

INTRODUÇÃO

A importância de se examinar a diversidade biológica – não apenas na esfera das espécies, mas também nos níveis genético e ecossistêmico – foi primeiramente reconhecido por Elliot R. Norse e seus colaboradores, no início da década de 1980, a expressão “diversidade biológica” começou a ser usada simultaneamente, em termos mais restritos, significando riquezas de espécies (SANT’ANA, 2002). A contração “biodiversidade” foi designada em 1985 para dar o nome ao National Forum ou BioDiversity que aconteceu na cidade de Washington, em 1986.

Neste contexto, surge a “*bioprospecção*” um termo que pode ser entendido como a busca envolvendo desde a coleta de material biológico o “*screening*” até a comercialização de produtos naturais.

O tipo de bioprospecção mais colocado em prática nos dias atuais é aquele voltado para a busca de novos compostos bioquímicos – a partir de “*screening*” de

extratos biológicos – cujos princípios ativos serão aproveitados para a produção de novos medicamentos.

Atualmente grande parte dos produtos sintéticos que estão no mercado apresenta substâncias derivadas de plantas, tais como antimalárico (quininos), antiamebianos (ipeca), analgésicos (morfina) e anticoagulantes (dicumarol). Ao mesmo tempo, não se pode esquecer que o uso destas plantas deve ser racional, a fim de não levar nenhuma espécie à extinção, ou causar desequilíbrio ecológico (BORGES et al., 1999).

É fato que na Amazônia está a maior diversidade de plantas, animais e microorganismos, sendo este complexo florestal caracterizado por uma alta diversidade biológica. Entretanto, pouco ainda se conhece das espécies que a compõem e suas relações filogenéticas (BANCO DE DADOS TROPICAL, 1997). Muitas áreas nunca foram exploradas botanicamente e, muito pouco de suas propriedades químicas, guardadas sua proporção territorial, é ainda conhecida. Por outro lado, os caboclos e ameríndios, que moram dentro ou perto da floresta, conhecem muito bem as espécies úteis; entretanto, este conhecimento empírico é em geral restrito e pouco divulgado (RIBEIRO et al., 1999).

No que se refere à madeira podemos considerá-la como um material orgânico produzido naturalmente, e que por esse motivo pode estar sujeita ao ataque de agentes xilófagos, os quais podem causar a redução da sua vida útil através do

enfraquecimento estrutural de uma peça de madeira. Vários agentes biológicos são responsáveis pela deterioração da madeira: fungos, insetos, formigas e numa escala menor bactérias. A maior perda econômica oriunda da biodeterioração resulta da podridão causada por fungos.

Os fungos podem causar podridão ou descoloração da madeira e outros materiais celulósicos. No caso específico da podridão podem enfraquecer e destruir completamente até mesmo as propriedades físicas da madeira. Muitos fungos de podridão pertencem à classe botânica dos basidiomycetes. Dentre estes, temos os fungos *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer causador de grandes perdas de material estrutural devido seu ataque aos componentes químicos da madeira (CASTRO e SILVA & AGUIAR, 2001; OLIVEIRA et al., 1986).

Nos dias atuais tenta-se aumentar a vida útil da madeira em serviço, prevenindo a podridão com a utilização de preservantes químicos inibidores do crescimento fúngico. Entretanto, tais compostos são altamente tóxicos ao homem e ao meio ambiente. Existe a preocupação mundial com a conservação ao meio ambiente, e as indústrias produtoras desses compostos altamente tóxicos para uso em madeira estão em busca de alternativas para substituí-los. Uma dessas alternativas passa pela possibilidade de se utilizar compostos naturais que possam ter potencial para uso na proteção da madeira. Neste sentido alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos com extrativos obtidos de cascas e lenho de árvores da Amazônia (SILVA, et al., 2002; JESUS et al., 1993; CLEMENTINO et al., 2001).

Os extrativos não residem na parede celular da planta, e esse termo engloba materiais extraíveis com água, solventes orgânicos neutros e também outros que não são extraíveis comumente com esses agentes, como, por exemplo, compostos inorgânicos, proteínas e substâncias pécicas.

Portanto, o presente trabalho se propõe a avaliar o extrato bruto, frações e sub-frações, obtido através de solventes em diferentes gradientes de polaridade, das folhas de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby em várias concentrações contra o crescimento do fungo *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer.

1 OBJETIVOS

1.1 GERAL:

Avaliar a atividade fungicida do extrato bruto, frações e sub-frações das folhas de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby contra a ação de fungos que causam podridão da madeira.

1.2 ESPECÍFICOS:

1. Obter extratos das folhas de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby com solventes orgânicos em diferentes gradientes de polaridade.
2. Testar a atividade fungicida dos extratos contra o crescimento micelial do fungo *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer.

3. Quantificar o crescimento do avanço da fronteira micelial do fungo *P. crinitus* (L. ex. Fr.) Singer em diferentes níveis de concentração de extrato bruto obtido das folhas de *S. reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby.

4. Fracionar o extrato bruto ativo por meio de **CC** (coluna cromatográfica) e realizar testes biológicos com as frações e sub-frações para quantificação do crescimento micelial.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Potencial farmacológico de espécies vegetais

Os estudos farmacológicos são decisivos na descoberta de produtos isolados que apresentam uso terapêutico direto, ou cujas estruturas sirvam de modelo na busca e síntese de novas drogas.

Dentre as famílias botânicas com representatividade na Hiléia Amazônica, encontram-se famílias do grupo das leguminosas com grande utilidade na farmacologia. É sem dúvida, a mais importante de todas as famílias de plantas da floresta amazônica e é também abundante em outros ecossistemas brasileiros (SILVA et al, 2004). Apresenta predominância em florestas tropicais e subtropicais, sendo que a maior diversidade ocorre na América Tropical, com cerca de 198 gêneros na região Amazônica, com 146 ocorrências na Amazônia brasileira (SILVA et al., 1989). Estão representadas por 17.030 espécies, amplamente distribuídas em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae com ampla distribuição nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas (JESUS, 2003).

A sub-família Caesalpinaceae é encontrada em toda Região Amazônica e em outras regiões brasileiras (HEYWOOD, 1985). É mais abundante nos trópicos, sendo raras ou ausentes nas regiões frias (POLHILL & STRIRTON, 1981). Em meio a essa diversidade da flora, distinguem-se também diversas espécies do gênero *Senna* e *Cassia*, tais como a *Cassia occidentalis*, L., *Cassia sericea*, S., *Cassia alata*, L., ocorre em campos abertos e pastagens (ALMEIDA, 1993). A *Cassia spruceana*, nativa da região amazônica e indicada no tratamento da malária. (PINTO et al., 2002). *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby ocorre em terrenos inundáveis e não inundáveis, nas pastagens em campo aberto e sombreado resistente a inundações, (REVILLA, 2000). *Senna alata* (L.) Roxb., *Senna tora* (L.) Roxb., empregada para *Vernonia sp.*, asterácea e outras com grande atividade medicinal popularmente conhecida e empregada por diversas pessoas da região (SILVA et al., 2004).

Informações científicas e tecnológicas de leguminosas da Amazônia Central têm sido geradas por pesquisas multidisciplinares, abrangentes e com propriedades em taxonomia das espécies. A procura de novos constituintes para as formulações química e estrutural de resinas para adesivos e de substâncias bioativas da preservação de madeira, e, ou na produção de novos fármacos, certamente promoverá o uso mais adequado de espécies de leguminosas (JESUS, 2003).

2.2 O Gênero *Senna*

Dentre as espécies da sub-família Caesalpinioideae, o gênero *Senna* tem uma grande representação no Brasil com 42 espécies: *Senna affinis* (Benth) Irwin & Berneby; *S. alata* (L.) Roxb.; *S. alexandrina* Mill; *S. angulata* (Vog) Irwin & Berneby; *S. apocouita* (Benth) Ducke; *S. australis* (Vell.) Irwin & Berneby; *S. bacillaris* (L.f.) Irwin & Berneby; *S. bicapsularis* (L.) Roxb.; *S. cana* (Nees. et Mart.) Irwin & Berneby; *S. fastuosa* Willd. ex Benth.; *S. flexuosa* L.; *S. ferruginea* (Schrad.) Schrad.; *S. georgica* Irwin & Berneby; *S. birsuta* (L.) Irwin & Berneby; *S. leptophylla* (Vog.) Irwin & Berneby; *S. macranthera* (DC. ex Collad.) Irwin & Berneby; *S. martiana* (Bent.) Irwin & Berneby; *S. multijuga* (L.C.Rich.) Irwin & Berneby; *S. obtusifolia* (L.) Irwin & Berneby; *S. occidentalis* (L.) Link; *S. pallida* (Vahl.) Irwin & Berneby; *S. patellaria* DC.; *S. polyphylla* (Jacq.) Irwin & Berneby; *S. pubescens* Mart.; *S. quinquangulata* (L.C.Rich.); *S. reticulata* (Willd.) Irwin & Berneby; *S. riparia* Rafin. *S. rugosa* (G. Don.) Irwin & Berneby; *S. scleroxylon* (Deque) Irwin & Berneby; *S. sericia* Sw.; *S. siamea* (Lam.) Irwin & Berneby; *S. silvestris* (Vell.) Irwin & Berneby; *S. speciosa* Roxb.; *S. sophera* (L.) Roxb.; *S. spectabilis* DC) Irwin & Berneby; *S. splendida* (Vog.) Irwin & Berneby; *S. tora* (L.) Roxb.; *S. trachypus* (Benth.) Irwin & Berneby; *S. uniflora* (Mill.) Irwin & Barneby (SILVA et al., 2004).

Muitas espécies apresentam amplo potencial biotecnológicos, onde alguns compostos químicos isolados, como os taninos, testados na aplicação de adesivos e

preservante de madeira (VITAL et al., 2001) e triterpenos que podem ser usados nos processos de industrialização de produtos farmacêuticos (JESUS, 2003), dentre outros.

2.2.1 A espécie *Senna reticulata*

A espécie *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby oferece grande contribuição à medicina alternativa por seus efeitos terapêuticos. Entretanto, vários outros aspectos biotecnológicos podem ser explorados nesta espécie. Neste contexto, surge a possibilidade de verificar seu potencial para a produção de fungicida que possa atuar no combate aos fungos que deterioram a madeira e, portanto, constituir uma alternativa a preservativos naturais para madeira. O estudo de novos produtos com atividade antifúngica e, ou antitermitas não tóxicos ao meio ambiente é um dos aspectos importantes para o conhecimento científico e aplicações biotecnológicas dos processos e produtos potenciais de origem vegetal (JESUS et al., 2000).

Senna reticulata (Willd.) Irwin & Barneby é um arbusto que pode atingir até 3m de altura ou mais, com ramificação muito densa, copa ampla e espalhada, inflorescência em racemos terminais com flores amarelas, frutos em vagens, folhas compostas paripinadas em espiral, floresce e frutifica o ano todo, habita áreas úmidas, alagadas e devastadas, (Figura 1), procedente da América do Sul, nativo à Amazônia (PRANCE & SILVA, 1975). Conhecida popularmente como Maria mole, matapasto, matapasto do grande, matapasto verdadeiro, retama, entre outros nomes vulgares,

dependendo da região onde se encontra (SILVA et al, 2004). Tem a seguinte classificação no táxon vegetal: Família: Leguminosae; Sub-família: Caesalpinioideae; Gênero: *Senna*; Espécie: *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby.



Figura1: Espécie *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby no Igarapé do Mundu/Manaus.
Foto: Naimy Castro

Devido a grande quantidade de compostos secundários de origem vegetal isolado e com estruturas químicas determinada, diversas plantas, principalmente da América do sul, estão sendo avaliadas. O gênero *Senna* apresenta várias espécies usadas como fonte de recursos terapêuticos, em função das várias classes de

metabólicos secundários, como alcalóides, terpenos, flavonóides, cumarinas, quinonas, xantonas, etc.

Através de técnicas cromatográficas, muitos compostos são isolados, dos quais com diversificadas atividades biológicas. A separação de constituintes de misturas complexa é realizada, simplificando o processo de análise, onde a repartição dos analitos em frações ou isolados individualmente, se dá entre duas fases uma estacionária e outra móvel. Os analitos (ou extrativos) são eluídos com solventes apropriados com seus índices de polaridade e poder de solvência (tabela 1) (AQUINO NETO & NUNES, 2003).

Tabela1: Solventes usuais para eluição com índices de polaridade e poder de solvência.

SOLVENTE	INDICE DE POLARIDADE, P'	FORÇA DE ELUIÇÃO (SiO₂)	TRANSMISSÃO NO UV, nm
Ciclohexano	0,04	0,03	200
n-Hexano	0,1	0,01	195
Tolueno	2,4	0,22	285
Clorofórmio	4,1	0,26	235
Etanol	4,3	0,68	205
Metanol	5,1	0,73	205
Água	10,2	grande	170

Fonte: Adaptado de AQUINO NETO et al., 2003.

No caso específico da *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby e de outras espécies no gênero *Senna*, além do uso ornamental, a medicina popular usa a infusão da raiz para irregularidades menstruais e nas obstruções do fígado; também é anti-reumática, diurética e febrífuga (PRANCE & SILVA, 1975). Como utilidade na cultura popular, misturado com sumo de limão, o suco das folhas é indicado contra dermatoses. As folhas maceradas gozam de fama como remédio para a tinha e para as feridas sifilíticas; as sementes dessas espécies são consideradas anti-helmínticas e usadas no tratamento de hidropisia; enquanto verde é desprezada pelo gado, devido ao sabor amargo e ao cheiro desagradável que possui, porém, quando furada, constitui alimento rico em proteína, o mesmo acontecendo com as vagens, que são procuradas pelos ovinos, quando secas (CAMPELO, 1982; REVILLA, 2000).

2.3 Considerações gerais sobre a madeira

A madeira sempre desempenhou um papel de destaque na economia nacional. No extrativismo ou no plantio, é um dos recursos naturais renováveis estratégicos proporcionando uma participação e economia avaliada em mais de 5% do PIB nacional. Adoção de medidas visando a sua prevenção é altamente necessária, “garantindo uma maior durabilidade e economicidade na utilização desse recurso natural” (FURTADO, 2000).

Vários fatores favorecem para que a madeira seja utilizada em diversas atividades: resistência mecânica elevada em relação à massa própria; matéria prima

renovável; baixo insumo energético e estéticas agradáveis, apresentando ampla gama de cores e texturas (OLIVEIRA et al., 1986).

Entretanto, a madeira como um material orgânico produzido naturalmente e em razão de sua importância econômica, pode estar sujeita a deterioração por organismos xilófagos os quais podem causar a redução da sua vida útil. Muitas vezes é difícil através de uma inspeção visual se estimar a extensão na qual a podridão ou apodrecimento tenha afetado a estrutura de uma peça de madeira. Quando são aparentes, a perda em resistência mecânica pode ser severa (OLIVEIRA et al., 1986).

Dentre os diversos fatores de degradação, um dos principais inimigos da madeira são os fungos, principalmente os que se alimentam dos compostos da parede celular (SANTINI, 1988). A madeira é degradada biologicamente porque os organismos reconhecem os polímeros naturais da parede celular como fonte de nutrição, e alguns deles possuem sistemas enzimáticos específicos capazes de metabolizá-los em unidades digeríveis (OLIVEIRA et al., 1986).

A madeira é distinta de outros materiais orgânicos por apresentar uma matriz de paredes celulares e espaços vazios (lúme das células) composta de celulose, hemicelulose e lignina. Os extrativos e os compostos inorgânicos também estão presente em menor proporção (CASTRO E SILVA & SILVA, 1991; FENGEL & WEGENER, 1984; LEPAGE, 1986). Dentre as propriedades tecnológicas da madeira a

durabilidades natural é uma das características mais importantes, principalmente com relação aos agentes degradadores como os fungos que causam manchas e os que causam podridão (JESUS, 1991). Esta durabilidade natural deve-se à presença de compostos altamente tóxicos aos organismos xilófagos no lenho e na casca das madeiras, os quais podem inibir o crescimento de algumas espécies de fungos (CASTRO E SILVA & SILVA, 1991; FENGEL & WEGENER, 1984; YATAGAI et al., 1980).

2.4 Os fungos como agentes deterioradores da madeira

Os fungos atacam em geral a madeira que apresenta um teor de umidade favorável ao seu desenvolvimento, além disso, o ataque pode ocorrer de acordo com o tipo de composto químico, podendo causar diferentes tipos de deterioração (OLIVEIRA et al., 1986).

- *Emboladores*: nesta classificação estão os fungos pertencentes à classe dos ascomicetos, deuteromicetos e, menos freqüentemente, ficomicetos que atacam a madeira provocando o emboloramento. Estes fungos preferem as células do parênquima radial devido a grande quantidade de substâncias nutritivas que acumulam, uma vez que se alimentam do conteúdo presente no lume das células.

- *Manchadores*: encontram-se principalmente os ascomicetos e deuteromicetos. As manchas são provocadas pela pigmentação das hifas (estruturas filamentosas) ou devido às substâncias pigmentadas que estas expelem quando são hifas hialinas.
- *Podridão branca*: este tipo de podridão é realizada principalmente pelos basidiomicetos que atacam a parede secundária e a lignina presente na parede celular dos elementos xilemáticos. Podem ocorrer linhas enegrecidas que margeiam a área afetada.
- *Podridão mole*: encontram-se os ascomicetos e deuteromicetos. Neste tipo de podridão as hifas penetram na parede secundária das células, tornando a madeira amolecida e causando degeneração em todas as suas características mecânicas.
- *Podridão parda*: Provocada por basidiomicetos que se nutrem dos hidratos de carbono presente na parede celular. A madeira que sofre este tipo de podridão apresenta-se escurecida e com fissuras por toda a peça. Este tipo de podridão afeta de maneira severa a resistência mecânica da madeira.

Os fungos podem causar podridão ou descoloração da madeira e outros materiais celulósicos. No caso específico da podridão podem enfraquecer e destruir completamente até mesmo as propriedades física-mecânica da madeira. Muitos fungos

que provocam podridão pertencem à classe botânica dos basidiomycetes. Dentre estes, encontram-se os fungos *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes sp.*, que causam grandes perdas de material estrutural devido seu ataque aos componentes químicos da madeira (CASTRO E SILVA & AGUIAR, 2001; OLIVEIRA et al., 1986).

Aqueles fungos que possuem atividade enzimática capaz de degradar a lignina existente na parede celular deixam aparecer a estrutura fibrilar da celulose na parede celular, evidenciando sua seletividade de lignina (CASTRO e SILVA & AGUIAR, 2001).

2.5 Extrativos

O termo extrativo abrange uma variedade de diferentes compostos os quais podem ser extraídos por meio de solventes polares e não-polares. Num senso restrito, extrativos são aqueles compostos os quais são solúveis em solventes orgânicos. Entretanto, alguns carboidratos solúveis em água e compostos inorgânicos também pertencem ao grupo dessas substâncias extraíveis.

