



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE**  
**BIOLÓGICA DO LÁTEX DE *COUMA UTILIS* (SORVA)**

**PRICILLA LOUISE LEITE DA SILVA**

MANAUS

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA MILTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**PRICILLA LOUISE LEITE DA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE**  
**BIOLÓGICA DO LÁTEX DE *COUMA UTILIS* (SORVA)**

**Dissertação apresentada como requisito à obtenção do título de mestre à Universidade Federal do Amazonas – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, área de concentração Agroflorestal, sob orientação do Dr. Prof. Massayoshi Yoshida.**

**Orientador: Dr. Massayoshi Yoshida**

**Co-orientador: Dr. Spartaco Alstolfi**

**MANAUS**

**2014**

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que sempre foi fiel a mim mesmo eu não merecendo, e a minha família que sempre me apoiou nas minhas decisões e me fortaleceu muitas vezes quando eu pensava em desistir.

## **Agradecimentos**

Primeiramente a Deus por seu imenso amor, zelo e cuidado. Por ter me concedido esta oportunidade de aprender o que realmente é ciência, na prática, no meu dia-dia. Agradeço-lhe por me ajudar a conseguir essa grande conquista, sempre me conduzindo com sabedoria e colocando pessoas especiais neste caminho, as quais me fizeram crescer em conhecimento a cada encontro. Mesmo com problemas e dificuldades pude sentir a Sua mão no controle durante esses dois anos.

Agradeço aos meus pais: Oswaldo Junior F. da Silva e Rosângela Leite da Silva por simplesmente me proporcionarem tudo que tenho hoje e por serem os grandes responsáveis pela minha essência. São os meus maiores exemplos de vida e sei que sempre poderei contar com eles em todos os momentos. Obrigada por esses 28 anos de tanto amor e dedicação! Agradeço ao meu irmão Hiago Leite da Silva, pela amizade e ajuda quando precisei. Ao meu noivo: Felipe Souza de Oliveira pelo amor, paciência, motivação e orações que com certeza fizeram toda a diferença para que eu conseguisse concluir este trabalho.

À coordenação do curso PPG-Biotec e a sempre tão gentil e prestativa secretária Nubiane Truicy.

Ao meu orientador Dr. Massayoshi Yoshida, pelo aceite, credibilidade e por todos os ensinamentos.

Ao meu co-orientador, Dr. Spartaco Astolfi, pela paciência em me receber todas as vezes que batia na porta da sua sala para esclarecer dúvidas e por me direcionar no que fazer quando estava completamente perdida.

Aos meus amigos do laboratório da Central Analítica do Centro de Biotecnologia da Amazônia: Karol Barbosa, Raimundo Junior, Dácio Montenegro e Laura Cristina que sempre me apoiaram me incentivando com “uma palavra amiga”.

Ao professor Dr. Francisco Célio Maia Chaves e aos motoristas da Embrapa Amazônia Ocidental, por sempre atenderem tão bondosamente todas as vezes que precisava realizar uma coleta com urgência.

Ao Professor Dr. Carlos Bloch, ao professor Dr. Luciano Paulino e a toda a sua equipe da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Cenargen por abrirem as portas dos laboratórios e me permitirem aprender técnicas de MFA e Maldi-TOF.

Ao Dr. Sérgio Nunomura e a sua aluna Rita Cynara, do INPA, que tão bondosamente me ajudaram nas análises de RMN.

Ao professor Felipe Cruz, pela ajuda nas análises antimicrobianas.

Finalizando, meus agradecimentos a todos os que, injustamente ou por esquecimento, não foram mencionados.

**AGRADEÇO**

## RESUMO

A presente dissertação descreve as características físico-químicas, químicas e atividades biológicas do látex de *Couma utilis* (Apocynaceae), espécie frutífera, genuinamente brasileira, endêmica da Região Amazônica, conhecida popularmente como sorveira, cujo látex é utilizado em alimentação. O látex, após a extração, separa-se em três fases: partículas de borracha (F1), soro (F2) e lutóides (F3). A caracterização morfológica do látex, previamente aquecido a 45°C, foi realizada por Microscopia de Força Atômica e observou-se a formação de filmes e rugosidade a partir do látex bruto, soro com anticoagulante, soro diluído, filtrado e centrifugado. Não se detectou a presença de proteínas em análise no Espectrômetro de Massas Maldi-TOF. Entretanto, o extrato filtrado e liofilizado do soro, através de fracionamento cromatográfico e posterior análise por RMN do composto isolado, permitiu identificar a ocorrência de acetato de  $\alpha$ -amirina. A atividade antimicrobiana do soro (F2) foi avaliada empregando os micro-organismos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Aspergillus niger* e *Candida albicans*. Observou-se a inibição de crescimento para *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* na concentração final de 50  $\mu$ L/mL de F2.

Palavras-chave: *Couma utilis*, Apocynaceae, acetato de  $\alpha$ -amirina.

## ABSTRACT

The present dissertation describes the physical-chemical, chemical and biological characteristics of latex utilis Couma (Apocynaceae), fruit species, genuinely Brazilian, endemic of Amazon region, popularly known as rowan, whose latex is used in food. After extraction, the latex is separated in three phases: rubber particles (F1), serum (F2) and lutoids (F3). Morphological characterization of latex, previously heated at 45°C was carried out by Microscopy of Atomic Force and was observed the formation of films and roughness from raw latex, anticoagulant serum, diluted, centrifuged and filtered serum. Presence of proteins was not detected in Maldi-TOF spectrometer analysis. However, filtered and lyophilized serum extract, by chromatographic fractioning and further analysis by NMR of isolated compound, allowed identifying the occurrence of  $\alpha$ -amyrin acetate. The antimicrobial activity of F2 serum was evaluated using microorganisms: Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Aspergillus Niger and Candida albicans. An inhibition of growth for Staphylococcus aureus and Candida albicans in the final concentration of 50  $\mu$ l/ml of F2 was observed.

Key-words: *Couma utilis*, Apocynaceae,  $\alpha$ -amirin acetate.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - <i>Couma utilis</i> ; a. Tronco; b. Flor.....	20
FIGURA 2 - Látex do tronco.....	23
FIGURA 3 - a. comercializado; b. fruto verde; c. fruto maduro.....	24
FIGURA 4 – Alergia causada pela utilização de luvas de látex.....	27
FIGURA 5 – a. Utensílio utilizado para sangria; b. Coleta em frascos.....	30
FIGURA 6 – Centrifugação do látex.....	31
FIGURA 7 - Três frações constituintes do látex centrifugado.....	31
FIGURA 8 – Cromatógrafo utilizado neste estudo.....	33
FIGURA 9 – Sistema de eluição (CCD).....	34
FIGURA 10 – RMN utilizado nesse estudo.....	35
FIGURA 11 - Microscópio de força atômica utilizado nesse estudo.....	39
FIGURA 12 - Esquema ilustrando o modo de operação–modo contato.....	39
FIGURA 13 – Cromatograma do soro (F2) obtido por coluna de exclusão.....	41
FIGURA 14 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância P3 (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	42
FIGURA 15 - Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H de P3 na região dos hidrogênios olefínicos.....	43
FIGURA 16 - Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H de P3 na região de hidrogênios carbinólicos.....	44
FIGURA 17 - Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H de P3 na região alifática.....	45
FIGURA 18 - Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H na região de P3 do sinal referente ao grupo metila do grupamento acetoxila.....	46
FIGURA 19 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C de P3 (CDCl <sub>3</sub> , 75MHz).....	48
FIGURA 20 - Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C na região dos carbonos olefínicos e carbinólico de acetato de $\alpha$ -amirina.(Exportada do programa ACD NMR).....	49
FIGURA 21 - Inibição do crescimento dos micro-organismos. a. <i>Staphylococcus aureus</i> ; b. <i>Candida albicans</i> .....	51
FIGURA - 22 a. Porta amostra metálico contendo amostras depositadas na superfície de mica muscovita; b.Local onde a amostra é colocada no equipamento.....	52
FIGURA 23 - Imagem planar e tridimensional da superfície de mica muscovita (software SPM-9600).....	53

FIGURA 24 - Imagem planar e tridimensional da superfície de látex bruto sem anticoagulante (software SPM-9600).....	55
FIGURA 25 – Imagem planar e tridimensional da superfície de soro com adição de amônia (software SPM-9600).....	57
FIGURA 26 - Imagem planar e tridimensional da superfície de soro diluído (1:10) (software SPM-9600).....	59
FIGURA 27 - Imagem planar e tridimensional da superfície de soro diluído (1:100) (software SPM-9600).....	61
FIGURA 28 - Imagem planar e tridimensional da superfície de soro filtrado e centrifugado (software SPM-9600).....	63

## LISTA DE HISTOGRAMAS

HISTOGRAMA 1 – Ilustração dos parâmetros de caracterização de superfície incluindo rugosidade ( $R_a$ ), altura média ( $R_z$ ), média aritmética da rugosidade ( $R_{zjis}$ ), raiz quadrática média da rugosidade ( $R_q$ ), profundidade média ( $R_v$ ) da mica.....	54
HISTOGRAMA 2 – Ilustração dos parâmetros de caracterização de superfície incluindo rugosidade ( $R_a$ ), altura média ( $R_z$ ), média aritmética da rugosidade ( $R_{zjis}$ ), raiz quadrática média da rugosidade ( $R_q$ ), profundidade média ( $R_v$ ) de LB.....	56
HISTOGRAMA 3 – Ilustração dos parâmetros de caracterização de superfície incluindo rugosidade ( $R_a$ ), altura média ( $R_z$ ), média aritmética da rugosidade ( $R_{zjis}$ ), raiz quadrática média da rugosidade ( $R_q$ ), profundidade média ( $R_v$ ) de SA.....	58
HISTOGRAMA 4 – Ilustração dos parâmetros de caracterização de superfície incluindo rugosidade ( $R_a$ ), altura média ( $R_z$ ), média aritmética da rugosidade ( $R_{zjis}$ ), raiz quadrática média da rugosidade ( $R_q$ ), profundidade média ( $R_v$ ) de SD1.....	60
HISTOGRAMA 5 – Ilustração dos parâmetros de caracterização de superfície incluindo rugosidade ( $R_a$ ), altura média ( $R_z$ ), média aritmética da rugosidade ( $R_{zjis}$ ), raiz quadrática média da rugosidade ( $R_q$ ), profundidade média ( $R_v$ ) de SD2.....	62
HISTOGRAMA 6 – Ilustração dos parâmetros de caracterização de superfície incluindo rugosidade ( $R_a$ ), altura média ( $R_z$ ), média aritmética da rugosidade ( $R_{zjis}$ ), raiz quadrática média da rugosidade ( $R_q$ ), profundidade média ( $R_v$ ) de SFC.....	63
HISTOGRAMA 7 – Ilustração da avaliação comparativa das amostras (LB, SA, SD1, SD2 e SFC) da caracterização de superfície incluindo rugosidade ( $R_a$ ), altura média ( $R_z$ ), média aritmética da rugosidade ( $R_{zjis}$ ), raiz quadrática média da rugosidade ( $R_q$ ), profundidade média ( $R_v$ ).....	65

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Comparação de características morfológicas das espécies <i>Couma macrocarpa</i> e <i>Couma utilis</i> .....	19
TABELA 2 - Produção da Extração Vegetal e da silvicultura (INPA, 2001).....	22
TABELA 3 – Informações nutricionais da fruta de sorva em g/100g (INPA, 1999).....	25
TABELA 4 – Comparação dos dados de RMN <sup>1</sup> H entre P3 e acetato de $\alpha$ -amirina .....	47
TABELA 5 – Comparação dos dados de RMN <sup>13</sup> C entre P3 e acetato de $\alpha$ -amirina.....	50
TABELA 6 – Medidas estruturais em média das partículas de látex.....	64
TABELA 7 – Avaliação comparativa dos parâmetros Rugosidade (Ra), altura máxima (Rz), média aritmética da rugosidade (Rzjis), raiz quadrática média da rugosidade (Rq), profundidade média (Rv), de nanorrugosidade das amostras LB, SSA, SD1, SD2 e SFC obtidos a partir das imagens topográficas.....	64
TABELA 8 – Desvio padrão ( $\sigma$ ) das principais características superficiais das amostras analisadas por MFA.....	65

# SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>17</b>
1.1 Apocynaceae.....	17
1.2 Couma utilis.....	18
1.3 Látex.....	21
1.4 Fruto.....	24
1.5 Produtividade.....	25
1.6 Extração do látex.....	25
1.7 Alergia ao látex.....	26
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
Geral.....	28
Específico.....	28
<b>CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
2.1 Materiais.....	29
2.2 Coleta.....	29
2.3 Centrifugação do látex.....	30
2.4 Filtração.....	32
2.5 Secagem.....	32
2.6 Métodos de Cromatografia.....	32
2.6.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficácia-CLAE.....	32
2.6.2 Cromatografia de Camada Delgada-CCD.....	34
2.7 Métodos de Caracterização.....	35
2.7.1 Ressonância Magnética Nuclear-RMN.....	35
2.7.2 Atividade Antimicrobiana.....	36
2.7.3 Microscopia de Força Atômica-MFA.....	37
<b>CAPÍTULO 3-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
3.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	42
3.2 Atividade Antimicrobiana.....	51
3.3 Microscopia de Força Atômica (AFM).....	52
<b>CAPÍTULO 4-CONCLUSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>67</b>

## INTRODUÇÃO

Desde os primórdios das civilizações, as plantas têm sido utilizadas pelo homem como fonte de alimento e de tratamento de doenças, devido à sua abundância na natureza e facilidade de obtenção. O emprego das plantas no controle de diversas doenças e pragas talvez seja tão antigo quanto o próprio aparecimento da humanidade (FRANÇA, 2001).

Indícios do uso de plantas medicinais e tóxicas foram encontrados nas mais antigas civilizações, onde o homem primitivo, ao procurar plantas para o seu sustento, foi descobrindo espécimes com ação tóxica ou medicinal. Os benefícios obtidos com a utilização empírica levaram o homem a buscar sempre “novas” plantas, para o tratamento de diversas patologias, e a experiência acumulada foi transmitida por inúmeras gerações, levando ao descobrimento de alguns dos mais valiosos medicamentos utilizados na medicina moderna (SIMÕES *et al.*, 1986).

Além dos benefícios, observaram-se muitas reações tóxicas associadas a plantas, levando à necessidade de estudos criteriosos relativos à sua utilização. Diversos autores têm apontado à importância dos estudos químicos e biológicos, em várias espécies vegetais, pela intensa produção de metabólitos secundários, que podem ser medicinais ou tóxicos, principalmente nas espécies dos ecossistemas tropicais (BRITO & BRITO, 1993). Atualmente, estima-se que existam aproximadamente 500.000 espécies de plantas terrestres (MONTANARI & BOLZANI, 2001).

Em nosso país, há uma grande diversidade de plantas com potencial terapêutico, o que estimula os pesquisadores no estudo de suas possíveis ações terapêuticas, bem como ações tóxicas, a fim de produzir medicamentos com garantia de eficácia e segurança. Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza revelarem uma gama quase inacreditável de diversidade, em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (WALL & WANI, 1996).

A região amazônica desperta interesse mundial devido à sua rica biodiversidade. Acredita-se que o Brasil possua cerca de 20% de toda biodiversidade existente no planeta. Estimativas indicam que das 500 mil espécies de plantas existentes nos ecossistemas terrestres, 16% encontram-se na Amazônia brasileira. Entretanto, menos de 10% foram estudadas quanto à sua constituição química, e apenas um pequeno número teve suas propriedades biológicas caracterizadas (PLETSCH, 1998). Desse modo, a biodiversidade dos ecossistemas amazônicos pode ser considerada como o maior potencial natural do mundo contemporâneo, servindo de material para inúmeros e futuros estudos científico, como também de recursos importantes para o desenvolvimento regional (BERTOLINI *et al.*, 2005).

Não se tem consenso sobre o número de espécies que estão em perigo de extinção. Contudo, há consenso de que a perda da biodiversidade vem sendo acelerada pela ação humana e, em diversos casos, em caráter irreversível. Várias espécies ameaçadas ou até mesmo extintas, sequer são conhecidas, ou foram identificadas quanto ao seu potencial uso (BARBOSA, 2001). Por este motivo, a política ambiental tem focado a conservação, sob a ótica da manutenção das reservas florestais para que os recursos possam ser explorados por meio de manejo sustentável.

