

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA**

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS GALHOS
DE *Piranhea trifoliata* BAILL (PICRODENDRACEAE)**

LAILA DA SILVA PEDROZA

**MANAUS
2014**

LAILA DA SILVA PEDROZA

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS GALHOS
DE *Piranhea trifoliata* BAILL (PICRODENDRACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Prof. Dra. Cecilia Veronica Nunez

**MANAUS
2014**

LAILA DA SILVA PEDROZA

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS GALHOS
DE *Piranhea trifoliata* BAILL (PICRODENDRACEAE)**

Banca Examinadora:

Dra. Cecilia Veronica Nunez
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Dra. Patrícia Melchiona Alburquerque
Universidade Federal do Amazonas

Dr. Adrian Martin Pohlit
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

PEDROZA, LAILA

Estudo Químico e Avaliação da Atividade Biológicas dos galhos de *Piranhea trifoliata* Baill (Picrodendraceae)/ Laila da Silva Pedroza. - Manaus: UEA, 2014.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) — Universidade do Estado do Amazonas, 2014.

Orientador: Prof. Dra. Cecilica Veronica Nunez

Dedicatória

*Aos meus pais:
Valdecelina da Silva Pedroza e
Alcimar da Silva Pedroza. Não
existem palavras que expressem
a gratidão e o amor que sinto
por vocês. Espero ser sempre
motivo de orgulho e alegria.
Dedico-lhes esta conquista com
gratidão.*

“Epígrafe”.

“Tudo posso naquele que me fortalece.”

Filipenses 4:13

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois Deus não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos, pois me escolheu para realização deste trabalho, por meio da sua infinita benção em minha vida.

Aos meus pais por terem me ensinando a ser a pessoa que sou hoje.

A minha orientadora, Prof. Dra. Cecilica Veronica Nunez, com quem aprendi muito mais que conhecimentos químicos, agradeço a confiança e compreensão em mim colocada.

À prof. Dra. Alaide Braga de Oliveira e a doutoranda Renata C. de Paula pela colaboração na realização dos ensaios antimaláricos.

Aos amigos do Laboratório 1, Daiane Martins pela amizade, paciência, ensinamento, confiança, incentivo desde a iniciação científica até agora no mestrado, Maria Izabel (Bel) pelo carinho e ajuda infinita, Manoel Jeffreys pela ajuda na realização das atividades do laboratório, Maria Teresa (Maite) pela amizade e conselhos e pelas risadas nas realizações dos testes antioxidantes e em todas as conversas, a Lorena Cursino por sempre estar disposta a ensinar, a Larissa Daniele pela parceria de bancada e a todas as conversas realizadas, David Ribeiro, pelo carinho enorme e a tranquilidade transmitida em momentos difíceis, aos demais amigos do laboratório Laís Menezes, Rodrigo Cavalcante, Giselle Mendes, Fabio Vidal, Jessica Ingrid, Mariana Monteiro, Fabiana pela compreensão e amizade e por fazerem parte desta conquista. Aos colegas do Laboratório 2, Maria Carolina, pela realização dos testes biológicos, Fabiele e Jaci pela realização das amostras de RMN, e aos demais, Vanessa Neves, Tais Xavier, Sabrina, Gabriel, Julio, Fabiane, Paula, Nicole e Weison.

Aos professores queridos do CBPS Lia e Nagai, tenham o meu reconhecimento e gratidão, pois depois de professores passaram a amigos, principalmente Lia, que de professora passou a colega de turma, muito do que sei hoje, foram vocês que me ensinaram.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (MBT – UEA).

Aos professores e colegas de curso do Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia.

Ao CNPq, PPBio, CENBAM e FAPPEAM, pelo apoio financeiro para realização deste projeto.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, me auxiliaram na execução deste projeto.

Lista de figuras

Figura 1: Estruturas dos alcaloides morfina (A), quinina (B), cafeína (C).	20
Figura 2: Estruturas dos antimaláricos (A) quinina e (B) artemisinina.....	24
Figura 3: Ocorrência mundial da família Picrodendraceae	26
Figura 4: Folhas verdes e árvore de <i>Piranhea trifoliata</i>	29
Figura 5: Triterpeno 28-hidroxi-friedelin-3-ona isolado das folhas de <i>Piranhea trifoliata</i>	30
Figura 6: Coleta do material vegetal.....	33
Figura 7: Metodologia de preparo dos extratos vegetais.....	34
Figura 8: Ensaio de difusão em agar	40
Figura 9: Ensaio de toxicidade	41
Figura 10: Concentrações utilizadas do ensaio de toxicidade	41
Figura 11: Análise em CCDC da fração 13	44
Figura 12: Análise em CCDC da fração 14-18.....	45
Figura 13: Fracionamento do extrato DCM dos galhos da 1ª coleta.....	45
Figura 14: Análise em CCDC das frações 26 a 30 da F-DCM do extrato metanólico dos galhos da 1ª coleta	48
Figura 15: Análise em CCDC das frações 31 a 36 da F - DCM do extrato metanólico dos galhos da 1ª coleta	48
Figura 16: Fracionamento do extrato metanólico dos galhos da 1ª coleta	48
Figura 17: Análise em CCDC da fração 31-32.....	50
Figura 18: Análise em CCDC das frações 26 a 30 da Fase DCM do extrato metanólico dos galhos da 2ª coleta	52
Figura 19: Fracionamento do extrato metanólico da 2ª coleta	52
Figura 20: Fotos das placas dos extratos DCM dos galhos da 1ª, 2ª e 3ª coletas.	54
Figura 21: Fotos das placas dos extratos MEOH ds galhos da 1ª, 2ª e 3ª coletas. ..	54
Figura 22: Estrutura da friedelin-3-ona	63
Figura 23: Espectros de RMN de ¹ H da friedelin-3-ona	64
Figura 24: Expansão do espectro de RMN de ¹ H da friedelin-3-ona	65
Figura 25: Espectro de RMN de ¹³ C da friedelin-3-ona.....	66
Figura 26: Expansão do espectro de RMN de ¹³ C da friedelin-3-ona.....	67
Figura 27: Proposta da estrutura da substância II (3-metoxi-4-hidroxi-benzaldeído).....	68

Figura 28: Espectro de RMN de ^1H da substância 2	69
Figura 29: Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância 2	70

Lista de tabela

Tabela 1: Substâncias isoladas da família Picrodendraceae	27
Tabela 2: Substâncias isoladas da espécie <i>Celaenodendron mexicana</i>	28
Tabela 3: Classificação da atividade antimalárica.....	37
Tabela 4: Eluentes utilizados no fracionamento da fração 1-2.....	42
Tabela 5: Eluentes utilizados no fracionamento da fração 21	43
Tabela 6: Eluentes utilizados no fracionamento da fração 22-23.....	44
Tabela 7: Massas dos extratos submetidas à partição.....	46
Tabela 8: Eluentes utilizados no fracionamento da fase DCM da 1ª coleta.....	47
Tabela 9: Eluentes utilizados no fracionamento da fase DCM da 2ª coleta	49
Tabela 10: Eluentes utilizados no fracionamento da fração 7 – 12.....	50
Tabela 11: Eluentes utilizados no fracionamento da fração 14 – 22.....	51
Tabela 12: Eluentes utilizados no fracionamento da fração 32 – 62.....	51
Tabela 13: Massas dos extratos obtidas dos galhos de <i>Piranhea trifoliata</i>	53
Tabela 14: Atividade antioxidante dos extratos brutos de diclorometânicos e metanólicos dos galhos	55
Tabela 15: Atividade antioxidante das fases das partições dos extratos metanólicos dos galhos.....	56
Tabela 16: Percentual de redução (% Red) do crescimento de <i>P. falciparum</i> cloquina-resistente (W2) na presença das amostras recebidas em duas concentrações, 25 e 50 µg/mL	57
Tabela 17: Concentração inibitória de 50% do crescimento (CI ₅₀) do clone W2 (cloroquina-resistente) de <i>P. falciparum</i> contra as amostras avaliadas.....	57
Tabela 18: Percentual de redução (% Red) do crescimento de <i>P. falciparum</i> cloroquina-resistente (W2) na presença das diferentes fases dos extratos metanólicos	58
Tabela 19: Concentração inibitória de 50% do crescimento (CI ₅₀) do clone W2 (cloroquina-resistente) de <i>P. falciparum</i> contra as fases dos extratos metanólicos	58
Tabela 20: Concentração citotóxica que inibe 50% do crescimento (CC ₅₀) de células HepG2 testadas.....	59
Tabela 21: Valores de CC ₅₀ , CI ₅₀ e índice de seletividade calculado para a fase DCM da 1ª coleta.....	59

Tabela 22: Resultado do ensaio de citotoxicidade.	60
Tabela 23: Resultados do teste antibacteriano pelo método de difusão em Agar	61
Tabela 25: Dados de RMN ¹³ C do friedelin-3-ona comparados com a literatura (MAHATO & KUNDU, 1994)	62

Lista de abreviaturas

AcOEt – Acetato de etila

CA – Coluna Aberta

CCDC – Cromatografia em camada delgada comparativa

CIM – Concentração inibitória mínima

CMB – Concentração mínima bactericida

DCM - diclorometano

DPPH - 1,1-difenil-2-picril-hidrazila

DMSO - dimetilsulfóxido

F-AcOEt – Fase Acetato de etila

F-DCM – Fase diclorometânica

F-H-MeOH – Fase hidrometanólica

HEX –Hexano

HPLC – High performance liquid chromatography

INPA – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia

MeOH - Metanol

MH – Mueller-Hinton

OMS – Organização Mundial de Saúde

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

UFC – Unidade formadora de colônia

UV – ultra-violeta

Resumo

Este trabalho teve como objetivo realizar o estudo químico dos galhos de *Piranhea trifoliata* (Picrodendraceae) e avaliar as atividades biológicas quanto às atividades antimalárica, antioxidante, antibacteriana e de toxicidade sobre *Artemia salina*. Para a pesquisa foram realizadas três coletas, duas realizadas no estado do Pará e uma no estado Amazonas. O material foi seco, moído e extraído com diclorometano (DCM) e metanol (MeOH). Os extratos DCM e MeOH foram submetidos à análise por meio de cromatografia em camada delgada, e apresentaram características principalmente de terpenos. O estudo fitoquímico do extrato DCM da 2ª coleta, forneceu o triterpeno friedelin-3-ona, e o extrato MeOH forneceu um composto fenólico. Quanto à atividade antimalárica, os extratos e as fases dos extratos MeOH foram avaliados frente ao *Plasmodium falciparum*, e os extratos MeOH das 1 e 2ª foram considerados ativos ($CI_{50} = 13,66 \mu\text{g/mL}$ para a 1ª coleta e de $CI_{50} = 5,79 \mu\text{g/mL}$ para a 2ª coleta), e a fase DCM da 1ª ($CI_{50} = 7,05 \mu\text{g/ml}$), esta fase foi avaliada quanto a sua citotoxicidade sobre a linhagem celular HepG2 A16 (derivada de um hepatoblastoma primário humano), e a concentração de redução foi superior $1000 \mu\text{g/mL}$ e após calculado o índice de seletividade, não foi considerada tóxica e assim foi possível inferir que esta fase possui um efeito direcionado apenas ao parasito e não que esta ação ocorre devido a sua toxicidade para quaisquer tipos de células. Quanto à atividade antioxidante, os extratos MeOH das 3 coletas apresentaram equivalências com o ácido ascórbico entre 1-2. Quanto à atividade antimicrobiana pelo método de difusão em Agar, o extrato MeOH da 2ª coleta apresentou atividade frente as bactérias *Salmonella enteritidis* e *Pseudomonas fluorescens*, com halos de inibição de 1,5 cm e 1,3 cm respectivamente. Este é o primeiro relato da substância friedelin-3-ona em Picrodendraceae.

Palavras – chave: Picrodendraceae, *Piranhea trifoliata*, fitoquímica

Abstract

The aim of this work was to realize the chemical study of branches of *Piranhea trifoliata* (Picrodendraceae) and evaluate the biological activity as antimalarial, antioxidant, antibacterial activities and toxicity about *Artemia salina*. The plant material was collected three times, two in Para State and one in Amazon State. The material was dried and extracted using dichromethane and methanol as solvents. There were realized TLC analyzes of these two extracts (CH₂Cl₂ and MeOH) and were observed characteristics of terpenes after derivatization with anisadehyde and Ce(SO₄)₂. The phytochemical study of CH₂Cl₂ extract from the second collection yielded 3-oxo-friedelin. The antimalarial activity of the extracts and fases from MeOH extract were tested against *Plasmodium falciparum*. The MeOH extracts from first (IC₅₀ = 13.66 µg/mL) and second collection (IC₅₀ = 5.79 µg/mL) and CH₂Cl₂ fase (IC₅₀ = 7.05 µg/mL) were active, this fase was evaluated for its cytotoxicity on the cell line HepG2 A16 (derived from a primary human hepatoblastoma) and concentration reduction was greater than 1000 mg/mL and after calculated the selectivity index, was not considered toxic and so it was possible to infer that this fase has a directed only to the parasite and not effect that this action is due to its toxicity for all types of cells. To antioxidant activity of the MeOH extracts of third collection has equivalence with ascorbic acid at 1-2. To antimicrobial activity by agar diffusion method, the MeOH extract of the 2nd collection has activity against the bacteria *Salmonella enteritidis* e *Pseudomonas fluorescens*, with inhibition halos of 1.5 cm and 1.3 cm. This is the first report of 3-oxo-friedelin in Picrodendraceae

Keywords: Picrodendraceae, *Piranhea trifoliata*, phytochemical

Sumário

1	Introdução	18
2	Revisão bibliográfica	20
2.1	Plantas medicinais e produtos naturais.....	20
2.2	Atividades biológicas e químicas	22
2.2.1	Atividade antioxidante.....	22
2.2.2	Atividade antimalárica.....	23
2.2.3	Atividade antimicrobiana	25
2.2.4	Atividade de toxicidade frente <i>Artemia salina</i>	25
2.3	A família Picrodendraceae.....	26
2.4	Gênero <i>Piranhea</i>	28
2.5	<i>Piranhea trifoliata</i>	29
3	Objetivos.....	31
3.1	Geral	31
3.2	Específicos.....	31
4	Material e métodos	32
4.1	Especificações dos equipamentos e materiais utilizados.....	32
4.2	Coleta do material vegetal e preparo dos extratos.....	33
4.2.1	Coleta.....	33
4.2.2	Preparo dos extratos	34
4.3	Triagem química e biológica.....	35
4.3.1	Análise cromatográfica em camada delgada comparativa (CCDC).....	35
4.3.2	Avaliação da atividade antioxidante.....	35
4.3.3	Avaliação da atividade antimalárica.....	36
4.3.4	Avaliação da atividade antimicrobiana.....	38

4.3.4.1	Bactérias testadas.....	38
4.3.4.2	Método de difusão em Agar- difusão em poço.....	39
4.3.4.2.1	Preparação do inóculo	39
4.3.4.2.2	Inoculação das placas teste	39
4.3.4.2.3	Leitura das placas e interpretação dos resultados	40
4.3.5	Avaliação da atividade de toxicidade frente <i>Artemia salina</i>	40
4.4	Fracionamento cromatográfico.....	41
4.4.1	Estudo fitoquímico do extrato diclorometânico dos galhos de <i>P. trifoliata</i> da segunda coleta.....	42
4.4.2	Partição líquido-líquido dos extratos metanólicos dos galhos de <i>p. Trifoliata</i>	46
4.4.3	Estudo fitoquímico da fase diclorometânica do extrato metanólico da primeira coleta.....	47
4.4.4	Estudo fitoquímico da fase diclorometânica do extrato metanólico da segunda coleta.....	49
5	Resultados e discussão.....	53
5.1	Rendimentos dos extratos brutos	53
5.2	Triagem química e biológica	53
5.2.1	Cromatografia em camada delgada comparativa.....	53
5.2.2	Avaliação da atividade antioxidante.....	55
5.2.3	Avaliação da atividade antimalárica.....	56
5.2.4	Avaliação da atividade citotóxica frente <i>Artemia salina</i>	60
5.2.5	Avaliação da atividade antibacteriana	61
5.2.5.1	Método de difusão em Agar –difusão em poço.....	61
5.3	Fracionamento cromatográfico.....	62
5.3.1	Determinação estrutural das substâncias isoladas	62
6	Conclusões	71
7	Referências bibliográficas.....	72

1 Introdução

O Brasil é detentor de uma grande parte da diversidade biológica mundial e que não é conhecida com precisão devido a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos (NODARI e GUERRA, 2004).

Considera-se que o Brasil possua entre 19 – 20% da flora mundial (GIULIETTI *et al.*, 2005; SHEPHERD, 2005). Possui a maior área de florestas tropicais do mundo, especialmente concentrada na Região Amazônica, ocupando cerca de 44,9% do território brasileiro (IBGE, 2010). Aliado ao fato de sua extensão territorial, diversidade geográfica e climática e uma imensa diversidade biológica, o Brasil é um dos países megadiversos, e considerado o maior banco genético do planeta (STROBEL e DAISY, 2003)

Diversidade biológica pressupõe uma diversidade química. Em florestas tropicais, ocorre uma constante renovação de nutrientes, abundância de luz, calor e água, diversidade de solo, competição entre indivíduos e uma complexa rede de interações entre os seres vivos, fatores estes que contribuem para essa variedade única de espécies, que a torna uma rica e promissora fonte de novas moléculas e compostos bioativos (STROBEL *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2010).

As plantas são apontadas como uma importante fonte de produtos naturais ativos (WALL e WANI, 1996). Na busca por novos fármacos, os produtos naturais destacam-se pela diversidade estrutural, favorecendo a descoberta de novos compostos bioativos (GIORDANI *et al.*, 2008). Estudos clínicos, farmacológicos e químicos destes medicamentos derivados de plantas, foram a base para muitos fármacos, tais como aspirina, digitoxina, morfina, quinina e pilorcapina (BUTLER, 2004).

Dos domínios fitogeográficos brasileiros, a região da Amazônia é uma fonte para estudos envolvendo áreas interdisciplinares, como botânica, farmacologia, etnofarmacologia, imunologia e a química de produtos naturais, juntas enriquecem o conhecimento sobre a inesgotável fonte medicinal natural desta grande floresta (BRASILIA:MMA/SBF, 2002; MACIEL *et al.*, 2002).

A região Amazônica, devido a sua grande área de abrangência e diversidade, possui um número surpreendente de espécies vegetais, que ainda não foram avaliadas quanto ao seu potencial químico e biológico. Portanto, é muito importante a realização de estudos que caracterizem o potencial desta flora, pois permitirá o aumento do conhecimento científico de espécies conhecidas como plantas medicinais e assim validar o seu uso medicinal.

Dentre as espécies que merecem destaque está a *Piranhea trifoliata*, uma espécie típica das regiões de várzeas e igapós, muito comum na região amazônica, e usada por indígenas e ribeirinhos como planta medicinal para tratamento de malária, porém pouco se conhece sobre a sua composição química e atividades biológicas.

Assim, o presente projeto consiste em realizar o estudo químico e biológico dos extratos dos galhos de *Piranhea trifoliata*, visando assim o isolamento, identificação e determinação estrutural dos constituintes químicos dos extratos e avaliar a atividade antimalárica, antimicrobiana, toxicidade e antioxidante.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Plantas medicinais e produtos naturais

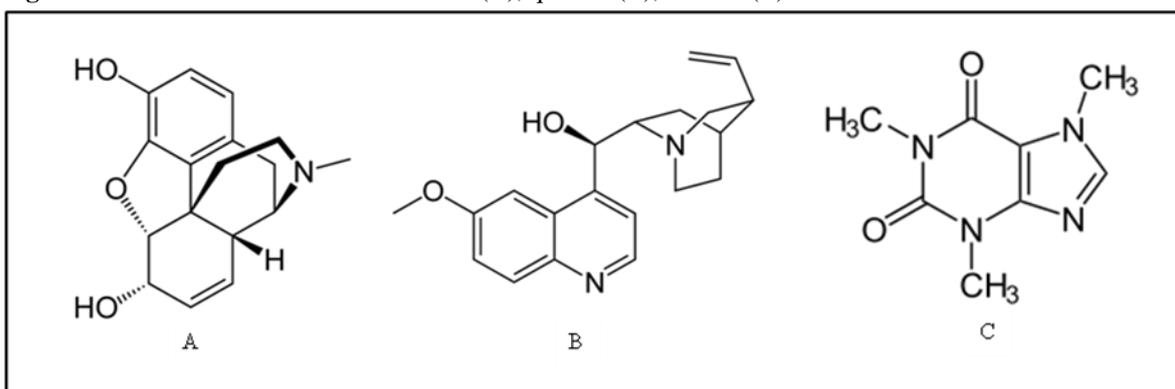
Considerada uma tradição milenar, o uso de plantas medicinais é propagado por todo o mundo. Ao longo da sua evolução, o homem foi aprimorando o seu conhecimento sobre as plantas, para poder utilizá-las na sua alimentação e para cura de algumas doenças. O resultado desse aprimoramento, foi que muitas civilizações, passaram a dominar o conhecimento do uso de plantas medicinais (FERREIRA, 2010).

A definição da OMS para plantas medicinais é: qualquer vegetal que possua substância em um ou mais órgãos que podem ser utilizadas com fins terapêuticos e que tenha uma história de uso tradicional como agente terapêutico. Cerca de 80% da população mundial utiliza plantas medicinais de acordo com a OMS (SIMÕES *et al.*, 2004; BARATA, 2005).