O teor e a composição dos extrativos variam entre as espécies vegetais. Mas, há também variações dependendo do sítio geográfico e a estação de crescimento. No caso específico daqueles extrativos encontrados no tecido lenhoso, a sua composição é

mudada durante a secagem da madeira; neste particular, compostos insaturados, gorduras e ácidos graxos são degradados (FENGEL & WEGENER, 1984).

Os extrativos servem para caracterizar a madeira. Estudos têm mostrado que existe uma relação geral entre o teor de extrativos e a durabilidade da madeira (ZHONG-LUH, 1981; BANANEIRA, 1986). Assim, sua resistência ao ataque de insetos ou fungos, odor, cor, flamabilidade, toxicidade e mesmo densidade estão geralmente correlacionados com a presença ou ausência desses compostos.

Atualmente, pesquisadores de todo o mundo voltam-se aos estudos de produtos naturais. Assim, as fontes de metabólitos secundários parecem ser inesgotáveis em relação as possibilidade de se encontrar novas e diferentes estruturas com atividade de extrema importância para vários setores industriais (GRAPE, 1999).

Neste contexto, torna-se necessário realizar os “*screenings*” de extratos vegetais, os quais são constituídos de misturas complexas de compostos. Segundo Ferreira (1998), entre as 250 a 500 mil espécies existentes no planeta, até aquela data, apenas cerca de 15% tinha sido estudada.

Muitos estudos têm mostrado e confirmado a eficácia e a segurança de extratos provenientes de plantas notadamente no uso terapêutico (YAMADA, 1998). Atualmente, existe uma grande quantidade de pesquisas em busca de moléculas ativas nas plantas, organismos marinhos, insetos e microrganismos. Isto pode ser evidenciado, tanto na

área acadêmica como industrial, mostrando que existe uma ligação ou retroalimentação entre ambas.

Os princípios ativos desses extratos são grupos de substâncias encontradas em várias espécies vegetais que lhes conferem determinadas propriedades, permitindo sua utilização num amplo espectro. Essas substâncias são elaboradas pelas plantas a partir de metabólitos primários e variam segundo sua estrutura. A diversidade molecular nas plantas representa um desafio uma vez que um extrato de determinada planta pode conter centenas ou milhares de compostos (HAMBURGER & HOSTETTMANN, 1991). No caso de procura por princípios ativos o que interessa é descobrir compostos que apresenta atividade biológica. Daí a importância e necessidade de estudos guiados pelos bioensaios. Portanto, os estudos com compostos ativos e posteriormente a determinação dos mecanismos de ação devem ser realizados, principalmente quando o efeito biológico demonstrado pelos compostos representa um fato de interesse.

Vários testes têm sido feito com compostos oriundos da madeira. A madeira contém também produtos extraíveis em água e/ ou solventes orgânicos denominados extrativos. Os extrativos compõem uma extraordinária diversidade de compostos e suas proporções exibem ampla variação. Alguns desses componentes são encontrados caracterizando a natureza e quantidade dos extrativos (OLIVEIRA et al., 1986). São encontrados na casca, folhas, flores, frutos e sementes proporcionando a durabilidade e características da espécie e são resultados de modificações sofridas pelos carboidratos no processo fisiológico da árvore.

Os extrativos solúveis em solventes orgânicos incluem ácidos resinosos e graxos, além de seus ésteres, ceras, substâncias insaponificáveis, materiais coloridos, etc. (D'ALMEIDA, 1981). Não há um solvente universal que remova todas essas substâncias sendo cada solvente seletivo para uma ou várias classes. Certas espécies de madeira são naturalmente resistentes ao ataque de organismos xilófagos, e essa durabilidade é atribuída à quantidade e tipo de extrativos encontrados no cerne (HARUN & LABOSKY JR. 1985).

Estilbene, um composto éter monoetil, isolado do cerne de *Pinus* parece ter propriedades fungistática e fungicida (COUTTS, 1970). Taninos também são outros grupos de extrativos encontrados tanto na madeira como na casca e folhas, que inibem o crescimento em meio de cultura de muitos fungos (HARUN & LABOSKY JR, 1985).

Terpenos, terpenóides, esteróides (saponinas) são vários grupos de compostos que ocorrem nas madeiras das folhosas. No contexto amazônico poucos trabalhos foram desenvolvidos com extrativos de vegetais amazônicos no sentido de testá-los contra organismos xilófagos. Os poucos que foram desenvolvidos utilizaram extrativos de casca e madeiras, buscando-se alternativas de uso como preservativos naturais da madeira. Estudos com extrativos obtidos do cerne de várias espécies do gênero *Tetragastris* e *Trattinnickia* contra fungos causadores de podridão branca e parda mostraram a atividade antifúngica desses extratos (JESUS et al., 1993). Mais recentemente Jesus (2003) constatou a potencialidade antifúngica de frações do ritidoma das espécies *Swartzia argêntea*, *S. polyphylla* e *S. sericea* e da casca do caule de *S. panacoco* contra fungos causadores de podridão branca da madeira.

Produtos alternativos no controle da biodegradação da madeira, os constituintes bioativos, isolados de madeira altamente resistente ao ataque de organismos xilófagos e de produtos não-madeireiro vem sendo testado como preservantes ou no tratamento preventivo contra fungos degradadores de madeira (REYES-CHILPA et al., 1997; ARORA & OHLAN, 1997; JESUS et al., 2000).

2.5.1 Terpenos

Os terpenos e seus derivados (Figura 2) como tropolonas, compostos fenólicos, flavonóides, compostos nitrogenados são os principais extrativos encontrados nos vegetais (LEPAGE et al, 1986).

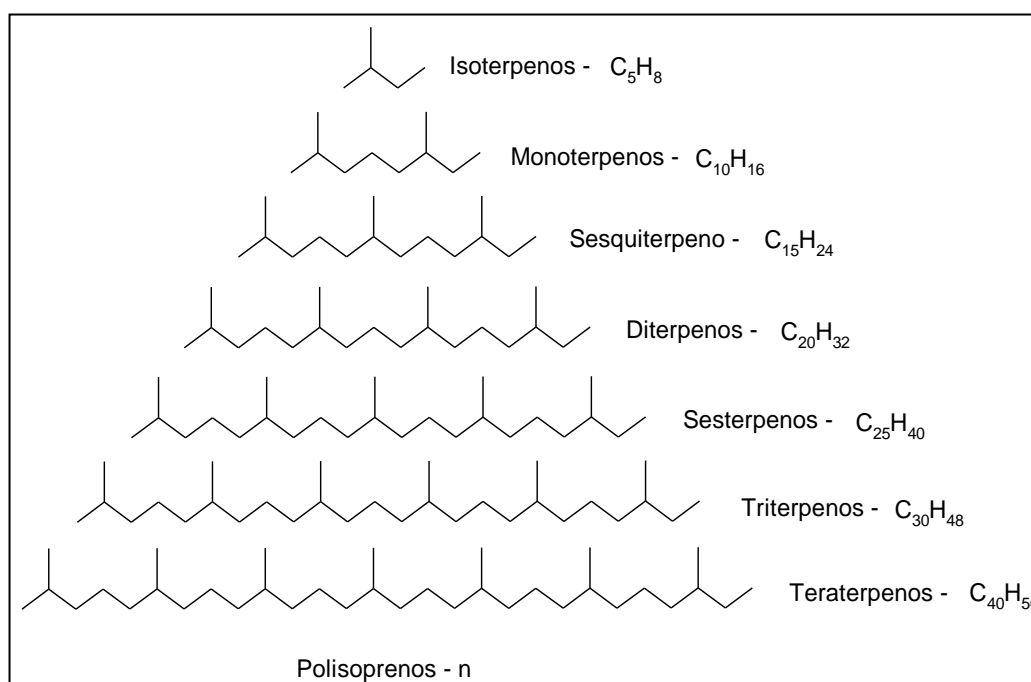


Figura 2: Condensação de unidades de isopreno na formação de terpenóides

Os compostos terpênicos mais freqüentes são os monoterpenos (cerca de 90% nos óleos voláteis) e os sesquiterpenos. Já os diterpenos são encontrados apenas em óleos voláteis extraídos com solventes orgânicos (STEINEGGER & HANSEL, 1992). Podem ser encontrados nos pêlos glandulares, canais oleíferos ou em bolsas lisígenas, folhas, flores, casca do caule, madeira, raízes, rizomas, frutos ou sementes. Esses extrativos podem desempenhar funções ecológicas diversificadas na proteção contra predadores, na proteção contra perda de água (óleos) e aumento na temperatura, polinização, efeito alelopáticos e tóxicos (SIMÕES & SPITZER, 2004).

2.5.2 Tropalonas

Tropalonas (figura 3) são extrativos encontrados no cerne de numerosas espécies da Família Cupressaceae, forma complexos coloridos com metais, notadamente o ferro, ocasionando descoloração na madeira (OLIVEIRA et al., 1986).

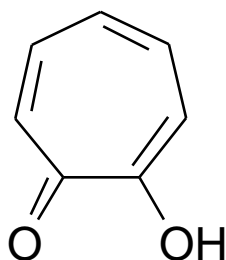


Figura 3: Estrutura básica de tropolona

2.5.3 Compostos fenólicos

Dentre os compostos fenólicos, pertencentes ao metabolismo dos vegetais, ocorrem com mais freqüência os flavonóides, estilbenos, quinonas, lignanas e taninos (OLIVEIRA et al., 1986).

Os flavonóides são grupos de compostos fenólicos que se baseiam num esqueleto (C₁₅), oriundo da estrutura da flavana (Figura 4) no qual um grupo fenil propano está ligado a um segundo anel aromático e ocorrem combinados com açúcares, através de um de seus grupos hidroxilas, tornando-os mais solúveis, de forma a facilitar o transporte no vegetal (OLIVEIRA et al., 1986). Representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural, principalmente nas angiospermas, onde são mais abundantes (ZUANAZZI & MONTANHA, 2004).

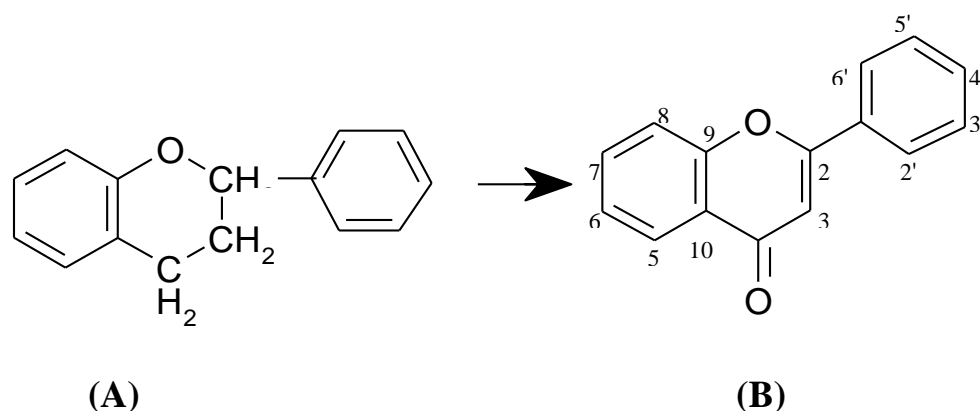


Figura 4: A - Estrutura da Flavana; B - Núcleo Fundamental dos flavonóides e sua numeração.

Os flavonóides podem ser encontrados em diversas formas estruturais (figura 5). A maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental. São conhecidos mais de 4.200 flavonóides diferentes, sendo que o número de novas estruturas identificadas dobrou nos últimos vinte anos, os encontrados nas folhas podem ser diferentes daqueles presentes nas flores, nos caules ou ramos, raízes ou frutos, podendo ocorrer em diferentes concentrações, dependendo do órgão vegetal em que se encontra (ZUANAZZI & MONTANHA, 2004). Possuem diversas funções: proteção contra a radiação UV, contra insetos, fungos, vírus e bactérias, na polinização, antioxidantes, controle hormonal dos vegetais, alelopatia, inibidores de enzimas e como marcadores taxonômicos (HARBORNE, 1989; HARBORNE & WILLIAMS, 2000).

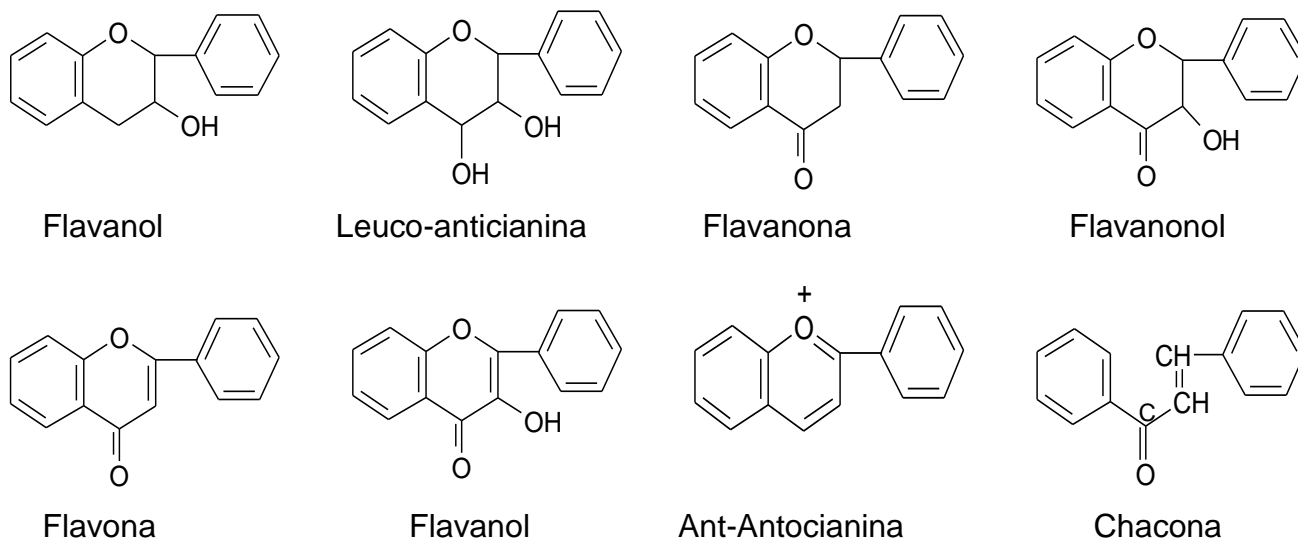


Figura 5: Compostos do tipo flavonóides que ocorrem em diversas espécies arbóreas.

Os estilbenos (Figura 6), são extrativos que ocorrem no cerne de *Pinus* na forma de Pinosilvin e seu éter monometílico, enquanto outros hidroxietilenos ocorrem em espécies de eucalipto (OLIVEIRA, 1986).

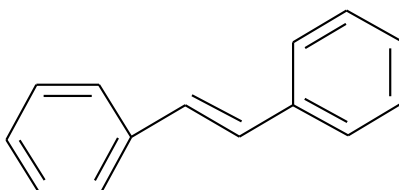


Figura 6: Estrutura básica de Estilbenos

As quinonas são compostos orgânicos que podem ser considerados como produtos de oxidação de fenóis ou a sua redução pode originar os correspondentes fenóis. Por suas atividades biológicas, podem ser usadas como fonte de corantes naturais e são encontradas em bactérias, fungos, líquens, gimnospermas e angiospermas, além dos equinodermos e insetos, dentre as mais de 1.500 quinonas conhecidas até o momento (THOMSON, 1971). São três os principais grupos de quinonas (Figura 6), nos quais se enquadra a maioria dos compostos conhecidos atualmente: benzoquinona (Figura 6A e 6B), naftoquinona (Figura 7C e 7D) e antraquinona (Figura 7E e 7F) (FALKENBERG, 2004).

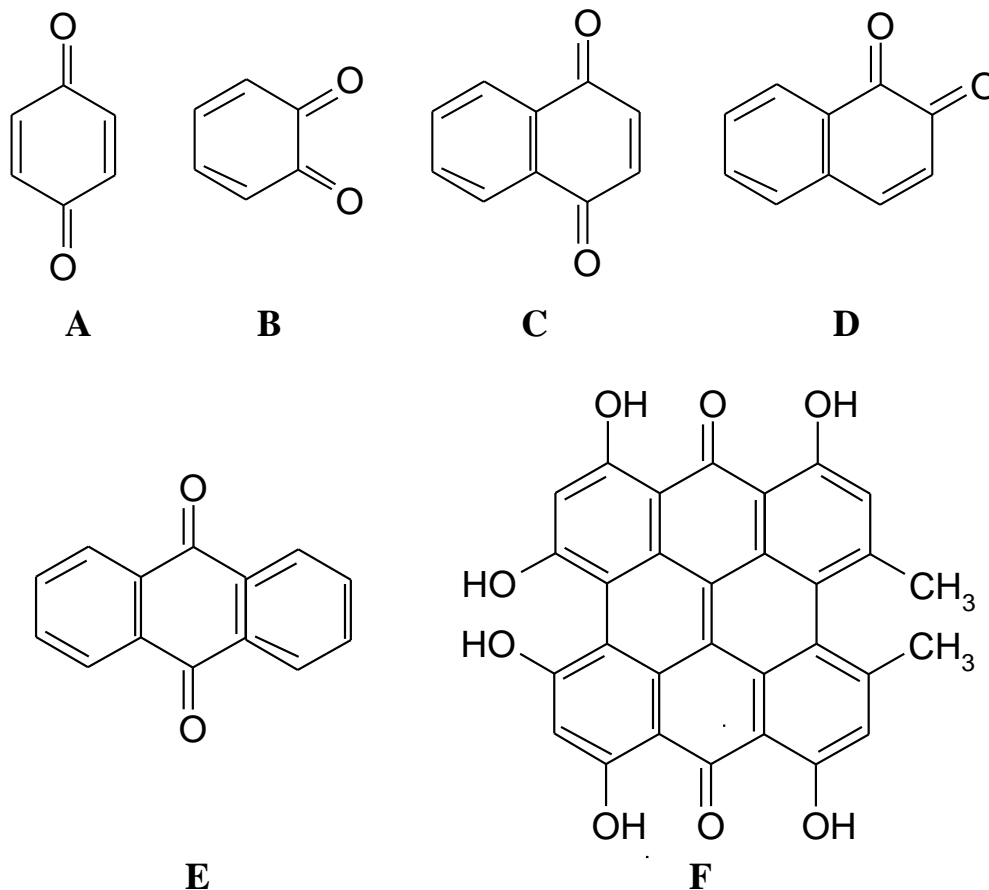


Figura 7: Estruturas básicas de quinonas: A = 1,4-benzoquinona (ou p-benzoquinona); B = 1,2-benzoquinona (ou o-benzoquinona); C = 1,4-naftoquinona; D = 1,2-naftoquinona; E = 9,10-antraquinona e F = hipericina

Dentre as quinonas, as antraquinonas é que apresenta maior número na natureza, daí sua importância farmacêutica. Em plantas superiores, encontram-se antraquinonas, sobretudo nas famílias Rubiaceae, Caesalpiniaceae, Rhamnaceae, Polygonaceae, Liliaceae, Verbenaceae e Asphodelaceae (FALKENBERG, 2004).

