

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOLUSCICIDA DA *Kielmeyera variabilis* MART (CLUSIACEAE)

Lucimar Pinheiro e Diógenes Aparício Garcia Cortez*

Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, Campus Universitário, 87020-900 Maringá - PR

Gentil J. Vidotti

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

Maria Claudia M. Young

Instituto de Botânica de São Paulo, Av. Miguel Stefano, 3687, 04301-902 São Paulo - SP

Antônio Gilberto Ferreira

Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, 13565-905 São Carlos - SP

Recebido em 2/5/01; aceito em 3/10/02

PHYTOCHEMICAL STUDY AND EVALUATION OF THE MOLLUSCICIDAL ACTIVITY OF *Kielmeyera variabilis* MART. (CLUSIACEAE). Methanol extract obtained from *Kielmeyera variabilis* stems showed significant molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata*. The phytochemical studies of the plants stem to the isolation of three xanthenes (assiguxanthone-B, kielcorin and 1,3,5,6-tetrahydroxy-2-prenylxanthone) and an organic acid (2,5-dihydroxy benzoic acid). The structures of these compounds were identified by IR, MS, ¹H and ¹³C NMR spectral analysis and comparison with literature data.

Keywords: *Kielmeyera variabilis*; molluscicidal activity; xanthenes.

INTRODUÇÃO

A espécie vegetal *Kielmeyera variabilis* Mart, conhecida popularmente por malva-do-campo (sinonímia: pau-santo), é encontrada nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Rio de Janeiro, Goiás e Piauí¹.

Plantas do gênero *Kielmeyera* encontradas no cerrado brasileiro têm sido usadas pela população para o tratamento de diversas doenças, como esquistossomose, leishmaniasis, malária, infecção por bactérias e fungos, entre outras².

Extratos brutos obtidos de diversas partes de espécies da família Clusiaceae, como *Calophyllum verticillatum*, *C. inophyllum* e *C. recedens* apresentaram atividade moluscicida na concentração de 100 ppm para a primeira espécie e 10 ppm para as outras duas³.

Nas plantas da família Clusiaceae, Hipericaceae e Gentianaceae encontra-se uma classe de substâncias de interesse fitoquímico denominadas xantonas⁴. Uma das principais atividades biológicas atribuídas às xantonas é a inibição da enzima monoamino-oxidase (MAO), e sua inibição está associada à atividade antidepressiva⁵. Outras propriedades farmacológicas atribuídas às xantonas são ação antiinflamatória, antiviral (herpes), antimicrobiana, antifúngica e, também, citotóxica⁶. Da espécie *Kielmeyera coriacea* foram isolados xantonas, triterpenos e um composto bifenílico, que exibiram atividade antifúngica sobre *Cladosporium cucumerinum* e *Candida albicans*⁷. A osajaxantona isolada desta espécie exibiu proteção contra a infecção das cercárias do *Schistosoma mansoni*, quando aplicada na pele de animais⁸.

As substâncias moluscicidas são um fator crucial para o controle da esquistossomose. No presente momento apenas uma substância sintética, a niclosamida, é recomendada pela OMS como moluscicida⁹. Em países do Terceiro Mundo o uso de moluscicidas sintéti-

cos tem causado problemas de toxicidade, contaminação do meio ambiente e a resistência dos caramujos (*Biomphalaria glabrata*) transmissores da esquistossomose. Em contraste, o uso de plantas com atividade moluscicida pode representar uma alternativa barata, além de não poluir o meio ambiente¹⁰.

O ensaio *in vitro* para avaliação da atividade moluscicida, utilizado neste trabalho, constitui uma importante alternativa para o controle do vetor dos parasitas da esquistossomose, pois é um teste rápido, barato e recomendado pela OMS, porém existem muitos pré-requisitos para uma planta ser utilizada como moluscicida^{10,11}.

