

CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Luehea divaricata* MART. (TILIACEAE)

Júlio Cesar Akio Tanaka e Cleuza Conceição da Silva*

Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900 Maringá - PR

Benedito Prado Dias Filho e Celso Vataru Nakamura

Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900 Maringá - PR

João Ernesto de Carvalho e Mary Ann Foglio

Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade Estadual de Campinas, CP 6171, 13083-970 Campinas - SP

Recebido em 24/8/04; aceito em 17/2/05; publicado na web em 11/7/05

CHEMICAL CONSTITUENTS OF *Luehea divaricata* Mart. (TILIACEAE). Chemical studies of the leaves of *L. divaricata* afforded 3 β -*p*-hydroxybenzoyl-tormentonic acid, a triterpene with an ursene-type skeleton, a mixture whose main compound was an oleanene derivative, the maslinic acid, a C-glycoside flavone, vitexin and glucopyranosylsitosterol. A flavonoid, characterized as (-)-epicatechin, which belongs to the flavan-3-ol class, was isolated from the stem's bark. The structures of the compounds were elucidated by spectroscopic analysis. The antibacterial, antifungal and antiproliferative activities of the crude methanolic extracts of leaves and bark were evaluated and the antibacterial properties of the fractions of the barks were also investigated.

Keywords: *Luehea divaricata*; triterpenes; flavonoids.

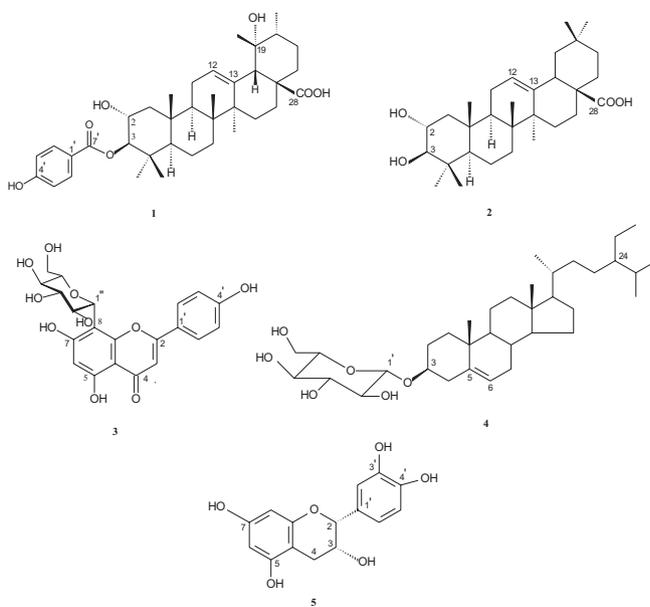
INTRODUÇÃO

O sul da África e o Brasil constituem os dois principais centros de dispersão da família Tiliaceae, a qual conta com 35 gêneros e 370 espécies das quais cerca de 55 a 60 espécies, distribuídas em 13 gêneros, ocorrem no Brasil¹. *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae), uma árvore de grande porte (15 a 25 m), popularmente conhecida como açoita-cavalo, açoita-cavalo miúdo, ibatingui, ivatingui, pau-de-canga e caiboti, também apresenta as sinônimas de *Luehea speciosa* Wild., *Brotera mediterranea* Vell. e *Luehea parvifolia* Mart. e é encontrada nos estados brasileiros da Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais, Goiás e do Mato Grosso do Sul até o Rio Grande do Sul².

As folhas de *Luehea* são comercializadas como fitoterápicos contra disenteria, leucorréia, reumatismo, blenorragia e tumores; a infusão das flores é usada contra bronquite e a raiz é depurativa³. Outras atividades biológicas e usos populares para a espécie *L. divaricata* foram encontradas na literatura⁴, descrevendo o isolamento do triterpeno, inédito à época, o ácido 3 β -*p*-hidroxibenzoil tormêntico (1) e da mistura contendo o ácido maslínico (2). Além deste relato, nenhum outro estudo químico foi encontrado na literatura para qualquer espécie do gênero *Luehea*.

