

## **Estudo fitoquímico e ação antimicrobiana de *Calycophyllum Spruceanum* (Mulateiro)**

### **Phytochemical study and antimicrobial action of *Calycophyllum Spruceanum* (Mulateiro)**

DOI:10.34117/bjdv7n6-335

Recebimento dos originais: 16/05/2021

Aceitação para publicação: 16/06/2021

#### **Renata Rhodes Dookie**

Acadêmica de Farmácia do Centro Universitário FAMETRO

Instituição: Centro Universitário Fametro – CEUNI, Instituto Metropolitano de Ensino

Endereço: Av. Constantino Nery, 3204 – Chapada, Manaus – AM, 69050-000

E-mail: renatha26@yahoo.com

#### **Amanda Karoline Protazio Garcia**

Acadêmica de Farmácia do Centro Universitário FAMETRO

Instituição: Centro Universitário Fametro – CEUNI, Instituto Metropolitano de Ensino

Endereço: Av. Constantino Nery, 3204 – Chapada, Manaus – AM, 69050-000

E-mail: amanda.karolinne17@gmail.com

#### **Evellyn Francisco e Silva**

Acadêmica de Farmácia do Centro Universitário FAMETRO

Instituição: Centro Universitário Fametro – CEUNI, Instituto Metropolitano de Ensino

Endereço: Av. Constantino Nery, 3204 – Chapada, Manaus – AM, 69050-000

E-mail: evellyn16\_silva@hotmail.com

#### **Weison Lima da Silva**

Pos-doutorando no Laboratório de bioprospecção e biotecnologia

Instituição: Instituto Nacional de pesquisa da Amazônia- INPA

Endereço: Av. André Araújo, 2.936 - Petrópolis - CEP 69067-375 - Manaus -AM, Brasil

Cx. Postal 2223 - CEP 69080-971 - Fone: (92) 3643-3377

E-Mail: weisilva3@gmail.com

#### **Cecilia Veronica Nunez**

Tecnologista Senior do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Instituição: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia- INPA

Endereço: Av. André Araújo, 2.936 - Petrópolis - CEP 69067-375 - Manaus -AM, Brasil

Cx. Postal 2223 - CEP 69080-971 - Fone: (92) 3643-3377

Email: cvnunez@gmail.com

#### **Maria Teresa Fachin-Espinar**

Professora Doutora do Centro Universitário FAMETRO

Instituição: Centro Universitário Fametro – CEUNI, Instituto Metropolitano de Ensino.

Endereço: Av. Constantino Nery, 3204 – Chapada, Manaus – AM, 69050-000

E-mail: maria.espinar@fametro.edu.br

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A espécie *Calycophyllum spruceanum*, pertencente à família Rubiaceae, conhecida popularmente como mulateiro, tem sido amplamente utilizada na região amazônica devido aos vários benefícios no uso cosmetológico, antiinflamatório e antimicrobiano. Nesse sentido, considerando a ampla utilização de *C. spruceanum*, muitas vezes de forma empírica, evidencia-se a necessidade de realizar estudos mais aprofundados com a espécie.

**OBJETIVO:** Realizar a caracterização fitoquímica e avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos de *C. spruceanum*.

**MÉTODOS:** As cascas de *C. spruceanum*, foram extraídas com hexano e metanol, posteriormente o extrato metanólico foi fracionado por partição líquido-líquido com diclorometano (DCM) e acetato de etila (AcOEt). Todos os extratos e fases foram analisados por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), utilizando-se reveladores físicos e químicos. A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada pela metodologia de microdiluição em poço (CLSI, 2013).

**RESULTADOS:** A avaliação cromatográfica permitiu observar indícios da presença de iridoides, terpenos, alcaloides, substâncias fenólicas entre os extratos hexânico e metanólico. No ensaio antimicrobiano o extrato metanólico apresentou uma concentração mínima inibitória (CIM) de 500 µg frente às 6 cepas testadas. Por outro lado, o extrato hexânico apresentou a menor taxa inibitória somente frente às bactérias *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas aeruginosa*, as fases DCM, AcOEt e hidrometanólico obtidas do extrato metanólico mostraram atividade antibacteriana frente às cepas *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella enteritidis*.

