

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTI-INSTITUCIONAL EM
BIOTECNOLOGIA

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DAS FOLHAS DE *Piranhea trifoliata* Baill
E DE SEUS FUNGOS ENDOFÍTICOS**

MANOEL FEITOSA JEFFREYS

MANAUS
2016

MANOEL FEITOSA JEFFREYS

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DAS FOLHAS DE *Piranhea trifoliata* Baill
E DE SEUS FUNGOS ENDOFÍTICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multi-Institucional em Biotecnologia da UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia com área de concentração em Saúde.

ORIENTADORA: Cecília Veronica Nunez, Doutora

MANAUS

2016

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

J46e Jeffreys, Manoel Feitosa
ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DAS FOLHAS DE Piranha
trifoliata Baill E DE SEUS FUNGOS ENDOFÍTICOS / Manoel
Feitosa Jeffreys. 2016
223 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Cecilia Veronica Nunez
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. Piranha trifoliata. 2. fungos endofíticos. 3. Diaporthe
hongkongensis. 4. fitoquímica. 5. atividade biológica. I. Nunez,
Cecilia Veronica II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

DEDICATÓRIA

À Deus,
À meus pais, M^a Francisca e Manoel pelo amor incondicional,
A toda minha família pelo apoio.

AGRADECIMENTOS

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

À Profa Dra. Ingard Merfort, por me aceitar em seu laboratório para fazer o doutorado sanduíche na Universidade de Freiburg, Alemanha.

À toda minha família, pela paciência e por entender todas as vezes que eu não podia sair com vocês.

À minha irmã, Meriane Jeffreys, por tudo, desde o café da madrugada até o x-salada da salvação (rs).

À minha namorada, Huriany Reis, pelo amor, carinho, compreensão e paciência, principalmente naqueles dias em que você queria passear e eu tinha que ir ao laboratório.

À minha grande amiga/irmã, Lorena Cursino. Lory, obrigado por tudo minha irmã, se não fossem os seus conselhos eu não teria entrado no doutorado, você me ajudou muito.

Aos meus amigos do laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia: Fábio, Isabel, Jéssica, Daiane, Maitê, Juliana do 1 e do 2, Taís, Laila, David, Kissinara, Vanessa, Julio, Karol, Luana, Perla, Sabrina, Weison, Fabiane, Fabiele, Jaciara, Yuri, Cris.

À minha aluna de iniciação científica Wyvirlane Lobo. Wivir muito obrigado por me ajudar na parte do fungos endofíticos.

Ao meu amigo e aluno de iniciação científica Gabriel Nunes, você me ajudou muito na parte dos fungos, até pra coleta você foi, valeu mesmo.

À minha amiga Vanuza Santos, por me ajudar em todos os momentos que precisei, por me ouvir e pelos conselhos.

À minha amiga Luana Monteiro, pelos conselhos, rizadas e descontração. Você sabe que junto com a Vana, Vanuza Santos, nós formamos a Lei zero da termodinâmica.

À minha amiga Paula, por ajudar no crescimento e pelos testes iniciais dos fungos endofíticos.

Aos amigos do laboratório da Universidade de Freiburg, Christoph, Christian, Regina, Bárbara, Betina, Tina, Philip, Ana e Hitesh.

Aos meus amigos: Emannuella, Girlane, Treza Paula, Clóvis, Elen, Lauro, Haroldo e Elineze, obrigado pelos momentos de descontração.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Ao INCT- CENBAM pela bolsa de doutorado sanduíche.

Aos técnicos da Central Analítica, em especial, ao Mágnio pelas análises de RMN e massas.

À todos que contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigado!

Sumário

1.	Introdução	1
2.	Bioprospecção de plantas do território brasileiro	3
2.1	Atividade Antioxidante	3
2.3	Atividade Antimalárica	7
2.4	Família Picrodendraceae	9
2.5	Gênero <i>Piranhea</i>	12
2.6	<i>Piranhea trifoliata</i>	14
2.7	Bioprospecção de fungos endofíticos: Um recurso plausível para o avanço biotecnológico	15
2.8	Família Valsaceae	18
2.9	Gênero <i>Diaporthe</i>	20
2.10	<i>Diaporthe hongkongensis</i>	28
3	Objetivos	29
3.1	Geral	29
3.2	Específicos	29
4	Metodologia	30
4.1	Equipamentos utilizados	30
4.2	Coleta	30
4.3	Preparação dos extratos vegetais das folhas de <i>P. trifoliata</i>	30
4.4	Partição líquido-líquido dos extratos metanólicos das folhas	31
4.5	Preparo dos extratos dos fungos endofíticos	31
4.6	Purificação e conservação dos fungos endofíticos de <i>P. trifoliata</i>	33
4.7	Identificação dos fungos endofíticos por análise molecular	34
4.7.1	Inoculação em meio de cultura	34
4.7.2	Manipulação do DNA	35
4.7.3	Análises das sequências	35
4.8	Preparo do cultivo celular para a obtenção dos fungos endofíticos em meio líquido.	35
4.9	Filtração e partição líquido-líquido do caldo metabólito obtida dos fungos endofíticos	36
4.10	Extração dos fungos endofíticos	37

4.11	Metodologias gerais iniciais com os extratos e as fases	38
4.12	Fracionamento do extrato diclorometânico das folhas coletadas em Altamira - PA (Coleta 1)	39
4.13	Fracionamento do extrato metanólico das folhas coletadas em Altamira - PA (Coleta 1)	27
4.14	Fracionamento do extrato do hexânico das folhas coletadas no lago do Catalão (Coleta 2)	31
4.15	Fracionamento do extrato metanólico das folhas coletadas no Lago do Catalão (Coleta 2)	34
4.16	Purificação do triterpeno: 28-Hidroxi-friedelan-3-ona (Canophyllol)	37
4.17	Fracionamento da fase DCM obtida do caldo metabólico de <i>D. hongkongensis</i> obtido de <i>P. trifoliata</i> (Coleta 3)	39
4.18	Fracionamento do extrato DCM do micélio de <i>D. hongkongensis</i> obtido de <i>P. trifoliata</i> (Coleta 3)	42
4.19	Fracionamento do extrato MeOH do micélio de <i>D. hongkongensis</i> obtido de <i>P. trifoliata</i> (Coleta 3)	45
4.20	Proposta de nomenclatura para as substâncias inéditas isoladas	48
4.21	Atividade antioxidante empregando as metodologias de DPPH• e Fe ³⁺ /Fenantrolina	48
4.21.1	DPPH•	48
4.21.2	Fe ³⁺ /Fenantrolina	48
4.22	Atividade antibacteriana	49
4.22.1	Metodologia do poço	49
4.22.2	Concentração Inibitória Mínima (CIM)	50
4.22.3	Concentração Mínima Bactericida (CMB)	51
4.23	Atividade antimalárica	51
4.23.1	Preparo das soluções dos extratos analisados	51
4.23.2	Cultura de Plasmodium falciparum e preparação do meio de cultura.	51
4.23.3	Avaliação da Atividade Antimalárica (in vitro).	52
4.23.4	Verificação da inibição de crescimento por citometria de fluxo.	53
5	Resultados e discussão	54
5.1	Rendimentos dos extratos das folhas de <i>P. trifoliata</i>	54
5.2	Análise fitoquímica dos extratos das folhas de <i>P. trifoliata</i>	55
5.3	Determinação estrutural das substâncias isoladas das folhas de <i>Piranhea trifoliata</i> .	58

5.3.1	Substância I: Friedelan-3-ona	60
5.3.2	Substância II: 30-hidroxi-friedelan-3-ona	64
5.3.3	Substância III: Lupeol	71
5.3.4	Substância IV e V: Mistura dos esteróides β -sitosterol e stigmasterol	75
5.3.5	Substância VI: Hidroxicoriatina	79
5.3.6	Substância VII e VIII: Mistura dos triterpenos: α e β - amirina	88
5.3.7	Substância IX: 7-hidroxi-6-metoxicumarina (Escopoletina)	92
5.3.8	Substância X: 7,4''' dimetilamentoflavona (podocarpusflavona B)	96
5.3.9	Substância XI: 3'-O-metil Ioniflavona	109
5.4	Estudo químicos e biológico dos fungos endofíticos: Rendimento dos extratos e do caldo metabólico dos fungos endofíticos	121
5.5	Análise fitoquímica por CCDC dos extratos e caldo metabólico obtidos dos fungos endofíticos de <i>P. trifoliata</i>	123
5.6	Análise das fase DCM e AcOEt obtida dos caldos metabólicos dos fungos endofíticos de <i>P. trifoliata</i> por RMN de ^1H	124
5.7	Análise dos extratos DCM e MeOH obtidos do micélio dos fungos endofíticos de <i>P. trifoliata</i> por RMN de ^1H	130
5.8	Identificação das substâncias isoladas	134
5.8.1	Proposta da substância XIII: (3-oxociclobutil) metil1-hidroxi-2 metilciclopenta-2,4-dieno carboxilato (Inédita)	134
5.9	Substância XIV: 9-amino-7- (2,5,7-triazabicyclo [2.2.1] hept -3-il) -2,3,6-trioxi-1-azabicyclo [3.2.2] nona-4,8-dieno-4-carbaldeído (inédita)	144
5.10	Ensaio Biológico	152
5.10.1	Atividade Antioxidante dos extratos das Folhas de <i>P. trifoliata</i> .	152
5.10.2	Atividade Antioxidante dos fungos endofíticos.	155
5.11	Atividade Antibacteriana das Folhas de <i>P. trifoliata</i> .	158
5.11.1	Atividade antibacteriana das substâncias isoladas das folhas de <i>P. trifoliata</i> .	160
5.11.2	Atividade Antibacteriana dos fungos endofíticos.	162
5.12	Atividade Antimalárica dos extratos das folhas obtidos de <i>P. trifoliata</i> .	168
5.12.1	Atividade Antimalárica dos Fungos endofíticos	169
6	Conclusões	170
7	Referências bibliográficas	172

Índice de Figuras

Figura 1: Mecanismos de reação entre o radical DPPH• e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio.	4
Figura 2: Substâncias com diferentes classes químicas e com potencial antioxidante.	5
Figura 3: Flavonoides com potencial antibacteriano.	6
Figura 4: Ciclo biológico da transmissão da malária em humanos. Fonte: (BIAMONTE et al., 2013).	8
Figura 5: Estrutura química do alcaloide quinina e do sesquiterpeno artemisinina considerados antimaláricos.	9
Figura 6: Ocorrência Mundial da Família Picrodendraceae	10
Figura 7: fotos da coleta de <i>Piranhea trifoliata</i> e confecção da exsicata para depósito no herbário	14
Figura 8: Triterpenos 28-hidroxi-friedelan-3-ona e friedelan-3-ona e um benzaldeído das folhas e galhos de <i>Piranhea trifoliata</i> .	15
Figura 9: Partição líquido-líquido dos extratos metanólicos das folhas com DCM (A), AcOEt (B) de <i>P. trifoliata</i> .	31
Figura 10: Coleta (a), desinfestação (b) e preparo dos fragmentos das folhas para a obtenção dos fungos endofíticos (c).	32
Figura 11: Crescimento dos fungos endofíticos (A), processo de obtenção e purificação de um único fungo (B) e conservação dos fungos (C).	33
Figura 12: Obtenção dos 9 fungos endofíticos obtidos de <i>Piranhea trifoliata</i> .	34
Figura 13: Cultivo dos fungos endofíticos em <i>Shakers</i> a 112 rpm à 25 °C (A), medição do pH e do nível de glicose (B e C).	36
Figura 14: Filtração do caldo metabólico dos fungos endofíticos (A) e (B) obtidos de <i>P. trifoliata</i> .	36
Figura 15: Partição líquido-líquido do caldo metabólico dos fungos endofíticos de <i>P. trifoliata</i> , para a obtenção da fase DCM (A) e da fase AcOEt (B).	37
Figura 16: Etapas da obtenção dos extratos do micélio em ordem crescente de polaridade em ultrassom (A) e preparo do material para a filtração simples (B).	37

Figura 17: Fluxograma do fracionamento do extrato DCM das folhas de <i>P. trifoliata</i> .	
Figura 18: Fluxograma do fracionamento da fase DCM do extrato metanólico e obtenção da substância IV, V, VI, VII e VIII.	30
Figura 19: Fluxograma do fracionamento do extrato hexânico e obtenção das substâncias I, IV, V e IX.	33
Figura 20: fluxograma do fracionamento do extrato MeOH das folhas de <i>P. trifoliata</i> .	
Figura 21: Estrutura química do triterpeno: 28-hidroxi-friedelin-3-ona	37
Figura 22: Vizualização de uma mancha roxa com características terpênicas quando reveladas com anisaldeiro sulfúrico.	37
Figura 23: Análise em CCDC da 28-hidroxi-friedelin-3-ona antes (A) e depois (B) de revelar com Anisaldeído sulfúrico.	38
Figura 24: Fluxograma do fracionamento da fase DCM obtida do caldo metabólico com a obtenção da substância XII.	41
Figura 25: Espectro de RMN de ^1H do caldo estéril e da fase AcOEt do caldo metabólico de <i>D. hongkongensis</i> .	42
Figura 26: Fluxograma do fracionamento do extrato DCM do micélio.	44
Figura 27: Fluxograma do fracionamento do extrato MeOH do micélio para a obtenção da substância XIII.	47
Figura 28: Extratos das folhas das coletas 1, 2 e 3, eluídas com DCM/AcOEt/MeOH 8:1:1 e reveladas com luz UV 365 nm antes da aplicação do revelador anisaldeído (A) e após a aplicação do revelador anisaldeído e UV- visível (B).	55
Figura 29: Fases DCM obtidas dos extratos MeOH das folhas das coletas 1, 2 e 3, eluídas com DCM/AcOEt/MeOH 8:1:1 e reveladas com luz UV 365 nm antes da aplicação do revelador anisaldeído (A), após a aplicação do revelador anisaldeído e UV 365 nm (B) e após a revelação (C).	56
Figura 30: Fases AcOEt obtidas dos extratos MeOH das folhas das coletas 1, 2 e 3, eluídas com DCM/AcOEt/MeOH 8:1:1 e reveladas com luz UV 365 nm antes da aplicação do revelador anisaldeído (A), após a aplicação do revelador anisaldeído e UV 365 nm (B) e após a revelação (C).	57
Figura 31: Substâncias isoladas das folhas de <i>P. trifoliata</i> .	59
Figura 32: Estrutura do triterpeno friedelan-3-ona (I).	60