O presente trabalho relata os principais constituintes químicos isolados das cascas do caule e das folhas de *L. divaricata*, bem como a avaliação das atividades antifúngica, antibacteriana e antiproliferativa dos extratos brutos, e antibacteriana das frações do extrato das cascas do caule. O estudo químico do extrato bruto metanólico das folhas resultou, em um primeiro momento, no isolamento do ácido 3 β -*p*-hidroxibenzoil tormêntico (1), triterpeno com esqueleto básico dos ursenos, e de uma mistura cuja substância majoritária foi o ácido maslínico (2), triterpeno derivado dos oleanenos⁴. Posteriormente, foram isolados do mesmo extrato a vitexina (3), uma flavona C-glicosilada, e o esteróide glicopiranosilsterol (4). O flavonóide (-)-epicatequina (5), um flavan-3-ol, foi isolado do extrato bruto

metanólico das cascas do caule. As estruturas das substâncias isoladas foram elucidadas com base nas análises dos dados espectrais de IV, EM, RMN de ¹H e de ¹³C uni e bidimensionais e por comparação com dados da literatura.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

A substância 1 e a mistura contendo 2 foram isoladas da fração clorofórmica do extrato bruto das folhas, e os procedimentos para suas obtenções e elucidações estruturais encontram-se descritos na literatura⁴.

A substância 3 foi isolada da fração acetato de etila do extrato bruto das folhas e seu espectro de massas revelou o pico do íon molecular em *m/z* 432. Observou-se um pico em *m/z* 270 atribuído

*e-mail: ccsilva@uem.br

à cisão da ligação com a unidade glicosídica, e o ganho de um hidrogênio em rearranjo. O espectro no IV apresentou, entre outras, as bandas de absorção em 3378 e 3251 cm^{-1} , referentes a estiramentos de grupos O-H livres e em ligação hidrogênio. A banda em 1654 cm^{-1} foi atribuída a estiramento de carbonila α,β -insaturada em ligação hidrogênio. No espectro de RMN de ^1H observaram-se sinais de hidrogênios aromáticos em δ_{H} 6,88 (2H), 8,02 (2H), 6,27 (1H) e 6,77 (1H) e sinais atribuídos à unidade glicosídica na região de δ_{H} 3,25 a 4,68, não sendo observado sinal para hidrogênio anomérico. Os três singletos, situados acima de 10 ppm, foram atribuídos aos hidrogênios das hidroxilas da aglicona. O sinal em δ_{C} 182,6 no espectro de RMN de ^{13}C foi atribuído à carbonila α,β -insaturada e três sinais em δ_{C} 160,9, 161,6 e 163,0 a carbonos aromáticos ligados a heteroátomo. Também observaram-se dois sinais duplos referentes a CH aromáticos em δ_{C} 116,1 e 129,3. Ainda foram observados seis sinais na região de δ_{C} 61,0 a 83,0 característicos de unidade glicosídica. Os dados apresentados e o fato de não ter sido observado nenhum carbono com deslocamento característico de carbono anomérico na região de 100 ppm, levantou a possibilidade de tratar-se de um flavonóide C-glicosilado. As correlações entre C-9 e H-1" e entre C-7 e H-1" observadas no mapa de contornos HETCOR-LR da substância **3** confirmaram que era um flavonóide C-glicosilado. Os dados espectroscópicos de RMN de ^1H de **3** foram comparados com os da literatura^{5,6} para a vitexina-2"-O- β -D-arabinofuranosídeo e os dados de RMN de ^{13}C de **3** com a vitexina e a vitexina 2"-O-glicosídeo. Esta comparação e a análise dos dados espectrais permitiram concluir que a substância **3** era a vitexina (**3**), uma flavona C-glicosilada.

A substância **4**, isolada da fração clorofórmica num segundo fracionamento do restante do extrato bruto das folhas, foi identificada como o glicopiranosilsterol (**4**) através da análise de seus dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e por comparação com dados da literatura⁷⁻¹⁰.