**CONCLUSÕES:** Evidenciou-se o potencial farmacológico da espécie *C. spruceanum*. Amparados pela confirmação da sua caracterização fitoquímica, os extratos vegetais foram analisados e comparando sua ação antibacteriana, sendo essas porcentagens influenciadas pelos solventes utilizados na extração, possibilitam estudos posteriores especificando sua sensibilidade e especificidade, visto que seus valores foram satisfatórios.

**Palavras-Chave:** Caracterização Química, Extração Vegetal, Comparação Inibitória.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** The species *Calycophyllum spruceanum*, belonging to the Rubiaceae family, popularly known as mulateiro, has been widely used in the Amazon region due to the various benefits in the cosmetological, anti-inflammatory and antimicrobial use. In this sense, considering the wide spread use of *C. spruceanum*, often in an empirical way, the need to conduct more in-depth studies with the species is evident.

**OBJECTIVE:** To perform phytochemical characterization and evaluation of the antimicrobial activity of crude extracts of *C. spruceanum*.

**METHODS:** Bioprospecting was carried out from the bark of the species *C. spruceanum*. Initially the material was extracted with hexane and methanol solvents, then ethanol extract was subsequently fractionated through a liquid-liquid partition with dichloromethane (DCM) and ethyl acetate (AcOEt) solvents and analyzed by comparative thin layer chromatography (CCDC), Using physical and chemical revealers. The evaluation of antibacterial activity was performed by the well micro dilution methodology (CLSI, 2013).

**RESULTS:** Was evaluated by chromatography observation the presence of iridoids, terpenes, alkaloids, phenoids compounds between the methanol and hexane extracts. In

the anti-microb assay, the methanol extract showed a minimum inhibition concentration (MIC) of 500 µg facing the 6 bacterial strains tested. On the other hand, the hexane extract showed low inhibitory activity only against *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas aeruginosa*. The DCM, AcOEt and hydromethanolic fazes obtained by the methanol partition showed inhibition values to *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella enteritidis* bacterial stains.

**CONCLUSION:** potential pharmacological efficacy of the native species *C. spruceanum* was evidences in the herbal course. Supported by confirmation of physical chemical characterization, the plant extracts were analyzed and comparing their anti-microbial action, this percentage is influenced by the solvents used during the extraction. they allow consecutive studies specifying there sensitivity and specificity since their results were satisfactory.

**Keywords:** Chemical Characterization, Plant Extraction, Inhibitory Comparison.

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas sempre fizeram parte da história medicinal da humanidade frente o combate de diversas patologias. Tendo estruturas que inspiram a síntese de medicamentos, suas moléculas possuem atividades biológicas que beneficiam á saúde humana (ALMEIDA, 2013).

Populações da américa latina são conhecidas mundialmente por utilizar plantas com propósito medicinal (FENALTI, J. M. et, al.,2016). No Brasil devido à diversidade florística e a ocorrência de espécies vegetais que possuem substâncias biologicamente ativas, tornam o país estratégico para estudos químicos e farmacêuticos (CORADIN, et al.,2011; MOURA, F. D., et al.,2020). Nesse contexto, encontramos espécies vegetais conhecidas pelos seus diferentes usos medicinais como é o caso da espécie *Calycophyllum spruceanum* (Rubiaceae).

No Brasil é popularmente conhecida como mulateiro, pau-mulato, escorrega-macaco e pau-marfim. O seu tronco possui a casca fina esverdeada quando nova, e torna-se castanho-escuro ou marrom, que se descasca anualmente em longas tiras, expondo a camada interna avermelhada e de textura lisa (GUITTON, T. L.1991).

Sua renovação natural e anual possibilita uma coleta totalmente sustentável, essa coleta é aconselhável fora do período chuvoso. O mulateiro foi incorporado na medicinal herbal e uso cosmetológico, podendo ser facilmente comprado nos feirantes locais na cidade de Manaus (ZULETA, et al.2003).