Figura 33: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da Friedelan-3-ona	62
Figura 34: Espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) da Friedelan-3-ona	63
Figura 35: Estrutura do triterpeno 30-hidroxi-friedelan-3-ona (II).	64
Figura 36: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da 30-hidroxi-friedelan-3-ona.	66
Figura 37: Espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) da 30-hidroxi-friedelan-3-ona.	67
Figura 38: Mapa de contorno HSQC (300 MHz, CDCl_3) da 30-hidroxi-friedela 3-ona.	68
Figura 39: Expansão do mapa de contorno HSQC (300 MHz, CDCl_3) da 30-hidroxi-friedela 3-ona.	69
Figura 40: Mapa de contorno HMBC (300 MHz, CDCl_3) da 30-hidroxi-friedela 3-ona.	70
Figura 41: Estrutura do triterpeno Lupeol (III).	71
Figura 42: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do Lupeol	73
Figura 43: Espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) do Lupeol.	74
Figura 44: Estrutura das substâncias β -sitosterol e estigmasterol (IV e V)	75
Figura 45: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura de esteróides β -sitosterol e Estigmasterol.	77
Figura 46: Espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) da mistura de esteróides β -sitosterol e 3 Estigmasterol	78
Figura 47: Hidroxicoriatina (VI)	79
Figura 48: Espectro mostrando o íon m/z 335,1098 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ referente a hidroxycoriatina (substância VI).	81
Figura 49: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da hidroxycoriatina (substância VI).	82
Figura 50: Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da hidroxycoriatina (substância VI).	83
Figura 51: Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, CD_3OD) da hidroxycoriatina (substância VI).	84
Figura 52: Mapa de contorno HSQC da Hidroxycoriatina (substância VI).	85
Figura 53: Mapa de contorno HMBC da hidroxycoriatina (substância VI).	86
Figura 54: Mapa de contorno COSY da hidroxycoriatina (substância VI).	87
Figura 55: Estrutura das substâncias – α -amirina (VII) e β -amirina (VIII)	88

Figura 56: Espectro de RMN de ^1H (300 Hz, CDCl_3) da mistura de α -amirina e β -amirina.	90
Figura 57: Espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) da mistura de α e β -amirina.	91
Figura 58: 7- Estrutura da hidroxí-6-metoxicumarina (Escopoletina) (IX).	92
Figura 59: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da escopoletina (IX).	94
Figura 60: Espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) da escopoletina (IX).	95
Figura 61: 7,4''' dimetilamentoflavona (Podocarpusflavona B) (X).	96
Figura 62: Espectro mostrando o íon m/z 567,1209 $[\text{M} + \text{H}]^+$ referente a 7,4''' dimetilamentoflavona (substância X).	100
Figura 63: Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz) da 7,4''' dimetilamentoflavona (X).	101
Figura 64: Expansão do espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz) da 7,4''' dimetilamentoflavona (X).	102
Figura 65: Mapa de contorno HSQC da 7,4''' dimetilamentoflavona (X).	103
Figura 66: Mapa de contorno HSQC da 7,4''' dimetilamentoflavona (X).	104
Figura 67: Mapa de contorno HMBC da 7,4''' dimetilamentoflavona (X)	105
Figura 68: Mapa de contorno HMBC da 7,4''' dimetilamentoflavona (X).	106
Figura 69: Mapa de contorno HMBC da 7,4''' dimetilamentoflavona (X).	107
Figura 70: Mapa de contorno COSY da 7,4''' dimetilamentoflavona (X).	108
Figura 71: 3'-O-metil Ioniflavona (XI).	109
Figura 72: Espectro mostrando o íon m/z 553,1107 $[\text{M} + \text{H}]^+$ referente a 3'-O-metil Ioniflavona (substância XI).	112
Figura 73: Espectro de RMN de ^1H (Acetona- d_6 , 300MHz) da 3'-O-metil Ioniflavona (XI).	113
Figura 74: Expansão do espectro de RMN de ^1H (Acetona- d_6 , 300MHz) da 3'-O-metil Ioniflavona (XI).	114
Figura 75: Expansão do espectro de RMN de ^1H (Acetona- d_6 , 300 MHz) da 3'-O-metil Ioniflavona (XI).	115
Figura 76: Expansão do espectro de RMN de ^1H (Acetona- d_6 , 300 MHz) da 3'-O-metil Ioniflavona (XI).	116
Figura 77: Mapa de contorno HSQC da 3'-O-metil Ioniflavona (XI).	117
Figura 78: Expansão do mapa de contorno HSQC da 3'-O-metil Ioniflavona (XI).	118

Figura 79: Mapa de contorno HMBC da 3'-O-metil Ioniflavona (XI).	119
Figura 80: Expansão do mapa de bncontorno HMBC da 3'-O-metil Ioniflavona (XI).	120
Figura 81: Fases DCM dos caldos nutritivos dos fungos da coletas 3, eluídas com DCM/Acetona 1:1 e reveladas com luz UV 365 nm antes da aplicação do revelador anisaldeído (A), após a aplicação do revelador AlCl ₃ e UV 365 nm (B), com iodo resublimado (C) e com anisaldeído (D).	124
Figura 82: Espectros de RMN de ¹ H das Fases DCM obtida do caldo metabólito dos fungos endofíticos de 1 ao 9.	126
Figura 83: Espectros de RMN de ¹ H das Fases AcOEt obtida do caldo metabólito dos fungos endofíticos de 1 ao 9.	128
Figura 84: Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) da fração 2-3 isolada da fase AcOEt do fungo 5.	129
Figura 85: Espectros de RMN de ¹ H dos extratos DCM obtida do micélio dos fungos endofíticos de 1 ao 9.	131
Figura 86: Espectros de RMN de ¹ H dos extratos MeOH obtida do micélio dos fungos endofíticos de 1 ao 9 solubilizados em DMSOD.	133
Figura 87: (3-oxociclobutil) metil1-hidroxi-2 metilciclopenta-2,4-dieno carboxilato (XII)	134
Figura 88: Espectro de massa de carboxilato de (3-oxociclobutil)-1-metil-2-hidroxi metilciclopenta-2,4-dieno (XIII).	137
Figura 89: Espectro de ¹ H de carboxilato de (3-oxociclobutil) -1-metil-2-hidroxi metilciclopenta-2,4-dieno.	138
Figura 90: Espansão do espectro de ¹ H de carboxilato de (3-oxociclobutil) -1-metil-2-hidroxi metilciclopenta-2,4-dieno.	139
Figura 91: Mapa de contorno HSQC de carboxilato de (3-oxociclobutil) -1-metil-2-hidroxi metilciclopenta-2,4-dieno.	140
Figura 92: Expansão do mapa de contorno HSQC de carboxilato de (3-oxociclobutil) -1-metil-2-hidroxi metilciclopenta-2,4-dieno.	141
Figura 93: Mapa de contorno HMBC de carboxilato de (3-oxociclobutil) -1-metil-2-hidroxi metilciclopenta-2,4-dieno.	142
Figura 94: Mapa de contorno COSY de carboxilato de (3-oxociclobutil) -1-metil-2-hidroxi metilciclopenta-2,4-dieno.	143

Figura 95: Espectro de massa de (3-oxociclobutil) metil1-iydroxi-2 metilciclopenta-2,4-dieno carboxilato (XII).	146
Figura 96: Espectro de RMN de ^1H da substância 9-amino-7- (2,5,7-triazabíciclo [2.2.1] hept -3-il) -2,3,6-trioxi-1-azabíciclo [3.2.2] nona-4,8-dieno-4- carbaldeído	147
Figura 97: Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância 9-amino-7- (2,5,7-triazabíciclo [2.2.1] hept -3-il) -2,3,6-trioxi-1-azabíciclo [3.2.2] nona-4,8-dieno-4-carbaldeído	148
Figura 98: Mapa de contorno HSQC da substância 9-amino-7- (2,5,7- triazabíciclo [2.2.1] hept -3-il) -2,3,6-trioxi-1-azabíciclo [3.2.2] nona-4,8- dieno-4-carbaldeído.	149
Figura 99: Mapa de contorno HMBC da substância 9-amino-7- (2,5,7- triazabíciclo [2.2.1] hept -3-il) -2,3,6-trioxi-1-azabíciclo [3.2.2] nona-4,8- dieno-4-carbaldeído.	150
Figura 100: Mapa de contorno COSY da substância 9-amino-7- (2,5,7- triazabíciclo [2.2.1] hept -3-il) -2,3,6-trioxi-1-azabíciclo [3.2.2] nona-4,8- dieno-4-carbaldeído.	151

Índice de Tabela

Tabela 1: Substâncias isoladas de espécies da família Picrodendraceae	10
Tabela 2: Substâncias isoladas do gênero Piranhea	12
Tabela 3: Algumas substâncias isoladas de fungos endofíticos com potencial biológico.	17
Tabela 4. Algumas substâncias isoladas da família Valsaceae	18
Tabela 5. Metabólitos isolados do gênero Diaporthe	22
Tabela 6. Condições e sistema usado para o fracionamento de (6-13).(8-13) para o isolamento da substância I	40
Tabela 7. Sistemas utilizados no fracionamento de (6-13).(8-13) para o isolamentos da substância II	40
Tabela 8. Condições e sistema usado para o fracionamento de (23-29).(5-7).(7).(2)	41
Tabela 9. Sistemas utilizados no fracionamento de 8-10 para o isolamentos da substância IV, V presentes na fração 2 e da substância VI presente na fração (28)	28
Tabela 10. Sistemas utilizados no fracionamento da fração 12 para o isolamentos da substância VII e VIII	29
Tabela 11: Sistemas utilizados no fracionamento de (21-25) para o isolamentos da substância IX	32
Tabela 12: Sistema utilizado no fracionamento da fração 16 para o isolamento da substância X.	34
Tabela 13. Condições e sistema usado para o fracionamento de 12 para a obtenção da substância XI	35
Tabela 14. Sistemas utilizados no fracionamento de (6-7) para o isolamentos da substância XIII, presente na fração 2-3	40
Tabela 15. Sistema utilizado no principal fracionamento do extrato DCM de <i>D. hongkongensis</i> .	43
Tabela 16. Sistema utilizado para o isolamento da substância XIII	46
Tabela 17: Cepas bacterianas utilizadas no ensaio antibacteriano	50
Tabela 18. Massas dos extratos das folhas obtidas de Piranhea trifoliata	54

Tabela 19: Dados de RMN de ^{13}C da Friedelan-3-ona [300 MHz, CDCl_3 , Δ (ppm)]	61
Tabela 20: Dados de RMN de ^{13}C da 30-hidroxi-friedelan-3-ona [300 MHz, CDCl_3 , Δ (ppm)]	65
Tabela 21: Dados de RMN de ^{13}C [300 MHz, CDCl_3 , Δ (ppm)] do lupeol	72
Tabela 22: Dados de RMN de ^{13}C da mistura de esteroides [300 MHz, CDCl_3 , Δ (ppm)]	76
Tabela 23. Dados de RMN de HSQC, HMBC e COSY [500 MHz, CD_3OD , Δ (ppm)] da hidroxycoriatina	80
Tabela 24. Dados de RMN de ^{13}C de VII e VIII α e β - amirina [300 MHz, CDCl_3 , Δ (ppm)]	89
Tabela 25: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (300 MHz) e de ^{13}C da substância IX, escopoletina (multiplicidade, J em Hz).	93
Tabela 26: Dados de RMN ^1H e ^1H - ^1H -COSY ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz) ^{13}C (300 MHz) e 2D da substância 7,4''' dimetilamentoflavona (X)	98
Tabela 27: Dados de RMN ^1H e ^1H x ^1H -COSY (Acetona- d_6 , 300MHz) e 2D da substância 3'-O-metil Ioniflavona (XI)	111
Tabela 28. Rendimento dos extratos DCM e MeOH dos fungos endofíticos obtidos da terceira coleta de <i>P. trifoliata</i>	121
Tabela 29. Massas obtidas das partições líquido-líquido com o caldo metabólito	122
Tabela 30: Dados de HSQC, HMBC e COSY da substância carboxilato de (3-oxociclobutil) -1-metil-2-hidroxi metilciclopenta-2,4-dieno.	136
Tabela 31: Dados de HSQC, HMBC e COSY da substância 9-amino-7-(2,5,7-triazabicyclo [2.2.1] hept -3-il) -2,3,6-trioxi-1-azabicyclo [3.2.2] nona-4,8-dieno-4-carbaldeído.	145
Tabela 32: Resultado da atividade antioxidante dos extrato de <i>P. trifoliata</i> da segunda coleta	152
Tabela 33. Atividade antioxidante das fases DCM, MeOH e H_2O obtidos dos extratos metanólicos das folhas das coletas 1 e 2	154
Tabela 34: Resultados da atividade antioxidante presente nas fases DCM e AcOEt dos caldos metabólitos dos fungos de <i>P. trifoliata</i>	155
Tabela 35: Resultados da atividade antioxidante presente nos extratos DCM e MeOH dos caldos metabólitos dos fungos de <i>P. trifoliata</i>	157

