

## ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOACTIVOS DE PLANTAS COM ACTIVIDADE INSECTICIDA

Entidade Beneficiária: FEUP (Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto)  
Supervisor da Instituição: Dra. Margarida Bastos

Empresa ou Serviço: I.I.C.T. (Instituto de Investigação de Ciências Tropicais)

Daniela Alexandra Baptista Fernandes  
Julho 2004

66(047.3)  
LEQ 2003/FERd



UNIÃO EUROPEIA  
Fundo Social Europeu



Mais Educação

## ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOACTIVOS DE PLANTAS COM ACTIVIDADE INSECTICIDA

Entidade Beneficiária: FEUP (Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto)  
Supervisor da Instituição: Dra. Margarida Bastos

Empresa ou Serviço: I.I.C.T. (Instituto de Investigação de Ciências Tropicais)

Daniela Alexandra Baptista Fernandes  
Julho 2004

54(047.3)/LEP 2003/FErd

Universidade do Porto	
Faculdade de Engenharia	
Biblioteca	
Nº	88421
CDU	632.35(047.3)
Data	/ /20

## **AGRADECIMENTOS**

À Dr. Margarida Bastos, pelo apoio, orientação científica, críticas e sugestões dadas ao longo deste trabalho. Gostaria ainda de salientar a amizade e disponibilidade demonstrada durante este estágio.

A todos os colegas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste estágio.

## ÍNDICE

1. Objectivos.....	pág. 1
2. Introdução.....	pág. 1
3. Processos de obtenção dos extractos.....	pág. 2
4. <i>Daphne gnidium</i> .....	pág.3
4.1. Preparação de extractos a 0,2%.....	pág.4
4.2. Fraccionamento por cromatografia em coluna (CC) .....	pág.5
4.3. Análise e decomposição das fracções da coluna por cromatografia em camada fina.....	pág.7
4.4. Purificação dos constituintes de algumas fracções.....	pág.8
5. Outras plantas com actividade pesticida.....	pág.10
5.1. Material vegetal a extrair.....	pág.12
5.2. Processo utilizado para obtenção dos extractos bioactivos.....	pág.13
5.3. Extracção exhaustiva do material vegetal: extracção múltipla.....	pág.14
5.4. Preparação dos extractos brutos.....	pág.17
5.5. Preparação dos extractos de concentração 0,018 %.....	pág. 21
6. Bibliografia.....	pág. 23

## 1. OBJECTIVOS

## 2. INTRODUÇÃO

A utilização maciça de pesticidas, que foi apanágio da protecção das plantas nos anos 50 e 60 é hoje, em todo o mundo uma prática abandonada, devido aos seus perigos de toxicidade para o homem, pelos casos de resistências de pragas, doenças aos pesticidas e pela poluição da natureza.

Nos últimos anos, tem-se procurado utilizar as plantas de várias espécies como fonte de compostos modelos para diversas finalidades, não só como princípios activos de numerosos medicamentos, mas também, entre outras, como potenciais pesticidas.

A expansão do conhecimento sobre as estruturas químicas dos produtos naturais, bem como da sua interacção das plantas com os insectos, permite uma melhor compreensão dos mecanismos bioquímicos dessas interacções, o que torna possível o desenvolvimento de novos agentes biocidas. Os produtos naturais provenientes das plantas apresentam um forte potencial no combate a insectos, uma vez que o conhecimento sobre a sua actividade biológica pode levar à sua aplicação no manejo de pragas.

A ecologia química, ramo da ciência em crescimento, no qual as relações planta - insecto e planta - planta, entre outras, são examinadas em termos de efeito de substâncias sobre as funções biológicas, estabelece que essas funções são frequentemente metabólicos secundários, os quais constituem verdadeiros sinais químicos nessas interacções.

Sendo assim, tem havido uma procura e uma investigação cuidadosa de novos agentes, baseados em produtos naturais, com o intuito de dominar os pesticidas e efectuar o manuseamento de pesticidas biológicos [1].

### 3. PLANTAS

*D.gnidium* é uma planta silvestre da família das *Thymealeaceae*, conhecida vulgarmente como Trovisco [2].

É uma planta com uma altura máxima de dois metros e cujos ramos chegam a alcançar os 120 cm de largura. A sua floração de cor alaranjada e vermelha dá-se entre o mês de Junho e Novembro e reside em todo o tipo de solos [2].

Na antiguidade as espécies de *Daphne* eram usadas nas seguintes aplicações: antibacteriano usado nos coelhos, usado para eliminar furunculoses e secar feridas, como condicionador de cabelo, utilizado na feitura de vassouras caseiras, usado para a pesca fraudulenta, como purgante drástico, eliminador de piolhos dos cabelos e como purgante drástico.