Várias ações biológicas são citadas no uso popular, principalmente a aplicação sobre a pele com função antiinflamatória e antimicrobiana (DUKE, 2009; BRIOSO,

2012; SANTOS, 2016). Inclui também uso contraceptivo, chá para prevenção de envelhecimento, controle de doenças gástricas e uterinas, distúrbios do aparelho geniturinário, colesterol alto, problemas de tireóide e para tratar diabetes (ALMEIDA, 2013; CAETANO et al., 2014). Sendo também amplamente apreciado por suas funções cosmetológicas, dentre elas, rejuvenescimento, hidratante curativo de rugas, cicatrizante (bastante usados em cortes, feridas e queimaduras), como protetor solar, no tratamento de manchas na pele, e como fortalecedor no controle de queda para os fios do couro cabeludo (REVILLA, 2001; ARAÚJO et al., LINO et al., 2009; MORAES et al., 2009).

Alguns estudos foram realizados para comprovar os benefícios do mulateiro. Os estudos da ação antifúngicos e antiparasitários do *C. spruceanum* obtiveram efetividade. Zuleta et al. (2003) através de testes in vitro exibiram alta atividades contra formas de tripomastigota (cepa Y) de *T. cruzi*. Santos et al. (2016) obtiveram resultados de eficiência na eliminação contra ovos e larvas de *S. frugiperdado* e Wen, L. et al. (2011), a ação sobre as espécies da *Cândida parapsilosis*, *Criptococcus*, *Fusariumoxusporum*, *Candidaalbicans*, *Microsporungypseum*, *Trichophytonmentagrophytense* *Trypanosoma cruzi*. Outros estudos comprovaram a segurança toxicológica, e Lino et al., (2009) comprovaram a ação antioxidante e fotoprotetora.

As pesquisas supracitadas evidenciam a eficácia da espécie para uso fitoterápico. Entretanto para validação científica como iniciativa prévia, tornam-se necessário a adoção por métodos padronizados, podendo ser exploradas atividades biológicas de interesse ou perfis químicos. Dessa a forma a execução deste trabalho será enfatizada na verificação da atividade antimicrobiana como também conhecer os aspectos fitoquímicos dos extratos e fases obtidas de casca do *C. spruceanum*.

## 2 MÉTODOS

### 2.1 OBTENÇÃO E MOAGEM DO MATERIAL VEGETAL

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus, Amazonas, Brasil. A matéria-prima utilizada nos experimentos foram cascas do *Calycophyllum spruceanum*. As amostras foram adquiridas, já secas, na cidade de Manaus/AM, no Armazém Adolpho Lisboa. Foi realizada a redução do tamanho da casca, usando Moinho de Facas SL-31.

## 2.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

Os extratos foram preparados utilizando 500 g de casca do *C. spruceanum* e 100 ml de hexano, usando Banho de Ultrassom, após isso o material vegetal foi filtrado e novamente extraído com hexano. Este procedimento foi repetido mais duas vezes (totalizando 3 extrações com hexano). Após a extração com hexano, o material vegetal foi seco e extraído com metanol através do mesmo procedimento.

## 2.3 PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO EXTRATO METANÓLICO

Para a cromatografia líquido-líquido utilizou-se a proporção de 1 g de amostra para 50 mL de solução hidrometanólica (1:1 v/v). A amostra, 10 g de extrato metanólico foi solubilizado numa solução de 250 ml de metanol (MeOH) com 250 ml de água destilada para formação de 1ª fase (MeOH/H<sub>2</sub>O), em seguida, adicionado 500 ml de DCM. Após separação das fases, o DCM foi retirado e submetido à rotaevaporação, então, reservado em capela de exaustão para total secagem e evaporação do solvente. Sendo repetido até completar um total de 3 L de DCM, obtendo-se assim a fase diclorometânica. O mesmo procedimento foi realizado com o AcOEt, obtendo-se, assim, a partir do extrato bruto metanólico, as fases DCM, AcOEt e hidrometanólica.