A substância **5** foi isolada da fração acetato de etila do extrato bruto das cascas dos caules. O pico do íon molecular da substância **5** apareceu em m/z 290. O espectro no I.V. apresentou bandas de absorção na região de 3184 a 3503 cm^{-1} referentes a estiramentos de grupos O-H livres. No espectro de RMN de ^1H observaram-se sinais característicos de hidrogênios aromáticos entre δ_{H} 5,91 e 6,97. Os sinais atribuídos a dois hidrogênios em δ_{H} 2,72 (H-4a) e 2,86 (H-4b) ligados ao carbono C-4, onde em geral existe uma carbonila em outros flavonóides, foi indicativo de que **5** poderia ser um flavanol. No espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ observaram-se sinais relativos a carbonos aromáticos entre δ_{C} 96,0 e 158,2. A constatação de um sinal de carbono saturado em δ_{C} 29,2 foi outro forte indício de que a substância **5** poderia ser um flavanol. A correlação entre os hidrogênios H-4a e H-4b com H-3 observada no mapa de contornos COSY de **5** ajudou a ratificar esta proposição. As atribuições dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos foram baseadas nos mapas de contornos COSY, HETCOR e HETCOR-LR. A técnica de diferença de NOE foi empregada, visando confirmar as estereoquímicas de H-2, H-3, H-4a e H-4b. O sinal em δ_{H} 2,72 (H-4a), quando irradiado causou um ganho de intensidade em δ_{H} 4,17 (H-3), no entanto quando foi irradiado o pico em δ_{H} 2,86 (H-4b) também houve um aumento de intensidade em δ_{H} 4,17 (H-3), maior do que na irradiação anterior. Dessa forma, concluiu-se que os hidrogênios cujas absorções apareceram em δ_{H} 2,86 (H-4b) e 4,17 (H-3) estariam posicionados na mesma face do plano do anel ao qual estão ligados. A irradiação do sinal em δ_{H} 2,86 (H-4b) também causou um incremento em δ_{H} 4,81 (H-2), sugerindo que H-2 também estaria posicionado na mesma face do plano do anel que H-3 e H-4b. Ao irradiar-se o sinal em δ_{H} 4,17 (H-3), houve um ganho de intensidade em δ_{H} 4,81 (H-2) e em δ_{H} 2,72 (H-4a) e 2,86 (H-4b), sendo este último em maior inten-

sidade, o que foi coerente com uma relação *syn* entre H-2, H-3 e H-4b. Para confirmar a proposta foi irradiado o sinal em δ_{H} 4,81pm (H-2), causando um ganho de intensidade em δ_{H} 4,17 (H-3) e em δ_{H} 2,86 (H-4b), enquanto que em δ_{H} 2,72 (H-4a) não houve aumento de intensidade. Desta forma, a substância **5** foi identificada através da análise dos dados espectroscópicos obtidos e da comparação com os dados da literatura^{11,12} como a (-)-epicatequina (**5**), um flavonóide da classe dos flavan-3-ol.

O extrato bruto metanólico das cascas dos caules de *L. divaricata* e as suas frações aquosa (A') e acetato de etila (AE') foram moderadamente ativos contra *Staphylococcus aureus* (CMI = 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), enquanto a fração butanólica (B') inibiu discretamente o crescimento de *S. aureus* (CMI = 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e a fração hexânica apresentou atividade fraca contra a mesma bactéria (CMI = 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As demais frações e o extrato bruto das folhas foram inativos frente aos microrganismos e à metodologia empregada.

Os extratos brutos das folhas e das cascas dos caules não demonstraram atividade inibitória ou fungicida nos ensaios antifúngicos realizados, através da metodologia e microrganismos testados.

