.dbs/genlist.pl?CAPPARACEAE)>. Acesso em 01 de Novembro de 2004.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (org). Farmacognosia da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (org). Farmacognosia da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003.

SETZER, W.N.; SETZER M.C. Plant-Derived Triterpenoids as potential antineoplastic agents. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2003, vol. 3, no. 6, p.540-556.

SIMAS, N.K.; LIMA, E.C.; CONCEIÇÃO, S.R.; KUSTER, R.M.; OLIVEIRA-FILHO, A.M. de. Produtos Naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. Química Nova, São Paulo, 2004, vol. 27, n. 1, p. 46-49.

SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. Disponível em: [www.desenvolvimento.gov.br/arquivo/sti/publicacoes/futamadiloportunidades/rev20011219\\_08](http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivo/sti/publicacoes/futamadiloportunidades/rev20011219_08) . Acessado em 07 de Fevereiro de 2003.

SIMÕES, C. M. O. et al (org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFSC, 1999.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (org). Farmacognosia da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003.

SIQUEIRA, T. V. Desenvolvimento sustentável: Antecedentes históricos e propostas para a Agenda 21. Revista do BNDES. Rio de Janeiro, v.8, n.15, p. 247-288, jun. 2001.

SOEJARTO, D.D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. Journal Ethnopharmacology. v.51, p.1-15, 1996.

VELICKOVIC, D.T.; RANDJELOVIC, N.V.; RISTIC, M.S.; ANDRIJA A. ; SMELCEROVIC, A.A.; VELICKOVIC, A.S. Chemical composition and antimicrobial action of the ethanol extracts of *Salvia pratensis* L., *Salvia*



*glutinosa* L. and *Salvia aethiopsis* L. Journal Chemical Society. 2002, vol. 67, no.10, p. 639–646.

VIEGAS JUNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. Química Nova, São Paulo, 2003, vol.26, n.3, p.390-400.

VIEIRA, S. Introdução à Bioestatística. 8 ed. revista e ampliada. Rio de Janeiro: Editora Campus, 1980.

WALDHOFF, D.; MAIA, L. M. A. Production and chemical composition of fruits from tree in floodplain forest of Central Amazônia and their importance for fish. In: JUNK, W. J. (ed.) The Central Amazon floodplain: Ecology of a pulsing system. Springer: Leiden-Netherlands/Backhuys publishers, v.1, p. 393-415, 2000.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO; V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. Química Nova, São Paulo, vol. 24, n. 1, 147-152, 2001.

ZUCO, V.; SUPINO, R.; RIGHETTI, S. C.; CLERIS, L.; MARCHESI, E.; GAMBACORTI –PASSERINI, C.; FORMELLI, F. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. Câncer Letters, 175, 17, 2002.

**ANEXOS – Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$**

**ANEXO A – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do extrato diclorometânico, em  $\text{CDCl}_3$  (300 MHz).**

**ANEXO A1 – Detalhe do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do extrato diclorometânico, em  $\text{CDCl}_3$  (300 MHz).**

**ANEXO A2 – Detalhe do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do extrato diclorometânico, em  $\text{CDCl}_3$  (300 MHz).**

**ANEXO A3 – Detalhe do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do extrato diclorometânico, em  $\text{CDCl}_3$  (300 MHz).**

**ANEXO A4 – Detalhe do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do extrato diclorometânico, em  $\text{CDCl}_3$  (300 MHz).**

**ANEXO A5 – Detalhe do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do extrato diclorometânico, em  $\text{CDCl}_3$  (300 MHz).**



**ANEXO A6 – Detalhe do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do extrato diclorometânico, em  $\text{CDCl}_3$  (300 MHz).**

**ANEXO B – Detalhe do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração CB 1.14 do extrato diclorometânico, em  $\text{CDCl}_3$  (300 MHz).**

**ANEXO C – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração CB 1.14 do extrato diclorometânico, em  $\text{CDCl}_3$  (300 MHz).**

**ANEXO C1 – Detalhe do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração CB 1.14 do extrato diclorometânico, em  $\text{CDCl}_3$  (300 MHz).**

**ANEXO D – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração CB 1.30 do extrato diclorometânico, em  $\text{CDCl}_3$  (300 MHz).**

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.