Neste contexto, destacam-se os produtos não-madeireiros, ou seja, produtos que podem ser explorados sem que seja necessária a eliminação do vegetal, o que contribui para a manutenção dos recursos florestais. Dentre os produtos não madeireiros, destacam-se o látex e os frutos regionais amazônicos (GAMA, 2006).

O látex natural, também conhecido por “leite vegetal”, é um produto extraído, pela incisão ou escarificação, geralmente do tronco da planta. Apresenta-se na forma viscosa, coagulável, de coloração esbranquiçada (LOUREIRO, 1992). O látex mais conhecido é o da seringueira (*Hevea brasiliensis*). Entretanto destacam-se também: o guaiúle (*Parthenium argentatum*); a figueira-da-borracha (*Ficus elastica*), que também são fontes

de borracha natural; a papoula verdadeira (*Papaver somniferum*), cujo látex produz o ópio; a árvore-vaca (*Tabernaemontana utilis*) (AMBIENTE BRASIL, 2006), das regiões baixas da América do Sul, cujo látex pode ser bebido como leite, látex da coroa de cristo (*Euphorbia splendens*), que é usado para o controle de vetores da esquistossomose (ZAMITH, 1995), o amapazeiro (*Brosimum parinariodes*) usado para o tratamento de inflamações e doenças pulmonares (NASCIMENTO, 1999) e o látex da sorva (*Couma utilis*), que já foi utilizado para produção de gomas de mascar (NASCIMENTO *et al.*, 2003).

Os frutos regionais amazônicos são conhecidos por apresentarem sabor exótico, e composição rica em nutrientes. Alguns frutos são conhecidos mundialmente, como é o caso do cupuaçu. Outras culturas mais conhecidas e exploradas são: açaí, buriti, camu-camu, tucumã. Porém, ainda existe um grande número de espécies frutíferas pouco exploradas e desconhecidas com grande potencial econômico, como por exemplo, a sorva (CAVALCANTE, 1991).

As plantas laticíferas são restritas a um pequeno número de famílias como: Apocynaceae, Asclepiadaceae, Euphorbiaceae, Moraceae, e Papaveraceae. Seu conteúdo pode ser venenoso, colante, mas também pode funcionar como um potente analgésico. Muitas são as qualidades dos látexes. O látex, produzidos pelos laticíferos, é uma suspensão aquosa de substâncias produzidas por células especializadas. Frequentemente terpenóides, mas também proteínas, açúcares, ácidos graxos, alcalóides, amidos e outras substâncias estão presentes no látex. Isoprenóides de grande peso molecular do látex são usados para fazer borracha natural geralmente branco, leitoso, às vezes colorido apresentando constituição química complexa, comumente empregada para fins terapêuticos (LORENZI, 2006). Está presente em aproximadamente 12000 espécies vegetais pertencentes a 900 gêneros. São constituídos de 50-85% de água, proteínas, ácidos aminados, carboidratos, sais minerais, poliisoprenos, terpenos, substâncias fenólicas e

alcalóides. O uso de látex de diferentes plantas na medicina popular é bastante difundido em alguns países (BUTTERY *et al.*, 1985).

# CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 Apocynaceae

As espécies da família Apocynaceae encontram-se bem representada na vegetação amazônica. No Brasil ocorre cerca de 850 subordinadas e 90 gêneros representadas por arbustos, subarbustos, árvores ou lianas geralmente latexcentes. Alguns gêneros conhecidos são *Allamanda*, *Aspidosperma*, *Plumeria*, *Rauwolfia*, *Tabernaemontana* e *Harcornia* (SOUZA & LORENZI, 2005).

Plantas de hábitos variados, as espécies dessa família apresentam na sua maioria látex abundante, em alguns casos visíveis somente em ramos terminais. É relevante a importância econômica dos vegetais desta família. Como exemplo é possível citar espécies do gênero *Aspidosperma* (*A. polyneuron*; *A. pyriformis*), que são muito procuradas pela qualidade da sua madeira e usadas pela indústria de móveis, construção civil, construção naval e carpintaria (SOUZA & LORENZI, 2005). Outras apresentam potencial paisagístico devido a beleza de suas flores ou pela forma de seus troncos ou copas. Dentre as espécies cultivadas no Brasil destacam-se a *Allamanda* (*Allamanda cathartica*), o jasmim-manga (*Plumeria rubra*), o chapéu de Napoleão (*Thevetia peruviana*), a espirradeira (*Nerium oleander*), e a vinca (*Catarranthus roseus*) (SOUZA & LORENZI, 2005).

Alguns gêneros apresentam frutos comestíveis (*Couma*, *Ambelania*, *Rhigospira* e *Harcornia*). O látex da sorva (*Couma utilis*) é comestível e já foi utilizado para a produção de goma de mascar (FALCÃO *et al.*, 2003).

Estudos feitos com algumas espécies de Apocynaceae possibilitaram o isolamento de diversos compostos ativos de ação biológica variada, tais como anticancerígena, leishmanicida, antibacteriana e anti-HIV. Estas atividades estão relacionadas principalmente aos alcaloides esteroidais e indólicos provenientes do metabolismo secundário destes vegetais. Neste grupo estão substâncias de grande interesse

farmacológico e terapêutico que se constituem em importantes princípios ativos na elaboração de medicamentos. As plantas mais conhecidas e estudadas são: *Cataranthus roseus*, *Tabernaemontana divaricata*, *Rauwolfia serpentina* (REYES *et al.*, 2006).

## 1.2 *Couma utilis*

*Couma utilis* é uma árvore laticífera nativa da região Amazônica, conhecida popularmente como sorva ou sorveira. Tal denominação popular é utilizada para seis espécies diferentes (NASCIMENTO, 2006), sendo quatro espécies pertencentes à família das Apocynaceae e duas da família das Rosaceae (PIO CORRÊA, 1931).

- *Couma utilis* (sorva-pequena), Apocynaceae
- *Couma macrocarga* (sorva-grande), Apocynaceae
- *Couma guyanensis* (sorveira), Apocynaceae
- *Couma rígida* (sorva), Apocynaceae
- *Pirus aucuparia* (sorva brava), Rosaceae
- *Sorbus domestica* (sorveira da Europa), Rosaceae

A sorveira é encontrada com maior frequência no estado do Amazonas (Alto rio Negro, rio Japurá e Solimões), Roraima (margens do Rio Branco), Mucajaí, Cantá, Iracema, Caracaraí, Alto Alegre, Amajari, Rorainópolis, São Luís do Anauá, São João do Baliza, Caroebe e Bonfim (divisa com o município de Caroebe) (CAVALCANTE, 1991; FALCÃO & LLERAS, 1981) A espécie tem seu habitat em mata tropical úmida, mata de transição e matas ciliares das savanas de Roraima, assim como áreas temporariamente inundáveis.

A altura das árvores atinge de 12 a 20 m dependendo da localidade na floresta. Suas inflorescências são corimbosas, inseridas nas axilas das folhas. As pequenas flores hermafroditas, gamopétalas, são róseas (Figura 1).

Em 1973, Albuquerque em seu trabalho de comparação entre as espécies *Couma macrocarpa* e *Couma utilis* (Apocynaceae), constatou que elas possuem características morfológicas distintas, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Comparação de características morfológicas das espécies *Couma macrocarpa* e *Couma utilis* (Albuquerque, 1973).

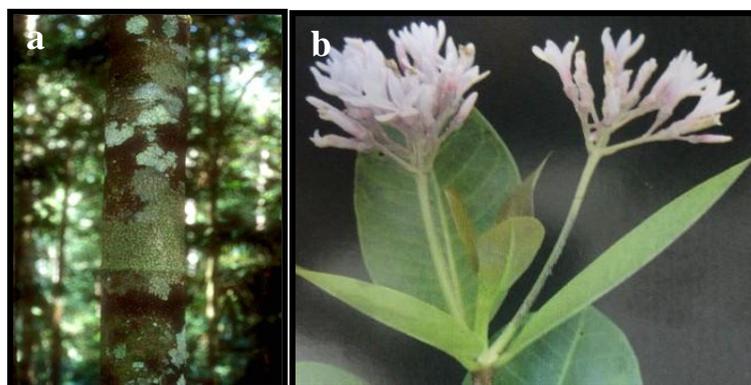
PARTES DAS PLANTAS ESTUDADAS			CARACTERES PECULIARES	
			<i>Couma macrocarpa</i>	<i>Couma utilis</i>
PECÍOLO	Região Vascular	Floemas externo e interno	Em forma de um arco contínuo em todo o comprimento do pecíolo	Em forma de cordões livres e finos limitando o xilema em todo o comprimento do pecíolo
LÂMINA	Epiderme abaxial		Células epidérmicas com paredes radiais onduladas	Células epidérmicas com paredes radiais frequentemente curvas
	Estomas (média)		336 por mm <sup>2</sup>	504 por mm <sup>2</sup>
FOLIAR	Nervura Principal Região Vascular	Floemas externo e interno	Em forma de um arco contínuo na face abaxial e de cordões na face adaxial limitando o xilema	Em forma de cordões livres e finos limitando o xilema
	Nervuras Secundárias		Numerosas	Pouco numerosas
	Nervuras de ordem superior às terciárias	Rede de nervuras	Esparsa	Relativamente densa

Em 1980, Aguiar e colaboradores publicaram um trabalho relatando o estudo botânico da produtividade e fenologia da sorva (*Couma utilis*) com o objetivo de ajudar no planejamento e no manejo do plantio, bem como na comercialização dos frutos, pois é uma

espécie amazônica de reconhecimento econômico como produtora de látex e fruto comestível.

O conhecimento da fenologia ajuda o planejamento do manejo, do plantio e comercialização dos frutos. FALCÃO & LLERAS (1981), relataram dois anos de fenologia em plantas reprodutivas na região de Manaus, detectando floração e frutificação por ano, com alguma dissincronia entre plantas.

Foram plantadas 10 árvores de sorva em 1980 num plantio homogêneo e observadas no período de 1984 a 1990. As sorveiras produziram em média 2.500 frutos, com peso médio de 15,5g, permitindo uma estimativa de quase 40 kg de frutos/árvore/safra e 15 t/ha numa densidade de 400 plantas/ha, concluindo assim, que a produtividade é maior no período de chuva (FALCÃO *et al.*, 1988).



Fonte: Lorenzi, 2006

Figura 1 - *Couma utilis*; a. Tronco; b. Flor

### 1.3 Látex de *Couma utilis*

O látex da sorva pode ser encontrado em várias partes da planta, principalmente no tronco, podendo ser encontrado também, nos frutos verdes (NASCIMENTO, 2006).

O látex é branco, viscoso, comestível e de paladar adocicado (FALCÃO, 1979). Os índios e ribeirinhos, povos que habitam as margens dos rios nas florestas, costumam ingerir o látex da sorva puro ou diluído com água, como uma alternativa alimentar, principalmente em época de escassez (BARBOSA, 2001).

O látex é encontrado nos vasos do córtex interno da casca da árvore, o qual fica abaixo do córtex externo, sendo que a borracha acha-se nas partículas citoplasmáticas. O látex é uma dispersão coloidal constituída de substâncias não-borracha e partículas de borracha dispersas em uma fase aquosa chamada de soro. O látex é neutro, com pH 7,0 mas quando exposto ao ar por um período de 12 a 24 horas, o pH cai para 5,0 ocorrendo a coagulação espontânea e a formação de polímero.

O látex também é utilizado para fins medicinais ou fitoterápicos, misturado com banana é usado para o combate da diarreia (PLETSCH, 1998), puro ou misturado com óleo de rícino é utilizado como anti-helmíntico (HOEHNE, 1946). Os nativos da Amazônia também utilizam o látex da sorveira para a calafetação das embarcações e caiação das paredes devido às suas propriedades isolantes e resistência à umidade (PRANCE & SILVA 1975).

Após a extração, o látex solidificado pode ser comercializado em grandes blocos compactos, destinados à exportação, para produção de gomas e de vernizes, como ocorreu na década de 80.

Entretanto, devido à sua abundância ecológica é possível aumentar o uso, com o aprimoramento do conhecimento de estudos químicos, interferindo em novas especificidades de uso.

A exploração do látex da sorva atingiu 6000 toneladas no final dos anos 70, mostrando potencial econômico e produtivo, rendendo para o Brasil US\$ 6.500.000. Em 2001, o IBGE divulgou a quantidade e o valor dos produtos de extração vegetal, onde a sorva ocupou o terceiro lugar com 39 toneladas equivalente a R\$ 61.000,00 (Tabela 2).

Tabela 2 - Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura (IBGE, 2009).

<b>Produtos</b>	<b>Quantidade (toneladas)</b>	<b>Valor (1000 R\$)</b>
<i>Hevea</i> (Látex Coagulado)	4 368	6 819
<i>Hevea</i> (Látex Líquido)	131	93
<b>Sorva</b>	<b>39</b>	<b>61</b>
Maçaranduba	4	15

O látex natural apresenta-se como um sistema bifásico, no qual a fase polimérica está na forma de emulsão. O látex é produzido por estruturas vegetais especiais denominadas laticíferos. Quando seccionados, os vegetais laticíferos deixam fluir o látex, que coagula e veda o corte feito na planta, (Figura 2) por reações enzimáticas. Esta prática é popularmente conhecida por “sangria” (MORAES, 1978).

O látex é normalmente composto por uma complexa mistura de diferentes componentes, incluindo macromoléculas. Além do poliisopreno, outros constituintes

presentes em látex e relatados em estudos fitoquímicos são: polissacarídeos, flavonoides, lipídeos, fosfolipídios e proteínas (LOURENÇO, 2000).



Fonte: Silva, 2013

Figura 2 - Látex do tronco

Não se sabe ao certo qual a função biológica dos poliisoprenos, ou seja, porque as plantas produzem látex. Há duas teorias correntes: 1- a borracha constitui uma reserva de energia que a planta pode utilizar quando necessário. Sabe-se que hidrocarbonetos são eficientes armazenadores de energia. No entanto não há nenhuma evidencia que suporte esta teoria, uma vez que hidrocarbonetos são quimicamente muito inertes, e os mecanismos bioquímicos pelos quais a energia armazenada possa ser percebida são raros. 2- A borracha é um produto de excreção com o qual a planta pode descartar metabólitos tóxicos inofensivos. A dificuldade em se aceitar esta teoria é que os poliisoprenos se acumulam na planta até que a planta seja danificada, e então qualquer perda de poliisopreno conduz à nova biossíntese (ARAÚJO, 1999).

No entanto, sabe-se que a respiração do látex é anaeróbica e que plantas redutoras de poliisopreno frequentemente crescem sob condições ácidas, onde a capacidade de troca de gases e vapor com a atmosfera é limitada. Além disso, poliisoprenos são formados durante períodos de intenso crescimento, quando ocorre respiração anaeróbica acelerada.

Então o poliisopreno seria um excremento da respiração anaeróbica e não álcool etílico que é o excremento normal nestes casos. Um defeito neste mecanismo é a sua insuficiência em demonstrar qualquer propósito para respiração anaeróbica, por exemplo, não há quantidade de energia líquida produzida por este processo e disponível para a planta (LEHNINGER, 2002).

## 1.4 Fruto

Os frutos são pequenos e globosos, pesam entre 10g e 20g, sua coloração é verde, e quando maduros apresentam cor castanho-escura, possuem casca fina e várias sementes. A polpa mucilaginosa é de coloração amarelada e sabor adocicado, sendo consumida pelas populações regionais. Além de apreciado *in natura*, o fruto é utilizado em sorvetes, sucos e cremes (FALCÃO & LLERAS, 1981; CAVALCANTE, 1991).

A polpa do fruto é comestível, de sabor agradável. Os frutos são colhidos da árvore quase maduros e, frequentemente, colocados em carbureto para amadurecerem igualmente, amarrados em forma de cachos contendo 20 a 25 frutos para serem comercializados (figura 3). É muito comum encontrá-los a venda nas margens das estradas ao redor da cidade (FALCÃO & LLERAS, 1981).



Fonte: Lorenzi, 2006

Figura 3 - a. comercializado; b. fruto verde; c. fruto maduro.

A composição da fruta de sorva por 100 g da parte comestível é de 72,5% de umidade; 1,2 g de proteína; 2,9 g de gordura; 22,9 g de carboidrato; e ainda 0,5 g de cinzas; 8,4 g de fibras e 122,5 Kcal de energia (Tabela 3). O fruto possui também 1500ug/100 g de carotenóides e 0,10 mg/100 g de Zinco (AGUIAR *et al.*, 1980).

Tabela 3. Informações nutricionais da fruta de sorva em g/100g (INPA, 1999).