## 2.4 ANÁLISE EM CROMATOGRÁFIA EM CAMADA DELGADA COMPARATIVA (CCDC) DOS EXTRATOS

As análises químicas dos extratos e fases foram realizadas por CCDC, empregando cromatofolhas de alumínio com sílica gel impregnado com indicador de fluorescência UV254 (Alugram SIL G/UV254). As amostras foram aplicadas nas cromatoplacas e eluídas com solventes orgânicos em diferentes proporções de acordo com a polaridade das amostras. Foram utilizados reveladores físicos: luz ultravioleta ( $\lambda$  254 e 365 nm), e reveladores químicos: iodo ressublimado, sulfato cérico, cloreto férrico, cloreto de alumínio, anisaldeído sulfúrico e reagente de Dragendorff. Alguns dos reveladores utilizados estão listados na tabela 1.

Tabela 1: Reativos para a cromatografia em camada delgada

Reveladores	Deteção
anisaldeído sulfúrico*	esteróides, terpenos, etc.
vanilina sulfúrica*	esteróides, terpenos, flavonóides
sulfato de cério*	revelador universal

cloreto férrico	substâncias fenólicas
reagente de Dragendorf	alcaloides

\*Reveladores universais.

## 2.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

Para os ensaios antibacterianos foram utilizadas cepas bacterianas sensíveis (ATCC) gram-positivas e gram-negativas, cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz-Rio de Janeiro (FIOCRUZ-RJ): *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966), *Edwardsiella tarda* (ATCC 15947), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145). As cepas foram escolhidas de acordo com sua importância clínica. O ensaio foi realizado segundo metodologia descrita por CLSI (2013).

Os micro-organismos utilizados no ensaio foram cultivados em meio líquido Mueller-Hinton e posteriormente diluídos até a concentração de 0,5 na escala de McFarland. Foram utilizadas 10 mg dos extratos e fases sendo solubilizadas em dimetilssulfóxido (DMSO) a 2,5%.

Utilizaram-se concentrações de 1000 e 500 µg/mL. Os micro-organismos foram inoculados em microplacas de 96 poços, em triplicata, juntamente com as diferentes diluições dos extratos/fases, posteriormente foi feita a leitura inicial em espectrofotômetro (625 nm) tipo ELISA e depois as microplacas foram mantidas em estufa de crescimento microbiano a 30 ou 37 °C.

Passado as 24 horas foi realizada a leitura final em espectrofotômetro tipo ELISA e adicionado junto aos poços, 40 µL de revelador (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazóleo). Onde houve crescimento bacteriano os poços foram revelados em vermelho, e onde não houve crescimento, os poços permanecerão incolores.

Foi feito o controle negativo (DMSO + micro-organismo), controle positivo (antibiótico Oxitetraciclina + micro-organismo) e um controle de esterilidade do caldo (3 poços contendo apenas o caldo).

## 3 RESULTADOS

### 3.1 TEOR DE RENDIMENTO

Os rendimentos dos extratos hexânicos e metanólicos e fases DCM e AcOEt estão apresentados na tabela 2.

A porcentagem de rendimento foi calculada com base na equação a seguir:

$$R = \frac{MF}{MO} \times 100$$

Onde:

R = Rendimento do extrato em porcentagem (g/100g de amostra)

MF = Massa do extrato medida ao final da extração (g)

MO = Massa da amostra inicial (g)

100 = Fator de conversão para porcentagem

É possível observar que os rendimentos dos extratos obedecem a ordem de polaridade dos solventes utilizados. Devido o MeOH ter polaridade superior ao DCM o extrato metanólico maior rendimento.

Para as fases DCM e AcOEt os rendimentos foram maiores, obedecendo também a regra de polaridade de solvente. É perceptível que a fase acetato teve destacado rendimento (tabela 2).