Os compostos encontrados no *D. gnidium* pertencem às seguintes famílias de compostos: Cumarinas, Flavonóides, Diterpenos, Catequinas, Tocoferóis [3] [4].

Recentemente foram realizados e investigados os efeitos dos extractos da planta *D.gnidium*, os quais mostram uma potencial actividade na área da medicina, indústria cosmética e na área dos pesticidas. As cumarinas isoladas (dafnina, dafnetina e dafnoretina) mostraram serem importantes componentes para o tratamento de doenças da pele, porque activam a produção da melanina e são usadas como um anti-inflamatório. Para além disso a cumarina Dafnina foi útil contra a bactéria *Staphylococcus*, resistente à penicilina [5]. Quanto ao seu papel na área da indústria cosmética, possuem uma potencial actividade antioxidante e podem inibir o crescimento de alguns microorganismos patogénicos [4]. Na área da medicina o composto mezerino, mostrou uma actividade antileucémica. Finalmente, o extracto metanólico das folhas possui actividade antibacteriana, antimicótica, tolerabilidade cutânea e o extracto metanólico provoca danos cutâneos fotoquímicos [4]

*Nerium oleander* é uma planta arbustiva da família da *Apocynaceae*, conhecida usualmente também como Espirradeira, Oleandro, Flor-de-São-José, Loandro, Loureiro-rosa e Loandro-da-Índia [6].

É uma planta que atinge os dois metros de altura, produz caule e ramos lenhosos com folhas esguias, verdes e acinzentadas. Floresce no verão ou no início do outono, as suas flores são

presas a cachos que nascem nas pontas dos ramos e o colorido varia em tons de rosa, amarelo, vermelho e branco [6].

Cerca de 15-20 g por animal são suficientes para matar bovinos e equinos. Existem casos registrados de intoxicação e morte de humanos que utilizaram o ramo de *Nerium oleander* como espeto de churrasco. Mesmo as folhas secas continuam como tóxicas. Entre os indígenas americanos, as mulheres preparavam um chá desta planta para assassinar seus maridos.



Investigações feitas a diferentes partes da planta, verificou-se que toda a planta é tóxica e revelaram a presença de glicosídeos cianogénicos, triterpenos, alcaloides e carboidratos de acção paralisante sobre o coração [7] [9].

Os glicosídeos politenólicos cardíacos presentes nas folhas possuem efeitos anti-inflamatórios e provocam um efeito inibidor do crescimento de tumores [5]. Os extractos metanólicos possuem uma actividade anti-bacteriana e os óleos obtidos das raízes são usados em doenças de pele [10]. Análises feitas a amostras de folhas colhidas em diferentes cidades do Brasil, revelaram a presença de metais Ti, V, Zn e Fe, verificando-se uma maior presença nas cidades onde o fluxo de tráfego é mais elevado. Estes resultados indicam que as folhas absorvem metais da atmosfera e são consideradas indicadores ambientais [11]

*Laurus nobilis* pertence à família da *Lauraceae* e é conhecida como Loureiro [13].

É uma árvore ou arbusto até 20 metros, de copa oval, densa e irregular. Possui ramos delgados, as folhas são agudas ou acuminadas, glabras e aromáticas quando esmagadas [13].

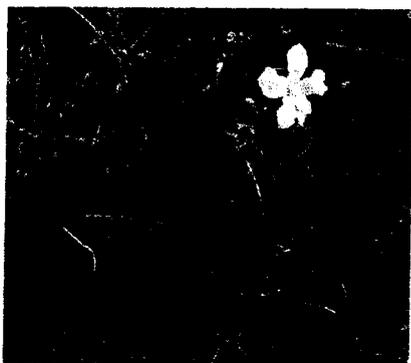
O ramo *Laurus nobilis* representava o símbolo histórico da victoria. Com este ramo eram coroados os príncipes e utilizado para venerar os deuses. É básico na cozinha, sobretudo para cozer marisco. A madeira é muito dura e tem muitíssima utilidade, para além do seu bom odor [13].

Nas folhas estão presentes essencialmente óleos, flavonoides, sesquiterpenos lactones e alcaloides isoquinolinos [13]. Foram analisados extractos de folhas e frutos em TLC e verificou-se a presença de flavonoides, ácidos fenólicos e alcaloides [13].