<b>Energia (kcal)</b>	<b>Proteína (g)</b>	<b>Lipídios (g)</b>	<b>Carboidratos (g)</b>	<b>Fibra (g)</b>
122	1,2	2,9	22,9	8,4

## **1.5 Produtividade**

A sorva floresce principalmente no período chuvoso, apresentando duas safras por ano, uma no início das chuvas, e outra no final das chuvas e início da estiagem frutificando de novembro a fevereiro. A produtividade do látex em média é ~ 15t/ha, razoável para uma espécie não selecionada e pouco manejada. (FALCÃO *et al.*, 2003).

## **1.6 Extração do látex**

O látex é coletado das árvores por um processo chamado ‘tapping’. Neste processo uma faca especialmente desenhada é usada para remover fatias da casca da superfície de um corte feito na árvore a uma profundidade de cerca de 1 mm do câmbio (camada de tecido do vegetal). O corte é feito da esquerda para a direita em um ângulo de 30° em meia

circunferência ao redor do tronco e no ponto mais baixo é inserida uma cânula de metal por onde o látex escorre para os recipientes. O corte em cada lado da região do tronco deve ser feito em dias alternados e as incisões devem ser feitas logo abaixo do corte anterior (AGOSTINI, 2009).

Para evitar a coagulação espontânea é utilizado amônia em uma concentração de 3% em relação à massa de látex, quando se necessita preservar o látex por longo prazo, sem a adição de preservativos auxiliares. Industrialmente a adição de amônia é feita a partir de sua forma líquida anidra, fornecida em cilindros na forma de solução aquosa concentrada por duas razões: a) é mais perigoso manipular a solução aquosa concentrada, principalmente em países com clima tropical; b) há uma tendência da solução concentrada em causar coagulação local do látex (PEREGRINO, 2009).

## **1.7 Alergia ao látex**

A alergia ao látex representa uma importante ameaça à saúde em países industrializados, devido ao uso freqüente de produtos de borracha natural (FUCHS *et al.*, 1997).

A alergia é manifestada principalmente em profissionais da área de saúde e pacientes submetidos a várias intervenções diagnósticas e terapêuticas, os quais estão freqüentemente expostos aos alérgenos do látex, presentes em produtos de borracha natural (figura 4). Foram detectadas manifestações clínicas conseqüentes às reações alérgicas de hipersensibilidade imediata, que vão desde rinite, urticária, conjuntivite, angioedema, asma e até anafilaxia (POTÉRIO *et al.*, 2009). Estudos recentes demonstram que pacientes alérgicos ao látex desenvolvem simultaneamente sensibilização a certos alimentos de origem vegetal, especialmente frutas como papaia, figo, banana, abacate, kiwi, pêsego,

abacaxi, melão e castanha, acreditando-se numa provável ocorrência de reações cruzadas entre os alérgenos do látex e das frutas (MARIN *et al.*, 2002).



Fonte: Revista Brasileira de Anestesiologia, 2003.

Figura 4 – Alergia causada pela utilização de luvas de látex.

## **OBJETIVO GERAL**

Estudar a caracterização química e atividade biológica do látex *in natura*, do soro (F2), no modo diluído, centrifugado e liofilizado.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar a morfologia das frações do látex;
- Desenvolver método de extração dos componentes do látex do tronco da sorveira;
- Identificar compostos químicos do látex;
- Verificar atividade antimicrobiana do látex.

## **CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais**

Antes do uso de cada experimento, as vidrarias foram lavadas com detergente neutro, água corrente e álcool 70%. Posteriormente, todo o material foi rinsado com água milli-Q e seco em estufa.

### **2.2 Coleta do látex**

O látex da borracha natural está contido no sistema de vasos lactíferos situados no córtex da árvore. Formando um feixo helicoidal ascendente, que leva o alimento para as partes superiores da árvore. Este sistema encontra-se logo abaixo da casca da árvore, e os vasos apresentam uma inclinação para o lado direito (AGOSTINI 2009).

O látex foi extraído do tronco de uma espécie de *Couma utilis* existente na Embrapa Amazônia Ocidental, localizada na AM 010, km 30, na região do Amazonas. O látex foi retirado várias vezes de uma matriz com as coordenadas S02°53'53,4" / W059°59'04,3", pela parte da manhã. As circunferências das árvores possuem entre 42 a 60 cm e altura de aproximadamente 12 m. Para a sangria foi utilizado o “método amazônico” com uma faca apropriada, estabelecida “faca de sangria”, iniciando cortes sucessivos a partir de uma altura de 1,20 m do solo, de maneira a atingir convenientemente os vasos lactíferos; o ângulo é de 30° para baixo em relação a horizontal e, a cada corte removeu-se cerca de 1,5 mm de córtex (Figura 5). O látex, de aspecto leitoso, foi armazenado em vidros escuros previamente limpos, sendo retirados aproximadamente 300 mL de látex.



Fonte: Silva, 2013

Figura 5 – a. Utensílio utilizado para sangria; b. Coleta em frascos.

Para o látex se manter na forma líquida e não coagular foi necessário neutralizá-lo. Após a extração do látex, foi adicionado hidróxido de amônio aquoso na concentração de 3% (produto alcalino) para evitar a acidez que é produzida naturalmente.

O látex foi transportado em uma caixa de isopor com gelo até o laboratório para a realização das análises.

### 2.3 Centrifugação do látex

A centrifugação é um dos métodos mais utilizados para concentrar látex natural, chegando a representar 90% de todo o látex concentrado utilizado industrialmente, pois é um processo contínuo e econômico (ZAIA & ZAIA, 1998).

O látex foi centrifugado no laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, localizado no Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA, e no laboratório de aula prática (bloco G) da Universidade Federal do Amazonas. Para a centrifugação foi utilizado

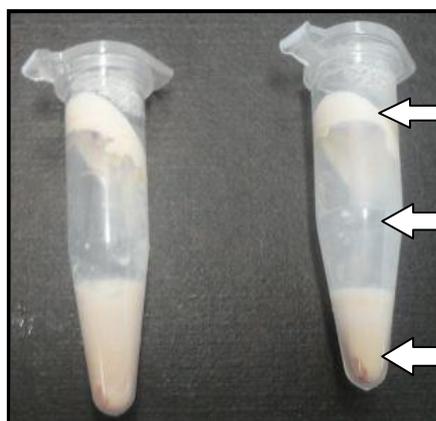
a centrífuga da marca eppendorf, modelo 5810R na rotação de 12000 rpm a 4°C por 20 minutos em eppendorfs de 1,5 mL (Figura 6).

Após a centrifugação, o látex bruto e fresco dividiu-se em três frações principais: uma camada superior branca contendo as partículas de borracha endurecida (F1), uma camada mediana contendo soro aquoso constituído principalmente de substâncias solúveis, incluindo aminoácidos, proteínas, carboidratos, ácidos orgânicos, sais inorgânicos, materiais nucleotídeos (F2) e a parte precipitada, que consiste principalmente em lutóides, quantidades variáveis de borracha e outros componentes de densidade maior que a do soro (AGOSTINI, 2009) (Figura 7).



Fonte: Silva, 2013

Figura 6 – Centrifugação do látex



Partículas de borracha (F1)

Soro (F2)

Lutóides (F3)

Fonte: Silva, 2013

Figura 7 - Três frações constituintes do látex centrifugado.

## **2.4 Filtração do soro (F2)**

Para uma purificação inicial do soro, foi realizado um processo de filtração utilizando filtros de sílica (Sep pak-C18), acetonitrila (20, 50 e 100%) e água ultra pura.

## **2.5 Secagem do soro (F2)**

Após a centrifugação do látex e a filtração do soro, foi utilizado nitrogênio líquido para congelar as amostras. Posteriormente, elas foram secas por um concentrador a vácuo (spedvacum) da marca labconco, do laboratório de síntese, gentilmente disponibilizado pelo professor Dr. Carlos Bloch, da Embrapa de Brasília (Figura 8).

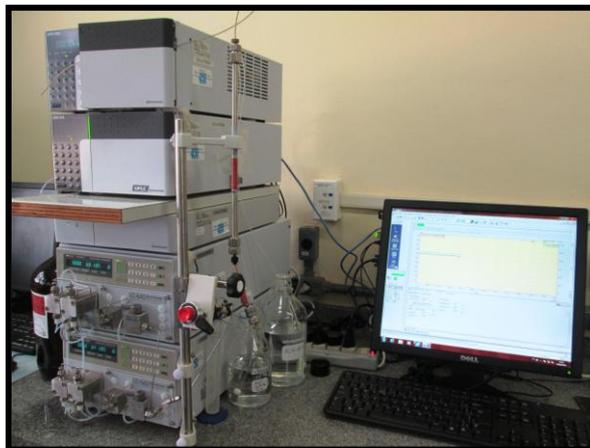
## **2.6 Métodos Cromatográficos**

Foram utilizados os métodos CLAE e CCD para a purificação das amostras.

### **2.6.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica de separação que, em menos de trinta anos, passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. As razões para este crescimento estão relacionadas à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade, a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, com destaque para a indústria

farmacêutica, bem como as suas aplicações em determinações ambientais e em muitos outros campos da ciência (LANÇAS, 2009).



Fonte: Silva, 2013

Figura 8 – Cromatógrafo utilizado neste estudo.

O cromatógrafo a líquido é constituído dos seguintes componentes: reservatório e sistema de bombeamento da fase móvel, sistema de introdução de amostra, sistema analítico: coluna cromatográfica, sistema de detecção (um ou mais detectores), sistema de registro e tratamento de dados.

As análises foram realizadas no cromatógrafo da Marca: Shimadzu, (Figura 8), no Laboratório de Cromatografia Cenargen/Brasília da Embrapa. Foi utilizado a coluna de exclusão (Phenomenex PolySep – GFC – P1000) , com o fluxo 0,8 mL/min, utilizando os solventes água (solução A) e acetonitrila 20% (gradiente/solução B) e corrida de 30 minutos.

A coluna de exclusão molecular é constituída por um material com o tamanho dos poros precisamente controlados, e os componentes da amostra são separados de acordo com o tamanho molecular (LANÇAS, 2009).

## 2.6.2 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada consiste na separação dos componentes de uma mistura sólido-líquido, onde a fase móvel (líquida) migra sobre uma camada delgada de adsorvente retido em uma superfície plana (fase estacionária-sólida), (Collins, 2006).

Para purificação do soro (F2) seco utilizou-se a CCD preparativa onde a fase móvel consistiu dos solventes hexano e acetato de etila na proporção (85:15) (figura 11).



Fonte: Silva, 2013.

Figura 9 – Sistema de eluição - CCD.

Após a eluição a placa foi observada utilizando-se luz UV (254 nm) onde se verificou a separação de três manchas distintas. Os locais das manchas foram raspados para a realização da extração com acetato de etila e posterior filtração, obtendo-se assim cada substância separadamente (P1: 0,3mg; P2: 0,4mg; P3: 2,6mg) (figura 12).

## 2.7 Métodos De Caracterização

Neste item são apresentados os métodos e técnicas utilizadas para investigar as características do látex bruto (F1) e do soro (F2).

### 2.7.1 Ressonância Magnética Nuclear - RMN

A substância isolada (P3) de (F2) foi identificada através dos espectros de RMN obtidos em espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) da Marca: Bruker, Modelo: Ultrashield 300 (figura 13), na Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (CA-LTQPN), do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Foram obtidos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ , utilizando  $\text{CDCl}_3$  (clorofórmio deuterado) como solvente.



Fonte: Silva, 2013.

Figura 10 – RMN utilizado nesse estudo

## 2.7.2 Atividade antimicrobiana

A busca por novos agentes antimicrobianos tornou-se ponto crucial em vários setores da indústria de fármacos e cosméticos. Em países com grande diversidade biológica como o Brasil, estes estudos são bastante incipientes. Pesquisas com esse tema contribuem significativamente no desenvolvimento no campo da saúde em nível mundial, detectando substâncias mais eficazes e de menor toxicidade, além de contribuir na corrida contra a resistência de micro-organismos patogênicos. Um grande número de fungos e bactérias apresenta atividade antimicrobiana, e muitas destas são moléculas não descritas, tornando-se fundamental a investigação desses compostos, e que estes possam ser utilizados no tratamento de doenças infecciosas (TEXEIRA, 2011).

A atividade antimicrobiana foi realizada no laboratório de DNA da Universidade Federal do Amazonas, onde foi utilizado o método de difusão em Agar usado para localizar substâncias com ação antibiótica que seja capaz de inibir o crescimento de certos micro-organismos (FERNANDES, 2005).

A aplicação do método de difusão se limita a micro-organismos de crescimento rápido, sendo eles aeróbios ou aeróbios facultativos (OSTROSKY *et al.*, 2008; VANDERLINDE & ONOFRE, 2010).

A atividade antimicrobiana do soro F2 foi avaliada através de testes de difusão em ágar, onde se observou a inibição de crescimento de micro-organismos. Os micro-organismos utilizados foram: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Aspergillus niger* e *Candida albicans*.

No pré-inóculo foi utilizado o meio de cultura LB líquido (10g NaCl; 10g de peptona; 5g de extrato de levedura e 1L de água destilada) e no inóculo meio de cultura LB sólido (10g NaCl; 10g de peptona; 5g de extrato de levedura e 15g de ágar).

Realizado o repique das testadoras, incubação a 30°C por 48 horas e inoculação em LB líquido a 37°C, o crescimento foi interrompido com 16 horas.

O meio de cultura foi dissolvido e inserido nas placas de petri, onde posteriormente as testadoras foram depositadas e guardadas em estufa bacteriológica para o crescimento dos micro-organismos. Passado 24 horas, foram retiradas da estufa bacteriológica e foi inserido em cada placa 100µl de cada meio com as testadoras e secas na placa e depois depositadas 50 µl do soro (F2).

### **2.7.3 Microscopia de Força Atômica**

Em meados da década de 80 foi criado o primeiro microscópio de força atômica por Binnig, Quate e Gerber com objetivo de medir forças menores que 1 µN entre a superfície de uma ponteira ou sonda (tip) e a superfície de uma amostra condutora ou não condutora sob condições ambientais. Desde então, ele se tornou o mais utilizado microscópio de varredura por sonda (MVS). A técnica consiste na varredura da superfície da amostra por uma sonda em distâncias que variam de 10 a 100 nm, na sua frequência natural de ressonância mecânica. O raio de curvatura da extremidade da sonda, produzida de silício (SiO<sub>2</sub>) é em geral menor que 20 nm. Esta ponteira é integrada a um cantilever (ou haste em balanço) que mede de 100 a 200 µm de comprimento, com constantes de mola variando tipicamente de alguns poucos décimos a centenas de N/m. A sonda ao se aproximar da superfície sofre a ação de forças de van der Waals que mudam a constante de mola efetiva da sonda, resultando na variação da frequência natural de ressonância e, conseqüentemente da amplitude e fase do sinal (RIPPEL, 2005).

O procedimento de varredura em um microscópio de força atômica, após o contato da ponteira com a amostra, onde ocorre por meio de varredura com um escâner baseado em

cerâmica piezoelétrica que permite movimentação nas direções x, y e z, linearmente. As interações entre a ponteira e a superfície ocorrem por forças de Van der Waals, forças eletrostáticas, magnéticas e de atrito, dependendo do tipo de material e da distância de separação entre a ponteira e a amostra (HERMANN *et al.*, 1997).

Na escala de frações de angstroms prevalecem as forças eletrostáticas de repulsão, enquanto que em nível de angstroms as forças atração de Van der Waals passam a predominar. Já na escala de 10 a 200 nm destacam-se as forças atrativas da tensão de superfície fluido, entre 0,1 a 1,0  $\mu\text{m}$  voltam a prevalecer as forças eletrostáticas, podendo ser de atração ou repulsão nestes casos e, finalmente para distâncias de ordem de 10  $\mu\text{m}$  há um amortecimento pelo filme fluido (HERMANN *et al.*, 1997).

A técnica de MFA fornece, entre outras informações, a topografia da superfície da amostra com seus defeitos e ordenamentos moleculares, possibilitando a medida direta de suas alturas e profundidades, bem como a rugosidade. As medidas de MFA são obtidas localmente, percorrendo áreas de micrômetros quadrados e não requer que a superfície estudada seja condutora eletricamente, ampliando ainda mais suas possíveis aplicações (AGOSTINI, 2009).