Assim, o presente trabalho tem como objetivo investigar a atividade moluscicida e realizar um estudo fitoquímico da *Kielmeyera variabilis* Mart.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato metanólico (EM) dos galhos da *Kielmeyera variabilis* Mart apresentou atividade moluscicida para a espécie *B. glabrata*, na concentração de 12,5 ppm deste extrato, conforme apresentado na Tabela 1. Como os extratos brutos de plantas são considerados ativos em concentrações abaixo de 100 ppm, este extrato poderia constituir uma alternativa aos moluscicidas sintéticos¹². Foi relatado na literatura que extratos brutos preparados de diversas partes de espécies da família Clusiaceae, pertencentes ao gênero *Calophyllum*, apresentaram atividade moluscicida entre 100-10 ppm. Estas espécies, originárias de Madagascar, podem ser uma nova opção no combate à esquistossomose, que é muito freqüente em países do Terceiro Mundo³. Porém, uma desvantagem quanto aos moluscicidas obtidos na forma de extratos brutos de plantas é a necessidade de uma padronização dos mesmos, em decorrência da variação do conteúdo dos princípios ativos que as plantas sofrem, de acordo com a época do ano. Este extrato foi fracionado em cromatografia a vácuo utilizando-se os solventes hexano, diclorometano e diclorometano:acetato de etila (1:1; v/v), acetato de etila, metanol e metanol:água (1:1; v/v), e

*e-mail: dagcortez@uem.br

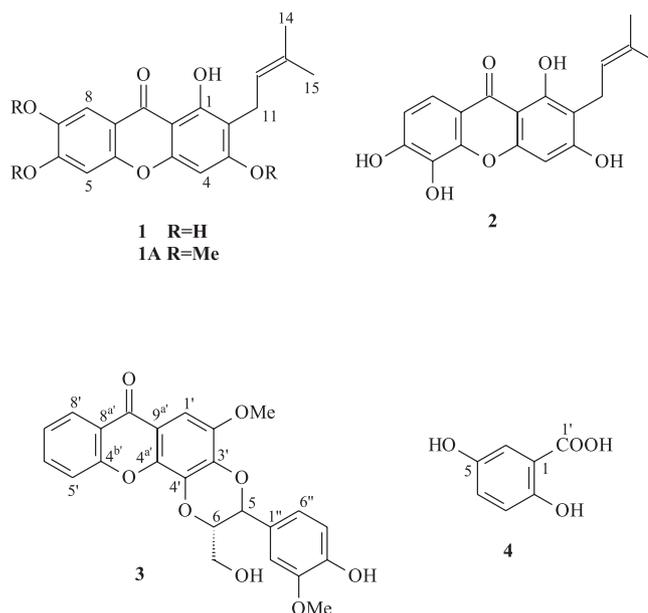
Tabela 1. Atividade moluscicida sobre a *Biomphalaria glabrata* dos extratos **EM**, **EH**, das frações **F1** a **F6** da *Kielmeyera variabilis* e do moluscicida sintético niclosamida, que foi utilizado como controle positivo (**C**)

[] ppm	C		EM		EH		F1 a F4		F5		F6	
	tempo de exposição		tempo de exposição		tempo de exposição		tempo de exposição		tempo de exposição		tempo de exposição	
	6 h	24 h										
400	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
200	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
100	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
50	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
25	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
12,5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6,25	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,12	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,56	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : inativo; + : 100% letal