Para a sub-família botânica Caesalpiniaceae, são típicas as antraquinonas do tipo emodina-crisofanol, embora benzoquinonas

e outros tipos de quinonas como os neoflavonóides de cadeia aberta derivados da dalbergiona (Figura 8) também tenham sido relatadas (FALKENBERG, 2004). Para abordagem quimiotaxonômica dessa família e, sobretudo dos gêneros *Cássia* e *Senna*, de difícil sistemática, as antraquinonas foram de grande importância (HEGNAUER e HEGNAUER, 1994).

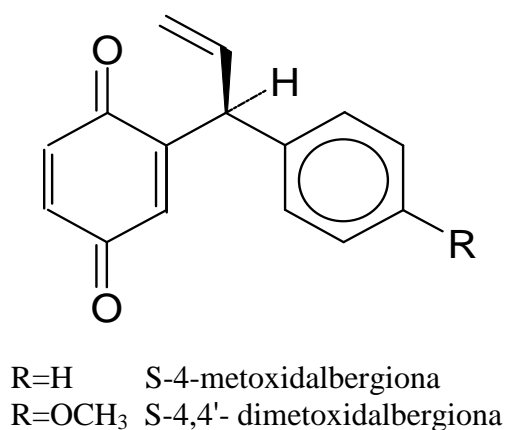


Figura 8: Exemplo de dalbergiona, precursoras de neoflavonóides em Caesalpiniaceae.

Várias quinonas encontradas no lenho de espécies de Leguminosas apresentam toxicidade para cupins aumentando a resistência da madeira e seu valor comercial, muito embora, possam funcionar na defesa da planta contra insetos e outros patógenos, além de apresentarem atividades alelopáticas. Além disso, estão incluídas entre os pigmentos naturais utilizados como corantes alimentares (Figura 9) e laxantes (FALKENBERG, 2004).

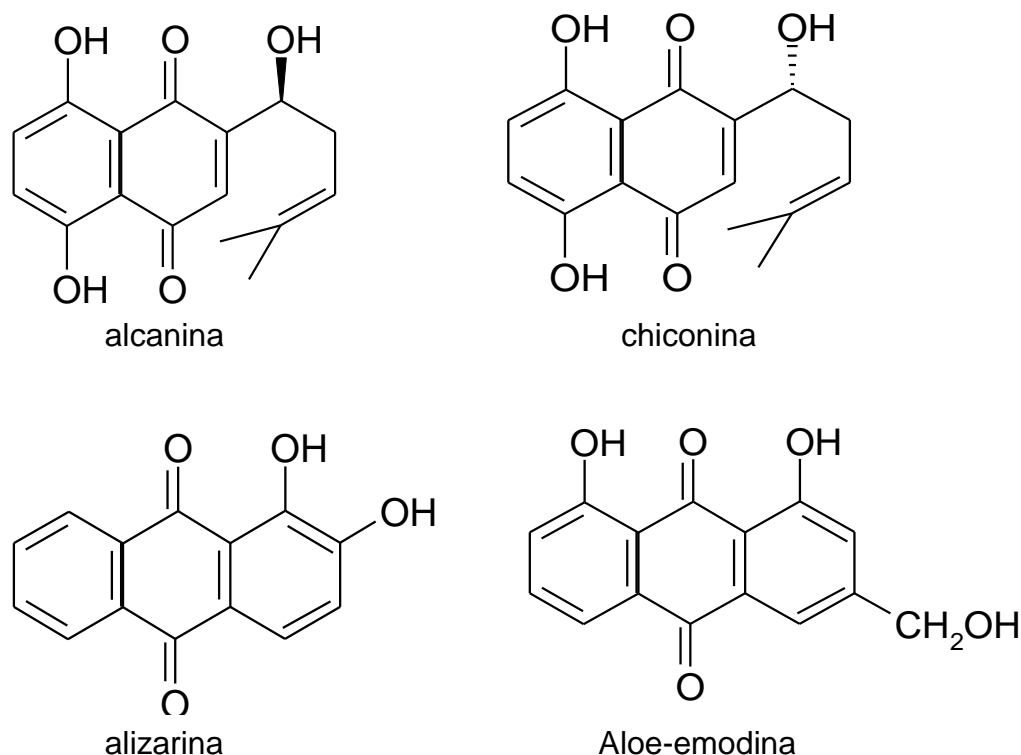


Figura 9: Quinonas empregadas industrialmente como corantes e outras finalidades.

Na farmacopéia, muitas drogas vegetais clássicas são utilizadas em diversas patologias. De *Senna alexandrina* Mill (Caesalpiaceae) derivados antracênicos, com uso laxante, foram isolados de folíolos e frutos, com teor de glicosídeos antranóides maior nos frutos – cerca de 5% - que nos folíolos – cerca de 3% (WESTENDORF, 1993), sendo que a mesma dose, folíolos apresenta efeito laxante mais intenso que o fruto, devido o teor de aloe-emodina, que possui maior atividade, ser mais alto (WAGNER, 1988). Na tabela 3 e figura 10, pode-se observar, diferentes agliconas e glicosídeos de diantronas, oriundos da combinação de antronas (HARNISCHFEGER & STOLZE, 1983).

Tabela 2: Agliconas e glicosídeos diantrônicos de folhas e frutos de *Senna Alexandrina* Mill

AGLICONA	COMBINAÇÃO DE ANTRONAS	GLICOSÍDEOS
senidina A	reína-antrona/ reína-antrona	senosídeo A
senidina B	reína-antrona/ reína-antrona	senosídeo B
senidina C	reína-antrona/ aloe-emodina-antrona	senosídeo C
senidina D	reína-antrona/ aloe-emodina-antrona	senosídeo D
reidina A	reína-antrona/ emodina-antrona	reosídeo A
palmidina A	aloe-emotina-antrona/emodina-antrona	palmosídeo A

Outras leguminosas, como por exemplo, a *Cassia fistula* L., apresentam sinosídeos A e B, reína e outros antranóides em concentrações menores, podendo ser consideradas como laxantes suaves (WAGNER, 1988).

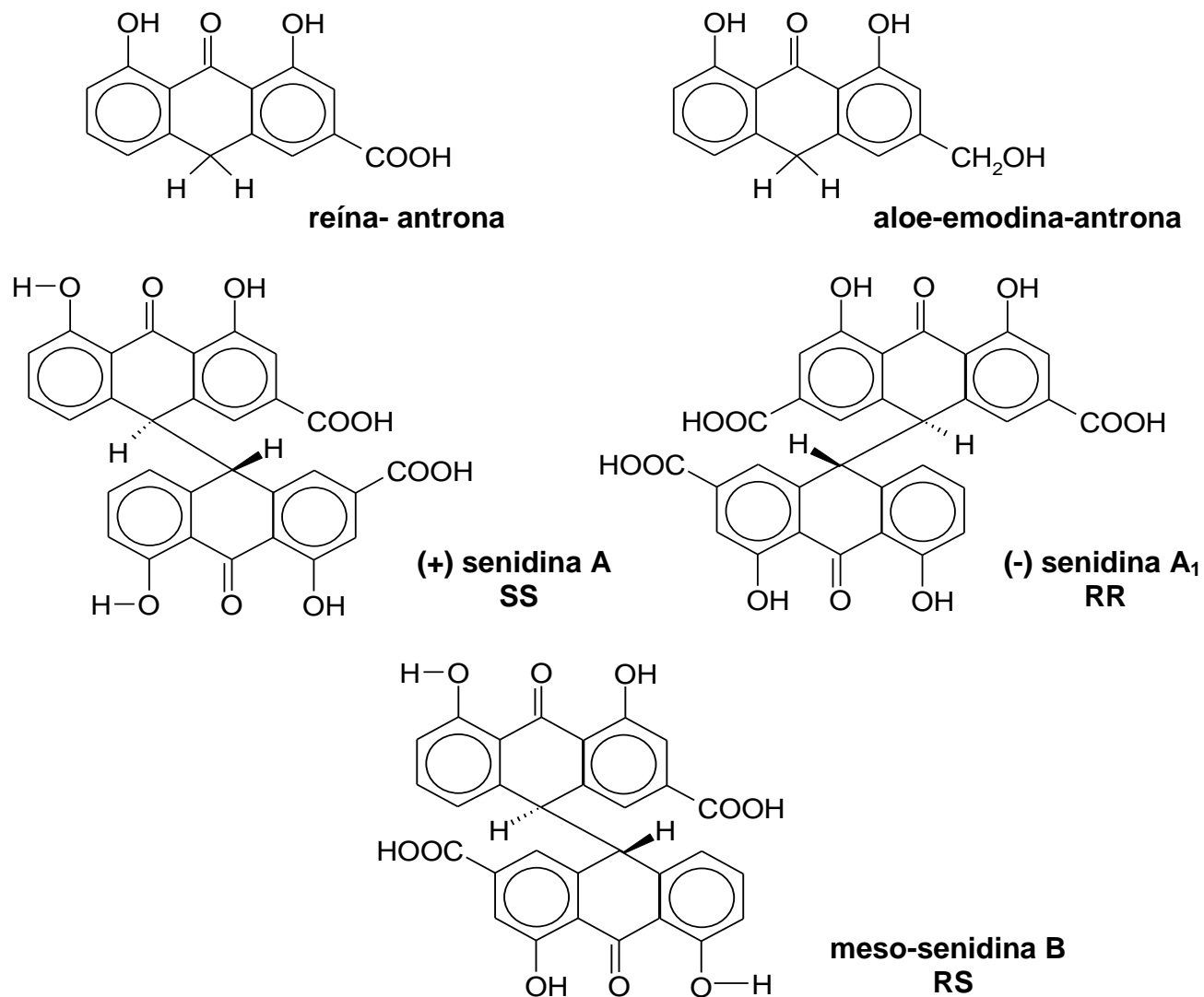


Figura 10: Principais antronas e diantronas encontradas em espécies do gênero *Senna*

As lignanas são macromoléculas, cujo esqueleto é formada de duas unidades de fenilpropano, ligadas pelo carbono β da cadeia lateral C_3 . Fazem parte de um conjunto de macromoléculas denominadas lignóides, onde além dessa estão presentes as Neolignanas, Aloligananas, Norlignanas, Oligolignóides e Heterolignóides (Quadro 1 e figura 11) (BARBOSA FILHO, 2004).

Quadro 1: Grupo de lignóides e compostos isolados de espécies vegetais

Grupo lignóide	Compostos isolados e espécies
Lignananas – formados por álcoois cinamílicos com ácidos cinâmicos.	Pinoresinol (<i>Picea</i> , <i>Pinus</i> e <i>Abies</i>); Ciclolariciresinol (<i>Araucária angustifolia</i> (Bertol.) Kuntze); Álcool di-hidrociniferílico (<i>Larix leptolepis</i> (Siebold et Zucc.) Gordon).
Neolignananas – dímeros oxidativos de alil fenóis e de propenil fenóis, não apresentam o carbono gama (C- γ) oxigenado.	Grandisina (<i>Licaria áurea</i> (Huber) Kosterm); Otobafenol (<i>Osteophloeum platyspermum</i> (Spruce ex. A. DC.) Warb.); Licarina A (<i>Nectandra glabrescens</i> Benth.).
Alolignananas – dímeros mistos de aril-propanóides, ou seja, um dos monômeros apresenta o C- γ oxigenado e o outro não.	Furoguaiacidina (<i>Guaiacum officinale</i> L.; Acido junaftóico (<i>Juniperus Sabina</i> L.); Carinatol (<i>Virola carinata</i> (Benth.) Warb.).
Norlignananas – é qualquer substância pertencente a um dos grupos acima, com um átomo de carbono menos em um dos precursores primários.	Criptoresinol (<i>Cryptomeria japonica</i> (L.f.) D. Don); Hidroxi-antrotaxina (<i>Metasequoia glyptostroboides</i> Hu et W.C.Cheng); Rataniafenol I (<i>Krameria interior</i> Rose et Painter e <i>Krameria triandra</i> Ruiz et Pav.)
Oligolignóides – são produtos resultantes da condensação de três a cinco unidades fenilpropanóidicas.	Herpetetradiona e Herpetetrol (ou sesquilignana e dilignana, respectivamente) (<i>Herpetospermum caudigerum</i> Wall. Ex Chakr.)
Heterolignóides – constituídas de moléculas de estruturas diversas.	Quielcorina (<i>Kielmeyera coriacea</i> Mart.); xantonolignóide e propacina (<i>Protium opacum</i> Swart); cumarinolignóide e o complexo lignana-iridóide-glicosilado (<i>Buddleja davidii</i> Franch.).

Fonte: Modificado de BARBOSA FILHO, 2004.

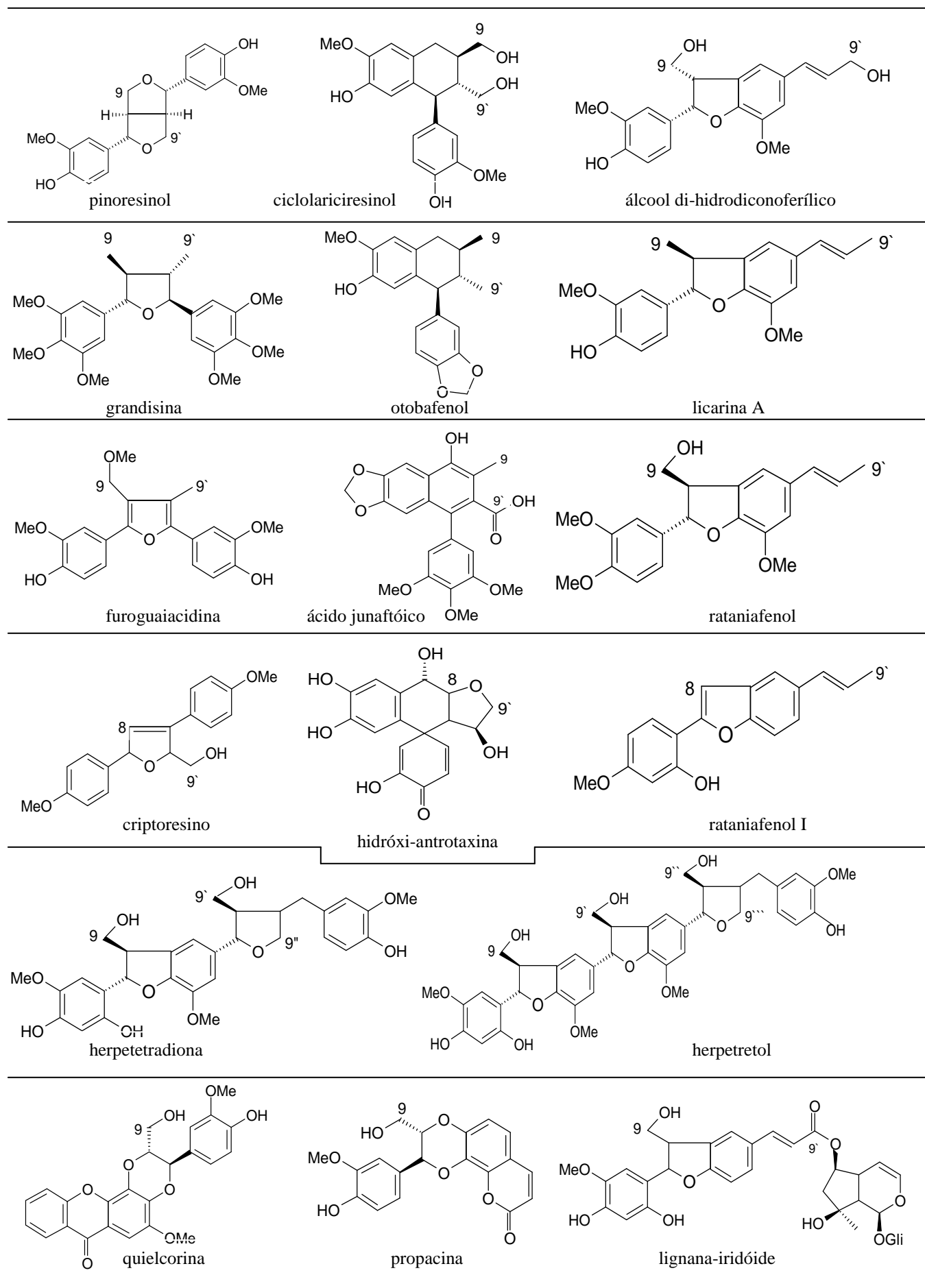


Figura 11: Exemplos de estruturas de lignóides

Mais de 500 lignóides estão relatados na literatura, desse total, 90% pertence ao grupo das lignanas e neolignanas (Figura 12 e 13) e pelo menos quatro dezenas de esqueletos carbônicos diferentes são conhecidos, são amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo as lignanas com maior ocorrência em plantas lenhosas e as neolignanas com predominância nos arbustos, dentre as espécies mais pesquisadas, os gêneros *Aniba*, *Licaria*, *Nectandra* e *Ocotea* (Lauraceae), apresentam centenas de lignóides já isolados (BARBOSA FILHO, 2004).

