



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
ESCOLA SUPERIOR CIÊNCIAS DA SAÚDE - ESA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA -
PROPESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA - MBT**

**ESTUDO QUÍMICO E BIOATIVIDADE DE *Piranhea trifoliata*
(PICRODENDRACEAE).**

MANOEL FEITOSA JEFFREYS

**Manaus – AM
2011**

MANOEL FEITOSA JEFFREYS

**ESTUDO QUÍMICO E BIOATIVIDADE DE *Piranhea trifoliata*
(PICRODENDRACEAE).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da UEA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais, área de concentração em Biotecnologia.

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a: Cecilia Veronica Nunez

**Manaus – AM
2011**

Ficha Catalográfica

J46 Jeffreys, Manoel Feitosa

Estudo químico e bioatividade de Piranha trifoliata

(Picrodendraceae). /Manoel Feitosa Jeffreys. -- Manaus: Universidade do Estado do Amazonas, 2011.

121. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado Amazonas - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, 2011. Orientadora: Dr^a. Cecília Verônica Nunez.

Ficha catalográfica elaborada por

Maria Eliana N. Silva – CRB- 11/248





GOVERNO DO ESTADO DO AMAZONAS

**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PROPESP
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA – MBT**

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO
ALUNO **MANOEL FEITOSA
JEFFREYS** EM BIOTECNOLOGIA E
RECURSOS NATURAIS.

Aos vinte e nove dias do mês de setembro do ano de dois mil e onze, às quatorze horas e trinta minutos, realizou-se no auditório do Curso de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais, localizado no 4º andar do prédio anexo da Escola Superior de Ciências da Saúde, na Avenida Carvalho Leal, número 1777, Cachoeirinha, a Defesa Pública da Dissertação de Mestrado de **MANOEL FEITOSA JEFFREYS**, sob o título “**Estudo químico e bioatividade dos extratos e frações de *Piranhea trifoliata* Baill (Picrodendraceae)**”, requisito exigido para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais, tendo como orientadora a Dra. Cecília Veronica Nunez, segundo encaminhamento da documentação à Coordenação do Curso e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas - UEA. A banca examinadora foi constituída pelos seguintes Professores: Dra. Cecília Veronica Nunez (Presidente), Dra. Sandra Patrícia Zanotto (membro), e a Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza (membro). Após as arguições e encerrada a sessão de defesa, os membros examinadores emitiram o parecer final sobre a defesa da dissertação de mestrado, tendo o aluno sido APROVADO conforme o parecer da referida banca examinadora.


Dra. Cecília Veronica Nunez
CPF: 219.679.728-90


Dra. Sandra Patrícia Zanotto
CPF: 933.60.389-49


Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza
CPF: 242.657.302-30

Aos meus pais, M^a Francisca e
Manoel, pelo amor incondicional
e que nunca mediram esforços
para que meu sonho se
realizasse.

AGRADECIMENTOS

O aprendizado conquistado foi muito mais que a dissertação de mestrado, no entanto a convivência do dia-dia com os colegas do MBT, PPGQ, "Lab. 1 e 2", professores, companheiros e amigos, foi o que me fez crescer e aprende verdadeiramente o que este período significou em minha vida. Em algumas conversas, desacertos, teimosias, alegrias, tristezas momentos de dificuldades fizeram de mim uma pessoa renovada e isso eu agradeço a cada um que participou dessa caminhada que só está começando.

Agradeço:

Profundamente a Deus, que iluminou a todos os meus passos nessa trajetória, permitindo assim a conquista de mais etapa.

À minha orientadora, Profa Dra. Cecilia Veronica Nunez, pelos ensinamentos, confiança, apoio, responsabilidade, dedicação e constante incentivo dispensado na realização deste trabalho.

Aos meus pais pelo total apoio e compreensão, Vocês são o alicerce da minha vida!

Ao professor Dr. Takeshi Matsuura, da UFAM, pela colaboração na realização dos ensaios antimicrobianos, em especial à Jaqueline Andrade, Virgínea e Paula pela ajuda com os ensaios biológicos.

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

A Lorena Cursino (Lory), obrigado pelos conselhos, por me ensinar, me ouvir, discordar e filosofar comigo durante muitas aulas e no dia-a-dia no Lab.1, você é uma pessoa pura e dona de um coração enorme. Muito obrigado! A Daiane Martins pela amizade, pelas conversas que centralizaram meus pensamentos, conselhos e compreensão.

A Luana Monteiro (Lua) apesar do "abuso" da intimidade e "chatice", eu sou "obrigado" a agradecer por você nunca dizer não pra mim, por sempre me acompanhar nos almoços por me dar incentivo na realização do meu trabalho mesmo não sabendo muita coisa da área "...seisterpenos, seteterpenos..rsrsr.", e , principalmente por cuidar de mim. Eu tenho a maior consideração pela nossa amizade e te desejo muito sucesso.

A Vanuza Santos (Vana) por me incentivar a não desistir, me reforçar que "vai dar tudo certo", "é assim mesmo", por fazer parte da minha vida desde a graduação "a lei zero da termodinâmica", de todos os momentos tristes e alegres, principalmente por ouvir as minhas aflições experimentais. Agradeço-te profundamente.

Aos meus amigos do laboratório Nerilson, Jaciara, pelo companheirismo, ajuda nos "sábados e feriados" e pelas risadas constantes nos momentos de descontração. Agradeço também: Orleylson, Francislane, David, Joyce, Claudia, Taciane, Karen, Maria Izabel, Kissinara, Gisele, Orlando, Gabriela, Sebastian, Virgínia, Júlio Souza, Júlio Nino que contribuíram para um ótimo ambiente de trabalho.

Aos professores do MBT-UEA, pelos ensinamentos e pela disposição sempre.

Ao CNPq/CT-Agro, FAPEAM, pelo apoio financeiro para realização deste projeto.

Àqueles que mesmo de passagem deixaram um pouco de si, obrigado!
Se levaram alguma coisa de mim, devolvam!!! Hehehe.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISAO DA LITERATURA | 3 |
| 2. 1. Produtos naturais biologicamente ativos | 3 |
| 2.2. Atividade antimicrobiana | 8 |
| 2.3. Atividade antimalárica | 10 |
| 2.4. Atividade citotóxica | 12 |
| 2.5. Atividade antioxidante | 13 |
| 2.6. A família Euphorbiaceae | 17 |
| 2.7. Gênero <i>Piranhea</i> | 27 |
| 2.8 <i>Piranhea trifoliata</i> | 30 |
| 3 OBJETIVOS | 32 |
| 3.1. Objetivo geral | 32 |
| 3.2. Objetivos específicos | 32 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 33 |
| 4.1. Metodologia | 33 |
| 4.1.1. Coleta do material vegetal e preparo dos extratos | 33 |
| 4.1.1.1. Coleta | 33 |
| 4.1.1.2. Preparo dos extratos | 34 |
| 4.1.2. Análise cromatográfica dos extratos | 37 |
| 4.1.2.1. Partição líquido-líquido | 38 |
| 4.1.2.2. Partição líquido-líquido do extrato metanólico dos galhos da coleta de número 1 | 38 |
| 4.1.2.2.1. Fracionamento das fases obtidas dos extratos metanólicos dos galhos da primeira coleta | 39 |
| 4.1.2.2.2. Fase diclorometânica do extrato dos galhos da primeira coleta | 39 |
| 4.1.2.2.3. Fase butanólica do extrato metanólico dos galhos da primeira coleta | 42 |
| 4.1.2.3. Fracionamento do extrato diclorometânico das folhas da segunda coleta | 43 |
| 4.1.3. Ensaio Biológicos | 53 |

| | |
|--|----|
| 4.1.3.1. Verificação de atividade antimicrobiana | 53 |
| 4.1.3.2. Verificação da atividade antimalárica | 55 |
| 4.1.3.3 Teste de citotoxicidade utilizando <i>Artemia salina</i> | 56 |
| 4.1.3.4. Ensaio antioxidante - metodologia empregando o DPPH | 58 |
| 5. RESULTADOS PARCIAIS E DISCUSSÃO | 60 |
| 5.1. Análises cromatográficas e fracionamento dos extratos | 60 |
| 5.2. Determinação estrutural das substâncias isoladas | 63 |
| 5.2.1. 28-hidroxi-friedelin-3-ona | 63 |
| 5.2.2. Substância 2 com características de triterpeno | 70 |
| 5.3. Ensaio Biológicos | 73 |
| 5.3.1 Atividade antimicrobiana contra <i>Aeromonas hydrophila</i> | 73 |
| 5.3.1.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (MBC). | 78 |
| 5.3.2. Atividade antimalárica dos extratos vegetais. | 79 |
| 5.3.3. Atividade citotóxica frente ao microcrustáceo <i>Artemia salin</i> | 82 |
| 5.3.4. Atividade Antioxidante | 86 |
| 6. CONCLUSÕES | 91 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 93 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Metabólitos secundários isolados da família Euphorbiaceae | 19 |
| Tabela 2. Substâncias isoladas do gênero <i>Androstachys</i> | 24 |
| Tabela 3. Substâncias isoladas do gênero <i>Petalostigma</i> | 26 |
| Tabela 4. Substâncias isoladas de <i>Celaenodendron mexicana</i> | 28 |
| Tabela 5. Massa dos extratos obtidos das folhas de <i>Piranhea trifoliata</i> | 35 |
| Tabela 6. Massa dos extratos obtidos dos galhos de <i>Piranhea trifoliata</i> | 36 |
| Tabela 7. Massa dos extratos obtidos das casca de <i>Piranhea trifoliata</i> | 36 |
| Tabela 8. Massa dos extratos obtidos dos caules de <i>Piranhea trifoliata</i> | 37 |
| Tabela 9. Eluentes utilizados para o fracionamento da fase DCM. | 40 |
| Tabela 10. Eluentes utilizados no fracionamento 2FoDCM | 44 |
| Tabela 11. Eluentes utilizados para o fracionamento de (2FoDCM).(5-7).(5-7) | 48 |
| Tabela 12. Dados de RMN de ¹³ C da 28-hidroxi-friedelin-3-ona comparados com a literatura (MAHATO & KUNDU,1994) | 64 |
| Tabela 13 - Resultados da atividade das folhas contra a bactéria <i>Aeromonas hydrophila</i> | 74 |
| Tabela 14 - Resultados da atividade dos galhos contra a bactéria <i>Aeromonas hydrophila</i> | 75 |
| Tabela 15 - Resultados da atividade dos caules contra a bactéria <i>Aeromonas hydrophila</i> | 76 |
| Tabela 16 - Resultados da atividade das cascas contra a bactéria <i>Aeromonas hydrophila</i> | 77 |
| Tabela 17. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). | 78 |
| Tabela 18. Atividade antimalárica contra <i>P. falciparum</i> das folhas de <i>P. trifoliata</i> | 80 |
| Tabela 19. Atividade antimalárica contra <i>P. falciparum</i> dos galhos de <i>P. trifoliata</i> | 81 |
| Tabela 20. Atividade antimalárica contra <i>P. falciparum</i> dos calhes de <i>P. trifoliata</i> | 81 |

| | |
|--|----|
| Tabela 21. Atividade antimalárica contra <i>P. falciparum</i> das cascas de <i>P. trifoliata</i> | 82 |
| Tabela 22. Teste de citotoxicidade das folhas realizado frente ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i> . | 83 |
| Tabela 23. Teste de citotoxicidade dos galhos realizado frente ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i> . | 84 |
| Tabela 24. Teste de citotoxicidade dos caules realizado frente ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i> . | 85 |
| Tabela 25. Teste de citotoxicidade das cascas realizado frente ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i> . | 85 |
| Tabela 26. Resultados dos extratos das folhas de <i>Piranhea trifoliata</i> quanto ao seu potencial antioxidante | 87 |
| Tabela 27. Resultados dos extratos dos galhos de <i>Piranhea trifoliata</i> quanto ao seu potencial antioxidante | 88 |
| Tabela 28. Resultados dos extratos dos caules de <i>Piranhea trifoliata</i> quanto ao seu potencial antioxidante | 89 |
| Tabela 29. Resultados dos extratos dos caules de <i>Piranhea trifoliata</i> quanto ao seu potencial antioxidante | 29 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 Fatores que influenciam no teor de metabólitos secundários | 5 |
| Figura 2. Substâncias isoladas de plantas com potencial terapêutico | 6 |
| Figura 3. Esquema de estudo e via de biossíntese das principais classes de metabólitos secundário | 7 |
| Figura 4. Aminoácidos que originam as substâncias fenólicas. | 14 |
| Figura 5. Substâncias antioxidantes: (1) ácido gálico, (2) BHA, (3) BHT, (4) quercetina, (5) α -tocoferol e (6) β -caroteno | 15 |
| Figura 6. Exsicata e folhas verdes de <i>Piranhea trifoliata</i> | 30 |
| Figura 7. Coleta do material vegetal | 33 |
| Figura 8. Preparo dos extratos vegetais de <i>Piranhea trifoliata</i> | 35 |
| Figura 9. Fluxograma da partição e frações obtidas. | 41 |
| Figura 10. Fracionamento da fase BuOH. | 42 |
| Figura 11. Frações obtidas da coluna (5-7). | 45 |
| Figura 12. Análise me CCDC da fração (2FoDCM).(5-7).(2).(5).(3) que contem a substância 1. | 46 |
| Figura 13 Fluxograma das frações do extrato diclorometânico das folhas da segunda coleta. | 47 |
| Figura 14. Análise em CCDC da fração (4).(1) que contem a substância 2 | 49 |
| Figura 15. Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração (5-7). | 49 |
| Figura 16. Análise em CCDC da fração (7).(4) que contem a substância 3 | 50 |
| Figura 17. Fluxograma do isolamento da fração (5-7).(7).(4). | 50 |
| Figura 18. Espectro de RMN de ^1H da substância (5-7).(7).4. | 52 |
| Figura 19A. Esquema de realização do ensaio antimicrobiano. | 53 |
| Figura 19B: Esquema da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). | 55 |
| Figura 20. Esquema de realização do ensaio tóxico | 57 |
| Figura 21. Esquema de realização do ensaio antioxidante | 58 |
| Figura 22. Placas cromatográficas reveladas com anisaldeido sulfúrico | |

| | |
|--|----|
| (A); cloreto férrico (B) e cloreto de alumínio (C) eluidas com Hexano/Acetona 8:2. | 61 |
| Figura 23: Placa cromatográfica visualizada em UV – 254 eluidas com DCM/hexano 8:2. | 62 |
| Figura 24. Placas cromatográficas reveladas com cloreto férrico (A) e cloreto de alumínio (B) eluidas com Acetona/MeOH 2:8. | 62 |
| Figura 25. Estrutura de 28-hidroxi-friedelin-3-ona | 64 |
| Figura 26. Espectro de RMN de ^1H do 28-hidroxi-friedelin-3-ona | 65 |
| Figura 27. Expansão do espectro de RMN de ^1H do 28-hidroxi-friedelin-3-ona. | 66 |
| Figura 28. Espectro de RMN de ^{13}C do 28-hidroxi-friedelin-3-ona. | 67 |
| Figura 29. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C do 28-hidroxi-friedelin-3-ona. | 68 |
| Figura 30. Espectro de RMN de DEPT do 28-hidroxi-friedelin-3-ona. | 69 |
| Figura 31. Espectro de RMN de ^1H da substância (5-7).(7).(4). | 71 |
| Figura 32. Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância (5-7).(7).(4). | 72 |
| Figura 33. Resultado da atividade frente à <i>Aeromonas hydrophila</i> A = placa vista de frente; B = placa vista pelo lado de trás. | 73 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOET – Acetato de etila

BuOH – Butanol

BHA - 3-terc-butil-4-hidroxianisol

BHT - 2-terc-butil-4-hidroxianisol

CCD – Cromatografia em Camada delgada

CCDC - Cromatografia em Camada delgada comparativa

CCDP - Cromatografia em Camada delgada preparativa

CG – Cromatografia em Fase Gasosa

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CL₅₀ – Concentração Letal de 50% dos indivíduos

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CMB – Concentração Mínima Bactericida

CPBO – Coordenação de Pesquisa em Botânica

CP – Controle positivo

CN – Controle negativo

DCM – Diclorometano

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio

MeOH – Metanol

R_f – Fator de retenção

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

UV – Ultra-violeta

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo o estudo químico dos extratos de *Piranhea trifoliata* (PICRODENDRACEAE) e a avaliação do seu potencial frente aos ensaios antimicrobiano, antioxidante, antimalárico e tóxico. Para a pesquisa foram realizadas quatro coletas na Volta Grande do Xingú (Altamira), PA, em épocas distintas. O material coletado foi seco em temperatura ambiente, triturado, pulverizado e extraído com diclorometano (DCM), primeira e segunda coleta, metanol (MeOH) e água (H₂O), sendo realizadas três extrações por 20 minutos em ultrassom com cada solvente. O material vegetal da terceira e quarta coleta foram extraídos com o hexano como seu primeiro solvente. Os extratos DCM das folhas, talo da folha, galhos e caules apresentaram indícios de terpenos quando revelados com sulfato cérico, bem como os extratos hexânicos, os extratos MeOH das folhas, galhos, casca, caule e os aquosos das folhas, talo das folhas, galho, cacas e caules apresentaram características de compostos fenólicos quando revelados com cloreto férrico. O estudo fitoquímico das folhas de *Piranhea trifoliata* da segunda coleta forneceu o triterpeno: 28-hidroxi-friedelin-3-ona, identificado por RMN de ¹H e de ¹³C e outra substância característica de triterpeno quando analisado por RMN de ¹H. Quanto à atividade antimicrobiana frente a *Aeromonas hydrophila*, apresentaram atividade os extratos MeOH e H₂O dos talos das folhas (1^a coleta), MeOH galhos (1^a coleta), MeOH e H₂O dos caules (2^a coleta). Quanto a Concentração Inibitória Mínima (CIM) o menor valor encontrado foi de 2,5 mg/mL para os extratos MeOH e H₂O dos caules e talos das folhas (2^a coleta) e a fase AcOEt dos galhos (1^a coleta), quanto a Concentração Mínima Bactericida (CMB) o menor valor encontrado foi de 5 mg/mL para a fase AcOEt dos galhos (1^a coleta). Quanto a atividade antimalárica frente a *P. falciparum* apresentaram atividade os extratos MeOH das folhas e galhos (1^a coleta), MeOH e H₂O dos caules e folhas (2^a coleta), Hexânicos e MeOH das folhas, galhos e cascas (3^a coleta) e os MeOH das folhas e galhos (4^a coleta). Quanto a atividade antioxidante utilizando ao radical DPPH apresentaram atividade os extratos MeOH e H₂O das folhas e galhos (1^a coleta), MeOH e H₂O das folhas, talo das folhas, caule e casca (2^a coleta), MeOH das folhas e cascas (3^a coleta), e MeOH dos galhos (4^a coleta).

Palavras chave: Piranhea trifoliata, fitoquímica, bioatividade.

ABSTRACT

This work aimed to study the chemical extracts of *Piranhea trifoliata* (PICRODENDRACEAE) and its potential antimicrobial tests ahead, antioxidant, antimalarial and toxic. For the research was carried out on the four collections in the Volta Grande of Xingu (Altamira), PA, in epoch different. The collected material was dried at room temperature, crushed, pulverized and extracted with dichloromethane (DCM), the first and second sample, methanol (MeOH) and water (H₂O), and three extractions performed by ultrasound in 20 minutes with each solvent. The plant material collected in the third and fourth were extracted with hexane solvent as its first. The DCM extracts of the leaves, leaf stems, twigs and stems showed signs of terpenes revealed when ceric sulfate, and the leaf extracts, the MeOH extracts of the leaves, twigs, bark, stem and the aqueous leaf, stem leaves, branch, and stems showed characteristics of phenolic compounds when revealed with ferric chloride. Phytochemical study of leaves of *Piranhea trifoliata* provided a triterpene: 28- hydroxy-Friedelin-3-one, identified by NMR of ¹H and ¹³C and another substance characteristic of triterpenes was analyzed by ¹H NMR. As for antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*, showed activity MeOH and H₂O extracts of the stems of the leaves (first collection), MeOH branches (1st gathering), MeOH and H₂O of stems (2nd collection). The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) the lowest value found was 2,5 mg/mL to H₂O and MeOH extracts of the stems and leaf stalks (2nd collection) and the AcOEt phase of the branches (1st collection), as the Minimum Bactericidal Concentration (CMB), the lowest value found was 5 mg/mL of AcOEt phase branches (1st collection). The antimalarial activity against *P. falciparum* showed activity extracts MeOH leaves, branches (1 st Collection), MeOH and H₂O of stems and leaves (2nd collection), hexanes and MeOH leaves, bark and branches (3rd Collection) and MeOH from the leaves and branches (4th collection). The antioxidant activity using the radical DPPH showed activity extracts MeOH and H₂O of leaves and branches (1 st Collection), MeOH and H₂O of leaves, stem and bark (2nd collection), MeOH leaves and bark (3rd Collection), and branches of MeOH (4 th collection).

Keywords: *Piranhea trifoliata*, phytochemistry, bioactivity

1. INTRODUÇÃO

As plantas são uma das mais importantes fontes de substâncias orgânicas, apresentando variadas classes químicas com propriedades biológicas. Na busca por novas fontes de medicamento, os produtos naturais destacam-se pela diversidade estrutural e, assim, as plantas são de grande importância para a prospecção de novos compostos bioativos (GIORDANI, 2008).

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

Os resultados positivos obtidos com a utilização de plantas sem caráter científico levaram o homem conhecer mais o seu meio ambiente e buscar no meio outras para o tratamento de diversas enfermidades, e a experiência acumulada foi transmitida por inúmeras gerações, levando ao descobrimento de alguns dos mais valiosos medicamentos utilizados na medicina moderna como a morfina e a quinina (SIMÕES, 1986).

A riqueza da biodiversidade da flora brasileira, associada aos levantamentos etnobotânicos, etnofarmacológicos, farmacognósticos e fitoquímicos, permitiu aos pesquisadores isolar compostos biologicamente ativos a partir de diferentes espécies vegetais, os quais podem ser usados como modelos tanto para a síntese de fármacos quanto de outros produtos para aplicação agrícola ou florestal (GUERRA; NODARI, 2001).

Entre os biomas brasileiros, a Floresta Amazônica destaca-se no fator biodiversidade, a Amazônia estende-se por nove estados brasileiros e ocupa 60% do território nacional (BORGES et. al., 2004), com mais de cinco milhões de quilômetros quadrados, apresentando várias espécies vegetais que não foram anteriormente estudadas fitoquimicamente, assim como suas potenciais aplicações também permanecem ocultas.

As Euphorbiaceae têm tido um papel muito significativo nas pesquisas fitoquímicas, em especial na determinação de novos compostos farmacologicamente ativos (BITTNER et al., 2001). Na família são comuns os terpenos em especial os triterpenos, do tipo curcubitacina. Na medicina tradicional, o uso da família Euphorbiaceae é muito comum ao longo do desenvolvimento da própria humanidade. Um exemplo é a espécie *Euphorbia fischeriana*, que vêm sendo utilizada há mais de 2.000 anos na China para o tratamento do câncer (DEI-JI et al., 1991).

Assim, o presente projeto objetiva realizar o estudo fitoquímico de extratos da espécie *Piranhea trifoliata* Baill, assim como avaliar as atividades antimicrobiana, citotóxica e antioxidante dos extratos dessa espécie.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. 1. Produtos naturais biologicamente ativos.

Desde a antiguidade o homem tem usado fontes vegetais, para o tratamento de doenças infecciosas comuns, sendo que algumas dessas, ainda estão em prática no tratamento habitual de vários males (HEINRICH, et al., 2004; DUARTE, 2005).

Os primeiros relatos sobre a utilização de plantas medicinais, com fins terapêuticos, estão disponíveis no código de Hamurabi (2.000 a.C.), no manuscrito egípcio “Ebers Papyrus” (1.500 a.C.), e na obra Universo Medicina de Penadio Dioscorides (40 – 90 d.C) (SIANI, 2003; DUARTE, 2006).

Nesse contexto a Floresta Amazônica destaca-se no fator biodiversidade, no qual abriga uma grande diversidade de plantas medicinais ricas para a bioprospecção de produtos naturais biologicamente ativos, com isso o número de pesquisadores fitoquímicos vem crescendo e se tornando importante para o Brasil tendo em vista que sua grande riqueza vegetal ainda encontra-se sem estudo (CECHINEL FILHO & YUNES, 2001).

Dentre as informações relativas à utilização empírica dessas fontes vegetais, podem ser citados, por exemplo, o uso da infusão da soja para o tratamento de furúnculos, carbúnculos e outras infecções cutânea que ocorrem na China há 2.500 a.C., o emprego do mel em feridas infectadas há 2.000 a.C. no Egito, entre outras (ACUNAL, 2003).

De acordo com Fetrow e Ávila (1999), plantas medicinais são aquelas que possuem em sua composição, substâncias químicas, sintetizadas a partir de

nutrientes, água e luz que provocam no organismo, reações que podem variar entre a cura e o abrandamento de doenças, através do teor da ação de princípios ativos.

Diversas culturas utilizam plantas medicinais no tratamento de enfermidades, especialmente nas áreas rurais de países em desenvolvimento (ARAÚJO e LEON, 2001; MACIEL et al., 2002; WHO, 2001; COUTINHO et al., 2004). De acordo com Lima (2001), as pesquisas por princípios ativos naturais, derivados de plantas, buscam a obtenção de princípios ativos contidos nas espécies vegetais, pelo fato de possuírem alto índice de diversidade molecular. Esta diversidade pode servir de modelo para uma produção de novos fármacos.

Princípios ativos são substâncias que exercem efeito farmacológico ou terapêutico (NOLDIN, et. al., 2003). Nos vegetais, eles podem ser produzidos nas flores, folhas, raízes, frutos, caules e cascas (SANTOS, 2004) e sua concentração não é homogênea, variando de acordo com o habitat, parte da planta e a sazonalidade (NOLDIN, et. al., 2003), (Figura 1).

Para a criação de diversos medicamentos originados de um produto natural, geralmente extraído de um vegetal, é necessário passar por diversas modificações chegando a um produto que, aparentemente, tem pouca relação com o seu precursor natural (ROBBERS, SPEEDIE e TYLER, 1997) e (ALBAGLI, 2001).

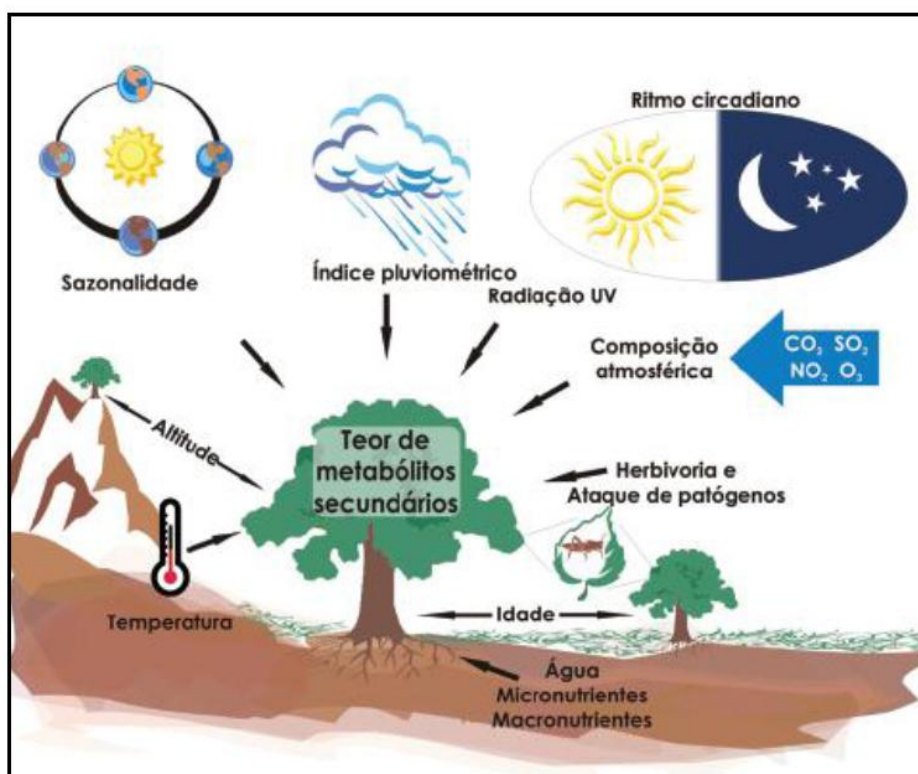
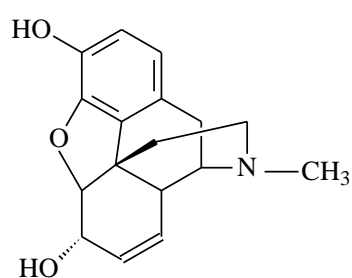


Figura 1. Fatores que influenciam no teor de metabólitos secundários.
 Fonte: Gobbo-Neto e Lopes, 2007.