Assim como qualquer outro equipamento o microscópio de força atômica possui limitações. Para determinar o uso deste equipamento é importante considerar suas vantagens e desvantagens. Dentre as vantagens podemos citar: grande capacidade para registrar interações biomoleculares em condições próximas às nativas, o que auxilia na análise de amostras biológicas (RIPPEL, 2005).

No modo contato, o cantilever é mantido a poucos angstroms da superfície da amostra e a força interatômica entre a ponteira e à amostra é repulsiva (figura 12). Neste modo de operação, a ponta faz um leve "contato físico" com a amostra produzindo imagens com alta resolução, mas a compressão e as forças geradas, entre a ponta e a superfície,

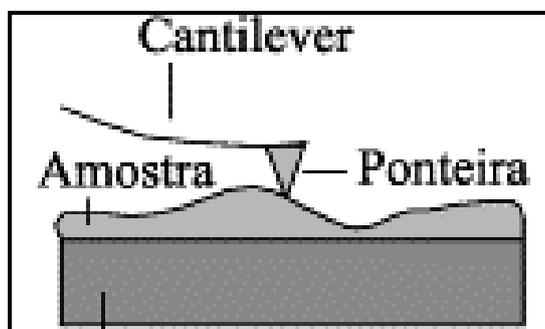
podem causar danos à ponteira e a amostra, principalmente às amostras biológicas que são sensíveis e nem sempre são fortemente aderidas ao substrato (figura 11).

As imagens de MFA foram obtidas no Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Utilizou-se o modo contato, em uma área de  $10 \times 10 \mu\text{m}$ ,  $512 \times 512$  linhas, 1 Hz, e escâner de  $125 \times 125 \mu\text{m}$ . Foi utilizado um equipamento da Shimadzu, modelo SPM 9600 (figura 14) com ponteira piramidal de nitreto de silício e hastes de  $200 \mu\text{m}$  de comprimento. As imagens de altura foram observadas com a obtenção de traço e retraço.



Fonte: Silva, 2013.

Figura 11 - Microscópio de força atômica utilizado nesse estudo.



Fonte: Ferreira, 2006

Figura 12 - Esquema ilustrando o modo de operação—modo contato

O microscópio de força atômica abrange aplicações simples, desde o estudo da morfologia de superfície de polímeros até o exame das características morfológicas, estruturais e moleculares de propriedades em escala nanométrica. Embora os polímeros tenham uma grande importância tecnológica, muito ainda deve ser estudado para o melhor conhecimento da sua morfologia e nanoestrutura (CANEVAROLO, 2003).

## CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O cromatograma abaixo representa a melhor separação da amostra F2 com a utilização da coluna de exclusão (Figura 13).

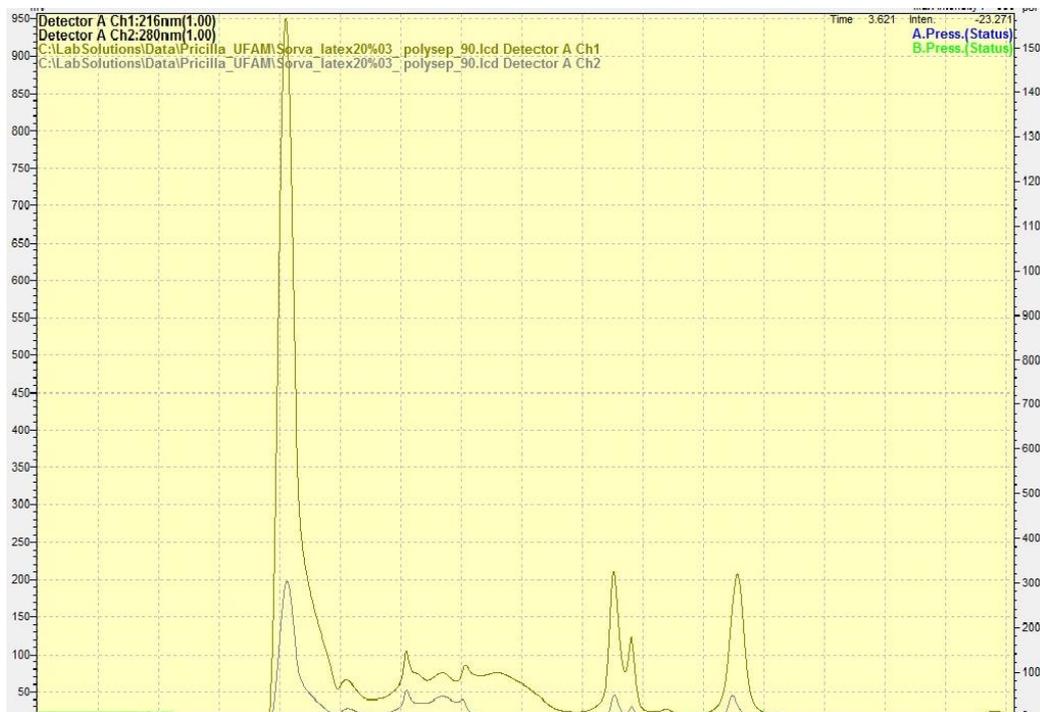


Figura 13 – Cromatograma do soro (F2) obtido por coluna de exclusão.

## 3.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

### Identificação de acetato de $\alpha$ -amirina

A substância (P3) foi identificada como sendo o acetato de  $\alpha$ -amirina, um triterpeno pentacíclico da série ursano. Essa confirmação foi possível através da comparação entre dados obtidos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos dados de RMN obtidos da literatura (200 MHz). A figura 14 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância P3.

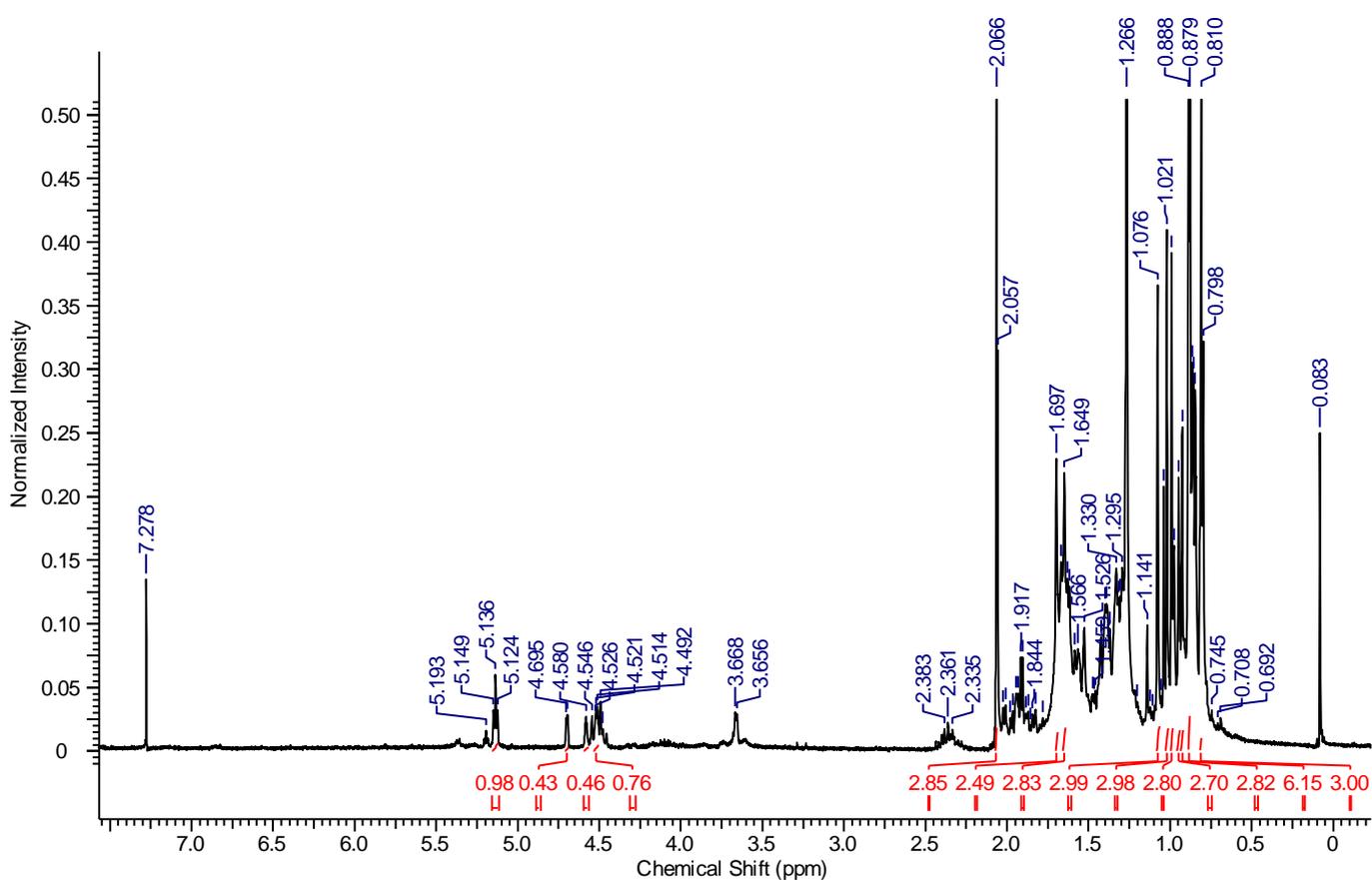


Figura 14 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância P3 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Os dados do espectro de RMN  $^1\text{H}$  obtidos permitiram verificar sinais, cujos valores de deslocamentos químicos estão condizentes com a presença de uma ligação dupla com sinal em  $\delta_{\text{H}}$  5,13 (t,  $J=3,6$ ) de hidrogênio olefínico atribuído ao H-12 (figura 15); o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  4,51 (m) referente ao H-3 e compatível com hidrogênio carbinólico sob efeito retirador de elétrons de grupo acetato (figura 16) e ainda 6 sinais em singletos com integral igual a 3 e um dubleto com integral igual a 6, referentes aos hidrogênios das 8 metilas presentes na estrutura dessa substância (figura 17). O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  2,06 corresponde ao grupamento metila que pertence ao grupo acetoxila (figura 18), o que confirma a substância como sendo o acetato de  $\alpha$ -amirina e não somente a  $\alpha$ -amirina. (Tabela 4).

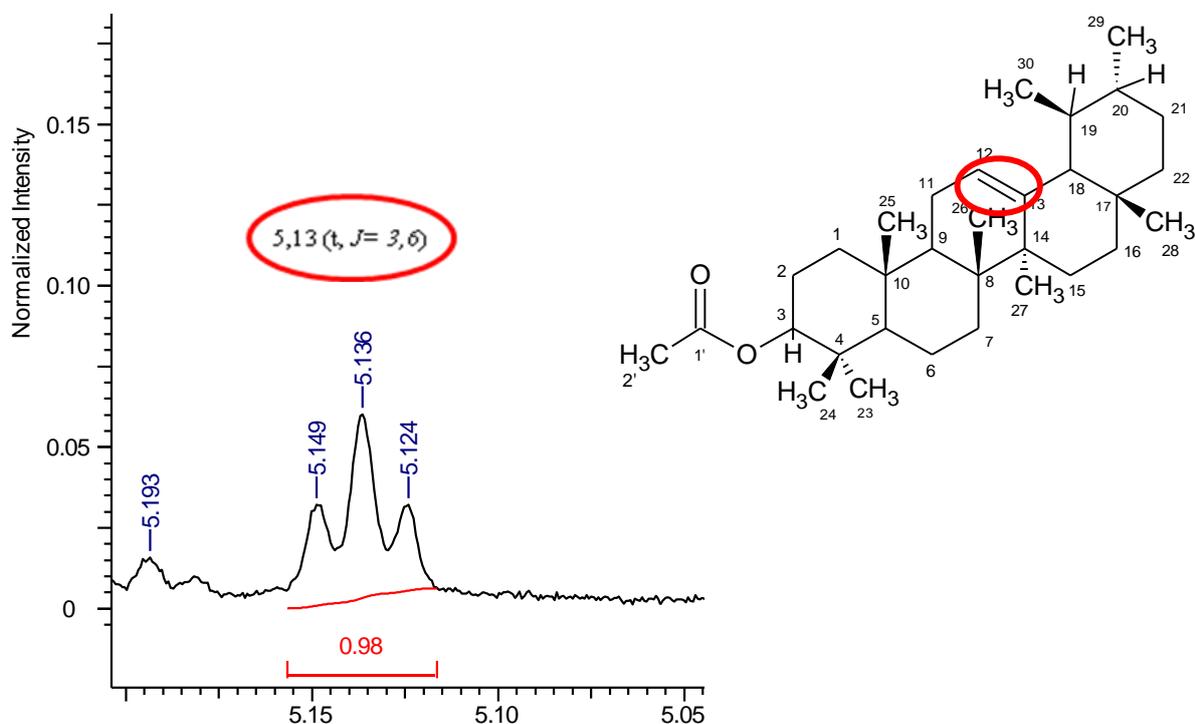


Figura 15 - Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de P3 na região de hidrogênios olefínicos.

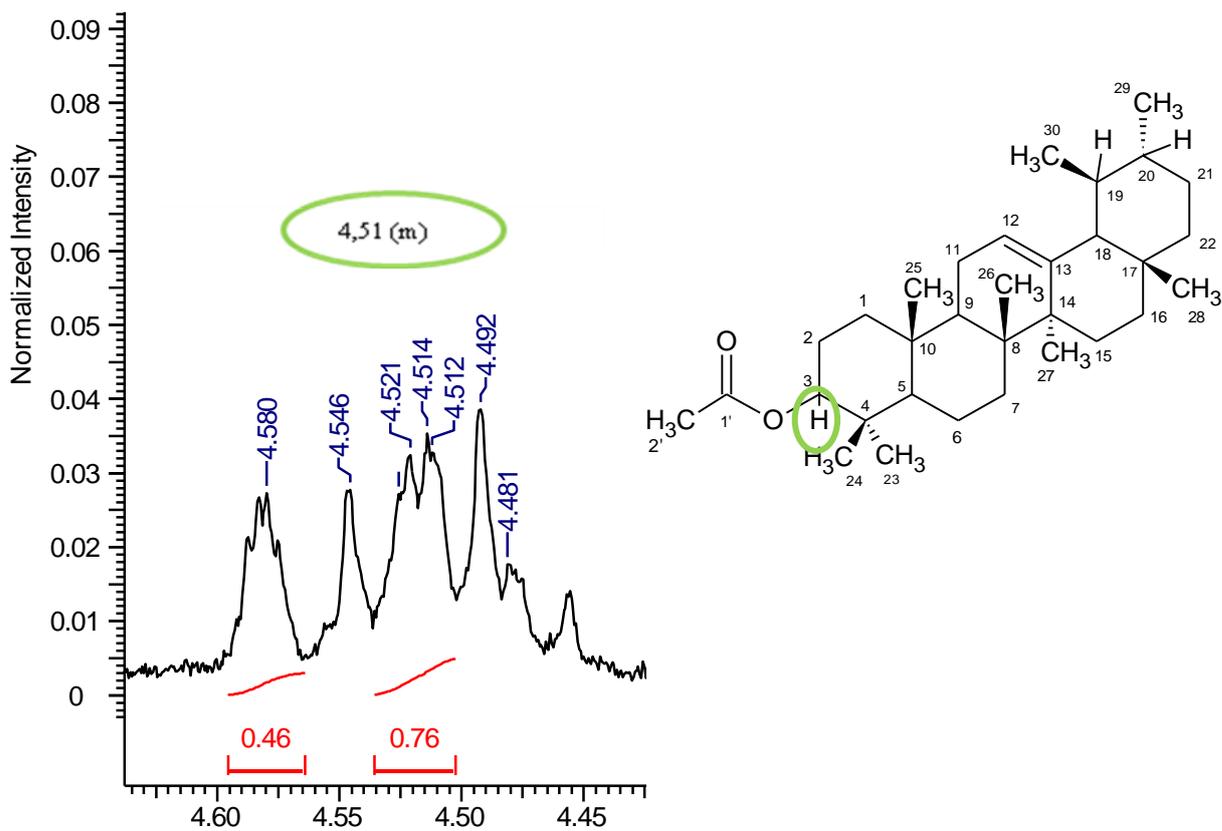


Figura 16 - Ampliação do espectro de RMN 1H de P3 na região de hidrogênios carbinólicos.