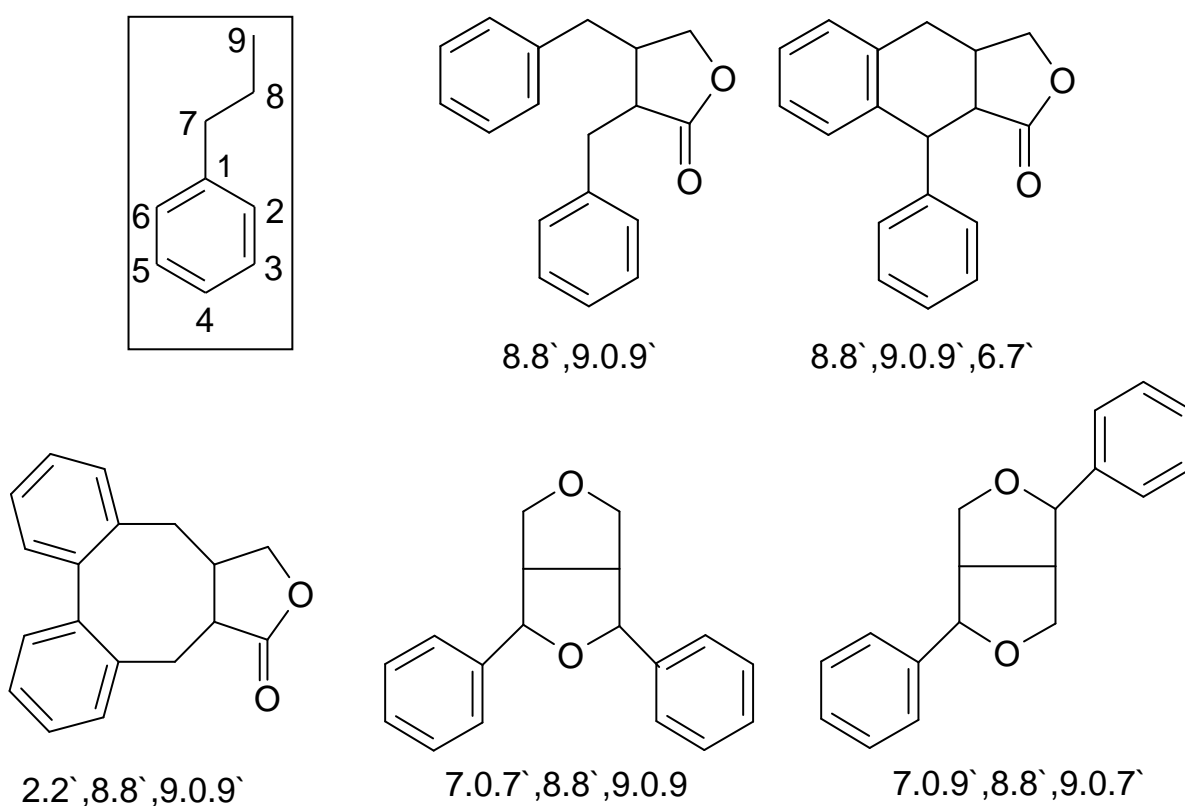


Figura 12: Esqueletos clássicos de lignanas

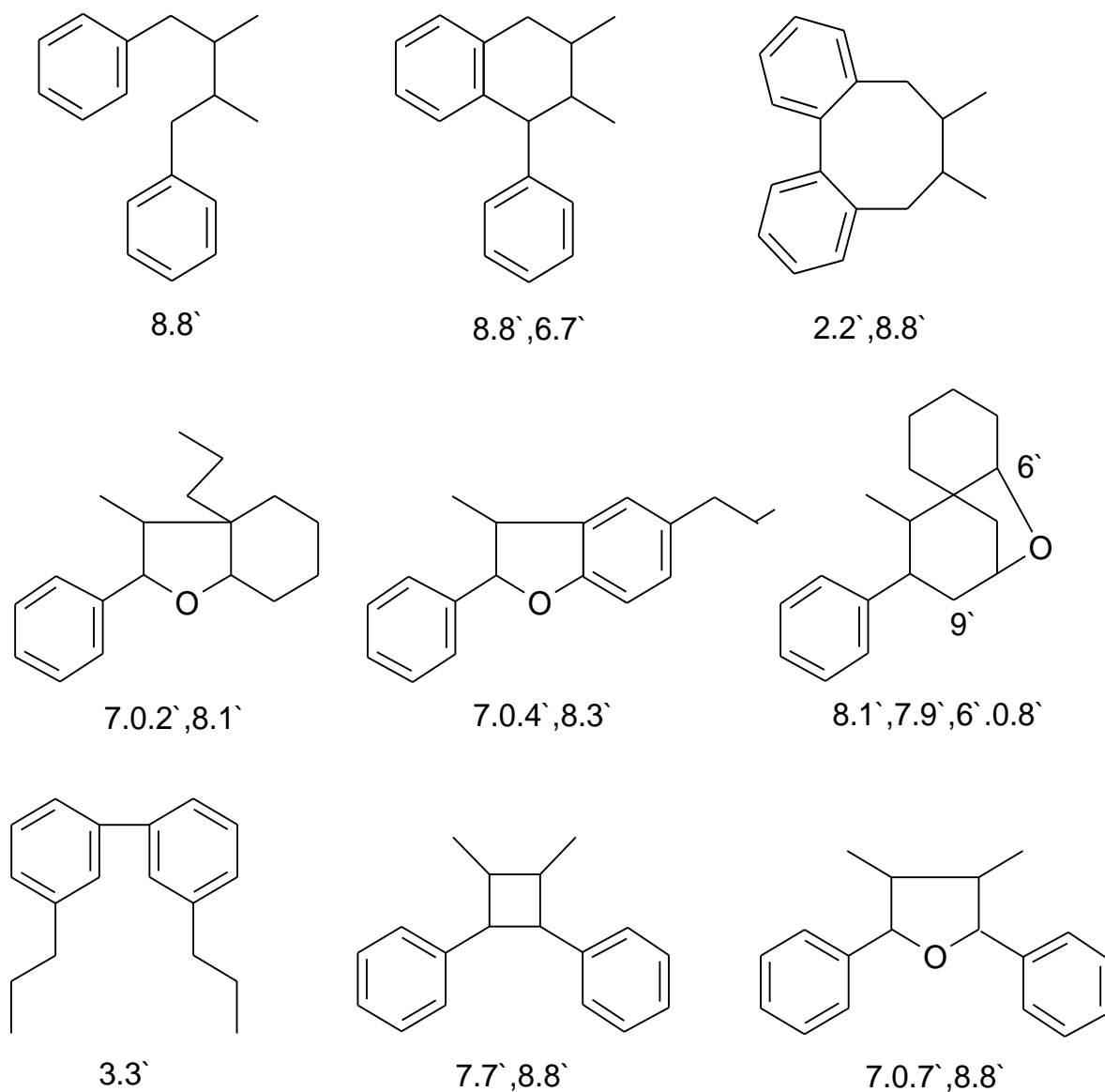


Figura 13: Esqueletos clássicos de neolignanas

Os lignóides estão relacionados como indicadores do processo evolutivos em angiospermas e desempenham papel na adaptação ecológica, interações de plantas com fungos, insetos ou com outras plantas (GOTTLIEB, 1982). Em madeiras as neolignanas tem respostas ao ferimento mecânico ou ao ataque de microrganismos,

como o ácido nordi-hidroguaiaretico (Figura 14), isolado de *Larrea cuneifolia* Cav. (*Zygophyllaceae*), que apresenta atividade antifúngica, antitumoral e antioxidante (BARBOSA FILHO, 2004).

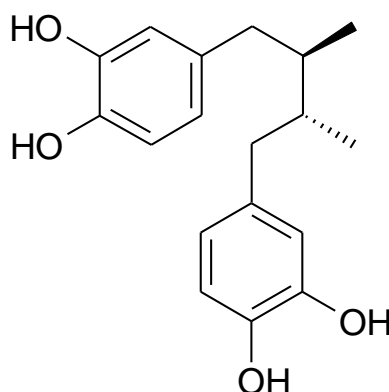


Figura 14: Ácido nordi-hidroguaiaretico

2.5.4 Taninos

Os taninos são substâncias fenólicas solúveis em água com capacidade de formar complexos insolúveis em água com alcalóides, gelatinas e outras proteínas adquirindo propriedades que atuam no controle de insetos, fungos, bactérias e suas atividades farmacológicas, além de sua importância na composição de produtos de origem vegetal (SANTOS & MELLO, 2004).

Uma definição mais precisa e muito empregada atualmente para taninos foi dada por Haslam (1989), segundo o qual o termo designa os metabólitos secundários de natureza polifenólica extraídos de plantas, classificados em dois grupos: as

proantocianidinas, que são os taninos condensados e os taninos hidrolisáveis. Os taninos hidrolisáveis (figura 15) são divididos em galotaninos, que produzem ácido gálico após hidrólise, e em elagitaninos, que produzem ácido elágico após hidrólise (NASCIMENTO & MORAIS, 1996).

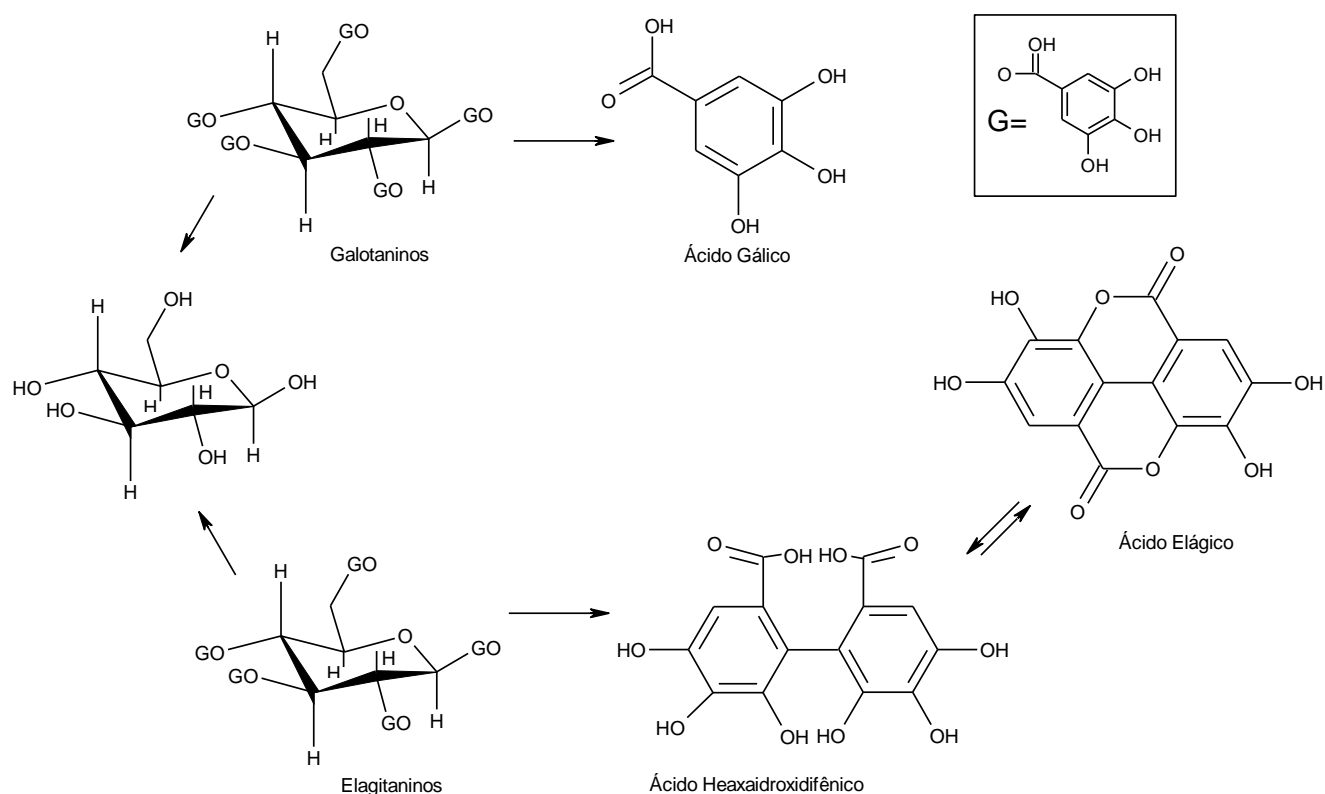


Figura 15: Formação dos taninos hidrolisáveis – Galotaninos e Elagitaninos

Os taninos condensados constituem pelo menos a metade da matéria seca da casca de muitas árvores, e a segunda fonte de polifenóis do reino vegetal. Possuem propriedades antioxidantes, com aplicação na complexação com proteínas, empregados na indústria de couros (HAGERMAN et al., 1997). São oligômeros e

polímeros formados pela poli-condensação de duas ou mais unidades de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol (SANTOS & MELLO, 2004), também denominados proantocianidina (figura 16) devido a pigmentação avermelhada característico das antocianidina (FREUDENBERG & WEINGES, 1958 e 1960).

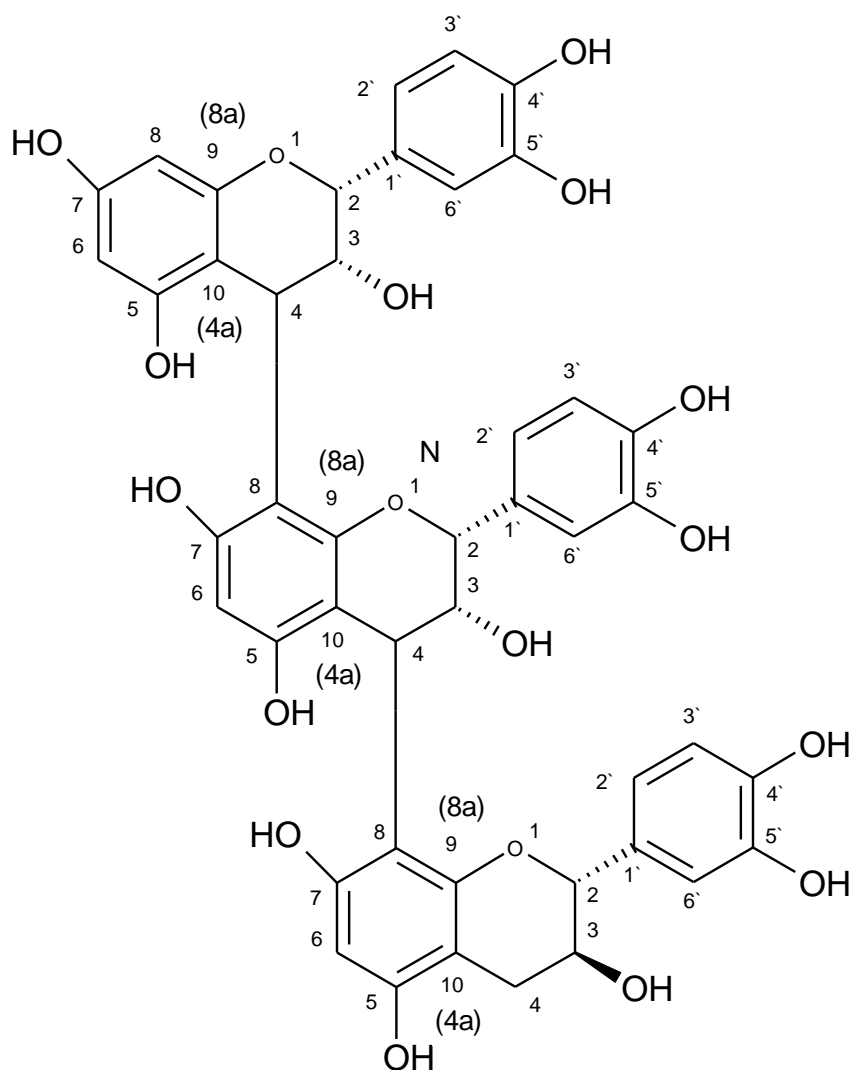


Figura 16: Monômeros de taninos condensados: Proantocianidina glicosiladas, diméricas e triméricas isoladas de a partir do licor da semente de cacau (*Theobroma cacao* L., Sterculiaceae).

Taninos hidrolisáveis e condensados se distribuem no reino vegetal seguindo padrões significativamente diferentes. Os hidrolisáveis são restritos as Choripetalae das dicotiledôneas, com ocorrência em dicotiledôneas herbáceas e lenhosas e utilizados como marcadores taxonômicos, enquanto que os taninos condensados exibem ampla distribuição em Gymnospermas e Angiospermas, com ocorrência em plantas lenhosas (SANTOS & MELLO, 2004).

Plantas ricas em taninos são empregadas no tratamento de diversas moléstias na medicina tradicional (DE BRUYNE et al., 1999a, DUFRESNE e FARNWORTH, 2001). Testes *in vitro* realizados com extratos ricos em taninos ou com taninos puros têm evidenciado diversas atividades biológicas tais como bactericida e fungicida (SCALBERT, 1991; CHUNG et al., 1998), antiviral (OKUDA et al., 1993; DE BRUYNE et al., 1999b), inibição de enzimas (HATTORI et al., 1990 e OOSHIMA et al., 1993), ação antitumoral (WANG et al., 1999; DUFRESNE e FARNWORTH, 2001) dentre outras, além das atividades farmacológicas, comuns aos dois grupos de taninos como complexação com íons metálicos, antioxidante e seqüestradora de radicais livres, complexar com outras moléculas, inclusive com proteínas e polissacarídeos (SANTOS & MELLO, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODO

A metodologia adotada compreendeu duas fases distintas para obtenção dos dados. Na **Fase I**, ocorreu a coleta e preparação do material botânico para a produção dos extratos brutos das folhas de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby com solventes orgânicos em diferentes gradientes de polaridades enquanto que na **Fase II**, realizou-se duas cromatografias líquido-sólido (CLS), a partir do extrato que apresentou atividade na fase I, com utilização de solventes em diferentes gradientes de polaridade seguido dos fracionamentos. Todos os produtos das duas fases foram submetidos a testes biológicos com o fungo *Panus crinutus* (L. ex. Fr.) Singer.

3.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

3.1.1 Solventes Utilizados

- Hexano P.A.
- Acetato de Etila P.A.
- Etanol P.A.
- Metanol P.A.

3.1.2 Meio de cultura utilizado

- Ágar-Sabouroud 4% - próprio para isolamento e identificação de fungo

Composição em g/L:

- Peptona de caseína = 5,0
- Peptona de carne = 5,0
- Glicose = 40,0
- Agar = 15,0
- pH a 25°C = 7,0

3.1.3 Suportes para cromatografia e equipamentos

- Silica gel 60 - 0,0063 - 0,200 mm (70-230 mesh ASTM)
- Aparelho de soxhlet
- Rota evaporador
- Liofilizador
- Estufa
- Autoclave
- Placa aquecedora
- Fluxo Laminar
- Termômetro
- Moinho de facas

- Vidrarias: pipetas, balão volumétrico, erlemayer, Becker, condensadores, placas de petri, bastão, etc.
- Outros: espátulas, bisturi, lamparinas, bico de bussen, etc

3.2 Coleta, identificação, secagem e moagem do material botânico

Foram coletadas folhas de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby (Figura 17) em áreas de ocorrências na cidade de Manaus e Parintins, (tabela 3). A identificação botânica foi realizada pela taxonomista botânica Profa. Dra. Marlene Freitas da Silva do Instituto de Tecnologia da Amazônia/ UTAM/UEA e sua exsicata com folha, flor e fruto, encontra-se depositada no Herbário do Instituto de Tecnologia da Amazônia UTAM/UEA. O material coletado foi submetido ao processo secagem ao ar livre e à sombra para evitar qualquer reação química de seus componentes, durante 15 dias, sendo em seguida moídas em moinho de facas (Figura 18 A).



Figura 17: Estrutura da folha de *S. reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby

Tabela 3: Área de ocorrência da coleta de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby.