com as frações os ensaios para avaliar a atividade moluscicida. O estudo fitoquímico biomonitorado do caule da *K. variabilis* convergiu para as frações **F5** e **F6**, com atividade moluscicida nas concentrações de 100 e 50 ppm respectivamente, como demonstrado na Tabela 1. Pode-se observar que após o fracionamento houve uma diminuição da atividade moluscicida. Este efeito pode estar relacionado a um sinergismo entre as substâncias componentes das frações. As frações **F5** e **F6** foram reunidas após análise em CCD e cromatografadas em coluna de gel de SEPHADEX® LH-20 eluída com metanol, fornecendo um material puro. A análise dos dados espectrais de RMN de ^{13}C e ^1H e MS deste material permitiu identificá-lo com sendo a kielcorina (**3**). As frações **F1** a **F4**, não ativas, foram reunidas e submetidas à cromatografia em coluna de gel de SEPHADEX® LH-20, e uma das frações obtidas após CC de sílica forneceu assiguxantona-B (**1**), 1,3,5,6-tetra-hidroxi-2-prenilxantona (**2**) e ácido 2,5-di-hidroxibenzóico (**4**). A substância **3**, originária da reunião das frações ativas **F5** e **F6**, foi avaliada numa concentração de 10 ppm e não apresentou atividade moluscicida após 24 h. A substância pura foi testada a partir desta concentração, porque são consideradas ativas somente substâncias próximas ao moluscicida sintético recomendado pela ONU (niclosamida), que apresenta atividade na concentração de 1 ppm. Por outro lado, passam a ter valor comercial somente as substâncias puras com atividades moluscicidas menores que 10 ppm¹³. O **EM** dos caules da *Kielmeyera variabilis* apresentou uma forte atividade moluscicida na concentração de 12,5 ppm, e esta parte coletada não compromete seu desenvolvimento quando a planta é coletada de forma racional. Esta espécie deve ser mais bem investigada para se avaliar o potencial de outras partes do vegetal, qual parte apresenta melhor atividade moluscicida e em que época do ano apresenta maior atividade. As substâncias **1**, **2**, **3** e **4** já foram isoladas de várias espécies vegetais¹⁴⁻¹⁷, porém foram obtidas pela primeira vez da *Kielmeyera variabilis* Mart. As estruturas **2**, **3** e **4** foram caracterizadas com base nos espectros de RMN ^1H , ^{13}C e massas. No presente trabalho estão sendo apresentados pela primeira vez os dados de RMN ^1H e ^{13}C de **1**, cuja atribuição foi efetuada por comparação com os dados do derivado metilado da assiguxantona-B (**1A**)¹⁴ e pelos dados HSQC, gHMBC e massas (Tabela 2). A substância **1** mostrou o íon molecular de m/z 329 $[\text{M} + \text{H}]^+$, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_6$. As diferenças significativas dos deslocamentos químicos nos espectros de ^{13}C e RMN ^1H para os carbonos 4, 5 e 8 da substância **1** com relação aos

dados correspondentes do derivado metilado **1A** foram consistentes com as alterações eletrônicas provocadas pela conversão dos grupos hidroxílicos na posição 3, 6 e 7 em metoxílicos, provocando uma blindagem 4 ppm nos carbonos 4, 5 e 8, devido à proteção exercida pelo grupo metoxila sobre esses átomos, para a substância **1A**.



CONCLUSÕES

O extrato metanólico bruto dos caules *Kielmeyera variabilis* Mart pode ser empregado satisfatoriamente como moluscicida natural, e o seu fracionamento levou à diminuição da atividade biológica. A principal vantagem da utilização deste extrato bruto seria o baixo custo de obtenção e a não-poluição do meio ambiente, por ser obtido de uma fonte renovável da natureza. Resultados similares com extrato bruto de espécies de plantas da família Clusiaceae foram encontrados. Uma possível alternativa à busca de xantonas como moluscicidas naturais seria a ocorrência predominante destas substâncias químicas nesta família.

Tabela 2. Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75,5 MHz) em CD_3OD para a substância (**1**), (**1A**) (100 MHz, acetona- d_6) e correlações observadas nos espectros de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}\text{-COSY} - ^1\text{J}_{\text{CH}}$ (HSQC) e $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}\text{-COSY} - ^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e 3, HMBC) (100 MHz, CD_3OD) para a substância (**1**)

C	1A $\delta^{13}\text{C}$ (DEPT)	$\delta^{13}\text{C}$ (DEPT)	1 $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}\text{-COSY} - ^1\text{J}_{\text{CH}}$ (HSQC)	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}\text{-COSY} - ^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e 3) (HMBC) $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (4-11 Hz)
1	159,3			H-11
2	111,8			H-11, H-4
3	163,7			H-11
4	89,4	93,9	6,31 (s)	
4a	156,1			H-4
5	99,3	103,4	6,76 (s)	
6	155,4			H-8
7	146,6			
8	104,6	108,9	7,42 (s)	
8a	113,5			
9	179,8			H-8
9a	103,5			H-4
10a	152,2			H-8
11	21,3		3,32 (d, 6,9)	H-12
12	122,1		5,23 (m)	H-11
13	131,9			H-11
14	25,8		1,66 (s)	H-12
15	17,8		1,78 (s)	
3-OMe	55,8			H-12
6-OMe	56,4			
7-OMe	56,3			