É uma planta usada tradicionalmente em África no tratamento da gonorreia, como analgésico e antipirético [12]. O óleo presente nos frutos é usado no tratamento de furunculos, pisaduras, entorces e como repelente de insectos [13]. As suas substâncias não polares possuem actividades anti-oxidantes e por isso usadas na indústria alimentar [2]. Os extractos aquosos são usados no tratamento de hemorroides, anti-reumáticos, diuréticos e atidotes nas

mordidelas de cobras [14]. A Industria Farmacêutica utiliza partes da planta como diurético, para combater a debilidade (fraqueza orgânica), febre, infecções, dor, nevralgias, úlceras e ausência de menstruação.

*Momordica charantia* é uma planta da família da Cucurbitaceae, conhecida popularmente como: erva-de-são-caetano, erva-de-lavadeira, fruto-de-cobra, fruto-negro, erva-de-são-vicente, melão-de-são-caetano-gigante[15].



Está distribuída pelos Trópicos e é cultivada extensamente como uma colheita vegetal [16].

Extractos aquosos, revelaram a presença de taninos, saponins, vitaminas, peptídeos, aminoácidos, flavonoides e alcaloides [18].

Na Índia é usada tradicionalmente na doença dos diabetes porque reduz a glucose no sangue, é consumida

como um vegetal [15] [17].

#### 4. MATERIAL VEGETAL A EXTRAIR

As plantas e as partes das plantas que foram extraídas encontram-se descritas na tabela 1.

**Tabela 1** – Partes do material vegetal

	<b>folhas</b>	<b>casca</b>	<b>flores</b>
<i>Ptaeroxylon obliquum</i>	X	X	
<i>Nerium oleander</i>	X		X
<i>Laurus nobilis</i>	X		
<i>Momordica charantia</i>	X		
<i>Leonotis nepetifolia</i>	X		
<i>Lonchocarpus sericens</i>	X		

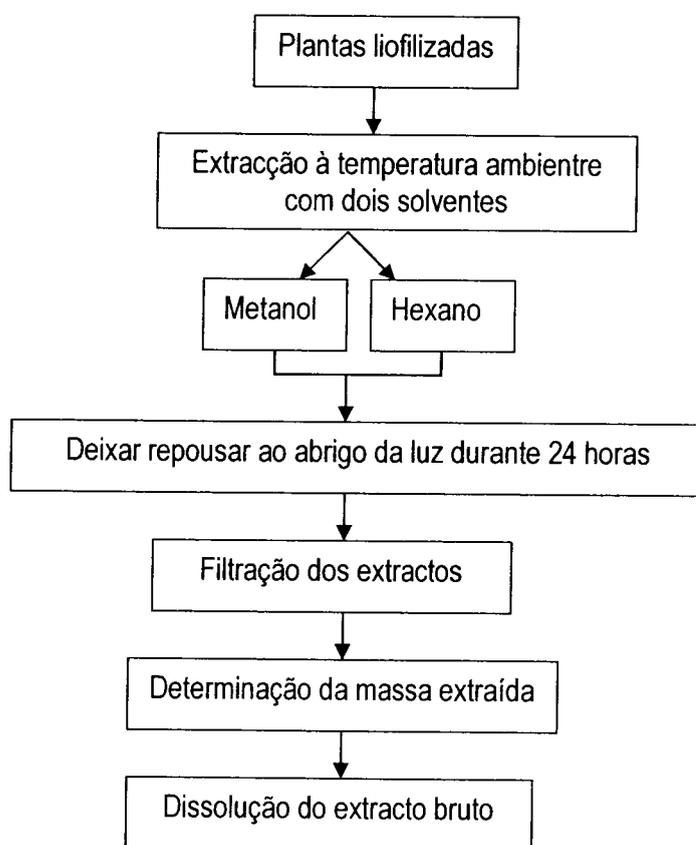
É de referir que, da planta *Lonchocarpus sericens* existe uma amostra menos triturada (*Lonchocarpus sericens* 1) e uma amostra mais triturada (*Lonchocarpus sericens* 2).

## 5. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1. PROCESSO GERAL DE OBTENÇÃO DOS EXTRACTOS BIOACTIVOS

Existem vários métodos de extracção de plantas, os quais utilizam diversos solventes com propriedades diferentes devido à sua polaridade.

De seguida apresenta-se o método geral usado na preparação dos extractos das plantas (esquema 1).



*Esquema 1* – Método geral de obtenção de extractos.

### 5.1.1 EXTRACÇÃO EXAUSTIVA DE MATERIAL VEGETAL: EXTRACÇÃO MÚLTIPLA

Foi efectuado o estudo do número de ciclos de extracções necessários para garantir a extracção exaustiva das diferentes amostras vegetais com dois solventes diferentes: Metanol e Hexano.