Foi a partir do século XVIII e XIX, com a confirmação da química como uma ciência, que as primeiras substâncias puras foram isoladas de plantas e tiveram suas estruturas determinadas (YOUNES *et al.*, 2007).

A partir do século XIX, substâncias foram isoladas de plantas e utilizadas como medicamentos até os dias atuais, como os alcaloides morfina obtido de *Papaver somniferum*, e quinina de *Cinchona sp*, cafeína da *Coffea* (Figura 1), os alcaloides da vinca com atividade antitumorais vinblastina e vincristina isoladas de *Catharanthus roseus*, estes usados na terapia do câncer (MACIEL *et al.*, 2002; CRAGG e NEWMAN, 2009).

Figura 1: Estruturas dos alcaloides morfina (A), quinina (B), cafeína (C).



Neste mesmo século, tem início os estudos das atividades de plantas indicadas empiricamente para fins medicinais através de ensaios de laboratório, para definir sua ação sistemática, nessas análises as substâncias bioativas, começaram a ser testadas, iniciando uma nova visão de aplicação terapêutica (NEWMAN e CRAGG, 2007).

Aliar o conhecimento popular com o conhecimento científico - somando- se a isso a busca de novos medicamentos, farmacoterápicos e fitoterápicos, são fatores que devem formar a base das pesquisas na área de plantas medicinais (DI STASI, 2002).

Muitas destas espécies nativas utilizadas como plantas medicinais possui pouca ou nenhuma comprovação de suas atividades farmacológicas, causando desta forma grandes problemas de intoxicação, ocasionada pelo uso indevido ou associações incorretas de plantas, tornando-se desta forma uma sério problema de saúde pública (VEIGA JR. *et al.*, 2005). A partir daí, a etnomedicina, farmacologia e a química de produtos naturais passaram a caminhar juntas (ALMEIDA, 2011).

Esses princípios ativos das plantas são os responsáveis pela ação terapêutica, são compostos que não possuem relação direta com o crescimento e desenvolvimento vegetal e são conhecidos como metabólitos secundários (TAIZ e ZEIGER, 2009), nos vegetais podem ser encontrados nas flores, folhas, raízes, frutos, sementes, caules e cascas, uma planta pode ter centenas de metabólitos secundários (SIMÕES, 2004).

Essas substâncias são responsáveis pela proteção do vegetal em diversos fatores, podendo servir como agentes de defesa contra (herbívoros, insetos, bactérias, fungos), agentes químicos (simbiose entre plantas e micro-organismos, insetos ou animais de grande porte), agentes protetores ou hormônios sexuais, e atrativos para polinizadores), os metabólitos secundários podem ser chamados bioativos e também exercem função de reconhecimento, defesa ou inibição de outras substâncias tóxicas. Exercendo dessa forma um papel importante na relação do vegetal com o ambiente (DEMAIN e FANG, 2000; DI STASI, 1996; GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

A produção desses metabólitos pelos vegetais pode ser influenciada por fatores ambientais como sazonalidade, temperatura, disponibilidade, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

A biossíntese de metabólitos secundários é realizada por rotas metabólicas, interligadas as rotas que são responsáveis pela síntese dos metabólitos primários. Nesse sentido, embora se faça a divisão em primários e secundários, as reações bioquímicas não ocorrem independentemente em um mesmo produtor (MARTINS *et al.*, , 2004; SIMÕES, 2004).

As principais classes de metabólitos secundários, tanto em número como em atividade farmacológicas são os alcaloides, terpenoides e flavonoides (HARTMANN, 2007).

2.2 Atividades biológicas e químicas

Uma planta pode produzir milhares de substâncias diferentes, onde apenas uma ou algumas são responsáveis pela atividade terapêutica ou tóxica e para comprovar esta atividade é necessário realizar testes químicos e biológicos (HOSTETTMANN *et al.*, 2003).

Muitos destes ensaios químicos e biológicos estão sendo realizados para complementar os estudos fitoquímicos na busca por substâncias bioativas, sendo específicos para um determinado alvo, como testes de toxicidade com *Artemia salina*, teste antioxidante, teste antibacteriano e teste antimalárico.

2.2.1 Atividade antioxidante

Os ensaios químicos para avaliação da atividade antioxidante tem como objetivo a investigação da capacidade dos extratos ou substâncias em reagirem com os radicais livres, na presença de um antioxidante padrão.

Radicais livres são moléculas instáveis, pelo fato de possuírem um número ímpar de elétrons. Para atingir a estabilidade, estas moléculas necessitam adquirir elétrons e, portanto, reagem com a maioria dos compostos vizinhos, oxidando-os (SANCHEZ- MORENO, 2002).

Eles desempenham papel importante no organismo, mas o efeito acumulativo desses radicais está sendo considerado a principal causa do estresse oxidativo. A geração desordenada provoca danos oxidativos em macromoléculas causando mutações que podem ser associadas a doenças neurodegenerativa e ao câncer. A oxidação de lipoproteínas é a principal causa de doenças no coração e aterosclerose, e o estresse oxidativo é o maior causador de isquemia cerebral (AMES e t al., 1995; ROESLER *et al.*, 2007, PASCUAL - TERESA e SANCHEZ - BALLESTA, 2008; BANERJEE *et al.*, 2005; EINBOND *et al.*, 2004; MULABAGAL *et al.*, 2009; HOGAN *et al.*, 2010; DAI *et al.*, 2009; SCHWARZ *et al.*, 2003; SHIN *et al.*, 2006).

Os antioxidantes são substâncias que presentes em baixas concentrações, comparadas ao substrato oxidável, inibem o processo oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000; VANNUCCHI, 1998), eles destacam-se por prevenir a formação e a ação das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que são associadas aos danos oxidativos (ANDRADE-WARTHA, 2007), portanto estudos sobre substâncias antioxidantes são necessários para prevenir o estresse oxidativo.

Os antioxidantes de origem vegetal merecem uma atenção especial, pois as plantas sintetizam metabólitos capazes de captar os radicais livres (POTTERAT, 1997). Embora as

plantas, sejam pouco usadas como agentes antioxidantes na medicina tradicional, é importante observar a capacidade contra os radicais livres que podem estar envolvidos em muitas doenças.

2.2.2 Atividade antimalárica

A malária é uma doença tropical, parasitária, cujo agente etiológico é um protozoário do gênero *Plasmodium*. As espécies associadas à malária humana são: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, sendo transmitida ao homem pela picada do mosquito do gênero *Anopheles*.

A transmissão ocorre pela picada da fêmea do mosquito infectada pelo *Plasmodium*, pois as fêmeas se alimentam de sangue, já os machos alimentam-se de fluídos de plantas e flores, sendo assim não transmitem a malária (BRASIL, 2005).

Esta doença está presente principalmente em países em desenvolvimento, concentrando-se nas Américas, Sudeste Asiático e África Central, onde ocorre mais de 90 % dos casos (BRASIL, 2001).

No Brasil, destaca-se com maior importância epidemiológica o *P. vivax* e o *P. falciparum*. Embora com baixa letalidade, o *P. vivax* constitui importante causa de morbidade e é responsável por grande número de recaídas nas regiões endêmicas. O *P. falciparum* é a espécie responsável pela maioria dos casos graves e óbitos, é o mais agressivo, pois multiplica-se mais rapidamente, invade e destrói mais hemácias que as outras espécies, dentre as complicações causadas pelo *falciparum*, existe ainda o que se chama de malária cerebral, responsável por cerca de 80% dos casos letais, além de desenvolver com maior frequência resistência às drogas usadas no tratamento da malária (WHO, 2001; BANNISTER e MITCHELL, 2003).

É uma doença infecciosa, que provoca febres e anemias, tornando o organismo debilitado, favorecendo assim outras moléstias, não contagiosa e de transmissão vetorial, apresenta elevada taxa de morbi-mortalidade principalmente em crianças, em adultos sendo debilitante e por vezes fatal, representando, portanto, um problema de saúde pública (SANTOS, 2005)

A malária é uma das principais ameaças em matéria de saúde pública mundial segundo a OMS, registram cerca de 250 milhões de novos casos de malária aguda em todo o mundo, e

quase um milhão de mortes. No Brasil, a região amazônica concentra mais de 99% da transmissão da malária (VALDEZ, 2010),

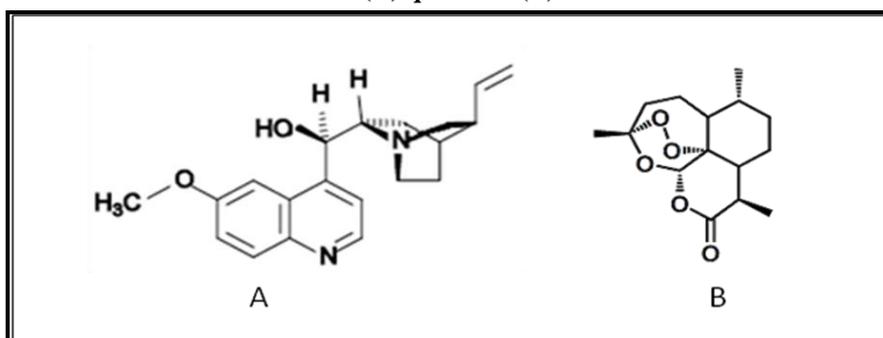
A principal razão para esse grande problema está na resistência do *P.falciparum* aos fármacos existentes, resistência do vetor aos inseticidas, hospedeiro e meio ambiente, que mesmo com avanços científicos e prevenção de epidemias não refletiram em um controle da endemia ao longo dos anos (OLLIARIO, 2001; GUERIN, 2002).

O tratamento da malária é feito utilizando-se quimioterápicos, no Brasil o Ministério da Saúde, disponibiliza gratuitamente os medicamentos antimaláricos utilizados em todo território nacional (BRASIL, 2001), as principais drogas antimaláricas são basicamente derivados da quinina (cloroquina, amodiaquina e mefloquina) e da artemisinina (nos casos resistentes a quinina) durante os sintomas agudos da malária, porém este tratamento é bastante complexo e longo e muitas vezes ineficaz devido a reinfeção do paciente, muito comum nas áreas de incidência da doença (SOARES, 1998).

Devido as dificuldades encontradas durante o tratamento, parte da população utiliza plantas medicinais no tratamento da malária, e algumas plantas já demonstraram o seu potencial para fornecer medicamentos eficazes para o tratamento da malária, quinina (Figura 2) e artemisinina são derivados de plantas. Por essa razão, o interesse em procurar nas plantas novas alternativas terapêuticas com eficácia igual ou maior dos que as já existentes (VALDEZ, 2010).

A quinina foi isolada da casca da *Chinchona officinalis*, ativa contra o *P. falciparum* e *P. vivax*. Já artemisinina (FIGURA 2) provém da planta *Artemisia annu*, desde o seu isolamento e caracterização como antimalárico eficaz, a artemisinina foi base de vários derivados artemisínicos, que são característicos pela sua rápida ação, melhorando o estado febril em menos de 32 horas, quimicamente é lactona sesquiterpênica, com um grupo endoperóxido, essencial para sua atividade antimalárica (CASTELL, 1997; MESHNICK, 1996).

Figura 2: Estruturas dos antimaláricos (A) quinina e (B) artemisinina



2.2.3 Atividade antimicrobiana

Ao longo das últimas décadas, desde a descoberta da penicilinas naturais, os antibióticos foram considerados remédios milagrosos quando o primeiro deles se tornou viável há meio século, o avanço da indústria farmacêutica levou ao surgimento de diversos antibacterianos (CUNICO *et al.*, 2004).

O surgimento de doenças causadas por micro-organismos multirresistentes, para as quais ainda não existe um tipo de tratamento adequado, tem sido um alerta para pesquisadores, e um incentivo para busca de novos agentes terapêuticos para combatê-las (STROBEL e DAISY, 2003)

Apesar de existirem muitos medicamentos disponíveis, provenientes de alguns metabólitos nas plantas, é imprescindível a descoberta de novos compostos bioativos, em virtude do uso indiscriminado de antibióticos e o grande aumento de doenças infecciosas, o que acaba limitando as ações terapêuticas dos compostos. Esses são fatores que reforçam o interesse em pesquisas que visem obter novas drogas com potencial antibacteriano (STROBEL *et al.*, 2004). Muitos produtos naturais vêm sendo isolados, e testados quanto a sua atividade antimicrobiana e apresentam grande potencial medicinal (BEHAL, 2001)

2.2.4 Atividade de toxicidade frente *Artemia salina*

O ensaio com *Artemia salina* é um bioensaio preliminar de atividade de produtos naturais, foi proposto como um substituto, mas barato e simples, para o ensaio de citotoxicidade com células (MEYER *et al.*, 1982). A *A. salina* é um microcrustáceo de água salgada, pertencente ao filo Arthropoda é muito comum o seu uso como alimento para peixes e outros crustáceos (MILHEM *et al.*, 2008).

Esta toxicidade frente a *A. salina* tem demonstrado uma boa correlação com a atividade citotóxica contra tumores humanos (McLAUGHLIN *et al.*, 1991). Extratos de plantas que apresentam toxicidade contra *A. salina* demonstram um futuro potencial para as atividades biológicas.

O uso deste teste é favorecido pelas vantagens que proporciona como: simplicidade no manuseio, a rapidez com que é realizado, baixo custo, pouca quantidade de amostra, além de

ser uma análise preliminar de toxicidade geral, mostrando que é um método útil (LUNA *et al.*, 2005; PARRA *et al.*, 2001)

2.3 A família Picrodendraceae

A família Picrodendraceae é pequena, possuindo apenas 29 gêneros e 100 espécies (SUTTER *et al.*, 2006), nativas de zonas tropicais (figura 3). Sua distribuição é bastante restrita, ocorrendo em vários tipos de vegetação de várzea, florestas secas ou cerrado árido. Ocorre principalmente no Hemisfério Sul e têm como principais representantes os gêneros *Austrobuxus*, *Oldfieldia*, *Pseudanthus*, *Tetracoccus*, *Picrodendron* e *Piranhea* (MOBOT, 2014).

Figura 3: Ocorrência Mundial da Família Picrodendraceae



<http://www.tropicos.org/Name/50168724?tab=maps>

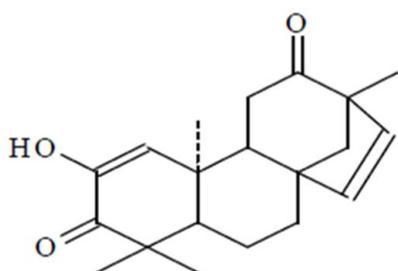
As espécies da família Picrodendraceae fazem parte da família Euphorbiaceae considerada um dos grupos taxonômicos mais complexos e morfológicamente diversos. Estudos baseados em investigações na anatomia das folhas e madeira, e das estruturas do pólen, mostraram que a família Euphorbiaceae não era um grupo monofilético (WURDACK *et al.*, 2004). Foram assim propostas algumas modificações na organização da família Euphorbiaceae, que foi dividida em três novas famílias: Euphorbiaceae, Picrodendraceae e Phyllanthaceae (CHASE, 2002; APG, 2003). A família Picrodendraceae, apresenta os lóculos do ovário biovulados, e o característico pólen espinhoso, o que a diferencia das demais.

No Brasil, é encontrada nos estados do Amapá, Pará, Amazonas, Tocantins, Acre, Rondônia, Maranhão, Bahia e Mato-Grosso, somente dois gêneros são encontrados, o gênero *Piranhea* Baill e o *Podocalyx* Klotzch (SECCO, 2014).

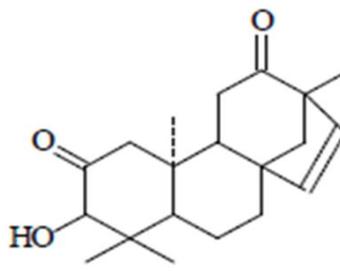
Estudo com algumas espécies da família, mostram a presença da classe dos terpenos como constituintes químicos da família Picrodendraceae, como nos estudos da espécie *Androstachys* (PIACENZA *et al.*, 1979, PIACENZA *et al.*, 1985), *Petalostigma* (GRACE *et al.*, 2006).

Tabela 1: Substâncias isoladas da família Picrodendraceae

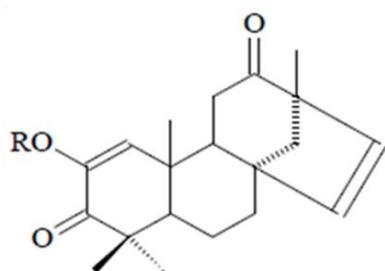
Gênero	Substância	Referência
<i>Androstachys</i>	ent-2-hidroxibeyer-I,15-diene-3,12-diona (1)	PIACENZA, 1979
<i>Androstachys</i>	ent-3 β -hidroxibeyer-15(16)-en-2,12-diona (2)	PIACENZA, 1979
<i>Androstachys</i>	2-acetoxi-1,15-beyeradien- 3,12-diona ; 2-hidroxi-1,15 beyeradiena-3,12-dione (3)	PIACENZA , 1979
<i>Petalostigma</i>	petalostigmona A (4)	GRACE <i>et al.</i> 2006
<i>Petalostigma</i>	petalostigmona B (5)	GRACE <i>et al.</i> 2006
<i>Petalostigma</i>	petalostigmona C (6)	GRACE <i>et al.</i> 2006



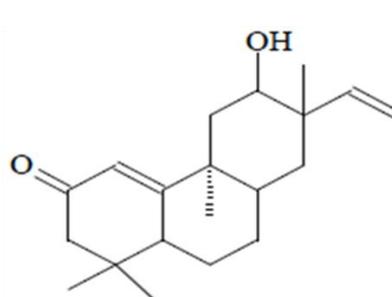
1



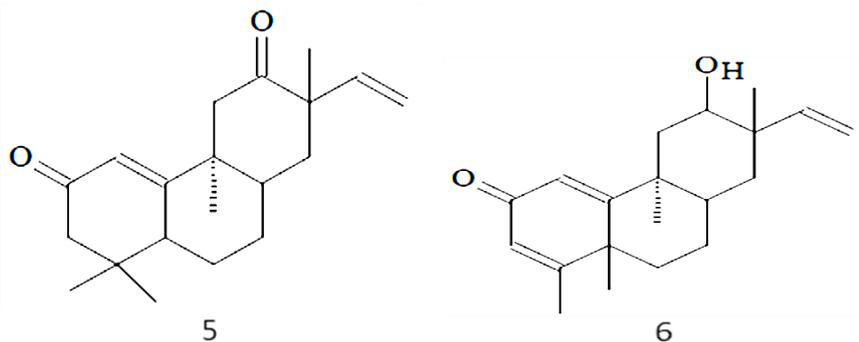
2



3



4



2.4 Gênero *Piranhea*

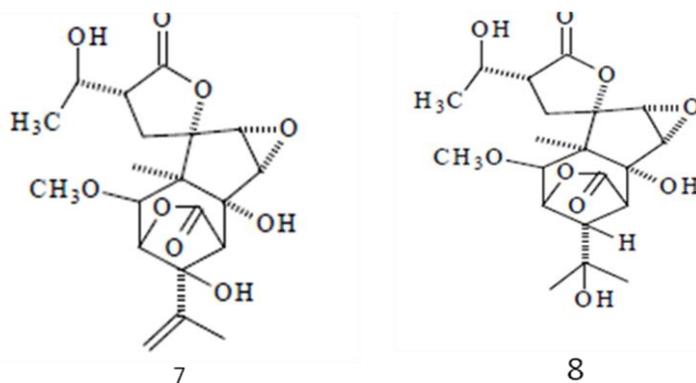
O gênero *Piranhea* possui 4 espécies: *Piranhea longepedunculata*, *Piranhea mexicana*, *Piranhea securinega*, *Piranhea trifoliata* (SECCO e CORDEIRO, 2014).

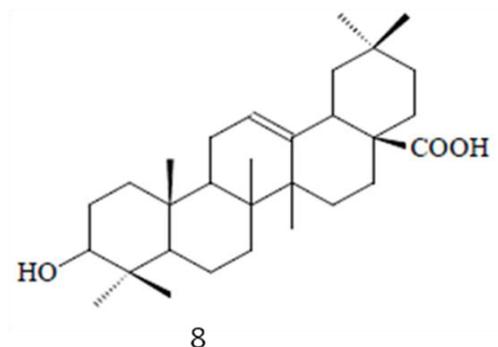
Do gênero *Piranhea*, tem-se estudos fitoquímicos relatados na literatura da espécie *P. mexicana* pela sinonímia *Celaenodendron mexicana*, da qual foram realizados estudos químicos e isolados terpenos, mostraram que esta espécie é utilizada por índios mexicanos como anti-séptico, possui atividade antimalárica, citotóxica e antiprotozoária (KAUR *et al.*, 2009; CASTANIEDA *et al.*, 1993; CAMACHO *et al.*, 2003).

Quimicamente o gênero *Piranhea* é uma fonte promissora de terpenos. Deste modo estudos de novas espécies de *Piranhea* faz-se necessário para a quimiotaxonomia do gênero, do qual se tem poucos estudos.