PARTE EXPERIMENTAL

Estudo fitoquímico

Procedimentos experimentais gerais

Os espectros no infravermelho foram registrados em espectrômetro BOMEN – MV 100, Hartmann & Braun- Michelson. Os espectros de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100,6 MHz) foram obtidos em espectrômetro Bruker WH 400 e VARIAN, modelo GEMINI 2000 BB, 300 MHz (300,06 MHz para ^1H e 75,45 MHz para ^{13}C), utilizando-se CD_3OD e $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ como solvente, e TMS como referência interna. Para a obtenção de espectro no ultravioleta foi utilizado o aparelho Varian Cary 1E. Os espectros de massa por elétron-spray foram obtidos em espectrômetro VG Platform II, operando a 70 eV, e os espectros de massas (EM) de baixa resolução foram obtidos em aparelho CG/EM – SHIMADZU, modelo QP 2000 A, a 70 eV, equipado com sonda para sólidos.

As separações cromatográficas em coluna por adsorção foram realizadas utilizando-se a técnica de cromatografia flash¹⁸ com sílica gel 60 (230-400 mesh ASTM, Merck), enquanto para as cromatografias em camada delgada analítica utilizou-se sílica-gel GF₂₅₄ Merck. Foram também utilizadas CC em gel de SEPHADEX[®] LH-20 para a purificação de substâncias.

Material vegetal

Os caules de *Kielmeyera variabilis* Mart. foram coletados em 09 de abril de 1999 na Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu – Fazenda Campininha, Estado de São Paulo, e uma excisata foi depositada no herbário do Instituto de Botânica de São Paulo, col. young 11(SP 346929).

Obtenção dos extratos

Os caules do vegetal foram secos em estufa de ar circulante (30 °C), durante 5 dias e pulverizados em moinho de faca rotativa, peneira de 1mm – 1500 rpm. O material moído (550,0 g) foi extraído com hexano e depois metanol, através do processo de maceração dinâmica a frio. Foram realizadas 5 extrações com hexano e 5 extrações com metanol, num período de 24 dias. Em seguida, concentrou-se sob pressão reduzida em evaporador rotatório (45 °C) até obter-se o extrato seco, e posteriormente foram liofilizados e armazenados em freezer, obtendo-se 30 g de extrato hexânico (**EH**) e 34 g de extrato metanólico (**EM**).

Extração e fracionamento

O **EM** (7 g) foi fracionado em cromatografia de coluna a vácuo, tendo como adsorvente Avicel[®], utilizando-se como fase móvel um sistema gradiente com porções 1000 ml de hexano, diclorometano e diclorometano:acetato de etila (50:50; v/v), acetato de etila, metanol e metanol:água (50:50; v/v), obtendo-se 6 frações, que foram liofilizadas após a eliminação do solvente orgânico em evaporador rotatório: (**F1**: 0,67 g), (**F2**: 2,74 g), (**F3**: 0,52 g), (**F4**: 0,26 g), (**F5**: 1,00 g) e (**F6**: 0,44 g). As frações obtidas foram submetidas ao ensaio da atividade moluscicida, utilizando-se caramujos da espécie *Biomphalari glabrata* (Tabela 1).