O extrato bruto das folhas de *L. divaricata* apresentou efeito citostático sem seletividade na concentração de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inibindo em aproximadamente 85% o crescimento celular das linhagens de células tumorais UACC.62, MCF.7 e C786.0, e efeito citocida com seletividade nesta mesma concentração para as linhagens OVCAR.3 (\approx 20% de morte), K.562 (\approx 30% de morte) e NCI.ADR (\approx 50% de morte). O extrato bruto das cascas dos caules apresentou efeito citostático na concentração de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, com pequena seletividade entre as linhagens C786.0 (\approx 60% de inibição), NCI.460 (\approx 75% de inibição), K.562 (\approx 80% de inibição), NCI.ADR (\approx 80% de inibição) e na concentração de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ também com pequena seletividade para as linhagens HT.29 (\approx 98% de inibição), MCF.7 (\approx 90% de inibição), PC.03 (\approx 95% de inibição), NCI.460 (\approx 100% de inibição) e C786.0 (\approx 90% de inibição) e efeito citocida na concentração de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, com pequena seletividade para as linhagens NCI.ADR (\approx 10% de morte), K.562 (\approx 40% de morte) e UACC.62 (\approx 50% de morte).

Os metabólitos secundários obtidos de *L. divaricata*, ácido 3b-*p*-hidroxibenzoil tormêntico (**1**) e ácido maslínico (**2**), relatados anteriormente, vitexina (**3**), glicopiranosilsterol (**4**) e (-)-epicatequina (**5**), descritos neste trabalho, são os primeiros reportados para o gênero *Luehea* sendo, também, a *L. divaricata* a primeira espécie estudada quimicamente no mesmo. Desta forma, estes resultados juntamente com os estudos de atividade antibacteriana, antifúngica e antiproliferativa ampliam o conhecimento do potencial químico e farmacológico da família Tiliaceae, à qual o gênero *Luehea* pertence.

PARTE EXPERIMENTAL

Geral

Os espectros de massas (EM) de baixa resolução foram obtidos em espectrômetro Shimadzu- GC/MS a 70 eV, modelo QP 2000A a 70 eV, com sonda para sólidos. Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram registrados em espectrofotômetro FTIR-Bomem MB-100, na região de 400 a 4000 cm^{-1} . A absorção em 1601 cm^{-1} de um filme de poliestireno foi utilizada como referência. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetro Varian, modelo Gemini 2000 BB 300 MHz (300,6 MHz para ^1H e 75,45 MHz para ^{13}C). Os deslocamentos químicos foram dados em ppm, tendo como referência interna o TMS (δ = 0,0 ppm). Os solventes deuterados utilizados foram DMSO-*d*₆, CDCl₃ e CD₃OD. As cromatografias em coluna foram feitas utilizando sílica gel 60 [(0,063 – 0,200 mm) (70-230 mesh ASTM)] ou

[(0,2 - 0,5 mm) (35-70 mesh ASTM)] e o acompanhamento das colunas foi feito através de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA). A espessura da camada de sílica gel (sílica gel GF₂₅₄) usada na confecção das placas de vidro para cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foram de 0,25 mm (20x5 cm) e 1,00 mm (20x20 cm), respectivamente.

As substâncias foram visualizadas nas placas de CCDA utilizando reveladores como H₂SO₄/MeOH (1:1) seguido de aquecimento, iodo ressublimado e revelador anisaldeído para terpenos (4-metoxi-benzaldeído, ácido acético, ácido sulfúrico / 1,0 : 48,5 : 0,5). As substâncias fluorescentes foram visualizadas sob luz UV nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm.

Material vegetal

As folhas e caules de *L. divaricata* foram coletadas pela Profa. Dra. M. C. de Souza, em abril de 1999, na mata ciliar do córrego Mandacaru, na cidade de Maringá-PR. Uma exsicata da espécie estudada (nº 9057) foi depositada no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá.