Tabela 2: Substâncias isoladas da espécie *Celaenodendron mexicana*

Espécie	Substância	Referência
<i>Celaenodendron mexicana</i>	celaenodendrolida I (7)	CASTANIEDA <i>et al.</i> , 1993
<i>Celaenodendron mexicana</i>	picrodendrine E (8)	CASTANIEDA <i>et al.</i> , 1993
<i>Celaenodendron mexicana</i>	ácido oleanólico (9)	KAUR, <i>et al.</i> , 2009





2.5 *Piranhea trifoliata*

Piranhea trifoliata (Figura 4) é uma árvore encontrada na Venezuela, Bolívia e no Brasil, neste sendo encontrada frequentemente nos estados do Amazonas, Pará, Tocantins, Rondônia e Mato Grosso (SECCO e CORDEIRO, 2014; FORZZA, 2010).

Popularmente conhecida como Piranheira, pois seus frutos e sementes alimentam piranhas e outros peixes (FILHO, 2012). É uma árvore grande de até 25 metros de altura e vive mais de 400 anos (WORBES *et al.*, 1992; FILHO, 2012), tem sapopemas na base do seu tronco, sua casca é acinzentada, seus frutos são mamonas triangulares de 1-2 cm e seu grão de pólen apresentam espinhos característicos da família Picrodendraceae (MOURA *et al.*, 2004; FILHO, 2012).

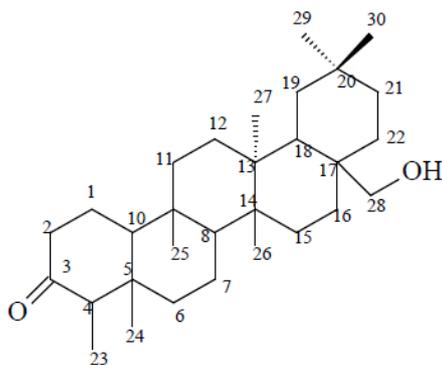
É encontrada nas áreas de várzeas e igapós, possui uma madeira sem cheiro e gosto, é resistente a fungos e insetos. A sua casca é usada como curativo para inflamações no útero em banhos de assento e para chás no tratamento de malária (FILHO, 2012)

Figura 4: Folhas verdes e árvore de *Piranhea trifoliata*



Na literatura foi encontrado apenas um estudo fitoquímico, realizado pelo nosso grupo de pesquisa, das folhas de *P. trifoliata* no qual foi isolado o triterpeno 28-hidroxi-friedelin-3-ona (figura 5) e os seus extratos metanólicos apresentaram atividades antimalárica, antioxidante e antibacteriana (JEFFREYS, 2011).

Figura 5: Triterpeno 28-hidroxi-friedelin-3-ona isolado das folhas de *Piranhea trifoliata*



3 Objetivos

3.1 Geral

- Realizar o estudo químico e avaliar a ação biológica dos extratos, frações e substâncias isoladas dos galhos de *Piranhea trifoliata*.

3.2 Específicos

- Avaliar a atividade antimalárica frente o *Plasmodium falciparum*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana frente as bactérias: *Aeromonas hydrophyla*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella enteritidis*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*;
- Avaliar a atividade de toxicidade frente *Artemia salina*;
- Avaliar a atividade antioxidante utilizando DPPH e Fe^{3+} /fenantrolina como agentes oxidantes;
- Fracionar e purificar as substâncias presentes nos extratos de *P. trifoliata*;
- Identificar ou elucidar a estrutura química das substâncias isoladas através da combinação de métodos espectroscópicos (RMN de ^1H e de ^{13}C , mono e bidimensionais) e outras técnicas que forem necessárias.

4 Material e métodos

4.1 Especificações dos equipamentos e materiais utilizados

- Solventes: foram utilizados solventes (hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol, metanol e água destilada) todos comerciais e de diferentes marcas e todos foram destilados no laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia – INPA.

- Preparação dos extratos: utilizou-se banho de ultra-som (UNIQUE) na preparação dos extratos, e para a evaporação do solvente, utilizou evaporador rotativo a vácuo (FISATOM).

- Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC): utilizaram-se cromatoplas de sílica gel 60, com indicador de fluorescência UV₂₅₄, com 0,20 mm de espessura, em folhas de alumínio (MACHEREY – NAGEL -MN).

- Cromatografia de Adsorção em Coluna Aberta (CA): Sílica Gel 60, 230 – 400 mesh (Merk). As colunas cromatográficas variaram de acordo com a quantidade de amostra, mas as proporções amostra/sílica manteve-se em torno de 1:100.

- Reveladores: foram utilizados os seguintes reveladores, reveladores físicos luz UV (254 e 365 nm), reveladores químicos: iodo ressublimado, sulfato cérico, cloreto férrico, cloreto de alumínio, anisaldeído sulfúrico e Dragendorff, onde a solução reveladora será borrifada sobre a cromatoplasca.

- Métodos Espectroscópicos: Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram obtidos no equipamento Bruker DRX 400 MHz, sendo os espectros obtidos utilizando solvente deuterado com TMS.

- Preparação dos reveladores utilizados na análise de cromatografia em camada delgada:
Solução de sulfato cérico: utilizou-se 4,2 g de sulfato de cério IV que foram solubilizados em 50 mL de água destilada. Após solubilização foi acrescentado 2,8 mL de H₂SO₄ concentrado e submetido a aquecido. Após resfriamento, foi completado com 100 mL de água destilada. Este é um revelador universal, nas cores entre lilás, laranja, vermelho e rosa indicam a presença de terpenos.

- Solução de anisaldeído sulfúrico: foram misturados 0,5 mL de anisaldeído com 10 mL de ácido acético glacial e adicionou-se 85 mL de MeOH e mais 5 mL de H₂SO₄ concentrado. Este é um revelador universal, nas cores como lilás e rosa indicam a presença de terpenos.

- Solução de cloreto de alumínio: foi solubilizado 1 g de cloreto de alumínio em 100 mL de álcool etílico. Para observação após a placa ser borrifada, observa-se no UV 365 nm a intensificação da fluorescência, o que indica a possível presença de flavonoides.

Iodo: para a revelação com iodo foi utilizado iodo ressublimado. O aparecimento de manchas amarelas indica a presença de ligações duplas, após evaporação do iodo as placas podem ser reveladas com outro revelador.

Solução de Dragendorff: prepararam-se duas soluções (I e II). A solução I consistiu em dissolver, sob aquecimento, 0,85 g de nitrato básico de bismuto em 10 mL de ácido acético glacial, após foi adicionada 40 mL de água destilada. A solução II foi preparada dissolvendo-se 8 g de iodeto de potássio em 30 mL de água destilada. Estas duas soluções (I e II) foram reunidas e denominadas de solução estoque. A solução para borrifamento direto nas placas foi preparada misturando-se 10 mL de água destilada e 1 mL da solução estoque com 2 mL de ácido acético glacial. A solução de Dragendorff quando borrifada na placa revela a presença de alcalóides com manchas de cor laranja.

Solução de cloreto férrico: foi solubilizado 3 g de cloreto férrico em 100 mL de álcool etílico. Esta solução revela indícios da presença de compostos fenólicos.

4.2 Coleta do material vegetal e preparo dos extratos

4.2.1 Coleta

O material vegetal foi coletado três vezes. A primeira e a segunda coleta foram realizadas em Altamira, na Volta Grande do Xingu no estado do Pará, sendo coletadas respectivamente em novembro de 2008 e agosto de 2009. A terceira coleta foi realizada no Careiro da Várzea, município do estado do Amazonas em setembro de 2012.

O material coletado (figura 6) foi identificado no herbário da Coordenação de Pesquisa em Botânica do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA.

Figura 6: Coleta do material vegetal



4.2.2 Preparo dos extratos

O material vegetal foi levado ao Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA, os galhos foram secos em estufa a 50 °C por aproximadamente dois dias e posteriormente triturados em moinho de facas para o preparo dos extratos.

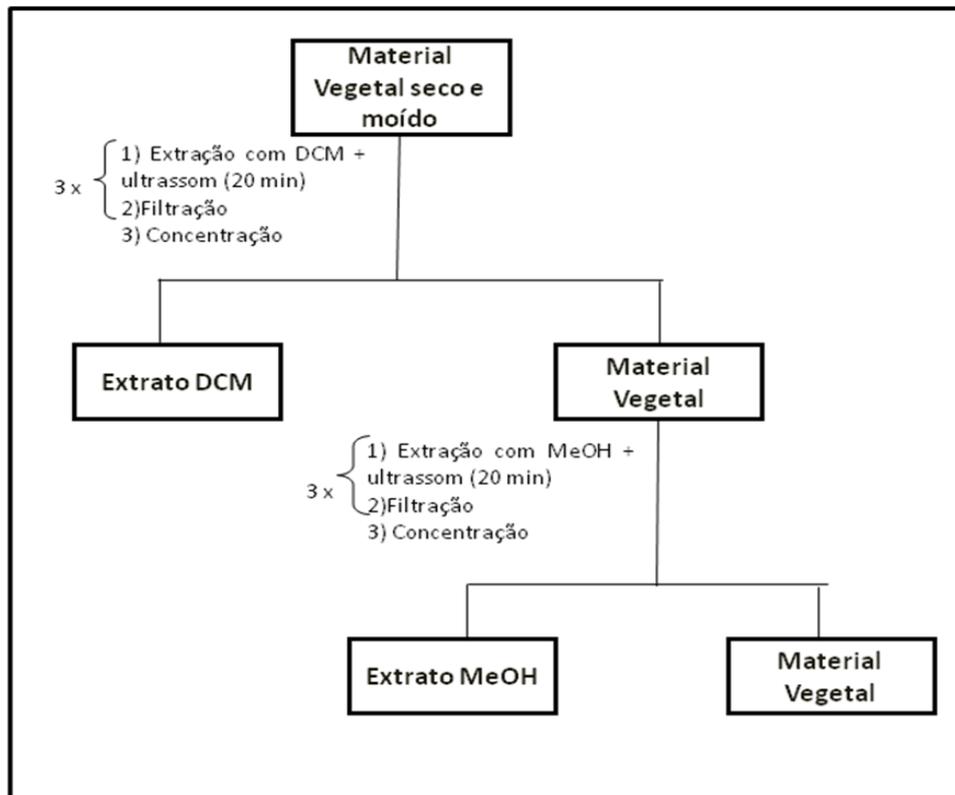
O material seco foi extraído com solventes de polaridade crescente, diclorometano e metanol (DCM e MeOH) (Figura 7). Foram realizadas três extrações utilizando ultrassom por 20 minutos, a cada extração realizada.

Após cada extração, o extrato obtido foi filtrado e seco, utilizando evaporador rotativo, sob pressão reduzida, em temperatura < 50 °C para os extratos DCM e MeOH.

Após as extrações com metanol, o material vegetal foi novamente seco, e reservado para uma posterior extração com água.

Os extratos brutos das três coletas foram comparados por CCDC e por serem distintos não foram reunidos.

Figura 7: Metodologia de preparo dos extratos vegetais.



4.3 Triagem química e biológica

4.3.1 Análise cromatográfica em camada delgada comparativa (CCDC)

Os extratos obtidos foram analisados em cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC), para detecção das classes dos constituintes químicos presentes em cada extrato, as amostras foram solubilizadas em solventes voláteis e aplicadas nas cromatoplasmas na forma de soluções.

A eluição ocorreu em cubas cromatográficas com a fase móvel escolhida sendo sistemas apropriados e de acordo com a sua polaridade.

Após eluição as placas foram reveladas com luz UV (comprimento de onda de 254 e 365 nm) e diversos reagentes químicos tais como: $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ para detecção de terpenos, anisaldeído para detecção de terpenos entre outras classes, FeCl_3 para detecção de substâncias aromáticas, AlCl_3 para confirmar a presença de flavonoides. Assim, conseqüentemente, foi possível estabelecer uma estratégia para a separação e purificação de suas moléculas.

4.3.2 Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada medindo a capacidade de sequestro de radicais livres do radical Fe^{3+} e do DPPH, ao adicionar o provável antioxidante presente nos extratos vegetais, ocorre a perda do radical, que é evidenciada pela redução de absorvância em determinado comprimento de onda, onde as diminuições são correlacionada em uma curva com o antioxidante padrão, o antioxidante padrão escolhido foi o ácido ascórbico por ser biologicamente ativo participando das reações no organismo.

Para a avaliação da atividade antioxidante foi preparada uma solução de DPPH solubilizando 28 mg do DPPH em 1 mL de DCM e adicionando MeOH até atingir o volume de 100 mL. Também foi preparada uma solução do ácido ascórbico com água deionizada a uma concentração de 900 mg/mL a partir da qual foram preparadas diluições resultando nas seguintes concentrações: 0, 90, 180, 360, 540 e 720 $\mu\text{g/mL}$.

Posteriormente foram realizadas as curvas com DPPH, a qual foi feita adicionando em seis novos micro-tubos 990 μL de DPPH e em seguida foram adicionados 10 μL da solução de ácido ascórbico nas diferentes concentrações. Após 30 minutos foi realizada a leitura da absorvância em espectrofotômetro no comprimento de 517 nm.

Após a verificação da curva de calibração e sua linearidade, os experimentos para medir a atividade antioxidante dos extratos foram realizados.

Para realização do teste pesou-se 5,0 mg de cada extrato a ser analisados, as amostras foram preparadas a partir da solubilização dos extratos com o solvente, DCM ou MEOH, após a solubilização as amostras foram avolumadas até 10 mL com MeOH grau HPLC, obtendo a concentração 0,5 mg/mL.

Para o procedimento usando o DPPH como agente oxidante. A reação foi iniciada pela adição de 990 μL da solução de DPPH e 10 μL de amostra (0,5 mg/mL), sendo realizado em triplicata com leituras após 30 minutos, em um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 517 nm. O controle foi preparado de modo semelhante, substituindo a amostra por água deionizada.

Para o procedimento usando o Fe^{3+} como agente oxidante, preparou-se a solução padrão de Fe^{3+} , pesou-se 8,6341 g de sulfato férrico amoniacal ($\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), solubilizou-se e completou-se para um 1L com ácido clorídrico (HCl), para a preparação da solução de 1,10 – fenantrolina 0,25% (m/v), pesou-se 0,25 g de 1,10 – fenantrolina ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e solubilizou-se com solução tampão de acetato de sódio, completou-se o volume para 1000 mL.

Após a preparação das soluções, transferiram-se 10 μL da solução padrão de Fe^{3+} com concentração de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para um micro tubo. Adicionou-se 10 μL da amostra e agitou-se a mistura para homogeneizar. Em seguida adicionou-se 980 μL da solução de fenantrolina. O branco foi preparado de modo semelhante substituindo a amostra por água deionizada. O procedimento foi realizado em triplicata com leituras após uma hora em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 508 nm.

A variação da absorbância dos extratos foi comparada com o ácido ascórbico para a avaliação quantitativa do potencial antioxidante.

4.3.3 Avaliação da atividade antimalárica

Os testes *in vitro* das amostras foram realizados com hemácias infectadas por *P. falciparum*, clone W2, resistente à cloroquina, através do método LDH (Makler *et al.*, 1993).

A incubação parasito - droga foi realizada com 20 μL de cada diluição dos compostos testados colocados em microplacas de 96 poços, em triplicata, onde já se encontravam 180 μL da suspensão de hemácias infectadas (1% hematócrito, 2% de parasitemia), provenientes de

um cultivo mantido no laboratório de Bioensaios. Foram usados controles sem drogas, com hemácias infectadas (controle positivo) ou hemácias não infectadas (controle negativo).

Em seguida as placas foram incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C por 48 h, com amostras e controles. Após esse período as microplacas foram congeladas (-20 °C no mínimo por 24 h), para promover a lise das hemácias.

O lisado celular foi transferido para placas de 96 poços, aos quais foram adicionados 100 µL de reagente Malstat e 25 µL de reagente NBT/PES. Após 1 h de incubação, a absorbância de cada poço das placas foi registrada em espectrofotômetro (540 nm).

Os percentuais de redução do crescimento dos parasitos foram calculados a partir da absorbância.

As amostras foram solubilizadas com DMSO resultando uma solução estoque de cada amostra na concentração de 50 mg/mL.

As amostras foram avaliadas em dois experimentos independentes. As amostras foram testadas em duas concentrações, 25 e 50 µg/mL, cada uma em triplicata, para a avaliação do percentual de redução da parasitemia que foi determinada pelo método do LDH. Aquelas que apresentaram percentual de redução de parasitemia igual ou maior que 50% nas duas concentrações testadas foram selecionadas para determinação das CI₅₀ determinadas em 3 experimentos distintos, em seis diferentes concentrações, com triplicatas de cada concentração.

Os resultados foram avaliados no programa Origin 8.0 com determinação das curvas dose-resposta traçadas com ajuste sigmoidal. Foram determinadas as concentrações inibitórias do crescimento de 50% dos parasitos (CI₅₀) em relação aos controles sem drogas. De acordo com os resultados, as amostras foram classificadas segundo a (tabela 3).

Tabela 3: Classificação da atividade antimalárica

Classificação	Valores de CI₅₀
MUITO ATIVAS	Menor que 1µg/mL
ATIVAS	De 1 até 15µg/mL
MODERADAMENTE ATIVAS	Entre 15,1 e 25 µg/mL
POUCO ATIVAS	Entre 25,1 e 50 µg/mL
INATIVAS	Maior que 50 µg/mL

Após a realização da avaliação da atividade antimalárica, amostras consideradas ativas no teste antimalárico, foram submetidas ao ensaio de citotoxicidade *in vitro* na linhagem celular HepG2 A16, derivada de um hepatoblastoma primário humano.

Primeiramente as células derivadas da linhagem celular HepG2 foram distribuídas em microplacas de 96 poços (4×10^5 células/100 μ L por poço) e incubadas em estufa de CO₂ à 37 °C por 24 h para a adesão das células à placa.

Em seguida foram adicionados 100 μ L de meio completo contendo diferentes concentrações dos extratos testados em triplicata. As placas foram incubadas por mais 24h.

Ao final deste período, foram adicionados 18 μ L/poço de uma solução brometo 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), na concentração de 20 mg/ml. Após 1 h e 30 minutos a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 492 nm.

A dose letal mínima que inibe em 50% o crescimento das células na presença dos extratos testes e de antimaláricos controles será determinada em comparação com células cultivadas sem a presença de compostos, considerada 100% de crescimento.

Os resultados foram avaliados no programa Origin 8.0 com determinação das curvas dose-resposta traçadas com ajuste sigmoideal. Foram determinadas as concentrações citotóxicas que inibem em 50% o crescimento das células (CC₅₀) em relação aos controles sem drogas.

Para as amostras consideradas ativas foi calculado o índice de seletividade que é dado pela razão entre o valor obtido de CC₅₀ para células HepG2 e o valor de CI₅₀ para *P. falciparum*. Por meio do índice de seletividade é possível inferir se a amostra possui um efeito direcionado apenas ao parasito ou se sua ação ocorre devido a sua toxicidade para quaisquer tipos celulares.

4.3.4 Avaliação da atividade antimicrobiana

4.3.4.1 Bactérias testadas

Para os ensaios antibacterianos foram utilizadas bactérias gram-positivas e gram-negativas de interesse clínico.

Para a realização dos ensaios foram utilizadas as seguintes bactérias:

1. *Aeromonas hydrophyla*
2. *Bacillus cereus*
3. *Escherichia coli*
4. *Klebsiella pneumoniae*
5. *Pseudomonas fluorescens*
6. *Salmonella enteritidis*
7. *Serratia marcescens*

8. *Staphylococcus aureus*

4.3.4.2 Método de difusão em Agar- difusão em poço

Os testes de difusão em Agar serão realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (2003)

No qual o teste foi realizado em três partes:

4.3.4.2.1 Preparação do inóculo

O método de crescimento das bactérias foi realizado da seguinte forma:

Os microrganismos testes estocados em um meio Agar definitivo, foram repicados em 10 mL de caldo Mueller-Hinton ou solução salina, posteriormente a suspensão foi incubada durante um período de 16 a 24 horas, para a reativação.

Após turvação do caldo Mueller-Hinton (MH), foram preparadas as suspensões bacterianas, Ajustando-se a turbidez da cultura em caldo em crescimento ativo com solução salina estéril ou caldo, de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão McFarland de 0,5. Isso resultou numa suspensão contendo aproximadamente de 1 a 2×10^8 UFC/mL. Para realizar essa operação corretamente, foram comparados o tubo de inóculo e a solução padrão McFarland de 0,5 contra um cartão de fundo branco e linhas contrastantes pretas.

4.3.4.2.2 Inoculação das placas teste

Em placas de Petri esterilizadas, foram adicionados 20,0 mL de Agar MH. Após a solidificação, confeccionaram-se poços/orifícios de 6,0 mm de diâmetro em pontos equidistantes, em seguida a superfície seca da placa de Agar MH foi inoculada esfregando o swab contendo o inóculo, em toda a superfície estéril do Agar. Esse procedimento foi repetido esfregando outras duas vezes, girando a placa aproximadamente 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo, após inoculação acrescentou-se em cada poço 50 μ L do extrato a ser testado.