Tabela 36: Atividade antibacteriana das fases do extrato MeOH das folhas	159
Tabela 37: Percentual de inibição dos triterpenos isolados de <i>P. trifoliata</i>	161
Tabela 38: Percentual de inibição das substâncias fenólicas isoladas de <i>P. trifoliata</i>	162
Tabela 39: Resultado das atividade antibacteriana das fases DCM e AcOEt dos caldos metabólicos dos nove fungos endofíticos obtidos de <i>P. trifoliata</i>	165
Tabela 40: Resultado das atividade antibacteriana dos extratos DCM e MeOH dos nove fungos endofíticos obtidos de <i>P. trifoliata</i>	167
Tabela 41: Atividade antimalárica dos extratos das coletas 1, 2 e 3.	168
Tabela 42: Determinação da CI_{50} da atividade antimalárica dos extratos MeOH dos micélios dos fungos endofíticos obtidos de <i>P. trifoliata</i>	169

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
CDCl₃ – Clorofromio deuterado
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
COSY – *Correlated Spctroscopy*
d - dubleto
dd – duplo dubleto
DCM – Diclorometano
DMSO – Dimetilsulfóxido
DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EM – Espectrometria de massas
ESI – *Electrospray ionization*
HMBC – Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HSQC – Heteronuclear Single-Quantum Correlation
J – Constante de acoplamento
m - Multipeto
MeOH – Metanol
m/z – Relação massa/carga
R_f – Fator de retenção
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
s – singleto
UV – Ultra-violeta
δ – deslocamento químico

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo realizar o estudo químico e biológico das folhas de *Piranhea trifoliata* e de seus fungos endofíticos (Picodendraceae) e realizar a avaliação do seu potencial frente aos ensaios antimicrobiano, antioxidante e antimalárico. As folhas foram coletadas na Volta Grande do Xingú, Altamira, PA (coleta 1) e no lago do Catalão, Manaus, AM (coletas 2 e 3). A coleta 1 foi extraída com diclorometano, metanol e Água, e as coletas 2 e 3 foram extraídas com hexano, metanol e água. Parte do material das coletas 2 e 3 foi também processada para a obtenção dos fungos endofíticos e estes foram extraídos com diclorometano e acetato de etila. A análise fitoquímica preliminar das folhas e dos fungos mostrou que os extratos diclorometânicos e hexânicos possuem terpenos e os extratos metanólicos apresentam substâncias fenólicas. Os caldos metabólitos dos fungos mostraram que a fase diclorometânica (DCM) possui terpenos, e a fase de acetato de etila (AcOEt) possui indícios de terpenos e substâncias fenólicas. O estudo fitoquímico das folhas levou ao isolamento da Friedela-3-ona, 30-hidroxi-friedelan-3-ona, Lupeol, a mistura dos esteróides β -sitosterol e Estigmasterol, hidroxycoriatina, a mistura de α e β -amirina, 7-hidroxi-6-metoxi-cumarina, 7,4''' dimetilamentoflavona, 3'-O- metilloniflavna e a 28-hidroxi-friedelan-3-ona. Já o estudo fitoquímico do fungo *Diaporthe hongkongensis*, levou ao isolamento de (3-oxociclobutil) metil1-hidroxi-2 metilciclopenta-2,4-dieno carboxilato e 9-amino-7-(2,5,7-triazabicyclo[2.2.1]hept-3-il)-2,3,6-trioxi-1-azabicyclo [3.2.2] nona-4,8-dieno-4-carbaldeído ambas inéditas. Todas as substâncias foram identificadas por RMN de ^1H e de ^{13}C , mono e bidimensionais e espectrômetro de massas. Quanto à atividade antioxidante, o extrato MeOH das folhas da coleta 2, apresentou equivalência de 1,15 e 1,13, a fase H_2O apresentou 2,8 e 4,51 (DPPH• e Fe^{3+}) sendo considerados significativos. A atividade antibacteriana mostrou que a fase DCM das folhas das coletas 2 e 3 e a fase AcOEt da coleta 1, apresentaram CIM e CMB de 500 $\mu\text{g/mL}$ frente às bactérias *Aeromonas hydrophila* e *Flavobacterium columnare*. A fase aquosa da coleta 1, apresentou CIM e CMB de 1000 $\mu\text{g/mL}$ frente às bactérias *Flavobacterium columnare* e *Pseudomonas fluorescens*. Os extratos miceliais dos fungos 4 e 6, testados pela metodologia do halo de inibição, apresentaram média atividade, 1 cm frente às bactérias *Aeromonas hydrophila* e *Klebsiella pneumoniae*. As fases DCM e AcOEt do caldo metabólito do fungo 4 mostraram-se ativas com 1 e 1,2 cm de halo. A atividade antimalárica mostrou que os extratos hexânicos e MeOH das folhas da coleta 3 apresentaram IC_{50} de 1,51 e 1,77 $\mu\text{g/mL}$ quando comparado com o padrão. O extrato MeOH do fungo 4 apresentou 6,89 de parasitemias sendo significativo. Ao testar as substâncias isoladas frente as bactérias, observou-se a CIM de 73,58% em **X** e 71,75% em **XI** frente a bactéria *K. pneumoniae*.

Palavras chave: *Piranhea trifoliata*, fungos endofíticos, *Diaporthe hongkongensis*, fitoquímica, atividade biológica.

Abstract

This work aimed to study the chemical extracts of *Piranhea trifoliata* and your endophytes (PICRODENDRACEAE) and its potential antimicrobial tests, antioxidant and antimalarial. The leaves it was collected in Volta Grande of Xingú, Altamira, PA (collect 1) and Lake of Catalão, Manaus, AM (collect 2 e 3). The dried specimen's it was deposited in the herbarium of the Federal Institute of Amazonas (IFAM) with record numbers 10653 and 10654. The collected material was dried and pulverized. The collect 1, was extracted by dichloromethane (DCM), methanol (MeOH) and water (H₂O). The collect 2 and 3 was extracted by hexane, methanol and water. The preliminary phytochemical analysis of leaves and fungi showed that dichlorometane and hexane extracts contain terpenes and methanolic extracts contain phenolic compounds. The broths from fungi showed that diclorometânica phase (DCM) contain terpenes, and phase of Ethyl Acetate (AcOEt) contain terpene and phenolic compounds. The phytochemical study of the leaves led to the isolation of: Friedelan-3-one (I), 30-hydroxy-friedelan-3-one (II), Lupeol (III), the mixture of β -Sitosterol and Stigmasterol steroids (IV and V), hydroxycoriatin (VI), the mixture of α and β -amyrin (VII and VIII), 7-hydroxy-6-methoxy-coumarin (IX), 7,4-dimethylamentoflavone (X), methylonyflavone 3'-O-(XI) and purification of the 28-hydroxy-friedelan-3-one (XIV). The phytochemical study of the *Diaporthe hongkongensis*, fungi, led to the isolation of (3-oxociclobutil) 2-methyl-1-hydroxi metilciclopenta-2,4-diene carboxylate (XII) and 9-amino-7-(2,5,7-triazabicyclo [2.2.1] hept-3-yl)-2,3,6-trioxi-1-azabicyclo [3.2.2] nona-4,8-diene-4-carbaldehyde (XIII) both isolated of the first time. All compound were identified by ¹H, ¹³C NMR, 2D and mass spectra data. The antioxidant activity, showed the MeOH extract of leaves from collection 2, was equivalent with 1,15 and 1,13, the H₂O phase showed 2,8 and 4,51 (DPPH• and Fe³⁺) were considered significant. The antibacterial activity the DCM phase of leaves of collectes 2 and 3 and the EtOAc phase of collection 1, showed CIM and CMB found was 500/mL against *Aeromonas hydrophila* and *Flavobacterium columnare*. The aqueous phase of collection 1 showed CIM and CMB found was 1000 µg/ml against *Flavobacterium columnare* and *Pseudomonas fluorescens*. The mycelial extracts of fungi 4 and 6, tested with methodology to inhibition halo, showed medium activity, 1 cm, against *Aeromonas hydrophila* and *Klebsiella pneumoniae*. The DCM and EtOAc phases of metabolite broth of the fungu 4, showed activity with halo of 1 and 1,2 cm. The antimalarial activity. The antimalarial activity showed that hexane and MeOH extracts of leaves of the collection 3, showed IC₅₀ of 1,51 and 1,77 mg/mL when compared to the standard. The MeOH extract of fungi 4, showed 6,89 of parasitaemia being significant. The activity by isolated compound sowed CIM of 73,58% to the compound X and 71,75% to the compound XI against *Klebsiella pneumoniae*.

Keywords: *Piranhea trifoliata*, endophytic fungi, *Diaporthe hongkongensis*, phytochemical, biological activity.

1. Introdução

O Brasil é considerado um dos países possuidores da maior biodiversidade mundo, com cerca de 20% do total mundial somente de Angiospermae, representando uma parte significativa da diversidade global do país. Por isso é de grande importância que o Brasil possua uma grande responsabilidade no campo da exploração, utilização e da preservação tanto das plantas como dos microrganismos presentes.

Nesse contexto, ganham destaque a química de produtos naturais e a biotecnologia vegetal, a qual interage diretamente com a biodiversidade, pois além da identificação e/ou elucidação das substâncias presentes nas espécies em estudo, nos leva ao entendimento e compreensão de outras áreas de conhecimento como a ecologia química, botânica, microbiologia, etnofarmacologia, entre outras, tornando-se assim, de grande importância o estudo e a obtenção de metabólitos secundários presentes em plantas e seus respectivos fungos endofíticos.

Além dessas interações em destaque, um parâmetro interessante a ser considerado é a relação dos estudos que contribuem para a indústria farmacêutica, minimizando ou solucionando os problemas relacionado a saúde humana, pois diversas são as doenças que podem acometer aos seres humanos.

Dentre elas, destaca-se a malária, a qual é considerada endêmica em 107 países, colocando em risco aproximadamente 3,2 bilhões de pessoas. No Brasil, mais especificamente no Amazonas, a maior parte dos casos de malária é causada pelo *Plasmodium vivax*, entretanto, é preocupante o percentual de casos por *Plasmodium falciparum*, pois também é considerada uma doença grave levando a óbitos (BIAMONTE *et al.*, 2013).

Outras doenças que estão se tornando um caso preocupante, são as infecções causadas por bactérias, pois algumas delas vêm ganhando resistências aos antibióticos testados ou não existem nenhum tipo de tratamento adequado. Dentre as bactérias com foco nesta tese, tem-se a *Aeromonas hydrophila*, que é uma bactéria patogênica facultativa que acomete ao homem e aos peixes de água doce, a qual apresenta poucos estudos

relacionados à sua interação com metabólitos secundários, tornando-se assim, de grande importância para o estudo fitoquímico de plantas e/ou fungos endofíticos na busca por novos agentes terapêuticos para combatê-las (CASTILHO *et al.*, 2012; SULTANBAWA, 2011; WEERAKKODY *et al.*, 2010).

Em virtude a esses problemas de saúde humana, o foco deste trabalho foi o estudo fitoquímico e biológico de *Piranhea trifoliata* e de seus fungos endofíticos, realizando o fracionamento dos extratos, fases e avaliando as atividades antioxidante, antibacteriana e antimalária.

2. Bioprospecção de plantas do território brasileiro

O território brasileiro é um grande possuidor de biodiversidade, o qual pode gerar produtos com uma considerável importância financeira (CALIXTO *et al*, 2016; LEITÃO *et al*, 2014; SIMÕES, 2004).

De tão complexa, a biodiversidade brasileira ainda não é conhecida com exatidão. Estima-se que existam mais de dois milhões de diferentes espécies de plantas, animais e micro-organismos. Com isso, o Brasil se torna um dos países com a maior diversidade genética vegetal do mundo.

Em se tratando de plantas com potencial terapêutico é importante citar que a utilização indiscriminada de plantas medicinais é arriscada, uma vez que, cada parte vegetal de uma planta possui inúmeros constituintes que podem agir de diferentes formas em nosso organismo, seja de modo benéfico ou maléfico. Assim é necessária uma sincronia entre a etnomedicina, farmacologia e a química de produtos naturais, para que haja uma caracterização completa dos princípios ativos em uma planta (ALMEIDA, 2011). Portanto faz-se necessária a realização de estudos multidisciplinares para que se obtenham conhecimentos sobre as atividades biológicas presentes em uma espécie vegetal. A fim de se obter o registro e sua validação junto à agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), pois, a Organização Mundial de Saúde tem reconhecido o uso de plantas medicinais como alternativa terapêutica.

2.1 Atividade Antioxidante

Os antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação ou a inibem, através de um ou mais mecanismos (MUSA *et al.*, 2013, ZHONG e SHAHIDI, 2012, CASTELO-BRANCO *et al.*, 2011;). Dentre os métodos que avaliam o potencial antioxidante de substâncias de interesse, existe o método DPPH•, o qual foi desenvolvido por Blois (1958) para determinar a atividade antioxidante de várias substâncias utilizando um radical livre estável 2,2-diphenil-1-picrilhidrazila.

Após a publicação deste método, novas padronizações e/ou adaptações foram criadas para determinar o potencial antioxidante de substâncias fenólicas e de amostras biológicas como os descritos por Cieśła *et al.* (2012), Deng *et al.* (2011), Noipa *et al.* (2011), Locatelli *et al.* (2009), entre outros.

Este método é considerado fácil, altamente sensível, preciso, rápido, simples e econômico, pois o sistema de reação envolve somente o radical e o antioxidante (Figura 1), além da mudança de coloração que passa da cor violeta para o amarelo, originando a forma reduzida e estável do DPPH-H (CIEŚLA *et al.*, 2012; KEDARE e SINGH, 2011; AMATATONGCHAI *et al.*, 2012; MUSA *et al.*, 2013).