Extração e isolamento dos constituintes químicos

As folhas secas ao ar e moídas (0,6 kg) foram submetidas à maceração em metanol à temperatura ambiente. O extrato bruto das folhas (EF) obtido foi evaporado sob pressão reduzida, obtendo-se 73,80 g de extrato bruto seco. Parte deste extrato (37,88 g) foi solubilizada em MeOH/H₂O 1:1 (150 mL) e submetida à partição com os solventes hexano (3 x 200 mL), clorofórmio (3 x 200 mL) e acetato de etila (3 x 200 mL) obtendo-se, após a evaporação dos solventes em evaporador rotativo, as frações hexânica (H: 5,77 g), clorofórmica (C: 2,87 g), acetato de etila (AE: 4,90 g) e hidroalcoólica (AM: 24,02 g). O isolamento das substâncias **1** e **2** da fração C encontra-se relatado na literatura⁴. Parte da fração AE (4,0 g) foi purificada por coluna cromatográfica em sílica gel 60 [(0,063 - 0,200 mm) (70-230 mesh ASTM)] eluída com os solventes clorofórmio, acetato de etila e metanol puros e combinados em gradiente de polaridade, da qual foram coletadas 170 frações (15 mL) agrupadas em 19 subfrações; da subfração 14 foi isolada a substância **3** (38,7 mg) sob a forma de um precipitado cristalino amarelo.

De uma segunda partição com 27,79 g de extrato bruto restante das folhas, empregando o mesmo procedimento utilizado anteriormente, foi estudada apenas a fração clorofórmica (m = 4,03 g), com o intuito de obter maior quantidade da substância **1** que ainda não fora totalmente identificada. A fração clorofórmica obtida (m = 4,03 g) foi submetida a um pré-fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel 60 [(0,2 - 0,5 mm) (35-70 mesh ASTM)] sendo obtidas as frações hexano/clorofórmio (50 e 75%), clorofórmio, clorofórmio/metanol (10 e 50%) e metanol, com 400 mL cada. A fração clorofórmio/metanol 50% foi purificada por cromatografia em coluna, utilizando-se o mesmo suporte da coluna anterior e coletando-se um total de 6 frações dos eluentes CHCl₃ e CHCl₃/MeOH (5, 10, 15, 30 e 50%). A substância **4** (4,5 mg) foi isolada como cristais brancos da fração CHCl₃/MeOH 5%. A tentativa de obter-se maior quantidade da substância **1** foi interrompida, pois foi possível a confirmação da estrutura desta substância **1** com a amostra que havia sido isolada anteriormente.

As cascas dos caules secas e moídas (0,5 kg) foram maceradas em metanol à temperatura ambiente. O extrato bruto das cascas (EC) foi evaporado sob pressão reduzida, obtendo-se uma massa de 32,74 g. Deste total, foram solubilizados 31,97 g de EC em 100 mL de uma mistura MeOH/H₂O (9:1). Em seguida foi realizada

uma partição em hexano (500 mL), clorofórmio (500 mL), acetato de etila (650 mL) e butanol (12 x 50 mL) que, após a eliminação dos solventes em evaporador rotativo, forneceu as frações hexânica (H': 2,67 g), clorofórmica (C': 0,77 g), acetato de etila (AE': 5,56 g), aquosa (A': 5,76 g) e butanólica (B': 11,44 g). Parte da fração AE' (5,26 g) foi submetida a um pré-fracionamento em coluna de sílica gel 60 [(0,2 - 0,5 mm) (35-70 mesh ASTM)] utilizando como eluentes hexano/AcOEt 75%, AcOEt, AcOEt/MeOH (5, 25 e 50%), MeOH e MeOH/H₂O 5%, obtendo-se 7 frações. As frações hexano/AcOEt 75%, AcOEt e AcOEt/MeOH 5% foram reunidas e a substância **5** (11,3 mg) foi isolada dessa mistura sob a forma de um precipitado cristalino marron claro.