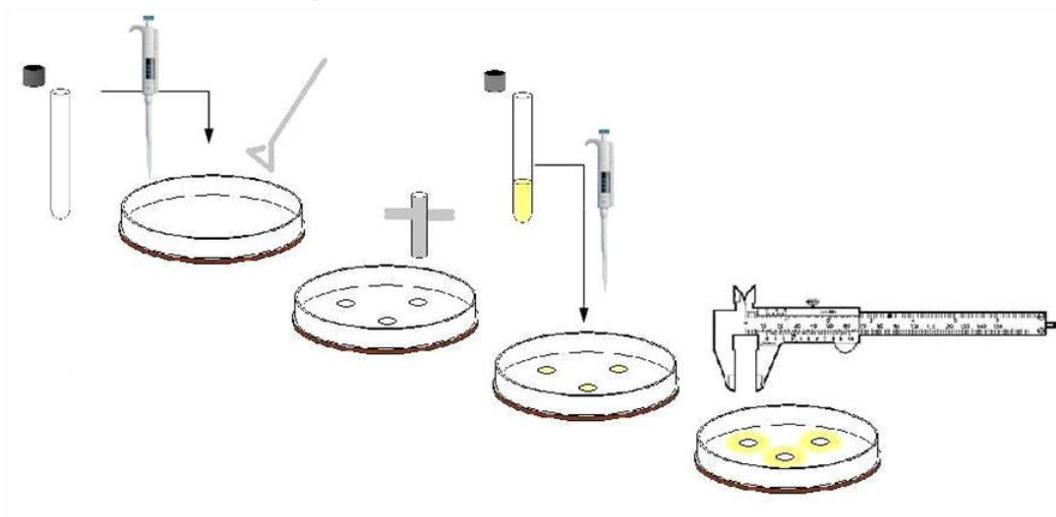
Após um período de pré-incubação de 2 h à temperatura ambiente, que permite a difusão dos extratos antes do início do desenvolvimento dos microrganismos, as placas foram incubadas em aerobiose a 30 ou 37 °C por 24 h.

4.3.4.2.3 Leitura das placas e interpretação dos resultados

Após 24 horas de incubação, cada placa foi examinada e foram observados os halos de inibição resultantes os quais devem ser uniformemente circulares e haver um tapete confluyente de crescimento (figura 8).

Os diâmetros dos halos de inibição total (julgadas a olho nu) foram mensurados, incluindo o diâmetro do poço. Os halos foram medidos em milímetros usando uma régua, que é encostada na parte detrás da placa de Petri invertida. O halo de inibição foi considerado a área sem crescimento detectável a olho nu. O crescimento de pequenas colônias, detectável apenas com lente de aumento, na margem do halo de inibição do crescimento deve ser ignorado.

Figura 8: Ensaio de difusão em Agar



4.3.5 Avaliação da atividade de toxicidade frente *Artemia salina*

Para a realização do teste de toxicidade frente à *A. salina*, primeiramente preparou-se uma solução salina de concentração de 38 g/L (3,8%) com pH entre 8 e 9, temperatura entre 24 e 26 °C e sob iluminação artificial, adicionou-se a esta solução para a eclosão das larvas 10 mg de ovos de *A. salina* para eclodir por um período de 48 horas.

Após as 48 h, foram adicionados a placas de 24 poços os 100 µL dos extratos (Figura 9) a serem testados com concentrações que variam de 1000 a 30 µg/mL (Figura 10) e avolumou-se para 2 mL com o solvente utilizado como controle (DMSO). Posteriormente

foram adicionados os micro-crustáceos (10 indivíduos por poço) em triplicata por concentração testada.

Após 24 horas a uma temperatura entre 24 a 26°C e iluminação artificial, contou-se o número total de indivíduos mortos por experimento (em triplicata), utilizando solução de dicromato de potássio como controle positivo, e como controle negativo, utilizou-se dois mL de água do mar sintética. Caso o extrato consiga matar acima de 50% testa-se em variadas concentrações, a fim de encontrar a CL_{50} .

Figura 9: Ensaio de toxicidade

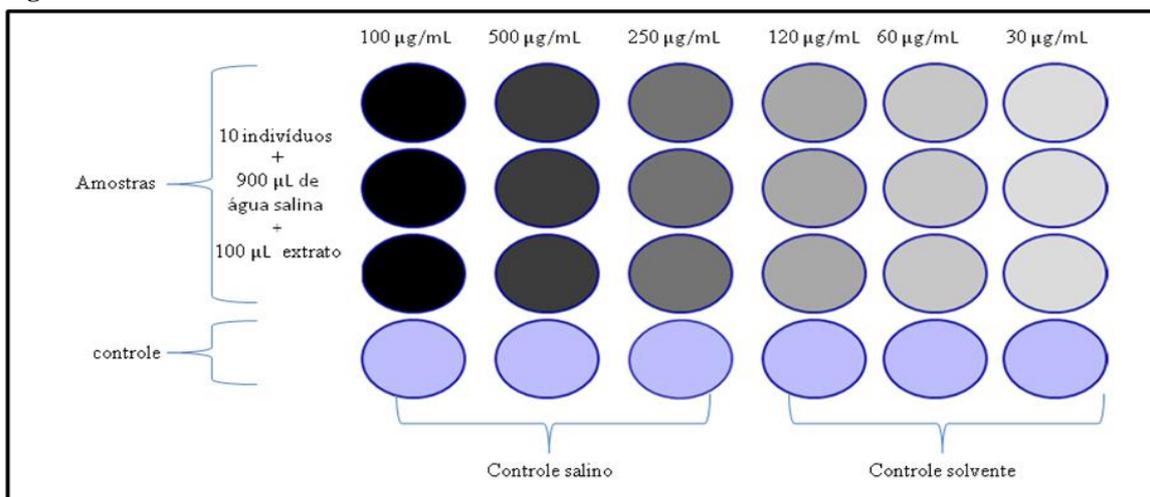
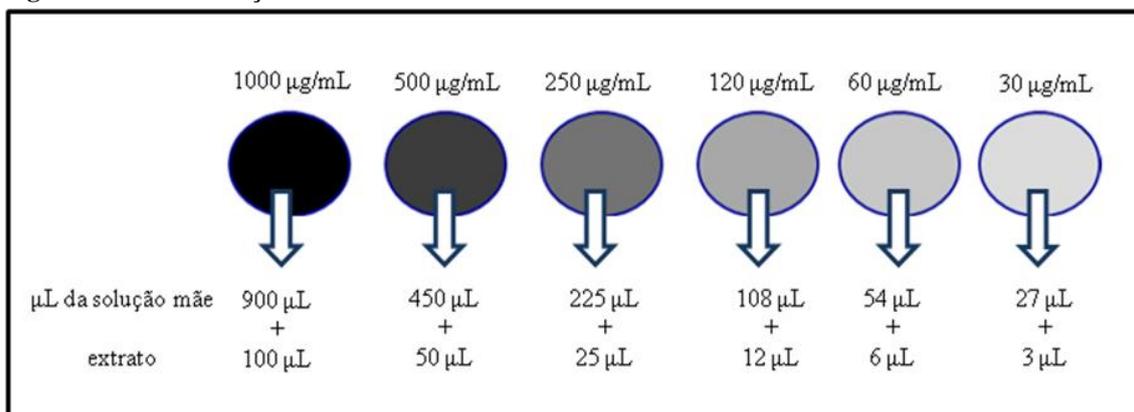


Figura 10: Concentrações utilizadas do ensaio de toxicidade



4.4 Fracionamento cromatográfico

Os extratos fracionados foram os metanólico da 1ª coleta e diclorometânico e metanólico da 2ª coleta, pois mostraram-se mais interessantes biologicamente e

quimicamente. O fracionamento foi monitorado por CCDC e revelados com reveladores físicos e químicos.

4.4.1 Estudo fitoquímico do extrato diclorometânico dos galhos de *P. trifoliata* da segunda coleta

Uma alíquota (5g) do extrato diclorometânico dos galhos da segunda coleta (2GDCCM) foi fracionada em coluna filtrante, utilizando sílica gel como fase estacionária e os gradientes diclorometano (DCM) 100%, acetato de etila (AcOEt) 100% e Metanol (MeOH) 100% como fase móvel. Dessa coluna foram obtidas três frações.

Após análises em CCDC as frações 1 e 2, por apresentarem semelhança quimicamente foram agrupadas.

A fração 1-2 (3,5 g) foi fracionada em coluna aberta (h x Ø = 44 x 2,5 cm) utilizando sílica gel 60 (120 g) como fase estacionária e eluída com misturas dos solventes, hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) (tabela 4) e utilizando um volume de 500 mL para cada mistura de gradiente.

Foram obtidas 102 frações em um volume de 100 mL a cada fração coletada.

Tabela 4: Eluentes utilizados no fracionamento da fração 1-2

Frações	Eluentes
1 – 5	HEX 100%
6 – 12	Hex/DCM 9:1
13 – 17	Hex/DCM 8:2
18 – 22	Hex/DCM 7:3
23 – 28	Hex/DCM 6:4
28 – 36	Hex/DCM 1:1
37 – 44	DCM 100%
45 – 52	DCM/AcOEt 9:1
53 – 60	DCM/AcOEt 8:2
61 – 67	DCM/AcOEt 7:3
68 – 75	DCM/AcOEt 6:4
76 – 78	DCM/AcOEt 1:1
79 – 82	AcOEt 100%
83 – 85	AcOEt/MeOH 9:1

86 – 92	AcOEt/MeOH 7:3
93 – 96	AcOEt/MeOH 1:1
97 – 102	MeOH 100%

Após análises em CCDC as frações que apresentaram semelhança foram reunidas, resultando em 34 frações.

A fração denominada 21 (45,7 mg) foi escolhida para continuar o fracionamento por apresentar poucas manchas e com características terpênicas quando reveladas com $Ce(SO_4)_2$, pois revelava com uma coloração vermelha, esta foi fracionada utilizando coluna cromatográfica aberta ($h \times \varnothing = 10,5 \times 1,5$ cm) de sílica gel 60 (7 g) e eluída com misturas dos solventes, HEX, AcOEt e MeOH com volume de 40 mL por mistura de gradiente utilizada (Tabela 5). Ao qual foram coletadas 44 frações com volumes variando entre 20 e 30 mL.

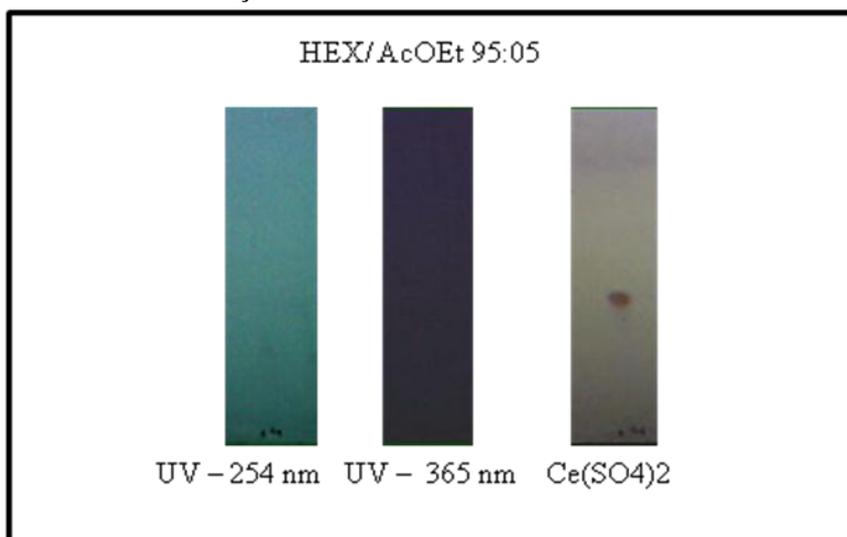
Tabela 5: Eluentes utilizados no fracionamento da fração 21

Frações	Eluentes
1 – 7	HEX 100%
8 – 15	Hex/AcOET 95:05
16 – 21	Hex/AcOET 9:1
22 – 26	Hex/AcOET 8:2
27 – 30	Hex/AcOET 7:3
31 – 34	Hex/AcOET 6:4
35 – 36	Hex/AcOET 1:1
37 – 38	AcEOt 100%
39 – 41	AcEOt/MeOH 7:3
42 – 44	MeOH 100%

As 44 frações foram submetidas à cromatografia em camada delgada comparativa e reunidas posteriormente em 10 frações.

A fração 13 (6,7 mg) apresentou um grau de pureza quando analisada por CCDC, (Figura 11), após ser analisada por Ressonância Magnética Nuclear de 1H e de ^{13}C , foi confirmada que estava pura, resultando na substância 1(cristais brancos).

Figura 11: Análise em CCDC da fração 13



Foi realizado também o fracionamento da fração 22–23 (71,7 mg) por também apresentar características terpênicas quando analisadas em CCDC, esta foi fracionada utilizando coluna cromatográfica aberta ($h \times \varnothing = 23,5 \times 1,0$ cm) de sílica gel 60 (8,5 g) e eluída com misturas dos solventes, HEX, AcOEt e MeOH (tabela 6) com volume de 50 mL por misturas de gradiente. Ao qual foram coletadas 72 frações com volume de 30 mL.

Tabela 6: Eluentes utilizados no fracionamento da fração 22-23

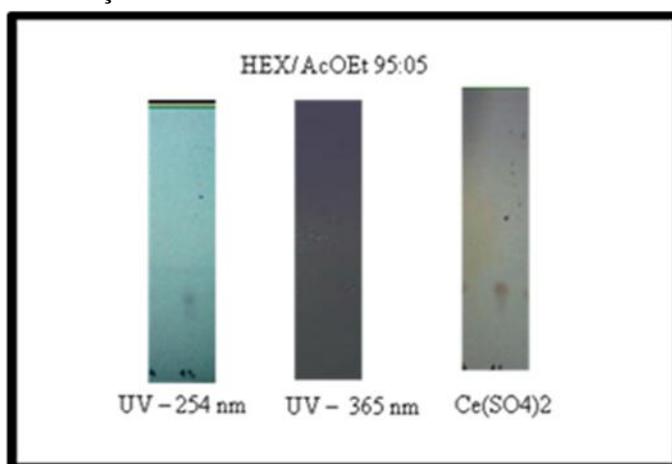
Frações	Eluentes
1 – 8	HEX 100%
9 – 16	Hex/AcOET 95:05
17 – 27	Hex/AcOET 9:1
28 – 33	Hex/AcOET 85:15
34 – 38	Hex/AcOET 8:2
39 – 44	Hex/AcOET 7:3
45 – 50	Hex/AcOET 6:4
51 – 55	Hex/AcOET 1:1
56 – 62	AcEOt 100%
63 – 66	AcEOt/MeOH 8:2
67 – 69	AcEOt/MeOH 6:4
70 – 72	MeOH 100%

As 72 frações foram submetidas à cromatografia em camada delgada comparativa e reunidas posteriormente em 15 frações.

A fração denominada 14-18 (7,7 mg) apresentou um grau de pureza quando analisada

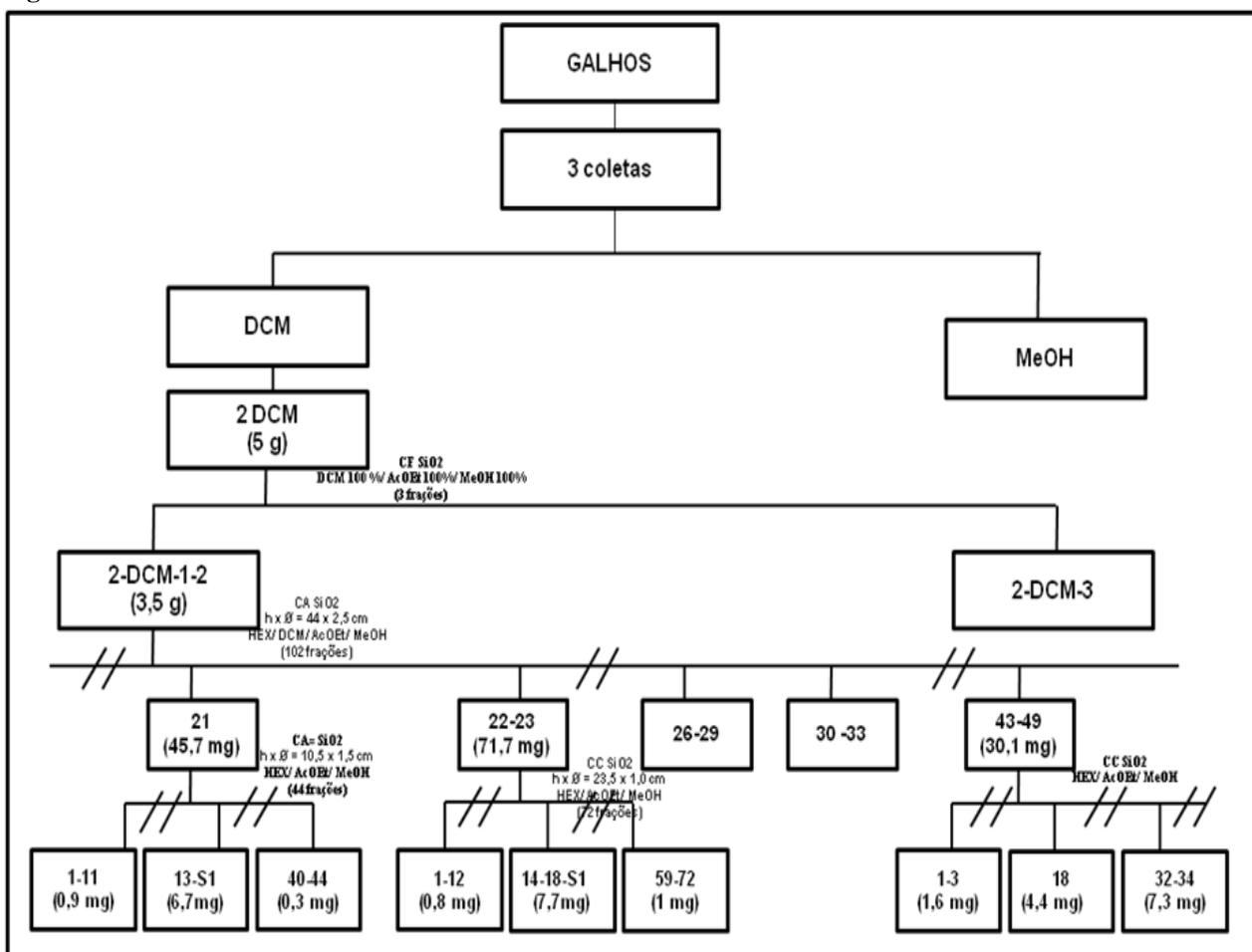
por CCDC, (Figura 12), após ser analisada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C , foi confirmada que estava pura, e após comparados os espectros de RMN foi observado novamente que era a substância 1 (cristais brancos).

Figura 12: Análise em CCDC da fração 14-18



Foram realizadas outras colunas cromatográficas (figura 13) mais não foi possível obter substâncias puras devido às frações apresentarem pouca massa e grande quantidade de substância em mistura.

Figura 13: Fracionamento do extrato DCM da 1ª coleta



4.4.2 Partição líquido-líquido dos extratos metanólicos dos galhos de *p. Trifoliata*.

Após a análise em cromatografia em camada delgada, os extratos metanólicos das três coletas foram submetidos à partição líquido-líquido.

Para tal procedimento, o extrato é solubilizado em MeOH/H₂O na proporção 1:9 e extraído três vezes, com DCM, e depois com AcEOt. Resultando em três fases, a fase do diclorometano (F-DCM), fase do acetato de etila (F-AcOEt) e a fase hidroalcoólica (F-H-MeOH).

Para a realização das partições, devido a capacidade do funil de separação seguiu-se os seguintes procedimentos para cada extrato, foi utilizada 5g dos extratos que foram solubilizados primeiramente com 25 mL de MeOH e 225 mL de água destilada, fornecendo a proporção 9:1 MeOH/H₂O, após a solubilização de cada extrato, foram transferidos para um funil de separação, respectivamente primeira coleta funil 1, segunda coleta funil 2 e terceira coleta funil 3, após essa transferência foi acrescentado 250 mL de DCM.

O funil foi agitado e deixado em repouso por alguns minutos até que se obteve a formação de duas fases, retirou-se a F-DCM, o procedimento foi realizado três vezes para todos as três coletas.

A fase hidroalcoólica foi novamente submetida a partição com 250 mL de AcOEt, sendo também o funil de separação agitado e colocado em seguida em repouso para a separação das fases, após a separação retirou-se a F-H-MeOH e a F-AcOEt, resultando assim nas três fases das partições que foram secas em evaporador rotativo e analisadas em CCDC para um posterior fracionamento. A (tabela 7), mostra as massas dos extratos metanólicos que foram submetidas a partições sucessivamente, para um maior rendimento das fases.

Tabela 7: Massas dos extratos submetidas à partição

Extrato	Massas Extratos	Fase DCM (g)	Fase AcOEt (g)	Fase H-MeOH (g)
1	25,0	2,65	7,43	5,43
2	130,0	12,16	55,55	*FS
3	5,0	0,15	0,54	2,1

*FS= fase secando

4.4.3 Estudo fitoquímico da fase diclorometânica do extrato metanólico da primeira coleta

Uma alíquota (2,41 g) da fase diclorometânica do extrato metanólico dos galhos 1ª coleta foi fracionada em coluna aberta (h x Ø = 57 x 3,5 cm) utilizando sílica gel 60 (170 g) como fase estacionária e eluída com misturas dos solventes, HEX, DCM, AcOEt e MeOH (tabela 7) volume de 400 mL para cada mistura de gradiente.

Foram obtidas 85 frações em um volume de 100 mL a cada fração coletada.