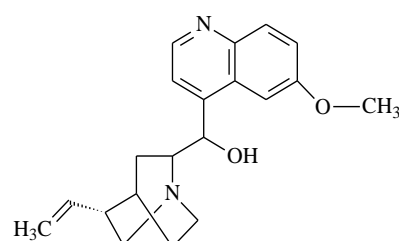
Os princípios ativos são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas, produtos estes que, mesmo não sendo necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para a sobrevivência e perpetuação da espécie no ambiente em que vive. Estas substâncias pertencem a várias classes químicas, dentre estas podemos citar os heterosídeos cianogênicos, fenóis, triterpenóides (e seus derivados metabólicos, os esteróides), taninos, alcalóides, dentre outros (SANTOS, 2004).

Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas tiveram um papel fundamental no desenvolvimento da química orgânica sintética moderna. Historicamente, tal desenvolvimento ocorreu paralelamente ao estudo de

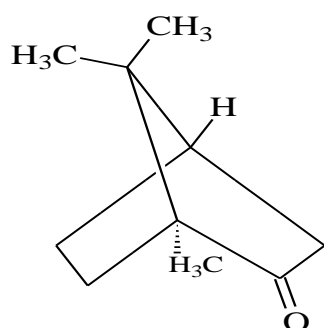
plantas, principalmente a partir do século XIX, quando foram registrados os primeiros estudos sobre plantas com base científica. Isso resultou no isolamento de alguns princípios ativos de plantas (Figura 2), e que até hoje ainda são muito empregados no tratamento de certas doenças, a exemplo de morfina (Figura 2A), quinina (Figura 2B), cânfora (Figura 2C) e cocaína (Figura 2D) (Montanari & Bolzani, 2001).



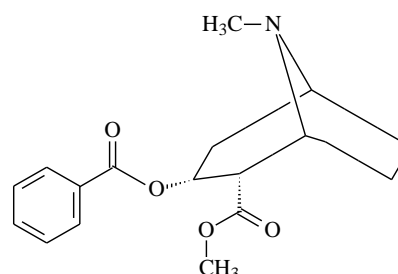
(A) Morfina



(B) Quinina



(C) Cânfora



(D) Cocaína

Figura 2. Substâncias isoladas de plantas com potencial terapêutico.

A produção desses metabólitos começa a partir da divisão entre metabólitos primários e secundários, em que os metabólitos secundários são substâncias orgânicas micromoleculares que podem ser isolados com o objetivo de identificação ou elucidação dos mesmos, sendo que esses

metabólitos secundários são classificados de acordo com as seguintes rotas metabólicas: Acetato, Chiquimato, Mevalonato e a rota independente do mevalonato, Desoxixilulose (ROBBERS, SPEEDIE e TYLER, 1997; SIMÕES et al., 2004) (Figura 3).

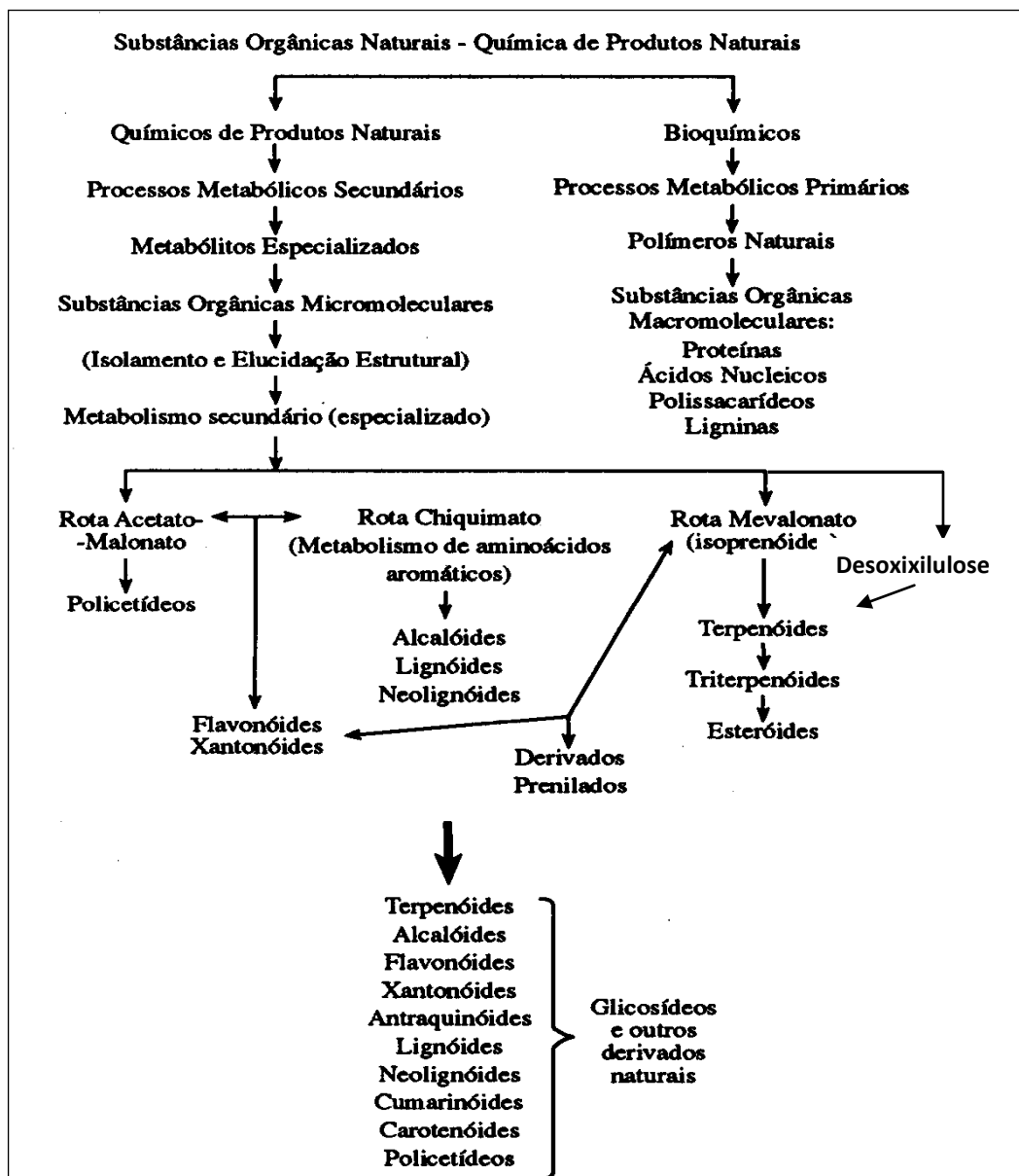


Figura 3. Esquema de estudo e via de biossíntese das principais classes de metabólitos secundários. Fonte: Simões *et al.*, 2004; Devick, 2002.

2.2. Atividade antimicrobiana

As florestas tropicais são as regiões que abrigam a maior diversidade de espécies florestais de grande interesse, devido às características favoráveis apresentadas. Sendo assim, existem várias espécies vegetais que podem ser portadoras de princípios ativos, com potencial terapêutico contra várias doenças.

Os princípios ativos naturais possuem metabólitos que exercem funções como, por exemplo, a defesa contra herbívoros, a atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes, alelopatia, dentre outras (SANTOS, 2004; MALHEIROS; PERES, 2001). Estudos mostram que plantas com estas classes de metabólitos apresentam efeito terapêutico contra várias doenças, principalmente no que diz respeito a doenças causadas por agentes bacterianos (CUNICO et al., 2006; TANAKA et al., 2005).

Isso adquire grande importância, visto que, os antibacterianos disponíveis no mercado estão se tornando cada vez mais ineficientes graças ao aparecimento de cepas com resistência a seus princípios ativos, o que tem gerado uma preocupação mundial. Os agentes antimicrobianos podem manifestar sua atividade através de vários mecanismos: lesão da parede celular, alterações da permeabilidade celular, alterações das moléculas de proteínas e ácidos nucleicos e inibição da síntese de ácidos nucleicos (LIMA, 2001).

As drogas antimicrobianas podem ser classificadas como bactericidas, quando matam o microrganismo, ou bacteriostáticas, quando impedem o

crescimento do mesmo. No caso das drogas bacteriostáticas, o hospedeiro se defende por si, utilizando mecanismos como a fagocitose e a produção de anticorpos, normalmente destruindo o microrganismo (TORTORA et al., 2005).

São inúmeros os relatos na literatura a respeito de espécies vegetais com atividade contra agentes bacterianos (BEHERA et al., 2008; LOGUERCIO et al., 2005; MAHASNEH; EL-OQLAH, 1999; SISTI et al., 2008). Várias pesquisas estão sendo realizadas com o objetivo de purificar e identificar substâncias de origem vegetal com propriedades antibacterianas.

A resistência bacteriana é um fenômeno natural entre os microrganismos, mas o uso indiscriminado de medicamentos tem acentuado este problema. Bactérias do gênero *Aeromonas* são responsáveis por grandes perdas na piscicultura, muitas vezes aparecendo como agente primário causador de lesões ulcerativas e septicemia hemorrágica em peixes de água doce (GHENGHESH et al., 2001; RADU et. al., 2003; SAHA; PAL, 2002; SOUZA; SILVA-SOUZA, 2001). Estas são bacilos ou coco-bacilos, Gram-negativas, anaeróbios facultativas, não esporulantes (ROBERTS, 1993) e que também está se tornando cada vez mais resistente aos antibióticos usados tradicionalmente (HATHA et al., 2004), (AKINBOWALE et al., 2007), (RICHARDS; ROBERTS, 1978).

A *Aeromonas hydrophila* possui como características ser tipicamente oportunista, patogênica facultativa, que quando há desequilíbrio dos sistemas bactéria-hospedeiro-ambiente, podem desencadear o aparecimento de doenças (PAVANELLI et al., 1998; VENTURA; GRIZZELE, 1998).

Dentre as medidas que podem ser tomadas para evitar ou diminuir a resistência bacteriana está o uso racional de antibióticos e o desenvolvimento de novos medicamentos (WANNMACHER, 2004). Os vegetais têm sido visto como uma fonte promissora de novas substâncias antibacterianas, e as pesquisas nessa área vêm ganhando importância mundial.

Segundo Rattanachaiakunsopon e Phumkhachorn (2007), alguns compostos da classe dos flavonóides, tais como, morina e quercetina, isolados da folha de *Psidium guajava*, demonstraram efeito bacteriostático sobre *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, *Flavobacterium columnare*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus agalactiae*, *Vibrio salmonicida*.

2.3. Atividade antimalárica

A malária é a doença causada por um parasito encontrado principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, ela é considerada uma das doenças mais importantes por sua alta incidência e taxa de mortalidade (RODULFO et al., 2007) e ela é considerada um desafio diagnóstico para laboratórios na maioria dos países não endêmicos (GATTI et al., 2007).

No Brasil a malária é endêmica na Amazônia legal em que ela é causada por um protozoário do filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium*. Sabe-se que hoje existem aproximadamente 150 espécies de parasitas causadores da malária em diferentes hospedeiros vertebrados, sendo que somente quatro espécies infectam o homem: *Plasmodium falciparum*,

Plasmodium vivax, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*. Estas espécies são transmitidas por fêmeas de mosquitos *Anopheles*, que inoculam formas esporozoítas no hospedeiro durante a alimentação sanguínea. Essas formas extracelulares migram rapidamente para o fígado pela corrente sanguínea e invadem os hepatócitos. Cada esporozoíto invasor diferencia-se e divide-se mitoticamente em milhares de merozoítos hepáticos que, quando liberados, invadem os eritrócitos, começando o ciclo sanguíneo assexuado (COWMAN e CRABB, 2006). Ela é caracterizada como uma enfermidade sistêmica, febril e aguda, cuja gravidade e curso dependem da espécie e cepa do parasita infectante, além do grau de imunidade do hospedeiro. Ocorre geralmente o aparecimento de anemia, hepato e esplenomegalia, alterações renais e hipoglicemia (ANDRADE, 2005).

O *P. falciparum* causa a forma mais virulenta das malárias humanas, por infectar eritrócitos em qualquer estágio e resultar em parasitemias altas, o que pode causar complicações e morte, na maioria das vezes em indivíduos não imunes. A infecção também pode resultar em estágios dormentes hepáticos do parasita, que acarretam em recorrências da infecção em meses ou anos (HALDAR e MOHANDAS, 2007; BLEVINS et al., 2008).

As drogas antimaláricas, denominadas esquizonticidas sanguíneos, pois apresentam ação sobre os estágios assexuados sanguíneos do parasito, que são responsáveis pelas manifestações clínicas da doença podem ser classificadas de acordo com seu grupo químico: 4-aminoquinolinas (cloroquina e amodiaquina), aril-aminoálcoois (quinina, mefloquina, halofantrina e lumefantrina), 8-aminoquinolinas (primaquina), peróxido de lactona

sesquiterpênica (derivados da artemisinina), naftoquinonas (atovaquona) e os antibióticos (tetraciclina, doxiciclina e clindamicina). (Levy et al. 1991,WHO 2006).

2.4. Atividade citotóxica

Muitos laboratórios de Produtos Naturais têm inserido dentro de suas rotinas de isolamento, purificação e elucidação estrutural, diversos ensaios biológicos simples, no intuito de selecionar e monitorar o estudo fitoquímico de extratos de plantas na procura de substâncias bioativas (HAMBURGER, et al.,1991). Dentre estes bioensaios, encontra-se a toxicidade sobre *Artemia salina* (TAS). Inúmeros constituintes bioativos têm sido obtidos de extratos vegetais utilizando este teste na monitoração de estudos fitoquímicos (McLAUGHLIN, et al., 1991); (McLAUGHLIN, et al., 1993).

Artemia salina é um microcrustáceo de água salgada que é utilizado como alimento vivo para peixes, sendo seus cistos facilmente encontrados em lojas de aquaristas. Ele é um organismo sensível a um amplo espectro de substâncias com atividades biológicas (McLAUGHLIN, et al., 1991). O ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina*, segundo Meyer et al., (1982), é um ensaio biológico rápido, de baixo custo, não requer ambiente asséptico, utiliza um grande número de organismos para validação estatística, não requer equipamentos especiais e a quantidade de amostra é relativamente pequena 2 - 20mg (MEYER et al., 1982). O ensaio permite a avaliação de metabólitos e extratos tóxicos e também a determinação da concentração em que a

porcentagem de mortalidade seja de 50% dos indivíduos (CL_{50}) (GONZÁLES et al., 2007). A simplicidade do bioensaio TAS favorece a utilização rotineira, podendo ser desenvolvido no próprio laboratório de fitoquímica (McLAUGHLIN, et al., 1991). Os cistos de *Artemia salina* eclodem cerca de 24 horas, sendo que o ciclo de vida relativamente curto favorece seu uso (McLAUGHLIN et al., 1998).

Além disso, os cistos que não são eclodidos têm um comportamento metabolicamente inativo, e podem ser conservados por longos períodos, se mantidos desidratados e a baixas temperaturas (MICHAEL et al., 1956). Diversos trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades como antifúngica, viruscida e antimicrobiana (MacRAE et al., 1988) entre outras.

2.5. Atividade antioxidante

A pesquisa por constituintes químicos ativos de plantas levou ao desenvolvimento de numerosas técnicas de ensaios para monitoramento e seleção de extratos bio/farmacologicamente úteis (VIEGAS Jr, 2004). Segundo Roginsky e Lissi (2005), a atividade antioxidante é a capacidade de um componente (ou mistura) de inibir a degradação oxidativa.

O uso de produtos que possuam espécies químicas antioxidantes tem por objetivo retardar ou inibir processos oxidativos, prolongando assim a vida da célula (FRAGA FILHO, 2003). A busca por prolongar a vida com saúde e boa aparência tem impulsionando as pesquisas científicas visando novos

antioxidantes, principalmente de origem natural, que possam ser utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética entre outras (MELO, 1989; KIM et al., 1997; MATIUCCI, 1998; MENSOR, 1999; MOREIRA, 1999; FREITAS, 2000).

Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação ou a inibem, através de um ou mais mecanismos, tais como neutralização de radicais livres e complexação de metais (PIETTA, 2000). Eles podem ser sintéticos ou naturais e, para serem utilizados em alimentos, devem ser seguros para a saúde. Dentre os antioxidantes naturais importantes destacam-se o ácido ascórbico, a vitamina E e o β -caroteno (RICE-EVANS, 1996).

Estudos recentes vêm demonstrando que a avaliação antioxidante está relacionada com o número de grupos hidroxilas livres (MOSADDIK et al. , 2004). Pode estar relacionada, também, com o tamanho da cadeia carbônica com ligações duplas conjugadas. Extratos que possuem atividade antioxidante usualmente contêm substâncias fenólicas derivadas dos aminoácidos: triptofano, fenilalanina e tirosina (Figura 4), por exemplo, cumarinas, flavonoides, e catequinas (DAPKEVICIUS et al., 1998).

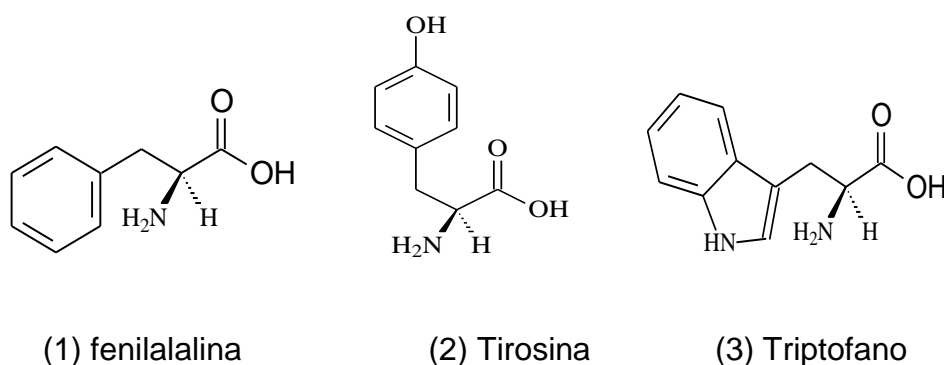
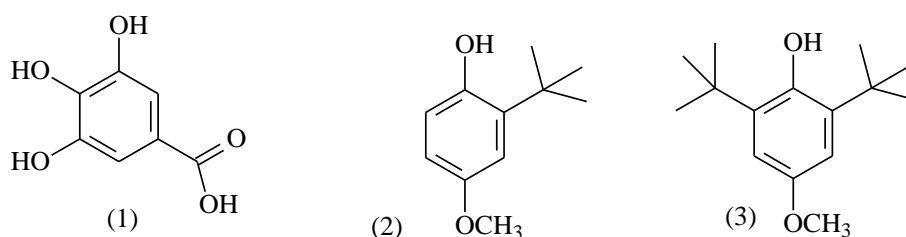


Figura 4. Aminoácidos que originam as substâncias fenólicas.

Substâncias antioxidantes estão naturalmente presentes em frutas, sendo que algumas as possuem em altas concentrações (HARBORNE, 2000; ARABBI, 2004). A acerola apresenta grandes concentrações de ácido ascórbico enquanto que no morango, amora e açaí, predominam determinados grupos de flavonóides como antocianinas, flavonóis e flavonas (ASSIS, et al., 2001; CORDENUNSI, et al., 2005; MAATTA-RIIHINEN, et al., 2004; POZO-INSFRAN, et al., 2004).

Vários trabalhos acadêmicos e artigos indicam que diversos tipos de danos teciduais, inclusive em tecidos vitais, são causados por grupos de substâncias químicas, conhecidas como radicais livres, produzidas naturalmente em grandes quantidades no organismo. Dessa forma, já se conhece bastante sobre o papel dos radicais livres nos mecanismos geradores de doenças, buscando-se agora tentativas de intervenção que possam minimizar os danos causados ou mesmo impedir a sua formação. Tais intervenções podem ser através de utilização da substâncias com atividade antioxidante, que neutralizam os radicais livres formados em excesso (YOUNGSON, 1996).

As substâncias antioxidantes presentes nas plantas podem ser de vários tipos: antocianidinas, cumarinas, compostos fenólicos, flavonóides, licopeno, terpenos entre outros (Figura 5).



Cont.

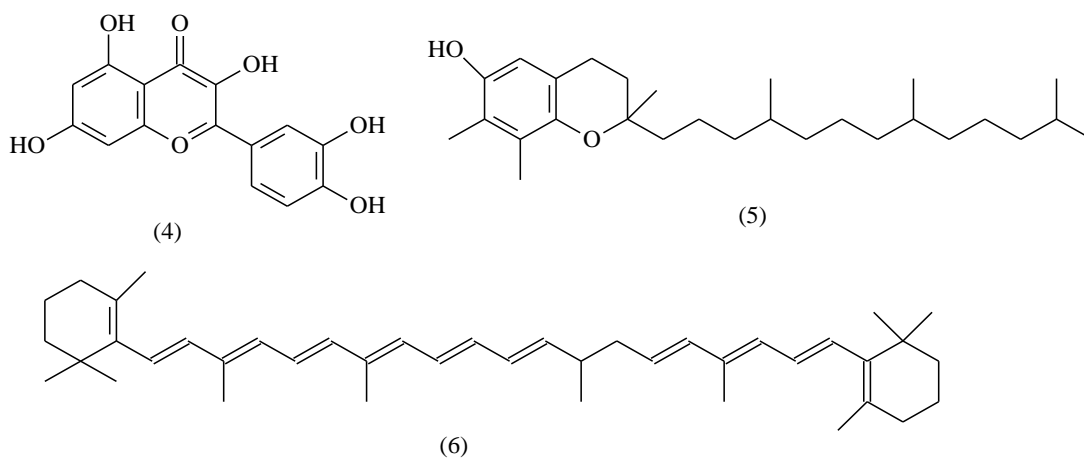


Figura 5. Substâncias antioxidantes: (1) ácido gálico, (2) BHA, (3) BHT, (4) quercetina, (5) α -tocoferol e (6) β -caroteno.

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes, na prevenção de doenças crônico-degenerativas. Dentre estes métodos destaca-se o método de sequestro de radicais livres, tais como DPPH• - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila. Este método está baseado no descolorimento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH• de cor violeta e na presença de doadores de hidrogênio (antioxidantes sequestrantes de radicais livres) se reduz tornando-se amarelo (HUANG, et al., 2005; BRAND-WILLIAMS, et al, 1995). Esta reação é amplamente utilizada para testar a habilidade de compostos em sequestrarem radicais livres ou doadores de hidrogênio, e assim, avaliar a atividade antioxidante de alimentos e extratos vegetais (YAMAGUCHI et al., 1998 apud GAMA, 2008).

2.6. A família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae possui aproximadamente 7500 espécies distribuídas principalmente nas regiões tropicais, onde os maiores centros de dispersão ficam na América e na África (PEREIRA et al., 1998; CORRÊA, 1984 apud BRANCO & PIZZOLATTI, 2002). É uma família bem intensa na Amazônia, sendo que algumas nunca foram estudadas do ponto de vista químico e outras ainda não foram classificadas botanicamente (ABREU et al., 2001).

Segundo os caracteres descritos em APG II, os membros da família Euphorbiaceae podem apresentar diferentes aspectos: arbustivo, arbóreo, plantas rasteiras e lianas, podendo ser monóicos ou dióicos. Comumente são laticíferas; suas folhas são, em geral, dispostas helicoidalmente em torno do galho, sendo menos comum a distribuição oposta das mesmas; flores em geral pequenas, dotadas de estames e frutos deiscentes ou não, entre outras características (APG II, 2003).

É por apresentar essa diversidade de características morfológicas que o grupo botânico Euphorbiaceae é considerado o mais controverso, e por isso também se sugere que o grupo seja de origem polifilética, ou seja, as espécies apresentam estruturas morfológicas aparentemente relacionadas, mas têm origens ancestrais diferentes (BITTNER et al., 2001).

No levantamento feito por Bittner e colaboradores (2001), foi observado que aproximadamente 90% das espécies de Euphorbiaceae estudadas até

aquele momento tinham os terpenóides como os compostos biologicamente ativos.

Em virtude a grande quantidade de terpenos na família foi possível encontrar pequenas quantidades de alcalóides que foram considerados como possíveis responsáveis pela ação anticâncer e antitumoral relacionados, na maioria dos casos, ao potencial ação citotóxica que exibem alguns alcalóides (ALMEIDA et al., 2005), (BOLZANI et al., 1983), (CONEGERO et al., 2003) (PEIXOTO, et al., 2009).

Alguns dos fármacos mais utilizados no tratamento de câncer são alcalóides de diversas famílias botânicas, como os alcalóides da vinca (vincristina e vimblastina), o taxol e as podofilotoxinas (ALMEIDA et al., 2005; CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

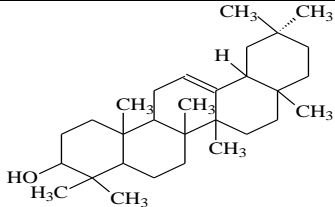
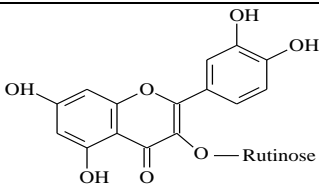
Em pesquisa recente, Wang e colaboradores (2006), obtiveram dos extratos das raízes de *Euphorbia fischeriana* nove diterpenos, dos quais sete ainda não eram conhecidos, elucidando suas estruturas principalmente por meios espectrofotométricos; destes compostos, dois apresentaram considerável citotoxicidade *in vitro*, a prostratina, um composto já conhecido é o 17-acetoxiolkinolida B, composto descrito pela primeira vez por estes autores. Wyde et al. (1993) demonstraram efeitos antivirais seletivos de polímeros polifenólicos obtidos a partir de cascas do caule de plantas do grupo das Euphorbiaceae contra diversos tipos de vírus de acentuada relevância em casos clínicos principalmente para países em desenvolvimento com o Brasil, tais como para influenza tipo 1; vírus influenza tipos A e B; e vírus respiratório sincicial. Estes são casos relevantes porque, nos países em desenvolvimento,

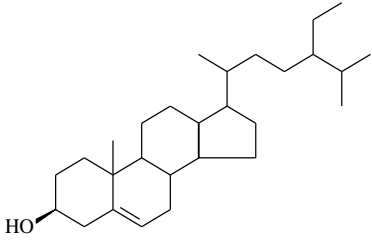
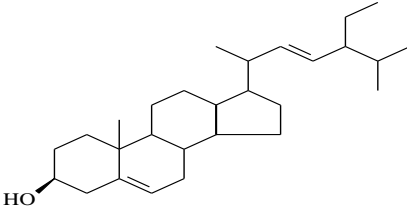
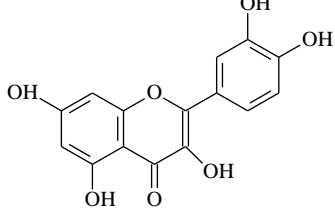
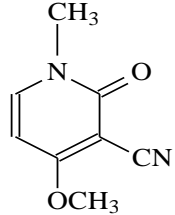
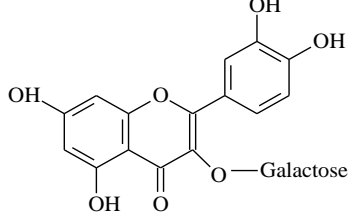
complicações decorrentes de infecções causadas por vírus destes tipos frequentemente podem levar à morte, principalmente em pacientes cujo estado físico já se encontre debilitado em decorrência de subnutrição e/ou outros fatores.