Vitexina (**3**). Cristais amarelos. IV (filme), ν_{\max} cm⁻¹: 3378, 3251, 1615, 1180. EM (70 eV), m/z (int. rel.): 432 (1, M⁺), 414 (2), 283 (100), 270 (19). RMN de ¹H (300,6 MHz, CD₃OD) δ_H (H; mult.; J em Hz; int.): 8,02 (H-2' e H-6'; d; 8,4; 2H); 6,88 (H-3' e H-5'; d; 8,4; 2H); 6,77 (H-3, s; 1H); 6,27 (H-6; s; 1H); 4,68 (H-1''; d; 9,9; 1H); 3,79 (H-2''; nd*; 1H); 3,74 / 3,53 (H-6''; nd*; 2H); 3,46 (H-4''; nd*; 1H); 3,28 (H-3''; nd*; 1H); 3,25 (H-5''; nd*; 1H). RMN de ¹³C δ_C (75,45 MHz, DMSO): 164,4 (C-2), 102,8 (C-3), 182,6 (C-4), 160,9 (C-5), 98,5 (C-6), 163,0 (C-7), 104,4 (C-8), 156,5 (C-9), 105,0 (C-10), 122,0 (C-1'), 129,4 (C-2'), 116,2 (C-3'), 161,6 (C-4'), 116,2 (C-5'), 129,4 (C-6'), 73,7 (C-1''), 71,1 (C-2''), 79,0 (C-3''), 70,3 (C-4''), 82,1 (C-5''), 61,6 (C-6'')

(-)-*epicatequina* (**5**). Cristais marrons. IV (filme) ν_{\max} cm⁻¹: 3184, 3503, 1626, 1144. EM (70 eV), m/z (int. rel.): 290 (14, M⁺), 272 (1), 152 (36), 140 (10), 139 (100), 124 (18), 123 (45), 110 (7), 78 (5), 77 (14), 55 (16), 53 (10), 52 (5), 51 (13), 45 (17), 44 (8), 43 (16), 41 (9), 39 (17). RMN de ¹H (300,6 MHz, CD₃OD) δ_H (H; mult.; J em Hz; int.): 6,97 (H-2'; d; 2,1; 1H); 6,79 (H-6'; dd; 8,4 e 2,1; 1H); 6,75 (H-5'; d; 8,4; 1H); 5,93 (H-6; d; 2,4; 1H); 5,91 (H-8; d; 2,4; 1H); 4,81 (H-2; sl; 1H); 4,17 (H-3; m; 1H); 2,86 (H-4b; dd; 16,8 e 4,7; 1H); 2,72 (H-4a; dd; 16,8 e 2,7; 1H). RMN de ¹³C δ_C (75,45 MHz, CD₃OD): 79,9 (C-2), 67,5 (C-3), 29,2 (C-4a e C-4b), 157,9 (C-5), 96,5 (C-6), 158,2 (C-7), 96,0 (C-8), 157,6 (C-9), 100,2 (C-10), 132,4 (C-1'), 115,4 (C-2'), 146,0 (C-3'), 146,1 (C-4'), 116,0 (C-5'), 119,5 (C-6'). nd*: não definido

Ensaio biológicos

As atividades antibacteriana e antifúngica de EF, EC e suas frações H', C', AE', B' e A' foram avaliadas. A atividade antimicrobiana das amostras e dos antibióticos de referência foi estabelecida¹³ de acordo com a concentração inibitória mínima (CMI): CMI > 1000 µg/mL (inativa), CMI = 500 a 1000 µg/mL (atividade fraca), CMI = 100 a 500 µg/mL (atividade moderada), CMI < 100 µg/mL (ativa boa). Os extratos EF e EC também tiveram suas atividades antiproliferativas avaliadas.

Avaliação da atividade antifúngica

A avaliação da atividade antifúngica dos extratos brutos das folhas e das cascas dos caules foi feita através do teste de susceptibilidade antifúngica, pelo método de microdiluição¹⁴. Fungos utilizados: *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Antifúngico de referência: micostatina (2,0 µg/mL).