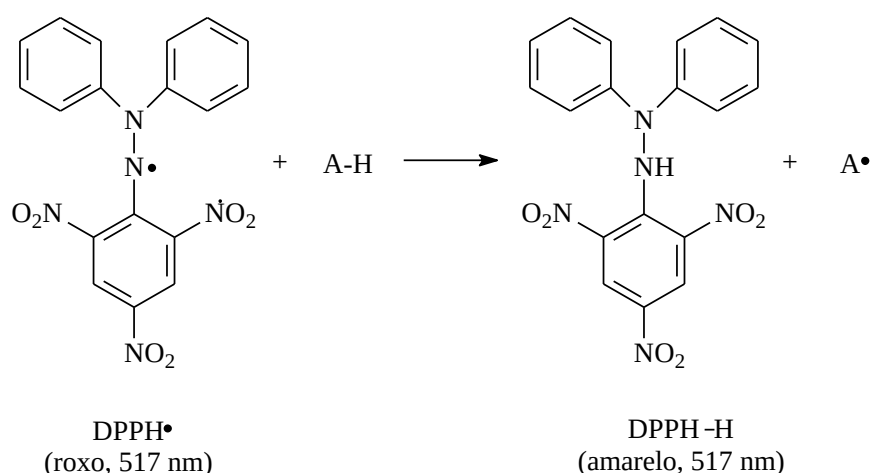


Figura 1: Mecanismos de reação entre o radical DPPH• e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio.

Nos últimos cinco anos, diferentes substâncias com potencial antioxidante foram comprovadas cientificamente como sendo beneficiadoras para a saúde, pois elas possuem grande capacidade de proteger um organismo de diferentes doenças originadas pelos radicais livres, protegendo ou retardando o início desses danos, como o câncer, artrite reumática, Mal de Alzheimer, doenças cardiovasculares, entre outras (ALAM, *et al*, 2013, TINKEL; *et al*, 2012; BORUT e RAJA, 2012).

Essas substâncias podem ser classificadas como taninos, flavonoides, carotenoides, antocianidinas, cumarinas, terpenos além de cadeia carbônica com ligações duplas conjugadas (SANIL, *et al* 2015, SEM, *et al* 2013, ZHONG

e SHAHIDI, 2012, HARBORNE e WILLIAMS, 2000). A Figura 2, ilustra algumas das quais possuem este potencial.

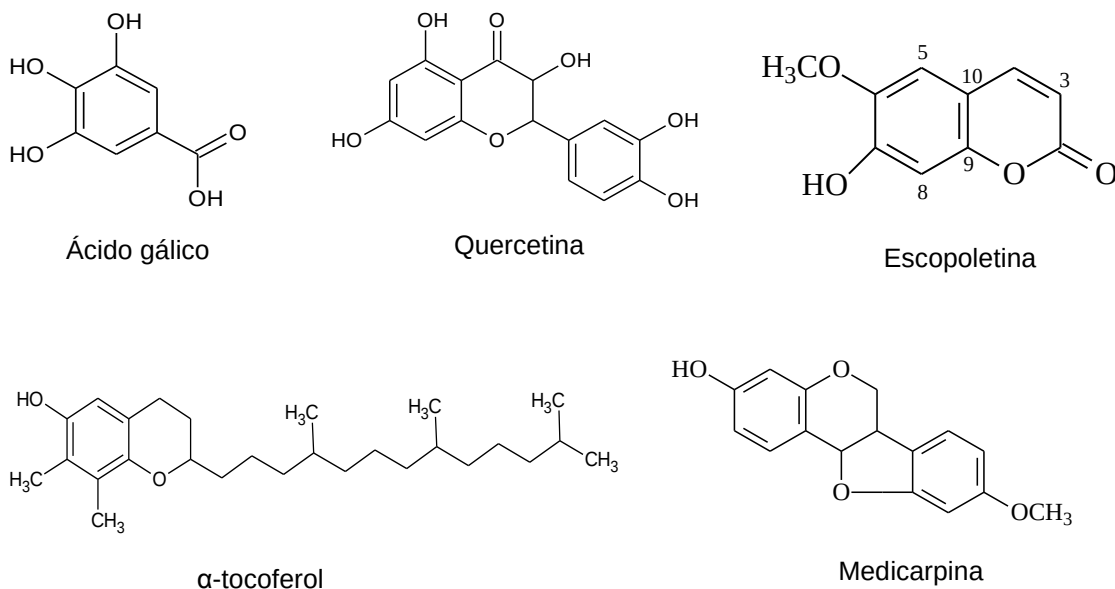


Figura 2: Substâncias com diferentes classes químicas e com potencial antioxidante.

Assim, o teor de substâncias com atividades antioxidantes podem variar dentro da própria planta, podendo ser classificada como, por exemplo, substâncias fenólicas, terpenos, entre outros (SANI *et al*, 2015, THARASENA e LAWAN, 2014).

2.2 Atividade Antibacteriana

As doenças de origem bacteriana vêm crescendo tornando-se um caso preocupante, principalmente porque algumas delas não possuem nenhum tipo de tratamento adequado, causando preocupação não só para a população, mas também para a comunidade científica, tornando-se necessária a busca por novos agentes terapêuticos para combatê-las (CASTILHO *et al.*, 2012; SULTANBAWA, 2011; WEERAKKODY *et al.*, 2010; NASCIMENTO *et al.*, 2000).

Em geral, as substâncias antimicrobianas naturais ou sintéticas podem ser classificadas como bactericidas, quando matam completamente o micro-organismo, 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 micro-organismo (SILVA *et al.*, 2013; HASSAN, 2012; CASTILHO *et al.*, 2012).

Dentre as substâncias com potencial bacteriano, tem-se em destaque os flavonoides Quercetina e Morina que apresentaram efeito bacteriostático frente as cepas de *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida*, *Flavobacterium columnare* e *Streptococcus agalactiae* (RATTANACHAIKUNSOPON e PHUMKHACHORN, 2007) (Figura 3).

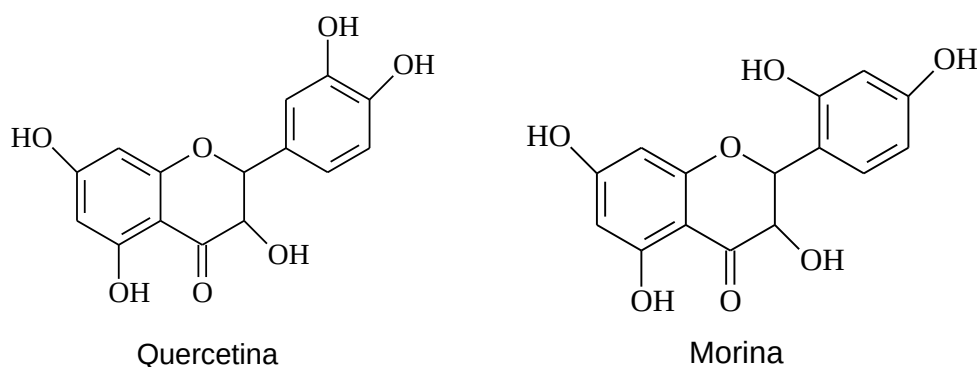


Figura 3: Flavonoides com potencial antibacteriano.

Dentre as diversas bactérias existentes, destaca-se a *A. hydrophila* que é o patógeno. Essa bactéria é tipicamente oportunista, patogênica facultativa, que quando há desequilíbrio dos sistemas bactéria-hospedeiro-ambiente, podem desencadear o aparecimento de doenças como a gastroenterites, infecções cutâneas e septicemias quando presentes no homem e ulcerações cutâneas, que envolvem a septicemias quando presente em peixes (GIRI *et al.*, 2105; ANACARSO *et al.*, 2104; HEO *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2007).

Outras bactérias que merecem destaque são as típicas causadoras de doenças em peixes como a *Flavobacterium columnare* que é um bastonete gram-negativo, causador da columnariose, doença que afeta a maioria das espécies de peixes de água doce, causando lesão da pele e nadadeira que evoluem para a necrose dos tecidos adjacentes (LANGE *et al.*, 2016; DONG *et*

al, 2015; STRAUS *et al*, 2015; XU *et al*, 2015; ZHOU *et al*, 2015; DECLERCQ *et al*, 2013) e a *Pseudomonas fluorescens*, que pode ser encontrada no solo e na água, quando detectadas em peixes, ela apresenta erosão nas nadadeiras, lesões circulares ou irregulares do tipo úlceras pelo corpo, hemorragia nas bordas das lesões e na base das nadadeiras, olhos saltados de aspecto opaco e hemorrágico entre outros (DARAK and BARDE, 2015; ZHOU, *et al*, 2015; ZHOU *et al*, 2016; PARK *et al*, 2015).

Com isso, o uso racional de antibióticos e o desenvolvimento de novos medicamentos é uma ótima medida que pode ser tomada para evitar ou diminuir a resistência bacteriana. Os vegetais têm sido vistos como uma fonte promissora de novas substâncias antibacterianas, e as pesquisas nessa área vêm ganhando importância mundial (BIVA *et al*, 2016; FELICIO *et al*, 2015; ARBI *et al*, 2014; RADIC e STRUKELJ, 2012).

2.3 Atividade Antimalárica

A malária é uma doença parasitária causada pela presença do protozoário *Plasmodium*, que se reproduz nos eritrócitos (células vermelhas sanguíneas), cuja sua transmissão é dada pelo mosquito fêmea do gênero *Anopheles*. Dentre as espécies de protozoários causadores da malária podemos destacar o *Plasmodium* (*P.*) *ovale*, *P. malariae*, *P. vivax* e o *P. falciparum* (OLIVEIRA *et al*, 2015; LEITE *et al.*, 2013).

No Brasil, a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) divulgou no boletim de 2015 que a malária ainda representa um grande problema de saúde pública, entretanto no Amazonas ela teve uma redução no ano de 2013 sendo considerada de baixo risco, mesmo assim a sua transmissão é variável nos diferentes municípios e localidades, sendo influenciada pela interação de fatores ambientais, socioculturais, econômicos e políticos.

O ciclo biológico do parasita da malária engloba dois estágios, a fase sexuada, que ocorre no interior do mosquito *Anopheles* e outra assexuada que ocorre no hospedeiro, conforme mostrado na Figura 4.

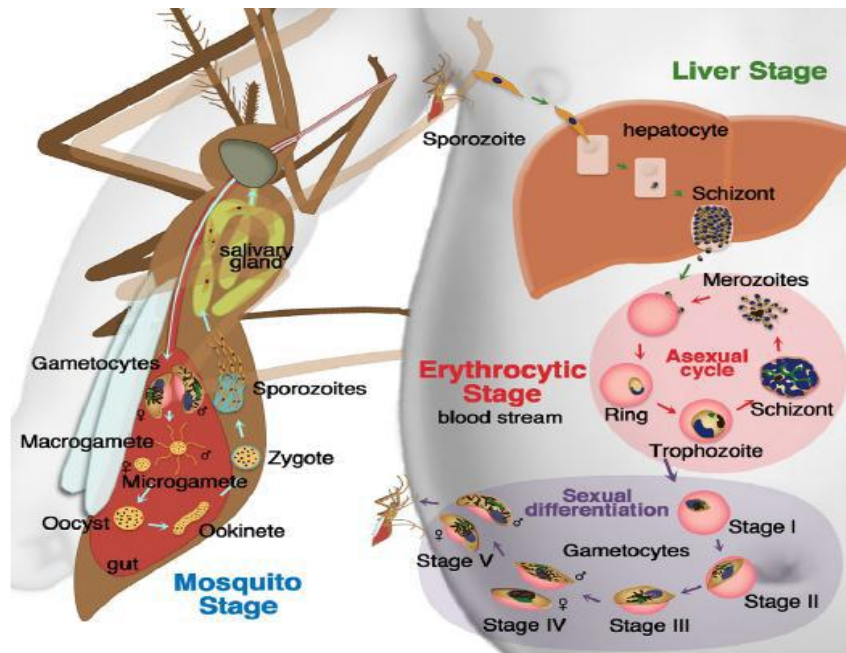


Figura 4: Ciclo biológico da transmissão da malária em humanos. Fonte: (BIAMONTE et al., 2013).

O primeiro estágio de infecção do parasita se inicia com a picada liberando diversos esporozoítos para a corrente sanguínea do indivíduo, por meio de suas glândulas salivares. Em seguida, as células do fígado (hepatócitos) são atingidas e a quantidade de esporozoítos no sangue se torna inexistente. Os parasitas se desintegram por meio de multiplicação assexuada liberando milhares de merozoítos, e através destes ocorre a eclosão e ruptura nas células do fígado. Cada unidade de merozoíto, após passar pelo eritrócito (célula vermelha do sangue), se multiplica em 12 a 16 merozoítos por esquizonte (glóbulo vermelho infectado), ocasionando as febres intermitentes (BIAMONTE *et al.*, 2013). Após o processo de multiplicação assexuada ocorre a formação dos gametócitos feminino e masculino, onde podem ser capturados pelo mosquito quando sugarem o sangue de um hospedeiro infectado completando o assim o ciclo biológico.

Para o tratamento, são utilizadas substâncias químicas com potenciais antimaláricos que podem ser classificados de acordo com as características químicas, farmacológicas, locais de ação no ciclo biológico do parasito, entre outras. Algumas classes de substâncias químicas têm sido utilizadas no tratamento da malária como, por exemplo, os alcaloides que são substâncias encontradas em alguns grupos vegetais. Sua característica é possuir um átomo

de nitrogênio no anel, além de sesquiterpenos que possuem 15 átomos de carbono em sua estrutura (Figura 5).