Tabela 2: Rendimentos dos extratos e fases de cascas de

Extrato	Peso (mg)	Rendimento em porcentagem (%)
Hexânico	4,35	0,87
metanólico	38,08	7,61
Fase DCM	0,34	3,4
Fase AcOEt	4,34	43,4
Fase MeOH/H <sub>2</sub> O	5,32	5,32

### 3.2 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COMPARATIVA

As análises fitoquímicas dos extratos hexânicos, metanólicos e fase DCM, apresentaram indícios da presença de terpenos quando revelados com anisaldeído e sulfato cérico sendo perceptível spots na cor lilás. Tal informação está de acordo com a literatura, publicações relatam a ocorrência da classe químicas dos terpenos na espécie *Calycophyllum spruceanum* (De VARGAS et al., 2016). Ainda com anisaldeído também



foi observado spots com coloração vermelha denunciando possivelmente a presença de flavonoides, no extrato metanólico. Resultados quanto à presença de flavonoides em *C. spruceanum* foram encontrados no trabalho realizado por Peixoto e colaboradores (2018) onde foram isolados a 5-hidroximorina e taxifolina.

Ainda nos extratos DCM e metanólico foram observados spots azulados quando revelados com anisaldeído, denunciando indício da presença de terpenos com unidades de açúcares ligados sendo denominados iridoides. Este resultado observado é condizente com as pesquisas realizadas por Zuleta et al. (2003) que isolaram e elucidaram estruturas de secoiridoides, iridoides (loganetina, loganina) e os secoiridoides kingiside, secoxiloganina e diderrosídeo.

A revelação com vanilina indicou a possível presença de terpenos e fenólicos através da coloração roxa. As presenças de substâncias fenólicas também foram observadas nos extratos metanólico, fases DCM, AcOEt e MeOH/H<sub>2</sub>O, pelos spots escuros como resultado da reação com o cloreto férrico. Substâncias fenólicas ou polifenólicas com frequência são citadas em trabalhos com a espécie nesse estudo. Essas moléculas certamente justificam a atividade antioxidante conferida a *C. spruceanum* (Da SILVA et al, 2018; PERIN et al, 2020).

Na aplicação do reagente de Dragendorff, houve reação nos extratos metanólico e DCM, indicando a presença de alcaloides. (WAGNER et al.,1984). Muitas espécies da família Rubiaceae, a qual pertence a espécie em estudo, são conhecidas pela produção de uma grande diversidade de alcaloides (MARTINS e NUNEZ 2015).

Todos os resultados estão mostrados na seguinte tabela (tabela 3).

Tabela 3: Avaliação qualitativa de classes de metabolitos secundários dos extratos da casca do *C. spruceanum*

Amostras	Indícios da classe de metabolitos secundários			
	IR	TE	FE	AL
Extrato hexânico	+	+	-	-
Extrato metanólico	+	+	+	+
Fase DCM	+	+	+	+
Fase AcOEt	+	-	+	-
Fase MeOH/H <sub>2</sub> O	+	-	+	-

IR – iridoides, TE – terpenos, FE - Fenóis, AL - alcalóides,+ presentes, - ausentes.



### 3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR MICRODILUIÇÃO EM POÇO

Nos estudos da atividade biológica de produtos naturais é importante a correta escolha dos bioensaios, devendo ser simples, sensíveis e reprodutíveis (MAM et al.,2002). A tabela 4 mostra a atividade antimicrobiana dos extratos vegetais frente a algumas bactérias sensíveis, testados pelo método de diluição em poço.

O extrato metanólico apresentou as maiores porcentagens inibitórias, entre 71-100% contra as 6 cepas na concentração de 1.000µg e 500µg. Em contra partida o hexânico teve o menor índice de inibição, agindo nas concentrações de 1.000µg apenas contra *A.hydrophila* (72,71%) e na concentração de 500µg contra *P.aeruginosa* (52,41%).

Os extratos de fases da partição obtiveram valores de inibições variáveis entre as concentrações. O DCM nas concentrações de 1.000µg inibiu as cepas *A.baumannii*, *A.hydrophila*, *S.enteritidis* e *S.aureus* com

valores entre 73 e 88% e nas concentrações de 500µg, inibiu *A.hydrophila* com 84,64% e *P.aeruginosa* com 51,41%. O acetato inibiu *A.baumannii* (65,51%), *A.hydrophila* (59,98%), *P.aeruginosa* (66,72%) e *S.enteritidis* (74,59%) com concentrações de 1.000µg enquanto apenas *A.baumannii* (60,27%) teve inibição na concentração de 500µg. Para a fase MeOH/H<sub>2</sub>O, apresentou resultados de inibição contra *A.hydrophila* e *S.aureus* nas concentrações de 1.000µg e nas concentrações de 500µg contra *A.baumannii* e *A.hydrophil*.