As frações **F5** e **F6** mais ativas foram reunidas após análise em CCD e fracionadas em cromatografia em gel de SEPHADEX[®] LH-20, utilizando-se como fase móvel MeOH, MeOH:H₂O (9:1) e MeOH:H₂O:ácido acético (45:5:1), obtendo-se 67 frações. A fração 10 (244, 9mg) foi recromatografada em gel de SEPHADEX[®] LH-20, resultando na fração 6 (53,2 mg), a qual foi submetida a uma CCDP, fase móvel Hexano:CH₂Cl₂:MeOH (5:4:1), obtendo-se a substância **3**

(2,1 mg). As frações **F3** e **F4** foram reunidas e fracionadas por cromatografia em gel de SEPHADEX® LH-20, utilizando-se como fase móvel CHCl₃:MeOH (1:1). Obteve-se a fração 23 (17,6 mg), que foi purificada através de cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando-se mistura de hexano, CHCl₃:AcOEt e AcOEt:MeOH como eluentes, o que resultou na substância **2** (2,2 mg). Deste fracionamento, as frações 19 e 21 foram reunidas (61,4 mg) e foram realizadas sucessivas CC em gel de SEPHADEX® LH-20, utilizando-se alternadamente os eluentes MeOH, AcOEt e MeOH, obtendo-se as substâncias **1** (4,6 mg) e **4** (2,5 mg). As frações **F1** e **F2** foram cromatografadas em CC de sílica gel e em gel de SEPHADEX® LH-20, obtendo-se misturas de ácidos graxos e misturas complexas de substâncias, não sendo possível a separação das mesmas por cromatografia de adsorção em coluna, camada delgada preparativa, utilizando-se sílica gel e CC em gel de SEPHADEX® LH-20.

As xantonas (**1**), (**2**), (**3**) e o ácido 2,5-di-hidroxibenzoico (**4**) foram identificados pela análise dos espectros de UV, IV, EM e foi feita aplicação de técnicas bidimensionais de RMN (COSY, HSQC, HMBC), comparando-se com os dados registrados na literatura¹⁴⁻¹⁷.

Assiguxantona-B (**1**). Óleo amarelo viscoso. UV (MeOH) λ_{\max} /nm (log ϵ): 206 (11,44), 254 (11,69), 322 (6,72), 365 (4,31); + NaOH: 242 (10,87), 266 (8,51), 303 (4,10), 383 (9,69); + NaOAc: 208 (14,50), 240 (12,30), 256 (10,35), 371 (7,28); + NaOAc+H₃BO₃: 209 (14,25), 236 (10,92), 260 (12,61), 292 (4,25), 332 (5,69), 364 (6,0); + AlCl₃: 210 (12,40), 234 (12,30), 268 (12,30), 289 (6,15), 363 (8,0), 401 (7,33); AlCl₃+HCl: 207 (13,07), 230 (12,30), 265 (11,84), 346 (9,33), 408 (4,61). IV: ν_{\max}^{NaCl} cm⁻¹: 3372, 2925, 1644, 1612, 1462, 1454, 1260, 1192, 1077, 813. RMN de ¹H (Tabela 2). RMN de ¹³C (Tabela 2). EM: m/z (int. rel.): 329 [M + H]⁺ (59), 325 (14), 315 (13), 300 (10), 291 (14), 199 (12), 186 (17), 184 (16), 178 (29), 163 (11), 143 (16), 142 (96), 130 (13), 100 (100), 65 (86), 64 (16), 62 (15), 58 (23).

1,3,5,6-tetra-hidroxi-2-prenilxantona (**2**). Óleo amarelo viscoso. UV (MeOH) λ_{\max} /nm (log ϵ): 251 (16,23), 284 (5,63), 321 (8,85). IV: ν_{\max}^{NaCl} cm⁻¹: 3358, 2925, 1647, 1612, 1587, 1458, 1292, 1189, 1126, 1076, 897, 813. RMN de ¹H (300 MHz, (CD₃)₂CO) δ : 13,48 (s, OH-1), 7,63 (d, J = 8,7 Hz, H-8), 6,98 (d, J = 8,7 Hz, H-7), 6,54 (s, H-4), 5,28 (m, H-12), 3,36 (d, J = 6,9 Hz, H-11), 1,78 (s, H-15), 1,65 (s, H-14). RMN de ¹³C (75,5 MHz, (CD₃)₂CO) δ : 182,8 (C-9), 161,7 (C-3), 152,7 (C-10a), 154,4 (C-4a), 144,2 (C-5), 164,0 (C-1), 133,4 (C-6), 131,6 (C-13), 123,5 (C-12), 111,4 (C-2), 117,4 (C-8), 113,6 (C-7), 111,6 (C-8a), 109,3 (C-9a), 94,2 (C-4), 25,8 (C-14), 22,9 (C-11), 17,8 (C-15). EM: m/z (int. rel.): M⁺ 328 (32), 313 (21), 286 (12), 285 (55), 274 (22), 273 (100), 69 (12), 55 (11), 44 (15), 41 (14), 39 (12).