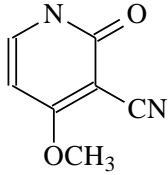
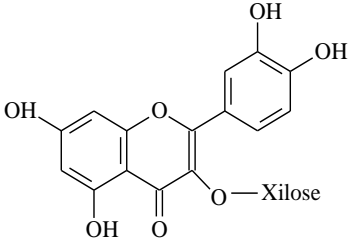
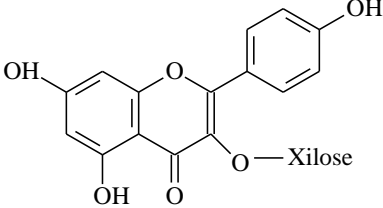
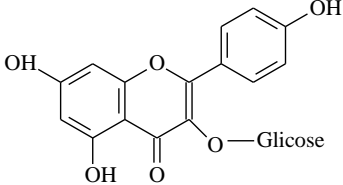
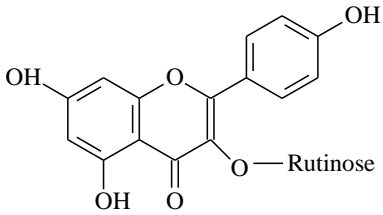
Na família Euphorbiaceae, há espécies bastante estudadas sob o aspecto de absorção de minerais, principalmente aquelas espécies que são de vegetação “pioneira”, como algumas do gênero *Croton* (VANDRESEN et al., 2007), além das cultivadas para alimentação, como as do gênero *Manihot* (VANDRESEN et al., 2007; ZANGARO et al., 2002) conhecida popularmente como mandioca.

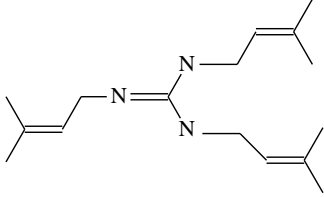
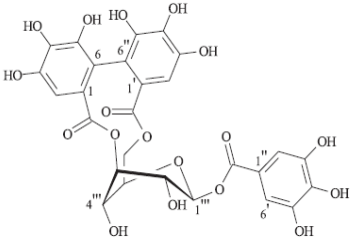
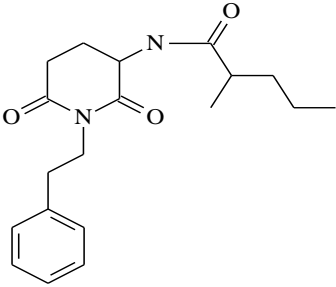
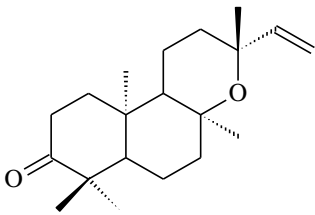
A tabela 1 mostra algumas substâncias isoladas da família Euphorbiaceae.

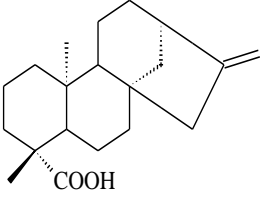
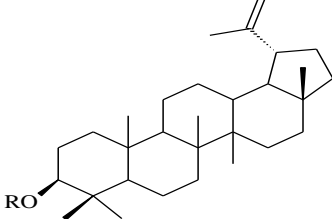
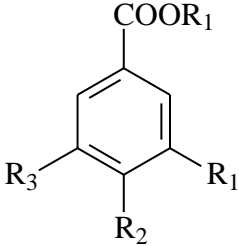
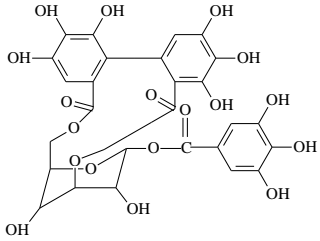
Tabela 1. Metabólitos secundários isolados da família Euphorbiaceae

| Estrutura | Parte vegetativa | Referência |
|--|-------------------------------------|----------------------------|
|  <p style="text-align: center;">β- amirina</p> | Folhas <i>(Ricinus communis)</i> | RODRIGUES, et al., 2002 |
|  <p style="text-align: center;">Rutina</p> | Folhas <i>(Ricinus communis)</i> | RODRIGUES, et al., 2002 |

| | | |
|---|--|--|
|  <p>β –sitosterol</p> | <p>Folhas, caules e cascas (<i>Ricinus communis</i> e <i>Croton pullei</i> var. <i>glabrior</i>)</p> | <p>RODRIGUES, et al., 2002 e ABREU et al, 2001</p> |
|  <p>Estigmasterol</p> | <p>Folhas, caules e cascas (<i>Ricinus communis</i> e <i>Croton pullei</i> var. <i>glabrior</i>)</p> | <p>RODRIGUES, et al., 2002 e ABREU et al, 2001</p> |
|  <p>Quercetina</p> | <p>Folhas (<i>Ricinus communis</i>)</p> | <p>RODRIGUES, et al., 2002</p> |
|  <p>Ricinina</p> | <p>Folhas (<i>Ricinus communis</i>)</p> | <p>RODRIGUES, et al., 2002</p> |
|  <p>Hiperosídeo</p> | <p>Folhas (<i>Ricinus communis</i>)</p> | <p>RODRIGUES, et al., 2002</p> |

| | | |
|---|---|------------------------------------|
|  <p>N-demetilricinina</p> | <p>Folhas <i>(Ricinus communis)</i></p> | <p>RODRIGUES, et al., 2002</p> |
|  <p>Cont. 3-xilopiranosídeo</p> | <p>Folhas <i>(Ricinus communis)</i></p> | <p>RODRIGUES, et al., 2002</p> |
|  <p>Kaempferol-3-xilopiranosídeo</p> | <p>Folhas <i>(Ricinus communis)</i></p> | <p>RODRIGUES, et al., 2002</p> |
|  <p>kaempferol-3-glicopiranosídeo</p> | <p>Folhas <i>(Ricinus communis)</i></p> | <p>RODRIGUES, et al., 2002</p> |
|  <p>Kaempferol-3-rutinosídeo</p> | <p>Folhas <i>(Ricinus communis)</i></p> | <p>RODRIGUES et al., 2002</p> |

| | | |
|--|--|---------------------------------|
|  <p>guanidínico N-1,N-2,N-3-triisopentenilguanidina</p> | <p>Folhas (<i>Alchornea glandulosa</i>)</p> | <p>CONEGERO et al, 2003</p> |
|  <p>Corilagina</p> | <p>Folhas (<i>Alchornea glandulosa</i>)</p> | <p>CONEGERO et al, 2003</p> |
|  <p>Julocrotina</p> | <p>Caules e Cascas (<i>Croton pullei</i> var. <i>glabrior</i>)</p> | <p>ABREU et al, 2001</p> |
|  <p>Ribenona</p> | <p>Caules (<i>Croton pullei</i> var. <i>glabrior</i>)</p> | <p>ABREU et al, 2001</p> |

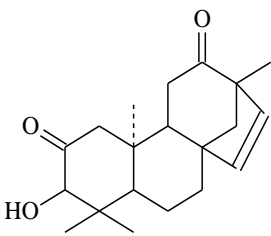
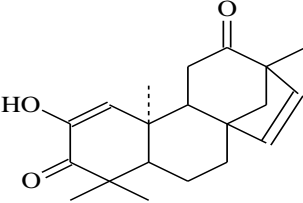
| | | |
|---|--|----------------------------|
|  <p>Acido caurenóico</p> | <p>Caules e Cascas (<i>Croton pullei</i> var. <i>glabrior</i>)</p> | <p>ABREU et al, 2001</p> |
|  <p>R=H R=CH₃(CH₂)_nCO</p> <p>Lupeol e éster do lupeol</p> | <p>Cascas do caule (<i>Croton pullei</i> var. <i>glabrior</i>)</p> | <p>ABREU et al, 2001</p> |
|  <p>R1 = CH₃; R2 = OH; R3 = OH R1 = H; R2 = OCH₃; R3 = OH R1 = H; R2 = OH; R3 = OH</p> <p>Galato de metila (1), 4-O-metilgálico (2), ácido protocatecuico (3), ácido gálico (4).</p> | <p>Folhas (<i>Alchornea discolor</i>)</p> | <p>BATISTA et al, 2004</p> |
|  <p>Isocorilagina</p> | <p>Folhas (<i>Alchornea discolor</i>)</p> | <p>BATISTA et al, 2004</p> |

Buscando entender se as famílias de Angiospermas constituiriam grupos monofiléticos, estudos baseados em análise de DNA mostraram que nenhuma evidência molecular sustenta Euphorbiaceae como uma família única e APG II (2003).

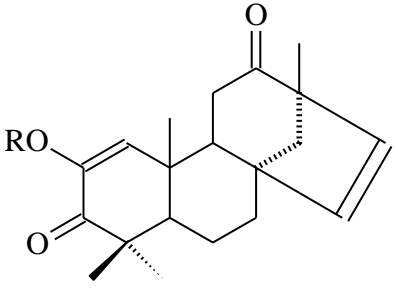
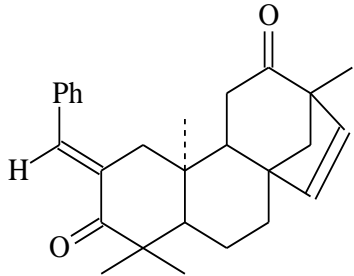
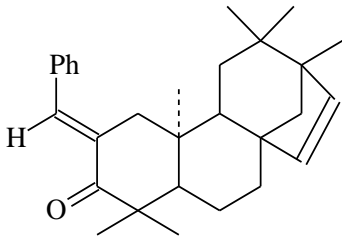
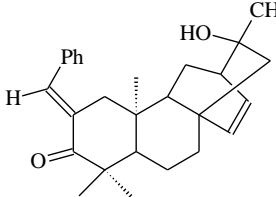
Em virtude a essa pesquisa a família Euphorbiaceae foi dividida em três novas famílias: Euphorbiaceae S.S., Picrodendraceae Small e Phyllanthaceae Martinov (Chase et al., 2002) e APG II (2003).

De acordo com essas pesquisas observou-se, que alguns constituintes químicos já haviam sido isolados da família Picrodendraceae. As tabelas 2 e 3 mostram as substâncias isoladas previamente da família Picrodendracea (Tabela 2 e 3).

Tabela 2. Substâncias isoladas do gênero *Androstachys*

| | | |
|---|-------|----------------|
|  <p>ent-3β-Hidroxibeyer-15(16)- en-2,12-diona</p> | Cerne | PIACENZA, 1979 |
|  <p>ent-2-hidroxibeyer-I,15-diene- 3,12-diona</p> | Cerne | PIACENZA, 1979 |

Cont.

| | | |
|---|--------|--|
|  <p>R = Ac R = H</p> <p>2-acetoxi-1,15-beyeradien-3,12-diona ; 2-hidroxi-1,15-beyeradiena-3,12-dione</p> | Raíces | AMMANAMANCHI, et al. 2002. PIACENZA, et al. 1979. |
|  <p>ent-2-benzilidenebeyer-15-en-3,12-diona</p> | Cerne | PIACENZA, 1985 |
|  <p>ent-benzilidenebeyer-15-en-3-ona</p> | Cerne | PIACENZA, 1985 |
|  <p>ent-2-benzilidene-16α-hydroxyatis-13-en-3-ona</p> | Cerne | PIACENZA, 1985 |

Cont.

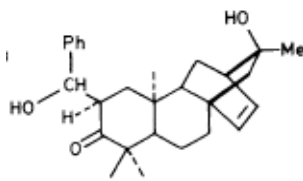
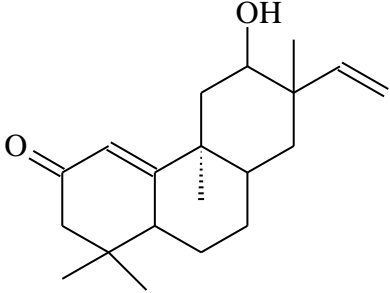
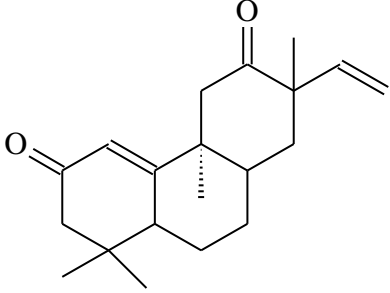
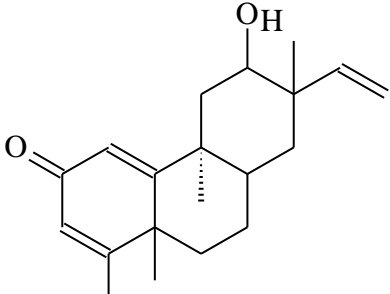
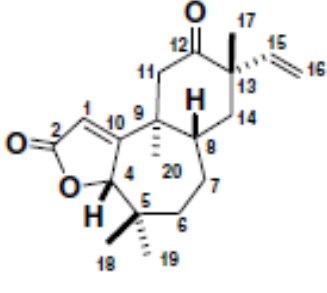
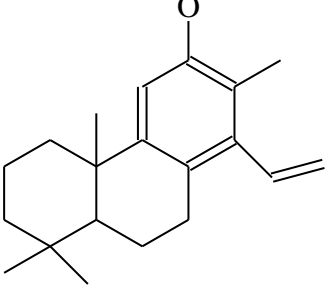
| | | |
|--|-------|----------------|
|  <p>ent-16α-Hidroxi-2α-hidroxibenzy-atis -13-en-3-ona</p> | Cerne | PIACENZA, 1985 |
|--|-------|----------------|

Tabela 3. Substâncias isoladas do gênero *Petalostigma*

| | | |
|---|-------|-------------------|
|  <p>Petalostigmona A</p> | Cerne | Grace et al. 2006 |
|  <p>Petalostigmona B</p> | Cerne | Grace et al. 2006 |
|  <p>Petalostigmona C</p> | Cerne | Grace et al. 2006 |

Cont.

| | | |
|--|-------|-------------------|
|  <p>pubescenone</p> | Cerne | Grace et al. 2006 |
|  <p>ent cleistanthane- sonderiano</p> | Cerne | Grace et al. 2006 |

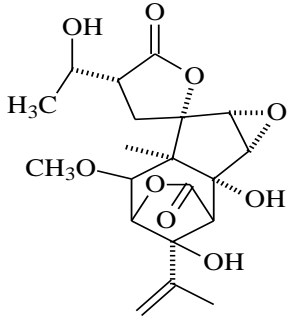
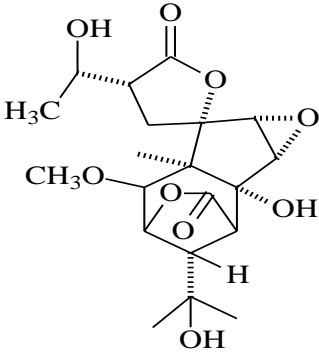
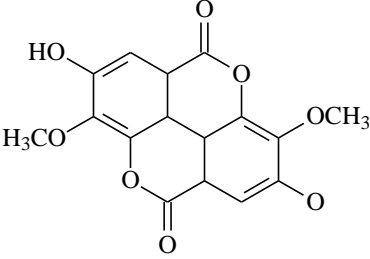
2.7. Gênero *Piranhea*

O gênero *Piranhea* possui apenas quatro espécies (MOBOT), *Piranhea longepedunculata*, *Piranhea mexicana*, *Piranhea securinega* e *Piranhea trifoliata*. Esta última foi identificada por Baill, em 1866, a qual é o foco deste trabalho. No levantamento bibliográfico realizado *P. mexicana* apresentou sinonímia *Celaenodendron mexicana*.

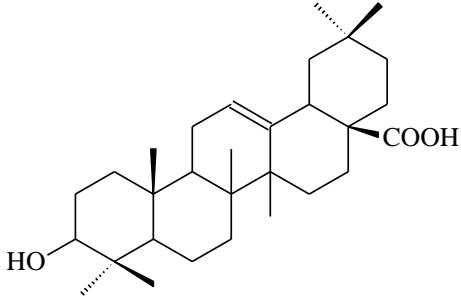
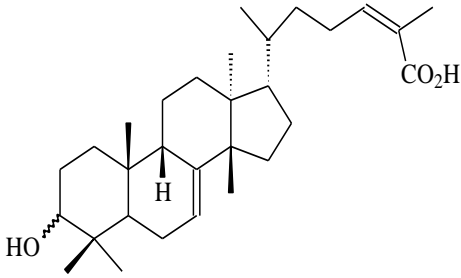
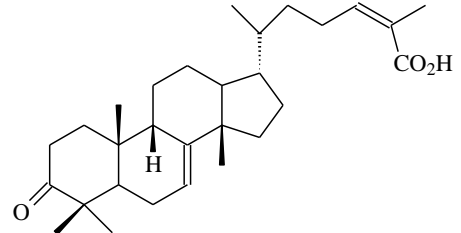
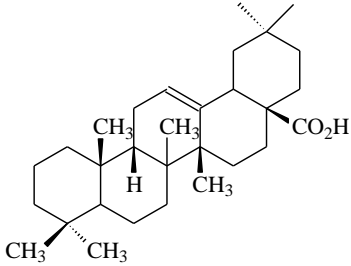
De acordo com Castañieda e colaboradores (1993), os índios do México usam *C. mexicana* na medicina popular como anti-séptico. Do estudo fitoquímico foram isolados alguns triterpenos. Outros estudos realizados com

esta espécie mostraram possuir atividade antimalárica (KAUR, et al., 2009), antiprotozoária e citotóxica (CAMACHO et al., 2003).

Tabela 4. Substâncias isoladas de *Celaenodendron mexicana*

| | | |
|--|-------------------------|--------------------------------|
|  <p>Celaenodendrolida I</p> | <p>Cascas do tronco</p> | <p>CASTAÑIEDA et al., 1993</p> |
|  <p>Picrodendrine E</p> | <p>Cascas do tronco</p> | <p>CASTAÑIEDA et al., 1993</p> |
|  <p>Ácido elágico-4-O-β-D-xylopyrosídio-3,3' dimetil eter</p> | <p>Cascas do tronco</p> | <p>CASTAÑIEDA et al., 1993</p> |

Cont.

| | | |
|--|--------|------------------------------|
|  <p>Ácido oleanólico</p> | Folhas | KAUR, K. et al., 2009 |
|  <p>Ácido 3α - hidroxí-7,24Z- dien-tirucala-26-oico</p> | Folhas | CORONA-CAMACHO, et al., 2009 |
|  <p>Ácido 3-oxitirucala-7,24-dien-26-óico</p> | Folhas | BACAB-CHAN et al., 2001 |
|  <p>Ácido <i>epi</i>-oleanolico</p> | Folhas | BACAB-CHAN et al., 2001 |

2.8 *Piranhea trifoliata*

Piranhea é uma árvore grande com os ramos bem desenvolvidos, em geral parcialmente submersos nas margens dos rios, tronco com cascas de cor cinza, estriadas longitudinalmente (REMADE, 2010). É uma árvore do dossel superior, alcançando idade de mais de 400 anos (WORBES, et al 1992).

Suas espécies ocorrem com frequência ao longo dos rios da Amazônia e no estado do Mato Grosso, na Guiana e no México. É conhecida popularmente como Piranheira.



Figura 6. Exsicata e folhas verdes de *Piranhea trifoliata*.

Sua morfologia polínica destaca-se por possui grãos de pólen médios, isopolares, de simetria radial, âmbito circular, pantoporados.

No levantamento bibliográfico não há citação de estudos químicos prévios feitos com a espécie *Piranhea trifoliata*.

Com isso, esta proposta de trabalho contribuirá para ampliar o conhecimento científico realizando estudos de bioprospecção para a espécie *P. trifoliata* bem como avaliar o seu potencial antimalárico, antioxidante, antioxidante e tóxico sobre *Artemia salina*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Estudo químico e bioatividade dos extratos das folhas, galhos, cascas e caule de *Piranhea trifoliata*.

3.2. Objetivos específicos:

1. Avaliar os extratos das folhas, galhos, cascas e caule de *Piranhea trifoliata*, quanto ao seu potencial antimicrobiano, antioxidante, antimalárico e citotóxico;
2. Fracionar os extratos das partes vegetais que apresentarem atividade biológica;
3. Avaliar as frações obtidas quanto ao potencial antimicrobiano, antioxidante, antimalárico e tóxico sobre *Artemia salina*;
4. Isolar as substâncias presentes nos extratos a serem fracionados;
5. Identificar ou elucidar a estrutura química das substâncias purificadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Metodologia

4.1.1. Coleta do material vegetal e preparo dos extratos

4.1.1.1. Coleta

O material vegetal foi coletado quatro vezes nas margens do rio Xingu, em um local específico, na Volta Grande do Xingu (Altamira) PA (Figura 7). As excisatas do material coletado (Figura 6, pag. 26) foram enviadas para identificação taxonômica no Herbário da Coordenação de Pesquisas em Botânica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA e depositadas no herbário da CPBO/INPA.



Figura 7. Coleta do material vegetal.

4.1.1.2. Preparo dos extratos

As partes vegetais foram separadas e secas em temperatura ambiente, moídas e pulverizadas em moinho de facas.

Após, foram extraídos com diclorometano, hexano, metanol e água. Foram realizadas três extrações com cada solvente utilizando o banho em ultrassom por 20 minutos em cada extração. Após o banho em ultrassom, o material foi filtrado, e o resíduo vegetal após as três extrações com o solvente foi seca a temperatura ambiente. Esse mesmo material vegetal foi extraído com os próximos solventes, em ordem crescente de polaridade (Figura 8).

Os extratos obtidos da primeira e segunda coleta, respectivamente, foram extraídos primeiro com o solvente diclorometano e posteriormente foram usados os solventes metanol e água. Visando contribuir para uma qualidade ambiental global, o laboratório aderiu à substituição de solventes clorados por outros menos tóxicos, assim o diclorometano foi substituído por hexano.

O diclorometano será usado apenas em volumes pequenos, quando necessário para partições ou colunas cromatográficas.

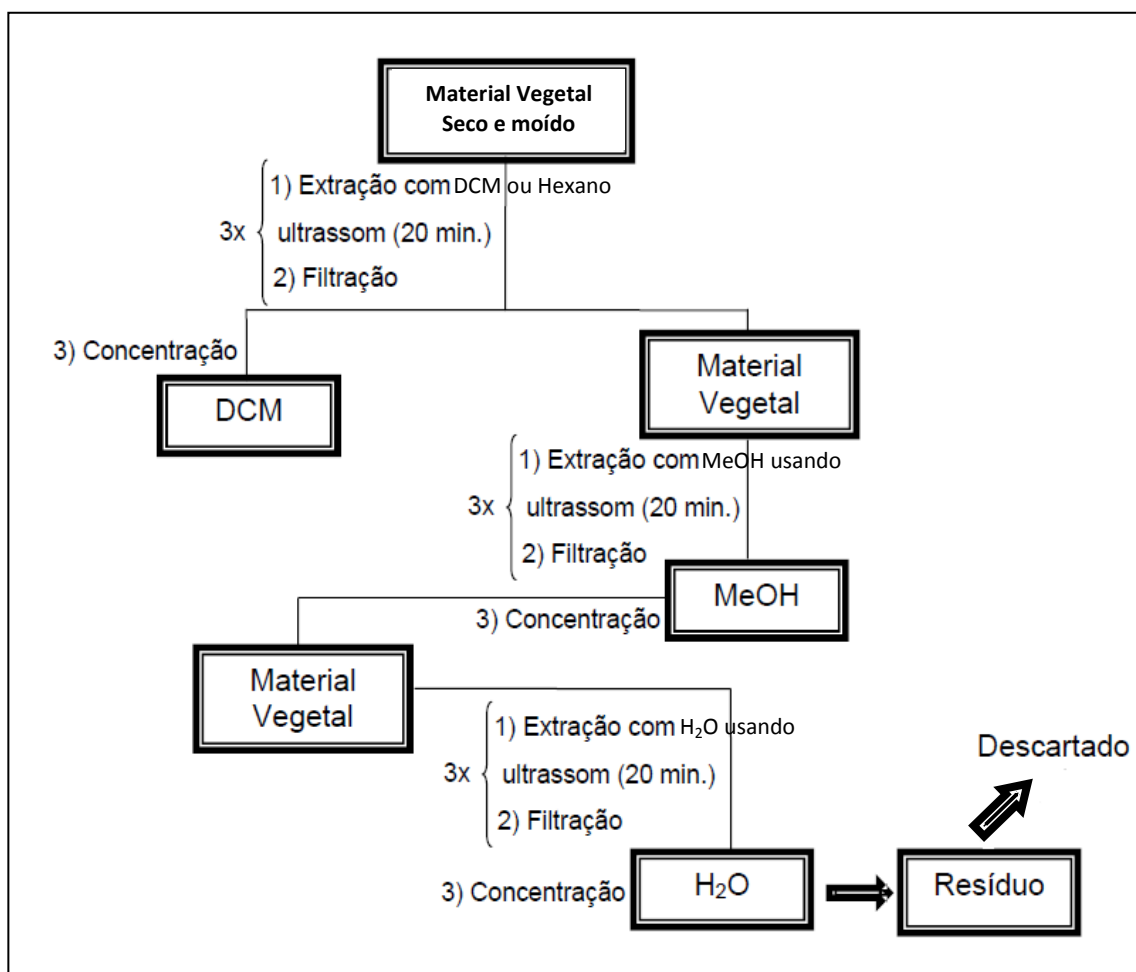


Figura 8. Preparo dos extratos vegetais de *Piranhea trifoliata*.

Os extratos hexânicos, diclorometânico e metanólico foram concentrados em rotaevaporador, já os extratos aquosos foram liofilizados. As tabelas 5, 6, 7 e 8 mostram as massas dos extratos obtido

Tabela 5. Massa dos extratos obtidos das folhas de *Piranhea trifoliata*

| Amostra | Parte Vegetal | Solvente | Massa Extrato (g) |
|---------|---------------|----------|-------------------|
| 1 | Folha | DCM | 9,24 |
| 1 | Folha | MeOH | 6,31 |
| 2 | Folha | DCM | 10,12 |
| 2 | Folha | MeOH | 3,23 |

| | | | |
|-----|-----------|------------------|------|
| 2 | Folha | H ₂ O | 2,55 |
| 2 | T. folha* | DCM | 1,46 |
| 2 | T. folha* | MeOH | 0,24 |
| 2 | T. folha* | H ₂ O | 0,70 |
| 3** | Folha | Hexano | 2,47 |
| 3** | Folha | MeOH | 0,03 |
| 3** | Folha | H ₂ O | 0,09 |
| 4** | Folha | Hexano | 0,91 |
| 4** | Folha | MeOH | 0,02 |
| 4** | Folha | H ₂ O | 1,01 |

*talo das folhas, **foram realizados micro extrações.

Tabela 6. Massa dos extratos obtidos dos galhos de *Piranhea trifoliata*

| Amostra | Parte Vegetal | Solvente | Massa Extrato (g) |
|---------|---------------|------------------|-------------------|
| 1 | Galho | DCM | 1,02 |
| 1 | Galho | MeOH | 10,03 |
| 1 | Galho | H ₂ O | 8,70 |
| 3** | Galho | Hexano | 3,83 |
| 3** | Galho | MeOH | 0,02 |
| 3** | Galho | H ₂ O | 2,02 |
| 4** | Galho | Hexano | 0,87 |
| 4** | Galho | MeOH | 0,05 |
| 4** | Galho | H ₂ O | 0,04 |

**foram realizados micro extrações

Tabela 7. Massa dos extratos obtidos das casca de *Piranhea trifoliata*

| Amostra | Parte Vegetal | Solvente | Massa extrato (g) |
|---------|---------------|------------------|-------------------|
| 3** | Casca | Hexano | 2,78 |
| 3** | Casca | MeOH | 0,04 |
| 3** | Casca | H ₂ O | 0,52 |

**foram realizados micro extrações

Tabela 8. Massa dos extratos obtidos dos caules de *Piranhea trifoliata*

| Amostra | Parte Vegetal | Solvente | Massa extrato (g) |
|---------|---------------|------------------|-------------------|
| 2 | Caule | DCM | 9,2808 |
| 2 | Caule | MeOH | 7,3685 |
| 2 | Caule | H ₂ O | 0,6324 |

4.1.2. Análise cromatográfica dos extratos

As análises iniciais dos extratos foram realizadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), empregando cromatofolhas de alumínio, com sílica gel impregnado com indicador de fluorescência (UV 254). A eluição das cromatofolhas foi realizada com vários solventes, em diferentes proporções. e para a revelação utilizou-se a luz ultravioleta (comprimento de onda de 254 nm e 365 nm), iodo resublimado, sulfato cérico, cloreto férrico, cloreto de alumínio e anisaldeído sulfúrico.

Essa metodologia também foi utilizada para a determinação dos procedimentos para o fracionamento e para a análise das frações obtidas das técnicas de fracionamento, indicando a similaridade entre as frações, o nível de pureza, e as possíveis classes de metabólitos presentes.