Avaliação da atividade antibacteriana

A microdiluição em caldo Mueller-Hinton¹⁵ foi utilizada para determinar as concentrações mínimas inibitórias (CMI) das amostras e dos antibióticos de referência. Bactérias/antibióticos de referência (CMI): *Staphylococcus aureus* ATCC 25923/penicilina

(0,00975 µg/mL), *Bacillus subtilis* ATCC 6623/vancomicina (0,09 µg/mL), *Escherichia coli* ATCC 25922/tetraciclina (0,78 µg/mL). Fração ativa (bactéria testada, CMI): EC (*S. aureus*, 250 µg/mL), AE' (*S. aureus*, 250 µg/mL), A' (*S. aureus*, 250 µg/mL) e B' (*S. aureus*, 500 µg/mL).

Avaliação da atividade antiproliferativa

As amostras EF e EC foram testadas frente a linhagens de células tumorais humanas de leucemia linfóide (K-562), melanoma (UACC-62), pulmão (NCI-460), mama (MCF-7), mama resistente (NCI-ADR), cólon (HT-29), ovário (OVCAR-3), rim (786-0) e próstata (PC-3), segundo a metodologia descrita na literatura¹⁶. O padrão quimioterápico utilizado foi a doxorubicina nas concentrações de 25×10^{-2} , 25×10^{-1} , 25 e 250 µg/mL.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. M. C. de Souza (Departamento de Biologia) pela coleta e identificação botânica da planta, à CAPES pela bolsa concedida e ao suporte financeiro oferecido pelo CNPq.

REFERÊNCIAS

1. Barroso, G. M.; Guimarães, E. F.; Ichaso, C. L. F.; Costa, C. G.; Peixoto, A. L.; *Sistemática de angiospermas do Brasil*, Ed. da USP: São Paulo, 1978, vol. 1.
2. Lorenzi, H.; *Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*, 2ª ed., Plantarum: Nova Odessa, 1998, vol. 1.
3. <http://www.traffic.org/publications/traffic>, acessada em Julho 2004.
4. Tanaka, J. C. A.; Vidotti, G. J.; Silva, C. C.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, *14*, 475.
5. Palme, E.; Bilia, A. R.; Feo V.; Morelli, I.; *Phytochemistry* **1994**, *35*, 1381.
6. Markham, K. R.; Webby, R. F.; Vilain, C.; *Phytochemistry* **1984**, *23*, 2049.
7. Goulart, M. O. F.; Sant'ana, A. E. G.; Lima, R. A. de; Cavalcante, S. H.; *Quim. Nova* **1993**, *16*, 95.
8. Furuya, T.; Orihara, Y.; Tsuda, Y.; *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2539.
9. Rubinstein, I.; Goad, L. J.; Clague, A. D. H.; Mulheirn, L. J.; *Phytochemistry* **1976**, *15*, 195.
10. Matida, A. K.; Rossi, M. H.; Blumental, E. E. A.; Schuquel, I. T. A.; Malheiros, A.; Vidotti, G. J.; *Anais Assoc. Bras. Quim.* **1996**, *45*, 147.
11. David, J. M.; Yoshida, M.; Gottlieb, O. T.; *Phytochemistry* **1994**, *35*, 545.
12. Agrawal, P. K.; Bansal, M. C.; Porter, L. J.; Foo, L. Y. Em *Carbon-13 NMR of Flavonoids – Studies in Organic Chemistry 39*; Agrawal, P. K., ed.; Elsevier Science Publishers B. V.: Amsterdam, 1989, vol. 39, cap. 8.
13. Holecz, F. B.; Pessini, G. L.; Sanches, N. R.; Cortez, D. A. G.; Nakamura, C. V.; Dias Filho, B. P.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 1027.
14. National Committee For Clinical Laboratory Standards; *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M-27A*, NCCLS: Wayne, PA, 1997.
15. National Committee For Clinical Laboratory Standards; *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, NCCLS: Wayne, PA, 2000.
16. Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vairgro-Wolff, A.; *J. Nat. Cancer Inst.* **1991**, *83*, 757.