Kielcorina (**3**). Óleo amarelo viscoso. UV (MeOH) λ_{\max} /nm (log ϵ): 242 (9,79), 283 (3,15), 312 (8,85). IV: ν_{\max}^{NaCl} cm⁻¹: 3371, 2924, 1608, 1464, 1403, 1350, 1284, 1225, 1141, 1057, 893, 823, 757, 663. RMN de ¹H (300 MHz, (CD₃)₂CO) δ : 8,28 (dd, J₁ = 7,9 e J₂ = 1,8 Hz, H-8'), 7,84 (td, J₁ = 8,5, J₂ = 6,9 e J₃ = 1,8, H-6'), 7,64 (d, J = 8,4 Hz, H-5'), 7,47 (td, J₁ = 7,5, J₂ = 7,6 e J₃ = 0,9, H-7'), 7,29 (s, H-1'), 7,20 (d, J = 1,8 Hz, H-2''), 7,04 (dd, J₁ = 8,6 e J₂ = 2,1 Hz, H-6''), 6,93 (dd, J₁ = 8,0 e J₂ = 2,1 Hz, H-5''), 5,19 (d, J = 8,1 Hz, H-5), 4,37 (td, J₁ = 7,7, J₂ = 3,9 e J₃ = 2,7, H-6), 3,65 (dd, J₁ = 12,4 e J₂ = 4,2 Hz, CH₂), 3,93 (s, H-3''OCH₃), 3,81 (s, H-2''OCH₃). RMN de ¹³C (75,45 MHz, (CD₃)₂CO) δ : 176,1 (C-9'), 156,9 (C-4''), 147,5 (C-2'), 141,9 (C-4''), 135,4 (C-6'), 133,8 (C-4'), 128,4 (C-1''), 127,1 (C-8'), 124,9 (C-7'), 122,4 (C-8''), 121,9 (C-6''), 118,9 (C-5'), 116,1 (C-5''), 115,7 (C-9''), 112,4 (C-2''), 97,8 (C-1'), 77,7 (C-5), 79,5 (C-6), 61,6 (CH₂), 56,4 (MeO-2'), 56,3 (MeO-3'). EM: m/z (int. rel.): 437 [M + H]⁺ (47), 355 (15), 334 (16), 333 (100), 325 (13), 318 (22), 317 (27), 304 (12), 303 (77), 289 (16), 288 (49), 273 (30), 272 (20), 259 (16), 258 (18), 257 (50), 245 (25), 229 (38), 100 (31), 90 (12), 65 (24), 59 (57).

Os valores dos carbonos C-3', 3'' e 4'' não foram observados.

Ácido 2,5-di-hidroxibenzoico (**4**). Óleo translúcido viscoso. UV (MeOH) λ_{\max} /nm (log ϵ): 210 (6,57), 255 (3,37), 292 (2,16). IV: ν_{\max}^{NaCl} cm⁻¹: 3352, 2958, 1686, 1604, 1527, 1447, 1382, 1291, 1120, 1096, 890, 769. RMN de ¹H (300 MHz, (CD₃)₂CO) δ : 7,57 (d, J = 2,1 Hz, H-6), 7,51 (dd, J₁ = 8,1 e J₂ = 2,1 Hz, H-4), 6,94 (d, J = 8,4 Hz, H-3). RMN de ¹³C (75,45 MHz, (CD₃)₂CO) δ : 167,8 (C-1'), 150,9 (C-5), 145,7 (C-2), 123,6 (C-4), 123,2 (C-1), 117,5 (C-6), 115,8 (C-3). EM: m/z (int. rel.): M⁺ 154 (81), 137 (100), 109 (33), 81 (15), 63 (16), 58 (14), 55 (12), 53 (15) 51 (14), 43 (45).