Os extratos foram analisados em Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H ¹³C, com o objetivo de obter o perfil cromatográfico de cada órgão vegetal em cada coleta.

4.1.2.1 Partição líquido-líquido

Após a análise em cromatografia em camada delgada, o extrato metanólico da primeira coleta foi submetido a uma partição líquido-líquido. Para tal procedimento, o extrato foi solubilizado em solução de água destilada e MeOH (9:1) e extraído três vezes primeiro com diclorometano (DCM), depois com acetato de etila (AcOEt) e finalmente com butanol (BuOH).

4.1.2.2. partição líquido-líquido do extrato metanólico dos galhos da coleta de número 1

Para a realização da extração, 6 g de extrato bruto metanólico foram solubilizados, em um Becker, em água destilada e metanol (9:1). Após, o extrato solubilizado foi transferido para um funil de separação e adicionou-se o volume de 300 mL de diclorometano. O funil foi agitado e após a formação de duas fases durante o repouso do funil, retirou-se a fase diclorometano. Esse procedimento foi realizado no total de três vezes. A fase aquosa foi então submetida a partição com 300 mL de acetato de etila, sendo também realizada a extração por três vezes. Por fim, a fase aquosa foi particionada com butanol, 300 mL cada extração, no total de três extrações.

Seguindo os mesmos procedimentos da extração anterior, foi realizada uma nova extração com uma massa igual a 4 g para obter uma maior quantidade de cada fase.

As fases obtidas das partições foram concentradas em rotaevaporador e analisadas em CCDC para o fracionamento.

4.1.2.2.1. Fracionamento das fases obtidas dos extratos metanólicos dos galhos da primeira coleta.

4.1.2.2.2. Fase diclorometânica do extrato metanólicos dos galhos da primeira coleta.

Após a extração líquido-líquido, as fases obtidas foram novamente analisadas em CCDC para a escolha do método cromatográfico de fracionamento. O volume de eluição utilizado para o fracionamento da coluna cromatográfica aberta é calculado a partir do conhecimento do volume morto da coluna. Cada sistema de eluição utilizado é calculado para conter duas vezes o volume morto da coluna em que esse volume é a quantidade de solvente necessária para umedecer toda a fase estacionária.

Após a análise em CCDC foi observado que a fase diclorometânica apresentava uma melhor separação quando comparada com as outras fases. Esta fase foi então fracionada em coluna cromatográfica aberta ($h = 110$ cm, $d_i = 3,0$) utilizando sílica gel como fase estacionária e eluída com as misturas dos solventes hexano (Hex) e acetato de etila (AcOEt) nas proporções de 95:5 até acetato de etila 100%, acetato de etila e metanol (MeOH) até metanol 100% (tabela 9).

Tabela 9. Eluentes utilizados para o fracionamento da fase DCM.

| Frações | Eluentes |
|----------------|-----------------|
| 0-3 | Hex/AcOEt 95:5 |
| 4-6 | Hex/ AcOEt 9:1 |
| 7-8 | Hex/A AcOEt 8:2 |
| 9-10 | Hex/ AcOEt 7:3 |
| 11-15 | Hex/ AcOEt 6:4 |
| 16-19 | Hex / AcOEt 1:1 |
| 20-25 | Hex / AcOEt 3:7 |
| 26-28 | Hex / AcOEt 1:9 |
| 29-42 | AcOEt 100% |
| 43-47 | AcOEt/MeOH 9:1 |
| 48-56 | AcOEt/MeOH 7:3 |
| 57-62 | AcOEt/MeOH 6:4 |
| 63-66 | AcOEt/MeOH 1:1 |
| 67-69 | AcOEt/MeOH 3:7 |
| 70-75 | MeOH 100% |

Dessa coluna cromatográfica (fase DCM), foi possível coletar 75 frações com um total de 50 mL de solvente por fração. As frações obtidas foram analisadas através da cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), com revelação em luz ultravioleta (comprimento de onda de 254 nm e 365 nm), iodo resublimado, sulfato cérico, cloreto férrico e anisaldeído sulfúrico. Em seguida, as frações que apresentaram semelhança química foram reunidas e submetidas a um novo fracionamento. Algumas frações por apresentarem pouca massa e com características interessantes quimicamente quando reveladas, foram submetidas a uma separação cromatográfica em camada delgada preparativa (CCDP) (fluxograma figura 9). Foram realizadas outras

colunas cromatográficas mais não foi possível obter substâncias puras devido às frações apresentarem pouca massa e grande quantidade de substância em mistura, (figura 9).

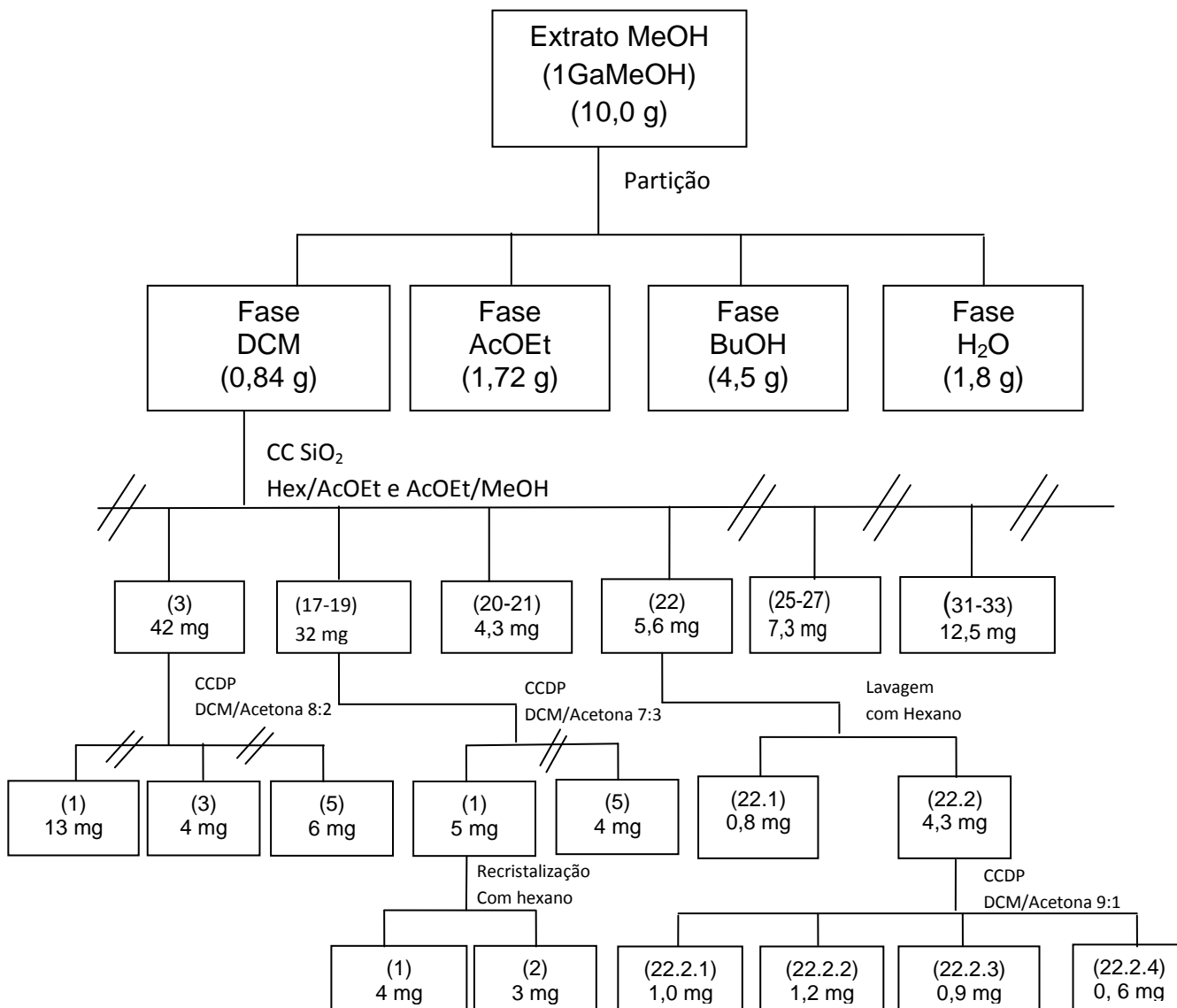


Figura 9. Fluxograma da partição e frações obtidas.

4.1.2.2.3. Fase butanólica do extrato metanólicos dos galhos da primeira coleta.

Em seguida escolheu-se a fase butanólica (BuOH) para análise e purificação (Figura 10). A fase estacionária utilizada foi Sephadex LH-20 (10 g) em coluna cromatográfica aberta com um gradiente de eluição MeOH/ H₂O (60 mL) e AcOEt/MeOH 3:7 (60 mL) sendo que, após a adição de AcOEt 100%. Para o uso da coluna novamente foi passado AcOEt/MeOH (1:1) e MeOH 100% para a limpeza da coluna. A massa da amostra utilizada foi 180,0 mg

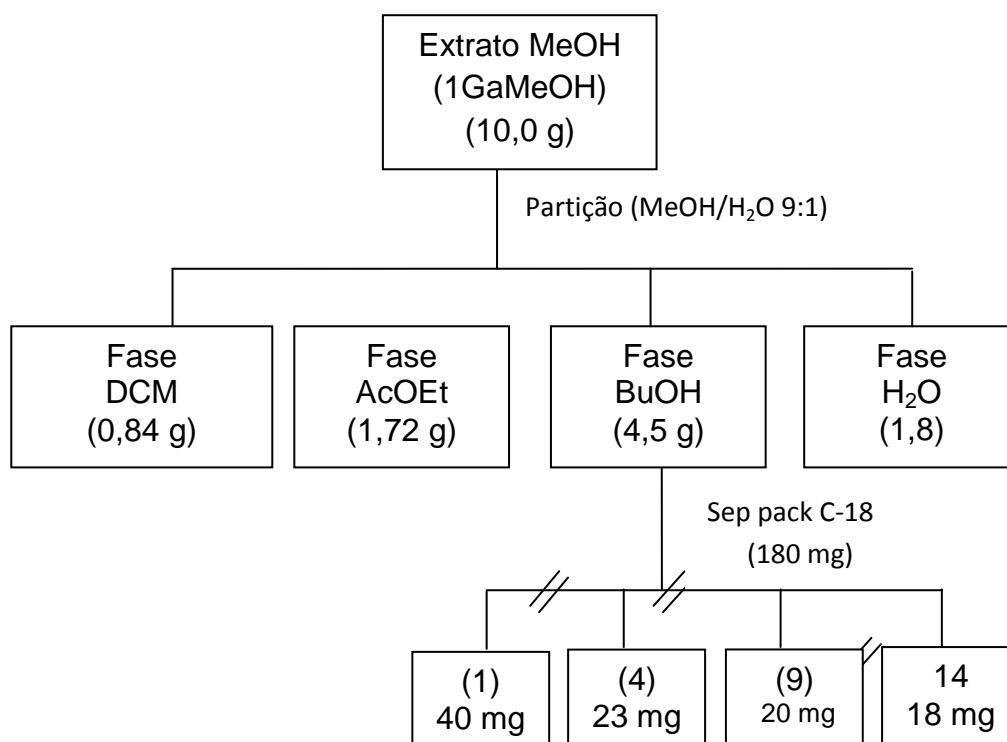


Figura 10. Fracionamento da fase BuOH.

Após separação das frações foi realizada uma análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE. Os solventes utilizados foram de grau espectroscópico (Tédia) degaseificados e ultrafiltrados. O equipamento utilizado possui um Degaseificador DGU-14A (Shimadzu), com Injetor

automático modelo SIL-10AF (Shimadzu). Utiliza duas Bombas do modelo LC 6AD (Shimadzu), um Coletor FRC 10A (Shimadzu) e a Interface possui o modelo SCL 10AVP (Shimadzu). O Detector possui arranjo de diodos, modelo SPD-M20A (Shimadzu). Foram utilizadas colunas analíticas (250 mm x 4,5 mm x 5 μ), semi-preparativa (250 mm x 10 mm 5 μ) todas da marca Luna Phenomenex, com partículas de 100 Å. As fases estacionárias utilizadas foram C-18.

Nesta análise utilizou-se um volume de injeção de 1 μ L com fluxo de 0,5 mL/min, com gradiente H₂O/MeOH - 0' - 50%; 15' - 100%; 25' - 100%; 30' 50%, além dessas diversos sistemas de eluição foram realizados porem não obtiram sucesso.

4.1.2.3. Fracionamento do extrato diclorometânico das folhas da segunda coleta.

Após o fracionamento da fase butanólica foi escolhido outro extrato bruto para dar continuidade ao fracionamento, no qual escolheu o extrato diclorometânico das folhas da segunda coleta (2FoDCM) por apresentar características interessantes quando analisadas em reveladores físicos e químicos e por apresentar boa massa para o fracionamento (10 g).

Visando um perfil químico mais detalhado o extrato (2FoDCM) foi monitorado por RMN ¹H a 60 Hz que mostrou uma intensidade de sinais nas regiões de 0 a 2 característico de metilas terpênicas, além de outros sinais, esse extrato foi então fracionado em coluna filtrante utilizando sílica gel como

fase estacionária e os gradientes Hex/Acetona, Acetona/MeOH até MeOH 100% como fase móvel (Tabela 10). Dessa coluna foram obtidas 20 frações em um volume de 500 mL a cada fração coletadas, a seguinte tabela mostra o sistema de eluentes utilizado no fracionamento.

Tabela 10. Eluentes utilizados no fracionamento 2FoDCM

| Frações | Eluentes |
|----------------|------------------|
| 0-3 | Hex/Acetona 9:1 |
| 4 | Hex/Acetona 6:4 |
| 5-7 | Hex/Acetona 1:1 |
| 8-11 | Hex/Acetona 2:8 |
| 12-14 | Acetona/MeOH 8:2 |
| 15-18 | Acetona/MeOH 1:1 |
| 19-20 | Acetona/MeOH 1:9 |

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

A fração (5-7) foi fracionada empregando uma coluna cromatográfica aberta (h = 270 cm, di = 97 cm) empacotada com sílica gel e eluída com misturas de Hex/AcOEt, AcOEt/MeOH até MeOH 100%. Dessa coluna foram obtidas 40 frações que após serem analisadas em CCDC as que apresentaram semelhança foram reunidas.

Na figura 11 pode-se observar as primeiras frações que foram analisadas e posteriormente fracionadas.

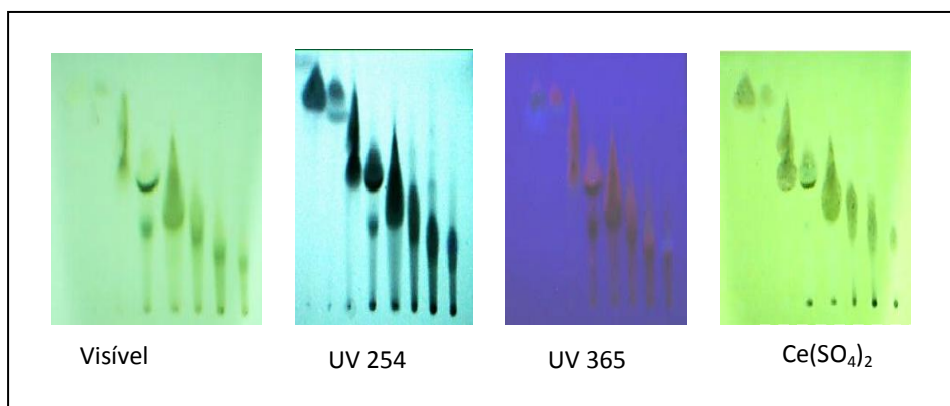


Figura 11. Frações obtidas da coluna (5-7).

Após análise em CCDC escolheu-se a fração (5-7).(2) (figura 13) para ser fracionada por apresentar poucas manchas e com características terpênicas quando reveladas no $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ e confirmadas no espectros de ^1H de 60 Hz do extrato bruto.

Esta foi fracionada utilizando coluna cromatográfica de sílica gel ($h = 40$ cm, $d_i = 1,8$ cm). Ao qual foram coletadas 45 frações, em que, as substâncias que tinham uma coloração bem característica foram coletadas nos primeiros sistemas, Hex/Acetona e apresentaram fluorescência quando irradiadas com os dois comprimentos de onda.

Após análises em cromatofolhas observou-se que a fração (5) apresentava poucas manchas e com RF bem distintos, esta então foi submetida a uma coluna cromatográfica preparativa o qual foi obtida a **substância 1** (figura 12).

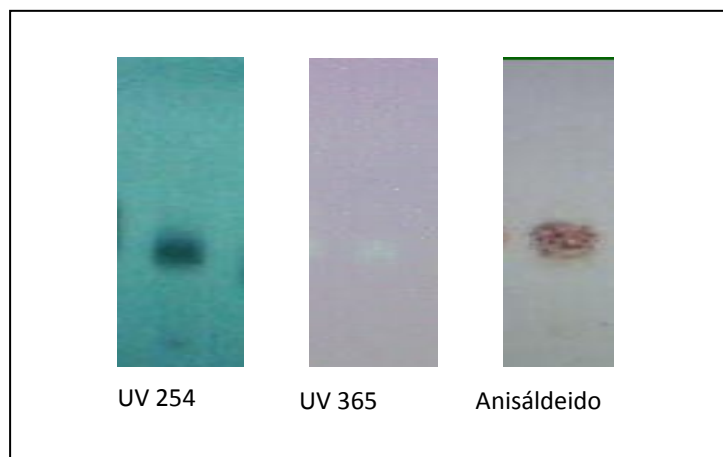


Figura 12. Análise em CCDC da fração (2FoDCM).(5-7).(2).(5).(3) que contem a substância 1.

A seguir encontra-se o fluxograma detalhado das etapas do fracionamento cromatográfico.

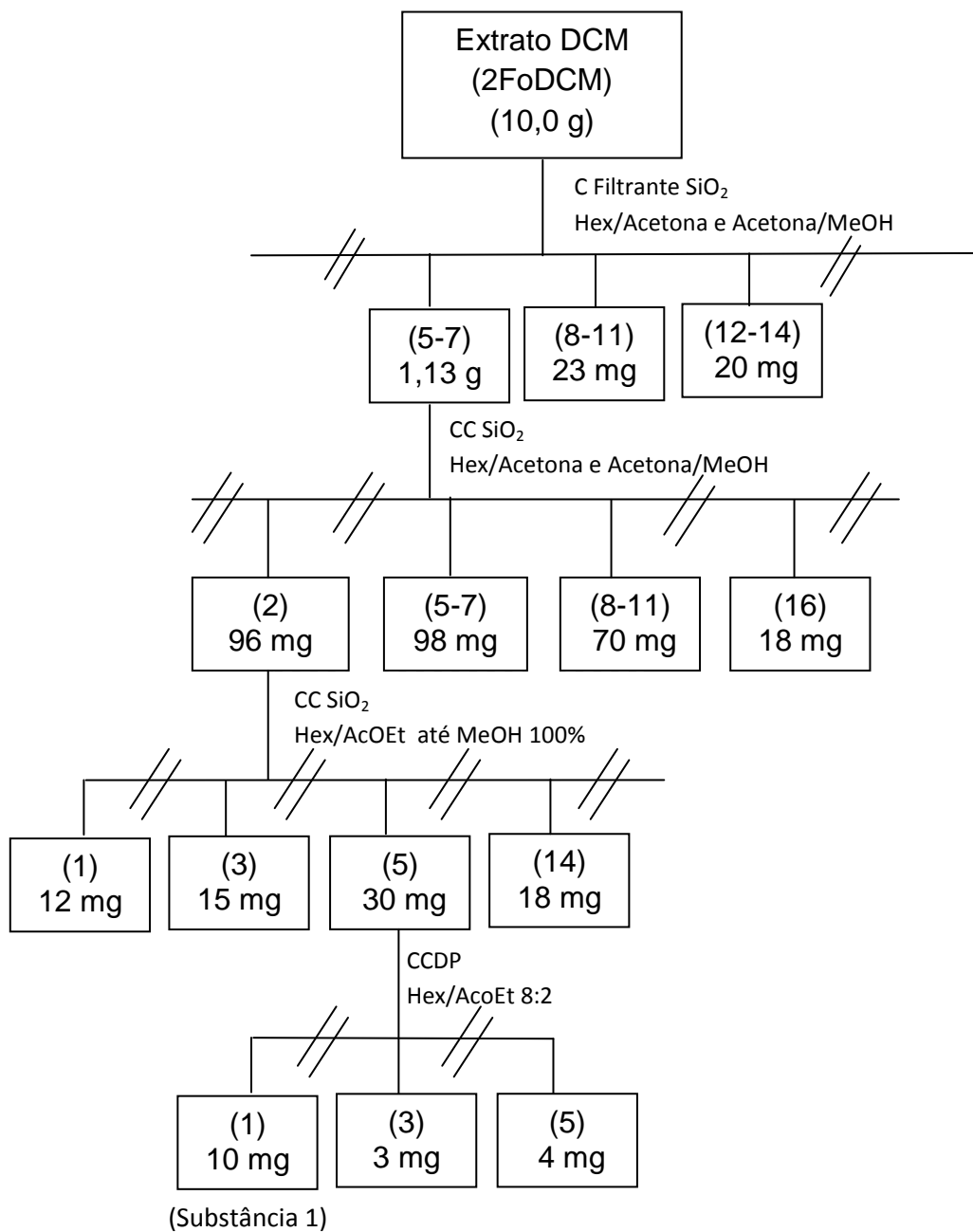


Figura 13: Fluxograma do fracionamento do extrato diclorometânico das folhas da segunda coleta.

Após a identificação da substância 1, foi realizado um novo fracionamento com a fração (2FoDCM).(5-7).(5-7), utilizando uma coluna cromatográfica aberta de sílica gel (h = 40 cm, di = 1,8 cm).resultando em 19 frações com um volume de 55 mL cada erlenmeyer (Tabela 11).

Tabela 11. Eluentes utilizados para o fracionamento de (2FoDCM).(5-7).(5-7)

| Frações | Eluentes |
|---------|-----------------|
| 0-1 | Hex/AcOEt 95:5 |
| 2 | Hex/ AcOEt 9:1 |
| 3 | Hex/A AcOEt 8:2 |
| 4 | Hex/ AcOEt 7:3 |
| 5-6 | Hex/ AcOEt 6:4 |
| 7 | Hex / AcOEt 1:1 |
| 8-9 | Hex / AcOEt 3:7 |
| 10-11 | Hex / AcOEt 1:9 |
| 12 | AcOEt 100% |
| 13-15 | AcOEt/MeOH 9:1 |
| 16 | AcOEt/MeOH 8:2 |
| 17-18 | AcOEt/MeOH 6:4 |
| 19 | MeOH 100% |

Em seguida, as frações foram analisadas em CCDC em que a fração 4 apresentou uma boa separação e apesar de possuir pouca massa (19 mg) foi submetida a uma CCDP com um sistema de Hex/AcOEt (8:2) no qual foi obtida um cristal branco (Figura 12).

Esta amostra foi mandada para análise de RMN de ^{13}C e ^1H , e estamos aguardando os espectros.

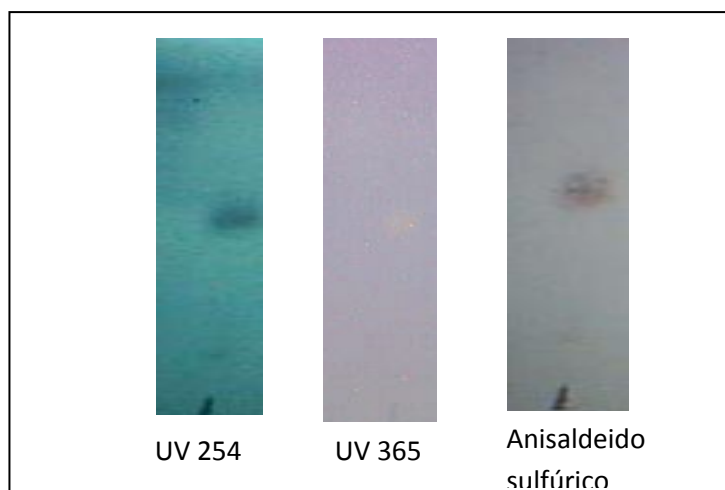


Figura 14. Análise em CCDC da fração (4).(1) que contem a substância 2.

O fluxograma a seguir mostra os detalhes do fracionamento.

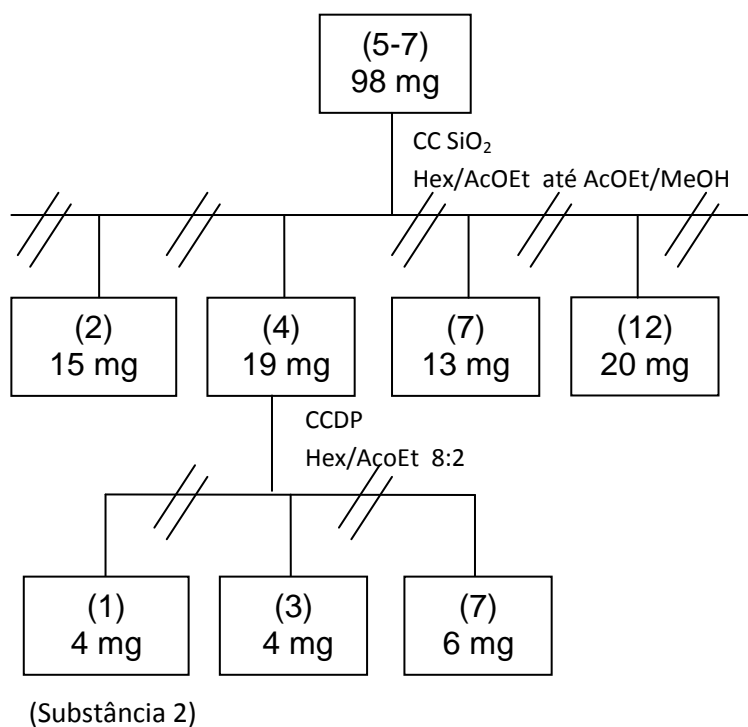


Figura 15. Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração (5-7).

Em seguida a fração (7) foi escolhida para realizar o fracionamento por apresentar poucas manchas e uma mancha bem definida, a qual apresentou

uma coloração laranja ao ser revelados com anisaldeído sulfúrico e cor rosa ao ser revelado com $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ que é característico de terpenos. Esta fração foi então submetida a uma CCDP que resultou na seguinte substância isolada.

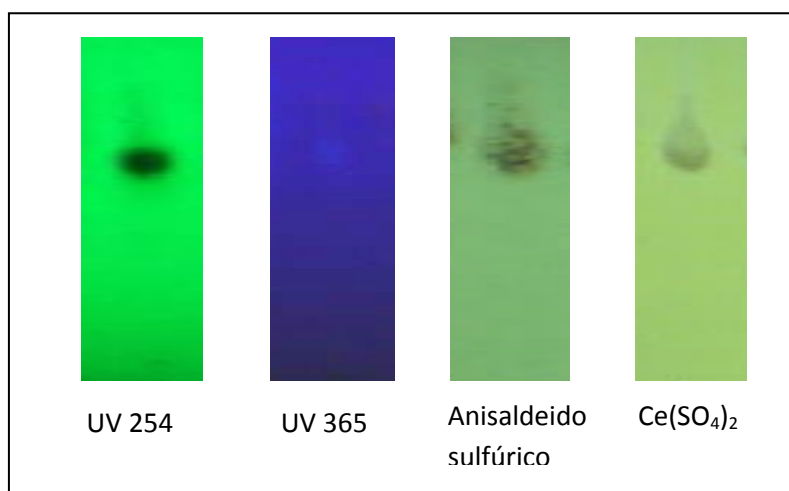


Figura 16. Análise em CCDC da fração (7).(4) que contém a substância 3.

O fluxograma a seguir mostra os detalhes da purificação da fração (5-7).(7).