Tabela 4: Porcentagem de inibição dos extratos sobre cepas sensíveis em concentrações de 1000 e 500µg/m

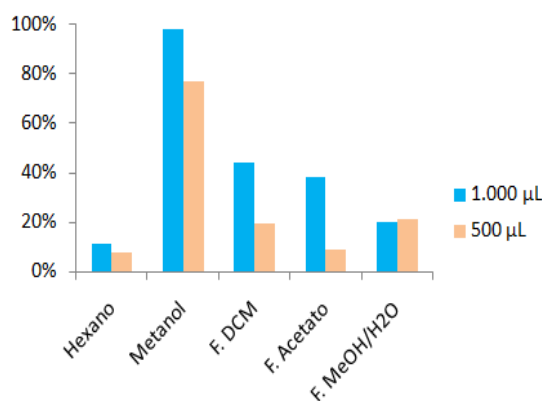
CEPAS bacterianas sensíveis (ATCC)	Concentração (µg/ml)	Porcentagem de inibição (%)				
		Extrato hexânico	Extrato metanólico	Fase DCM	Fase AcOEt	Fase MeOH/H <sub>2</sub> O
<i>A. baumannii</i>	1000	-	100	83,45	65,51	-
	500	-	80,75	-	60,27	57,98
<i>A. hydrophila</i>	1000	72,71	100	88,23	59,98	90,27
	500	-	92,75	84,64	-	89,06
<i>E. tarda</i>	1000	-	100	-	-	-
	500	-	79,76	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	1000	-	-	-	66,72	-
	500	-	93,65	51,41	-	-
<i>S. enteritidis</i>	1000	-	100	73,36	74,59	-
	500	-	97,02	-	-	-
<i>S. aureus</i>	1000	-	71,02	60,11	-	-
	500	-	-	-	-	-

De acordo com os resultados observados, o extrato bruto metanólico, se mostrou com maior potencial antibacteriano inibindo o crescimento bacteriano em ambas as concentrações testadas, sendo um resultado esperado e condizente com as análises cromatográficas que revelaram principalmente a presença de compostos fenólicos nos

extratos mais polares, uma vez que é reconhecida a atividade antibacteriana associada a este tipo de metabólitos secundários (SILVA et al, 2010; PAZ et al. 2018). Para os extratos que apresentaram valores de inibição apenas em concentrações diluídas, embasam-se em possíveis componentes isolados e separados durante o processo de extração levando em consideração que essa espécie botânica possui componentes químicos não identificados e desconhecidos (PEIXOTO et, al.2018).

Para comparar os resultados da atividade inibitória dos extratos, avaliados quanto a sua ação antimicrobiana, sendo então representado no gráfico, observa-se que o extrato metanólico apresenta melhor potencial de ação bacteriostático e bactericida, tendo elevado valores inibitórios em ambas as concentrações testadas.

Gráfico 1: Comparativa da porcentagem de probabilidade inibitória dos extratos sobre microbianos.



#### 4 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados nesse estudo justificam o uso medicinal do *C. spruceanum* entre os povos nativos e algumas das ações relatadas que partem das crenças mitológicas da suposta árvore milagrosa. Amparados pela confirmação da caracterização fitoquímica, os extratos vegetais testados apresentam atividade antimicrobiana para microrganismos de cepas sensíveis, sendo a porcentagem inibitória influenciada pelo método de extração realizado. Apesar disso, são necessários mais estudos para confirmar estes achados. Mesmo com esses resultados obtidos, não é aconselhável o uso indiscriminado desta planta para fins medicinais. Essa pesquisa contribui para a valorização dos estudos fitoquímicos e pode incentivar pesquisas futuras exploratórias em relação à espécie *C. spruceanum*, promovendo assim, resultados que possam garantir o uso seguro e eficaz de produtos dela originados.