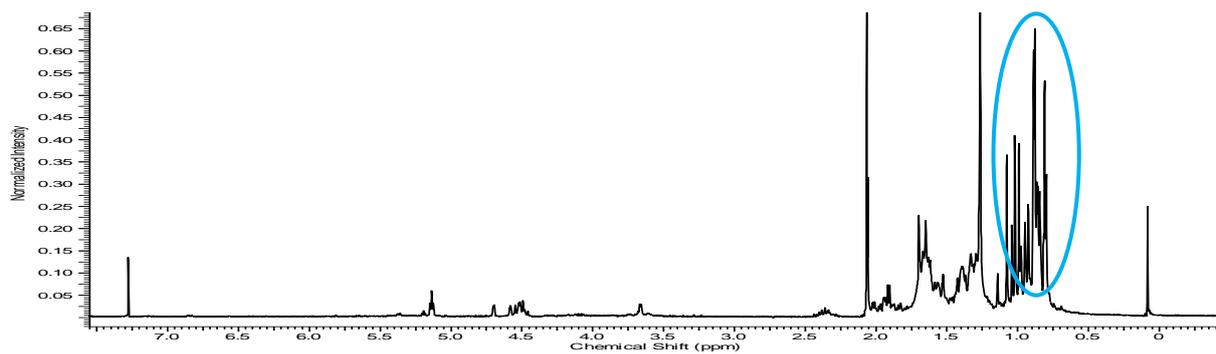
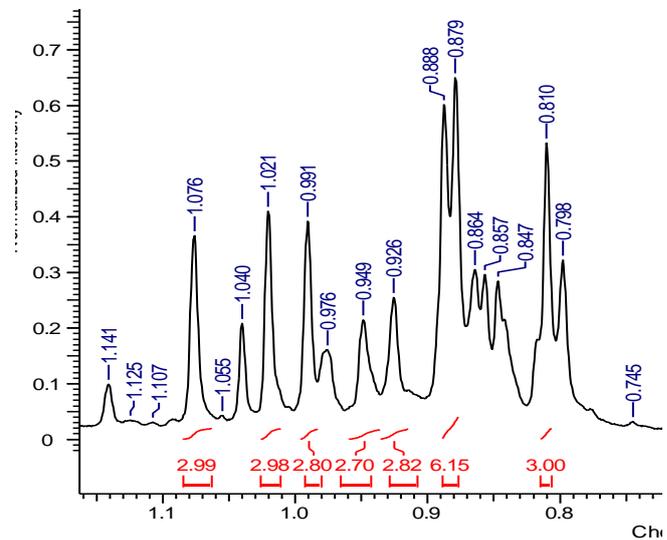
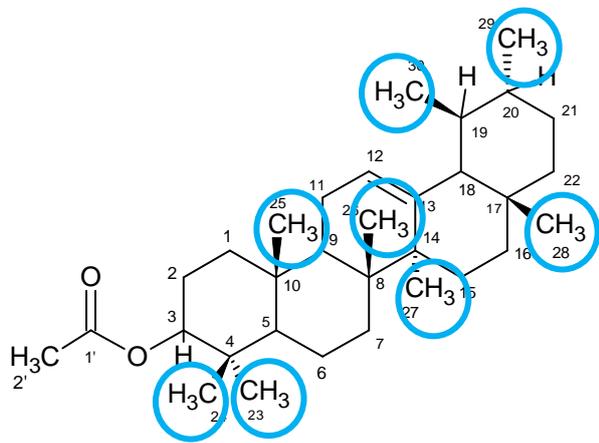


Figura 17 - Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup>H de P3 na região alifática.

Os sinais em  $\delta_c$  171,09 (C-1'),  $\delta_c$  139,6 (C-13) e  $\delta_c$  124,3 (C-12) são característicos para o acetato de  $\alpha$ -amirina (Figura 18).

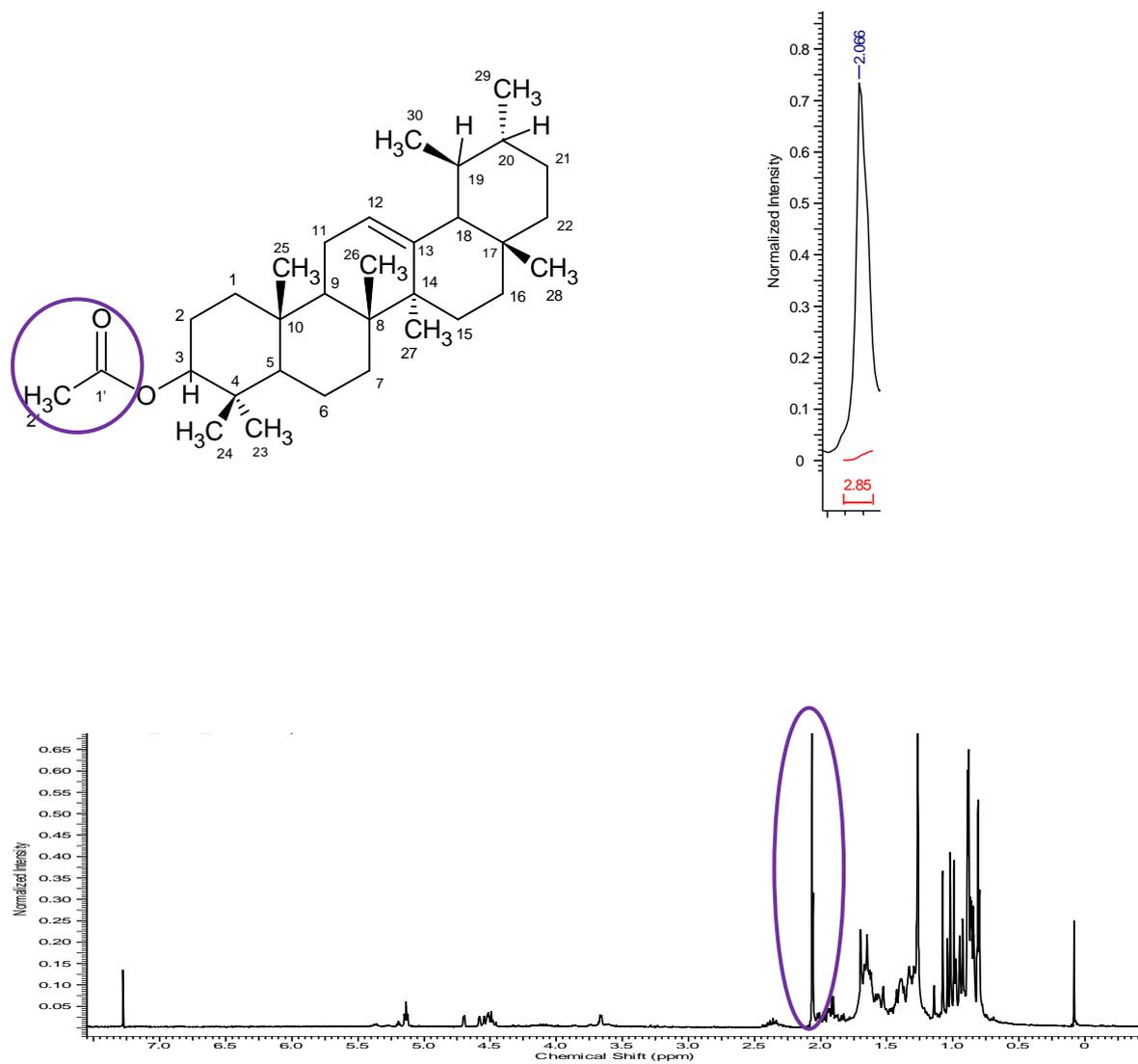


Figura 18 - Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de P3 na região do sinal referente ao grupo metila do grupamento acetoxila.

Tabela 4: Comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  entre P3 e acetato de  $\alpha$ -amirina.

H	$\delta(\text{ppm})$ do acetato de $\alpha$ -amirina (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz) (Velloso, 1998)	$\delta(\text{ppm})$ do acetato de $\alpha$ -amirina (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz)
H-12	5,14 (m)	5,13 (t, $J= 3,6$ Hz)
H-3	4,43 (m)	4,51 (m)
1' (acetoxila)	2,00 (s)	2,06 (s)
CH <sub>3</sub>	0,99; 0,93; 0,81; 0,75 (vários)	1,07 (s); 1,02 (s); 0,99; 0,94 (s); 0,92 (s); 0,88 (d); 0,88 (d); 0,81 (s)

Os dados obtidos do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 19 e 20) mostraram claramente sinais cujos valores de deslocamentos químicos são referentes à ligação dupla já observada pelos dados de RMN de  $^1\text{H}$ .

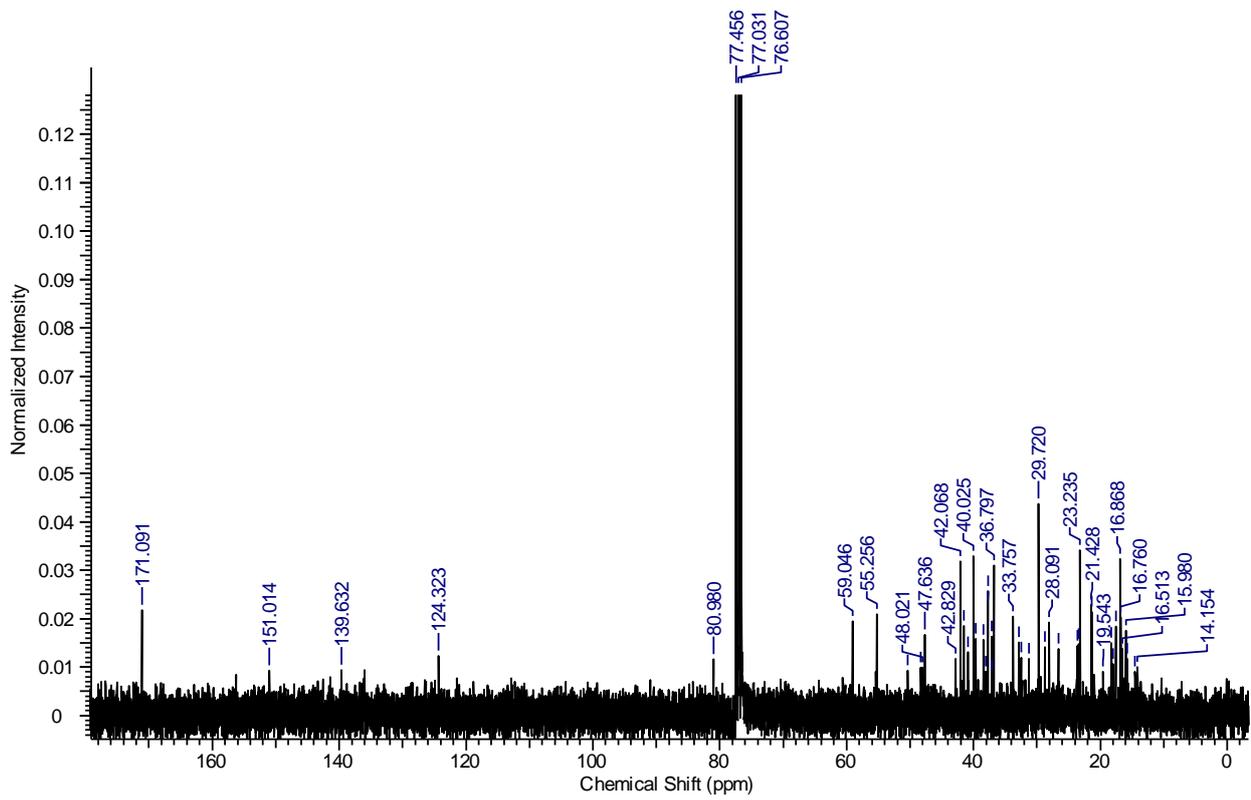


Figura 19 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C de P3 (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz).

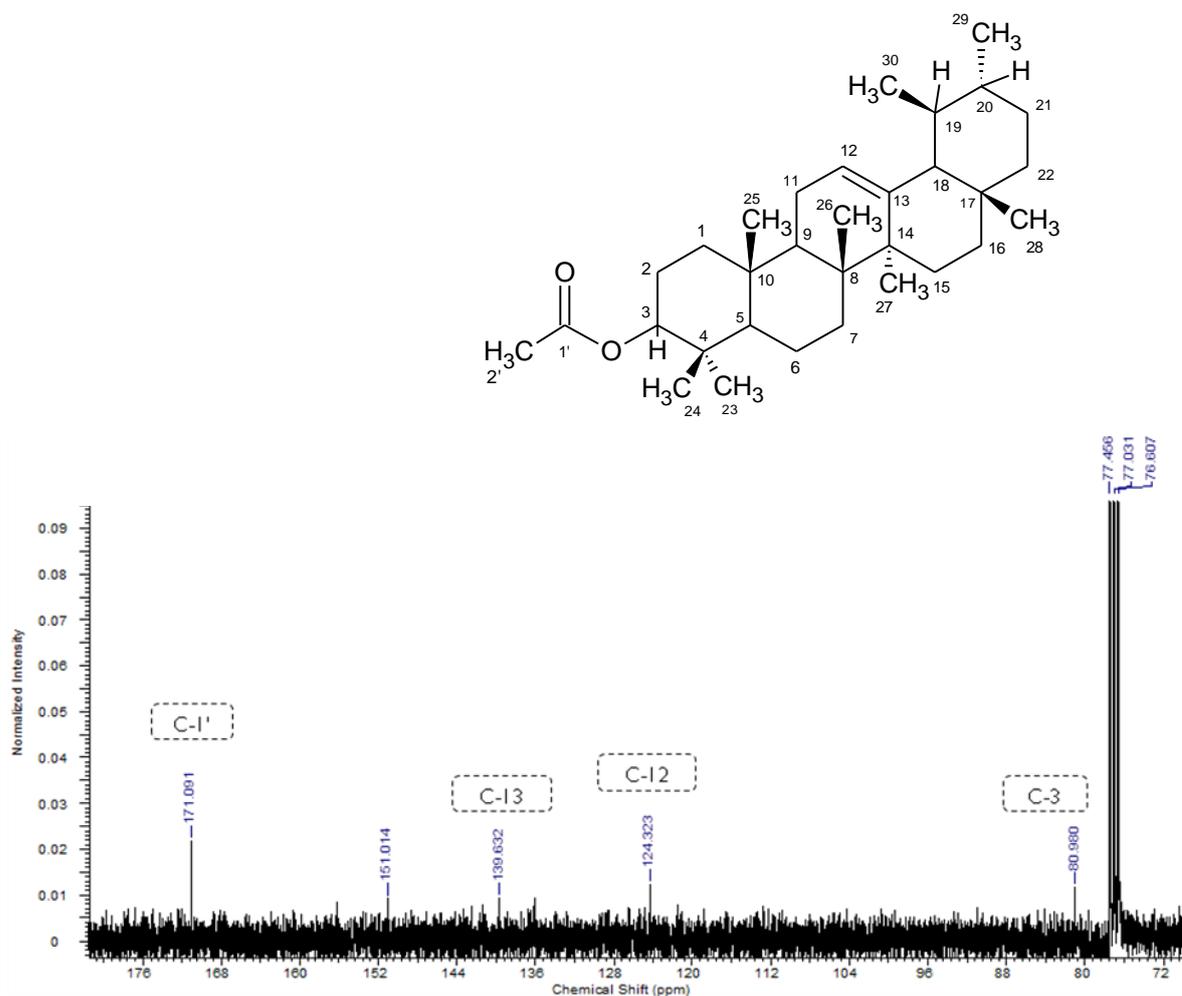


Figura 20 - Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  na região dos carbonos olefínicos e carbinólico de acetato de  $\alpha$ -amirina. (Exportada do programa ACD NMR).

O Sinal em  $\delta$ c 80,9 foi atribuído ao carbono carbinólico (C-3) e o sinal em  $\delta$ c 171,0 (C-1') ao carbono carbonílico (C=O). Os valores dos deslocamentos de carbonos obtidos foram comparados com os valores obtidos através da literatura e esses dados encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5: Comparação entre os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de P3 e o acetato de  $\alpha$ -amirina.

$^{13}\text{C}$	$\delta(\text{ppm})$ do acetato de $\alpha$ - amirina ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) (Velloso, 1998)	$\delta(\text{ppm})$ de P3 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)
1	38,3	38,02
2	27,4	26,59
3	80,9	80,97
4	38,3	38,45
5	55,3	55,24
6	18,2	18,24
7	32,8	32,85
8	39,6	39,6
9	47,9	47,63
10	37	37,07
11	23,7	23,6
12	124,3	124,31
13	139,6	139,63
14	42,8	43
15	28,7	28,75
16	26,5	26,13
17	34	33,75
18	59	59,04
19	39,6	39,64
20	39,6	40,01
21	32,5	32,49
22	41,5	41,53
23	27,9	28,08
24	15,9	15,75
25	16,1	16,19
26	16,5	16,75
27	23,7	23,7
28	27,9	27,95
29	23,3	23,37
30	21,3	21,42
1' C=O	170,9	171,09
2' CH3	21,3	21,35

### 3.3 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do soro (F2) foi avaliada através de testes de difusão em ágar, onde se observou a inibição de crescimento para *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* na concentração final de 50 µl/mL de F2.