Espécie	Parte coletada	Local e data da coleta	Amostragem
<i>Senna reticulata</i> (Willd.) Irwin & Barneby	Folhas	Igarapé do Mindú – março de 2003 – Manaus/AM	Amostra de 03 árvores
		Lagoa da Francesa – maio de 2004 - Parintins/AM	Amostra de 02 árvores

3.3 Obtenção dos extratos brutos das folhas de *S. reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby

Para obtenção dos extratos brutos, as folhas devidamente trituradas foram submetidas ao processo de extração a quente em Soxhlet, (Figura 18B) com a utilização de solventes com diferentes gradientes de polaridade: Hexano (C₆H₁₄), Acetato de Etila (C₄H₈O₂), Etanol (C₂H₆O) e Metanol (CH₄O), por um período de 08 horas de extração para cada solvente.

Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo à pressão reduzida (Figura 18C), observando o ponto de ebulição de cada solvente (Tabela 4). Todos os extratos foram liofilizados.



Figura 18: A – Moinho de facas; B - aparelho de Soxhlet; C - Evaporador rotativo

Tabela 4: Ponto de ebulição de solventes orgânicos com diferentes polaridades

SOLVENTE	PONTO DE EBULIÇÃO (°C)	DENSIDADE
Hexano	68,7 (PF)	$d^{25} = 0,6548 \text{ g/L}$
Acetato de estila	77,1 (PF)	$d^{25} = 0,894 \text{ g/L}$
Etanol	78,5 (PF)	$d^{25} = 0,7851 \text{ g/L}$
Metanol	64,6 (PF)	$d^{25} = 0,7867 \text{ g/L}$

3.4 Coleta e identificação do fungo

Para a realização do bioensaio, foi utilizado o fungo *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer (Figura 19), causador de podridão branca em madeira. Corpos frutíferos foram

coletados na Br 174 Km 41 – Manaus/Presidente Figueiredo (Sítio Água Viva). As amostras foram levadas ao laboratório para inoculação em meio de cultura nutritivo Agar-malte (2% p/v) para obtenção de cepas puras, que seriam utilizadas na repicagem com o meio de cultura contendo os extratos.



Figura 19: Corpo frutífero de *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer

3.5 Bioensaios: atividade fungistática ou fungicida dos extratos brutos

O teste de avaliação do crescimento do fungo nos extratos foi realizado utilizando-se a metodologia da placa de petri (Figura 20) contendo meio de cultura. Para cada extrato obtido nos quatro solventes empregados, utilizou-se dois níveis de concentrações: 10^{-2} g/mL e 10^{-3} g/mL, pesado em balança analítica de precisão adicionado ao meio de cultura Agar-Sabouroud, pH 5,2 e homogeneizado em placa aquecedora. Cada meio de cultura contendo as concentrações de extrato foi vertido em

placa de petri. Após solidificação do meio, amostra do fungo *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer foi repicado no centro da placa (na testemunha e nas concentrações consideradas). As culturas foram mantidas em temperatura ambiente para crescimento.



Figura 20: Esquema do teste biológico realizado com *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer em presença do extrato de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby

A quantificação do crescimento micelial foi realizado através da mensuração diária da progressão linear da fronteira micelial em cada placa de petri, medida no sentido vertical e horizontal, num período de 13 dias, período necessário para o crescimento do fungo em toda a placa. Todos os tratamentos foram realizados em

triplicatas (Figura 21A). As amostras testemunhas compreenderam o crescimento do fungo em meio Agar- Sabouroud sem acréscimo de extrato (Figura 21B).

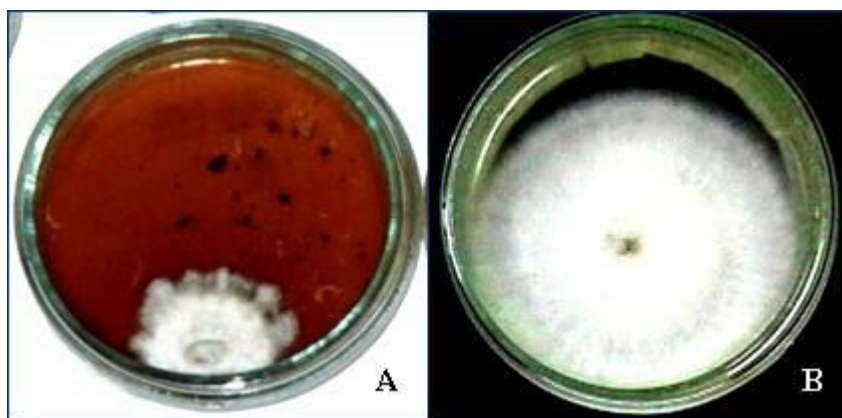


Figura 21: Cultura do fungo *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer em meio de cultura - **A:** com extrato; **B:** sem extrato

Para análise estatística dos dados foi utilizado o Software STATISTICA 7.0. A figura 22 mostra o procedimento adotado nesta fase.

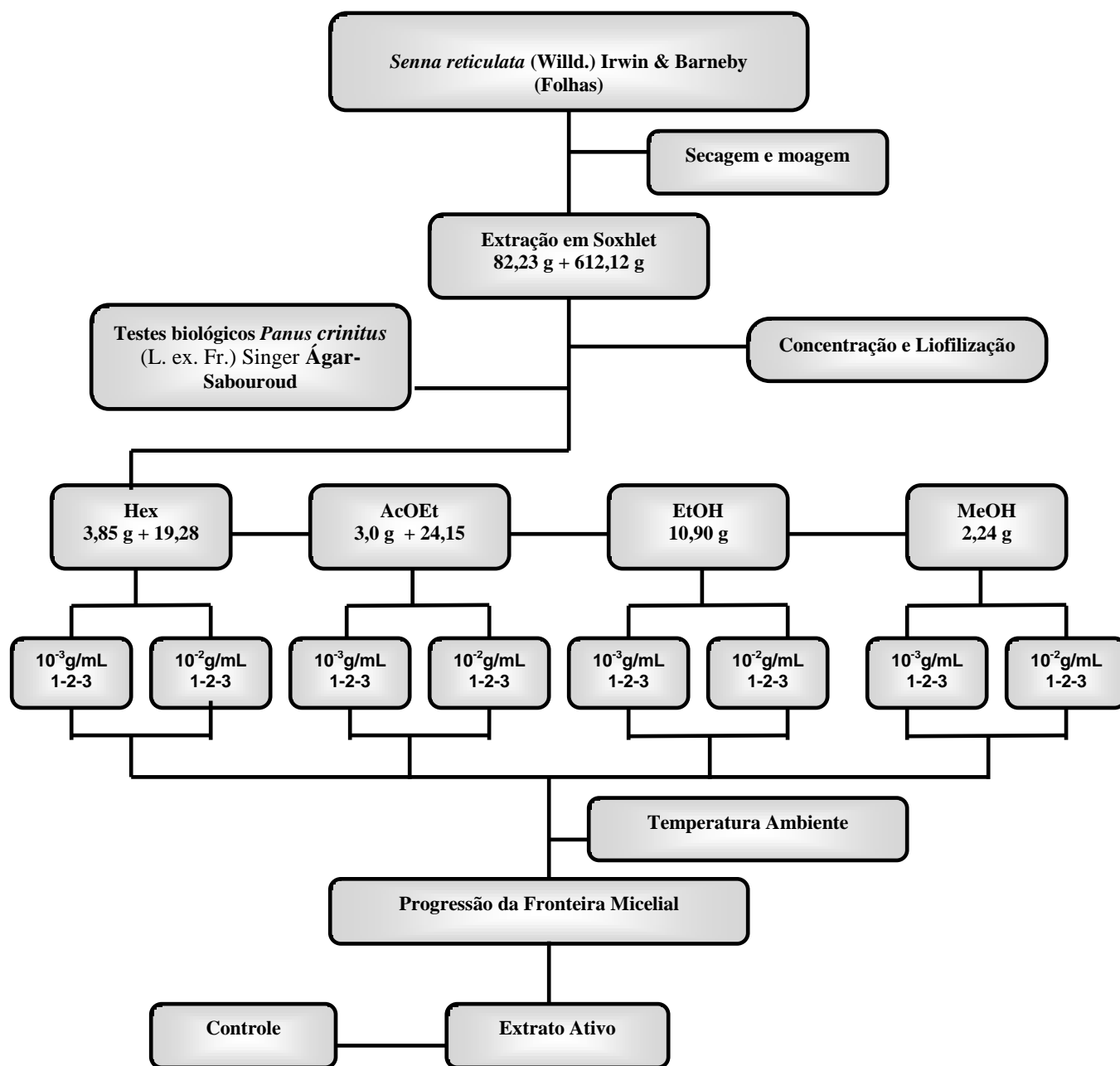


Figura 22: Esquema do procedimento adotado na primeira fase da metodologia.

3.6 Cromatografia Líquido-sólido (CLS)

A CLS envolve uma fase móvel líquida (solvente) e uma fase estacionária finamente dividida (sílica), percorrendo as colunas pela ação da gravidade (Figura 23). O papel do solvente na CLS é evidentemente fundamental, pois as moléculas da fase móvel competem, pelos sítios de adsorção polar, com as moléculas do soluto. Os compostos mais bem separados pela CLS são os solúveis em solventes orgânicos e não-ionógenos (VOGEL, 1992). Para o desenvolvimento desta etapa metodológica, foi realizadas duas colunas cromatográficas líquido-sólido (CLS). A primeira (CLS 1) com o extrato bruto que apresentou atividade biológica com os fungos e a segunda (CLS 2) com a fração obtida da primeira que também apresentou atividade biológica com o fungo.

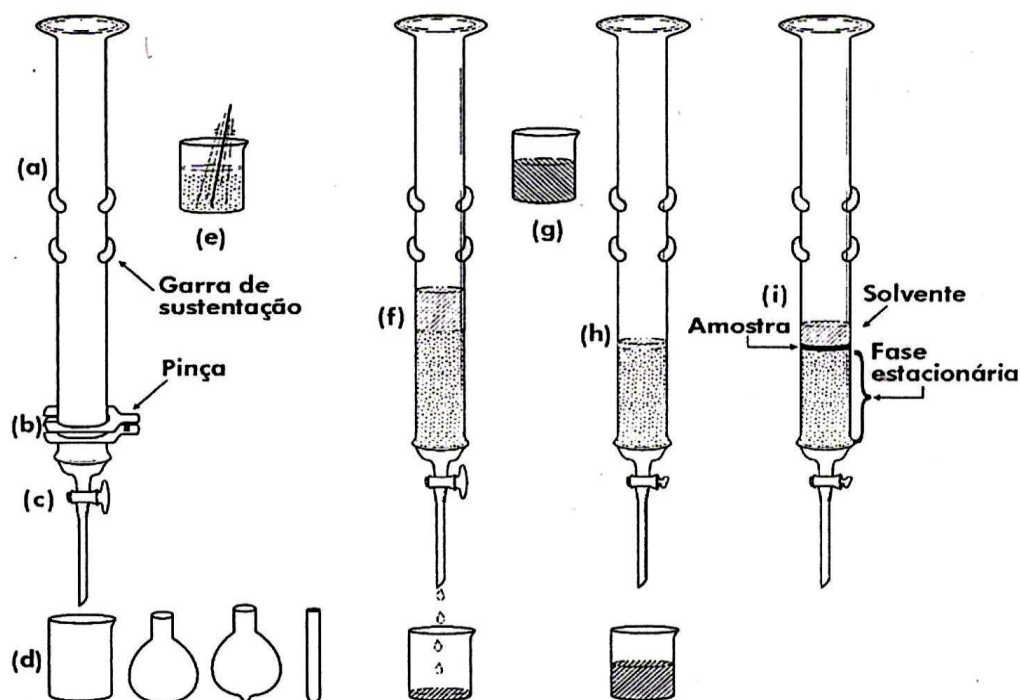


Figura 23: Esquema da preparação da coluna cromatográfica líquido-sólido (CLS)

3.6.1 CLS 1

Para realização da CLS 1, o extrato bruto acetato de etila de folhas de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby (que apresentou atividade biológica) foi pesado (19,28 g). Com a sílica gel 60 - 0,0063 - 0,200 mm (70-230 mesh ASTM) preparou-se a pastilha (extrato misturado à sílica com auxílio de solvente até obter uma substância homogênea e seca).

A CLS 1 ($\Phi \times h = 2,5 \times 20$ cm), contendo sílica gel 60 - 0,0063 - 0,200 mm (70-230 mesh ASTM) foi empacotada com hexano. Com o equipamento preparado foi adicionada a pastilha (amostra a ser analisada), tendo o cuidado que a mesma permanecesse no topo da coluna (Figura 23i). Os solventes de eluição utilizados foram Hexano, Acetato de Etila e Metanol. Para mudar a natureza do solvente, deixou-se o solvente tangenciar o topo da coluna, antes de adicionar o próximo solvente.

3.6.2 Fracionamento e testes biológicos

As frações resultantes da CLS 1, (Hexano, Acetato de Etila e Metanol) foram concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida e em seguida submetidas novamente a testes biológicos com o fungo *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer, seguindo a metodologia adotada na primeira etapa (Figura 20). A figura 24 mostra o procedimento adotado nesta fase.

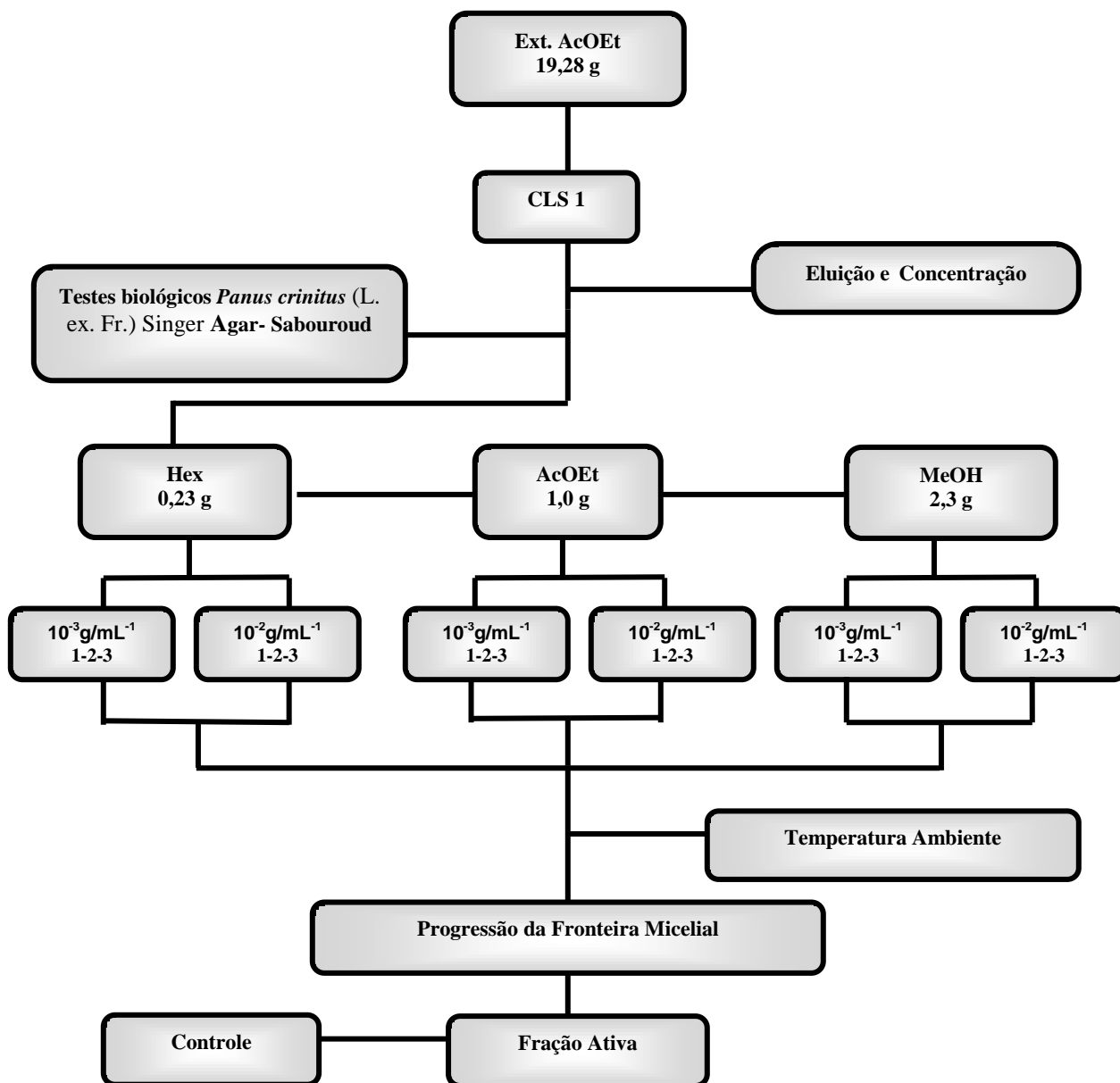


Figura 24: Esquema do procedimento adotado na CLS 1

3.6.3 CLS 2

A CLS 2 foi realizada baseada nos resultados dos testes biológicos da CLS 1, ou seja, com a fração que apresentou atividade biológica com o fungo, nesse caso a Fr.MeOH. O procedimento adotado foi o mesmo da coluna anterior (Figura 23). Para esta coluna os solventes de eluição utilizados foram: AcOEt, AcOEt + MeOH 1:1 e MeOH. As sub-frações resultantes foram submetidas novamente a testes biológicos com o fungo *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer (figura19). A figura 25 mostra o procedimento adotado nesta fase.