Tabela 8: Eluentes utilizados no fracionamento da fase DCM da 1ª coleta

Frações	Eluentes
1 – 2	HEX/DCM 7:3
3 – 4	HEX/DCM 6:4
5 – 6	HEX/DCM 1:1
7 – 13	DCM 100%
14 – 21	DCM/AcOET 9:1
22 – 27	DCM/AcOET 8:2
28 – 32	DCM/AcOET 7:3
33 – 38	DCM/AcOET 6:4
39 – 45	DCM/AcOET 1:1
46 – 55	AcOEt 100%
56 – 64	AcOEt/ ACETONA 9:1
65 – 72	AcOEt/ ACETONA 7:3
73 – 76	ACETONA 100%
77 – 78	ACETONA/MeOH 8:2
79 – 82	ACETONA/MeOH 6:4
83 – 85	MeOH 100%

As 85 frações foram submetidas à cromatografia em camada delgada comparativa e reunidas posteriormente em 16 frações (Figura 14 e Figura 15)

Figura 14: Análise em CCDC das frações 26 a 30 da F-DCM do extrato metanólico da 1ª coleta

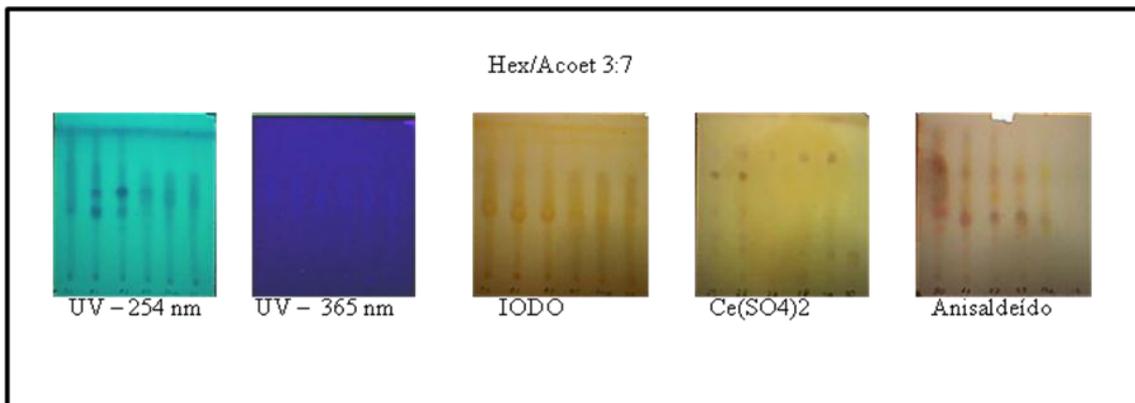
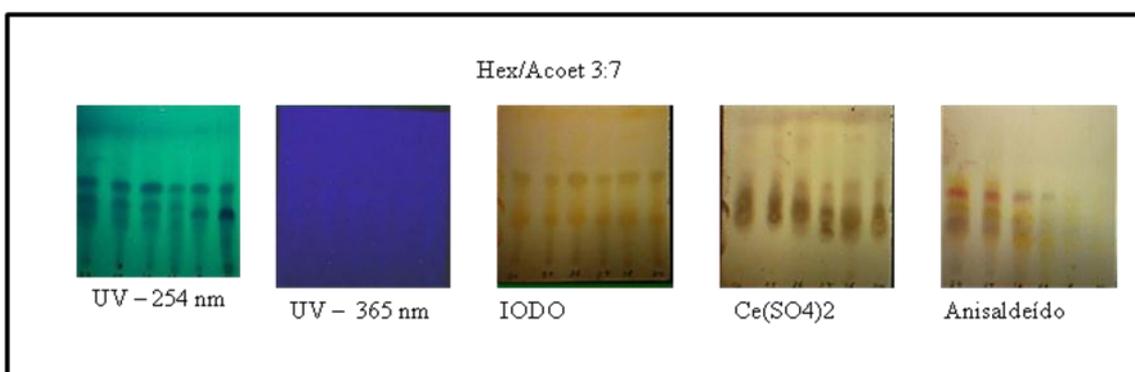
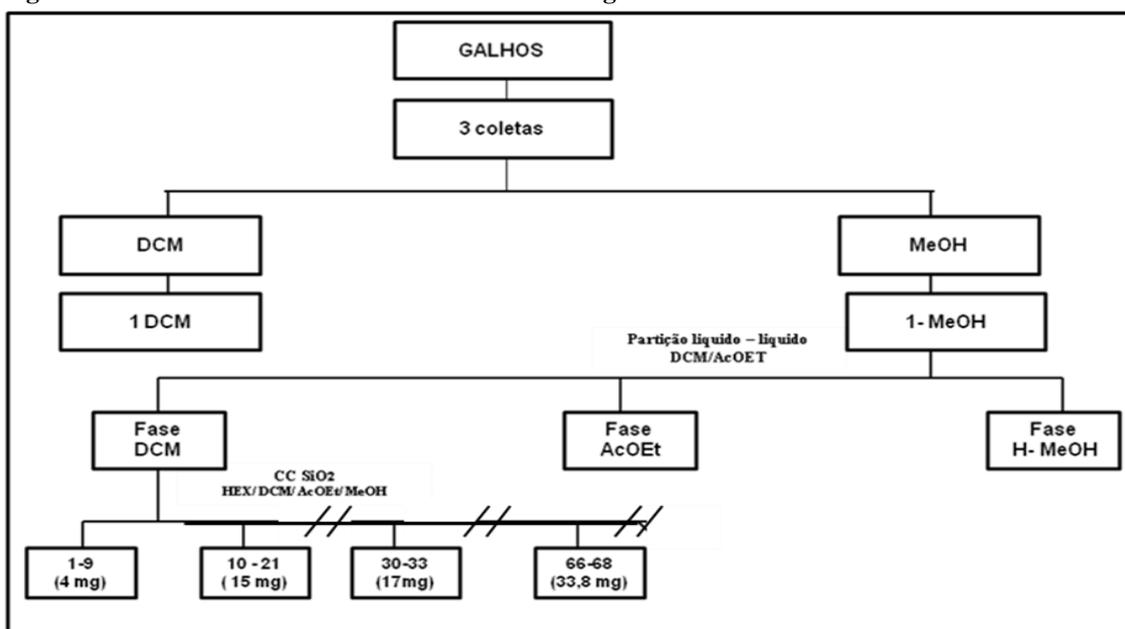


Figura 15: Análise em CCDC das frações 31 a 36 da F - DCM do extrato metanólico da 1ª coleta



Não foi possível continuar o fracionamento (figura 16) devido às frações apresentarem pouca massa e grande quantidade de substância em mistura.

Figura 16: fracionamento do extrato metanólico dos galhos da 1ª coleta



4.4.4 Estudo fitoquímico da fase diclorometânica do extrato metanólico da segunda coleta

Uma alíquota (10,58 g) da fase diclorometânica do extrato metanólico da 2ª coleta (2GMeOH) foi fracionada em coluna aberta ($h \times \varnothing = 57,0 \times 3,5$ cm) utilizando sílica gel 60 (200 g) como fase estacionária e eluída com misturas dos solventes, HEX, DCM, AcOEt e MeOH com volume de 800 mL para cada mistura de gradiente (tabela 9).

Foram obtidas 74 frações em um volume de 250 mL a cada fração coletada.

Tabela 9: Eluentes utilizados no fracionamento da fase DCM da 2ª coleta

Frações	Eluentes
1 – 4	Hex/DCM 1:1
5 – 8	Hex/DCM 4:6
9 – 11	Hex/DCM 3:7
12 – 15	Hex/DCM 2:8
16 – 19	Hex/DCM 1:9
20 – 22	DCM 100%
23 – 26	DCM/AcOEt 9:1
27 – 30	DCM/AcOEt 8:2
31 – 33	DCM/AcOEt 7:3
34 – 37	DCM/AcOEt 6:4
38 – 41	DCM/AcOEt 1:1
42 – 45	DCM/AcOEt 4:6
46 – 48	DCM/AcOEt 2:8
49 – 51	AcOEt 100%
52 – 55	AcOEt/MeOH 9:1
56 – 58	AcOEt/MeOH 8:2
59 – 62	AcOEt/MeOH 7:3
63 – 65	AcOEt/MeOH 6:4
66 – 68	AcOEt/MeOH 1:1
69 – 71	AcOEt/MeOH 3:7
71 – 74	MeOH 100%

Após análises em CCDC das 74 amostras, as frações que apresentaram semelhança

foram reunidas, resultando em 9 frações.

A fração denominada 7 - 12 (121,9 mg) foi escolhida para continuar o fracionamento por apresentar poucas manchas, esta foi fracionada utilizando coluna cromatográfica aberta ($h \times \varnothing = 33,0 \times 1,5 \text{ cm}$) de sílica gel 60 (20 g) e eluída com misturas dos solventes, HEX, AcOEt e MeOH com volume de 80 mL por mistura de gradiente utilizada (Tabela 10).

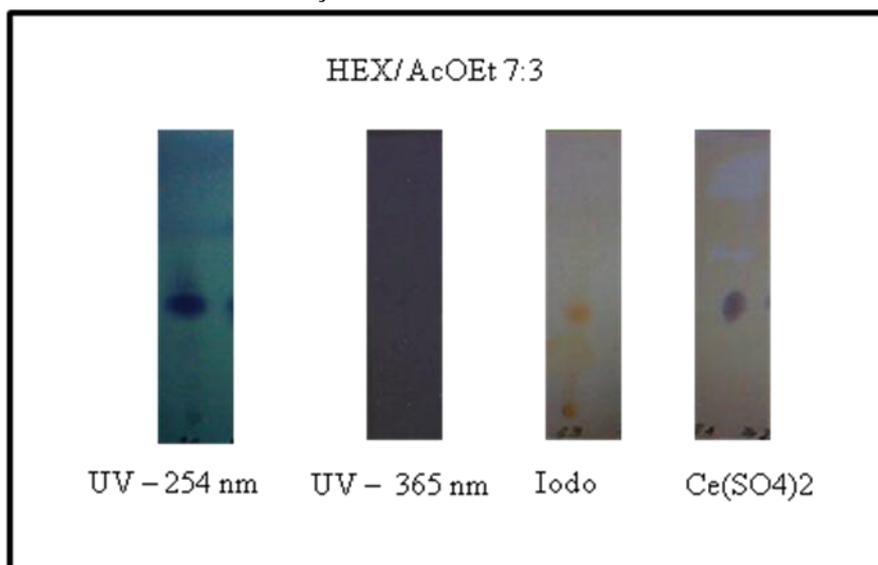
Ao qual foram coletadas 46 frações com volumes variando entre 25 e 30 mL.

Tabela 10: Eluentes utilizados no fracionamento da fração 7 - 12

Frações	Eluentes
1 - 5	HEX 100%
6 - 19	Hex/AcOET 95:05
19 - 24	Hex/AcOET 9:1
25 - 28	Hex/AcOET 8:2
29 - 33	Hex/AcOET 7:3
34 - 38	Hex/AcOET 6:4
39 - 41	AcEOt 100%
42 - 45	AcEOt/MeOH 9:1
46	MeOH 100%

A fração 31 - 32 (2,2 mg) apresentou um grau de pureza quando analisada por CCDC, (Figura 17), após ser analisada por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C , foi confirmada que estava pura, resultando na substância 2 (cristais brancos).

Figura 17: análise em CCDC da fração 31-32



Após análises em CCDC das 46 amostras, as frações que apresentaram semelhança

foram reunidas, resultando em 11 frações.

A fração denominada 14 – 22 (44,9 mg) foi fracionada novamente, por apresentar poucas manchas e com características terpênicas quando reveladas com $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, pois revelava com uma coloração vermelha e em anisaldeído com coloração lilás característica de terpenos, esta foi fracionada utilizando coluna cromatográfica aberta ($h \times \varnothing = 25,5 \times 1,0 \text{ cm}$) de sílica gel 60 (7,41 g) e eluída isocraticamente com mistura dos solventes, DCM, ACETONA com gradiente na proporção de 99: 1 com um volume de 100 mL para o gradiente utilizado (tabela 11). Ao qual foram coletadas 17 frações com volumes de 15 mL.

Tabela 11: Eluentes utilizados no fracionamento da fração 14 – 22

Frações	Eluentes
1 – 17	DCM / ACETONA 99: 1

A fração 7 (2 mg) apresentou um grau de pureza quando analisada por CCDC, e quando reveladas com $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ apresentou características terpênicas esta amostra foi enviada para análise por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C .

A fração 8 – 10 apresentou um grau de pureza quando analisada por CCDC, e quando reveladas com $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ apresentou características terpênicas esta amostra foi enviada para análise por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C .

A fração 32 – 62 (5,6 g) da coluna mãe da fase DCM, foi escolhida para continuar o fracionamento, utilizando coluna cromatográfica aberta ($h \times \varnothing = 62,5 \times 3,0 \text{ cm}$) de sílica gel 60 (250 g) e eluída com misturas dos solventes, HEX, AcOEt e MeOH com volume de 600 mL por mistura de gradiente utilizada (Tabela 12).

Tabela 12: Eluentes utilizados no fracionamento da fração 32 – 62

Frações	Eluentes
1 - 5	Hex/AcOET 9:1
6 – 10	Hex/AcOET 8:2
11 – 15	Hex/AcOET 7:3
16 – 19	Hex/AcOET 6:4
20 – 25	Hex/AcOET 1:1
26 – 30	Hex/AcOEt 4:6
31 – 36	Hex/AcOEt 3:7
37 – 42	Hex/AcOEt 2:8
43 – 47	Hex/AcOEt 1:9

48 – 52	AcEOt 100%
53 – 57	AcEOt/MeOH 9:1
58 – 63	AcEOt/MeOH 8:2
64 – 68	AcEOt/MeOH 6:4
69 – 73	AcEOt/MeOH 1:1
74 - 79	MeOH 100%

Foram coletadas 79 frações com volumes de 150 mL. As frações estão sendo analisadas por CCDC (Figura 18), para um posterior fracionamento (Figura 19) das amostras que mostrarem-se interessantes quimicamente.

Figura 18: Análise em CCDC das frações 26 a 30 da Fase DCM do extrato metanólico da 2ª coleta

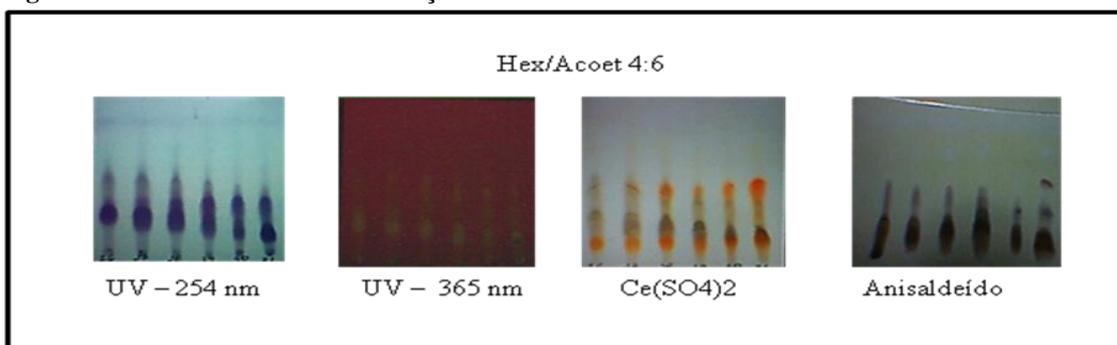
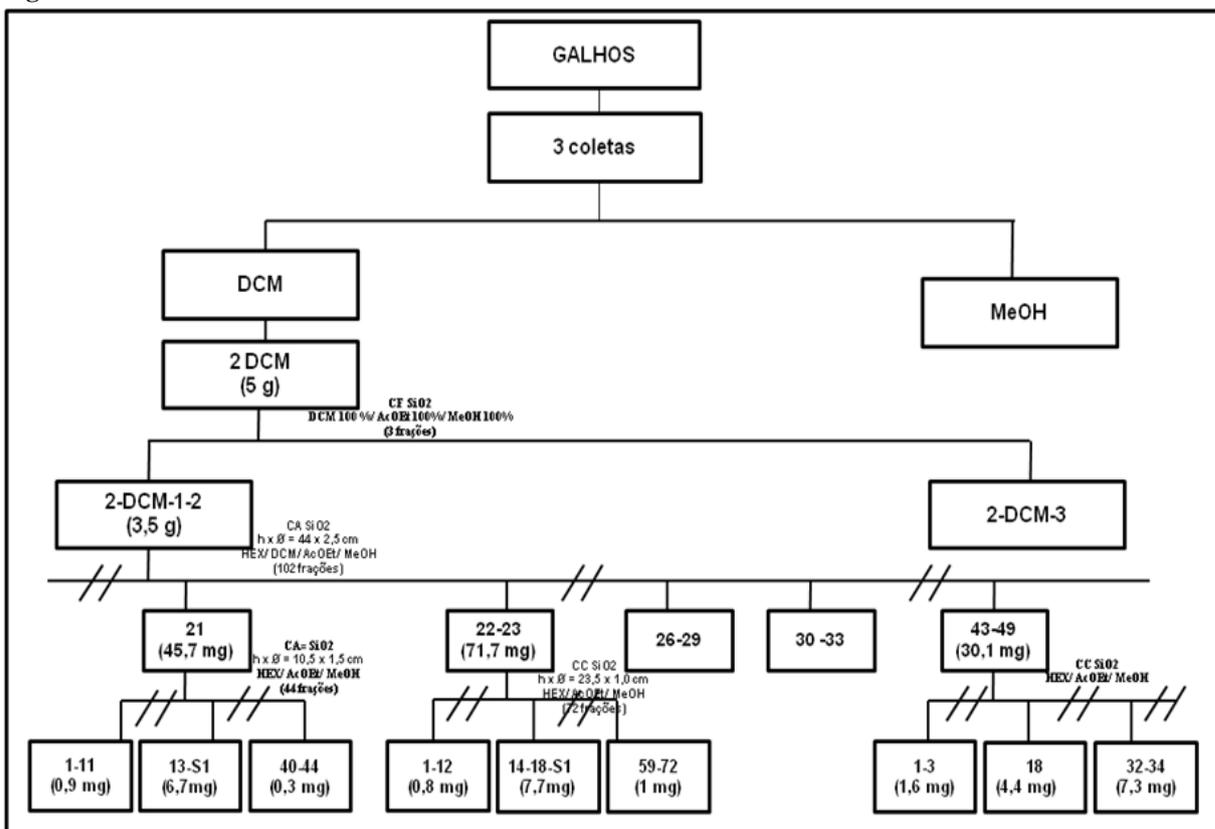


Figura 19: Fracionamento do extrato metanólico da 2ª coleta



5 Resultados e discussão

5.1 Rendimentos dos extratos brutos

Dos extratos obtidos, foi observado que os metanólicos para as três coletas foram os que apresentaram uma maior porcentagem de rendimento (tabela 13), destacando-se principalmente a 1ª e a 3ª coleta com rendimentos acima de 5%, já os extratos diclorometânicos obtiveram rendimentos inferiores a 1%, já para os extratos aquosos, não foram preparados.

Tabela 13: Massas dos extratos obtidas dos galhos de *Piranhea trifoliata*

Coleta	Solvente	Material vegetal (g)	Massa extrato (g)	Rendimento (%)
1	DCM	4225,0	24,11	0,57
1	MeOH	3973,67	206,19	5,18
2	DCM	4800,84	10,09	0,21
2	MeOH	5378,86	264,82	4,92
3	DCM	400	3,56	0,89
3	MeOH	400	21,86	5,46

5.2 Triagem química e biológica

5.2.1 Cromatografia em camada delgada comparativa

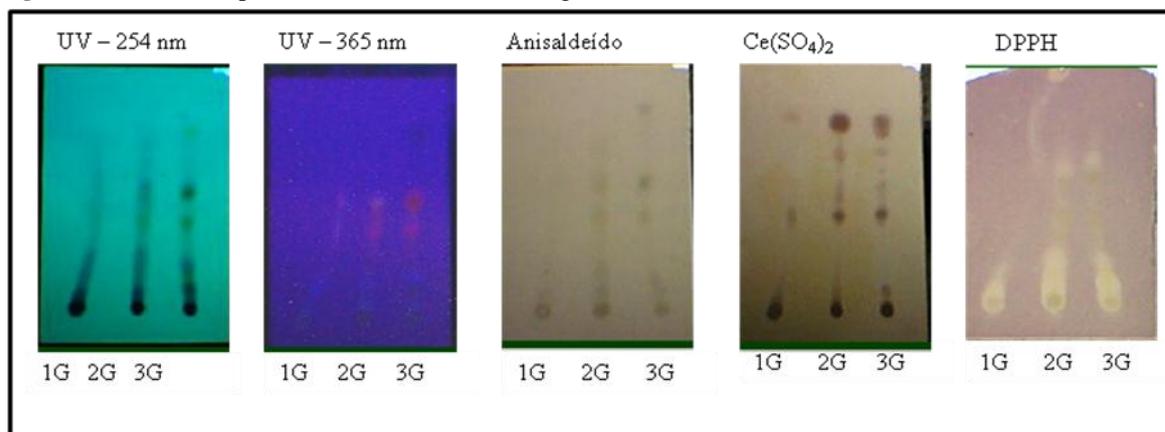
Os extratos das três coletas de *Piranhea trifoliata* foram analisados por CCDC com o objetivo de averiguar a complexidade química dos extratos.

Os extratos DCM da 1ª, 2ª e 3ª coleta foram submetidos a análise por CCDC revelados com alguns reveladores químicos e físicos, para detecção das classes dos constituintes químicos presentes em cada extrato. O eluente utilizado para as três coletas foi o Hex/DCM 7:3.