Ensaio biológico

Avaliação da atividade moluscicida¹³

O ensaio moluscicida foi realizado com os extratos **EH**, **EM**, frações **F1** a **F6** e substâncias puras, utilizando-se caramujos adultos da espécie *Biomphalaria glabrata*. Foram utilizados caramujos criados em aquário de tamanho uniforme e ensaiados com os extratos e as frações numa concentração de 400 ppm em duplicata, os quais ficaram em contato com esta solução por 24 h, à temperatura ambiente. As substâncias puras foram testadas apenas na concentração de 10 ppm. Após este tempo foram observados os batimentos cardíacos, através de uma lupa para verificar a mortalidade em 100%. Para avaliar a atividade moluscicida mínima dos extratos **EH**, **EM**, e das frações **F1** a **F6**, foram realizadas diluições decrescentes em água destilada de 400; 200; 100; 50; 25; 12,5 ppm em duplicatas, com a finalidade de se determinar a quantidade mínima para causar 100% de morte. Como controle positivo foi utilizado a niclosamida.

AGRADECIMENTOS

À Profa M. Furlan, do Instituto de Química da UNESP, pela realização dos espectros de massa, e à CAPES, pela bolsa de estudo.

REFERÊNCIAS

- Correa, M. P.; *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1984, vol. V, p. 50.
- Alves, T. M. A.; Silva, A. F.; Brandão, M.; Grandi, T. S. M.; Smânia, E. F.; Smânia, Jr. A.; Zani, C. L.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2000**, *95*, 367.
- Ravelonjato, B.; Kunesch, N.; Poisson, J. E.; *Phytochemistry* **1987**, *26*, 2973.
- Cardona, M. L.; Fernández, I.; Pedro, J. R.; Serrano, A.; *Phytochemistry* **1990**, *29*, 3003.
- Bennet, G. J.; Lee, H. H.; *Phytochemistry* **1989**, *28*, 967.
- Cortez, D. A. G.; Marston, A.; Hostettmann, K.; *Chromatographia* **1999**, *50*, 7.
- Cortez, D. A. G.; Young, M. C. M.; Marston, A.; Wolfender, J. L.; Hostettmann, K.; *Phytochemistry* **1998**, *47*, 367.
- Lopes, J. L.; Lopes, J. N. C.; Gilbert, B.; Bonini, S. E. O.; *Phytochemistry* **1976**, *16*, 1101.
- D'Arcy, P.; Harron, D. W. G.; *Pharm. Int.* **1983**, *4*, 16.
- Marston, A.; Hostettmann, K.; *Phytochemistry* **1985**, *24*, 639.
- Hostettmann, K. Em *Economic and Medicinal Plant Research*; Wagner, H.; Hikino, H.; Farnsworth, N. R., eds.; Academic Press: London, 1989, vol. 3, p. 73.
- Reyes, A. C.; Chavarin, C.; Arias, M. P. C.; Taboada, J.; Jimenez, M. E.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1989**, *84*, 34.
- Hostettmann, H.; Kizu, H.; Tomimori, T.; *Planta Med.* **1982**, *44*, 34.
- Chihiro, I.; Miyamoto, Y.; Nakayama, M.; Kawai, Y.; Rao K. S.; Furukawa, H.; *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, *45*, 1403.
- Goh, S. H.; Jantan, I.; *Phytochemistry* **1991**, *30*, 366.
- Bankova, V.; Dyulgerov, A.; Popov, S. Marekov, N.; *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **1987**, *42*, 147.
- Pinto, M. M. M.; Mesquita, A. A. L.; Gottlieb, O. R.; *Phytochemistry* **1987**, *26*, 2045.
- Still, W.; *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923.