Foram usados 500 mg de cada amostra vegetal e 2,5 ml de cada solvente. As amostras com o solvente extractor foram deixadas fechadas e ao abrigo da luz. O líquido sobrenadante foi filtrado por papel de filtro (celulose), deixou-se evaporar (hotte) e determinou-se a massa extraída nessas condições.

Este processo foi repetido várias vezes com adição de igual volume de solvente extractor.

#### . EXTRACÇÃO MÚLTIPLA COM O SOLVENTE HEXANO

Foram efectuadas oito reextracções sobre cada amostra vegetal. A quantidade extraída variou entre aproximadamente 1 e 17 mg. A partir da oitava extracção não se verificou aumento significativo de massa extraída.

A planta planta *P. obliquum* (folhas), *N. oleander* (flores rosa) e *N. oleander* (flores vermelhas), foram aquelas que se se obtiveram uma maior massa de extractos com o solvente Hexano (fig. 4 e 5).

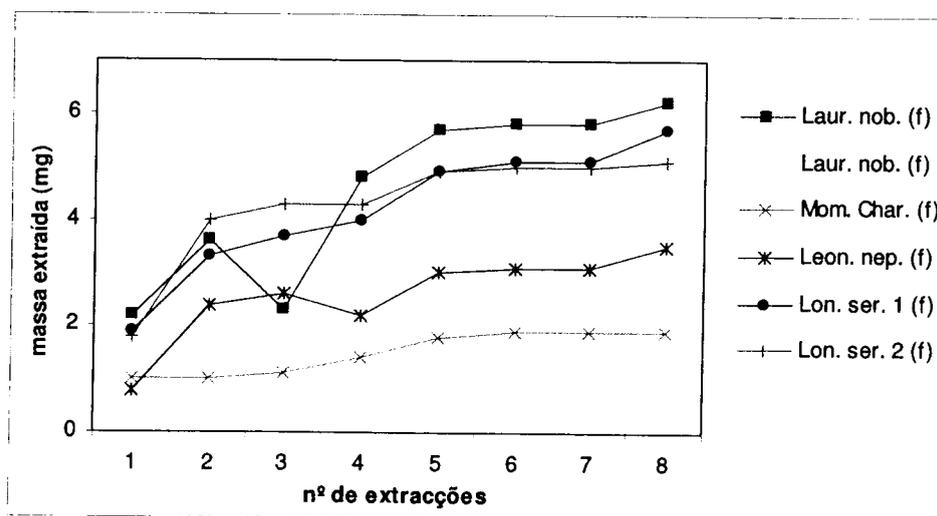
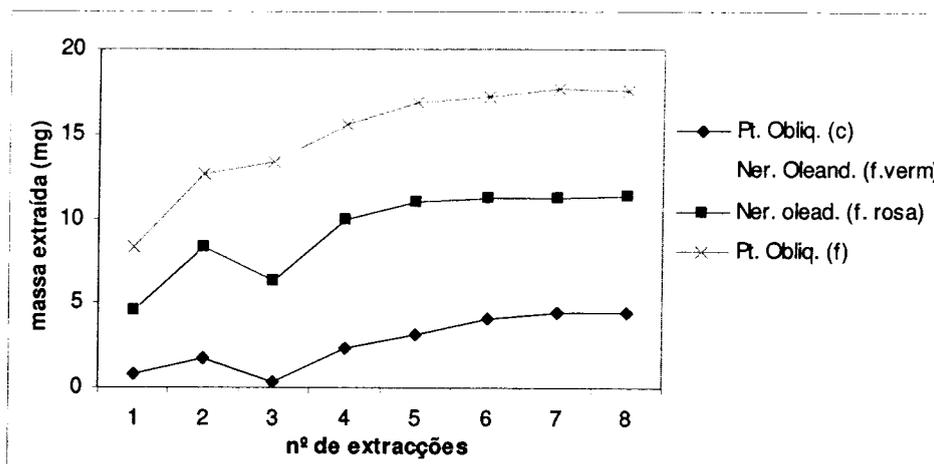


Figura 4 – Extracção múltipla com Hexano.



**Figura 5** – Extracção múltipla com Hexano.

Na fig. 4 verifica-se que na 2ª extracção as plantas apresentam um valor de massa extraída superior ao que seria de esperar. Tal excesso de massa, deve-se ao facto de que a amostra ainda não se encontrava completamente seca, isto é, ainda não teria ocorrido a evaporação total do solvente extractor Hexano.