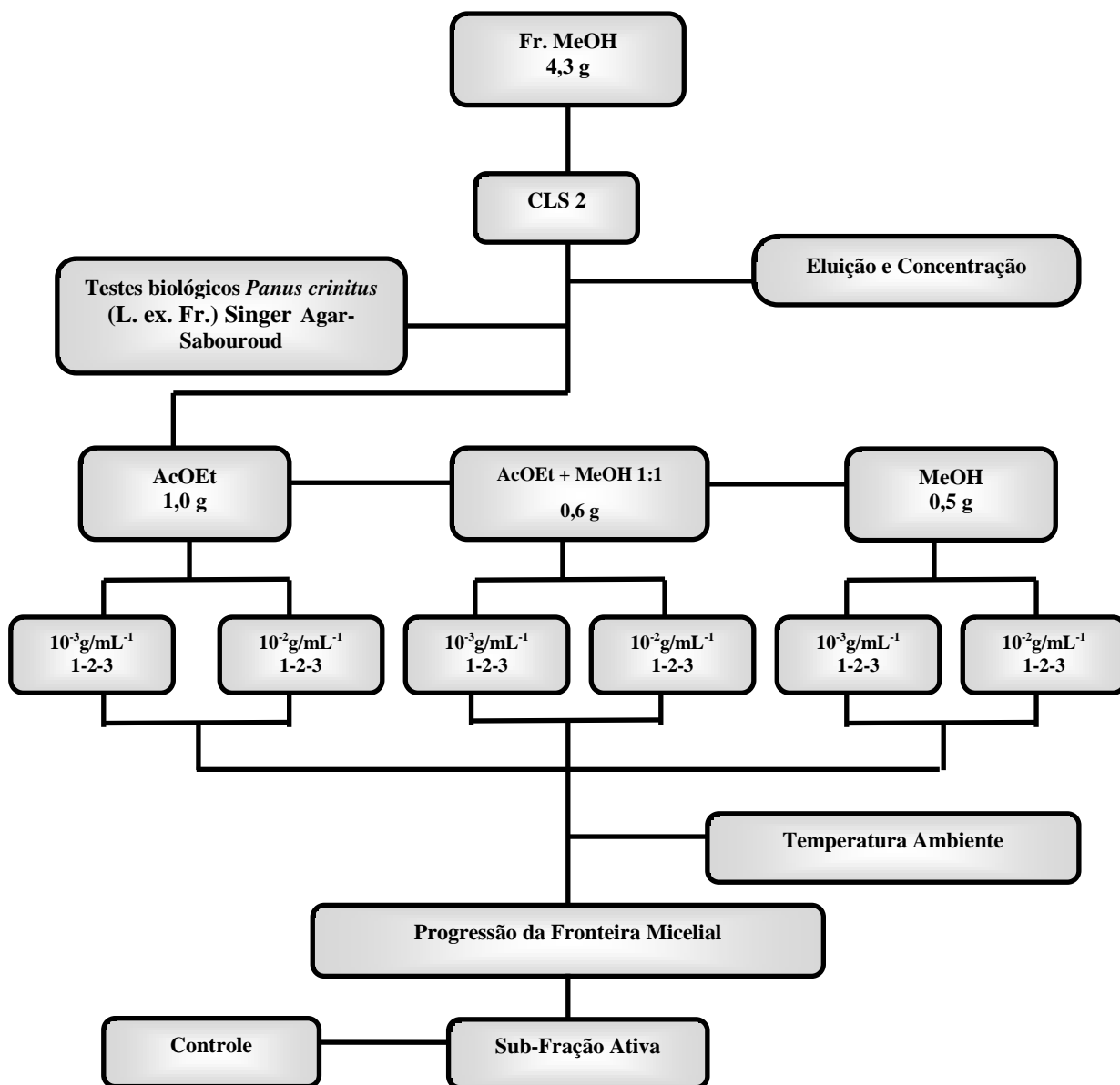


Figura 25: Esquema do procedimento adotado na CLS 2.

4 RESULTADOS

Avaliamos o crescimento do fungo *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer na presença de vários extratos obtidos através de diferentes solventes (hexano , acetato de etila, etanol e metanol) em extração com soxhlet e coluna cromatográfica.

4.1 Rendimento dos extratos brutos

Os rendimentos dos extratos das folhas de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby (Tabela 5) variam entre 2,72% e 13,25%. Os de natureza etanólica apresentaram maior rendimento e os de natureza metanólica, menor rendimento. A relação entre os rendimentos de hexano e acetato de etila é muito pequena, enquanto houve uma grande diferença percentual entre etanol e metanol. Este fato pode estar relacionado com o grau de polaridade dos componentes químicos da amostra e seu poder de solvência (Tabela 1).

Tabela 5: Pesos e rendimentos dos extratos brutos obtidos de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby

PARTE DA PLANTA USADA	QUANT. (g)	SOLVENTE ORGÂNICO	EXTRATO (g)	RENDIMENTO (%)
		Hexano	3,85	4,68
Folhas (secas e trituradas)	82,23*	Acetato de Etila	3,0 g	3,65
		Etanol	10,90	13,25
		Metanol	2,24	2,72
			612,12**	Hexano
		Acetato de etila	24,15	3,95

* Primeira extração

* *Segunda extração

4.2 Observação sobre o crescimento do fungo na presença de extrato bruto

O fungo *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer, mostrou um crescimento linear em função do tempo, medido pelo método de crescimento em placa de petri, em temperatura ambiente (28 a 35°C) e meio de cultura sólido de Ágar-sabouroud no período de 13 dias. A influência dos extratos obtidos com diferentes solventes e duas concentrações, no crescimento do fungo *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer, foi mensurada através do avanço da fronteira micelial.

A média da taxa de crescimento, definida como a razão entre a média do avanço da fronteira micelial, em cm, e o número de dias de crescimento do fungo *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer é mostrada na tabela 6. De modo geral, a taxa de crescimento

mostrou-se igual para todos os solventes e todas as faixas de concentrações estudadas, com exceção do crescimento em meio de cultura com a presença do Ext. MeOH. Neste, a taxa de crescimento apresentou valor médio menor, indicando um crescimento mais lento. Como era esperado, na menor concentração testada, a taxa de crescimento é maior. A diferença percentual na taxa de crescimento entre as duas concentrações testadas é de 58,3% para o Ext. Hex. e EtOH. Para o Ext. MeOH é de 75%. Na menor concentração, o crescimento micelial na presença do Ext. MeOH é de 100% menor do que nos outros extratos na mesma concentração. Na maior concentração essa diferença é de 71 - 80% (tabela 6).

Tabela 6: Taxa de crescimento de *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer, em meio de cultura com diferentes extratos de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby.

Solvente	Concentração (mg/ mL)	
	10^{-2}	10^{-3}
Hexano	0,24	0,38
Etanol	0,24	0,36
Metanol	0,12	0,21

O avanço da fronteira micelial apresentou uma resposta linear em função do tempo para todos os extratos (Figura 26). Assim a velocidade de crescimento fúngico (cm/h) pôde ser determinada pela inclinação da reta, sendo que em todos os

tratamentos o coeficiente de correlação foi igual ou maior que 0,97. De modo geral, a velocidade mostrou-se constante para todos os crescimentos (Tabela 7).

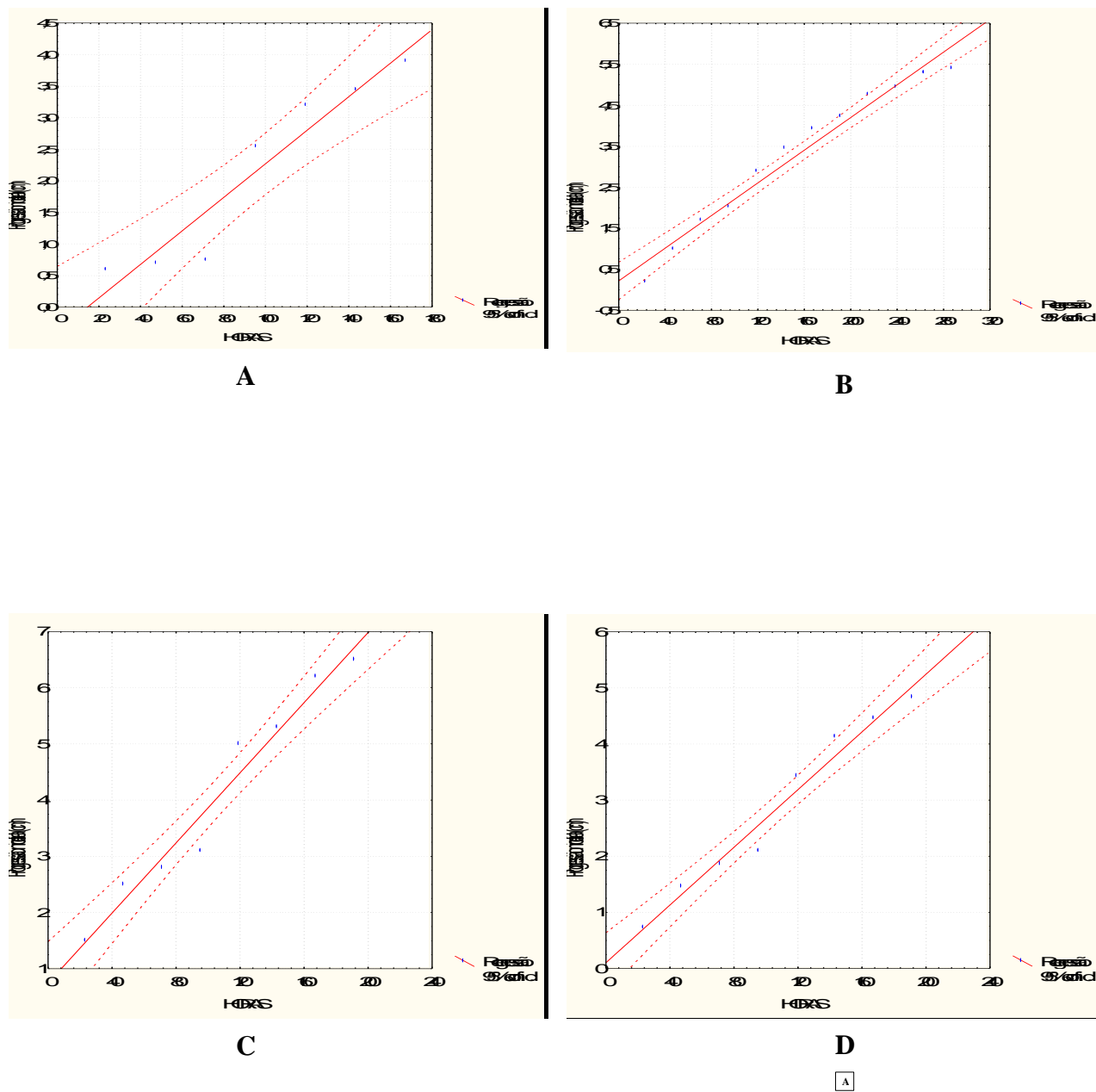


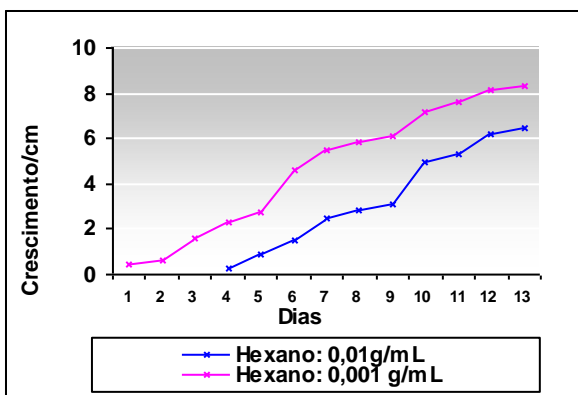
Figura 26: Relação linear entre a progressão da fronteira micelial (cm) e o tempo decorrido de crescimento (h). **(A)** MeOH 10^{-2} g.mL $^{-1}$. **(B)** AcOEt 10^{-3} g.mL $^{-1}$. **(C)** EtOH 10^{-2} g.mL $^{-1}$. **(D)** Hex 10^{-2} g.mL $^{-1}$.

Tabela 7: Velocidade de crescimento (cm/h) de *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer, em meio de cultura com diferentes extratos de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby

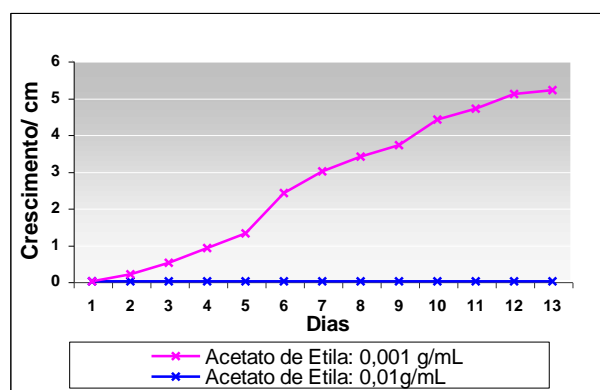
Solvente	Concentração (mg/ mL)	
	10^{-2}	10^{-3}
Hexano	0,020	0,020
Etanol	0,015	0,023
Metanol	0,013	0,020

A figura 27A mostra o resultado do crescimento em meio sólido de Ágar-Sabouroud acrescido do extrato Hexânico obtido das folhas de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby. Na concentração 10^{-3}g.mL^{-1} desse extrato observou-se crescimento micelial vinte e quatro horas após a inoculação, enquanto que na concentração 10^{-2}g.mL^{-1} o crescimento micelial tornou-se visível somente no quarto dia de crescimento (“lag phase”). Aparentemente esse extrato apresenta uma ação fungistática inicial numa concentração maior. Por outro lado, nos extratos obtidos com Acetato de Etila (Figura 27B) concentração 10^{-3}g.mL^{-1} , Etanol (Figura 27C) e Metanol (Figura 27D) ocorreu crescimento micelial vinte e quatro horas após inoculação para ambas concentrações utilizadas. Em todos os extratos o crescimento medido pelo avanço linear da fronteira micelial é menor na concentração de 10^{-2}g.mL^{-1} . Aparentemente, numa baixa concentração o fungo *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer, utiliza esses metabólitos secundários como possível fonte de carbono para seu crescimento. Não encontramos diferenças significativas entre o crescimento no meio contendo diferentes extratos e aqueles sem extratos (TEST), sob as mesmas condições de temperatura.

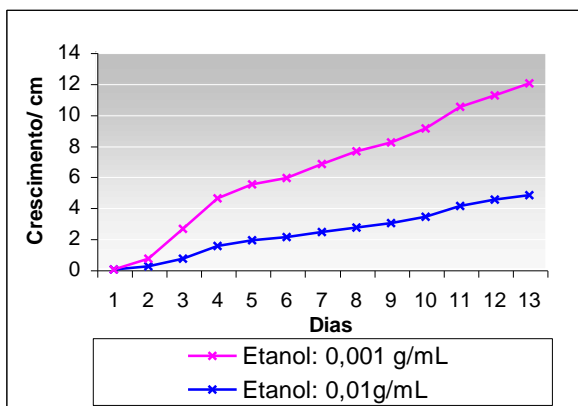
Exceção ocorreu no crescimento onde o meio foi acrescido do extrato AcOEt concentração 10^{-2}g.mL^{-1} (Figura 27B).



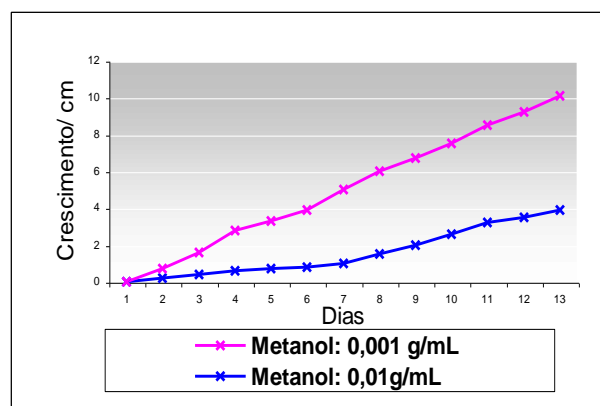
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 27: Progressão da fronteira micelial de *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer, em meio de cultura nas concentrações 10^{-2}g.mL^{-1} (linha azul) e 10^{-3}g.mL^{-1} (linha rosa) dos extratos das folhas de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby obtido com diferentes solventes: Hexano(A), Acetato de etila (B), Etanol(C) e Metanol (D).

Com o intuito de verificar se havia diferença significativa estatisticamente entre a média de crescimento dos vários tratamentos, realizou-se o teste de análise de variância (ANOVA). A tabela 8 mostra o resultado do teste da ANOVA para todos os solventes e todas as concentrações testadas, incluindo o controle (crescimento sem a presença de extrato no meio de cultura). Estatisticamente existem diferenças entre os diversos tratamentos, levando a inferir que algum(s) do (s) extrato (s) e em uma das concentrações testadas estaria (m) exercendo influencia no crescimento do fungo *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer.

Tabela 8: Teste de ANOVA do crescimento de *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer em meio de cultura com extratos de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	p
Tratamento	7	147,40	21,058	4,50*	0,000113
Resíduo	195	911,94	4,67		
Total	202	1059,34			

* Significativo a 95% de probabilidade

Para verificar quais tipos de extratos estariam apresentando influência no crescimento do fungo estudado, foi realizado o teste de Tukey para comprovar o contraste entre duas médias de tratamentos. Resultados mostraram que o Ext. EtOH e MeOH na concentração de 10^{-2} g.mL⁻¹ e o Ext. AcOEt na concentração 10^{-3} g.mL⁻¹ influenciaram no crescimento do fungo, retardando seu crescimento, quando comparado com aquele sem influencia de nenhum extrato (TEST.) (Tabela 9).

Tabela 9: Teste do contraste entre médias do crescimento em meio com extratos e concentrações diferentes

Test	H01	H001	E01	E001	M01	M001	AE001	
	M=4,902	M=4,112	M=4,605	M=2,879	M=4,320	M=2,164	M=3,858	M=3,151
TEST	0.9822	0.9989	0.0080	0.9697	0.0013	0.5842	0.0154	
H01	0.9822	0.9990	0.8590	1.0000	0.4596	1.0000	0.9509	
H001	0.9989	0.9990	0.0457	0.9996	0.0074	0.8897	0.0888	
E01	0.0080*	0.8590	0.0457	0.2883	0.9769	0.7693	0.9998	
E001	0.9697	1.0000	0.9996	0.2883	0.0604	0.9957	0.4712	
M01	0.0013*	0.4596	0.0074	0.9769	0.0604	0.2774	0.8429	
M001	0.5842	1.0000	0.8897	0.7693	0.9957	0.2774	0.9268	
AE001	0.0154*	0.9509	0.0888	0.9998	0.4712	0.8429	0.9268	

* Significativo a 95% de probabilidade

TESTE= testemunha; H01= hexano, conc. 10^{-2}g.mL^{-1} ; H001= hexano, conc. 10^{-3}g.mL^{-1} ; E01= etanol, conc. 10^{-2}g.mL^{-1} ; E001= etanol, conc. 10^{-3}g.mL^{-1} ; M01= metanol, conc. 10^{-2}g.mL^{-1} ; M001= metanol, conc. 10^{-3}g.mL^{-1} ; AE001= acetato de etila, conc. 10^{-3}g.mL^{-1}

Podemos ainda verificar na tabela acima diferenças entre extratos e concentrações. Como era esperado, de modo geral, na maior concentração testada ocorre uma maior inibição do crescimento. Para verificar se existe diferença significativa ao nível de 95% de probabilidade entre as diferentes concentrações de extrato obtido com um mesmo solvente foi realizado o teste ANOVA (Tabela 10).