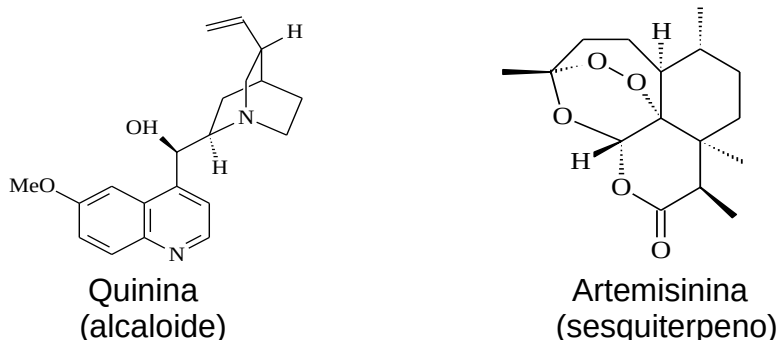


Figura 5: Estrutura química do alcaloide quinina e do sesquiterpeno artemisinina considerados antimaláricos.

Outros estudos mostraram que outras substâncias também possuem atividade antimalárica, como os taninos hidrolisados, flavonoides, sesquiterpenos lactônicos, saponinas e triterpenos (KAUR *et al.*, 2009; CASTANIEDA *et al.*, 1993; CAMACHO *et al.*, 2003).

2.4 Família Picrodendraceae

A família Picrodendraceae possui apenas 29 gêneros e 100 espécies (SUTTER *et al.*, 2006), nativas de zonas tropicais (Figura 6). Ela possui uma distribuição bastante restrita, ocorrendo em vários tipos de vegetação de várzea, florestas secas ou cerrado árido. Ela ocorre principalmente no hemisfério sul (Figura 6) destacando-se os gêneros *Austrobuxus*, *Oldfieldia*, *Pseudanthus*, *Tetracoccus*, *Picrodendron* e *Piranhea* (MOBOT, 2015).

Estes gêneros foram originalmente classificados em Euphorbiaceae, a qual é considerada um dos grupos taxonômicos mais complexos. Estudos posteriores foram realizados sobre a anatomia das folhas, madeira e das estruturas do pólen, e assim foi comprovado que a família Euphorbiaceae não era um grupo monofilético (WURDACK *et al.*, 2004). Essas propostas com algumas modificações na organização da família Euphorbiaceae, contribuíram para a divisão em três novas famílias: Euphorbiaceae, Picrodendraceae e Phyllanthaceae (CHASE, 2002; APG, 2003).

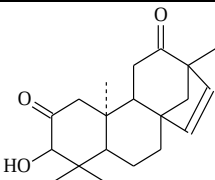
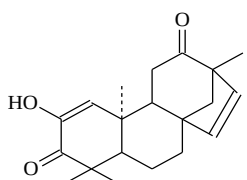


<http://www.tropicos.org/Name/50168724?tab=maps>

Figura 6: Ocorrência Mundial da Família Picodendraceae

Estudo com algumas espécies da família, mostram a presença da classe dos terpenos como constituintes químicos da família Picodendraceae, como nos estudos dos gêneros *Androstachys* (PIACENZA *et al.*, 1979), *Petalostigma* (GRACE *et al.*, 2006), porém outras classes de substâncias foram isoladas com espécies da mesma família (Tabela 1).

Tabela 1: Substâncias isoladas de espécies da família Picodendraceae

Susbstâncias	Parte Vegetal	Espécie	Referências
 <i>ent-3β-hidroxibeier-15(16)-en-2,12-diona</i>	Cerne	<i>Androstachys johnsonii</i>	PIACENZA, 1979
 <i>ent-2-hidroxibeier-1,15-diene- 3,12-diona</i>	Cerne	<i>Androstachys johnsonii</i>	PIACENZA, 1979

	Raíces	<i>Androstachys johnsonii</i>	PIACENZA, et al. 1979.
R = Ac R = H 2-acetoxi-1,15-beieradien-3,12-dione ; 2-hidroxi-1,15-beieradiena-3,12-dione			
	Cerne	<i>Androstachys johnsonii</i>	PIACENZA, 1979
<i>ent</i>-2-benzilidenebeier-15-en-3,12-dione			
	Cerne	<i>Androstachys johnsonii</i>	PIACENZA, 1979
<i>ent</i>-benzilidenebeier-15-en-3-one			
	Cerne	<i>Androstachys johnsonii</i>	PIACENZA, 1979
<i>ent</i>-2-benzilidene-16α-hidroxiatis-13-en-3-one			
	Cerne	<i>Androstachys johnsonii</i>	PIACENZA, 1979
<i>ent</i>-16α-Hidroxi-2α-hidroxibenzi-atis-13-en-3-one			

2.5 Gênero *Piranhea*

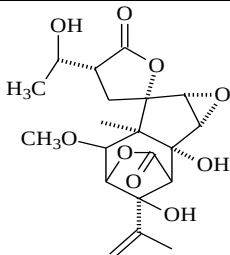
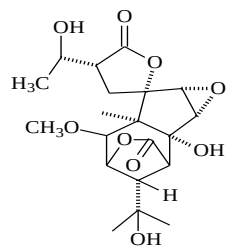
No Brasil, ocorrem os gêneros *Piranhea* e *Podocalyx*, sendo que, o gênero *Piranhea* pode ser encontrado nos estados do Amapá, Pará, Amazonas, Tocantins, Acre, Rondônia, Maranhão, Bahia e Mato-Grosso (SECCO e CORDEIRO 2015). Esse gênero possui apenas 4 espécies: *Piranhea longepedunculata*, *P. mexicana*, *P. securinaga*, *P. trifoliata* (SECCO e CORDEIRO, 2015).

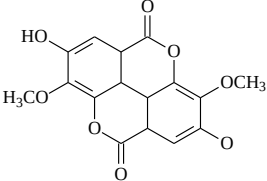
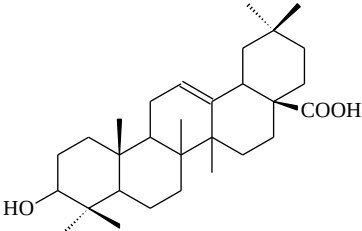
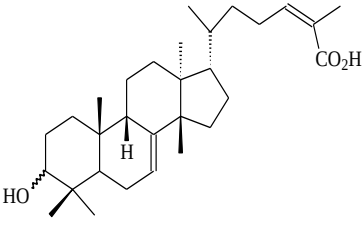
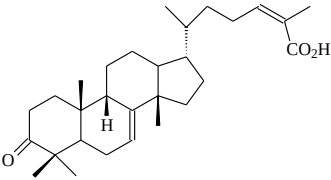
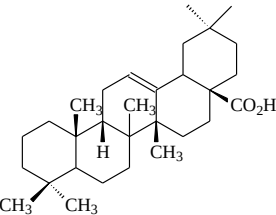
Estudos fitoquímicos foram realizados apenas com a espécie *P. mexicana* que possui sinonímia *Celaenodendron mexicana*, da qual foram isolados terpenos com atividade antimalárica, citotóxica e antiprotozoária (KAUR *et al.*, 2009; CASTANIEDA *et al.*, 1993; CAMACHO *et al.*, 2003).

Foram realizados também, estudos fitoquímicos de *P. trifoliata*, com o isolamento da 28-hidroxi-friedelan-3-ona, friedelan-3-ona e 3-metoxi-4-hidroxi-benzaldeído (JEFFREYS, 2011; PEDROZA, 2014; CASTANIEDA *et al.*, 1993).

A tabela a seguir (Tabela 2) mostra as substâncias isoladas do gênero *Piranhea*.

Tabela 2: Substâncias isoladas do gênero *Piranhea*

Substância	Parte Vegetal	Espécie	Referências
 celaenodendrolida I	Cascas do tronco	<i>Celaenodendron mexicanum</i>	CASTAÑIEDA <i>et al.</i> , 1993.
 picrodendrina E	Cascas do tronco	<i>Celaenodendron mexicanum</i>	CASTAÑIEDA <i>et al.</i> , 1993

 ácido elágico-4-O-β-D-xilopirosidio-3,3' dimetil eter	Cascas do tronco	<i>Celaenodendron mexicanum</i>	CASTAÑIEDA et al., 1993
 ácido oleanólico	Folhas	<i>Celaenodendron mexicanum</i>	CASTAÑIEDA et al., 1993
 Á ácido 3α - hidroxí-7,24Z-dien- tirucala-26-oico	Folhas	<i>Celaenodendron mexicanum</i>	CAMACHO, et al., 2009
 ácido 3-oxitirucala-7,24-dien-26-óico	Folhas	<i>Celaenodendron mexicanum</i>	BACAB-CHAN et al., 2001
 ácido <i>epi</i>-oleanólico	Folhas	<i>Celaenodendron mexicanum</i>	BACAB-CHAN et al., 2001

2.6 *Piranhea trifoliata*

Piranhea trifoliata são árvores grandes com os ramos bem desenvolvidos, em geral parcialmente submersos nas margens dos rios, troncos com cascas de cor cinza, estriadas longitudinalmente (REMADE 2015). É uma árvore do dossel superior, alcançando idade de mais de 400 anos (WORBES, et al 1992). Ela pode ser encontrada no Brasil, Bolívia e Venezuela. Aqui no Brasil ela é encontrada nos estados do Amazonas, Pará, Tocantins, Rondônia e Mato Grosso (SECCO e CORDEIRO, 2015).

É conhecida popularmente como Piranheira (Figura 7), pois seus frutos e sementes alimentam piranhas e outros peixes, é encontrada nas áreas de várzeas e igapós, possui uma madeira sem cheiro e gosto, é resistente a fungos e insetos. A sua casca é usada como curativo para inflamações no útero em banhos de assento e para chás no tratamento de malária (CAMPOS FILHO, 2012).



Figura 7: fotos da coleta de *Piranhea trifoliata* e confecção da exsicata para depósito no herbário

Até o presente momento foram publicados pelo nosso grupo de pesquisa, estudos fitoquímicos com o isolamento dos triterpenos: 28-hidroxi-friedelin-3-ona, friedelan-3-ona e o ácido-metoxi-4-hidroxi-benzaldeído além de seus extratos metanólicos apresentarem atividades antimalárica, antioxidante,

antibacteriana e antifúngica (RODRIGUES et al., 2014; PEDROZA, 2014; JEFFREYS, 2011) (Figura 8) .

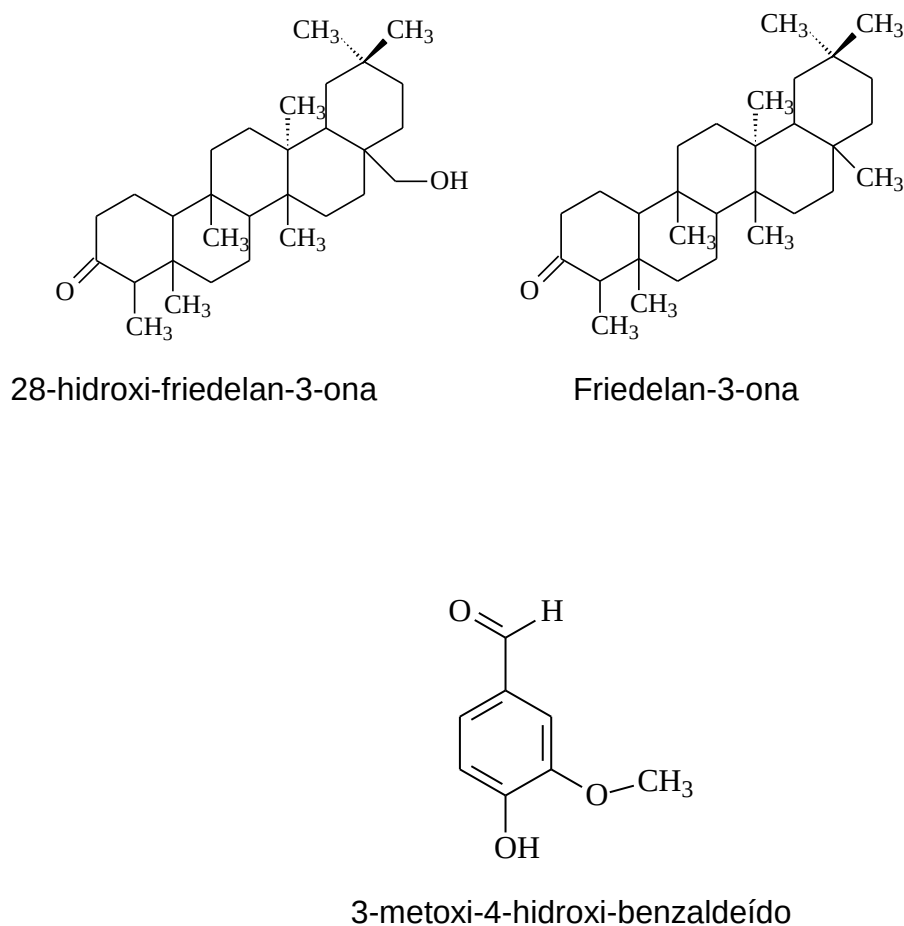


Figura 8: Triterpenos e um benzaldeído isolados das folhas e galhos de *Piranhea trifoliata*.

2.7 Bioprospecção de fungos endofíticos: Um recurso plausível para o avanço biotecnológico

Os fungos endofíticos podem ser encontrados nos espaços inter e intracelulares do tecido vegetal, podendo permanecer por um longo período do seu ciclo de vida, apresentando incidência variável de acordo com a planta, espaço geográfico, idade e sazonalidade (AZEVEDO et al., 2000; ESPOSITO-POLESI 2011, PICCOLO et al, 2010).

Além disso, sua interação no tecido vegetal, pode induzir a produção de diferentes substâncias de interesse clínico pois, estudos mostram que o isolamento de substâncias a partir de fungos, tornou-se benéfica tanto para a saúde pública quanto para o avanço biotecnológico com a produção de diferentes antibióticos, contribuindo com o desenvolvimento econômico e científico pois, seu crescimento é mais rápido e ocupa menor espaço (BEZERRA *et al.*, 2015; FREIRE *et al.*, 2015).