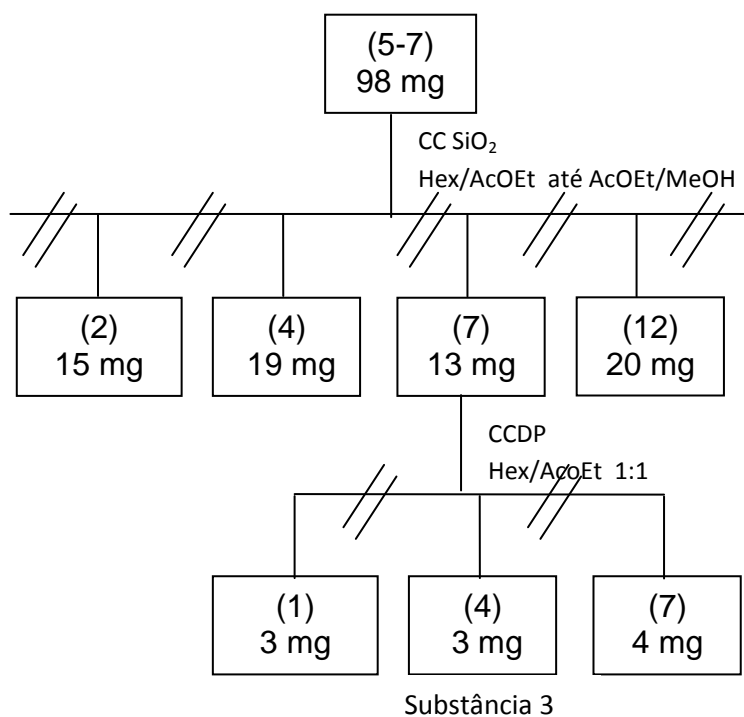


Figura 17. Fluxograma do fracionamento cromatográfico (5-7).(7).(4).

Vale ressaltar que esta substância foi mandada para a análise de RMN de ^1H e de ^{13}C , sendo que até o presente momento foi possível realizar apenas o RMN de ^1H .

Análise de RMN ^1H (60 MHz) de extratos, frações e substâncias puras.

Para a identificação de grupos químicos dos extratos, frações e substâncias isoladas, foram primeiramente analisadas em RMN de ^1H de 60 MHz, no qual foi possível identificar grupos químicos, que corroboraram com a escolha do extrato para o fracionamento cromatográfico.

Os espectros apresentaram diferentes classes químicas de acordo com os extratos. Para os extratos diclorometânicos foi possível identificar vários singletos, bem como outros sinais, nas regiões entre δH 0- 2, concluindo a possível presença de terpenos, para os extratos metanólico observaram-se vários sinais na região de ligações duplas conjugadas características de flavonóides.

O espectro a seguir, foi obtido da substância pura (5-7).(7).4 do extrato diclorometânico das folhas.

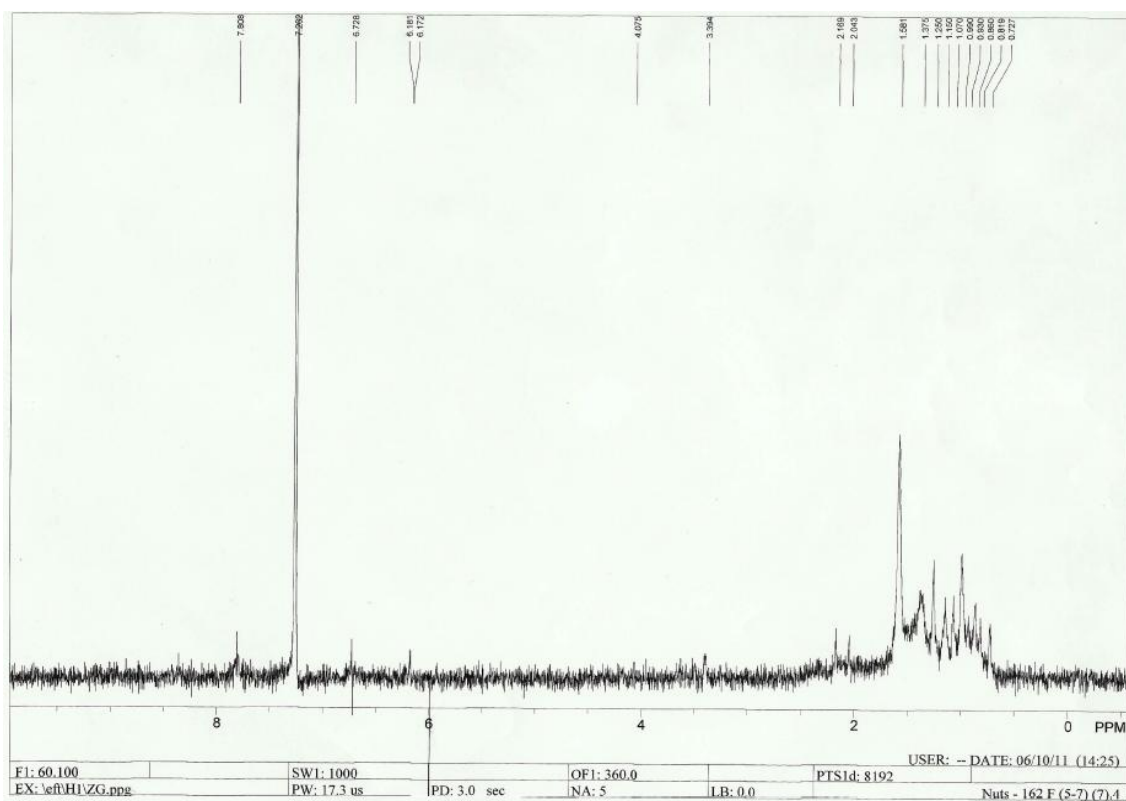


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H da substância (5-7).(7).4.

Essa substância mostrou 8 singletos largos na região relativa às metilas. Os singletos em δ 0,72, 0,81, 0,86, 0,93, 0,98, 1,07, 1,14 e 1,25 foram atribuídos aos grupos metílicos característicos de triterpenos.

Esta análise é de grande importância, pois, nos mostram as possíveis características das substâncias presentes nos extratos, frações e até mesmo nas substâncias isoladas.

4.1.3. Ensaios Biológicos

4.1.3.1. Verificação de atividade antimicrobiana

Os ensaios de atividade antimicrobiana dos extratos e frações foram realizados segundo a metodologia de cavidade-placa.

Aeromonas hydrophila foi inoculada em placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar Mueller-Hinton, através da técnica de *spread-plate*, onde são feitas cavidades circulares de 6 mm.

Em seguida foram adicionados, os extratos de *P. trifoliata* na concentração de 3 mg/mL de extrato. Utilizou-se como controle negativo o solvente usado para dissolver as amostras DMSO (figura 19A) e a oxitetraciclina como controle positivo.

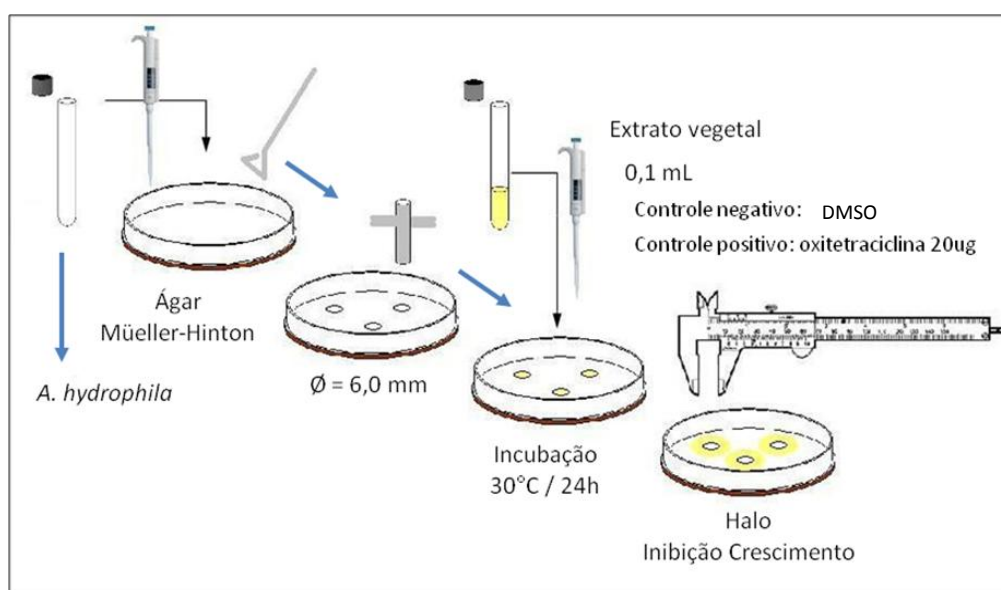


Figura 19A. Esquema de realização do ensaio antimicrobiano.

Após 24 horas de incubação a 30 °C, procede-se à verificação da formação dos halos de inibição de crescimento e, em caso de atividade positiva, a verificação do diâmetro do halo com o auxílio de uma régua.

Concentração Inibitória Mínima (CIM): realizou-se a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio líquido, através da técnica de macrodiluição. Para isto, foram realizadas diluições sucessivas dos extratos (128 mg/mL até 0,065 mg/mL). Em seguida, inoculou-se a bactéria nos tubos de ensaio que foram incubados a 30 °C por 24 horas.

Considerou-se o valor de CIM a menor concentração do extrato onde não houve crescimento bacteriano visível (figura 19B).

Concentração Bactericida Mínima (CBM): Os tubos incubados para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio líquido foram utilizados para determinação da CBM. Uma alíquota (100 µL) de cada concentração (a partir da CIM) foi inoculada em placas de Ágar Müller-Hinton e incubadas nas condições adequadas.

Considerou-se CBM a menor concentração do extrato onde não houve crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado (99,9 % de morte microbiana) (figura 19B).

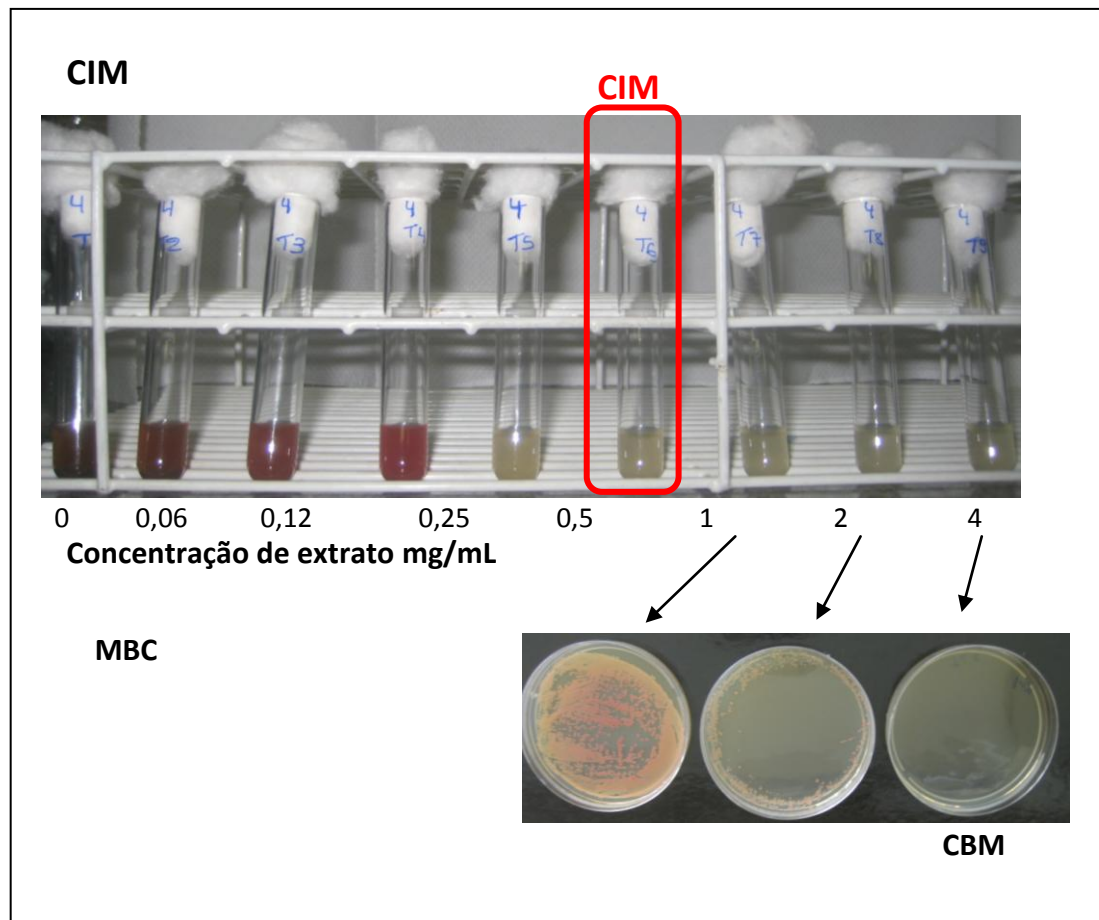


Figura 19B: Esquema da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).

4.1.3.2. Verificação da atividade antimalárica.

Os ensaios *in vitro* foram realizados no laboratório de bioensaio da faculdade de farmácia da UFMG, com hemácias infectadas por *P. falciparum*, clone W2, resistente à cloroquina, através do método do HRP2 (NOEDL et al., 2002).

Primeiramente foi realizada uma incubação parasito-droga: 20 μ l de cada diluição dos compostos testados colocados em microplacas de 96 poços, em triplicata, onde já se encontravam 180 μ l da suspensão de hemácias

infectadas (1,5% hematócrito, 0,05% de parasitemia), provenientes de um cultivo mantido por pelo menos três dias sem hipoxantina. Foram usados controles sem drogas, com hemácias infectadas (controle positivo) ou hemácias não infectadas (controle negativo).

As placas foram incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C por 72 h na presença dos extratos. Após esse período as microplacas foram congeladas (-20 °C por no mínimo 24 h), para promover a lise das hemácias.

O lisado celular foi transferido para placas de 96 poços previamente incubadas com anticorpo de captura anti-HRP2. Após 1 h de incubação, as placas foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase por mais uma hora. As placas foram novamente lavadas e incubadas por 10 min na presença do substrato TMB. A reação foi interrompida com HCl 1 N e a absorbância registrada em espectrofotômetro.

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

Para a solubilidade das amostras uma solução estoque de cada amostra foi preparada na concentração de 50 mg/mL em DMSO. As amostras 307G Hex, 230 Fo HEX, 307 Fo HEX e 162 Fo DCM foram insolúveis em DMSO.

4.1.3.3 Ensáio de citotoxicidade utilizando *Artemia salina*

Para o teste, utilizou-se como meio de crescimento uma solução salina (3,8%), e para a eclosão, adicionaram-se 10 mg de cistos de *Artemia salina*.

As condições de crescimento utilizadas foram: temperatura de 25 a 28 °C, e iluminação em lâmpada fluorescente, durante 48 horas. Após esse período, as larvas são transferidas para placas de 24 poços, sendo distribuídas 10 larvas de *Artemia salina* para cada poço. Nos poços são adicionados 100 µL do extrato na concentração de 1000 µg/mL, e avoluma-se para 1 mL, em triplicata. No controle, adiciona-se o solvente usado para dissolver o extrato. As placas com as larvas de *A. salina* são mantidas por 24 horas sob iluminação de lâmpada fluorescente. Após esse período, avalia-se o número de larvas sobreviventes, tanto nos poços de controles quanto no teste. Testa-se inicialmente na concentração de 1000 µg/mL e, se for citotóxico, diluir o extrato até encontrar a CL₅₀ (Figura 20).

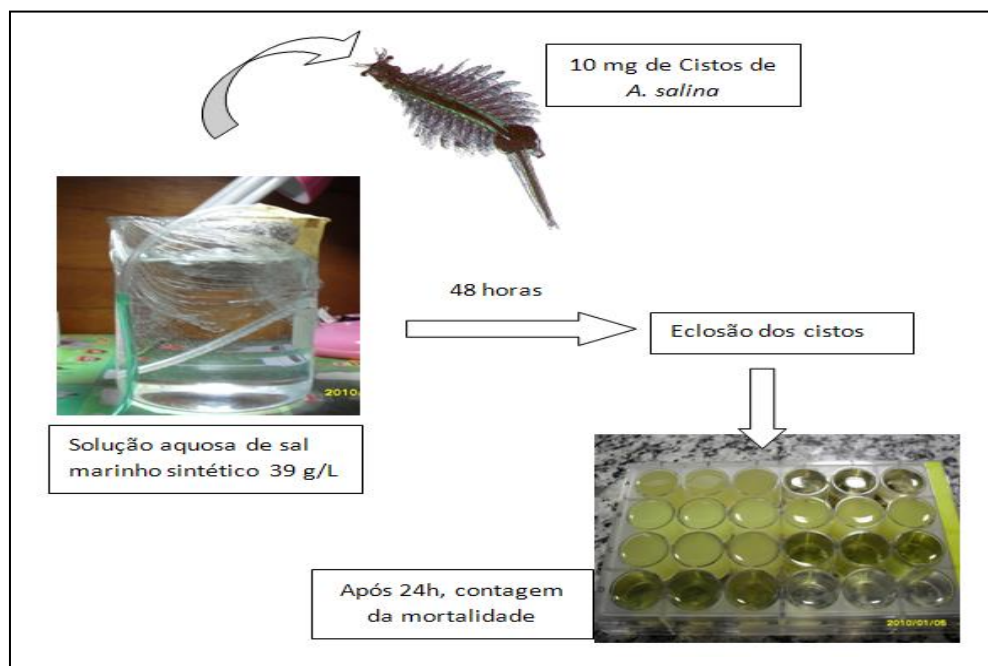


Figura 20. Esquema de realização do ensaio tóxico.

4.1.3.4. Ensaio antioxidante empregando a metodologia do DPPH

A solução de DPPH• foi preparada solubilizando 28 mg do DPPH• com 1 mL de DCM e avolumando com MeOH até 100 mL.

A diluição da solução do ácido ascórbico com água deionizada resultou nas seguintes concentrações: 0, 100, 200, 400, 600 e 800 µg/mL. A solução de DPPH• é utilizada na concentração de 2,8 mg/L (Figura 21).

Preparação da curva do DPPH•: adicionam-se em seis novos microtubos 990 µL de DPPH• e completa-se com 10 µL da solução de ácido ascórbico. Espera-se por 30 minutos para realizar a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de 517 nm.

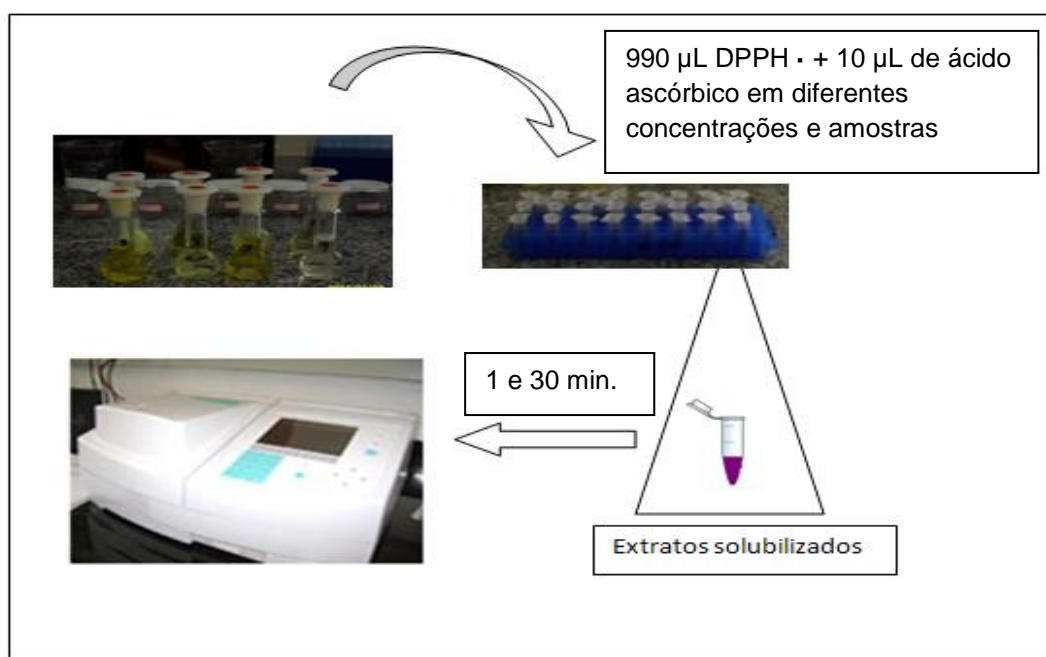


Figura 21. Esquema de realização do ensaio antioxidante.

Ensaio com os extratos: após a verificação da curva de calibração e sua linearidade, adicionam-se 0,5 mg/mL dos extratos nas soluções de DPPH•. Realiza-se a leitura da absorvância (517 nm) no espectrofotômetro, e após 30 minutos de reação, a leitura é realizada novamente . A variação da absorvância dos extratos é comparada com o ácido ascórbico para a avaliação quantitativa do potencial antioxidante.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análises cromatográficas e fracionamento dos extratos

Os extratos das quatro coletas foram analisados por CCDC e revelados para revelar as possíveis classes químicas contidas.

Os extratos diclorometânicos e hexânicos quando revelados em UV 365 nm, verificou-se fluorescência caracterizando possivelmente compostos aromáticos. Observaram-se também manchas de cores laranja e roxa quando reveladas com sulfato cérico, confirmando a presença de terpenos. Através da revelação química com cloreto férrico, o qual revela substâncias fenólicas com a coloração verde escura, percebeu-se que os extratos DCM e Hexânicos possuem uma baixa quantidade desse grupo de metabólitos (Figura 22).

Ao revelar com cloreto de alumínio verificou-se presença de flavonóides quando intensificou a cor verde quando foi visualizado no UV – 365 (Figura 22). A revelação com anisaldeído sulfúrico mostrou que os extratos possuem uma grande complexidade de substâncias, porém, como esse revelador é universal, não revela um grupo específico de metabólitos, assim sendo, não é possível inferir sobre as classes de metabólitos presentes.

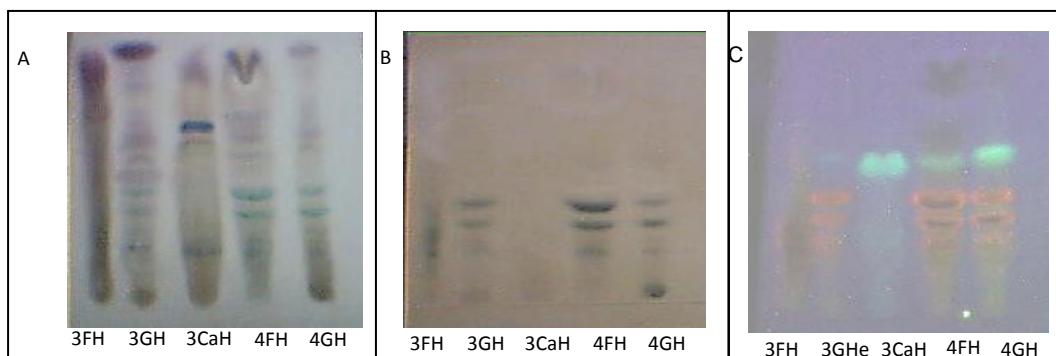


Figura 22. Placas cromatográficas reveladas com anisaldeido sulfúrico (A); cloreto férrico (B) e cloreto de alumínio (C) eluidas com Hexano/Acetona 8:2.

Os extratos MeOH mostraram a presença de compostos aromáticos quando revelados com cloreto férrico, quando reveladas com Dragendorff observou-se a ausência de alcalóides, pois não apareceu cor laranja. Ao ser revelado com sulfato cérico observou-se a presença de possíveis terpenos, pois apresentou coloração lilás (WAGNER & BLADT, 2001). Observou-se ainda que os extratos MeOH apresentam variedade de polares (Figura 23).

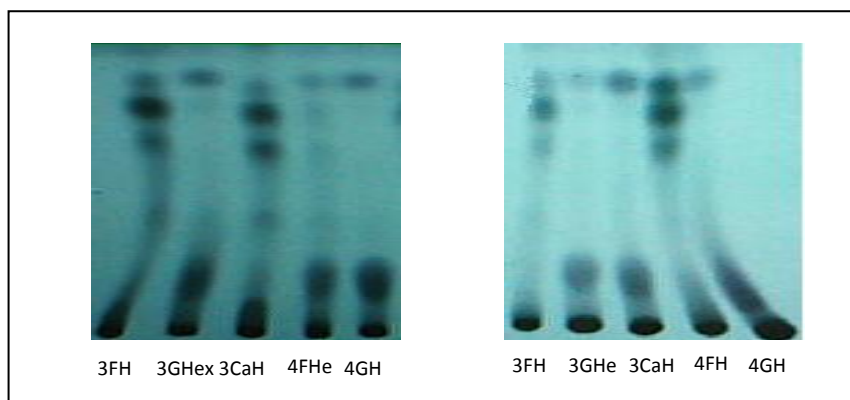


Figura 23: Placa cromatográfica visualizada em UV – 254 eluídas com DCM/hexano 8:2.

Os extratos aquosos mostraram, nas placas cromatográficas, rastros bem intensos, devido à grande polaridade das substâncias. Quando revelados com cloreto férrico observou-se a possível presença de compostos fenólicos, coloração escura, e quando reveladas com cloreto de alumínio observou-se a possível presença de flavonóides, coloração azul escuro, que intensificou na luz UV 365 (Figura 24).

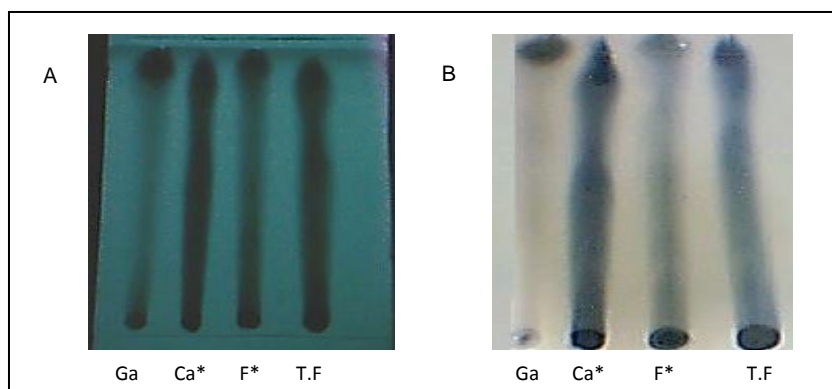


Figura 24: Placas cromatográficas reveladas com: cloreto férrico (A) e cloreto de alumínio (B) eluídas com Acetona/MeOH 2:8.

5.2. Determinação estrutural das substâncias isoladas

5.2.1. 28-hidroxi-friedelin-3-ona

A fração (5.3) denominada de **substância 1** foi obtida na forma de cristais brancos e quando revelada com anisaldeído sulfúrico verificou-se a cor rosa e quando revelada com sulfato cérico verificou-se as cores laranja e roxo caracterizando um triterpenos.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 26 e 27, p. 64 e 65) mostrou 7 sinais δ_{H} 0,73 a 1,26, referentes aos hidrogênios de metilas, indicandondo um triterpeno com uma metila a menos. Observaram-se sinais em δ_{H} 2,27 (*m*, 2H), em δ_{H} 2,39 (*ddd*, 2H, $J= 7$, $J= 5$ e $J= 2$ Hz) e em δ_{H} 3,63 (*sl*, 2H) característico de hidrogênio carbinólico.

Entre os sinais de RMN de ^{13}C (Figura 28 e 29 p. 66 e 67) observou a falta de ligação dupla sugeriu um esqueleto do tipo friedelano, a carbonila em 213,0 ppm aliada a metila em 7,0 ppm e um carbono carbinólico em 68,2 ppm indicaram a presença de 28-hidroxi-friedelin-3-ona, o qual foi confirmados com os dados da literatura (MAHATO & KUNDU,1994).