Tabela 10: Teste de ANOVA do crescimento de *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer, em meio de cultura com diferentes extratos de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby em diferentes concentrações.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	p
Hexano	1	1,604	1,604	0,226	0,6362
Resíduo	4	311,367	7,076		
Etanol	1	22,280	22,280	1,604*	1,0000
Resíduo	45	115,196	2,559		
Metanol	1	21,293	21,293	7,801*	0,0084*
Resíduo	35	95,526	2,729		

* Significativo ao nível de 95% de probabilidade ($\alpha = 0,05$)

Para o crescimento em meio de cultura acrescido de Ext. Hex. não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as duas concentrações. Ou seja, o extrato obtido com este solvente não tem efeito inibitório ou fungistático nas concentrações testadas. Ao que tudo indica o fungo está utilizando esse extrato como fonte de carbono para seu crescimento. tanto, o Ext. EtOH como o MeOH mostraram diferenças significativas no crescimento micelial nas duas concentrações testadas. No caso do Ext. EtOH, a diferença entre as médias da progressão da fronteira micelial nas concentrações é de 46%, ou seja, o avanço da fronteira micelial no meio de cultura contendo a concentração de 10^{-3}g.mL^{-1} desse extrato é 46% maior do que na concentração de 10^{-2}g.mL^{-1} . No Ext MeOH essa diferença chega a 56%. Vale ressaltar, entretanto, que em termos absolutos o crescimento no meio contendo Ext. EtOH é aproximadamente 14% maior do que no Ext. MeOH. Em relação ao crescimento em meio de cultura sem as concentrações dos extratos (TEST.), verificou-se uma diferença

em porcentagem, de 15,1% e 31,25% a mais na média da progressão da fronteira micelial em relação aos Ext. EtOH e MeOH respectivamente.

Análise de variância do crescimento micelial na concentração de 10^{-2}g.mL^{-1} para todos os extratos testados mostra que existe diferença significativa a 95% de probabilidade entre eles (Tabela 11). Teste de Tukey para contraste entre duas médias mostrou que nessa concentração o crescimento em meio contendo Ext. MeOH é menor do que nos meios com Ext. Hex. e EtOH (Tabela 12). O crescimento no meio contendo Ext. Hex. é quase o dobro do crescimento com o Ext. MeOH nessa concentração de 10^{-2}g.mL^{-1} .

Tabela 11: Análise de variância da progressão da fronteira micelial de *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer, em meio de cultura com Ext. Hex., EtOH e MeOH das folhs de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	p
Extrato	2	19,37	9,68		
Resíduo	42	97,17	2,31	4,187*	0,0219*
Total	46	116,54			

* Significativo ao nível de 95% de probabilidade

Tabela 12: Teste de Tukey para contraste entre as médias de crescimento do fungos *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer, em diferentes extratos e concentração de 10^{-2}g.mL^{-1}

	Hexano (4,11)	Etanol (2,94)	Metanol (2,16)
Hexano	-	0,1593	0,0164*
Etanol	0,1593	-	0,296
Metanol	0,0164*	0,2961	-

* Significativo a 95% de probabilidade

4.3 Observação sobre o crescimento do fungo com frações do extrato bruto AcOEt obtido a partir de CLS1

Na fase anterior do experimento, o extrato de Acetato de etila foi o que apresentou melhor resposta inibitória para o crescimento do fungo em meio de cultura. Nesta segunda fase esse material foi submetido a eluição em coluna cromatográfica líquido-sólido (CLS) com os solventes Hexano, Acetato de Etila e Metanol.

Das frações obtidas e testadas, a fração metanólica (Fr. MeOH), na concentração de 10^{-2}g.mL^{-1} foi onde a progressão da fronteira micelial menos avançou (Tabela 13). Ressalta-se que no período considerado para o crescimento, esse extrato metanólico, em ambas as concentrações testadas, foi o que apresentou o menor valor médio da progressão micelial indicando uma ação inicial inibitória de crescimento do fungo *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer .

Tabela 13: Avanço do crescimento micelial com frações da CLS1.

	Média (cm)	Variância	Desvio padrão
TEST	5,48	10,77	3,28
CLS1H01	5,51	9,98	3,16
CLS1AE01	5,16	8,95	2,99
CLS1AE001	5,41	9,63	3,10
CLS1M01	1,12	0,22	0,47
CLS1M001	3,15	2,17	1,47

TEST= testemunha; CLS1H01= Fração hexânica conc. 10^{-2}g.mL^{-1} ; CLS1AE01 = Fração Acetato de etila conc. 10^{-2}g.mL^{-1} ; CLS1AE001 = Fração Acetato de etila conc. 10^{-3}g.mL^{-1} ; CLS1M01 = Fração metanólica conc. 10^{-2}g.mL^{-1} ; CLS1AE01 = Fração metanólica conc. 10^{-3}g.mL^{-1}

A diferença de crescimento na fração metanólica, concentração 10^{-2}g.mL^{-1} , em relação ao crescimento em meio de cultura da testemunha foi de quase 400%, enquanto que para a concentração de 10^{-3}g.mL^{-1} foi aproximadamente 74% (Tabela 13). A diferença do crescimento micelial nas outras frações, quando comparados com a testemunha, foi de 1,3% a 6,2%. Ressalta-se que o crescimento na fração hexânica concentração 10^{-2}g.mL^{-1} foi de 0,54% maior do que da testemunha. Ao que tudo indica o fungo está utilizando os compostos extraídos com esse solvente, como uma boa fonte de carbono para seu crescimento.

Para se verificar se as diferenças observadas eram estatisticamente significativas, realizou-se o teste de ANOVA onde apresentou significância ao nível de 95% de probabilidade (Tabela 14).

Tabela 14: ANOVA. Crescimento micelial nas várias frações obtidos em CLS1 com diferentes solventes.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	p
Tratamento	5	335	67	9,89*	6X10 ^{-8*}
Resíduo	117	792	6,77		
Total	122	1127			

* Significativo ao nível de 95% de probabilidade

Teste de contraste da média (Tabela 15) mostrou que o crescimento do fungo com a fração metanólica é estatisticamente diferente em relação às outras frações, conforme comentado anteriormente. Por outro lado, a diferença do crescimento nas outras frações não se mostrou estatisticamente diferente do crescimento da testemunha (sem extratos) evidenciando que, pelo menos nas concentrações testadas, o fungo fez uso dos compostos secundários como fonte de carbono para crescimento.

Tabela 15: Teste de contraste das médias (Tukey) do crescimento micelial em diferentes concentrações.

	TEST	CCF1HO1	CCF1AE		CCF1M	
			01	001	01	001
TEST	-	1	0,99	0,99	0,00132*	0,0521
CLS1H01	1	-	0,99	0,99	0,00132*	0,0521
CLS1AE						
01	0,99	0,99	-	0,99	0,000146*	0,1086
001	0,99	0,99	0,99	-	0,000128*	0,0474*
CLS1M						
01	0,00013*	0,000132*	0,000146*	0,00128*	-	0,1056
001	0,521	0,0521	0,1086	0,0474*	0,1056	-

*Significativo ao nível de 95% de probabilidade.

A taxa de crescimento nesta etapa foi similar para todas as frações e concentrações, com exceção da fração metanólica que, assim como na etapa anterior do teste biológico também apresentou uma menor taxa para ambas as concentrações (Tabela 16). A diferença entre a taxa de crescimento na fração metanólica, concentração 10^{-2}g.mL^{-1} , e o crescimento sem acréscimo desse composto metabólico, ou seja, na testemunha foi de 281% e de 74% para a concentração de 10^{-3}g.mL^{-1} . Para as outras frações (hexânico e acetato de etila) a taxa de crescimento foi maior do que da testemunha, evidenciando o uso dos compostos metabólicos obtidos nesta fase, como fonte de carbono para a produção micelial.

Tabela 16: Taxa de crescimento do fungo *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer nas frações Hexânica, acetato de etila e metanol do extrato de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby.

	Taxa de crescimento
TEST	0,61
CLS1H01	0,79
CLS1AE01	0,74
CLS1AE001	0,77
CLS1M01	0,16
CLS1M 001	0,35

TEST= Testemunha; CLS1H01= Hexano conc. 10^{-2}g.mL^{-1} ; CLS1AE01= Acetato de etila conc. 10^{-2}g.mL^{-1} ; CLS1AE001= Acetato de etila conc. 10^{-3}g.mL^{-1} ; CLS1M01= metanol conc. 10^{-2}g.mL^{-1} ; CLS1M001= metanol conc. 10^{-3}g.mL^{-1} .

4. 4 Observação sobre o crescimento do fungo com sub-frações da Fr MeOH obtido a partir de CLS 2

Assim com na fase anterior, o resultado mostra que o crescimento micelial médio na sub-fração metanólica, concentração 10^{-3}g.mL^{-1} , é menor do que nas outras sub-frações obtidas em diferentes solventes (Acetato de Etila 100% e Acetato de Etila + Metanol 1:1). A diferença no crescimento médio na sub-fração metanólica em relação ao crescimento em meio sem adição de extrato foi de 31,33% e 195,2 % respectivamente. Este resultado é um tanto surpreendente uma vez que era de se esperar um maior crescimento em menor concentração. Descartada a possibilidade de erro amostral, o teste foi repetido nas mesmas condições e este resultado leva a crer sobre a existência de efeito sinérgico dos componentes químicos que compõem esse extrato. Para o crescimento em meio contendo as outras sub-frações essa diferença foi de 26,8% e 2,4% para as concentrações de 10^{-2}g.mL^{-1} e 10^{-3}g.mL^{-1} respectivamente. A média do crescimento proveniente da sub-fração AcOEt + MeOH 1:1 não mostrou diferença em relação às frações obtidas com solventes puro (Tabela 17).

Tabela 17: Parâmetros descritivos do crescimento micelial de *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer em meio de cultura contendo sub-frações da fração metanólica obtidas por CLS2.

	Média (cm)	Variância	Desvio padrão
TEST	5,49	10,77	3,28
CLS2AE01	4,33	4,22	2,05
CLS2AE001	5,36	5,93	2,43
CLS2AE+M 1:101	4,41	4,07	2,02
CLS2AE+M 1:1001	5,63	4,30	2,07
CLS2 M01	4,18	3,70	1,92
CLS2M001	1,86	1,29	1,13

TEST= Testemunha; CLS2AE01= Acetato de etila conc. 10^{-2}g.mL^{-1} ; CLS2AE001= Acetato de etila conc. 10^{-3}g.mL^{-1} ; CLS2AE+M1:101= Acetato de etila e Metanol conc. 10^{-2}g.mL^{-1} ; CLS2AE+M1:1001= Acetato de etila e Metanol conc. 10^{-3}g.mL^{-1} ; CLS2M01= Metanol conc. 10^{-2}g.mL^{-1} ; CLS2M001= Metanol conc. 10^{-3}g.mL^{-1} .

O teste de ANOVA foi realizado para se verificar a existência de diferenças significativas entre as médias de crescimento micelial de *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer em diferentes sub-frações (Tabela 18). O teste mostrou que ao nível de 95% de probabilidade existe diferença de crescimento micelial entre as sub-frações testadas.

Tabela 18: Análise de variância do crescimento do fungo *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer em meio de cultura contendo as sub-frações da fração metanólica e em diferentes concentrações.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	p
Tratamento	6	261,73	43,62		
Resíduo	173	795,11	459	9,50	
Total	179	1056,84			

Com o objetivo de verificar estatisticamente quais dessas sub-frações estariam influenciando o crescimento micelial do fungo em questão foi realizado o teste de múltipla comparação para contraste entre as médias (Tabela 19) onde ficou evidenciado que o crescimento do fungo no meio contendo a sub-fração metanólica (conc. 10^{-3}g/mL^{-1}) é 190% menor em comparação a testemunha.

Tabela 19: Teste de Tukey para comparação de média dos tratamentos. Valores em parênteses indicam a média do crescimento micelial.

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
	(5,49)	(4,33)	(5,36)	(4,41)	(5,63)	(4,18)	(1,86)
{1}	-	0,56	0,99	0,65	0,99	0,41	$2,6 \times 10^{-5*}$
{2}	0,56	-	0,58	0,99	0,29	0,99	0,0004*
{3}	0,99	0,58	-	0,67	0,99	0,41	$2,5 \times 10^{-5*}$
{4}	0,65	0,99	0,67	-	0,37	0,99	0,0002*
{5}	0,99	0,28	0,99	0,37	-	0,17	$2,5 \times 10^{-5*}$
{6}	0,41	0,99	0,41	0,99	0,17	-	0,001*
{7}	$2,6 \times 10^{-5*}$	0,0004*	$2,5 \times 10^{-5*}$	0,0002*	$2,5 \times 10^{-5*}$	0,001*	-

* Não significativo ao nível de 95% de probabilidade

{1}= Testemunha; {2} = CLS 2 Acetato de Etila, conc. 10^{-2}g.mL^{-1} ; {3}= CLS 2 Acetato de Etila, conc. 10^{-3}g.mL^{-1} ; {4}= CLS 2 Acetato de Etila e Metanol, conc. 10^{-2}g.mL^{-1} ; {5}= CLS 2 Acetato de Etila e Metanol, conc. 10^{-3}g.mL^{-1} ; {6}= CLS 2 Metanol, conc. 10^{-2}g.mL^{-1} ; {7} = CLS 2 Metanol, conc. 10^{-3}g.mL^{-1} .

A taxa de crescimento, definida como a razão entre a média da progressão da fronteira micelial e o período de crescimento do fungo, foi menor no meio de cultura contendo a sub-fração metanólica (10^{-3}g.mL^{-1}) (Tabela 20). Comparando-se a taxa de crescimento da testemunha com aquela obtida com a sub-fração metanólica, verifica-se

que esta é 190% menor, evidenciando a influencia que este tipo de extrato tem sobre o crescimento do fungo. Na concentração de 10^{-2}g.mL^{-1} dessa sub-fração a taxa de crescimento micelial do fungo em relação a testemunha foi de 32%.

Por outro lado, para as outras sub-frações na concentração de 10^{-3}g/mL^{-1} a taxa de crescimento, quando comparadas com a testemunha, é praticamente a mesma, mostrando que nessa concentração não há influencia do extrato na produção de massa fúngica.

Tabela 20: Taxa de crescimento nas sub-frações e concentrações diferentes

Solvente/ concentração (mg.mL^{-1})	Ac. Etila		Ac. Etila+ Met1:1		Metanol	
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}
Taxa de crescimento	0,48	0,60	0,49	0,63	0,46	0,21
Testemunha= 0,61						

5 DISCUSSÃO

O extrato obtido com MeOH, depois do AcOEt na concentração de 10^{-2} g.mL⁻¹, foi o que teve maior influência na taxa de crescimento do fungo. O metanol é o solvente com maior polaridade e capaz de extrair distintas categorias de princípios ativos, incluindo substâncias de diferentes graus de polaridade (CALIXTO, 2001). Estes compostos estão de uma maneira isolada ou sinérgica atuando no avanço do fungo diferentemente dos outros extratos obtidos com solventes menos polares.

Fato interessante aconteceu no que se refere ao efeito "lag" (*lag phase*), ou seja, o período depois da inoculação e antes que qualquer divisão celular aconteça (MOORE-LANDECKER, 1982). Embora o metanol tenha apresentado uma menor taxa de crescimento, o efeito "lag" foi de 24 horas, ou seja, os primeiros sinais de formação de micélio do *P. crinitus* (L. ex. Fr.) Singer apareceu um dia após a inoculação para ambas concentrações, acontecendo a mesma coisa para o extrato hexânico, na concentração de 10^{-3} g.mL⁻¹. Ressalta-se, entretanto, que no extrato hexânico a taxa de crescimento é 80% maior do que no metanol para a mesma concentração. Por outro lado, na concentração hexânica de 10^{-2} g.mL⁻¹ o crescimento micelial tornou-se visível somente no quarto dia de crescimento.

Sabe-se que o fungo cresce através de um processo de alongamento das hifas e posterior ramificação. Este crescimento é restrito a extremidade das hifas, a qual cresce mais ou menos a uma taxa constante e, portanto, estende a margem da colônia a uma taxa linear (MOORE-LANDECKER, 1982). Embora as hifas apresentem uma taxa linear, o crescimento do *P. crinitus* (L. ex. Fr.) Singer parece ocorrer exponencialmente durante o estágio inicial do desenvolvimento da colônia, se considerarmos todo o micélio, com exceção no extrato Hex e AcOEt na concentração de 10^{-2} .g.mL⁻¹. A questão que surge neste aspecto é se o *P. crinitus* (L. ex. Fr.) Singer estaria utilizando compostos ativos dos extratos neste momento inicial de crescimento ou os nutrientes contidos no meio de cultura no qual os extratos forma misturados. Os compostos químicos dos extratos testados de alguma forma estão sendo utilizados por *P. crinitus* (L. ex. Fr.) Singer para retardar, no caso de alguns dos extratos, ou servindo como substrato para o crescimento, no caso de outros extratos.

Os extratos obtidos com solventes polares foram os que apresentaram uma capacidade maior de diminuição da velocidade de crescimento do fungo *P. crinitus* (L. ex. Fr.) Singer. Os testes biológicos na primeira fase do experimento mostraram que os extratos obtidos com acetato de etila, usados na concentração de 10^{-2} g.mL⁻¹ contribuíram para a diminuição do crescimento do fungo. Cechinel Filho & Yunes (2001) reportam que o acetato de etila provavelmente pode separar as seguintes classes de compostos: flavanóides, taninos, xantonas, ácidos terpênicos, saponinas e vários compostos fenólicos. As substâncias fenólicas têm propriedades fungicidas (SJOSTROM, 1981). Os taninos são conhecidos por apresentarem atividade fungicida e inseticida (ROWEL & CONNER, 1979). Além dos taninos, outros compostos fenólicos

também inibem a ação de fungos (HARUN & LABOSKY, 1985). Portanto, podemos inferir que esses compostos podem estar contribuindo para as propriedades fungistáticas do extrato acetato de etila em baixa concentração do fungo *P. crinitus* (L. ex. Fr.) Singer.

Ressaltamos, entretanto, que as plantas apresentam freqüentemente vários compostos com atividade similar ou vários compostos com atividades diferentes. Cechinel Filho & Yunes (2001) comentam que em função disso, a "*atividade total*" de um extrato não será, em alguns casos, explicada pela atividade parcial de cada composto, isto é, a soma dos efeitos dos diversos compostos ativo é menor que a atividade do extrato normal ". Isto pôde ser observado no presente trabalho quando a fração MeOH isolada do extrato normal AcOEt apresentou-se mais inibitória do que aquela fração normal do próprio MeOH.

A assertiva daqueles autores, entretanto, nos leva ao questionamento sobre se existem alguns compostos em menor proporção, muito mais ativo que os outros, ou trata-se de um efeito sinérgico entre alguns compostos que resulta num efeito maior (PERES et al., 1998). Não sabemos ainda a resposta, pois, foge do objetivo do trabalho identificar e quantificar esses compostos. Entretanto, chamamos à atenção para o fato do extrato obtido com AcOEt, na concentração de 10^{-3} mg.mL⁻¹ não inibir o crescimento do fungo. Isso nos leva a inferir que, pelo menos, a proporção dos compostos está influenciando na atividade do fungo, uma vez que na concentração bruta desse extrato noutra concentração maior não ocorreu atividade do fungo. Resta saber se existe algum efeito sinérgico entre esses compostos.