Os resultados obtidos expressaram uma grande riqueza de terpenos nos extratos da 2ª e 3ª coleta, quando revelados com sulfato cérico (Figura 20), pois apresentaram uma coloração vermelha. Observou-se também a presença de substâncias fluorescentes sob a luz UV em 365 nm, um indicativo da presença de compostos aromáticos. Quando revelados com DPPH mostraram a presença de possíveis antioxidantes pela coloração amarelada, não foi identificada a presença de alcaloide quando revelados com o Reagente de Dragendorff, pois

não se verificaram-se manchas de coloração laranja, o que indica a presença dos mesmos.

Figura 20: Fotos das placas dos extratos DCM dos galhos da 1ª, 2ª e 3ª coletas.

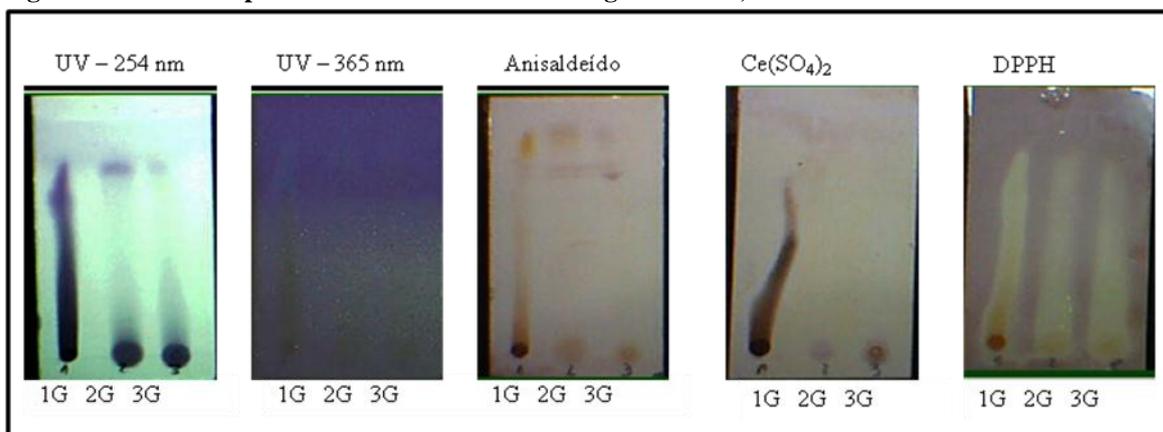


Os extratos MeOH dos galhos foram submetidos a análise por CCDC. O eluente utilizado para as três coletas foi o AcOEt/MeOH 1:1.

Os resultados obtidos expressaram a presença de terpenos nos extratos da primeira e segunda coleta, quando revelados com sulfato cérico (Figura 21), pois apresentou uma coloração vermelha. Quando revelados com DDPH mostraram a presença de possíveis antioxidantes pela coloração amarelada, não foi identificada a presença de alcaloide quando revelados com o Reagente de Dragendorff, pois não se verificou manchas de coloração laranja, o que indica a presença dos mesmos.

A partir das observações por CCDC, foi possível escolher o método de partição líquido-líquido para realizar o primeiro fracionamento dos extratos metanólicos.

Figura 21: Fotos das placas dos extratos MEOH dos galhos da 1ª, 2ª e 3ª coletas.



Ao comparar as três coletas é possível observar que há muita diferença entre as coletas

realizadas, e mostraram-se ricas quimicamente revelando uma grande quantidade de possíveis substâncias a serem isoladas.

5.2.2 Avaliação da atividade antioxidante

Os resultados obtidos foram expressos em equivalência com o ácido ascórbico, permitindo correlacionar a resposta obtida do extrato vegetal com a do antioxidante padrão e quanto mais próximo de 1,0 mais semelhante é a capacidade antioxidante da amostra frente ao ácido ascórbico.

Assim, os extratos metanólicos das três coletas apresentaram uma elevada atividade antioxidante com uma equivalência com o ácido ascórbico variando entre 1 e 2 (Tabela 14), destacando-se principalmente a 2ª coleta com uma equivalência de 1,650 para o DPPH e 0,868 para o Fe^{3+} , mostrando desta forma que este extrato metanólico tem presente constituintes químicos com um grande potencial antioxidante.

Estudos descritos na literatura atribuem esta atividade antioxidante de extratos vegetais aos compostos fenólicos, pois estes têm propriedades captadoras de radicais livres, o que lhe confere a atividade antioxidante (MATINEZ – VALVERDE *et al*, 2000; MELO *et al*, 2008; SILVA, 2005), estes compostos fenólicos incluem as classes químicas dos flavonoides e taninos, importantes metabólitos secundários presentes nas plantas.

Quanto aos extratos diclorometânicos das três coletas, estes foram inativos, com equivalências muito altas. Estes resultados mostram que as substâncias antioxidantes estão presentes apenas nos extratos de maior polaridade. É interessante notar que os extratos obtidos das três coletas apresentaram potenciais muito semelhantes nas reações com estes oxidantes.

Tabela 14: Atividade antioxidante dos extratos brutos de diclorometânicos e metanólicos dos galhos

Extratos	DPPH			Fe^{3+}		
	$ \Delta\text{ABS}_{517} $	$[\text{AA}]_{\text{eq}}$	Equiv.	$ \Delta\text{ABS}_{508} $	$[\text{AA}]_{\text{eq}}$	Equiv.
1- Galho -DCM	0,003	0,133	37,696	-0,071	0,471	10,669
1 - Galho – MeOH	0,364	3,036	1,650	1,217	2,500	2,006
2 - Galho - DCM	0,048	0,266	23,740	0,253	0,477	11,747
2 - Galho – MeOH	0,388	3,101	1,650	3,097	5,806	0,868
3 - Galho - DCM	0,041	0,207	35,655	0,290	0,547	10,401
3 - Galho - MeOH	0,286	2,250	2,227	2,188	4,103	1,401

As fases das partições dos extratos metanólicos dos galhos também foram submetidas a realização do teste antioxidante e apresentaram boas equivalências comparadas ao ácido ascórbico, destacando-se principalmente as fases AcOEt da 2ª e 3ª coleta, com equivalências

de 0,833 para DPPH e 0,595 para o Fe^{3+} para a 2ª coleta e equivalência de 0,764 para DPPH e 0,449 para o Fe^{3+} para a 3ª coleta (tabela 15), mostrando desta forma que estas fases dos extratos metanólicos possuem constituintes químicos com um grande potencial antioxidante.

Quanto as fases DCM dos extratos metanólicos apresentaram equivalências variando entre 3 e 4, sendo consideradas pouco ativas em comparação as fases AcOEt e HMeOH que obtiveram atividades mais altas.

Tabela 15: Atividade antioxidante das fases das partições dos extratos metanólicos dos galhos

Amostras	DPPH			Fe^{3+}		
	$ \Delta\text{ABS}_{517} $	$[\text{AA}]_{\text{eq}}$	Equiv.	$ \Delta\text{ABS}_{508} $	$[\text{AA}]_{\text{eq}}$	Equiv.
1 - Galho – MeOH – FDCM	0,118	1,035	4,857	2,627	3,872	1,291
1 - Galho – MeOH- F-AcOEt	0,420	3,573	1,539	2,708	3,989	1,328
1 - Galho - MeOH – F-H-MeOH	0,363	3,094	1,670	4,136	6,065	0,825
2 - Galho – MeOH – FDCM	0,138	1,206	4,148	1,910	2,829	1,832
2 - Galho - MeOH- F-AcOEt	0,711	6,016	0,833	5,769	8,438	0,595
2 - Galho - MeOH – F-H-MeOH	0,556	4,715	1,065	6,573	9,605	0,521
3 - Galho – MeOH – FDCM	0,103	0,909	5,507	1,916	2,839	1,775
3 - Galho - MeOH- F-AcOEt	0,774	6,549	0,764	7,627	11,138	0,449
3 - Galho - MeOH – F-H-MeOH	0,670	5,672	0,887	7,394	10,799	0,464

5.2.3 Avaliação da atividade antimalárica

As amostras foram testadas em duas concentrações, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Aquelas que apresentaram percentual de redução de parasitemia igual ou maior que 50% nas duas concentrações testadas foram selecionadas para determinação das CI_{50} .

Os extratos metanólicos da 1ª e 2ª coleta mostraram resultados satisfatórios nos experimentos realizados, os extratos das duas coletas apresentaram 100% de redução de parasitemia nas duas concentrações (100% - 25 $\mu\text{g/mL}$ e 100% - 50 $\mu\text{g/mL}$) (tabela 16). Esses extratos que apresentaram um percentual de redução de parasitemia igual ou maior que 50% nas duas concentrações foram testadas para determinação CI_{50} .

Os extratos diclorometânicos da 1ª, 2ª e 3ª coletas apresentaram um percentual de redução de parasitemia inferior a 50%, assim como o metanólico da 3ª coleta, não sendo um

percentual significativo e não tiveram a CI_{50} determinada, pois não obtiveram um resultado satisfatório.

Tabela 16: Percentual de redução (% Red) do crescimento de *P. falciparum* cloquina-resistente (W2) na presença das amostras recebidas em duas concentrações, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$

Extratos	% Red.	
	25 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$
1 – G – DCM	12	36
1 – G – MeOH	100	100
2 – G – DCM	25	36
2 – G – MeOH	100	100
3 – G – DCM	16	32
3 – G – MEOH	28	32
Cloroquina	100	100

Para os extratos que tiveram o percentual de redução de parasitemia igual ou maior que 50% foi determinada a CI_{50} , os extratos metanólicos da 1ª e 2ª coletas, foram considerados ativos ($CI_{50} = 13,66 \mu\text{g/mL}$ para a 1ª coleta e de $CI_{50} = 5,79 \mu\text{g/mL}$ para a 2ª coleta) (tabela 17).

Tabela 17: Concentração inibitória de 50% do crescimento (CI_{50}) do clone W2 (cloroquina-resistente) de *P. falciparum* contra as amostras avaliadas.

Extratos	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Classificação
	Média	
230 G MeOH	13,66	Ativa
307 G MeOH	5,79	Ativa
Cloroquina	0,078	Muito ativa

Os estudos realizados com as fases dos extratos metanólicos da 1ª, 2ª e 3ª coletas mostrou-se satisfatório, com destaque para a fases DCM da 1ª e 2ª coleta com redução de parasitemia superior a 90% para as duas concentrações testadas para 1ª coleta (92% - 25 $\mu\text{g/mL}$ e 93% - 50 $\mu\text{g/mL}$) (tabela 18) e redução superior a 70% na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ para a 2ª coleta e para a fase AcOET da 3ª coleta com redução superior a 50 % (59% - 25 $\mu\text{g/mL}$ e 63% - 50 $\mu\text{g/mL}$). Estas fases foram testadas para determinação da CI_{50} .

As demais fases testadas apresentaram um percentual de redução de parasitemia inferior a 50%, não sendo um percentual significativo e não tiveram a CI_{50} determinada, assim como os extratos.

Tabela 18: Percentual de redução (% Red) do crescimento de *P. falciparum* cloroquina-resistente (W2) na presença das diferentes fases dos extratos metanólicos

Extratos	% Red.	
	25 µg/mL	50 µg/mL
1 – G – MEOH – F – DCM	92	93
1 – G – MEOH – F – ACOET	47	57
1 – G – MEOH – F – H – MEOH	39	49
2 – G – MEOH – F – DCM	36	71
2 – G – MEOH – F – ACOET	19	31
2 – G – MEOH – F – H – MEOH	10	47
3 – G – MEOH – F – DCM	32	43
3 – G – MEOH – F – ACOET	59	63
3 – G – MEOH – F – H – MEOH	9	18
Cloroquina	100	100

Para as fases dos extratos metanólicos que tiveram o percentual de redução de parasitemia igual ou maior que 50% foi determinada a CI_{50} . Destacando-se principalmente a fases DCM da 1ª e 2ª coleta ($CI_{50} = 7,05 \mu\text{g/mL}$ sendo considerada ativa para 1ª coleta e $CI_{50} =$ entre 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ sendo considerada pouco ativa) e a fase AcOEt da 1ª coleta ($CI_{50} =$ entre 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ sendo considerada pouco ativa). Quanto as demais fases foram consideradas inativas (Tabela 19).

Tabela 19: Concentração inibitória de 50% do crescimento (CI_{50}) do clone W2 (cloroquina-resistente) de *P. falciparum* contra as fases dos extratos metanólicos

Amostras	CI_{50} (µg/mL) contra <i>P. falciparum</i> (cepa W2)	Classificação
1-G-MEOH-F-DCM	7,05 ±1,08	Ativa
1-G-MEOH-F-ACOET	Entre 25 e 50	Pouco ativa
1-G-MEOH-F-H-MEOH	>50	Inativa
2-G-MEOH-F-DCM	Entre 25 e 50	Pouco ativa
2-G-MEOH-F-ACOET	>50	Inativa
2-G-MEOH-F-H-MEOH	>50	Inativa
3-G-MEOH-F-DCM	>50	Inativa

3-G-MEOH-F-ACOET	Inconclusivo	Inconclusivo
3-G-MEOH-F-H-MEOH	>50	Inativa
Cloroquina	0,145 ± 0,02	Muito ativa

A amostra 3-G-MEOH-F-ACOET foi testada repetidas vezes, no entanto, não foi possível determinar o valor de CI_{50} para a mesma.

Pela CI_{50} obtida para a fase DCM da 1ª coleta a mesma foi submetida ao teste de citotoxicidade e a concentração que de redução foi superior 1000 µg/mL (tabela 20).

Tabela 20: Concentração citotóxica que inibe 50% do crescimento (CC_{50}) de células HepG2 testadas.

Amostra	CC_{50} (µg/mL)
230-G-MEOH/F-DCM2	>1000
CQ	167,04 ± 5,66

Após o teste de citotoxicidade foi realizado o cálculo do índice de seletividade dado pela razão entre o valor obtido de CI_{50} para células HepG2 e o valor de CI_{50} para *P. falciparum*.

A fase DCM da 1ª coleta apresentou índice maior que 10 e não foi considerada citotóxica, e assim foi possível inferir que esta fase possui um efeito direcionado apenas ao parasito e não que esta ação ocorre devido a sua toxicidade para quaisquer tipos de células (tabela 21). Estudos posteriores para o isolamento das substâncias são necessários para constatar se uma única substância é a responsável pela atividade antimalárica.

Tabela 21: Valores de CC_{50} , CI_{50} e índice de seletividade calculado para a fase DCM da 1ª coleta

Amostra	CC_{50} (µg/mL)	CI_{50} (µg/mL)	IS
1-G-MEOH/F-DCM	>1000,0	7,05	>141,84
Cloroquina	167,04	0,145	1152

5.2.5 Avaliação da atividade antibacteriana

5.2.5.1 Método de difusão em Agar –difusão em poço

Os extratos da 1ª, 2ª e 3ª coleta foram testados pelo método de difusão em poço e os resultados foram expressos de acordo com Alves, 2000, com base no diâmetro de zona de inibição: menor que 0,9 cm inativo, entre 0,9 e 1,2 cm atividade média, entre 1,3 e 1,8 cm ativos, e maior que 1,8 cm muito ativo.

O extrato MeOH da 2ª coleta mostrou os melhores resultados frente as oito bactérias testadas, destacando-se principalmente o teste realizado com *Salmonella enteritidis* com um halo de 1,5 cm sendo considerado ativo, e para *Pseudomonas fluorescens* com um halo de 1,3 cm também sendo considerado ativo, e contra as bactérias *Aeromonas hydrophyla*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, apresentou média atividade (tabela 23).

Os extratos DCM da 1ª e 3ª coleta mostraram-se também com uma atividade mediana frente as bactérias testadas, apresentou halo de 1,2 cm frente à *Salmonella enteritidis* para a 2ª coleta e 1,2 cm frente à *Klebsiella pneumoniae* para a 3ª coleta.

Os demais extratos testados tiveram atividades consideradas medianas frente às bactérias testadas.

Todos os extratos foram considerados inativos para a bactéria *Serratia marcescens*.

Tabela 23: Resultados do teste antibacteriano pelo método de difusão em Agar .

Extratos	Controle (oxitetraciclina)	1- GDCM	1- GMEOH	2- GDCM	2- GMEOH	3- GDCM	3- GMEOH
<i>Aeromonas hydrophyla</i>	3 (alta)	-	0,7 (inativo)	0,8 (inativo)	1,0 (média)	1 (média)	0,9 (média)
<i>Bacillus cereus</i>	2,1 (alta)	-	0,7 (inativo)	0,9 (média)	1,0 (média)	0,9 (média)	-
<i>Escherichia coli</i>	1,4 (alta)	-	-	-	1,2 (média)	1 (média)	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,5 (alta)	1,1 (média)	1,1 (média)	1,0 (média)	1,1 (média)	1,2 (média)	0,7 (inativo)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1,5 (alta)	-	1,0 (média)	-	1,3 (ativo)	-	1,1 (média)
<i>Salmonella enteritidis</i>	2,3 (alta)	-	0,9 (média)	1,2 (média)	1,5 (ativo)	1 (média)	1 (média)
<i>Serratia marcescens</i>	1 (média)	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	3 (alta)	-	1,0 (média)	-	1,2 (média)	-	-

5.3 Fracionamento cromatográfico

5.3.1 Determinação estrutural das substâncias isoladas

A subfração 13 (6,7 mg) obtida do extrato DCM dos galhos apresentou-se na forma de cristais brancos, e quando revelada com $\text{Ce}(\text{SO}_2)_4$ verificou-se a coloração vermelha, com $r_f = 0,35$, quando eluída com Hex/AcOEt 95:05.

O espectro de RMN de ^1H (figuras 23 e 24) desta fração mostra a presença de sinais mais intensos nas regiões de δ_{H} 0,73 a 1,26 ppm, com 8 sinais referentes as 8 metilas da molécula 6 sinais como singletos e 2 como dubletos, sugerindo que o composto se tratava de um triterpeno. E sinais entre 1,3 e 2,5 ppm referentes aos hidrogênios metilênicos e metinos, não há hidrogênios de ligação dupla.

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou 30 sinais (figuras 25 e 26) cujos dados estão mostrados na tabela 25, mostrou a falta de carbonos de ligação duplas e o sinal de um grupo metílico em 6,8 ppm, sugerem o esqueleto friedelano. Também observou-se a presença de uma carbonila em 213,0 ppm. De acordo com a literatura foi possível confirmar os deslocamentos químicos de carbono 13 identificando a substância I como o triterpeno friedelin-3-ona (MAHATO e KUNDU, 1994)

O triterpeno friedelin-3-ona (figura 22) está sendo descrito pela primeira vez na família Picrodendraceae.