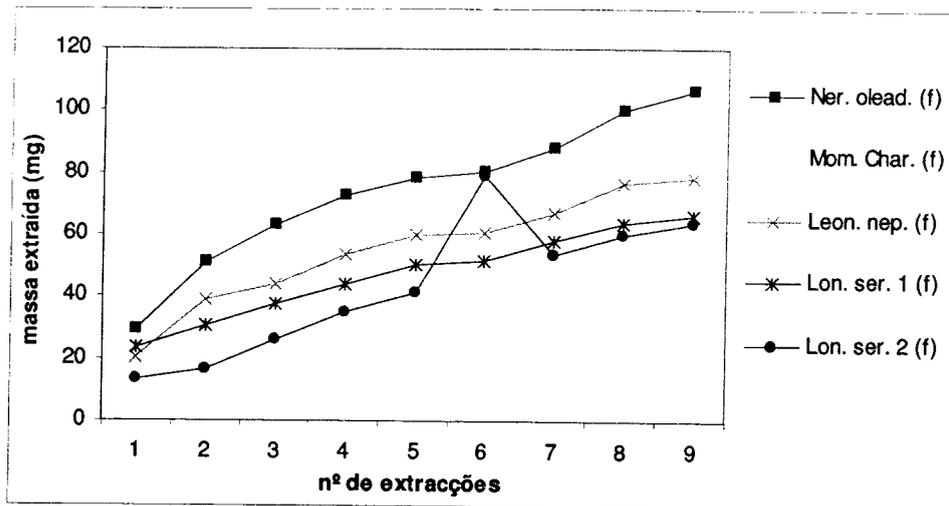
Na fig. 5, na extracção nº 3 a massa determinada deverá estar incorrecta, por defeito. Isto é, apresenta um valor inferior ao obtido após a 1ª e 2ª extracção. Tal facto deverá ser atribuído a um erro de calibração da balança analítica utilizada.

### . EXTRACÇÃO MÚLTIPLA COM O SOLVENTE METANOL

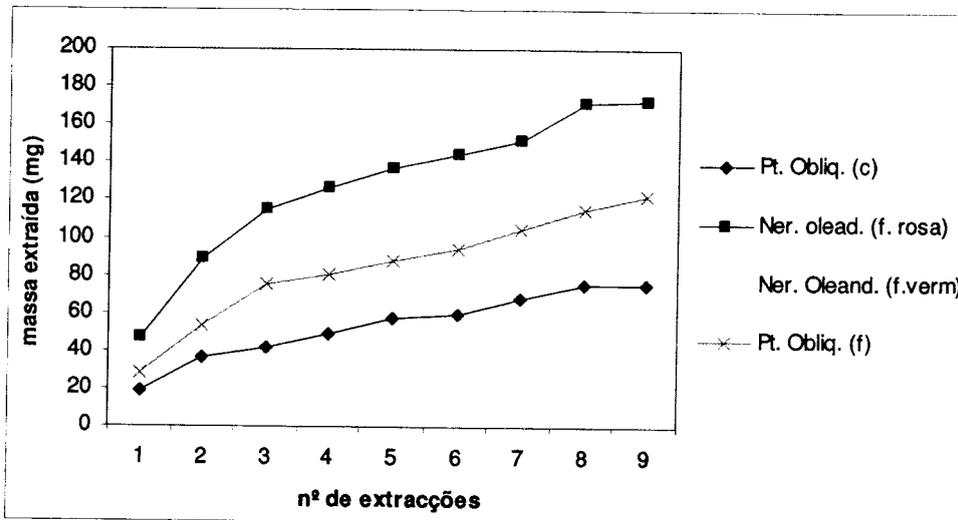
Foram efectuadas nove reextracções sobre cada amostra vegetal. A quantidade extraída variou entre aproximadamente 14 e 175 mg. A partir da nona extracção não se verificou aumento significativo de massa extraída.

A planta planta *P. obliquum* (folhas), *N. oleander* (flores rosa) e *N. oleander* (flores vermelhas), foram novamente aquelas que se se obtiveram uma maior massa de extractos com o solvente Metanol (fig. 4 e 5).

Ao comparar as fig. 5 e 6 com as fig. 4 e 5, o solvente extractor Metanol extrai maior quantidade de massa do que o solvente extractor



**Figura 6** – Extracção múltipla com Metanol.

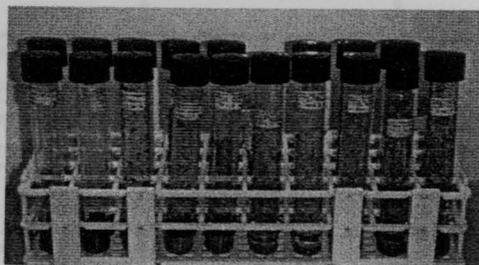


**Figura 7** – Extracção múltipla com Metanol.

Da fig. 6 verifica-se que na extracção nº 6, a massa extraída da planta *Lonchocarpus sericens2* é superior às que seria de esperar. Isto deve-se ao facto de ainda não ter ocorrido a evaporação total do solvente extractor Metanol.