### **AGRADECIMENTOS**

As autoras são gratas ao Programa de Graduação de Bacharel em Farmácia, pelo Centro Universitário Fametro, ao Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas (INPA), ao Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia, e à todos que cooperaram, incentivaram e apoiaram a elaboração do projeto.

## REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, M.C. Aspectos ecofisiológicos da germinação de sementes de mulateiro (*Calycophyllum spruceanum* Benth.) Rubiaceae. 2003. v, 114 f. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2003. Available at: <<http://hdl.handle.net/11449/100669>>. Acesso em maio de 2020
2. Araújo, V. F.; Petry, A. C.; Echeverria, R. M.; Fernandes, E. C.; Pastore, F. Plantas da Amazônia para Produção Cosmética: uma abordagem química - 60 espécies do extrativismo florestal não-madeireiro da Amazônia. Brasília. 2007:244. Disponível em <https://docplayer.com.br/5379318-Itto-plantas-da-amazonia-para-producao-cosmetica.html>. Acesso em maio de 2020
3. Ducke, A.; Black, E. A. Notas sobre Filogeografia da Amazônia Brasileira. Boletim técnico do Instituto Agrônomo do Norte, v.29, [s.n.], 1954. Disponível em publicação > notas-sobre-a-fitogeografia-da-amazonia-brasileira <https://www.embrapa.br> >. Acesso em maio de 2020
4. Caetano, R. S.; Souza, A. C. R.; Feitozao, L. F. O uso de plantas medicinais utilizadas por frequentadores dos ambulatórios Santa Marcelina, RO. Revista Saúde e Pesquisa, v. 7, n. 1, 2014. Disponível em: [https://periodicos.unicesumar.edu.br > download](https://periodicos.unicesumar.edu.br/download). Acesso em maio de 2020
5. Coradin, L.; Siminsk, A.; Reis, A. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul /. – Brasília: MMA, 2011. Disponível em: [https://www.gov.br > fauna-e-flora > Regiao\\_Sul](https://www.gov.br/fauna-e-flora/Regiao_Sul). Acesso em maio de 2020
6. Da Silva, A. P. A. B., Amorim, R. M. F., de Freitas Lopes, R., Mota, M. R. L., da Silva, F. M. A., Koolen, H. H. F., ... & da Cunha, R. M. (2018). *Calycophyllum spruceanum* BENTH ameliorates acute inflammation in mice. Journal of ethnopharmacology, v. 219, p. 103-109, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29567276/>. Acesso em maio de 2020
7. DE VARGAS, Fabiano S. et al. Antioxidant activity and peroxidase inhibition of Amazonian plants extracts traditionally used as anti-inflammatory. BMC complementary and alternative medicine, v. 16, n. 1, p. 1-8, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26921197/>. Acesso em maio de 2020
8. Fenalti, J. M.; Santos, T. M.; Santos, P. C.; Baccega, B. B.; Scaini, C. J. Diversidade das plantas brasileiras com potencial anti-helmíntico. VITTALLE - Revista De Ciências Da Saúde. (2016). Recuperado de <https://periodicos.furg.br/vittalle/article/view/6188>. Acesso em maio de 2020
9. Guitton, T.L. Madeiras da Amazônia: características e utilização. 1. ed., Rio Branco: CEAGAC, 1991. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/174831/1/CPAF-AP-2016-Densidade-e-resistencia-a-flexao-da-madeira.pdf> .Acesso em maio de 2020