Tabela 24: Dados de RMN ^{13}C do friedelin-3-ona comparados com a literatura (MAHATO & KUNDU, 1994)

Posição	δ_c observado	δ_c literatura	Carbonos
1	22,3	22,3	CH_2
2	41,5	41,5	CH_2
3	213,1	213,2	C
4	58,3	58,2	CH
5	42,1	42,1	CH
6	41,3	41,3	CH
7	18,3	18,2	CH_2
8	53,1	53,1	CH_2
9	37,5	37,4	C
10	59,3	59,4	CH
11	35,6	35,6	CH_2

12	30,5	30,5	CH ₂
13	39,7	39,7	C
14	38,3	38,3	C
15	32,4	32,4	CH ₂
16	36,0	36,0	CH ₂
17	30,0	30,0	C
18	42,8	42,8	CH
19	35,3	35,3	CH ₂
20	28,2	28,1	C
21	32,8	32,7	CH ₂
22	39,3	39,2	CH ₂
23	6,8	6,8	CH ₃
24	14,7	14,6	CH ₃
25	17,9	17,9	CH ₃
26	20,3	20,2	CH ₃
27	18,6	18,6	CH ₃
28	32,1	32,1	CH ₃
29	35,0	35,0	CH ₃
30	31,8	31,8	CH ₃

Figura 22: estrutura da friedelin-3-ona

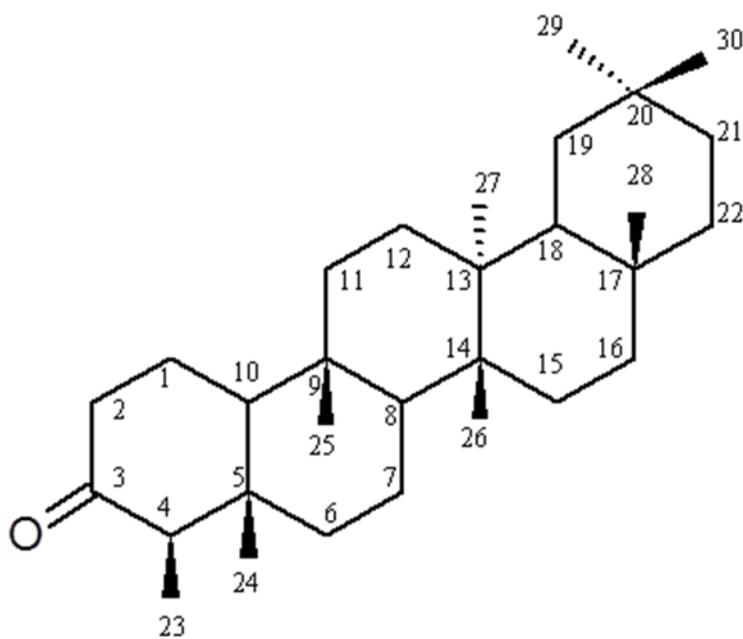


Figura 23: Espectros de RMN de ¹H da friedelin-3-ona

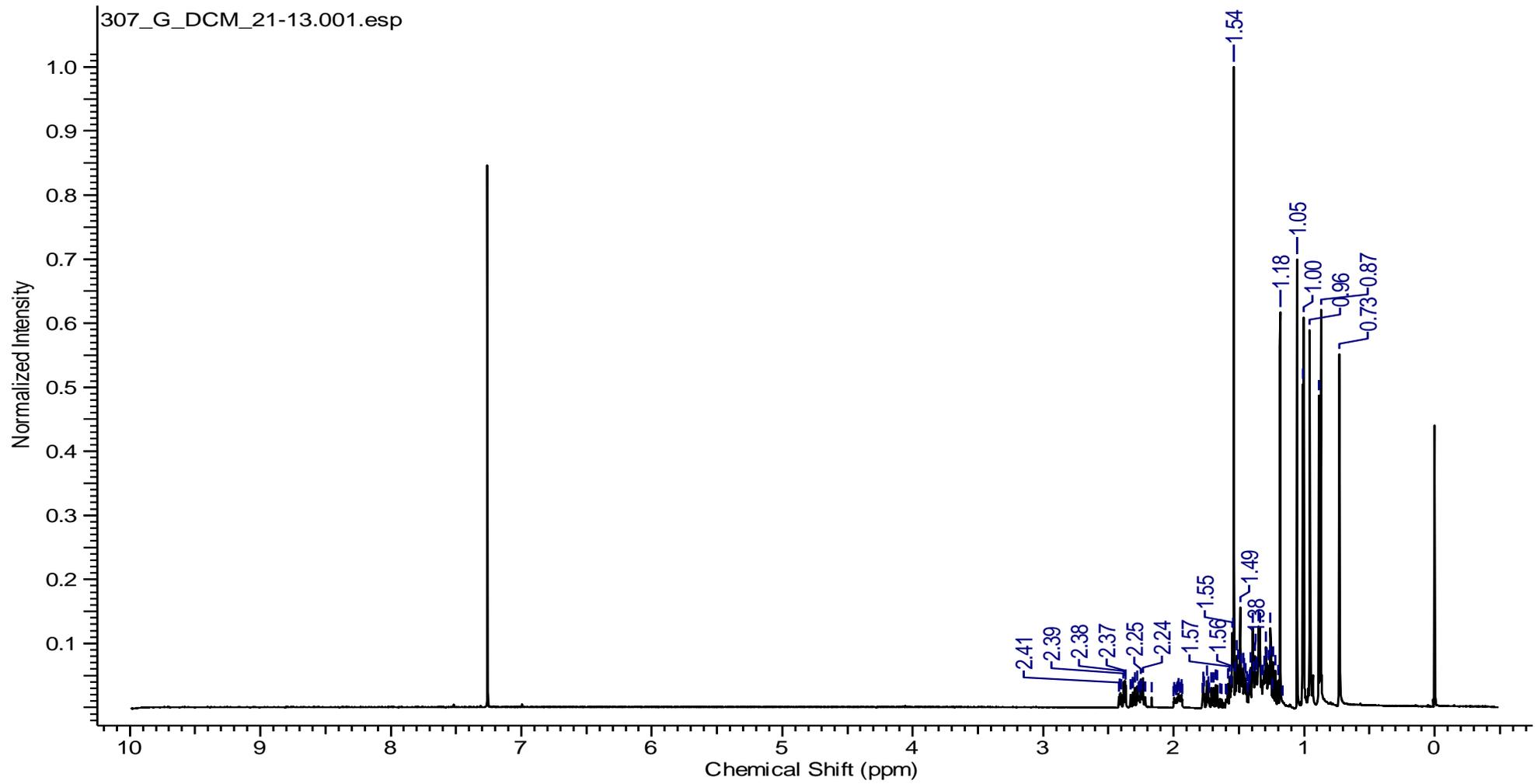


Figura 24: Expansão do espectro de RMN de ¹H da friedelin-3-ona

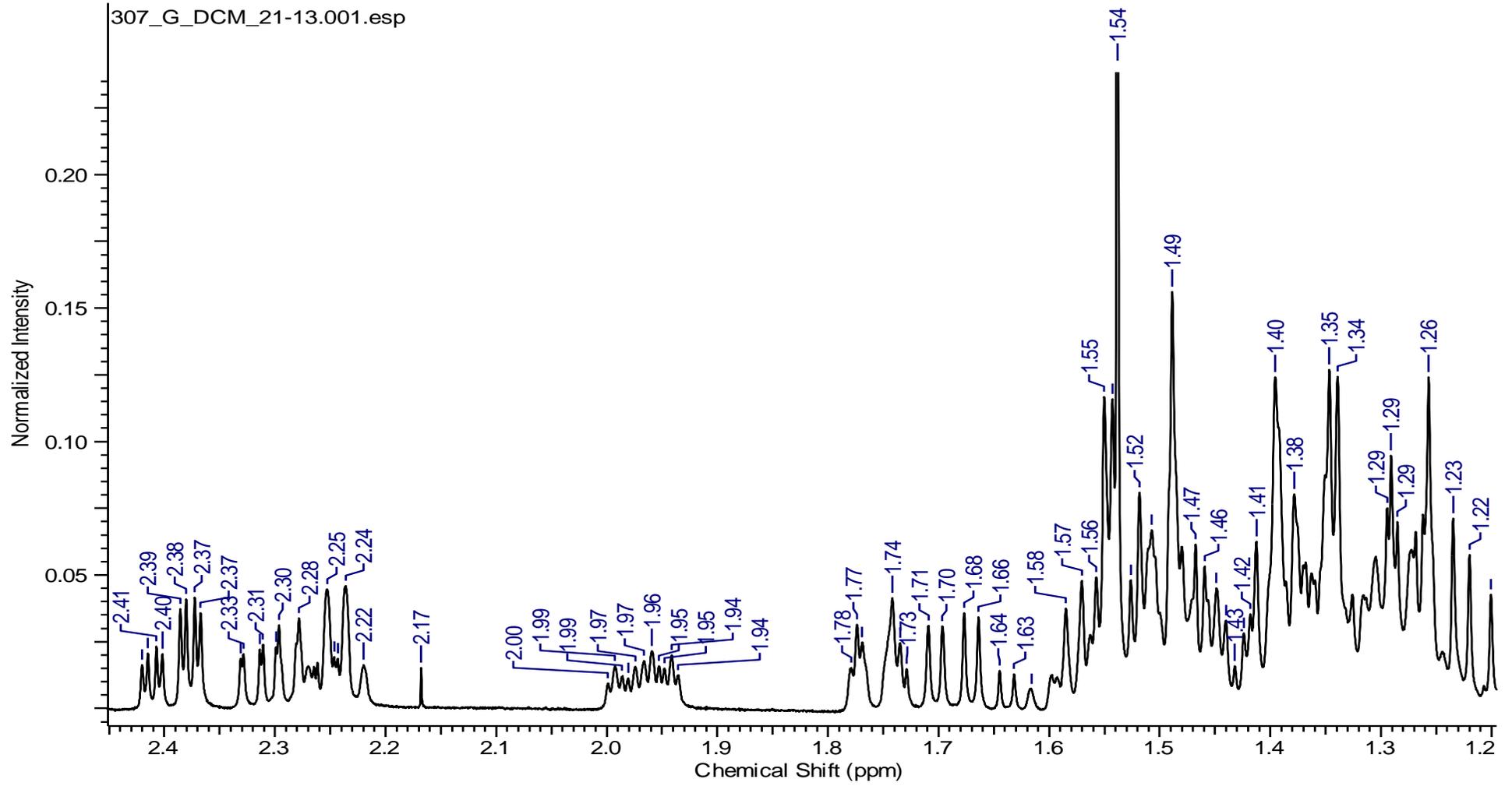


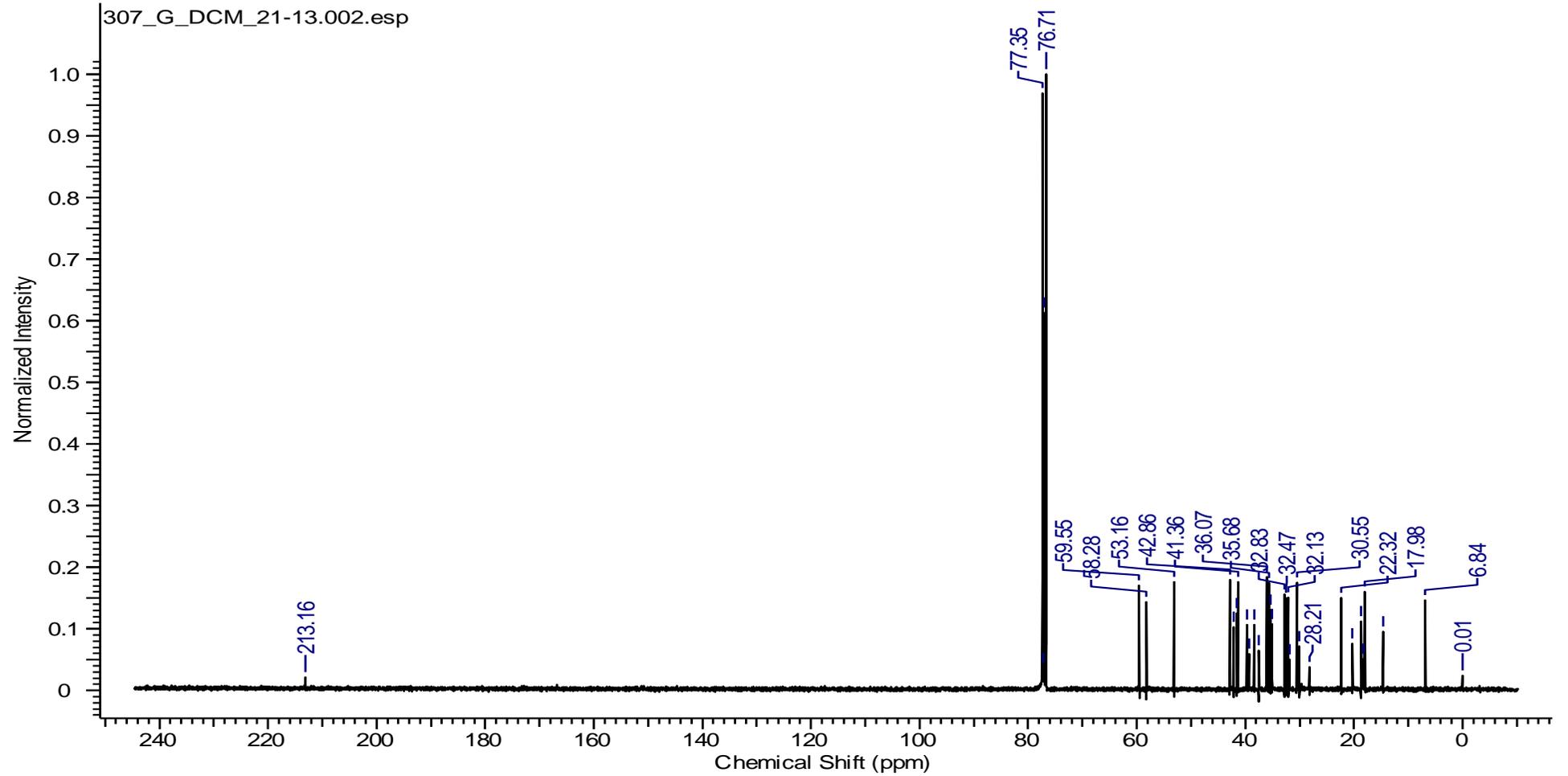
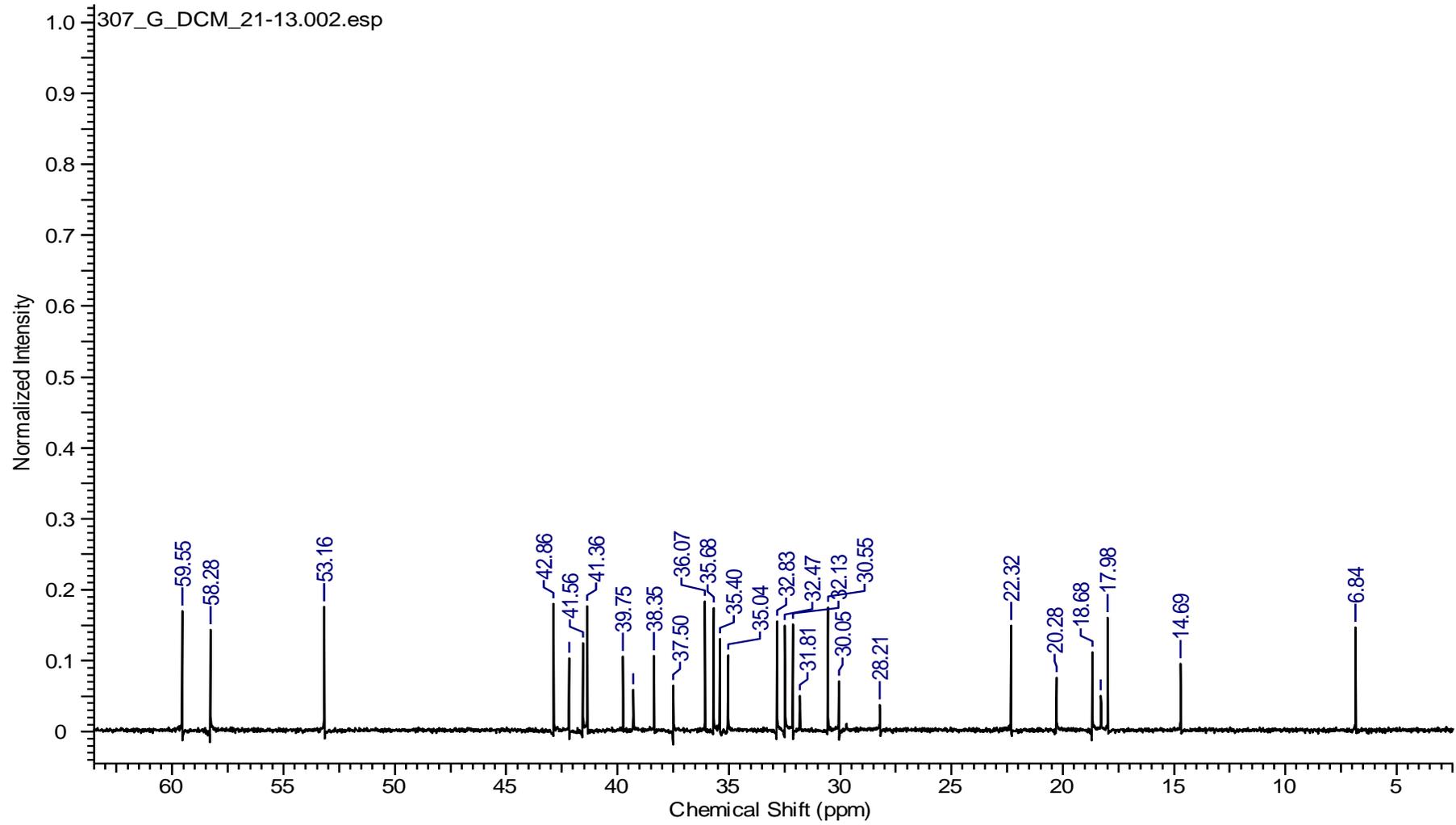
Figura 25: Espectro de RMN de ^{13}C da friedelin-3-ona

Figura 26: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C da friedelin-3-ona

A subfração 31-32 (2,2 mg) do extrato MeOH dos galhos de *Piranhea trifoliata*, apresentou-se como cristais brancos e $rf = 0,4$ quando eluidas em Hex/AcOEt 7:3.

O espectro de RMN ^1H (figura 28 e 29), mostrou alguns sinais na região dos aromáticos em $\delta_{\text{H}} 7,05$ (1H, *d*, $J = 8,5$ Hz), $\delta_{\text{H}} 7,44$ (1H, *dd*, $J = 8,5$ e $1,8$ Hz), $\delta_{\text{H}} 7,42$ (1H, *d*, $J = 1,8$ Hz), mostrou sinais em $\delta_{\text{H}} 9,82$ mostrando a presença de um hidrogênio de aldeídos, e em $\delta_{\text{H}} 3,97$, relativo ao grupo metoxílico. Os dados foram comparados com a literatura, e o espectro de RMN apresenta características de ser o composto fenólico 3-metoxi-4- hidroxi-benzaldeído (Figura 27), porém somente pelo espectro de RMN ^1H não foi possível inferir as posições do grupo aldeído e da metoxila e a existência da hidroxila, para tal afirmação são necessários experimentos de RMN bidimensional (HMBC) para posicionar a metoxila e o aldeído e complementado com espectros de massas, para confirmar a presença de uma hidroxila.

Figura 27: Proposta da estrutura da substância II (3-metoxi-4-hidroxi-benzaldeído)