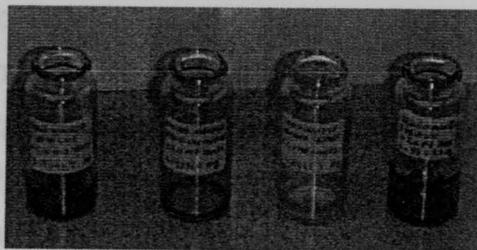
## 5.2. PREPARAÇÃO DOS EXTRACTOS BRUTOS

Para a obtenção dos extractos das diferentes plantas a uma concentração de 0,018%, pesou-se aproximadamente 2x500 mg de cada amostra de planta para dois tubos de ensaio e adicionou-se 2,5 ml do solvente: Metanol e Hexano (fig.1). Na totalidade foram preparados vinte extractos diferentes: dez extractos com o solvente Metanol e dez extractos com o solvente Hexano.



**Figura 1** – Tubos de ensaio contendo amostras de plantas com solvente.

Deixou-se repousar ao abrigo da luz durante 24 horas, filtrou-se com filtro de papel para frascos devidamente rotulados. Após evaporação do solvente, pesou-se e determinou-se a massa extraída (fig.2).



(1) (2) (3) (4)

**Figura 2** – Frascos contendo extractos brutos.

- (1) *L. nobilis* (folhas)
- (2) *N. oleander* (flos vermelhas)
- (3) *L. Sericens* (folhas)
- (4) *L. nepetifolia* (folhas)

A massa de planta pesada e massa de extracto obtida com os dois solventes (Metanol e Hexano), apresenta-se na tabela 2.

**Tabela 2** – Massa de planta usada na extracção e massa de extractos obtida após a primeira extracção.

	massa de planta (mg)	Volume de solvente (ml)	massa de extracto (mg)
<i>Ptaeroxylon obliquum</i> (casca)	504,9	2,5 de metanol	23,3
<i>Ptaeroxylon obliquum</i> (folhas)	501,25	2,5 de metanol	56,6
<i>Ptaeroxylon obliquum</i> (folhas)	500,2	2,5 de hexano	19,3
<i>Nerium oleander</i> (folhas)	502,3	2,5 de metanol	187,3
<i>Nerium oleander</i> (folhas)	502,7	2,5 de hexano	6,2
<i>Nerium oleander</i> (flores rosa)	503,3	2,5 de metanol	29,2
<i>Nerium oleander</i> (flores rosa)	500,2	2,5 de hexano	5,9
<i>Nerium oleander</i> (flores vermelhas)	505,1	2,5 de metanol	45
<i>Nerium oleander</i> (flores vermelhas)	500,1	2,5 de hexano	8,8
<i>Laurus nobilis</i> (folhas)	500	2,5 de metanol	182,5
<i>Laurus nobilis</i> (folhas)	502,8	2,5 de hexano	98,9
<i>Momordica charantia</i> (folhas)	500,9	2,5 de metanol	14,7
<i>Momordica charantia</i> (folhas)	502,4	2,5 de hexano	0,7
<i>Leonotis nepetifolia</i> (folhas)	507,7	2,5 de metanol	15,3
<i>Leonotis nepetifolia</i> (folhas)	500,9	2,5 de hexano	0,2
<i>Lonchocarpus sericens 1</i>	507,7	2,5 de metanol	9
<i>Lonchocarpus sericens 1</i>	500,4	2,5 de hexano	2
<i>Lonchocarpus sericens 2</i>	505,6	2,5 de metanol	2,6
<i>Lonchocarpus sericens 2</i>	507,6	2,5 de hexano	1,6

Pode-se verificar, pela análise da tabela 2, que o solvente metanol possui maior capacidade de extracção dos compostos presentes nas plantas do que o solvente Hexano. Assim por exemplo para a amostra *N. oleander* (flores rosa) com o solvente metanol obtém-se cerca de 5 vezes mais extracto (29,2 / 5,9) do que com o solvente Hexano. Para se obter os extractos de hexano a uma determinada concentração, será necessário maior quantidade de amostra vegetal e de um maior número de extracções do que para obter extractos com o solvente Metanol.