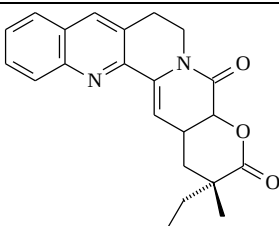
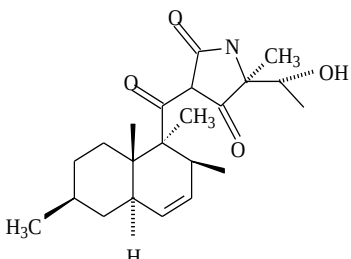
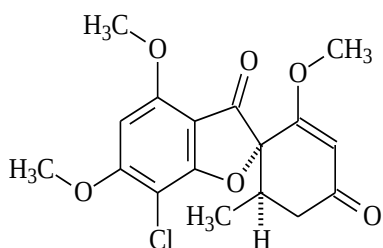
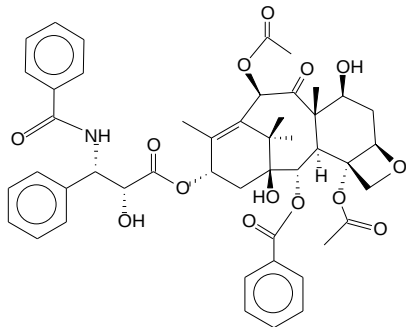
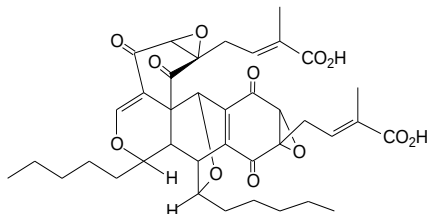
Segundo os relatos do avanço da pesquisa fitoquímica e biológica, mais de 100 micro-organismos endofíticos foram cultivados e submetidos a investigações para a caracterização química e avaliação biológica, resultando em novas estruturas químicas e atividades biológicas interessantes (WIBOWO *et al.*, 2016, KUSARI *et al.*, 2013; SENADEERA *et al.*, 2012; GUNATILAKA 2006,

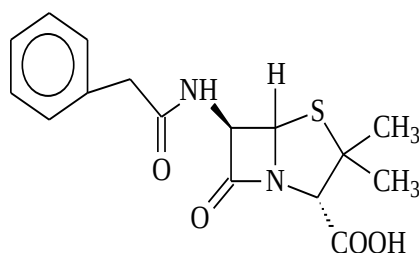
Grande parte dos fungos endofíticos produzem metabólitos similares ou igualmente presentes em suas plantas hospedeiras, onde as classes químicas podem ser identificadas e comparadas através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear - RMN de ^1H (ZHANG; SONG; TAN, 2006; GUNATILAKA, 2006).

De acordo com Schulz e Boyle 2005, aproximadamente 80% dos fungos endofíticos produzem metabólitos biologicamente ativos que podem transformar-se em antibióticos, fungicidas ou herbicidas, como por exemplo o taxol, obtido tanto da planta medicinal *Taxus brevifolia* como do fungo endofítico *Taxomyces andreanae* (STROBEL *et al.*, 2004). Essas similaridades, nos mostram que os fungos endofíticos possuem a capacidade de se adaptar ao microambiente por variação genética, ocorrendo assim, uma transposição de genes entre a planta e o fungo em uma verdadeira engenharia genética *in vivo* (DAVITT *et al.* 2011, GUNDEL *et al.*, 2011; AZEVEDO *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2006;).

A tabela 26, mostra algumas substâncias que foram isoladas a partir de fungos endofíticos com importantes potenciais biológicos.

Tabela 3: Algumas substâncias isoladas de fungos endofíticos com potencial biológico.

Substância	Fungo endofítico	Atividade
 Camptotecina	<i>Nothapodytes foetida</i>	Citotóxica em linhagens celulares de câncer humano <i>in vitro</i> (PURI et al., 2005)
 Criptocina	<i>Cryptosporiopsis quercina</i>	Antitumoral (LI, 2000)
 Griseofulvina	<i>Penicillium griseofulvum</i>	Antifúngica (CAFEU et al., 2005)
 Taxol	<i>Taxomyces andreanae</i>	Tratamento de câncer de útero e mama (STROBEL et al., 2004)
 Ácido torreiânico	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	Anticancerígenos (LEE et al., 1996)



Penicilina

*Penicillium
notatum*

Antibiótico
(TAN and ZOU, 2001)

2.8 Família Valsaceae

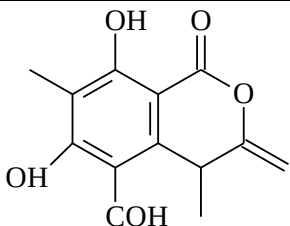
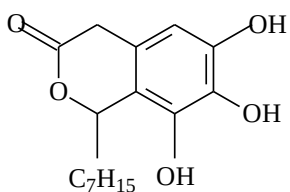
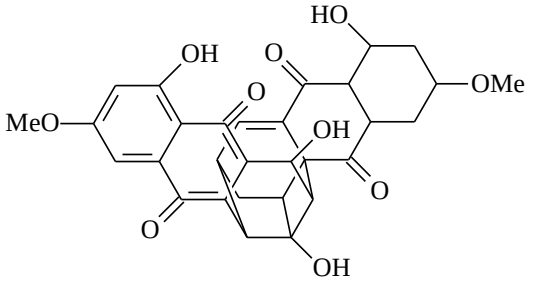
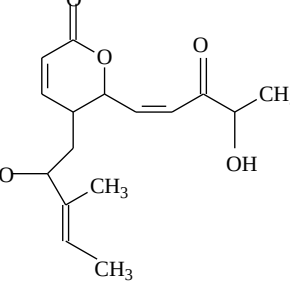
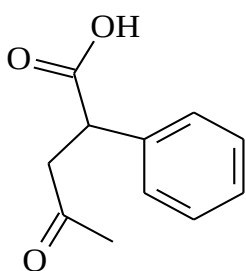
A família Valsaceae pertence ao reino *Fungi*, divisão *Ascomycota*, subfilum *Pezizomycotina*, classe *Sordariomycetes*, subclasse *Sordariomycetidae* e orden *Diaporthales* (MYCOBANK, 2016).

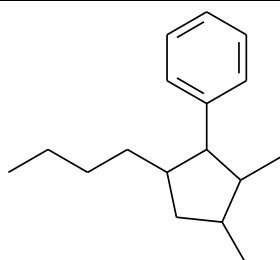
Possui 95 gêneros e aproximadamente 228 espécies com ocorrência principalmente no Brasil e Europa, tendo com os principais representantes os gêneros: *Amphioportha*, *Apioplagiostoma*, *Chadefaudiomyces* Kamat, *Clypeoporthella*, *Cytospora*, *Ditopellina*, *Durispora*, *Hypospilina* (Sacc.), *Leptosillia*, *Leucostoma*, *Phomopsis*, *Rossmania* e *Valsella* (MYCOBANK, 2016; LUMBSCH, 2009).

Estudos com algumas espécies da família, mostraram a presença de substâncias fenólicas e ácidos (Tabela 4).

Tabela 4. Algumas substâncias isoladas da família Valsaceae

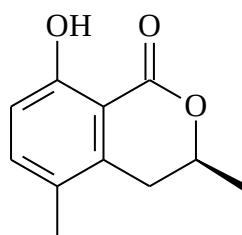
Substância	Fungo endofítico	Atividade
2,4-diidroxi-5,6-dimetil benzoato de etila	<i>Phomopsis cassiae</i>	Atividade antifúngica; contra a linhagem celular de tumor cervical humano (STINSON et al, 2003)

 phomopsilactona	<i>Phomopsis cassiae</i>	Atividade antifúngica; contra a linhagem celular de tumor cervical humano (STINSON et al, 2003)
 citosporona D	<i>Cytospora sp.</i> e <i>Diaporthe</i>	Antibacteriana (BRADY, 2000)
 Citoskirina A	<i>Cytospora sp.</i>	Antibacteriana (BRADY, 2000)
 Fomopsolida A	<i>Phomopsis sp.</i>	Antibacteriana (STIERLE, 1993)
 5-phenyl-4-oxopentanoic acid	<i>Cytospora sp.</i>	(LU et al, 2011)



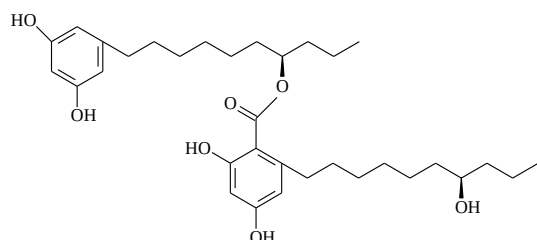
Cytospora sp. (LU *et al*, 2011)

3-(2,5-dihydro-4- hydroxy-5-oxo-3-phenyl-2-furyl)propionic acid



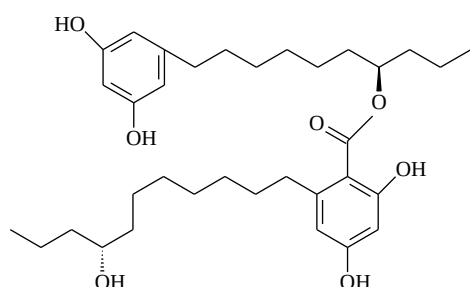
Cytospora sp. (LU *et al*, 2011)

(3R)-5-methylmellein



Cytospora sp. (LU *et al*, 2011)

Integracins A



Cytospora sp. (LU *et al*, 2011)

Integracins B

2.9 Gênero *Diaporthe*

O gênero *Diaporthe* é a forma sexuada, teleomorfo, do fungo endofítico e a forma assexuada, anamorfo, é denominada de *Phomopsis*. Ele é um ascomiceto pertencente ao filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotin, classe

Sordariomycetes, subclasse Sordariomycetidae, ordem Diaporthales e família Valsaceae (ABREU *et al.*, 2012).

Estudos recentes, mostraram que a identificação das espécies do gênero *Diaporthe* é considerado um desafio mediante a um hospedeiro não descrito anteriormente (UDAYANGA *et al.*, 2011), pois existem diferentes espécies vegetais possuidoras de uma gama de fungos endofíticos com poucas características que podem diferenciá-las, sendo necessárias diferentes técnicas moleculares para fazer a classificação (UECKER, 1988; SANTOS *et al.*, 2010; BOTELLA e DIEZ, 2011).

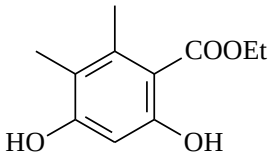
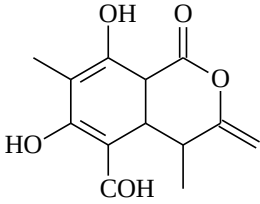
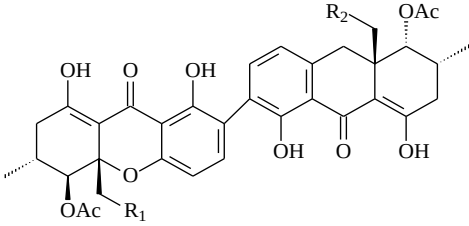
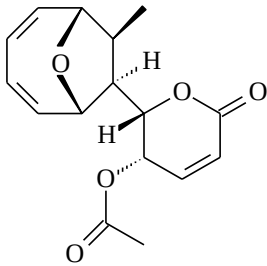
Apesar da dificuldade de identificação, diferentes estudos afirmaram que espécies do gênero *Diaporthe* têm sido descritas como endofíticas, patogênicas, além de causar problemas à saúde humana (GARCIA-REYNE *et al.*, 2011; ROSSMAN, 2007; CROUS e GROENEWALD, 2005).

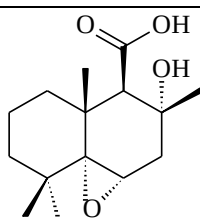
Além disso, este gênero é citado como produtor de metabolitos secundários e enzimas (DAI *et al.*, 2005; ELSAESSER *et al.*, 2005), além de possuidor de diferentes atividades biológicas como: ação antibiótica (LIN *et al.*, 2005; DETTRAKUL *et al.*, 2003), fungicida (WU *et al.*, 2008), capaz de impedir a herbivoria (VESTERLUND *et al.*, 2011), anticancerígena (KUMARAN, 2009) e pode ser utilizado no controle biológico de ervas daninhas (ASH *et al.*, 2010).

Sendo assim, estudos de bioprospecção de microrganismos endofíticos para fins farmacêuticos e biotecnológicos, são de fundamental importância para a descoberta de novos antibióticos, agentes quimioterápicos e defensivos agrícolas, pois grande parte dos metabólitos isolados a partir de fungos endofíticos são caracterizados como eficazes, com baixa toxicidade, não causa impacto ambiental e podem ser produzidos em larga escala (XU *et al.*, 2010; SMITH *et al.*, 2008; UDAYANGA *et al.*, 2011).

A tabela a seguir mostra os metabólitos secundários isolados de espécies do gênero *Diaporthe* (Tabela 5).

Tabela 5. Metabólitos isolados do gênero *Diaporthe*

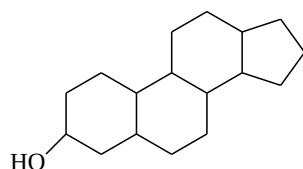
Substância	Gênero	Atividade biológica
 Etil 2,4 dihidroxi-5,6-dimetil benzoato	<i>Phomopsis cassiae</i>	Antifúngica (SILVA <i>et al.</i> , 2005)
 Fomopsilactona	<i>Phomopsis cassiae</i>	Antifúngica (SILVA <i>et al.</i> , 2005)
 R₁ = OH R₂ = OH - Diceradiol A R₁ = OAc R₂ = OH - Diceradiol B R₁ = OAc R₂ = OAc - Diceradiol C	<i>Phomopsis longicolla</i>	Antibiótica e citotóxica (WAGENAAR, <i>et al.</i> , 2000)
 Micoepoxidieno	<i>Diaporthe sp.</i>	Citotóxica (PRACHYA <i>et al.</i> , 2007).