Assim como verificado a identificação da fração 5.3, observa-se a conformação bote dos anéis D e E responsável pelo alto deslocamento químico em direção a alta freqüência observado para C-8 δ_{C} (52,7) (STESKIND et al, 1995). Este triterpeno possui ponto de fusão que varia entre 255,5 -257,8 °C (CLAUDINO, G. P., 2005), cuja fórmula molecular corresponde a $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$

Tabela 12. Dados de RMN de ^{13}C da 28-hidroxi-friedelin-3-ona comparados com a literatura (MAHATO & KUNDU,1994)

| Posição | δ_c Observado | δ_c Literatura | Carbonos |
|---------|-------------------------|--------------------------|-----------------|
| 1 | 22,4 | 22,1 | CH ₂ |
| 2 | 41,7 | 41,6 | CH ₂ |
| 3 | 213,0 | 212,6 | C=O |
| 4 | 58,4 | 57,8 | CH |
| 5 | 42,2 | 41,9 | C |
| 6 | 41,4 | 41,0 | CH ₂ |
| 7 | 18,4 | 18,1 | CH ₂ |
| 8 | 52,7 | 51,2 | CH |
| 9 | 38,5 | 37,3 | C |
| 10 | 59,7 | 59,1 | CH |
| 11 | 35,6 | 35,5 | CH ₂ |
| 12 | 29,9 | 29,9 | CH ₂ |
| 13 | 39,7 | 39,1 | C |
| 14 | 37,8 | 38,0 | C |
| 15 | 31,4 | 31,3 | CH ₂ |
| 16 | 29,3 | 29,0 | CH ₂ |
| 17 | 35,7 | 31,1 | C |
| 18 | 39,6 | 39,2 | CH |
| 19 | 34,7 | 34,4 | CH ₂ |
| 20 | 28,4 | 27,9 | C |
| 21 | 31,6 | 31,4 | CH ₂ |
| 22 | 33,5 | 33,2 | CH ₂ |
| 23 | 7,0 | 6,7 | CH ₃ |
| 24 | 14,8 | 14,5 | CH ₃ |
| 25 | 18,2 | 18,0 | CH ₃ |
| 26 | 19,3 | 18,9 | CH ₃ |
| 27 | 19,4 | 19,1 | CH ₃ |
| 28 | 68,2 | 67,0 | CH ₂ |
| 29 | 33,0 | 32,9 | CH ₃ |
| 30 | 34,4 | 34,2 | CH ₃ |

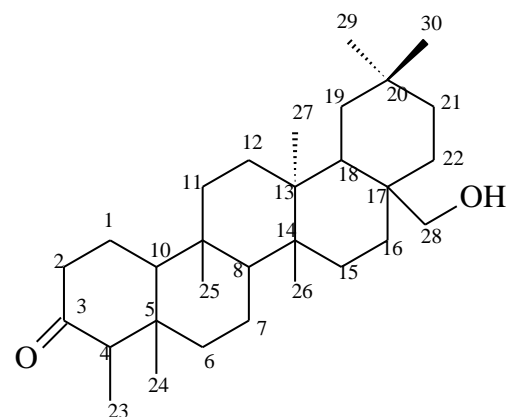


Figura 25. Estrutura de 28-hidroxi-friedelin-3-ona

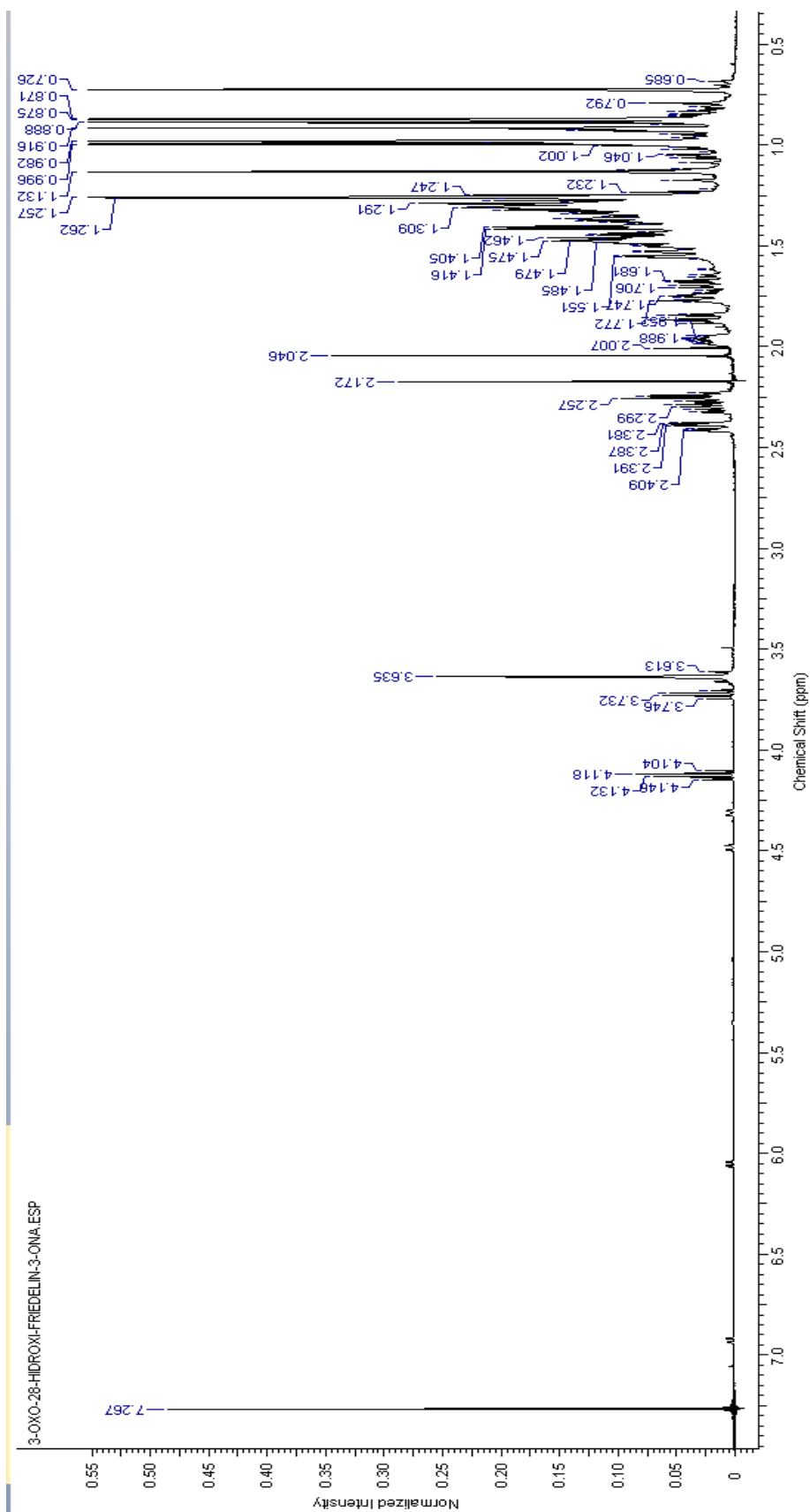


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H do 28-hidroxi-friedelin-3-ona

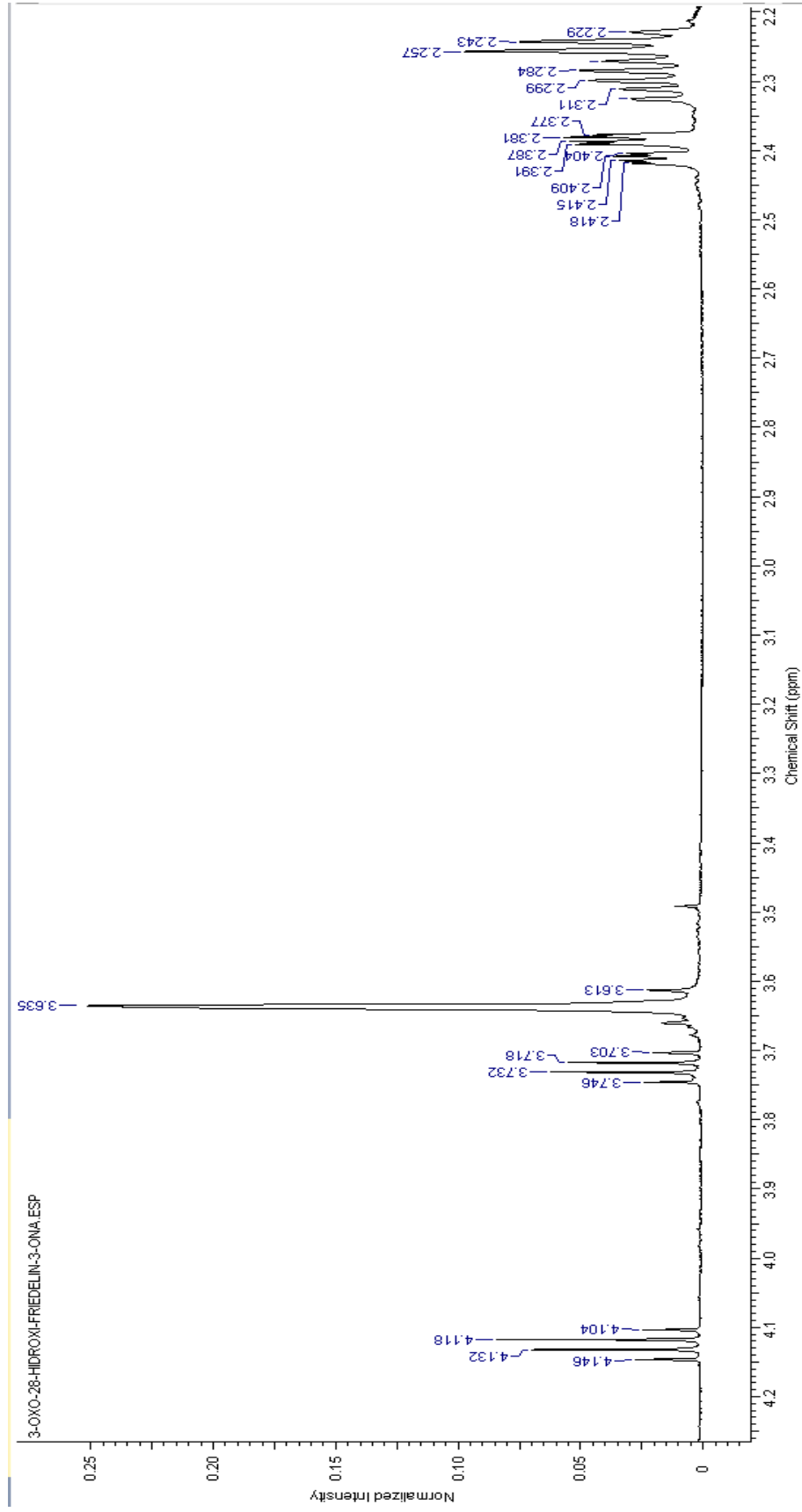


Figura 27. Expansão do espectro de RMN de ^1H do 28-hidroxi-friedelin-3-ona

```

Std proton
File: N14_162FDCM_5_7_5.1_Carbon01
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CCL3
Operator: vnmr1
File: N14_162FDCM_5_7_5.1_Carbon01
INOVA-500 "Inova500"
Rate: 450.1300 MHz
Pulse: 45.000000 sec
Acq. time: 1.360000 sec
Width: 30165.9 Hz
OBSERVE F1: 125.6890220 MHz
DECOUPLE H1: 459.8591863 MHz
Power: 40.000000 dB
WALTZ16: ON
WALTZ16: modulated
DATA PROCESSING
Line broadening: 0.5 Hz
SFO: 125.6890220 MHz
Total time: 36 min, 29 sec

```

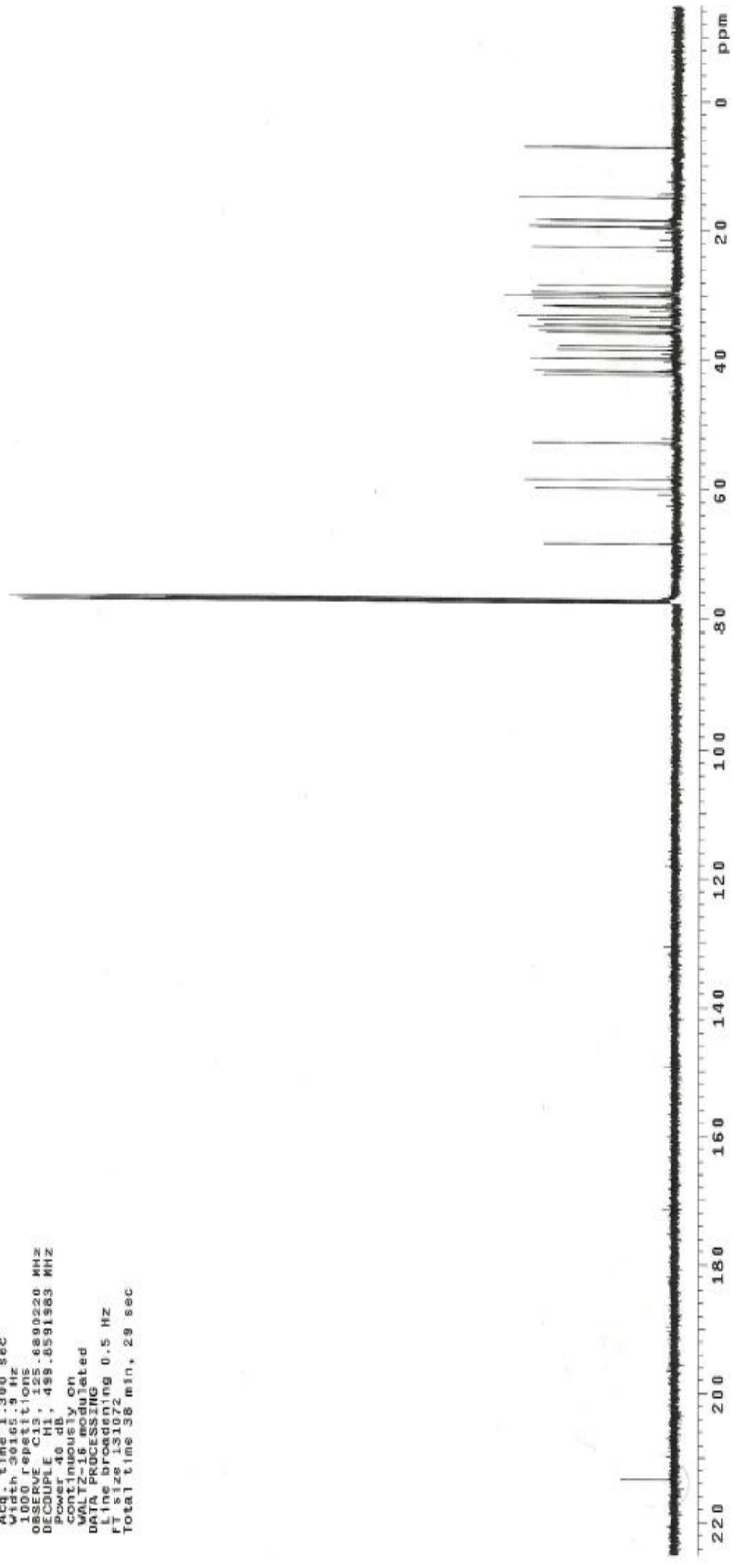


Figura 28. Espectro de RMN de ¹³C do 28-hidroxi-friedelin-3-ona

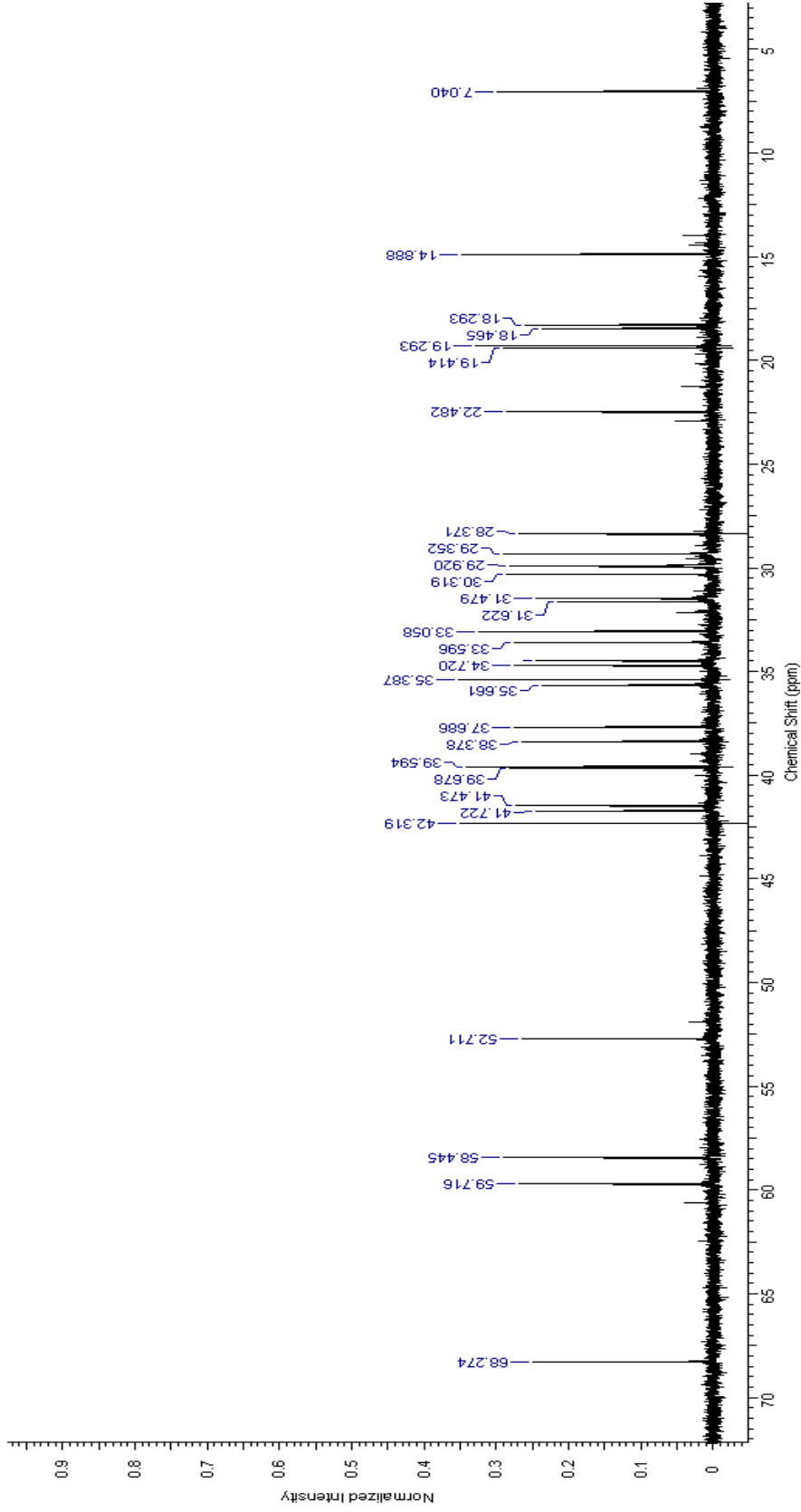


Figura 29. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C do 28-hidroxi-friedelin-3-ona

File: N14_162fDCM_5_7_5_1_Dept01
Pulse Sequence: DEPT

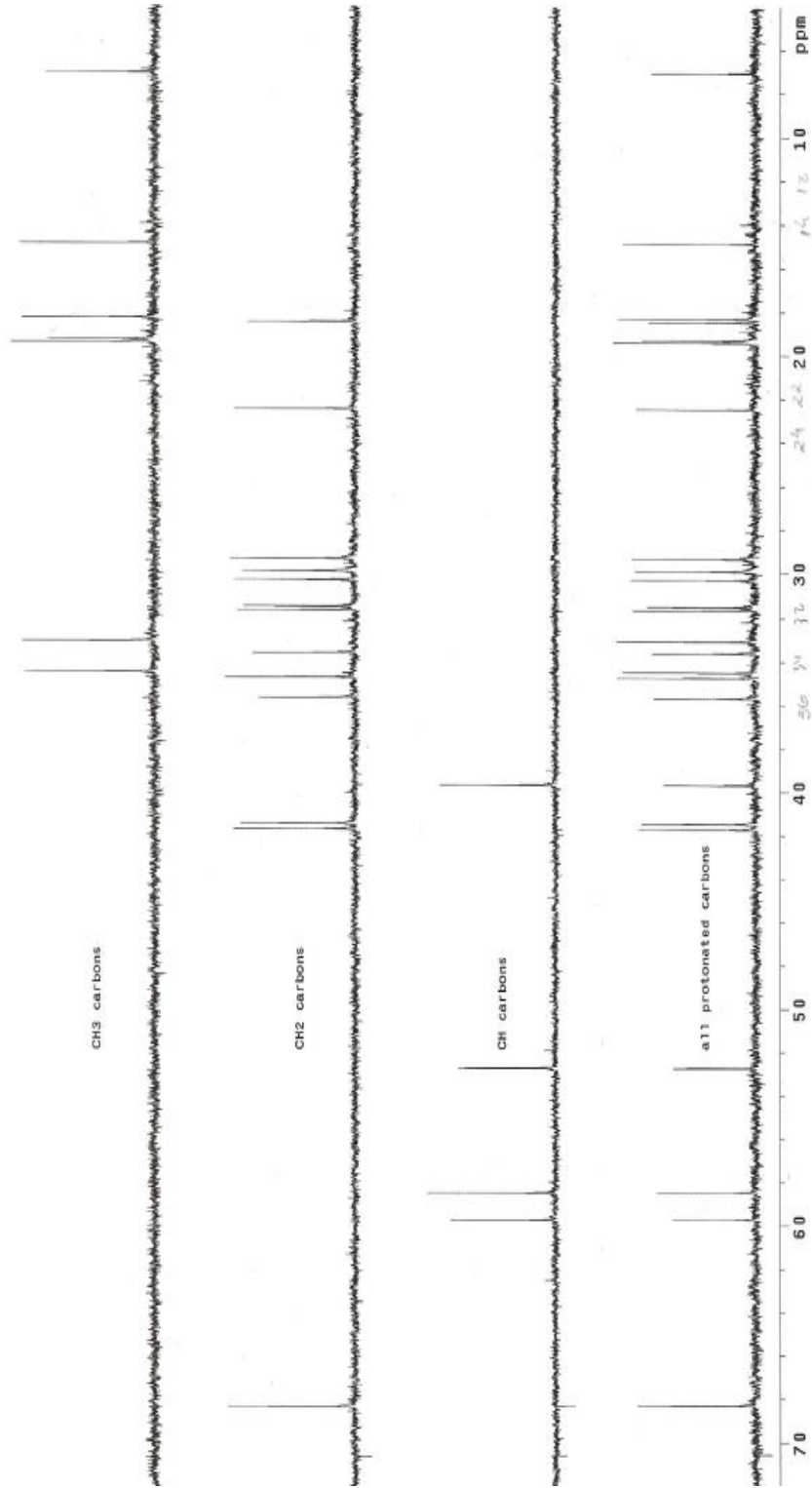


Figura 30. Espectro de RMN de DEPT do 28-hidroxi-friedelin-3-ona

5.2.2. Substância 2 com características de triterpeno.

A substância obtida da fração (5-7).(7).(4)., foi obtida na formas de cristais brancos e caracterizada como um triterpeno quando analisado seu espectro de ^1H .

O espectro de RMN de ^1H revelou 8 sinais entre δ_{H} 0,72 a 1,25, referentes aos hidrogênios de metilas, caracterizando um triterpeno.

Observaram-se sinais em δ_{H} 2,28 (*m*, 2H), em δ_{H} 2,39 (*ddd*, 2H, $J= 7$, $J= 5$ e $J= 2$ Hz), em δ_{H} 3,35 (*d*, 2H, $J= 10$ Hz) e em δ_{H} 3,42 (*d*, 2H, $J= 10\text{Hz}$) característico de hidrogênio carbinólico (Figura 31 e 32 p. 71 e 72).

Os espectros de ^{13}C até o presente momento não foi realizado por motivo de manutenção do equipamento.

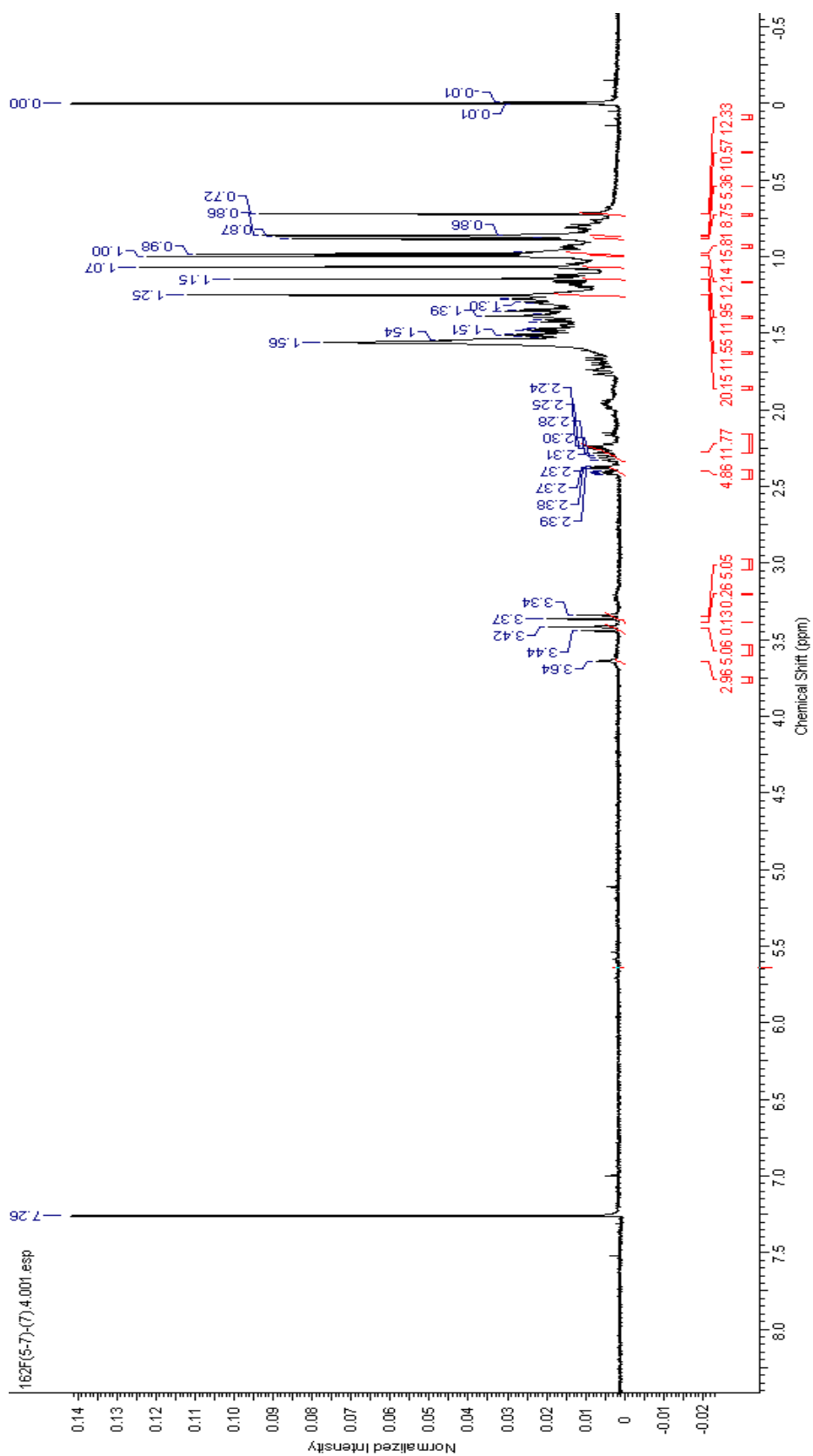


Figura 31. Espectro de RMN de ^1H da substância (5-7).(7).(4).,

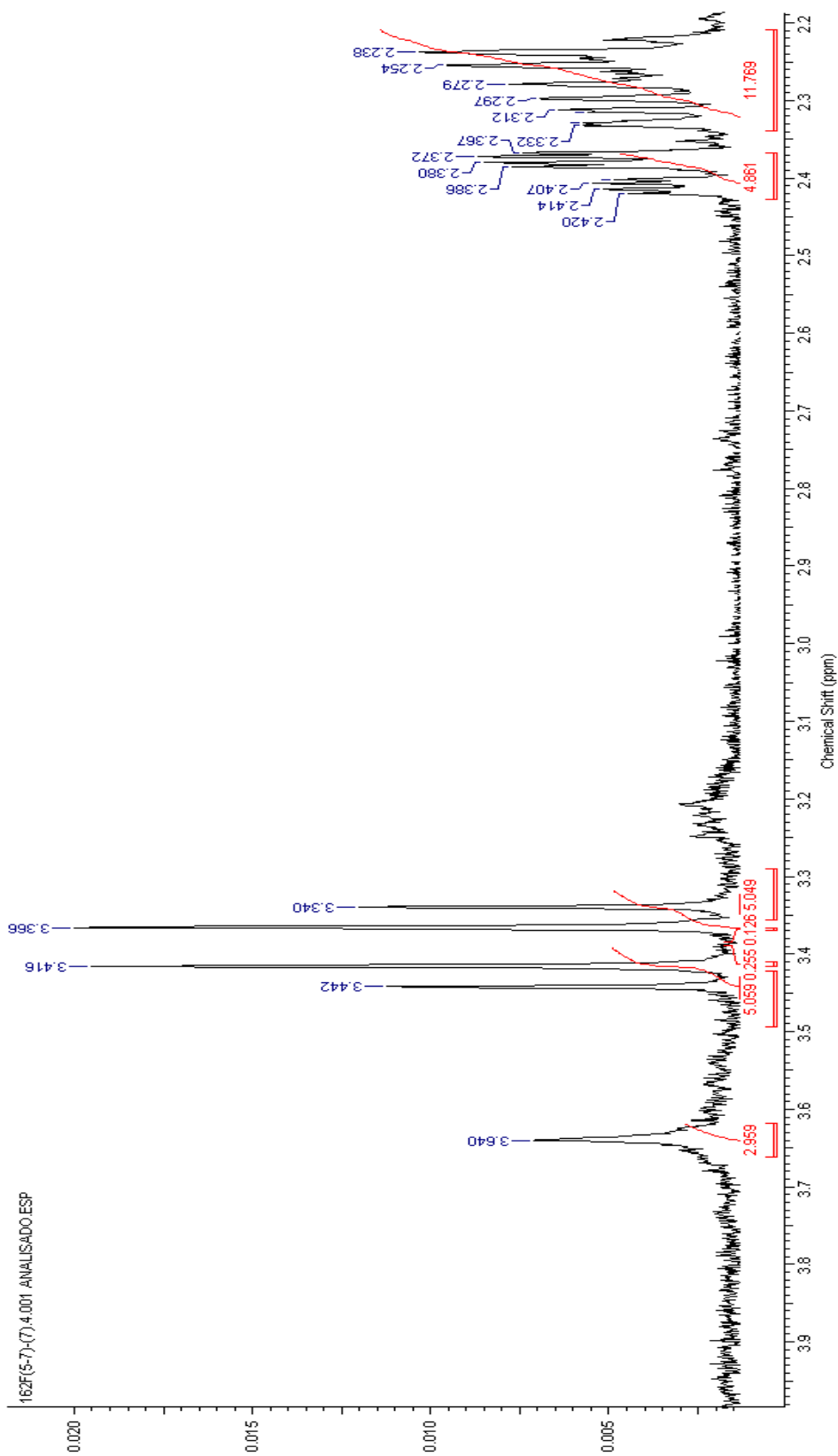


Figura 32. Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância (5-7).(7).(4).,

5. 3. Ensaio Biológicos

5.3.1. Atividade antimicrobiana contra *Aeromonas hydrophila*.

Os extratos hexânicos, DCM, MeOH e H₂O das folhas, galhos, cascas e caules de *P. trifoliata* foram analisados quanto à atividade antibacteriana frente a *Aeromonas hydrophila*. O resultado pode ser visualizado quanto ao seu halo de inibição (Figura 33).