Através do valor de massa de extracto obtido com a primeira porção de cada solvente, estimou-se a quantidade de planta necessária para preparar 25 ml de extracto a 0,018%. De acordo com essa estimativa, foi pesada quantidade adicional de planta e utilizado um maior volume de solvente. Foram efectuados várias reextracções da matéria vegetal, até obter a massa necessária para preparar o volume de extracto à concentração pretendida.

Na tabela 3., apresenta-se a massa total de amostra vegetal utilizada na preparação dos dois tipos de extractos - Metanol e Hexano, bem como o número de extracções efectuadas com cada amostra vegetal. Por exemplo , para obter cerca de 130-140 mg de extracto de *Momordica charantia* (folhas) foi utilizado cerca de 10 g de amostra vegetal e reextrair sete vezes com 50 ml de Hexano (7X50 ml Hexano), enquanto que com o solvente Metanol apenas foram utilizadas cerca de 1,6 mg de amostra vegetal reextraída seis vezes com 6 ml de Metanol (6X6 ml Metanol).

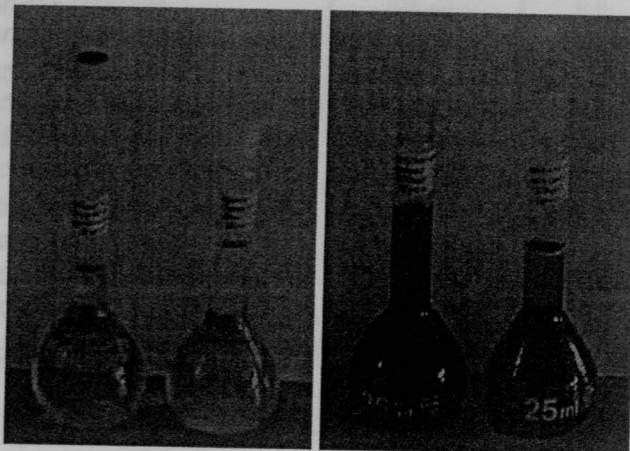
**Tabela 3** – Massa total de planta utilizada e de extracto obtida.

	massa total pesada (mg)	método de extracção	massa de extracto (mg)
<i>Ptaeroxylon obliquum</i> (casca)	1540,8	1 x 2,5 + 6 x 5 ml metanol	140,4
<i>Ptaeroxylon obliquum</i> (folhas)	501,25	1 x 2,5 ml metanol	58,1
<i>Ptaeroxylon obliquum</i> (folhas)	500,2	1 x 2,5 ml hexano	0,9
<i>Nerium oleander</i> (folhas)	502,3	1 x 2,5 ml metanol	144,5
<i>Nerium oleander</i> (folhas)	3758,4	1 x 2,5 + 8 x 18 ml hexano	68,1
<i>Nerium oleander</i> (flores rosa)	1409,7	1 x 2,5 + 1 x 4,6 ml metanol	146,4
<i>Nerium oleander</i> (flores rosa)	4010,2	1 x 2,5 + 1 x 18 ml hexano	80,6
<i>Nerium oleander</i> (flores vermelhas)	505,1	1 x 2,5 ml metanol	45,4
<i>Nerium oleander</i> (flores vermelhas)	3082,4	1 x 2,5 + 1 x 13 ml hexano	77
<i>Laurus nobilis</i> (folhas)	1002	1 x 2,5 + 6 x 6 ml metanol	289,9
<i>Laurus nobilis</i> (folhas)	1006,7	1 x 2,5 ml hexano	71,1
<i>Momordica charantia</i> (folhas)	1621,3	1 x 2,5 + 6 x 6 ml metanol	142,9
<i>Momordica charantia</i> (folhas)	10559,4	1 x 2,5 + 7 x 50 ml hexano	134,2
<i>Leonotis nepetifolia</i> (folhas)	2035,3	1 x 2,5 + 1 x 8 ml metanol	82,9
<i>Leonotis nepetifolia</i> (folhas)	10630,7	1 x 2,5 + 1 x 50 ml hexano	69,5
<i>Lonchocarpus sericensis</i> 1	2643	1 x 2,5 + 1 x 11 ml metanol	101,2
<i>Lonchocarpus sericensis</i> 1	10564,2	1 x 2,5 + 1 x 51 ml hexano	77,7
<i>Lonchocarpus sericensis</i> 2	505,6	1 x 2,5 metanol	2,5
<i>Lonchocarpus sericensis</i> 2	13559,4	1 x 2,5 + 1 x 70 ml hexano	2,4

## 5.2.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRACTOS DE CONCENTRAÇÃO 0,018%

Pretendeu-se preparar 25 ml de extracto à concentração de 0,018% a partir da massa de extractos brutos obtidos na tabela 3.