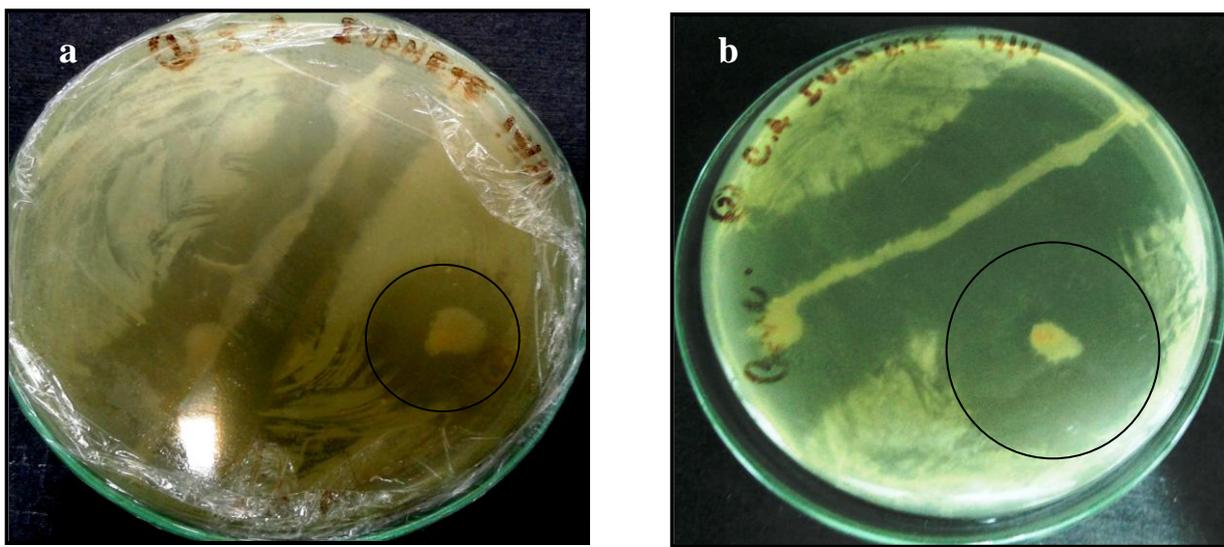


Figura 21 - Inibição do crescimento dos micro-organismos. a. *Staphylococcus aureus*; b. *Cândida albicans*.

Observou-se que extrato do soro (F2) apresentou maior atividade de inibição em *Candida albicans* (32 mm) do que em *Staphylacoccus aureus* (20 mm). Portanto, nos dois micro-osganismos obtiveram-se halos evidenciando a presença de compostos com atividade bacteriostática.

### 3.3 Microscopia de Força Atômica (MFA)

A morfologia das amostras: látex bruto (LB), soro com anticoagulante (SA), soro diluído 1:10 (SD1), soro diluído 1:100 (SD2) e soro filtrado e centrifugado (SFC) foram avaliadas após deposição em superfície de mica muscovita recém-clivada e seguida de montagem em um porta amostra metálico e deixada secar a 45°C em estufa.

Foram obtidas imagens topográficas representativas a partir de 5 (cinco) superfícies sob investigação. As imagens foram processadas pelo software SPM-9600 off-line e mostradas em 2D e 3D (Figura 22).

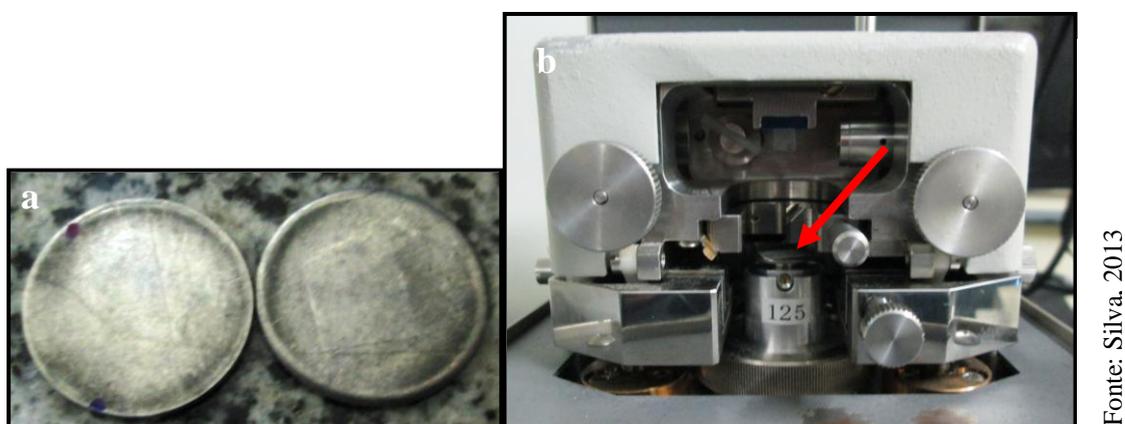


Figura - 22 a. Porta amostra metálico contendo amostras depositadas na superfície de mica muscovita; b. Local onde a amostra é colocada no equipamento.

Foi utilizado um substrato de mica, normalmente, o mais comum na preparação de substrato para amostras a serem analisadas em microscópio de força atômica, possuindo uma superfície extremamente lisa, facilitando assim a observação das amostras depositadas (Figura 23).

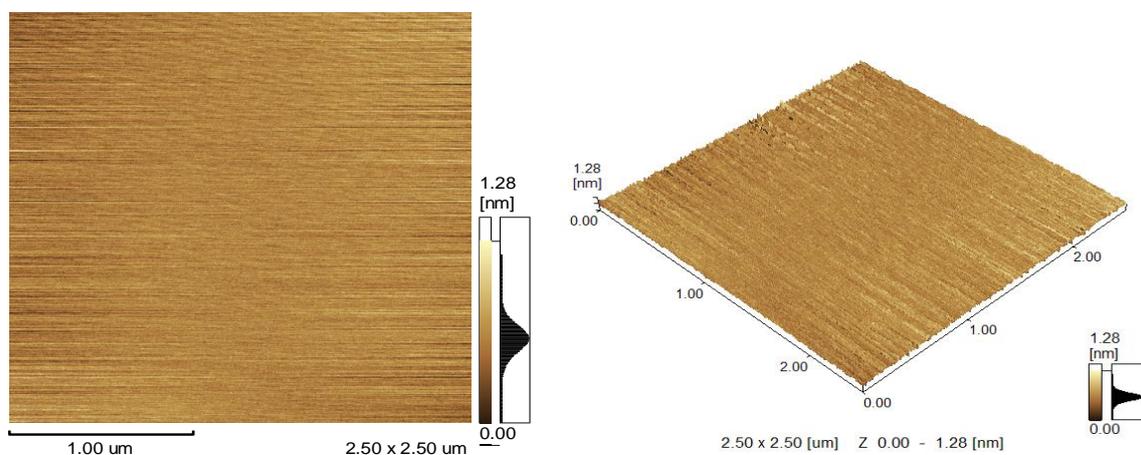
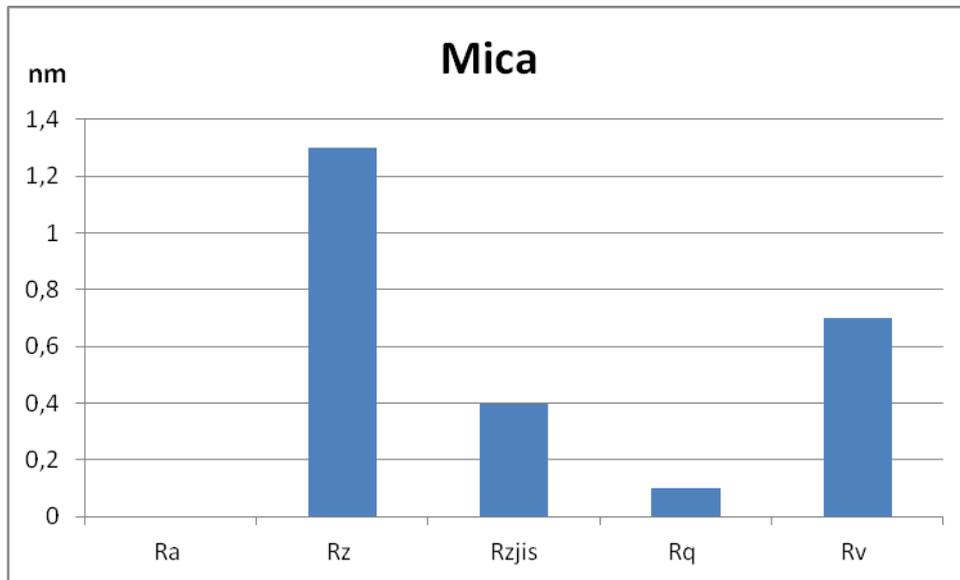


Figura 23 - Imagem planar e tridimensional da superfície de mica muscovita (software SPM-9600).



Histograma 1 – Ilustração dos parâmetros de caracterização de superfície incluindo rugosidade (Ra), altura média (Rz), média aritmética da rugosidade (Rzjis), raiz quadrática média da rugosidade (Rq), profundidade média (Rv) da mica.

A avaliação pela microscopia de força atômica apresentou diferenças topográficas entre as diferentes superfícies contendo filmes de látex, conforme mostrado nas imagens a seguir, nos vários parâmetros considerados, em especial, a rugosidade (Ra). Para cada imagem, houve pelo menos 3 (três) diferentes áreas adquiridas com obtenção nos sentidos de traço e retraço. O látex foi analisado em 5 (cinco) situações distintas:

- Látex bruto – LB;
- Soro com anticoagulante – SA;
- Soro diluído 1:10 – SD1;
- Soro diluído 1:100 – SD2;
- Soro filtrado e centrifugado SFC;

## Látex Bruto - LB

A análise foi realizada com 20  $\mu\text{L}$  de látex *in natura* coletada diretamente da árvore de *Couma utilis*, o qual minutos depois sofreu coagulação espontânea. Na imagem abaixo (Figura 24), observa-se a formação de filme que apresentou: ondulações, depressões, cavidades e presença de partículas, as quais não estão totalmente aglomeradas, indicando que a interdifusão das cadeias poliméricas não é completa.

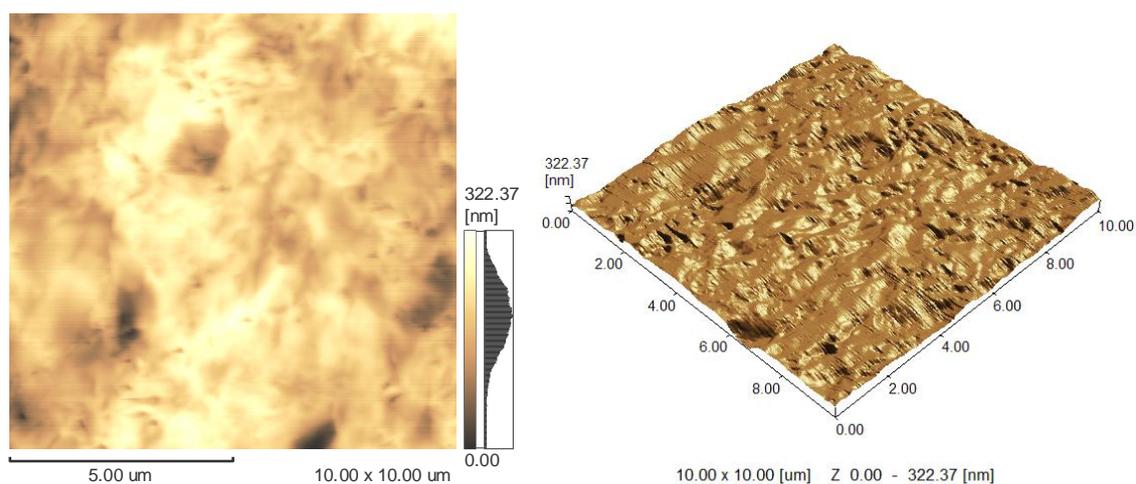
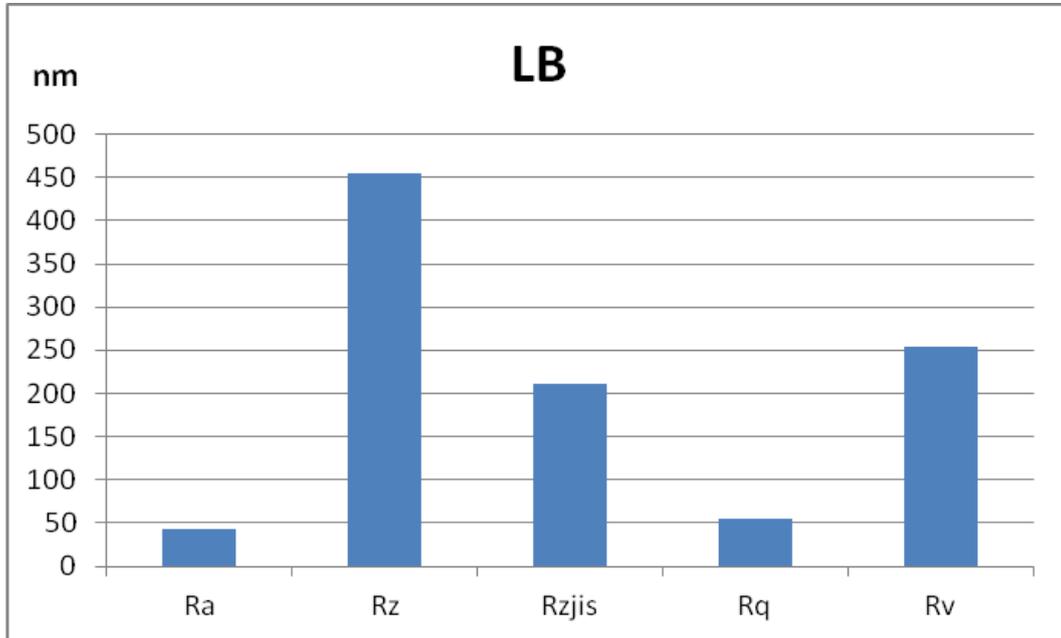


Figura 24 - Imagem planar e tridimensional da superfície de látex bruto sem anticoagulante (software SPM-9600).



Histograma 2 – Ilustração dos parâmetros de caracterização de superfície incluindo rugosidade (Ra), altura média (Rz), média aritmética da rugosidade (Rzjis), raiz quadrática média da rugosidade (Rq), profundidade média (Rv) de LB.

## Soro com anticoagulante - SA

A análise foi realizada com o soro do látex com amônia. Na imagem observa-se a formação de filme com ondulações, cavidades e depressões (Figura 25).