Altiloxina A

Diaporthe sp.

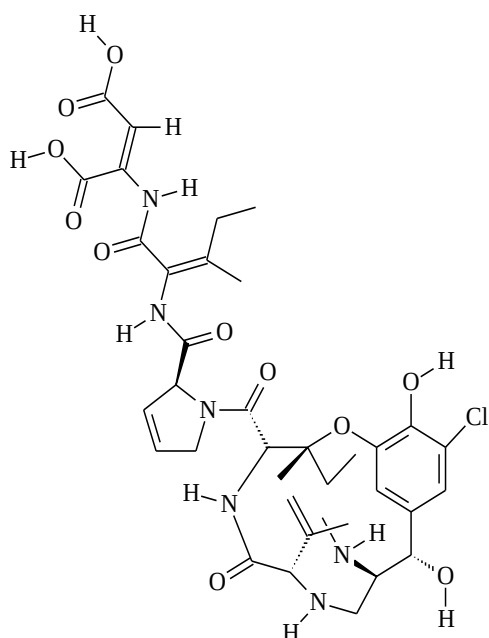
Fitotóxica
(ICHIHARA et al,
1984)



Esterol

Phomopsis sp. Lz42

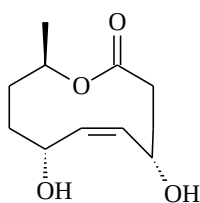
LIN et al., 2005



Fomopsina

*Phomopsis
leptostromiformis*

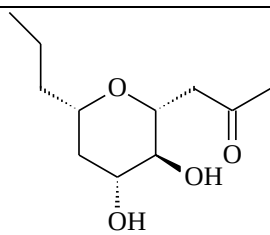
Antimicótico
(SHIVAS et al.,
1991)



Nonenolide

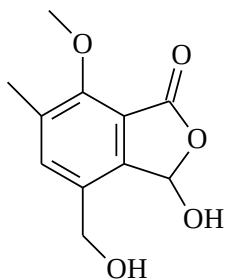
Phomopsis sp. A123

Fitotóxico
(LI et al., 2010;
RIVERO-CRUZ,
2003)



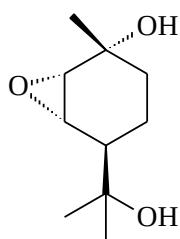
Fomonol

Phomopsis sp. A123 (LI *et al.*, 2010)



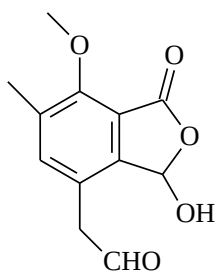
Fomotone

Phomopsis sp. A123 (LI *et al.*, 2010)



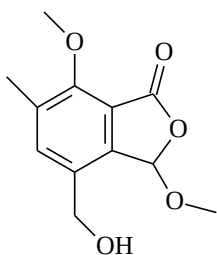
Fomofene

Phomopsis sp. A123 (LI *et al.*, 2010)



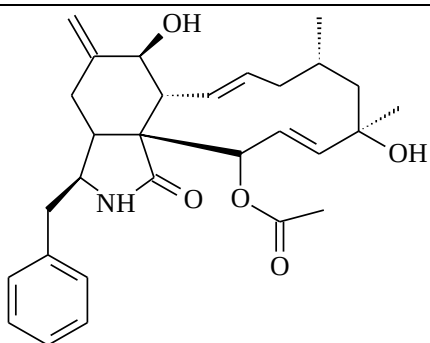
4-formil-7-metoxil-6-metil-ftal-ida

Phomopsis sp. A123 (LI *et al.*, 2010)



Ácido diidrogladiolico metillactol

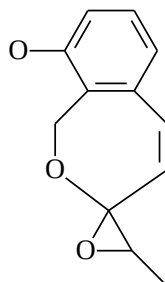
Phomopsis sp. A123 (LI *et al.*, 2010)



Citotalasina H

Phomopsis sp. A123

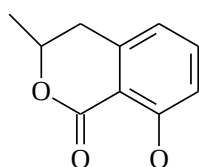
(LI *et al.*, 2010)



Benzofomopsin A

Phomopsis sp. KS-37-2

SHIONO *et al.*,
2009



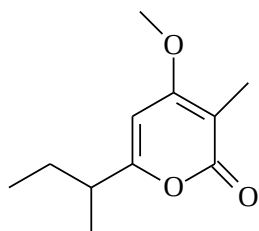
mileim

Phomopsis sp.

Antimicrobiana e
antinflamatória

(REDKOA
et al., 2007;

WEBER *et al.*,
2005)



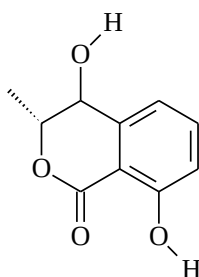
Nectriapirona

Phomopsis sp.

Antimicrobiana e
antinflamatória

(REDKOA
et al., 2007;

WEBER *et al.*,
2005)



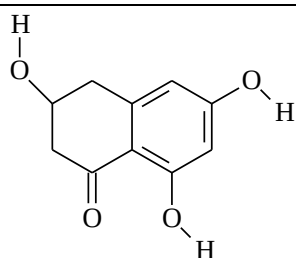
4- Hidroximileim

Phomopsis sp.

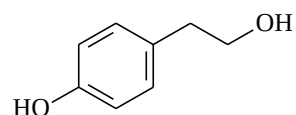
Antimicrobiana e
antinflamatória

(REDKOA
et al., 2007;

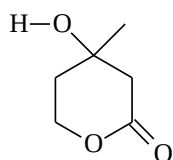
WEBER *et al.*,
2005)



Scitalona



Tirosol



Mevalonalactona

Phomopsis sp.

Phomopsis sp.

Phomopsis sp.

Antimicrobiana e
antinflamatória

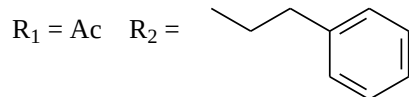
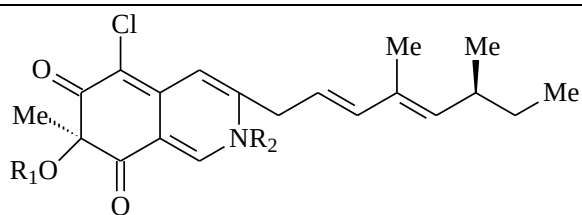
(REDKOA
et al., 2007;
WEBER *et al.*,
2005)

Antimicrobiana e
antinflamatória

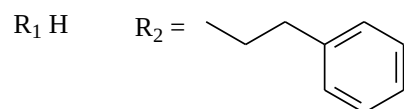
(REDKOA
et al., 2007;
WEBER *et al.*,
2005)

Antimicrobiana e
antinflamatória

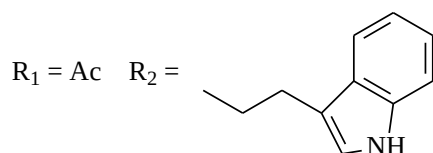
(REDKOA
et al., 2007;
WEBER *et al.*,
2005)



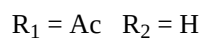
Isochromophilones X



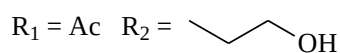
Isochromophilones XI



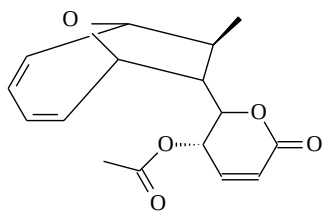
Isochromophilones XII



Sclerotioramina



Isochromophilone VI



Micoepoxidieno

Diaporthe sp.

Citotoxicidade
contra células do
câncer
(ZANG *et al*,
2012)

*Diaporthe
pseudomangiferae*
SNB-GSS10

Citotóxicas
contra câncer
cervical
(WANG *et al.*,
2010)

2.10 *Diaporthe hongkongensis*

Este fungo foi isolado das folhas de *P. trifoliata* e foi fracionado neste trabalho. O fungo endofítico *Diaporthe hongkongensis*, pertencente ao reino Fungi, filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Sordariomycetes, subclasse Sordariomycetidae, ordem Diaporthales, família Diaporthaceae, gênero *Diaporthe* é largamente distribuído, saprófito, considerado fitopatígeno, mas também com ação patogênica contra humanos e outros mamíferos.

Até o presente momento, este fungo possui apenas estudos morfológicos e moleculares (DISSANAYAKE et al, 2014; HUANG et al, 2013), tornando-se plausível seu estudo químico e biológico visto que, outras espécies de fungos do mesmo gênero possuem importantes metabólitos secundários com diferentes ações biológicas.

3 Objetivos

3.1 Geral

- ✓ Realizar o estudo químico e biológico dos extratos das folhas de *Piranhea trifoliata* Baill e dos seus fungos.

3.2 Específicos

- ✓ Avaliar as atividades antimalárica, antioxidante e antibacteriana dos extratos vegetais e dos caldos metabólitos obtido dos fungos endofíticos;
- ✓ Realizar o perfil químico dos fungos endofíticos obtidos de *P. trifoliata*;
- ✓ Isolar e identificar as substâncias majoritárias presentes nos extratos e nos caldos metabólicos ativos dos fungos endofíticos;

4 Metodologia

Material e Métodos

4.1 Equipamentos utilizados

O espectro de massas utilizado foi o *MircoTOF-QII* (Brucker Daltonics), fonte de ionização ESI em modo positivo, 17500 FWHM, cromatógrafo Prominence UFLC (Shimadzu) com detector de diodos (DAD) SPDM-20^a operando na faixa 190 a 400 nm, injetor automático SIL-20-A e coluna Shim-pack XR-ODS 2 µm x 50 µm.

Os espectros de RMN, foram analisados em: RMN de 300 MHz (Bruker BioSpin AG, Modelo Fourier 300 UltraShield, com frequência de 300 MHz para hidrogênio com sonda EasyProbe Dual 300 MHz S1 5mm Z-gradient), para os núcleos de ¹H e de ¹³C (300 e 75 MHz, respectivamente), em CDCl₃.

Para a atividade antibacteriana utilizou-se: leitora para microplaca (modelo multiscan 60, Thermo) com leitura em 600 nm e espectrofotômetro (Femto, Cirrus 80 ST).

4.2 Coleta

As folhas de *Piranhea trifoliata* foram coletados em Volta Grande do Xingu, Altamira, PA em agosto de 2009 (Coleta 1), no lago do Catalão, Iranduba, AM em julho de 2010 (Coleta 2) e em abril de 2013 (Coleta 3, realizada do mesmo espécime vegetal da coleta 2).

As exsiccatas foram enviadas para identificação taxonômica no Herbário do Instituto Federal do Amazonas – IFAM, sendo registrada sob o número: 10653 (coletada 1) e 10654 (coletas 2 e 3).

4.3 Preparação dos extratos vegetais das folhas de *P. trifoliata*

As folhas coletadas foram secas à temperatura ambiente, moídas em moinho de facas e extraídas com diclorometano (DCM) (coleta 1) e com hexano, coleta 2. Esta mudança ocorreu devido à conscientização de preservação ao meio ambiente, substituindo um solvente mais tóxico (DCM) por um solvente menos tóxico (hexano). Essa extração foi repetida quatro

vezes com o auxílio da ultrassom por 20 minutos, para a obtenção de maior massa de extrato bruto onde foram concentrados em rota-evaporador. Após esta etapa, o material vegetal foi acondicionado em uma bandeja onde ficou em repouso e em temperatura ambiente até a evaporação total do solvente.

Em seguida, foram realizadas duas novas extrações do mesmo material vegetal com metanol e água destilada, utilizando o mesmo processo da extração anterior, com exceção da concentração do extrato aquoso que foi realizada em liofilizador.

4.4 Partição líquido-líquido dos extratos metanólicos das folhas

A fim de se obter uma primeira separação, os extratos metanólicos foram submetidos a uma partição líquido-líquido no funil de separação (Figura 9). Os extratos foram solubilizados com água destilada e MeOH na proporção 7:3 e extraído três vezes com cada solvente. O primeiro solvente foi o diclorometano (DCM) e o segundo foi o acetato de etila (AcOEt). A solução resultante no funil foi denominada de hidrometanólica com símbolo (H_2O -MeOH) sendo considerada a terceira fase.



Figura 9: Partição líquido-líquido dos extratos metanólicos das folhas com DCM (A), AcOEt (B) de *P. trifoliata*.

4.5 Prepado dos extratos dos fungos endofíticos

Para o estudo dos fungos endofíticos, foi realizado uma nova coleta do mesmo espécime da coleta 2, denominada de coleta 3. As folhas foram coletadas no lago do Catalão no município de Careiro da várzea, como descrito no item 4.1, submetidas a um processo de desinfecção superficial do material pelo método de Araújo *et al.*, (2001), com modificações.

As folhas com aparência saudáveis foram lavadas cuidadosamente em água corrente e enxaguadas com água destilada. No processo de desinfecção superficial, para a eliminação de micro-organismos epifíticos, as folhas foram desinfestadas com a solução de álcool 70%, sendo imersas por um minuto, sob agitação vigorosa e constante. Em seguida, foi descartada a parte líquida e adicionado à solução de hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo (v/v) durante três minutos e novamente adicionado álcool 70% por trinta segundos. Ao final do procedimento todo o material foi lavado quatro vezes em água destilada esterilizada. Uma pequena alíquota de 50 µL de água da última lavagem foi inoculada em placa de Petri como forma de controle negativo.