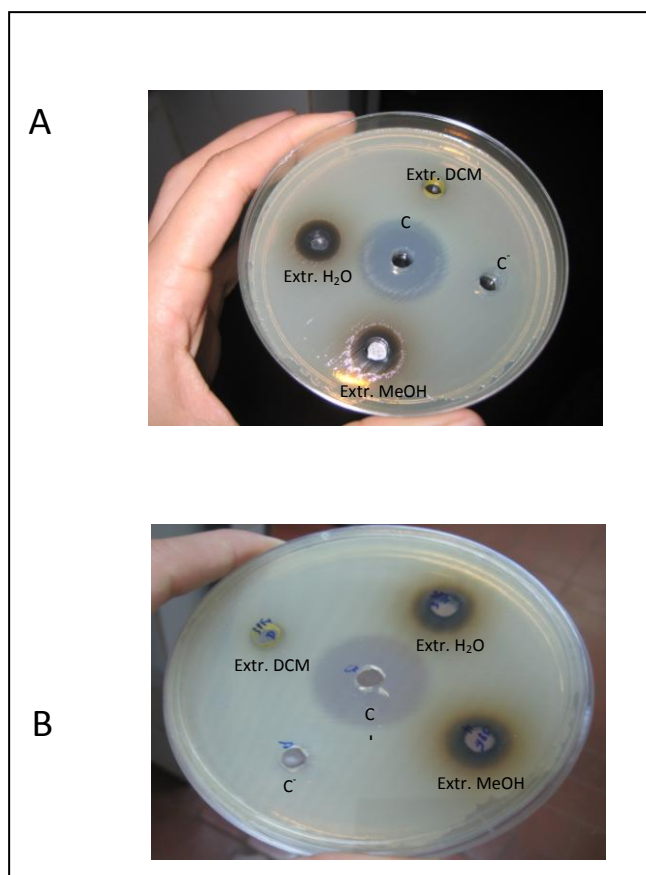


Figura 33. Resultado da atividade frente à *Aeromonas hydrophila*

A = placa vista de frente; B = placa vista pelo lado de trás.

As partes vegetais coletas foram organizadas em tabelas separadas para a melhor compreensão dos resultados como as seguintes medições adotadas no laboratório: de 0 a 6,9 mm é considerada baixa atividade, de 7 a 13,9 mm é considerada média atividade e acima de 14 mm será considerado alta atividade.

A tabela 13, mostra os resultados dos extratos das folhas para todas as coletas. Nela podem-se observar diferentes resultados quanto ao tamanho do halo de inibição. Os extratos DCM e hexânicos apresentaram variações de 2 a 3 mm, nas quatro coletas, indicando baixa ou sem atividade. Os extratos metanólicos apresentaram variações de 1 mm a 8 mm quando testados, no qual foi considerado uma média atividade os extratos dos talos das folhas da segunda coleta. Já os extratos aquosos das folhas, obtiveram variações quanto ao seu halo de inibição de 3 mm a 7 mm, mostrando-se que a segunda coleta apresenta importantes metabólitos secundários referente a este teste.

Tabela 13 - Resultados da atividade dos extratos das folhas contra a bactéria *Aeromonas hydrophila*

| <i>Aeromonas hydrophila</i> Concentração de 3 mg/mL de extratos | | | |
|--|---------------|------------------|------------------|
| Coleta | Parte vegetal | Solvente | Diâmetro do Halo |
| 1 | Folha | DCM | S/A |
| 1 | Folha | MeOH | 5 mm |
| 2 | Folha | DCM | 3 mm |
| 2 | Folha | MeOH | 4 mm |
| 2 | Folha | H ₂ O | 4 mm |
| 2 | T. folha* | DCM | S/A |

| | | | |
|---|-----------|------------------|------|
| 2 | T. folha* | MeOH | 8 mm |
| 2 | T. folha* | H ₂ O | 7 mm |
| 3 | Folha | Hexano | 2 mm |
| 3 | Folha | MeOH | 3 mm |
| 3 | Folha | H ₂ O | 3 mm |
| 4 | Folha | Hexano | S/A |
| 4 | Folha | MeOH | 1 mm |
| 4 | Folha | H ₂ O | 3 mm |

*Talo da folha (na 1ª coleta foi realizado extrato dessa parte vegetal separado).
S/A=sem atividade.

Outras partes vegetais testadas sobre a mesma bactéria foram os extratos dos galhos (Tabela 14), que apresentou semelhança quanto ao crescimento do seu halo de inibição. Na primeira coleta os extratos metanólicos apresentaram média atividade, os demais extratos mostraram-se com baixa ou sem atividade, na segunda e terceira coleta todos os extratos apresentaram baixa atividade mostrando que os metabolitos secundários não apresentam significância quando testado com este micro organismo.

Tabela 14 - Resultados da atividade dos galhos contra a bactéria *Aeromonas hydrophila*

| <i>Aeromonas hydrophila</i> | | | |
|-------------------------------------|---------------|----------|------------------|
| Concentração de 3 mg/mL de extratos | | | |
| Coleta | Parte gevetal | Solvente | Diâmetro do Halo |
| 1 | Galho | DCM | S/A |
| 1 | Galho | MeOH | 7 mm |

| | | | |
|---|-------|------------------|------|
| 1 | Galho | H ₂ O | 3 mm |
| 3 | Galho | Hexano | 3 mm |
| 3 | Galho | MeOH | 6 mm |
| 3 | Galho | H ₂ O | 3 mm |
| 4 | Galho | Hexano | 3 mm |
| 4 | Galho | MeOH | 6 mm |
| 4 | Galho | H ₂ O | N/T |

S/A=sem atividade, N/T= não testado.

A tabela 15 mostra os extratos dos caules obtidos apenas na segunda coleta. Como podemos observar, os halos de inibições dos extratos metanólicos e aquosos apresentaram média atividade, mostrando que essa parte vegetal possui importantes metabólitos secundários.

Tabela 15 - Resultados da atividade dos caules contra a bactéria *Aeromonas hydrophila*

| <i>Aeromonas hydrophila</i> Concentração de 3mg/mL de extratos | | | |
|---|---------------|------------------|------------------|
| Coleta | Parte vegetal | Solvente | Diâmetro do Halo |
| 2 | Caule | DCM | 3 mm |
| 2 | Caule | MeOH | 7 mm |
| 2 | Caule | H ₂ O | 7 mm |

Já a tabela 16, mostra os resultados obtidos dos extratos das cascas, coletados apenas em uma época do ano. Seus halos de inibições variaram de 1 mm a 6 mm, mostrando-se todos com baixa atividade.

Tabela 16 - Resultados da atividade das cascas contra a bactéria *Aeromonas hydrophila*

| <i>Aeromonas hydrophila</i> | | | |
|------------------------------------|---------------|------------------|------------------|
| Concentração de 3mg/mL de extratos | | | |
| Coleta | Parte gevetal | Solvente | Diâmetro do Halo |
| 3 | Casca | Hexano | 1 mm |
| 3 | Casca | MeOH | 6 mm |
| 3 | Casca | H ₂ O | 3 mm |

Diversos estudos mostram que os extratos metanólicos de espécies vegetais são constituídos por metabólitos secundários como flavonóides, triterpenóides, alcalóides, antraquinonas, dentre outras, que apresentam atividade antibacteriana (CONEGERO, et al., 2003; KUETE et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007).

Como os extratos testados são provenientes de coletas diferentes, realizadas em épocas do ano diferentes, a natureza das substâncias e a concentração responsável pela atividade antibacteriana contra *Aeromonas hydrophila* podem estar variando conforme a sazonalidade e a temperatura.

5.3.1.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).

A análise antibacteriana por difusão em ágar é classificada como qualitativa, dessa forma, para se obter um resultado quantitativo, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração mínima bactericida (CMB) das fases obtidas do extrato metanólico dos galhos da

primeira coleta, os extrato metanólico e aquoso do caule e Talo das folhas da segunda coleta, para uma melhor avaliação de sua atividade (tabela 17).

Tabela 17. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).

| Concentrações Mínimas contra <i>Aeromonas hydrophila</i> | | | | |
|--|---------------|--------------------|-------------|-------------|
| Amostra | Parte gevetal | Solvente | CIM (mg/mL) | CBM (mg/mL) |
| 1.1 | Galho | AcOEt* | 2,5 | 5 |
| 1.2 | Galho | BuOH* | 5 | 10 |
| 1.3 | Galho | H ₂ O* | 2,5 | 10 |
| 2 | Caule | MeOH** | 2,5 | 10 |
| 2 | Caule | H ₂ O** | 2,5 | 16 |
| 2 | T. Folha | MeOH** | 5 | 16 |
| 2 | T. Folha | H ₂ O** | 2,5 | 16 |

*fases; **extrato bruto.

Como podemos observar as amostras obtidas da partição do extrato metanólico dos galhos da primeira coleta apresentou um MIC que variou de 2,5 a 5 mg/mL e um MBC entre 5 e 10 mg/mL. Outros resultados satisfatórios estão relacionados com os caules e talo das folhas da segunda coleta o qual apresentaram MIC de 2,5 e MBC com variação de 10 a 16 mg/mL.

Através desses resultados podemos dizer que as fases obtidas dos galhos possuem atividade tanto bacteriostática quanto bactericida, ou seja, pode tanto inibir o crescimento quanto possuir a capacidade de matar a bactéria.

5.3.2 Atividade antimalárica dos extratos vegetais.

Para a avaliação do potencial antimalárico dos extratos, foram selecionados apenas alguns extratos devido já não contarmos com massa suficiente.

As amostras foram testadas em duas concentrações, 25 e 50 µg/ml. Os extratos das folhas mostraram-se com resultados (Tabela 18) satisfatórios visto que, da primeira coleta o extrato metanólico apresentou uma redução de parasitemia igual a 52% na concentração de 25 µg/mL e 100% na concentração de 50 µg/mL.

Para os extratos da segunda e terceira coleta os extratos diclorometânicos (42% em 25 µg/mL e 100% em 50 µg/mL), hexânicos (100% em 25 µg/mL e 100% em 50 µg/mL), metanólicos (100% em 25 µg/mL e 100% em 50 µg/mL; 78 % em 25 µg/mL e 100% em 50 µg/mL) e aquoso (42% em 25 µg/mL e 100% em 50 µg/mL) mostraram um bom percentual de redução de parasitemia seguido dos extratos metanólicos da quarta coleta. Esses resultados que apresentaram um percentual de redução de parasitemia igual ou maior que 50% (tabela 18) nas duas concentrações foram testados para determinação da CI_{50} .

Tabela 18. Atividade antimalárica contra *P. falciparum* das folhas de *P. trifoliata*

| Amostra | P. Vegetal | Solvente | % Red. | |
|-------------------|------------|------------------|------------|------------|
| | | | 25µg/ml | 50µg/ml |
| 1 | Folhas | MeOH | 52 | 100 |
| 2 | Folhas | DCM | 42 | 100 |
| 2 | Folhas | H ₂ O | 42 | 100 |
| 2 | Folhas | MeOH | 100 | 100 |
| 2 | T folhas* | H ₂ O | 14 | 42 |
| 2 | T. folhas* | MeOH | 50 | 100 |
| 3 | Folhas | Hex | 100 | 100 |
| 3 | Folhas | MeOH | 78 | 100 |
| 4 | Folhas | Hex | 30 | 84 |
| 4 | Folhas | MeOH | 78 | 100 |
| Cloroquina | | | 100 | 100 |

* Talo da folha

O extrato metanólico e a fase butanólica dos galhos da primeira coleta apresentaram um bom percentual de redução de parasitemia (69% em 25 µg/mL e 100% em 50 µg/mL) e (67% em 25 µg/mL e 100% em 25 µg/mL), respectivamente. Essa redução pode ser observada também nos extratos metanólicos da terceira e quarta coleta (100% em 25 e 50 µg/mL), os demais extratos dos galhos analisados, não apresentaram resultados satisfatórios (Tabela 19).

Tabela 19. Atividade antimalárica contra *P. falciparum* dos galhos de *P. trifoliata*

| Amostra | P. vegetal | Solvente | % Red. | |
|-------------------|------------|------------------|------------|------------|
| | | | 25µg/ml | 50µg/ml |
| 1 | Galhos | BuOH | 67 | 100 |
| 1 | Galhos | DCM | 22 | 50 |
| 1 | Galhos | H ₂ O | 0 | 37 |
| 1 | Galhos | MeOH | 69 | 97 |
| 3 | Galhos | MeOH | 100 | 100 |
| 4 | Galhos | MeOH | 100 | 100 |
| 4 | Galhos | Hex | 0 | 0 |
| Cloroquina | | | 100 | 100 |

Os extratos metanólicos e aquosos dos caules da segunda coleta apresentaram um percentual de 97% e 69% para a concentração de 25 µg/mL e 100% para a concentração de 50 µg/mL (Tabela 20), portanto estes foram selecionados para IC₅₀.

Tabela 20. Atividade antimalárica contra *P. falciparum* dos calhes de *P. trifoliata*

| Amostra | P. vegetal | Solvente | % Red. | |
|-------------------|------------|------------------|------------|------------|
| | | | 25µg/ml | 50µg/ml |
| 2 | Caule | DCM | 4 | 50 |
| 2 | Caule | H ₂ O | 97 | 100 |
| 2 | Caule | MeOH | 69 | 100 |
| Cloroquina | | | 100 | 100 |

Os estudos relacionados com as cascas da terceira coleta mostraram que apenas o extrato metanólico foi capaz de ter um percentual de redução de parasitemia (tabela 21).

Tabela 21. Atividade antimalárica contra *P. falciparum* das cascas de *P. trifoliata*

| Amostra | P. vegetal | Solvente | % Red. | |
|-------------------|------------|----------|------------|------------|
| | | | 25µg/ml | 50µg/ml |
| 3 | Casca | Hex | 24 | 78 |
| 3 | Casca | MeOH | 100 | 100 |
| Cloroquina | | | 100 | 100 |

5.3.3 Atividade citotóxica frente ao microcrustáceo *Artemia salina*

Neste ensaio foram submetidas amostras dos extratos das quatro coletas realizadas de *Piranhea trifoliata*. A tabela 22 mostra os resultados do ensaio realizado com o microcrustáceo *Artemia salina*. Além desses extratos, outras partes vegetais agrupadas nas tabelas 7, 8 e 9 mostram-se com letalidade significativa contra o microcrustáceo. Esse teste foi realizado a partir de uma concentração máxima (1000 µg/mL), e caso apresentassem uma mortalidade acima de 50%, seriam testado em concentrações menores até encontrar a CL₅₀.

Os extratos metanólicos obtidos das folhas da segunda coleta se mostraram com maior citotoxicidade, tendo uma mortalidade de 76,6 % quando

testados com uma concentração de 1000 µg/mL, esse mesmo extrato foi testado novamente, agora com uma concentração de 800 µg/mL e apresentou uma mortalidade de 70 % mostrando-se bastante tóxico. Os extratos referentes à primeira, terceira e quarta coleta amostraram todos com baixa citotoxicidade.

Tabela 22. Teste de citotoxicidade das folhas realizado frente à *Artemia salina*

| Coleta | Partes vegetal | Solvente** | Mortalidade (%) nas concentrações (µg/mL) | | |
|--------|----------------|------------|---|------|------|
| | | | 1000 | 800 | 400 |
| 1 | Folha | DCM | NT | NT | NT |
| 1 | Folha | MeOH | 10 | NT | NT |
| 2 | Folha | DCM | NT | NT | NT |
| 2 | Folha | MeOH | 26,6 | NT | NT |
| 2 | Folha | H2O | 36,6 | NT | NT |
| 2 | T. folha* | DCM | NT | NT | NT |
| 2 | T. folha* | MeOH | 76,6 | 70 | NT |
| 2 | T. folha* | H2O | 0 | NT | NT |
| 3 | Folha | Hexano | 75,4 | 55,3 | 13,3 |
| 3 | Folha | MeOH | 16,6 | NT | NT |
| 3 | Folha | H2O | 10 | NT | NT |
| 4 | Folha | Hexano | 74,7 | 56,7 | 13,8 |
| 4 | Folha | MeOH | 3,3 | NT | NT |
| 4 | Folha | H2O | NT | NT | NT |

*Talo da folha, considerado como folha.

**Solvente que foi solubilizado a amostra.

NT= não testada.

A tabela 23 mostra os resultados dos galhos coletados em três épocas do ano diferente. Nela, pode-se observar uma alta citotoxicidade na maioria dos extratos, em que alguns deles foram testados em menores concentrações a fim

de encontrar a CL_{50} . Os extratos DCM podem apresentar sua CL_{50} em uma concentração variante entre 800 $\mu\text{g/mL}$ a 400 $\mu\text{g/mL}$, para os extratos hexânicos essa concentração pode variar de 400 $\mu\text{g/mL}$ a 200 $\mu\text{g/mL}$ e os metanólicos em torno de 700 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 23. Teste de citotoxicidade dos galhos realizado frente à *Artemia salina*

| Mortalidade (%) nas concentrações ($\mu\text{g/mL}$) | | | | | | | |
|--|---------------|------------------|------|------|------|------|------|
| Coleta | Parte vegetal | Solvente* | 1000 | 800 | 400 | 300 | 200 |
| 1 | Galho | DCM | 63,4 | 54,3 | 26,6 | NT | NT |
| 1 | Galho | MeOH | 46,6 | NT | NT | NT | NT |
| 1 | Galho | H ₂ O | 93,3 | NT | NT | NT | NT |
| 3 | Galho | Hexano | 88,5 | 81,5 | 73,3 | 56,5 | 16,6 |
| 3 | Galho | MeOH | 20 | NT | NT | NT | NT |
| 3 | Galho | H ₂ O | NT | NT | NT | NT | NT |
| 4 | Galho | Hexano | 69,4 | 59,0 | 56,6 | 16,6 | NT |
| 4 | Galho | MeOH | 60,4 | 33,3 | NT | NT | NT |
| 4 | Galho | H ₂ O | NT | NT | NT | NT | NT |

*Solvente que foi solubilizado a amostra.

NT= não testada.

A tabela 24 mostra os resultados dos extratos dos caules, o qual foi coletado em apenas uma época do ano, em que apenas o extrato metanólico apresentou alta citotoxicidade e sua CL_{50} pode ser encontrada nas concentrações entre 1000 $\mu\text{g/mL}$ e 800 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 24. Teste de citotoxicidade dos caules realizado frente à *Artemia salina*

| Mortalidade (%) nas concentrações (µg/mL) | | | | | |
|---|----------------|------------------|------|-----|-----|
| Coleta | Partes vegetal | Solvente* | 1000 | 800 | 400 |
| 2 | Caule | DCM | NT | NT | NT |
| 2 | Caule | MeOH | 66,6 | 40 | NT |
| 2 | Caule | H ₂ O | 6,6 | NT | NT |

*Solvente que foi solubilizado a amostra; NT= não testada.

A tabela abaixo mostra os resultados dos testes realizados com os extratos das cascas. A CL₅₀ dos extratos metanólicos encontrado foi obtida em uma concentração de 1000 µg/mL.

Tabela 25. Teste de citotoxicidade das cascas realizado frente à *Artemia salina*

| Mortalidade (%) nas concentrações (µg/mL) | | | | | |
|---|----------------|------------------|------|-----|------|
| Coleta | Partes vegetal | Solvente | 1000 | 800 | 400 |
| 3 | Casca | Hexano | NT | NT | 53,3 |
| 3 | Casca | MeOH | 50 | NT | NT |
| 3 | Casca | H ₂ O | NT | NT | NT |

Segundo MEYER et al. (1982), extratos com valores de CL₅₀ inferiores a 1000 µg/mL são considerados bioativos.

Conforme os resultados demonstrados, pode-se observar que diversas amostras testadas apresentam considerável bioatividade frente à *Artemia salina*, indicando que podem ser prosseguidos os estudos biológicos com algumas partes vegetais de *P. trifoliata*, uma vez que este ensaio foi utilizado

como estudo inicial para detecção simultânea de toxicidade (OJALA et al., 1999; MOREIRA et al., 2003; PIMENTA et al., 2003).

5.3.4. Atividade antioxidante

A determinação do potencial antioxidante ocorreu com a redução do radical DPPH em contato com as substâncias presentes nos extratos de *Piranhea trifoliata*.

Essa reação é perceptível quando há uma mudança na sua coloração, do roxo para o amarelo esbranquiçado, devido à presença de grupos doadores de hidrogênio. Na tabela 26, podemos observar que os extratos metanólicos das folhas apresentaram uma boa atividade com uma equivalência entre 1 e 2, isso mostra que esses extratos possuem importantes metabólitos secundários com um potencial antioxidante, outros extratos que apresentaram boa atividade foram os extratos aquosos como pode ser observado o talo da folha da segunda coleta.

Os extratos DCM e hexânicos por sua vez não apresentaram uma boa atividade antioxidante. Esse fato pode ser explicado devido aos metabólitos secundários responsáveis, não possuírem grupos de hidrogênio ou hidroxilas livres em sua estrutura.

Tabela 26. Resultados dos extratos das folhas de *Piranhea trifoliata* quanto ao seu potencial antioxidante

| Atividade Antioxidante | | | |
|------------------------|---------------|------------------|--------------|
| Coleta | Parte vegetal | Solvente | Equivalência |
| 1 | Folha | DCM | 19,05 |
| 1 | Folha | MeOH | 1,53 |
| 2 | Folha | DCM | 18,28 |
| 2 | Folha | MeOH | 1,24 |
| 2 | Folha | H ₂ O | 9,49 |
| 2 | T. folha* | DCM | 46,28 |
| 2 | T. folha* | MeOH | 1,44 |
| 2 | T. folha* | H ₂ O | 1,52 |
| 3 | Folha | Hexano | 16,89 |
| 3 | Folha | MeOH | 1,66 |
| 3 | Folha | H ₂ O | NT |
| 4 | Folha | Hexano | 18,37 |
| 4 | Folha | MeOH | NT |
| 4 | Folha | H ₂ O | NT |

NT=Não testado * Talo da folha

O resultado da atividade antioxidante obtida dos galhos (Tabela 27) mostrou que os extratos metanólicos e aquosos tiveram um bom resultado nas três coletas, com sua equivalência entre 1,33 e 1,82. Com relação aos extratos DCM e hexânicos, o potencial antioxidante apresentou-se com uma maior equivalência entre 20,05 e 56,97.

Tabela 27. Resultados dos extratos dos galhos de *Piranhea trifoliata* quanto ao seu potencial antioxidante

| Atividade Antioxidante | | | |
|------------------------|---------|------------------|--------------|
| | Amostra | Solvente | Equivalência |
| 1 | Galho | DCM | 22,12 |
| 1 | Galho | MeOH | 1,82 |
| 1 | Galho | H ₂ O | 1,65 |
| 3 | Galho | Hexano | 56,97 |
| 3 | Galho | MeOH | 1,33 |
| 3 | Galho | H ₂ O | NT |
| 4 | Galho | Hexano | 20,05 |
| 4 | Galho | MeOH | 1,58 |
| 4 | Galho | H ₂ O | NT |

NT=Não testado

Os extratos dos caules foram coletados em apenas uma época do ano e seus resultados mostram uma boa equivalência para os extratos metanólicos e aquosos observados na tabela 28.

Tabela 28. Resultados dos extratos dos caules de *Piranhea trifoliata* quanto ao seu potencial antioxidante

| Atividade Antioxidante | | | |
|------------------------|---------|------------------|--------------|
| | Amostra | Solvente | Equivalência |
| 2 | Caule | DCM | 20,94 |
| 2 | Caule | MeOH | 1,34 |
| 2 | Caule | H ₂ O | 1,43 |

Os extratos das cascas por sua vez, foram coletados também em apenas uma época do ano e foram analisados apenas os extratos metanólicos que se mostrou com um bom potencial antioxidante (Tabela 29).

Tabela 29. Resultados dos extratos dos caules de *Piranhea trifoliata* quanto ao seu potencial antioxidante

| Atividade Antioxidante | | | |
|------------------------|---------|------------------|--------------|
| | Amostra | Solvente | Equivalência |
| 3 | Casca | Hexano | NT |
| 3 | Casca | MeOH | 1,51 |
| 3 | Casca | H ₂ O | NT |

NT=Não testado

Os extratos metanólicos e aquosos de todas as partes vegetais mostraram um maior potencial antioxidante quando comparado com a equivalência do ácido ascórbico. Já os extratos diclorometânico e hexânicos

foram os menos ativos. Isso indica que a espécie *P. trifoliata* possui importantes metabólitos secundários com alta polaridade e que possui hidrogênios livres em sua estrutura capazes de realizar uma boa interação quando em contato com o radical DPPH.

6. CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico preliminar realizado por meio de cromatografia em camada delgada, com a espécie *Piranhea trifoliata* (PICRODENDRACEAE) evidenciou a presença das seguintes classes químicas: triterpenos e flavonóides.

O fracionamento por cromatografia em coluna de sílica-gel do extrato diclorometânico da segunda coleta forneceu o triterpeno 28-hidroxi-friedelin-3-ona, o qual foi identificado por RMN de ^1H e ^{13}C , sendo descrito pela primeira vez nesta família. Da segunda substância isolada foi possível identificar apenas a sua classe química, como sendo um triterpeno, até o presente momento não obtivemos os espectros de carbono treze. Outras substâncias foram isoladas, mas, até o presente momento seus espectros ainda não foram obtidos.