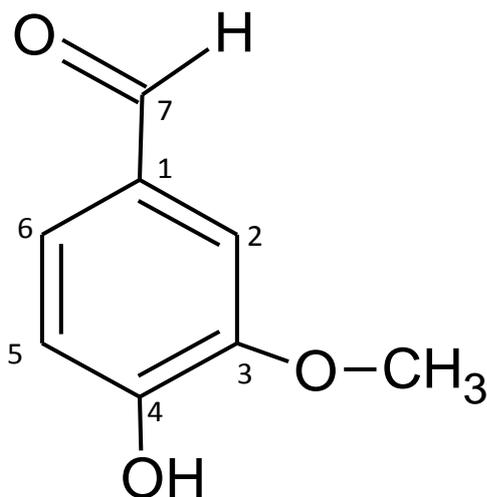


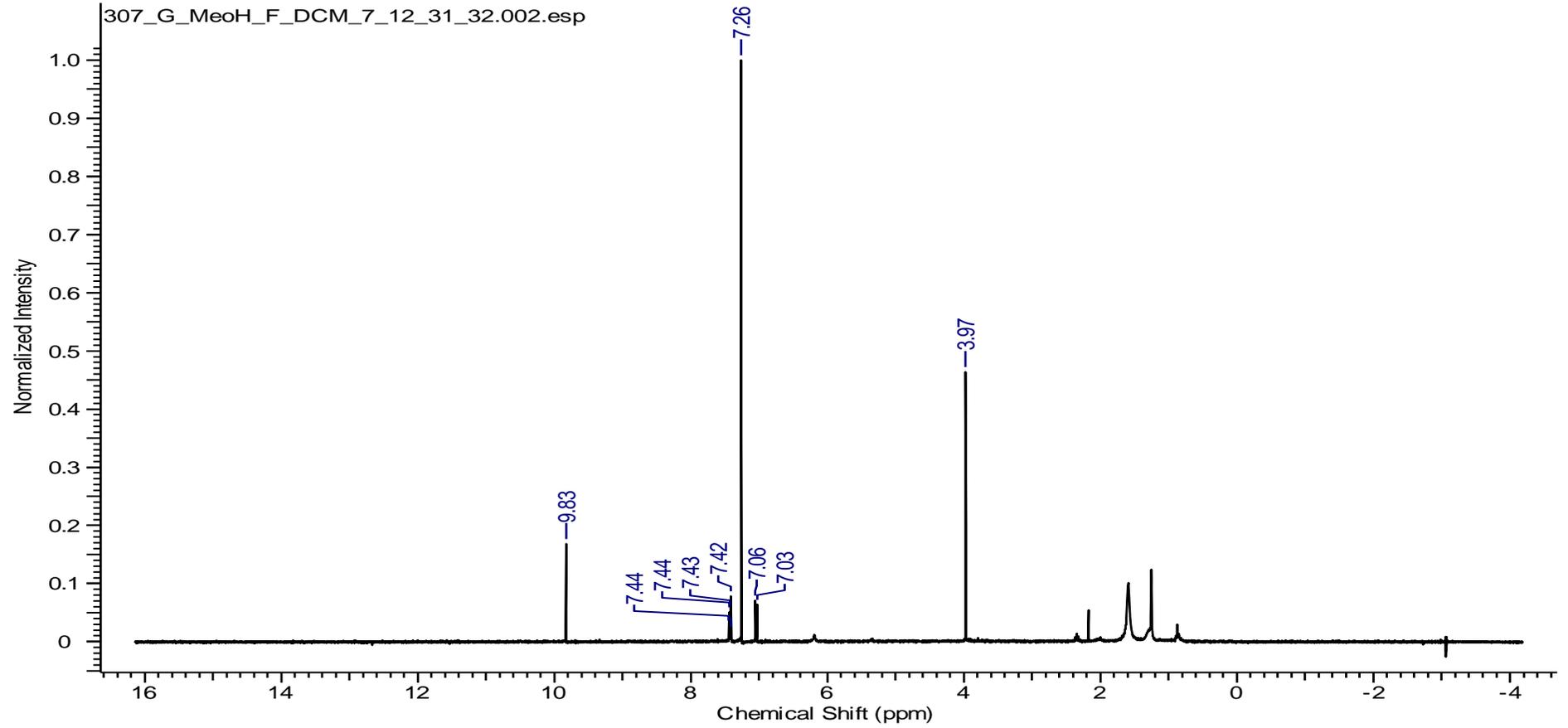
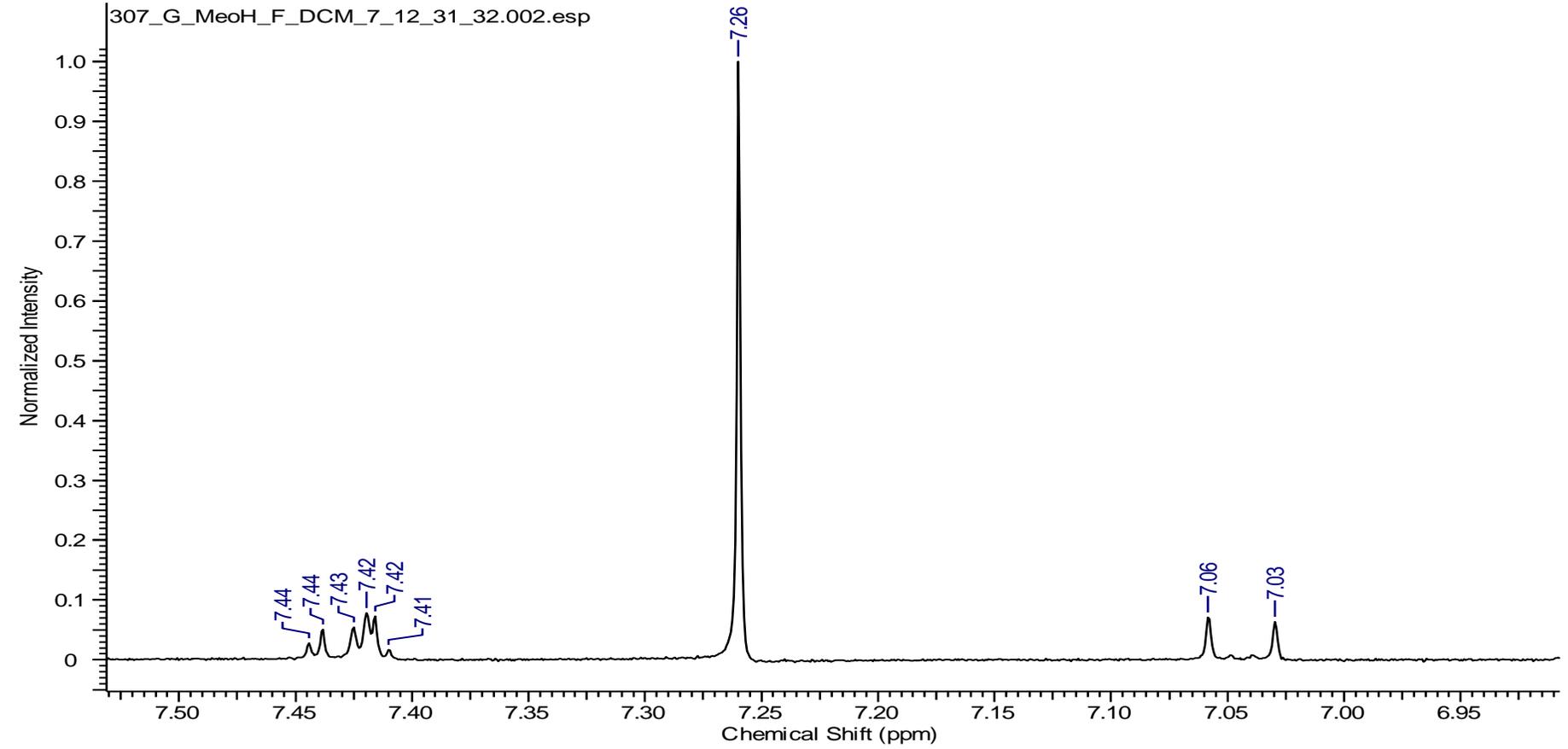
Figura 28: Espectro de RMN de ^1H da substância 2

Figura 29: Expansão do espectro de RMN de ¹H da substância 2



6 Conclusões

O estudo fitoquímico dos galhos de *P. trifoliata*, revelou que os extratos DCM e MeOH das 3 coletas são ricos em terpenos fato mostrado por análises em CCDC.

O fracionamento do extrato DCM da 2ª coleta possibilitou o isolamento do triterpeno friedelin-3-ona.

O fracionamento do extrato MeOH da 2ª coleta possibilitou o isolamento de um composto fenólico, possivelmente o 3-metoxi-4- hidroxi-benzaldeído

Os extratos MeOH da 1ª e 2ª coleta apresentaram atividade antimalárica frente ao *P. falciparum*.

Os extratos das 3 coletas não apresentou toxicidade frente à *A. salina*.

O extrato MeOH da 2ª coleta mostrou os melhores resultados frente as oito bactérias testadas, destacando-se principalmente o teste realizado com *Salmonella enteritidis* com um halo de 1,5 cm sendo considerado ativo.

Quanto à atividade antioxidante os extratos metanólicos foram considerados ativos com equivalências com ácido ascórbico entre 1-2.

As fases AcOEt dos extratos MeOH da 2ª e 3ª coleta apresentaram atividade antioxidante, com equivalências variando entre 0,4 e 0,8 em comparação ao ácido ascórbico.

Os resultados obtidos neste trabalho contribuíram para o conhecimento da atividade biológica e química de *Piranhea trifoliata*. Vale ressaltar que o triterpeno friedelin-3-ona está sendo descrito pela primeira vez em Picrondendraceae. Com base nos resultados obtidos até o momento, a espécie em questão, apresenta um forte potencial, como fonte de substâncias bioativas, o que incentiva a continuação do trabalho.

7 Referências bibliográficas

ALMEIDA, M. Z. **Plantas medicinais** - 3. ed. - Salvador : EDUFBA, 2011.

ALVES, L. F. **Plantas Medicinais e Fitoquímica no Brasil: Uma Visão Histórica**. 380 p. Tese (Doutorado em História das Ciências e das Técnicas e Epistemologia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, 2010.

ANDRADE-WARTHA, E.R.S. **Capacidade antioxidante in vitro do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.) e efeito sobre as enzimas participantes do sistema antioxidante de defesa do organismo animal..** Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. São Paulo, 111p, 2007.

AMES, B. N.; GOLD, L. S.; WILET, W. C. The causes and prevention of cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, U.S.A. v. 92, p. 5258-5265, 1995.

APG II. An update of the Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society** 141: 399-436. 2003.

BANERJEE, A.; DASGUPTA, N.; DE, B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chemistry**, v. 90, p. 727-733, 2005.

BANNISTER, L.; MICHELL, G. The ins, out and roudabouts of malária. **Trends Parasitol.** 19 (5): 209 – 13, 2003.

BARATA, L. E. S. Empirismo e ciência: fonte de novos fitomedicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 57, n. 4, p. 4-5, 2005.

BARREIRO, E. J. BOLZANI, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de novos fármacos. **Química nova**, v.32. p. 679-688, 2009.

BEHAL, V. Nontraditional microbial bioactive metabolites. **Folia Microbiologica**, v. 46, n. 5, p. 363-370, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de terapêutica da malária**. Brasília, FUNASA, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6. ed. Brasília, 2005.

BRASILIA: MMA/SBF. **Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. 404 p. 2002.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004.

CAMACHO, M. D. R., PHILLIPSON, J. D., CROFT, S. L., SOLIS, P.N., MARSHALL, S.J., GHAZANFAR, S.A. Screening of plant extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. **Journal of Ethnopharmacology** No 89pp. 185–191. 2003.

CASTAÑEDA, P. M. R., ALMA, B., GARCIA, E.CHÁVEZ, D., MATA, R. Secondary metabolites from the stem bark *Celaenodendron mexicanum*. **Journal of Natural Products**. Vol. 56, N. 9, p 1575-1579, 1993.

CASTEEL, D. A. Antimalarials agents. In: WOLF, M. E. (ed.). **Burger's medicinal chemistry and drug discovery**. v. 5, ed.5, Pennsylvania: Wiley Interscience, p.38-61, 1997.

CHASE, M. W.; ZMARTZTY, S.; LIEDÓ, M. D.; WURDACK, K. J.; SWESEN, S.M.; FAY, M. F.. When in doubt, put it in Flacourtiaceae: a molecular phylogenetic analysis based on plastid rbcL DNA sequences. **Kew Bulletin**. n. 57. p. 141-181. 2002.

CHIBALE, K. Economic drug discovery and rational medicinal chemistry for tropical diseases. **Pure Appl. Chem.**, v.11, p.1957-1964, 2005.

Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard — Sixth**

Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West. Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

CRAGG, G. M. GROTHAUS, P. G. NEWMAN, D. J. Impact of Natural Products on Developing New anti-cancer agents. **Chemical Reviews**, v.109, p. 3012-3043, 2009.

CUNICO, M. M.; CARVALHO, J. L. S.; KERBER, V. A.; HIGASKINO, C. E. K.; CRUZ ALMEIDA, S. C.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 14:: 97-103. 2004.

DAI, J.; GUPTE, A.; GATES, L.; MUMPER, R. J. A comprehensive study of anthocyanins-containing extracts from selected blackberry cultivars: extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 837-847, 2009.

DEMAIN, A. L. FANG, A. Q. The Natural functions of secondary metabolites. **History of Morden Biotechnology I**, v.69, p.1-39, 2000.

DI STASI, L. C. (Org). **Plantas medicinais: arte e ciência, um guia para uma pesquisa interdisciplinar**. São Paulo: Fundação Editora Unesp, 1996. 230 p.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA C. A.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; MARIOT, A.; SANTOS, C. M.. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica** - 2. ed. rev. e ampl. - São Paulo: Editora UNESP, 2002.

EINBOND, L. S.; REYNERTSON, K. A.; LUO, X.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, v. 84, p. 23 - 28, 2004.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Med.** 64: 711-713. 1998.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 3. ed. Florianópolis: Editora da UFSC, p. 197-220. 2004

FERREIRA, Vitor F. and PINTO, Angelo C.. A fitoterapia no mundo atual. **Química nova**. vol.33, n.9, pp. 1829-1829. 2010

FILHO, E. M. C. **Plante as árvores do Xingu e Araguaia**. São Paulo: Edição Revista e Ampliada, 2012. 260 p. ISBN 978-85-8226-005-0.

FORZZA, R. C. (Org). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. v.1, Rio de Janeiro – Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010

FRANÇA, V. C.; VIEIRA, K. V. M.; LIMA, E. O.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S.. E. Estudo fitoquímico das partes aéreas de *Aristolochia birostris* Ducht. (Aristolochiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 15(4): 326 – 330, 2005

FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1271-1278, 2008.

FURTADO, N. A. J. C. **Estudo sobre as condições de produção e as atividades antibiótica e antichagásica de substâncias isoladas de *Aspergillus fumigatus***. 2004. 293 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; NOSTEN, F.; DRUILHE, P.; LAXMINARAYAN, R.; BINKA, F.; KILAMA, W. L.; FORD, N.; WHITE, N. J. Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 564-573, 2002.

GIORDANI, R. B.; PAGLIOSA, L. B.; HENRIQUES, A. T. ZUANAZZI, J. A. Investigação do potencial antioxidante e antiolinesterásico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). **Química nova**. v.31, N°8, 2042 – 2046, 2008.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P.; WANDERLEY, M.G.L. & VAN DEN BERG, C. 2005. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, 1: 52–61.2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GRACE, M. H., JIN, Y., WILSON, G. R., COASTES, R. M. Structures, biogenetic relationships, and cytotoxicity of pimarane-derived diterpenes from *Petalostigma pubescens*. **Phytochemistry**, vol. 67. p 1708–1715. 2006.

HALLIWELL, B.; GUITTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3th ed. New York: Oxford Science Publications, 2000. 936p.

HARTAMANN, T. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, 68 (22-24), 2831- 2846, 2007.

HOGAN, S.; CHUNG, H.; ZHANG, L.; LI, J.; LEE, Y.; DAI, Y.; ZHOU, K. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanins-rich extract from açai. **Food Chemistry**, v.118, p. 208-214, 2010.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C.; “**Princípios ativos de Plantas Superiores**”. EdUFSCar, 2003.

IBGE 2010. **Mapa de biomas brasileiros**. Publicado na Internet: http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/default_prod.shtm#MAPAS, acessado em abril 2014.

JEFFREYS, M. F. **Estudo Químico e Bioatividade de Piranha trifoliata (Picrodendraceae)**. Universidade do Estado do Amazonas. Manaus, p. 120. 2011.

KAUR, K., JAIN, M., KAUR, T., JAIN, T., Review antimalarials from nature. **Bioprognic & medicinal chemistry**, n. 9, 2009.

LANGMEAD, L.; RAMPTON, D. S. Review Article. Herbal treatment in gastrointestinal and liver disease – benefits and dangers. **Alimentary Pharmacology and therapeutics**, v.15, p. 1239 – 1252, 2001.

LUNA, J. S.; SANTOS, A.F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal Ethnopharmacol.** 2005; 97(2):199-206.

MAKLER, M. T.; RIES, J.M.; WILLIAMS, J. A; BANCROFT, J. E.; PIPER, R. C.; GIBBINS, B. L.; HINRICHS, D. J. Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. **J Trop Med Hyg** 48(6): 739-741, 1993.

MCLAUGHLIN, J.L.; CHANG, C.J.; SMITH, D.L. “Bench-top” bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update, p. 383-409. In: Rahman, A. (Org.). **Studies in Natural Product Chemistry**, 9th ed., Elsevier, Amsterdam, 1991

MACIEL, M. A. M; PINTO, A. C. VEIGA, V. F. J. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, 429 – 438, 2002.

MAHATO, S. B. e KUNDU, A. P. ¹³C NMR Espectra of Pentacyclic Triterpenoids Compilation and some Salient Features. *Phytochemistry*. p. 1517- 1575, 1994.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M. DE; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais: do cultivo a terapêutica**. 6. ed. Petrópolis: Vozes, 247 p. 2003.

MATINEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M. J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Arch.Latinoam. Nutr.**, v. 50, n. 1, p. 5-18, 2000.

MELO, E. A.; MACIEL, M.I.A.; LIMA, V. L. A. G.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 44, n. 2, abr./jun., 2008.

MESHNICK, S. R.; TAYLOR, T. E.; KAMCHONWONGPASAIN, S. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. **Microbil. Rev**, Amsterdam, v. 60, n.2, p. 301-315, 1996.

MILHEM, M. M.; AL-HIYASAT, A. S.; DARMANI, H. Toxicity Testing of Restorative Dental Materials Using Brine Shrimp Larvae (*Artemia salina*). **J. Appl. Oral Sci.** [online], vol.16, n.4, pp. 297-301, 2008.

MEYER, B.N.; FERRINGI, N. R.; PUTMAM, J. B.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D.E.; McLAUGHLIN, J. L.; Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, Vol. 45, p. 31-34, 1982.

MOBOT: <http://www.tropicos.org/Name/50168724?tab=subordinatetaxa>, acesso em maio de 2014

MOBOT: <http://www.tropicos.org/Name/50168724?tab=maps>, acesso em maio de 2014

MOBOT: <http://www.tropicos.org/Name/40009472?tab=maps>. Acesso em maio de 2014

MOURA, C.O.; ABSY, M.L.; SANTOS, F.A.R. & MARQUES-SOUZA, A.C. Morfologia polínica de espécies de várzea e de igapó da Amazônia Central. **Acta Amazônica**, 34: 15-19. 2004.

MULABAGAL, V.; WANG, H.; NGOUAJIO, M.; NAIR, M. G. Characterization and quantification of health beneficial anthocyanins in leaf chicory (*Chicorium intybus*) varieties. **European Food Reserch Technology**, v. 230, p. 47-53, 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NEWMAN, D. J.; GRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geograficos, legais e eticos. In: SIMOES, C. M. O., *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: editora da UFSC, 2004.

OLLIARO, P. Mode of action and mecanismos resistance for antimalarical drug. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 89, p. 207-219, 2001

PASCUAL-TERESA, S.; SANCHEZ-BALLESTA, M. T. Anthocynins: from plant to health. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, p. 281-299, 2008.

PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S; SARDIÑAS, I.G; BUELA, L.I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine.**, v. 8(5), p. 395-400, 2001

PEREIRA, A. de C. **Prospecção fitoquímica de *Unxia kubitzkii* H.ROB., e estudo da atividade citotóxica utilizando *Artemia salina* LEACH**, Rio de Janeiro, Universidade Castelo Branco. Curso de Ciências Biológicas. 2006.

PIACENZA, L. P. L.; PEGEL, K. H.; PHILLIPS, L.; WAIGHT, E. S. BEYERANE. Diterpenes : Structure and Reactivity of the α -Ketol ent-3p- Hydroxybeyer-I 5- eneo2,12-dione, its Corresponding Diosphenol, and Synthesis of the Isomeric α -KetoI Acetates **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**. I. p. 1004-1012. 1979.

PIACENZA, L. P.L; PEGEL, K.H; LAING, M. WAIGHT, E. S.;WEEKS, C.M; GORST-ALLMAN, C.P. A new atisane diterpene: ent -16 α -hydroxyatis-13-en-3-one from

Androstachys johnsonii prain. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**, pp.703-709, 1985

POTTERAT, O. Antioxidants and free radical scavengers of natural origin. **Current Organic Chemistry**, 1, 415, 1997.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 27(1): 53-60, jan.- mar. 2007.

SANCHES –MORENO, C. Review: methods used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Sci. Tech. Int.**, 8 (3), 121 - 137, 2002.

SANTOS, M. A. C.; COELHO-FERREIRA, M. Inventário de espécies medicinais empregadas pelo IEPA, Macapá-AP. **Amazônia: Ci. & Desenv.**, Belém, v.1, n.1, jul.-dez. 2005.

SCHWARZ, M.; HILLEBRAND, S.; HABBEN, S.; DEGENHARDT, A.; WINTERHALTER, P. Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of anthocyanins. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14, p. 179-189, 2003.

SECCO, R.; CORDEIRO, I. *Picrodendraceae*: In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB38587>>. Acesso em: 25 Mar. 2014

SILVA, C. G.; HERDEIRO, R. S.; MATHIAS, C. J.; Panek, A. D.; Silveira, C. S.; Rodrigues, V. P.; Rennó, M. N.; Falcão, D. Q.; Cerqueira, D. M.; Minto, A. B. M.; Nogueira, F. L. P.; Quaresma, C. H.; Silva, J. F. M.; Menezes, F. S.; Eleutherio, E. C. A. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. **Pharmacological research**. v. 52, p. 229 – 233, 2005.

SILVA, R.M.G. **Efeito Trypanossoma cruzi do extrato bruto de *Mandevilla velutina* (Apocinaceae) na infecção de camundongos.** Tese de mestrado, Pós-graduação. 162 p. Departamento de Ciências Biológicas. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia. 1999.

SHEPHERD, G.J. Plantas terrestres. In. Lewinsohn, T.M. (org.). **Avaliação do estado do conhecimento da biodiversidade brasileira.** Série Biodiversidade 15(2): 145–192. 2005.

SHIN, W-H.; PARK, S-J.; KIM, E-J. Protective effect of anthocyanins in middle cerebral artery occlusion and reperfusion model of cerebral ischemia in rats. **Life Science**, v. 79, p. 130-137, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento.** Porto Alegre/ Florianópolis, Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.

SOARES, I. S.; RODRIGUES, M. M. Malaria vaccine: roadblocks and possible solutions. **Braz. J. Med. Biol. Res**, Ribeirão Preto, n. 31, p. 317, 1998.

STROBEL, G. A.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, n. 4, p. 491 -502. 2003.

STROBEL, G. A.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.

SUTTER, D. M.; FORSTER, P. I.; ENDRESS, P. K. Female flowers and systematic position of Picrodendraceae (Euphorbiaceae s.l., Malpighiales).(Author abstract) Sutter, D. Merino ; Forster, P. I. ; Endress, P. K. **Plant Systematics and Evolution**, Vol.261(1), p.187, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** Porto Alegre, Artmed, 2009.

VALDES, Aymé Fernández-Calienes. *In vitro* antimalarial activity and cytotoxicity of some selected cuban medicinal plants. **Rev. Inst. Med. Trop.**, vol.52, n.4, pp. 197-201, 2010

VANNUCCHI, H.; MOREIRA, E. A. M.; CUNHA, D. F.; JUNQUEIRA-FERNACO, M. V. M.; BERNARDES, M. M.; JORDAO JUNIOR, A. A. Role of nutrients on lipid peroxidation and antioxidant defense system. **Medicina Ribeirao Preto**, v. 31, p. 31- 44, 1998.

VEIGA JUNIOR, Valdir F.; PINTO, Angelo C.; MACIEL, Maria Aparecida M.. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, June, 2005.

YOUNES, R. N.; VARELLA, A. D.; SUFFREDINI, I. B. Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from Brazilian plant extracts using high throughput screening. **Clinics**, v. 62, n. 6, p. 763-768, 2007.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report**, 2001.

WORBES, M.; KLINGER, H.; REVILLA, J. D.; MARTINS, C. On dynamics, floristic subdivision and geographical distribution of várzea forest in Central Amazonia. **Journal of Vegetation Science**. Vol 3, p. 553-564, 1992.

WURDACK, K. J.; HOFFMANN, P.; SAMUEL, R.; DEBRUIJN, A.; VANDERBANK, M; CHASE, M.W. 2004. Análise filogenética molecular de Phyllanthaceae (Phyllanthoideae pró contraditório, Euphorbiaceae sensu lato) usando plastídeo seqüências de DNA rbcL. **Amer. J. Bot.** 91: 1882-1900.