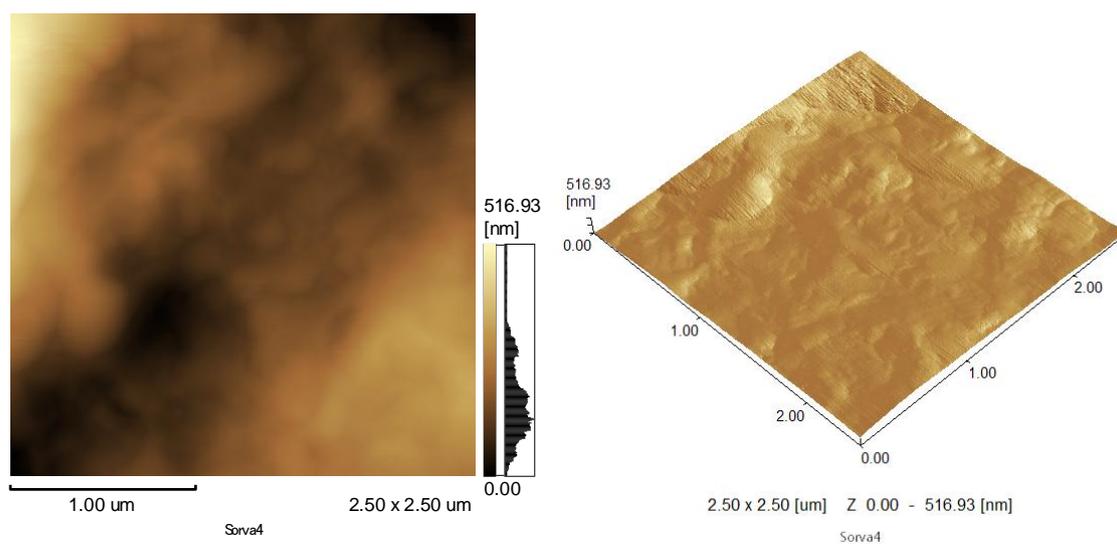
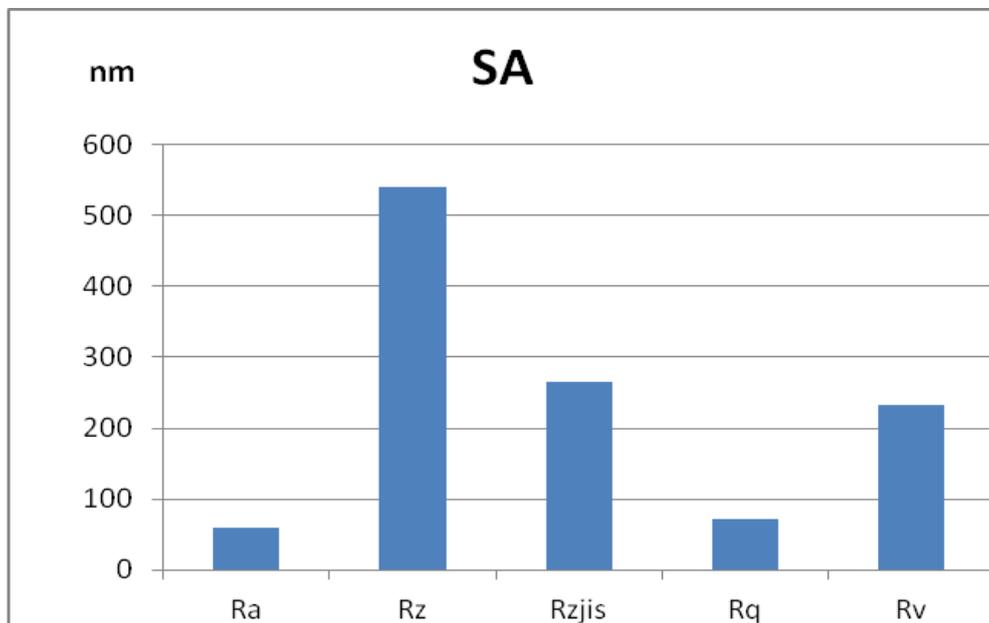


Figura 25 – Imagem planar e tridimensional da superfície de soro com adição de amônia (software SPM-9600).



Histograma 3 – Ilustração dos parâmetros de caracterização de superfície incluindo rugosidade (Ra), altura média (Rz), média aritmética da rugosidade (Rzjis), raiz quadrática média da rugosidade (Rq), profundidade média (Rv) de SA.

As amostras LB e SA possuem semelhanças, o soro com anticoagulante (SA) apresentou um mínimo aumento em relação as características superficiais.

## Soro diluído 1:10 – SD1

A análise foi realizada com o soro e diluído em água ultra pura. Na imagem observa-se a formação de filme com ondulações e cavidades. (Figura 26)

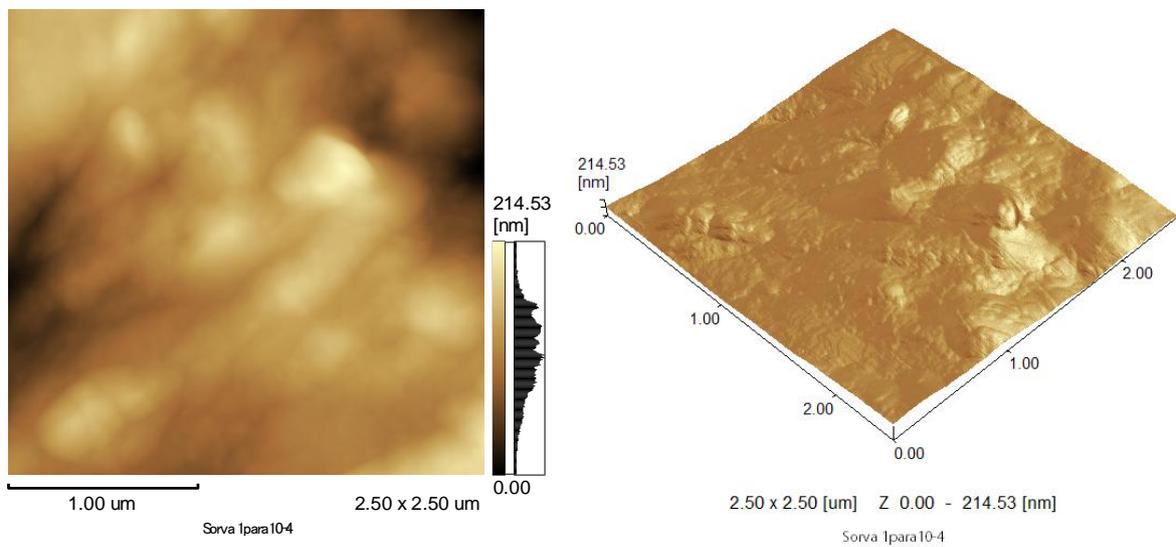
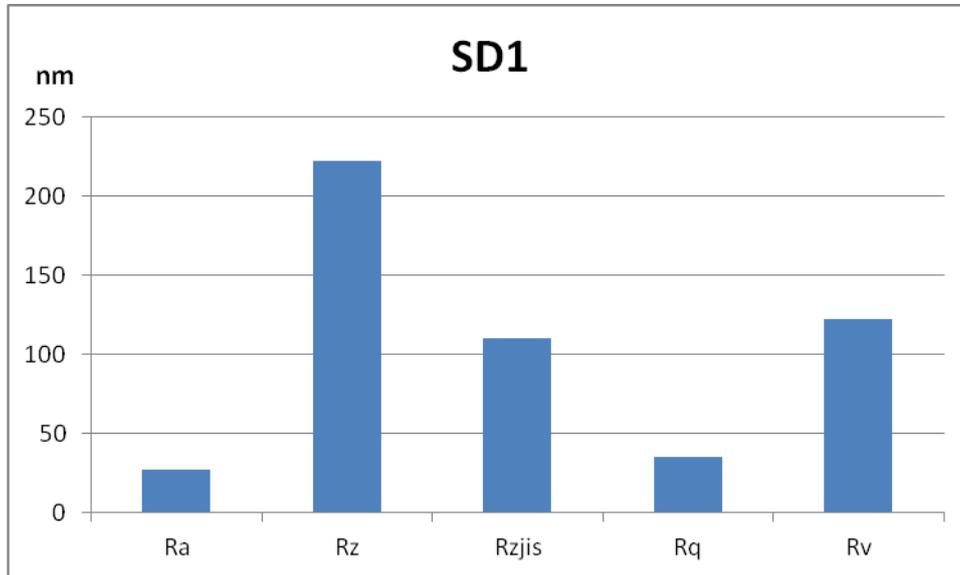


Figura 26 - Imagem planar e tridimensional da superfície de soro diluído (1:10) (software SPM-9600)



Histograma 4 – Ilustração dos parâmetros de caracterização de superfície incluindo rugosidade (Ra), altura média (Rz), média aritmética da rugosidade (Rzjis), raiz quadrática média da rugosidade (Rq), profundidade média (Rv) de SD1.

## Soro diluído 1:100 – SD2

A análise foi realizada com soro e diluído em água ultra pura. Na imagem observa-se a formação de filme com ondulações, cavidades, depressões, não permitindo distinguir facilmente as fronteiras das partículas (Figura 27).

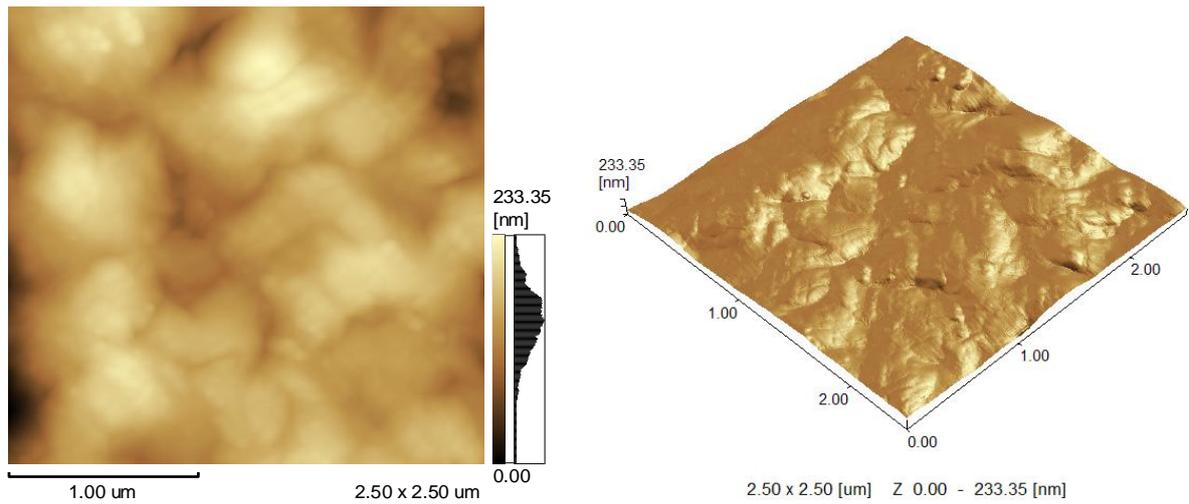
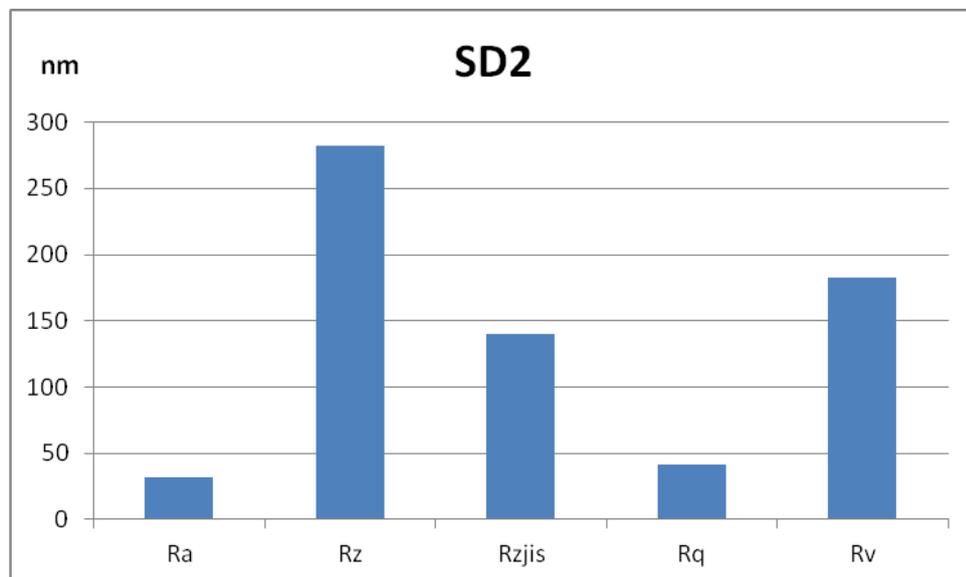


Figura 27 - Imagem planar e tridimensional da superfície de soro diluído (1:100) (software SPM-9600)



Histograma 5 – Ilustração dos parâmetros de caracterização de superfície incluindo rugosidade (Ra), altura média (Rz), média aritmética da rugosidade (Rzjis), raiz quadrática média da rugosidade (Rq), profundidade média (Rv) de SD2.

Apesar da amostra SD2 ser a mais diluída, apresentou maior altura média (Rz), média aritmética da rugosidade (Rzjis) e profundidade média (Rv).

### **Soro filtrado e centrifugado - SFC**

O soro do látex foi filtrado, sêco, ressuspendido em acetonitrila e água ultra pura e por fim centrifugado. Somente nesta situação ocorreu presença de partículas, o que permite observar uma quantidade maior de partículas de látex, onde estas se posicionaram separadamente possibilitando a realização de suas medidas estruturais. (Figura 28). Não houve variação na superfície da amostra, detectando 229 partículas as quais foram medidas (Tabela 6).

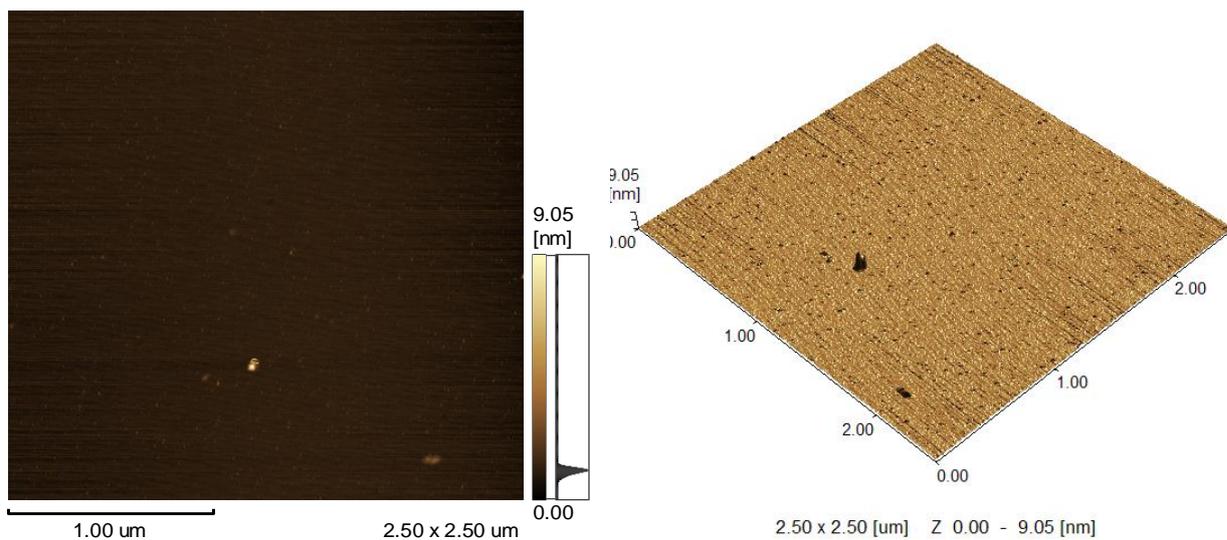
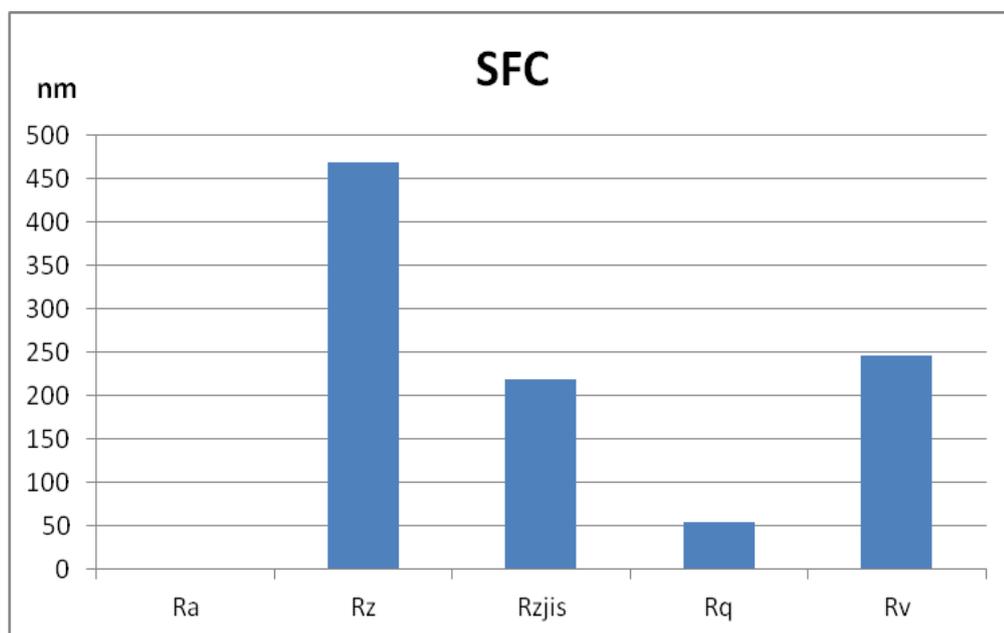


Figura 28 - Imagem planar e tridimensional da superfície de soro filtrado e centrifugado (software SPM-9600)



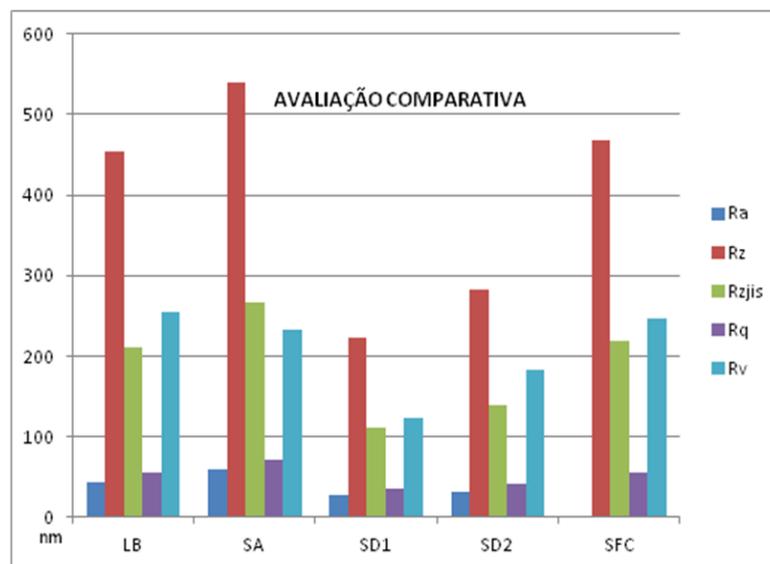
Histograma 6 – Ilustração dos parâmetros de caracterização de superfície incluindo rugosidade (Ra), altura média (Rz), média aritmética da rugosidade (Rzjis), raiz quadrática média da rugosidade (Rq), profundidade média (Rv) de SFC.