O extrato hexânico pode separar provavelmente esteróides, ácidos graxos, terpenos, hidrocarbonetos e acetofenonas (CECHINEL FILHO & YUNES, 2001), e uma vez que o crescimento no meio com adição desse extrato não se mostrou inibitório na atividade de crescimento linear do *P. crinitus* (L. ex. Fr.) Singer é possível que este fungo não sofra influência desses compostos ou esteja utilizando-o para favorecer seu crescimento uma vez que não houve diferença estatística na progressão da fronteira micelial entre este extrato e o controle (sem adição de extratos). Herrera (1991) comenta que o fungo ascomiceto termofílico *Thermoascus aurantiacus* utiliza as substâncias solúveis, que compõem os extrativos, para seu crescimento, resultado este também apontado por Auer et al., (1986) para uma cepa brasileira do mesmo fungo.

CONCLUSÃO

A análise da atividade dos extratos brutos obtidos das folhas de *Senna reticulada* (Willd.) Irwin & Barneby, espécie nativa amplamente distribuída na Amazônia, sobre o fungo *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer, causador de podridão em madeiras mostra que :

- As substâncias que constituem a sub-fração metanólica, oriunda da fração metanólica do extrato bruto Acetato de etila de *S. reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby, apresentaram maior atividades inibitórias no crescimento do fungo *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer.
- Nos testes realizados nas duas concentrações o crescimento mostrou-se mais lento na concentração de 10^{-2} g.mL⁻¹ ,; exceção para a concentração 10^{-2} g.mL⁻¹ do acetato de etila onde o fungo não apresentou nenhum crescimento.

- Embora sem conclusões definitivas, os fungos parecem estar utilizando certas classes de extrativos das folhas de *S. reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby para a formação de sub-produtos, os quais podem estar sendo utilizados para seu crescimento.

Considerações finais:

O que constatamos no presente trabalho foi que as folhas de *S. reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby podem conter metabólitos secundários com uma ação fungistática contra o fungo *P. crinitus* (L. ex. Fr.) Singer. As duas concentrações testadas aqui não foram o suficiente para realizar a inibição total do crescimento do fungo. Entretanto, os resultados mostraram que existem metabólitos, principalmente na sub-fração metanólica oriunda do extrato bruto acetato de etila que podem, numa concentração maior, oferecer uma ação inibitória total para o crescimento do fungo. Neste sentido, torna-se necessário a realização de testes biológicos em concentrações maiores a das testadas no presente trabalho.

Por outro lado, urge a necessidade de estudos para se determinar e isolar as substâncias químicas que estão exercendo esse efeito inibitório e verificar se existe alguma ação sinérgica entre eles que possa estar contribuindo para o efeito apresentado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E. R. **Plantas Medicinais Brasileiras: Conhecimentos Populares e Científicos**. Hermus Editora Ltda, 1993.

AQUINO NETO, F. R. de e NUNES, D. S. S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciencia, 2003.

ARORA, D. S. e OHLAN, D. In vitro studies on antifungal activity of tea (*Camelia sinensis*) and coffee (*Coffea arabica*) against wood-rotting fungi. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v.37, p.159-165. 1997.

AUER, C.G.; BARRICHELO, L.E.G; FERRARI, M.P. Utilização do fungo termófilo *Thermoascus aurantiacus* na degradação dirigida de cavacos de eucalipto. **Silvicultura 1**:: 194-198. 1986.

BANANEIRA, M. B. **Chemical comparison between three Amazonian woods and North American Hardwoods**. Master Dissertation. Colorado State University. USA. 1986.

BANCO DE DADOS TROPICAL. "Biodiversit: Perspectives and Technological Opportunities" <http://www.bdt.org.br>, 1997.

BARBOSA FILHO, J.M. Lignanas, neolignanas e seus análogos. In: **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. Orgs. SOMÕES, C. M. O.; GUERRA, M. P. et al. 5 ed. Porto alegre – Florianopolis: Editora da UFRGS/ Editora da URSC, 2004.

BORGES, M. H., BRANDEBURGO, M. I. H., SOARES, A. M., RODRIGUES, V. DE MELLO, IZIDORO, L. F. M. "Ação não peçonha do extrato vegetal de *Casaria sylvestris*. Inibição da atividade fosfolipase A2 hemorrágica e inibitória de venenos animais pelo extrato vegetal de *Casaria sylvestris* (Flacouticeae). **Revista de Biotecnologia**, nº. 4, 1999.

CALIXTO, J.B. Estudo farmacológico pré-clínico de plantas medicinais. *IN.: Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Rosendo Augusto Yunes, João Batista Calixto (orgs.). Chapecó:Argos. 2001.

CAMPELO, G. R. Contribuição ao estudo das plantas medicinais no Estado de Alagoas III. **VII Simpósio de plantas medicinais do Brasil**, p.85, 1º a 3 de setembro, Belo Horizonte – MG, 1982.

CASTRO e SILVA, A. e AGUIAR, I. J. A. Micromorfologia da Degradação da Madeira da Espécie Amazônica *Hura crepitans* L. Por Fungos Lignolíticos Pertencentes à Classe Hymenomyces . **Acta Amazônia**, V 31, nº 3, p397 – 418, 2001.

CASTRO E SILVA, A.; SILVA, M.B.C. **Influência da anatomia e química nas propriedades da madeira**. Manaus: Publicação CEPEF/UTAM. 17p. 1991.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estudos químicos de plantas medicinais orientado para a análise biológica, obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. *IN.: Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Rosendo Augusto Yunes, João Batista Calixto (orgs.). Chapecó:Argos. 2001.

CHUNG, K. T.; LU, Z.; CHOU, M. W. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. **Food and Chemical Toxicology**, v.36, p. 1053-1060, 1998.

CLEMENTINO, I. P. et all. EFEITOS DOS EXTRATIVOS OBTIDOS DE LENHO E CASCA DE *Dipteryx odorata* (CUMARU) e *Bagassa guanensis* (TATAJUBA) A FUNGOS APODRECEDORES DE MADEIRA. **X Jornada de Iniciação Científica do PIBIC/INPA**. Resumos expedidos 04 a 06 de julho de 2001. Manaus/AM.

COUTTS, M. P. **The influence of phenolic compounds in *Pinus radiata* on the growth of *Amylostereum areolatum***. Aust. For. Res. 4: 15-18.

D'ALMEIDA, M. L. O. **Caracterização química e físico-química de materiais lignocelulósicos**. IN.: Celulose e Papel. Vol. 1. Coord. Técnica maria Luiza Otero. Publ. IPT nº 1193. São Paulo, S P. 1981.

DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A. J. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. **Biochemistry and Systematic Ecology**, v. 27, p.445 - 459, 1996a.

DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; WITVROUW, M.; DE CLERCQ, E.; BERGHE, D.V.; VLIETINCK, A.J. Biological evaluation of proanthocyanidins and related polyphenols. **Journal of Natural Products**, v. 62, p.954-958, 1996b.

DUFRESNE, C. J.; FARNWORTH, E. R. A review of latest research findings on health promotion properties of tea. **Journal od Nutritional Biochemistry**, v. 12, p. 4004-421, 2001.

FALKENBERG, M. B. Quinonas. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Orgs. SOMÕES, C. M. O.; GUERRA, M. P. et al. 5 ed. Porto alegre – Florianopolis: Editora da UFRGS/ Editora da URSC, 2004.

FENGEL, D., WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Walter de Gruyter, Berlin and New York. 1984, 613p.

FERREIRA, S. H. (Org.). **Medicamentos a partir de Plantas Medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências. Rio de Janeiro, 1998.

FREUDENBERG, K.; WEINGES, K. Catechine, andere Hydroxy-flavane und Hydroxy-flavane. **Fortschritte der Chemie organischen Naturstoffe**, v.16, p.1-25, 1958.

FREUDENBERG, K.; WEINGES, K. Systematik und Nomenklatur der Flavonoide. **Tetrahedron**. v. 8, p. 336-349, 1960.

FURTADO, E. L. Microorganismos manchadores de madeira. Série Técnica IPEF, v.13, nº 33, p.91-96. **Anais do 1º Simpósio do Cone Sul sobre o Menejo de Pragas e Doenças de Pinus**. Curitiba – PR, março de 2000.

GOTTLIEB, O.R. **Macromolecular evolution, systematics and ecology, an essay a nivel botanical discipline**. Heidelberg: Springer, 1982. 170p.

GRAPE, U. In: **Drug Discovery from Nature**. S. GRABLEY e R. THIERICKE. Editores. Berlin: Springer. 1999.

HAGERMAN, A. E.; ZHAO, Y.; JOHNSON, S. E.; SHAHADI, F. **Methods for determination of condensed and hydrolyzable tannins**. Acs Sym Ser, v. 662, p. 209-222, 1997.

HAMBURGER, M. & HOSTETTMANN, K. **Medicinal Plants. Phytochemistry** 30: 3864-3882, 1991.

HARBORNE, J.B. (ed.) **Methods in plant biochemistry. Plant Phenolics**. London: Academic, 1989. v.1.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS. C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HARNISCHFEGER, G.; STOLZE, H. **Bewahrte Pflanzendrogen in Wissenschaft und Medizin**. Bad Homburg: Notamed, 1983.

HARUN, J.; LABOSKY Jr, P. Antitermitic and antifungal properties of selected bark extractives. **Wood and Fiber Science** 17(3): 327-335. 1985.

HASLAM, E. **Plant polyphenols**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. 230 p.

HATTORI, M.; KUSUMOTO, L. T.; NAMBA, T.; ISHIGAMI, T.; HARA, Y. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyl transferase from *Streptococcus mutans*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.38, p.717-720, 1990.

HEGNAUER, R.; HEGNAUER, M. **Chemotaxonomie der Pflanzen**. Band Xia Basel: Berkhauser, 1994.

HERRERA, A M. **Thermoascus aurantiacus : Aspectos do crescimento, produção enzimática e utilização no tratamento de materiais ligninocelulósicos**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP. Campinas. 1991.

HEYWOOD, V. H. **Flowering Plants of the World**. Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs, 1985.

JESUS, M. A. Contribution to the knowledge of wood-rotting fungi n Brazil: 1. Ocorrence and distribution of fungi on different substrates from the Manaus region. Amazonas States. **International Research Group on Wood Preservation**, Stuckhom, 1991. 21p.

JESUS, M. A. de; LIMA, M. da P.; RIBEIRO, M. N. de S.; MARQUES, M. de F. S. e AREVALO, A. G. A. **Avaliação da Toxicidade de extrativos isolados de espécie de *Burseraceae* a fungos xilófagos**. Parte I. Associação Brasileira de Preservadores de Madeira, 1993. 7.p (Boletim ABPM nº 76).

JESUS, M. A. **Efeito dos Extratos obtidos de *Swartzia argentea* Spruce ex Benth., *S. laeviscarpa* Amshoff, *S. panococo* (Aublet) Cowan, *S. polyphylla* DC. E de *S. sericea* Vogel da Amazônia Central sobre fungos degradadores de madeira**. Rio Claro: UNEP,2003. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2003.

JESUS, M.A.; WILLERDING, A.L.; SANTOS, M.; WOLTER, E.L. Atividade antifungica de extratos obtidos de plantasmedicinais amazônicas a fungos podrecedores de madeira. **Revista Árvore**, Viçosa – MG, v.24, n.2, p.223-228, 2000.

LEPAGE, E. S. Química da madeira. In: **Manual de Preservação da Madeira**, Vol. 1, IPT, São Paulo/SP. 1986, 250p.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of The Fungi**. New Jersey: Prentice-Hall, Inc. 1982.

NASCIMENTO, E. A.; MORAIS, S. A. L. Polifenóis da madeira de *Eucalyptus grandis*. Parte 1: análise por espectroscopia e cromatografia líquida. **Ciência & Engenharia**, v. 5, n. 2, p. 13-18, 1996.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. **Phytochemistry**, v.32, p. 507-521, 1993.

OLIVEIRA, A. M. F.; LELIS, A. T. de; LEPAGE, E. S.; LOPEZ, G. A. C.; OLIVEIRA, L. C. de S.; CANEDO, M. D. e MILANO, S. Agentes destruidores da Madeira. In: **Manual de Preservação da Madeira**. Vol. 1. I.P.T. São Paulo, p 99 – 165, 1986.

OOSHIMA, T.; MINAMI, T.; AONO, W.; IZUMATANI, A.; SOBUE, S.; FIJIWARA, S.; HAMADA, S. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with *Streptococcus mutans*. **Caries Research**, v.27, p.124-192, 1993.

PERES, M. T. L.; DEELE-MONACHE, F.; PIZZOALATTI, M.G.; SANTOS, A.R.S.; BEINTH, A.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. **Phytother.** Res. 12: 209-215. 1998.

PINTO, P. de S.; POHLIT, A. M.; NONOMURA, S. M.; QUIGNARD, E. J. L.; PEDROSO, A. C. S.; GOMES, E. O. e SILVA, L. F. R. Estudo Fitoquímico da Raiz de *Cassia Spruciana* (Leguminosae: Caesalpinioideae). **XI Jornada de Iniciação Científica do PIBIC/INPA**. Resumos expedidos 03 a 05 de julho de 2002. Manaus/AM.

POLHILL, R.M. & STRIRTON, C.H. Evolution and systematics of the Leguminosae. In: POLHILL, R.M.; RAVEN, P. H. **Advences in legume systematics**. Part 1. Kew: Royal Botanic Garden, 1981. p. 1-69.'

PRANCE, G. T. & SILVA, M. F. **Árvores de Manaus**. Manaus, INPA, 1975. p. Ilust.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia: Oportunidades Econômicas e Sustentáveis**. Co-Edição Sebrae/INPA, Manaus, 2000.

REYES-CHILPA, R.; QUIROZ-VASQUEZ, R.R.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M. Antifungal activity of selected plant secondary metabolites against *Coriolus versicolor*. **Journal Tropical Forest Products**, Malaysia, v.3, n.1, p.110-113, 1997.

RIBEIRO, J. E. L, M. J.G., VICENTIN, A, SOTHERS, C. A, COSTA, M. A, BRITO, J. M. de SOUZA, M. A.D. de, MARTINS, L. H. P., LOHMANN, L. G., ASSUNÇÃO, P. A C. L., PEREIRA, E. da C., SILVA, C.F. da, MESQUITA, AM. R., PROCÓPIO, L. C. **“Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central**, Manaus, 816p.il, 1999

ROWEL, J.W. & CONNER, H. Extractives in eastern hardwoods. General Tech. Report **FPL 18. Forest Products Labs**, Madison, W.I. 1979.

SANT'ANA, P.J.P. **Bioprospecção no Brasil. Contribuições para uma gestão ética.** Brasília: Paralelo 15, 2002.

SANTINI, E.J., **Biodeterioração e Preservação da Madeira.** UFSM/CEPEF/FATEC. Santa Maria/ RS, 1988, 125p.

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. Taninos. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Orgs. SOMÕES, C. M. O.; GUERRA, M. P. et al. 5 ed. Porto Alegre – Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da URSC, 2004.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v.30, p.3875-3883, 1991.

SILVA, M. F.; CARREIRA, L. M. M.; TAVARES, A. S.; RIBEIRO, I. C.; JARDIM, M. A. G.; LOBO, M. G. A.; OLIVEIRA, J. O. **As leguminosas da Amazônia brasileira.** Lista prévia. Acta Botânica Brasílica, São Paulo, v.2,p.193-237, 1989.

SILVA, M. F.; SOUZA, L. A. G. e CARREIRA, L. M. M. **Nomes populares das leguminosas do Brasil.** Manaus: EDUA/INPA/FAPEAM, (Série: Biblioteca Científica da Amazônia) 2004, 236 p.

SILVA, T. M. D. da *et al.* Avaliação das Atividades Antifúngicas e Citotóxica de Plantas Tradicionalmente Descritas com Medicinais. **XI Jornada de Iniciação Científica do PIBIC/INPA.** Resumos expedidos 03 a 05 de julho de 2002. Manaus/AM.

SJOSTROM, E. Wood Chemistry: **Fundamentals and Application.** New York: Academic Press. 1981

SOMÕES, C. M. O. e SPITZER, Volker. Óleos voláteis. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Orgs. SOMÕES, C. M. O.; GUERRA, M. P. et al. 5 ed. Porto alegre – Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da URSC, 2004.

STEINEGGER, E.; HANSEL, R. **Pharmakognosie.** 5.ed. Berlin: Springer,1992.

TANGARLIN, J. R., SCHWAN-ESTRADA, K. F., CRUZ, M. E. DE SILVA, MOZEITOS, M. H. "Plantas Mediciniais e Controle Alternativo de Fitopatógenos" **Revista de Biotecnologia**, nº 11, 2000.

THOMSON, R. H. **Naturally occurring quinones**. 2 ed. London: Academic, 1971.

VITAL, B.R.; SHIMADA, A.N.; DELLA LUCIA, R.M.; VALENTE, O.F.; PIMENTA, A.S. Avaliação dos taninos da casca de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden como preservativo de madeira. **Revista Árvore**, Viçosa – MG, v.25, n.2, p.245-256, 2001.

VOGEL, et all. **Análise Química Quantitativa**. 5ª Ed. Traduzido por Horácio Macedo/UFRJ. LTC, 1992.

WAGNER, H. **Pharmazeutische Biologie 2: Drogen und ihre Inhaltsstoffe**. 4. Aufl., Stuttgart: Gustav Fischer, 1988.

WANG, C.-C.; CHEN, L.-G.; YANG, L. –L. Antitumor activity of four macrocyclic ellagitannins from *Cuphea hyssopifolia*. **Cancer Letters**, v. 140, p. 195-200, 1999.

WESTENDORF, J. Anthranoid Derivatives – *Cassia* Species. In: **Adverse effects of herbal drugs**. DE SMET, P. A. G. M.; KELLER, K.; HANSEL, R.; CHANDLER, R. F. (ed). Berlin: Springer, 1993c. V.2. p. 125-128.

YAMADA, C.S.B., **Racine** 1998, 2, p.50

YATAGAI, M. ; TAKAHASHI, T. **Tropical wood extractives affects on durability, paint curing, time and pulp sheet resin spot**. *Wood Science*, 1980, 12(3): 176-181.

ZHONG-LUH, W. **The influence of extratctives on wood properties and its utilization**. **Chemistry and Industry of Forest Products**. Chinese Soc. of For. Chem. Prod. and Engineering, 1981 1(2): 34-39.

ZUANAZZI, J. A. S. & MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Orgs. SOMÕES, C. M. O.; GUERRA, M. P. et al. 5 ed. Porto Alegre – Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da URSC, 2004.