A atividade antibacteriana dos extratos e fases sobre *Aeromonas hydrophila* evidenciou que os mesmos apresentaram média atividade principalmente os extratos MeOH dos galhos (1ª coleta), talo das folhas e caule (2ª coleta) e H₂O dos caules (2ª coleta). Esses resultados foram confirmados quando analisados a concentração mínima bactericida e a concentração mínima bacteriostática, destacando a fase AcOET dos galhos (1ª coleta) por apresentar menor resultado de ambos sendo considerado bactericida e bacteriostático.

A atividade antimalárica mostrou que os extratos MeOH das folhas, galhos e fase BuOH dos galhos (1ª coleta) foram ativos seguido dos extratos MeOH das folhas e Caule (2ª coleta), MeOH das folhas, galhos, casca e

Hexânico das folhas (3ª coleta) e MeOH das folhas e galhos (4ª coleta), confirmando que estes possuem importantes metabólitos secundários capazes de matar esse micro organismo.

O ensaio de toxicidade sobre *Artemia Salina* mostrou que os extratos das quatro coletas possuem alta toxicidade evidenciando os extratos hexânicos das folhas e galhos (3ª e 4ª coleta) que possuíram uma maior toxicidade.

A determinação do potencial antioxidante evidenciou que os extratos metanólicos e aquosos das folhas, talo das folhas, galhos, caule e casca (1ª, 2ª, 3ª e 4ª coleta) apresentaram importantes equivalências quando comparados com o ácido ascórbico.

Esses resultados contribuíram para o conhecimento das atividades biológicas bem como o conhecimento das substâncias químicas de *Piranhea trifoliata*, tendo em vista que o triterpeno isolado, esta sendo descrito pela primeira vez na família. Estes resultados mostraram-se promissores, abrindo oportunidades para futuros desenvolvimentos de fármacos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A. S., BARBOSA, P. S., MULLER, A. H. (PQ), GUILHON, G. M. S. Constituintes químicos do caule e das cascas de *Croton pullei* var. *Glabrior* (EUPHORBIACEAE). *Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA*. Vol 1, No 2, Julho, 2001.

ACUÑAL, G. Evolución de la terapia antimicrobiana: lo que era, lo que es y lo que será. *Rev Chil Infect (Supl 1)*: p. 7-10, 2003.

AHMAD, V.U., RAHMAN, U. Pentacyclic triterpenoids. *Handbook of natural products Amsterdam-London-NewYork-Tokyo*. vol. 2, p 1556. 1994

AKINBOWALE, O.L.; PENG, H.; GRANT, P.; BARTON, M.D. Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 30 p. 177–182, 2007.

ALBAGLI S. Amazônia: fronteira geopolítica da biodiversidade. *Revista Parcerias Estratégicas*. 2001.

Disponível em: <<http://ftp.mct.gov.br/CEE/revista/Parcerias12/01sarita>>.

ALMEIDA, V. L., LEITAO, A., REINA, L. D. C. B., MONTANARI, C. A., DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não-específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 28, n. 1, jan./fev. 2005

AMMANAMANCHI, S. R. A, RAO, V.i L., and SCREEDHAR, K. *Ent*-Kaurane and Beyerane Diterpenoids from *Excoecaria agallocha*¹. *Journal of Natural Products*, Vol. 65, No.3. p.382-385. 2002.

ANDRADE, J. I. A. Atividade antibacteriana dos extratos dos frutos de *Coussapoa asperifolia magnifolia* (Trécul) contra *Aeromonas hydrophila* e fracionamento do extrato metanólico. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual do Amazonas, Manaus. 2009

ANDRADE, S. L. Aspectos Epidemiológicos da Malária no Parque Nacional do Jaú, Amazonas, Brasil. 287p. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, 2005.

ARAÚJO, C. A. C, LEON, L. L. Biological activities of *Curcuma longa*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v96, p723-728, 2001.

ARABBI, P.R.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated by the Brazilian population. J. Agric. Food Chem., v. 52, p. 1.124-1.131, 2004.

ASSIS, S.A.; LIMA, D.C.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development. Food Chem., v. 74, p. 133-137, 2001.

APGII: SOUZA, V. C., LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrada para identificação da família de fanerógoma nativas e exóticas no Brasil, 2ed. Nova Odessa. SP. Instituto Plantarium, 2008.

APGIII: SOUZA, V. C., LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrada para identificação da família de fanerógoma nativas e exóticas no Brasil, 2ed. Nova Odessa. SP. Instituto Plantarium, 2003.

BACAB-CHAN, M. J., RODRIGUEZ-PEÑA, L. M. Plant natural products with leishmanicidal activity. Nat. Prod. Rep. Vol. 18. p. 674-688. 2001.

BALANDRIN, M. F. Symposium Series No. 534, American Chemical Society, Washington, D.C., p. 112-137. 1993.

BATISTA, E. F., FONSECA, M. S. R., GUILHON, G. M. S. P., SANTOS, L. S. S., MULLER, A. H., ARRUDA, M. S. P., ARRUDA, A. C., SECCO, R. S. Constituintes fenólicos do caule e das folhas de *Alchornea discolor* (Euphorbiaceae). Sociedade Brasileira de Química (SBQ) 30a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2004.

BEHERA, B.C.; VERMA, N.; SONONE, A.; MAKHIJA, U. Antioxidant and antibacterial properties of some cultured lichens. Bioresource Technology, v. 99, p. 776–784, 2008.

BITTNER, M. et al. Estudio químico de especies de la familia Euphorbiaceae em Chile. Bol. Soc. Chil. Quim., Concepción, v. 46, n. 4, p. 1-15, dez. 2001.

BLEVINS, S. M.; GREENFIELD, R. A.; BRONZE, M. S. Blood smear analysis in babesiosis, ehrlichiosis, relapsing fever, malaria, and Chagas disease. Cleveland Clinic Journal of Medicine, v. 75, n. 7, p. 521-530, 2008.

BORGES, S. H.; IWANAGA, S.; DURIGAN, C. C.; PINHEIRO, M. R. Janelas para a biodiversidade no Parque Nacional do Jaú: uma estratégia para o estudo da biodiversidade na Amazônia. Manaus: Fundação Vitória Amazônica, 2004.

BRANCO, A.; PIZZOLATTI, M. G. CGAR e CGAR-EM na análise dos constituintes químicos isolados do extrato hexânico de *Sebastiania argutidens* (Euphorbiaceae). *Química Nova*, v. 25, Nº 1, 15-19, 2002.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, v. 28, p. 25-30, 1995.

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.

CANELON, D. J., COMPAGNONE, S., CASTILLO, A., SUAREZ, A. I. Chemical constituents from *Senefeldropsis chiribiquetensis*. *Biochemical Systematics and Ecology* Nº 33 p. 1303e1306. 2005

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, Nº 9, p 1575-1579, 1993

CECHINEL FILHO, V. & YUNES, R. A. Estudo Químico de Plantas Medicinais Orientado para a Análise Biológica: Obtenção, Determinação e Modificação Estrutural de Compostos Bioativos. In: YUNES, R. A., CALIXTO, J. B. (Eds.) *Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó: Editora Argós. 523 p. 2001.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para a otimização da atividade. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 21, n. 1, jan./fev. 1998.

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*. nº57. p. 141-181. 2002.

CLAUDINO, G. P. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade citotóxica e antioxidante de *Paullinia weinmanniaefolia*. Tese. CCT/ UENF. 2005.

COLLINS, C.H.;BRAGA, G.L.;BONATO,P.S. Introdução a métodos cromatográficos. Campinas, 4a.ed.,Editora da UNICAMP, p.279. 1990.

CONEGERO, L. S., IDE, R. M., NAZARI, A. S., SARRAGIOTTO, M. H., DIAS filho, B. P., NAKAMURA, C. V., CARVALHO, J. E. C., FOGLIO, M. A. Constituintes Químicos de *Alchornea glandulosa* (EUPHORBIACEAE). *Quim. Nova*, Vol. 26, No. 6, 825-827, 2003.

CORDENUNSI, B.R.; GENOVESE, M.I.; NASCIMENTO, J.R.O.; HASSIMOTTO, N.M.A.; SANTOS, R.J.; LAJOLO, f.m. Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. *Food Chem.*, v. 91, p. 113-121, 2005.

CORONA-CAMACHO, M. R., FAVELA-HERNÁNDEZ, J. M. J., GONZÁLEZ-SANTIAGO, O., GARZA-GONZÁLES, E., MOLINA-SALINAS, G. M., SAID-FERNADEZ, S., DELGADO, G., LUNA-HERRERA, J. Evaluation of some Plant – deriver secondary metabolites against sensitive and multidrug – resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Mex. Chem. Soc.* Vol. 53 (2). p. 71-75. 2009.

COUTINHO, H. D. M., BEZERRA, D. A. C., LÔBO, K., BARBOSA, I. J. F. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. *Conceitos*, 2004.

CUNICO, M. M.; DIAS, J. G.; MIGUEL, M. D.; OBDULIO, G. M.; AUER, C. G.; CÔCCO, L. C.; LOPES, A. R.; YAMAMOTO, C. I.; MONACHE, F. D. Potencial antimicrobiano e alelopático das amidas isoladas do extrato das raízes de *Ottonia martiana* Miq. *Química Nova*, v. 29 p. 746-749, 2006.

COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. *Cell*, v. 124, n. 4, p. 755–766, 2006.

DAPKEVICIUS, A., VENSKUTONIS, R., BEEK, T. A. V. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of Science Food Agric.* v. 77. 1998.

DE-JI, P., CHANG-QI, H., JER-JANG, C., LEE, T-Y., YUH-PAN, C., HONGYEN, H., McPHAIL, D. R., McPHAIL, A. T. Kanmiphorin-C and D citotoxic diterpenes from *Euphorbia kansui*. *Phytochemistry*, New York, v. 30, n. 3, p. 1018-1020, 1991.

DUARTE, M. C. T., FIGUEIRA, G. M., SARTORATTO, A., REHDER, V. L. G., DELARMEINA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v97, p305-311, 2005.

FETROW, C. W., ÁVILA, J. R. Manual de medicina alternativa para o profissional. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999.

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

FRAGA FILHO, C. Radicais Livres: vilões ainda em estudo. *Ciênc. Hoje*, v.27, p. 60- 62, 2003.

FREITAS, P. C. D. Avaliação "in vitro" da atividade antioxidantes de plantas medicinais brasileiras da família Piperraceae. São Paulo: USP, 2000. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos), Universidade de São Paulo, 2000.

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

GATTI, S.; GRAMEGNA, M.; BISOFFI, Z.; RAGLIO, A.; GULLETTA, M.; KLERSY, C.; BRUNO, A.; MASERATI, R.; MADAMA, S.; SCAGLIA, M.; GISPI STUDY GROUP. A comparison of three diagnostic techniques for malaria: a rapid diagnostic test (NOW Malaria), PCR and microscopy. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 101, n. 3, p. 195-204, 2007

GIORDANI, R. B.; PAGLIOSA, L. B.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI, J.A.; Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). *Química Nova*, Vol. 31, No. 8, Pp 2042-2046, 2008.

GHENGHESH, K. S.; EL-GHODBAN, A.; DKAKNI, R.; ABEID, S.; ALTOMI, A.; TAHRUNI, A.; MARIALIGETI, K. Prevalence, species differentiation, haemolytic activity, and antibiotic susceptibility of aeromonads in untreated well water. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 2, p. 169-173, 2001.

GONZÁLES, A. M.; PRESA, M.; LATORRE, M. G.; LURÁ, M. C. Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*. *Revista Iberoamericana de Micología*. v. 24 p. 59-61. 2007.

GOBBO-NETO, L. & LOPES, N. P. Plantas Medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. 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.

GAMA, J. J. T. Efeitos do processo de obtenção do catchup sobre seus compostos antioxidantes, capacidade seqüestrante do radical DPPH e cor. 2008, 169f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, São Paulo, 2008.

GUERRA, M. P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2. Ed. p.13 - 26, 2001.

HAMBURGER, M, e HOSTTMAN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine *Phytochemistry*, vol. 30 (12), pp. 3864. 1991.

HALDAR, K.; MOHANDAS, N. Erythrocyte remodeling by malaria parasites. *Current Opinion in Hematology*, v. 14, n. 3, p. 203-209, 2007

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, v. 55, n. 6, p. 481-504. 2000.

HATHA, M.; VIVEKANANDHAN, A.A.; JULIE JOICE, G.; CHRISTOL. Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. *International Journal of Food Microbiology*, v. 98, p. 131– 134, 2004.

HEINRICH, M., BARNES, J., GIBBONS, S., WILLIAMSON, E. M. *Fundamental of Pharmacognosy and Phytotherapy*. Churchill Livingstone, Edinbrugh, p 245–252, 2004.

HOFFMANN, P., KATHRIARACHCHI, H., WURDACK, K.J. A phylogenetic classification of Phyllanthaceae (Malpighiales; Euphorbiaceae s.l.). *Kew Bulletin* 61: 37-53. 2006.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, n. 6, p. 1.841-1.856, 2005.

KAUR, K., JAIN, M., KAUR, T., JAIN, T., Review antimalarials from nature. *Bioprganic & medicinal chemistry*, no 9, 2009.

KIM, B. J.; KIM, J.H.; KIM, H.P.; HEO, M.Y. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (II): anti-oxidative activity and free radical scavenging activity. *International Journal of Cosmestic Science*, v. 19, nº 6, p. 299-307, 1997.

LEVY, M, BUSKILA, D, GLADMAN, D.D., UROWITZ, M. B., KOREN, G. Pregnancy outcome following first trimester exposure to chloroquine. *Am J Perinatol* 8(3): p. 74-78. 1991.

LIMA, E. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica, In: *Plantas medicinais sob a ótica da química moderna*. Argos, Chapecó, p. 479-499, 2001.

LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS A. C.; HENZEL, A.; WITT N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão, (*Syzygium cumini* (L.) Skells). *Ciência Rural*, v. 2, p. 371-376, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, J.F.A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

LORENZI, H.; MOREIRA, H. *Plantas ornamentais no Brasil*. 3a Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2001. 1120 p.

MAATTA-RIIHINEN, K.R., KAMAL-ELDIN, A., TORRONEN, A.R. Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family Rosaceae). *Jor. Agric. Food Chem.*, v. 52, n. 20, p. 6.178-6.187, 2004.

MACIEL, M. A. M., PINTO, C. A., VEIGA Jr. V. F., GRYNBERG, N. F., ECHEVARRIA, A. *Plantas Mediciniais a necessidade de estudos multidisciplinares*. *Química Nova*, v25, n3, p.429-438, 2002.

MacRAE, W. DONALD, J. B., TOWERS, G. H. N. Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae.; *J. of Ethnopharm.* 22, 143. 1988.

MAHASNEH, A. M.; EL-OQLAH, A. A. Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 64, p. 271–276, 1999.

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

MARCRINI, D. J., SUFFREDINI, I. B., VARELLA, A. D., YOUNES, R. N., OHARA, M. T. Extracts from Amazonian plants have inhibitory activity against tyrosinase: an in vitro evaluation. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 45, n. 2, abr./jun., 2009.

MALHEIROS, A.; PERES, M. T. L. P. Alelopatia: Interações químicas entre espécies. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Eds) *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Ed. Argos: Chapecó, p. 502-523, 2001.

McLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L.; ANDERSON, J. E. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*. v. 32, p. 513 – 524. 1998.

McLAUGHLIN, J. L., CHANG, C-J.; SMITH, D. L.; In *Human Medicinal Agents from Plants*, Kinghorn, A. D. & McLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C-J.; SMITH, D. L.; In *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 9, Ed. Atta-ur- Rahman, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, p. 383-409. 1991.

McLAUGHLIN, J. L., CHANG, C-J.; SMITH, D. L.; In *Human Medicinal Agents from Plants*, Kinghorn, A. D. & Balandrin, M. F., eds., *Symposium Series No. 534*, American Chemical Society, Washington, D.C., p. 112-137. 1993.

MARQUES, A. C. Migration and dissemination of malaria in Brazil. *Mem Inst. Oswaldo Cruz* 81(2): 17-30.1986.

MARQUES, A. C.; GUTIERREZ, H. C. Combate à malária no Brasil: evolução, situação atual e perspectivas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 27, p. 91-108, 1994

MATIUCCI, C. A. R. Atividades antioxidante “in vitro” em plantas com propriedades medicinais. Jundiaí: UFV, 1998. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimento), Universidade Federal de Viçosa, 1998.

MENSOR, L. L. Avaliação da atividade antioxidante de plantas brasileiras. Rio de Janeiro: UFRJ, 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1999.

MELO, L. F. Implantação e acompanhamento do manejo e recursos vegetais com potencial para comercialização junto aos ribeirinhos do municípios de Manaquiri-AM/. Tese de doutorado. INPA/UFAM. p 208. 2006.

MELO, M. S. O. Antioxidantes Naturais da castanha do Brasil (*Bertholetia excelsa*), da castanha do caju (*Anacardium occidentale*) e fruto do dendezeiro (*Elais guineensis*, Jacq.) São Paulo: USP, 1989. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos), Universidade de São Paulo, 1989.

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.

MICHEL, A.S.; THOMPSON, C.G.; ABRAMOVITZ, M. *Artemia salina* as a Test Organism for Bioassay. *Science*, v. 123. 1956.

MIGUEL, M. D. Desenvolvimento de fitoterápicos. São Paulo: Ed. Robe, p. 30. 1999.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*, v. 24, Nº 1, 105-111, 2001.

MOREIRA, A. V. B. Avaliação da atividade antioxidante de semente de mostarda (*Brassica Alba*, L) I.- Identificação dos principais compostos responsáveis pela inibição da oxidação. São Paulo: USP, 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos), Universidade de São Paulo, 1999.

MOREIRA, F. P. M., COUTINHO, V., MONTANHER, A. B. P., CARO, M. S. B., BRIGHENTE, I. M. C., PIZZOLATI, M. G. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – bioatividade sobre *Artemia salina*. *Química Nova*, v. 26, p. 309-311, 2003.

MOSADDIKA, M. A., BANBURYA, L., FORSTERB, P., BOOTHB, R., MARKHAMC, J., LEACHA, D., WATERMAN, P.G. Screening of some Australian Flacourtiaceae species for in vitro antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity. *Phytomedicine* v. 11 p. 461–466. 2004.

NOEDL, H. WERNSDORFER, W. H. MILLER, R. S. WONGSRICHANALAI, C. Histidine – Rich Protein II. A novel approach to malaria drug sensitivity testing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. v 46. n. 06. p. 1658-1664. 2002.

NOLDIN, V.F.; FILHO, V.C.; MONACHE, F.D.; BENASSI, J.C.; CHRISTMANN, I.L.; PEDROSA, R.C.; YUNES, R.A. Composição química e atividades

biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivadas no Brasil. *Química Nova*, v. 26, n. 3, p. 331-334, 2003.

OJALA, T. et al. A bioassay using *Artemia salina* for detecting phototoxicity of plant coumarins. *Planta medica*, v. 65, p. 715-8, 1999.

PAROLIN, P. Submergence tolerance vs. escape from submergence: two strategies of seedling establishment in Amazonian floodplains. *Environmental and Experimental Botany*. N° 48. p. 177–186. 2002.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J.C; TAKEMOTO, R. M. Doenças de peixes: Profilaxia, diagnóstico e tratamento. 3. ed. Nupélia, Maringá, 301 p. 1998.

PEGEL, K. H and PIACENZA, L P L. ent-3 β -Hydroxybeyer-1r- 15(16)-ene-2,12-dione from *Androsfachys johnsonii* Prain (Euphorbiaceae). *CHEMICAL COMMUNICATIONS*. p. 1346-1347. 1971.

PEIXOTO, R. N. S., SILVA, E. S., GUILHON, G. M. S. P., SANTOS, L. S., BRASIL, D. S. B., MARINHO, P. S. B., ZOGHBI, M. G. B. Outros constituintes químicos de *Croton pullei* (Euphorbiaceae). 32^a Sociedade Brasileira de Química. 2009.

PEREIRA, A. Q. Estudo da diversidade de *Croton cajucara* Benth.: análise da composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial. 2008, 73f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

PIACENZA, L. P. L.; PEGEL, K. H.; PHILLIPS, L.; WAIGHT, E. S. BEYERANE. Diterpenes : Structure and Reactivity of the α -Ketol ent-3 β - Hydroxybeyer-1 5-eneo2,12-dione, its Corresponding Diosphenol, and Synthesis of the Isomeric α -Ketol Acetates *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*. p. 1004-1012. 1979.

PIMENTA, L. P. S., PINTO, G. B., TAKAHASI, J. A., SILVA, L. G., BOAVENTURA, M. A. Biological screening of Annonaceous brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). *Phytomedicine*, v. 10, p. 209–212, 2003.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, v. 63, n. 7, p. 1.035-1.042, 2000.

Portal Nacional de Madeiras - REMADE. O Universo de madeiras em suas mãos

Disponível:

em:http://www.remade.com.br/br/madeira_especies.php?num=431&title=Madeiras%20brasileiras%20e%20ex%F3ticas&especie=Piranheira

POZO-INSFRAN, D. D.; BRENES, C. H.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and pigment stability of açai (Euterpe oleracea Mart.). J. Agric. Food Chem., v. 52, n. 6, p. 1.539-1.545, 2004.

RADU, S.; AHMAD, N.; LING, F. H.; REEZAL, A. Prevalence and resistance to antibiotics for Aeromonas species from retail fish in Malaysia. International Journal of Food Microbiology, v. 81, p. 261-266, 2003.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Bacteriostatic effect of flavonoids isolated from leaves of Psidium guajava on fish pathogens. Fitoterapia, v. 78, p. 434–436, 2007.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Rad. Biol. Med., New York, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RICHARDS, R. H.; ROBERTS, R. J. The bacteriology of teleosts. In: Roberts, R.J. Fish pathology. London : Baillien Tindall. p.183-204, 1978.

ROBERTS, R. J. Motile Aeromonad Septicaemia. In: Inglis, V.; ROBERTS, R. J.; BROMAGE, N. R. (Ed.). Bacterial disease of fish. Oxford: Blackwell Science, cap. 08: 143-155, 1993.

ROBBERS, J. E., SPEEDIE, M. K. e TYLER, V. E. Farmacognosia-Farmacobiotecnologia. p.123-148. São Paulo: Premier, 1997.

RODULFO, H.; DE DONATO, M.; MORA, R.; GONZÁLEZ, L.; CONTRERAS, C. E. Comparison of the diagnosis of malaria by microscopy, immunochromatography and PCR in endemic areas of Venezuela. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 40, n. 4, p. 535-543, 2007

RODRIGUES, R. F. O., OLIVEIRA, F., FONSECA, A. M. As folhas de Palma Christi – Ricinus communis L. Euphorbiaceae Jussieu. Revisão de conhecimentos. Revista Lecta, Bragança Paulista, v. 20, n. 2, p. 183-194, jul./dez. 2002.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. Food Chemistry, v. 92, p. 235–254, 2005.

SAHA, D.; PAL, J. In vitro antibiotic susceptibility of bacteria isolated from EUS-affected fishes in India. *Letters in Applied Microbiology*, v. 34, p. 311-316, 2002.

SANTOS, I.R. Metabolismo básico e origem dos metabolitos secundários. In: Simões, C.M.L.; Schenkel, E.P.; Gosmam, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (Eds) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Vol. 5. Editora UFSC, p. 403-434, 2004.

SANTOS, I.R. Metabolismo básico e origem dos metabolitos secundários. In: Simões, C.M.L.; Schenkel, E.P.; Gosmam, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (Eds) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Vol. 5. Editora UFSC, p. 403-434, 2004.

SCHONGART, J., Growth-Oriented Logging (GOL): A new concept towards sustainable forest management in Central Amazonian várzea floodplains. *Forest Ecology and Management* no 256, pp 46–58. 2008.

SCHONGART, J., JUNK, W. J. Forecasting the flood-pulse in Central Amazonia by ENSO-indices. *Journal of Hydrology*, NO335, 124– 132. 2007.

SEYE, O., SANTOS, E. C. S., SOUZA, R. C. R., SOUZA, C. D. R., JEFFREYS, M. F. Caracterização de biomassa florestal do estado do Amazonas para fins energéticos. 48^o Congresso Brasileiro de Química. 2008.

SIANI, C. Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos: plataforma metodológica. *Scriptorio: Rio de Janeiro*, 2003.

SILVA, V. C. Análise dos flavonóides de *Acacia longifolia* (Andr.) Willd. *LEGUMINOSAE-MIMOSOIDEAE*. 2001.

SIMÕES, C. M. L.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAM, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Vol. 5. Editora UFSC, p. 403-434, 2004.

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

SISTI, M.; DE SANTI, M.; FRATERNALE, D.; NINFALI, P.; SCOCCIANI, V.; BRANDI, G. Antifungal activity of *Rubus ulmifolius* Schott standardized in vitro culture. *LWT - Food Science and Technology*, v. 41, p. 946–950, 2008.

SMITH, A. R., RATTER, J. A. A New Piranha from Brazil, and the Subsumption of the Genus *Celaenodendron* (Euphorbiaceae: Oldfieldioideae) Kew Bulletin Vol. 51, No. 3, p. 543-548. 1996.

SOUZA, J. A.; SILVA-SOUZA, A. T. Bacterial community associated with fish and water from Congonhas river, Sertaneja, Paraná, Brazil. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 4, p. 373-381, 2001.

STADTLER, E. W. C. Estimativas de biomassas lenhosas, estoque e seqüestro de carbono acima do solo ao longo do gradiente de inundação de uma floresta de igapó alagada por água preta na Amazônia Central. Dissertação. INPA/UFAM. 2007.

STESKIND, O., KINTZINGER, J.P., METZ B., ALBRECHT, P. Structure determination of diascholestanes. Their geochemical significance. Tetrahedron. Vol. 51(7). p. 2009-2022. 1995.

TANAKA, J. C. A.; SILVA, C. C.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V.; CARVALHO, J. E.; FOGGIO, M. A. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). Química Nova, v. 28, n. 5, p. 834-837, 2005.

TORTORA, G. J. FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 8 ed. Porto Alegre: Editora Artmed. 2005.

UGAZ, O. L. Investigación fitoquímica. Pontificia Universidad Católica Del Peru. 2 ed. Fondo Editorial. p 300. 1994.

VANDRESEN, J. et al. Inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e adubação na formação e pós-transplante de mudas de cinco espécies arbóreas nativas do Sul do Brasil. Acta bot. Bras., v. 21 (4), p. 753-765, 2007.

VENTURA, M. T.; GRIZZLE, J.M. Lesion associated with natural and experimental infections of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). Journal of Fish Diseases, v. 11, p. 397-407, 1998.

VERPOORTE, R. & MARASCHIN, M. Engenharia do metabolismo de plantas medicinais. In: Yunes, R. A. & Calixto, J. B. (Eds.) Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó: Editora Argós. 523 p. 2001.

VIEGAS Jr., C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J.; Os produtos Naturais e a química medicinal moderna. Química Nova, Vol.29, No. 02, p. 326-337, 2006.

WANG, Y. B., HUANQ, R., WANQ, H. B., JIN, H. Z., LOU, L. G., QIN, G. W. Diterpenoids from the roots of *Euphorbia fischeriana*. *J. Nat. Prod.*, London, v. 69, p. 967-970, 2006.

WYDE, P. R., MEYERSON, L. R., GILBERT, B. E. In vitro evaluation of the antiviral activity of SP-303, an euphorbiaceae shrub extract, against a panel of respiratory viruses. *Drug Development Research*, Berlim, v. 28 n. 4 p. 467-472, 1993.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? *Boletim de Saúde*, v. 1, p. 4, 2004.

WITTMAN, F., JUNK, W. J., PIEDADE, M. T. F., The várzea forests in Amazonia: flooding and the highly dynamic geomorphology interact with natural forest succession. *Forest Ecology and Management* No 196 p. 199–212. 2004.

World Health Organization (WHO) 2001. In vitro micro-test (mark III) for the assessment of the response of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, mefloquine, quinine, amodiaquine, sulfadoxine/pyrimethamine and artemisinin. CTD/MAL/97.20Rev. 2. 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.

YOUNGSON, R. Como combater os Radicais Livres. Rio de Janeiro: Editora Campus Ltda,. p. X-XIII. 1996.

YOUNGSON, R. Como combater os Radicais Livres. Rio de Janeiro: Editora Campus Ltda, p. 10-13. 1996

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Quim. Nova*, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ZANGARO, W. et al. Micorriza arbuscular em espécies arbóreas nativas da bacia do Rio Tibagi, Paraná. *CERNE*, Lavras, v. 8, n. 1, p. 77-87, 2002.