Tabela 6 – Medidas estruturais em média das partículas de látex.

<b>229 Partículas</b>	
<b>Medidas estruturais</b>	
Centro X [nm]	174,4
Centro Y [nm]	1233,7
Diâmetro máximo [nm]	10,8
Largura padrão [nm]	6,4
Comprimento horizontal [nm]	6,7
Comprimento vertical [nm]	8,7
Média do raio [nm]	4,4
Perímetro [nm]	26,9
Z máximo [nm]	25,7
Z mínimo [nm]	1,8
Média Z [nm]	1,5
Area da superfície [nm <sup>2</sup> ]	141,0
Volume [nm <sup>3</sup> ]	141,9
Área de partículas	2,5
Distorção	0,8
Grau circular	0,8
Rugosidade	0,5

Tabela 7 - Avaliação comparativa dos parâmetros Rugosidade (Ra), altura máxima (Rz), média aritmética da rugosidade (Rzjis), raiz quadrática média da rugosidade (Rq), profundidade média (Rv), de nanorugosidade das amostras LB, SSA, SD1, SD2 e SFC obtidos a partir das imagens topográficas.

<b>Parâmetro (nm)</b>	<b>LB</b>	<b>SSA</b>	<b>SD1</b>	<b>SD2</b>	<b>SFC</b>
<b>Ra</b>	43,2	59,7	27,5	32	0,2
<b>Rz</b>	453,9	539,1	222,2	282,2	468,8
<b>Rzjis</b>	211,3	265,8	110,6	139,8	219,3
<b>Rq</b>	54,8	72	35	41,2	54,4
<b>Rv</b>	253,9	233,1	122,4	182,2	246,2



Histograma 7 – Ilustração da avaliação comparativa das amostras (LB, SA, SD1, SD2 e SFC) da caracterização de superfície incluindo rugosidade (Ra), altura média (Rz), média aritmética da rugosidade (Rzjis), raiz quadrática média da rugosidade (Rq), profundidade média (Rv).

Os filmes apresentam rugosidade baixa que varia de 0 a 72 nm, onde a amostra SA apresenta maior rugosidade. A altura média varia de 222, 2 a 539,1 nm, sendo que o filme de SA apresenta a superfície mais alta, enquanto o filme do SD1 apresenta a superfície mais baixa conforme com os parâmetros Ra, Rz, Rzjis, Rq. Observa-se que os filmes de SD1 e SD2 tem uma superfície mais plana que os filmes de SA, LB e SFC, mostrando uma boa concordância com os valores dos parâmetros Ra,e Rv. A amostra SFC possui maior profundidade (252,2 nm) e a SD2 a menor (121,2 nm).

Tabela 8 – Desvio padrão ( $\sigma$ ) das principais características superficiais das amostras analisadas por MFA.

Desvio Padrão ( $\sigma$ )			
Amostras	Rugosidade (Ra) (nm)	Altura média (Rz) (nm)	Profundidade média (Rv) (nm)
Látex bruto – LB	2,3	45,7	29,6
Soro com anticoagulante – SA	6,2	86	34,9
Soro diluído 1:10 – SD1	6,2	40,5	33,7
Soro diluído 1:100 – SD2	5,4	36,1	33,9
Soro filtrado e centrifugado - SFC	0,04	68,7	49

## CAPÍTULO 4 - CONCLUSÕES

O látex da sorva é utilizado frequentemente pelos indígenas e ribeirinhos da Amazônia há tempos. Devido à existência de várias espécies lactíferas, estudos voltados para a descrição da composição química e caracterização biológica de latexes amazônicos tem sido de grande importância.

O fracionamento cromatográfico do soro proveniente do látex de *Couma utilis* resultou o isolamento do triterpeno acetato de  $\alpha$ -amirina, identificado por RMN. Constatou-se a atividade antimicrobiana do soro (F2) frente a cepas de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*. A avaliação comparativa das características superficiais do látex em cinco situações distintas, mostrou que

O trabalho contribui para o conhecimento de seus constituintes e pretende auxiliar no desenvolvimento de usos, assim como, na valorização de produtos obtidos do látex de *Couma utilis*, que constitui uma perspectiva importante para o desenvolvimento regional. O grande potencial antimicrobiano observado pode também auxiliar na defesa contra predadores nas plantas e fitoterápicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI, D. L. S. 2009. *Caracterização dos constituintes do látex da borracha natural que estimulam a angiogênese*. Dissertação de Mestrado. UEP – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente, São Paulo.

AGUIAR, J. P. L. MARINHO, H.A.; REBELO, Y.S.; SHRIMPTON, R. 1980. *Aspectos nutritivos de alguns frutos da Amazônia*. Acta Amazônica, 10 (4): 755-758.

ALBUQUERQUE, B. W. P.; 1973. *Contribuição ao conhecimento de Couma macrocarpa Barb. Rodr. e C. utilis (Mart.) M. Arg. (Apocynaceae) da Amazônia*. Acta Amazonica, Belém, Falângula, 3 (2): 7-15.

AMBIENTE BRASIL. Látex-Borracha vegetal. Disponível em: [www.ambientebrasil.com.br/](http://www.ambientebrasil.com.br/) Acesso em 21/05/2012.

ARAÚJO, JÚLIO M. A, 1999. *Química de alimentos: teoria e prática*. Viçosa, UFV, 2 ed 12: 275-309.

BARBOSA, F. B. C. 2001. *A biotecnologia e a conservação da biodiversidade Amazônica, sua inserção na política ambiental*. Caderno de Ciência & Tecnologia, 18 (2): 69-94.

BERTOLINI, A. C; CREAMER, L.K.; EPPINK, M; BOLAND, M, 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53.

BRITO, A.R.M.S.; BRITO, A.A.S. Forty years of brasilian medicinal plant research. J. of Ethnopharmacol., 49(2), p. 53-67, 1993.

BUTTERY, B.R., BOATMAN, S.G. 1985. Déficits hídricos e fluxo de látex. T.T. Kozlowski (ed.), Academic Press, Nova Iorque, trad. P.C. Hipolito Campinas, Fundação Cargil, 120p.

CANEVAROLO Jr., S.V. Técnicas de Caracterização de Polímeros. ArtLiber, p. 31, São Paulo, Brasil, 2003.

CAVALCANTE, P. B.; 1991. *Frutas comestíveis da Amazônia*. 5ª ed. Edições CEJUP, Belém.

COLLINS, C.H.; BRAGA,G.L.; BONATO,P.S. Fundamentos de Cromatografia. São Paulo: da Unicamp, 2006. 456p.

FALCÃO, M. A.; CLEMENTS, C. R.; GOMES, J. B. M.; 2003. *Fenologia e Produtividade da Sorva (Couma Utilis (Mart.) Muell. Arg.) na Amazônia Central*. Acta bot. bras., 17(4): 541-547.

FALCÃO, M. A.; LLERAS, E. 1981. *Aspectos fenológicos, econômicos e de produtividade da sorva (Couma utilis Muell. Arg.)*. Acta Amazônica, 11(4): 729-741.

FALCÃO, M. DE A. 1979. *Aspectos fenológicos, ecológicos e de produtividade de algumas fruteiras cultivadas na Amazônia*. Vol I. ed. Calderaro & Funcomiz, Manaus.

FALCÃO, M. DE A. 1993. *Aspectos fenológicos, ecológicos e de produtividade de algumas fruteiras cultivadas na Amazônia*. Vol II. Amazonas, Manaus.

FALCÃO, M. DE A.; CHAVÉZ FLORES, W. B.; FERREIRA, S. A. N.; CLEMENT, C. R.; BARROS, M. J. B.; BRITO, J. M. C. & SANTOS, T. C. T. 1988. *Aspectos fenológicos e ecológicos do araçá-boi (Eugenia stipitata McVaugh) na Amazônia Central. I. Plantas juvenís*. Acta Amazônica 18(3-4): 27-38.

FERNANDES, O. C. C. Metabólitos secundários de fungos Anamorfos da Amazônia com ação antimicrobiana. Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2007.

FRANÇA, S. C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O. ET AL. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. Ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRS, p.499-525, 2001.

Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: (de consumo in natura) / HARRI LORENZI ET AL. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006.

FUCHS. T., SPITZAUER, S., VENTE, C., HELIER, J., KAPIOTS, S., RUMPOLD, H., KRAFT, D., VALENTE, R. 1997. *Natural latex, grass pollen, and weed pollen share IgE epitopes*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, Saint Louis, 100 (3): 356-364.

GOUNARIDES, J. S.; CHEN, A.; SHAPIRO, M. J. 1999. *Nuclear magnetic resonance chromatography: applications of pulse field gradient diffusion NMR to mixture analysis and ligand–receptor interactions*. Journal of Chromatography B. 725: 79-90.

HERMANN, P.S.P.; DA SILVA, M.A.P.; BERNARDES FO, R.; JOB, A.E.; COLNAGO, L.A.; FROMMER, J.E.; MATTOSO, L.H.C. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 1997.

HODGE, P.; MONVISADE, P.; MORRIS, G. A. PREECE, I. 2001. *A novel NMR method for screening soluble compound libraries*. *Chemical Communications*, 3: 239-240.

HOEHNE, F. C. 1946. *Frutas indígenas*. Instituto de Botânica, São Paulo.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <http://www.ibge.gov.br/> *Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura* – 2001. Acesso em: 22/05/2011.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2004. *Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos* – São Paulo.

LANÇAS, F. M. 2009. *Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE* - Campinas.

LEHNINGER, A. L. 2002. *Princípios de bioquímica*. São Paulo: Savier., 3 ed. 5: 89-150.

KOSASI, S.; VAN DER SLUIS, W.V.; BOELEN, R.; THART, L.A.; LABADIE, R.P. 1989. *Labaditin, a novel cyclic decapeptide from the latex of Jatropha multzifida L. (Euphorbiaceae) Isolation and sequence determination by means of two-dimensional NMR*. *Febs Letters*, 256 (1-2): 91-96.

LOUREIRO, V. R. A. 1992. *História Social e Econômica da Amazônia. Estudos e Problemas Amazônicos*. CEJUP, Belém, 9-55.

- LOURENÇO, E. J. 2000. *Tópicos de proteínas de alimentos*. 1. ed. Jaboticabal: Funep, 344p.
- GAMA, M. M. B.; LIMA P. T. N.A.; OLIVEIRA V. B. V. Recursos florestais não madeiros-experiências e novos rumos em Rôndônia. 1ª Ed. Porto Velho, EMBRAPA RO, 2006.
- GEORGE, M. M. 2005. Fundamentos de Biologia Molecular 4ª ed Editora: Guanabara Koogan, 2: 120-200. Caracterização microestrutural de filmes e partículas de látex de borracha natural / Márcia Maria Rippel. -- Campinas, SP: [s.n], 2005.
- MARIN, F. A.; PERES, S. P. B. A.; ZULIANI, A. 2002. *Alergia látex-fruta*. Revista de Nutrição, Campinas, 15 (1): 95-103.
- MICHON. G, 1999. *Agro-forests: incorporating a forest vision in agroforestry. Agroforestry in Sustainable Agricultural Systems*. Lewis Publishers, Boca Raton, 381-406.
- MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. Química Nova, v.24, n.1, p. 105-111, 2001.
- MORAES, V. H. F. 1978. *Comparação entre sangria oriental e sangria amazônica em seringais nativos*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 13: 69–73.
- NASCIMENTO, A.M.R. 1999. *Avaliação química e farmacológica do Leite do Amapá (Brosimum parinarioides)*. 98p. Dissertação de Mestrado. UFAM - Química de Produtos Naturais, Manaus, Amazonas.

NASCIMENTO, A.M.R. 2006. *Estudo do látex da sorva pela espectroscopia de ressonância magnética nuclear*. 104 p. Dissertação de Doutorado. UFRJ – Instituto de macromoléculas, Rio de Janeiro.

OSTROSKY, E. A. ET AL. Métodos para avaliação de atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) da plantas medicinais. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18, n. 2, 2008, p.301-307.

PEREGRINO, F. Seringueiros transformam látex em tecido ecológico. [S.I.], 2009.

PIO C. M. 1931. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil*, Ministério da Agricultura: Rio de Janeiro.

PLETSCH, M. 1998. *Compostos naturais biologicamente ativos em Biotecnologia*. Ciência & Desenvolvimento. Brasília, 1 (4): 12-15.

POTERIO G. M. BRAGA A DE F, SANTOS R. M, GOMES I. D. E. F, LUCHETTA MI. Anaphylaxis during renal transplantation of live donor graft in a child with latex allergy: case report. *Rev Bras Anesthesiol*.2009.

PRANCE, G. T.; SILVA, M. F. 1975. *Árvore de Manaus*. Instituto Nacional de pesquisas da Amazônia.

REYES J.R, VOLLMER T.R, SLOMAN K.N, HALL A, REED R, JANSEN G, ET AL.  
Assessment of deviant arousal in adult male sex offenders with developmental disabilities. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 2006.

RIPPEL, M.M. “Caracterização microestrutural de filmes e partículas de látex de borracha natural”, Tese (Doutorado em Ciências na área de Físico- Química) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química- UNICAMP – Campinas, SP 2005.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. 2006. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, 7 Ed, LTC, Rio de Janeiro, 1: 7-56.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.O.; IRGANG, B.E.; STEHMAN, J.R. *Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: Editora da UFRS, p.176, 1986.

SOUZA, V. C. & LORENZI, H. 2005. *Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Plantarum, Nova Odessa.

*Fungos da Amazônia: Uma riqueza inexplorada*. TEXEIRA, M. F. S ET AL. Manaus: EDUA, 2011.

VANDERLINDE, D. G.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana de metabólitos produzidos pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* (Linnaeus:fries) Murriel. *Revista Saúde e Pesquisa*, 3, 2010, p.11-16.

VELLOSO, C. R. X. Triterpenos isolados de Parahanconia de Amapá (Apocynaceae) e Diterpenos isolados de Pinus Caribaea var. bahamensis Barr et Golf. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1998.

VOGEL, A. I. 2008. *Análise química quantitativa*. 6 ed, Rio de Janeiro, Editora Guanabara, 19: 400-430.

WALL, M.E.; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. J. of Ethnopharmacol., 51, p.239-254, 1996.

ZAIA, D. A.; ZAIA, C. B. V. 1998. *Determinação de proteínas via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes*. Química Nova, 21 (6): 787 – 793.

ZAMITH, H. P. S. 1995. *Estudo da genotoxicidade do látex moluscicida da Coroa-de-Cristo (Euphorbia milii var hislopii)*. 129 p. Dissertação - Instituto Oswaldo Cruz.