10. Lino, T. S. S. et al. Efeito antioxidante e fotoprotetor de extratos aquosos e etanólicos da casca do *Calycophyllum spruceanum*. In: Reunião Anual da SBPC - Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. 2009, Manaus. Anais Eletrônicos. Manaus: UFAM, 2009. Acesso em maio de 2020
11. Martins, D.; Nunez, C. V. Secondary metabolites from Rubiaceae species. *Molecules*. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/DOI: 10.3390/molecules200713422>. Acesso em maio de 2020
12. MAM, M.; Pinto, A. C.; Veiga, Jr. V. F.; Grynberg, N.F.; Echevarria, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quím Nova*. 2002; 25(3):429-438. DOI: 10.1590/S0100-40422002000300016. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422002000300016](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000300016) Acesso em maio de 2020
13. Morais, S. M. et al. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 1, 2009. Disponível em: <http://www.http://www.scielo.br/j/qn/a/tgsYhzfzBs3pDLQ5MtTnw9c/?lang=pt>. Acesso em maio de 2020
14. Moura, F. D., et al., A importância da biossegurança na produção e utilização de produtos naturais e fitoterápicos/ the importance of biosafety in the production and use of natural and herbal products. *Brazilian Journal of Development*, Curitiba, v. 6, n. 2, feb. 2020. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/issue/view/79>.
15. Oliveira, A. C. D.; Ropke, C. D. Os dez anos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e os principais entraves da cadeia produtiva de extratos vegetais e medicamentos fitoterápicos no Brasil. 2016. FIOCRUZ, Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde, ABIFINA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil 2PHYTOBIOS, Barueri, SP, Brasil. DOI 10.5935/2446-4775.20160015. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/19253>. Acesso em maio de 2020
16. PAZ, Jorge Enrique Wong et al. Phenolic content and antibacterial activity of extracts of *Hameliapatens* obtained by different extraction methods. *Brazilian journal of microbiology*, v. 49, n. 3, p. 656-661, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1517838216301903>. Acesso em maio de 2020
17. PEIXOTO, Herbenya et al. *Calycophyllum spruceanum* (Benth.), the amazonian “tree of youth” prolongs longevity and enhances stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Molecules*, v. 23, n. 3, p. 534, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29495517/>. Acesso em maio de 2020
18. Revilla, J. Apontamentos para a cosmética amazônica. Ed. SEBRAE-AM/INPA, Manaus, 2002. Disponível em: <https://koha.inpa.gov.br>. Acesso em maio de 2020
19. Santos, A. B.; Ribeiro-oliveira, J. P.; Carvalho, C. M. Sobre a botânica, a etnofarmacologia e a química de *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f.ex K. Schum. Universidade Federal do Acre, Centro de Ciências Biológicas e da Natureza,

69.920-900.2016. Disponível em:  
[https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S151605722016000500383&script=sci\\_abstract&tlng=pt](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S151605722016000500383&script=sci_abstract&tlng=pt). Acesso em maio de 2020

20. Silva, J. R. A., Rezende, C. M., Pinto, A. C., & Amaral, A. C. F. (2010). Cytotoxicity and antibacterial studies of iridoids and phenolic compounds isolated from the latex of *Himatanthus sucuba*. *African Journal of Biotechnology*, 9(43), 7357-7360. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/130387>. Acesso em maio de 2020

21. Wen, L.; Haddad, M.; Fernández, I.; Espinoza, G.; Ruiz, C.; Neyra, E.; Bustamante, B.; Rojas, R. Actividad Antifúngica De Cuatro Plantas Usadas En La Medicina Tradicional Peruana. Aislamiento De 3'- Formil - 2',4',6' - Trihidroxidihidrochalcona, Principio Activo De *Psidium acutangulum*. *Rev Soc Quím Perú*. 2011. Disponível em [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2011000300005](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2011000300005). Acesso em maio de 2020

22. Wagner, H.; Proksch, A.; Riess-Maurer, I.; Vollmar, A.; Odenthal, S.; Stuppner, H.; Jurcic, K.; Le Turdu, M.; Heur, Y. H. Immunostimulant action of polysaccharides (heteroglycans) from higher plants. Preliminary communication. *Arzneimittelforschung*, v.34, n.6, 1984. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6541484/>. Acesso em maio de 2020

23. Zuleta, L. M. C.; Cavalheiro, A. J.; Silva, D. H. S.; Furlan, M.; Young, M. C. M.; Albuquerque, S.; Castro-Gamboa, I.; da Silva Bolzani, V. Seco-iridoids from *Calycophyllum spruceanum* (Rubiaceae). *Phytochemistry* 2003, 64, 549-553. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12943773/>. Acesso em maio de 2020

RADECIMENTOS