Transferiu-se 44 mg de cada amostra de extracto bruto para balão volumétrico de 25 ml.



1) 2) 1) 2)

**Figura 3** – Extractos à concentração de 0,018%:

A) *N. oleander* (flores rosa) B) *L. nepetifolia*

1) Extracto com metanol

2) Extracto com hexano

Na tabela apresentam-se os extractos que foram preparados a 0,018%, bem como os volumes dos diferentes solventes utilizados na dissolução do extracto bruto.

**Tabela 4** – Volumes adicionados na dissolução dos extractos brutos.

	solvente	volume de solvente dissolvido		
		metanol	hexano	diclorometano
<i>Ptaeroxylon oblquum</i> (casca)	metanol	25	0	0
<i>Nerium oleander</i> (folhas)	metanol	25	0	0
<i>Nerium oleander</i> (folhas)	hexano	1,5	21,4	2,1
<i>Nerium oleander</i> (flores rosa)	metanol	25	0	0
<i>Nerium oleander</i> (folhas rosa)	hexano	1,4	21,6	2
<i>Nerium oleander</i> (folhas vermelhas)	hexano	1,2	23	0,8
<i>Laurus nobillis</i> (folhas)	metanol	25	0	0
<i>Momordica charantia</i> (folhas)	metanol	25	0	0
<i>Momordica charantia</i> (folhas)	hexano	0,6	23,4	1
<i>Leonotis nepetifolia</i> (folhas)	metanol	25	0	0
<i>Leonotis nepetifolia</i> (folhas)	hexano	0,9	22,5	1,6
<i>Lonchocarpus sericens 2</i> (folhas)	metanol	25	0	0
<i>Lonchocarpus sericens 2</i> (folhas)	hexano	0,9	22,5	1,6

O solvente usado para a dissolução dos extractos brutos dependeu do solvente utilizado na preparação desses extractos. Assim foi utilizado Metanol para a dissolução do extracto bruto metanólico das diferentes amostras vegetais. No entanto, a dissolução dos extractos brutos obtidos com o solvente extractor Hexano, foi auxiliado com a adição de fracções de Diclorometano e Metanol.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- [1] – JAMILTON P. SANTOS; HÉLIO T. PRATES; JOSÉ M. WAQUIT; ALAÍDE B. OLIVEIRA: *Avaliação de substâncias de origem vegetal no controle de pragas de grãos armazenados. Embrapa.*
- [2] – M. A. PÉREZ; R. OCETE; M. LARA, 1992: *Ensayos sobre la actividad antialimentaria de un extracto etanólico de hojas de Daphne Gnidium L. frente a cuatro especies de insectos. Bol. San. Veg. Plagas, 18, 435-440.*
- [3] – FÁTIMA ROCHA, 1996, edição especial: *Nomes vulgares das plantas existentes em Portugal.*
- [4] – M. ASSUNTA DESSÍ; MÓNICA DEIANA; ANTONELLA ROSA, 2001: *Antioxidant Activity of Extracts from Plants Growing in Sardinia. Phytoterapy Research. 15, 511-518.*
- [5] – M. A. PÉREZ; R. OCETE, 1994: *Actividad antialimentaria de extractos de Daphne Gnidium L. y Anagyris foetida L., sobre Leptinotarsa decemlineata Say. Bol. San. Veg. Plagas, 20, 617-622.*
- [6]- *Toxicology and Applied Pharmacology* xx (2004) xxx – xxx.
- [7]- *Carbohydrate Research* 332 (2001) 109-114.
- [8]- *Spectrochimica Acta Part B* 55 (2000) 1181-1187.
- [9]- *Phytochemistry* , vol. 50, pp. 435-438, 1999.
- [10]- *Journal of Ethnopharmacology* 49 (1995) 33-39.
- [11]- *Phytochemistry* , vol. 42, NO. 1 pp. 45-49, 1996.
- [12]- *Phytochemistry* 64 (2003) 1405-1411.
- [13]- *Fitoterapia* 74 (2003) 613-616.
- [14]- *Fitoterapia* 73 (2002) 242-243.
- [15]- *Journal of Ethnopharmacology* 88 (2003) 107-111
- [16]- *Phytochemistry* , vol. 44, NO. 7 pp. 1313-1320, 1997.
- [17]- *Phytoterapy Research*, 14, 592-595 (2000).
- [18]- *Phytoterapy Research*, 15, 95-98 (2001).



FACULDADE DE ENGENHARIA

UNIVERSIDADE DO PORTO

BIBLIOTECA



000088421