Ao final da desinfestação, as folhas de *P. trifoliata* foram cortadas com bisturi, cinco pequenos fragmentos com 0,5 X 0,5 centímetros onde foram distribuídos equidistantes em cada placa de Petri, contendo o meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA) acrescido do antibiótico oxitetraciclina a 2,5 mg/mL para evitar o crescimento de bactérias endofíticas. As placas foram incubadas em temperaturas variando de 26 a 30 °C durante quinze dias (Figura 10).



Figura 10: Coleta (a), desinfestação (b) e preparo dos fragmentos das folhas para a obtenção dos fungos endofíticos (c).

Vale ressaltar que parte do material coletado, foi moído e extraído com hexano, metanol e água para a realização do teste antibacteriano e análise de RMN de H^1 para identificação das possíveis classes químicas e comparação com os extratos das outras coletas.

4.6 Purificação e conservação dos fungos endofíticos de *P. trifoliata*

Após o crescimento dos fungos, de 15 dias, estes foram purificados em meio BDA, onde utilizou-se a técnica de visualização macroscópica, observando a coloração e a forma variada. Em seguida, os fungos foram submetidos a sucessivas repicagens até a observação macroscópica de uma única coloração e forma uniforme. Sua conservação foi realizada pelo método de Castelani 1963. (Figura 11).

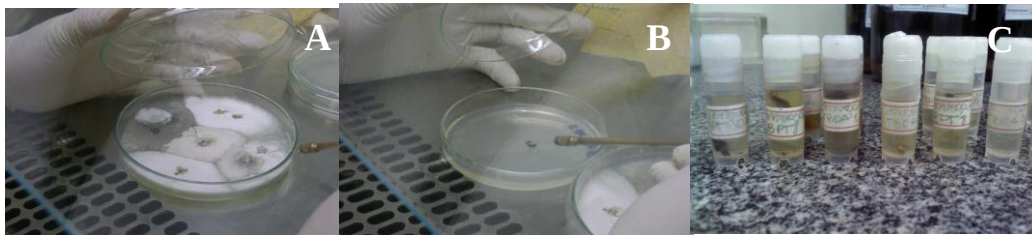


Figura 11: Crescimento dos fungos endofíticos (A), processo de obtenção e purificação de um único fungo (B) e conservação dos fungos (C).

Após o processo de purificação foram obtidos nove fungos endofíticos em diferentes formas e cores diferentes (Figura 12).

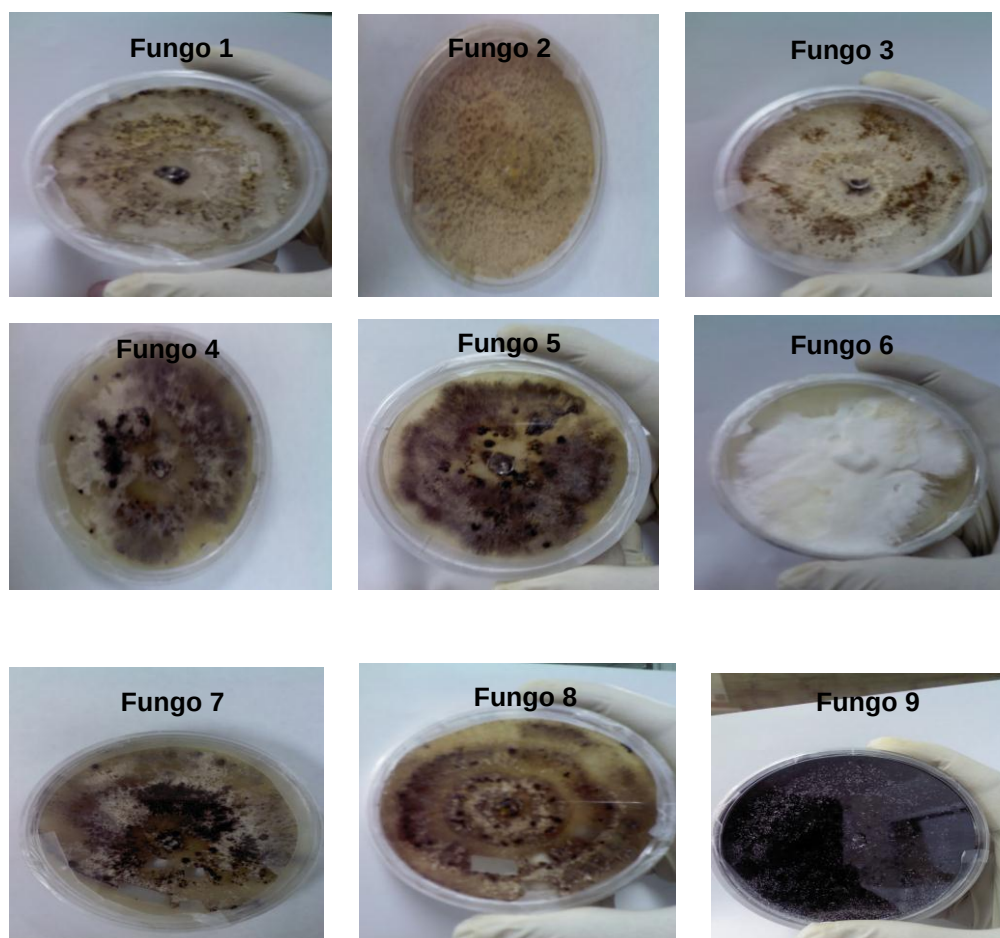


Figura 12: Obtenção dos 9 fungos endofíticos obtidos de *Piranhea trifoliata*.

4.7 Identificação dos fungos endofíticos por análise molecular

A identificação do fungo endofítico foi realizada na Fundação André Tosello Pesquisa e Tecnologia – FAT, junto a sua Coleção de Culturas Tropical, pela técnica Milena Duarte Lançoni.

4.7.1 Inoculação em meio de cultura

Os fungos endofíticos foram cultivados em SDB (Sabouraud Dextrose Broth) para posterior extração genômica.

4.7.2 Manipulação do DNA

O DNA foi extraído com kit comercial *Quick-DNA Isolation Kit* (Zymo Research), segundo as instruções do fabricante. A amplificação do DNA alvo, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foi realizada a partir dos oligonucleotídeos SR6R (5' AAGTATAAGTCGTAACAAGG 3') e LR1(5' GGTGTTGTTTCTTTCCT 3') (WHITE *et al.*, 1990). Após corrida eletroforética em gel de TBE-agarose 1,5% (p/v), o produto foi purificado, quantificado, concentrado, aliquoteado e acrescido dos oligonucleotídeos SR6R e LR1 utilizados para seqüenciamento, sendo este realizado na plataforma ABI 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies).

4.7.3 Análises das seqüências

A obtenção da seqüência consenso (BioEdit) da amostra dos fungos endofíticos foram geradas a partir do seqüenciamento bidirecional realizado com os *primers* supracitados. A seqüência consenso foi comparada com as depositadas no GenBank (NCBI) via BLASTn, alinhada com as seqüências similares disponíveis no banco de dados e, posteriormente, foi construída uma árvore de distância filogenética com auxílio do programa MEGA6.

4.8 Preparo do cultivo celular para a obtenção dos fungos endofíticos em meio líquido.

Para a obtenção dos fungos em grande quantidade, pequenos fragmentos foram adicionados em erlenmeyers de 500 mL contendo o meio de cultura batata dextrose líquido (BDL), onde permaneceram por um período de 15 dias em dois *sheikers*, um com doze e outro com vinte posições, a 112 rpm à 25 °C, (Figura 13 A). Para a realização do controle do pH da solução, foi utilizado uma fita de pH, Merck, onde foi medido o pH do caldo antes de colocar os fragmentos e a cada cinco dias até o final do período de crescimento e para o controle da concentração de glicose, foi utilizado uma fita reativa da URICLIN 10, seguindo os mesmos procedimentos descritos na bula (Figura 13 B e C)



Figura 13: Cultivo dos fungos endofíticos em *Shakers* a 112 rpm à 25 °C (A), medição do pH e do nível de glicose (B e C).

4.9 Filtração e partição líquido-líquido do caldo metabólico obtida dos fungos endofíticos

Com o objetivo de realizar uma análise química e biológica completa dos fungos endofíticos, o caldo metabólico foi filtrado com um funil de Buchner e kitassato (Figura 14).



Figura 14: Filtração do caldo metabólico dos fungos endofíticos (A) e (B) obtidos de *P. trifoliata*.

Após a filtração, o caldo foi acondicionado em um funil de separação de 1000 mL para a realização da partição líquido-líquido. As imagens a seguir, mostram os detalhes da partição na obtenção da fase DCM (Figura 15 A) e da fase AcOEt (Figura 15 B).



Figura 15: Partição líquido-líquido do caldo metabólico dos fungos endofíticos de *P. trifoliata*, para a obtenção da fase DCM (A) e da fase AcOEt (B).

4.10 Extração dos fungos endofíticos

Para a extração, primeiramente foi retirada toda a água do micélio por filtração a vácuo e a acondicionado em um erlenmeyer de 500 mL, em seguida foi adicionado o solvente hexano e levado ao ultrassom por 20 min. Após o tempo estimado, o solvente foi filtrado e ao observar sua coloração, verificou-se que a extração não foi eficiente, apresentando um rendimento entre 4 a 9 mg de extrato bruto.

Com isso, optou-se por realizar novamente a extração sendo que agora com DCM, o qual possui maior polaridade (Figura 16). A extração com DCM foi repetida cinco vezes seguida do MeOH e água. Os detalhes dessa etapa está descrita no item 4.2.



Figura 16: Etapas da obtenção dos extratos do micélio em ordem crescente de polaridade em ultrassom (A) e preparo do material para a filtração simples (B).

4.11 Metodologias gerais iniciais com os extratos e as fases

Para o início do fracionamento fitoquímico foi necessário fazer um levantamento bibliográfico da família e do gênero afim de verificar as possíveis classes químicas presentes. Em seguida, realizou-se a técnica da Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) com os solventes Hexano, DCM, Acetona, Acetato de Etila (AcOEt) e Metanol (MeOH) nos seguintes sistemas: hexano/DCM, hexano/AcOEt, hexano/acetona, DCM/AcOEt, DCM/acetona, DCM/MeOH e AcOEt/MeOH em diferentes proporções variando de 10 a 100% de solventes, borrifados com os reveladores químicos. Os reveladores químicos foram: iodo ressublimado, sulfato cérico, cloreto férrico, cloreto de alumínio, anisaldeído sulfúrico e reagente de Dragendorff.

Os extratos e fases escolhidos foram fracionados em cromatografia em coluna aberta utilizando Sílica gel 60 (SiO_2 - 230–400 e 40-140 mesh, MERCK). As frações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada comparativa analítica CCDC (Silica gel 60 F₂₅₄, aluminium sheets, Merck, Germany) sob luz UV 254 e 364 nm e após reveladas com anisaldeído sulfúrico e cloreto férrico.

Após essa etapa, uma pequena parte dos extratos (40 mg) foram enviados para análise de Ressonância Magnética Nuclear – RMN de ^1H de 60 MHz ou 300 MHz para a verificar as possíveis classes químicas presentes nos extratos e guiar o fracionamento.

Para verificar as atividades biológicas presentes nos extratos, uma pequena quantidade de massa foi testada para as atividades antioxidante (5 mg), antibacteriana (10 mg) e antimalárica (5 mg). A metodologia para cada ensaio está descrita nos itens 4.13 ao 4.15 respectivamente.

4.12 Fracionamento do extrato diclorometânico das folhas coletadas em Altamira - PA (Coleta 1)

Para o fracionamento do extrato DCM das folhas, utilizaram-se 840 g de amostra acondicionada em Sílica Gel 60 Mesh, com os sistemas de eluição: DCM 100%; DCM/AcOEt 9:1 até 4:6, AcOEt/MeOH 9:1 até 1:1 e MeOH 100%. As dimensões da coluna utilizada foi de 100 cm e 2,0 cm de diâmetro. Para cada fração foram coletados 15 mL totalizando 84 frações.

Todas as frações foram analisadas por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa - CCDC e reveladas com os reveladores químicos e físicos e as frações semelhantes foram reunidas. A fração reunida (0-5) com 34 mg, apresentou-se interessante quimicamente e foi refracionada com sílica gel-60 mesh utilizando os sistemas Hex/DCM de 9:1 até DCM 100%, DCM/AcOEt 9:1 até AcOEt 100% e 100% MeOH, resultando em 30 frações.

Todas as frações foram analisadas em CCDC e seus respectivos reveladores químicos e físicos, sendo a fração 3 com 20 mg apresentou manchas roxas quando revelada com anisaldeído característico de terpenos. Esta foi então refracionada utilizando Sílica Gel 60 Mesh, com o sistema inicial Hexano/Acetona 9:1 até Acetona 100% e posteriormente com Acetona/MeOH 1:1 até MeOH 100%. Após a realização da coluna e análise por CCDC as frações 8 e 9 as quais saíram no sistema Hexano/Acetona 1:1 apresentaram uma única mancha de coloração roxa, estas então, foram reunidas e enviadas para análise de RMN de ^1H .

Após a análise das frações anteriores, foi realizado o fracionamento das frações reunidas de 6 a 13 utilizando sílica como fase estacionária e DCM/acetona 9:1 até 100% de acetona, acetona/MeOH 9:1, 7:3, 1:1 e 100% de MeOH. Após a obtenção e análise das frações reuniu-se a fração 8-13 por apresentar uma massa significativa, 35 mg, além de manchas de coloração roxa quando reveladas com anisaldeído sulfúrico. Esse fracionamento foi realizado com o sistema DCM/Acetona 9:1 até 100% de acetona, acetona/MeOH 9:1, 7:3, 1:1 e 100% MeOH, obtendo-se 20 frações. Durante a análise em CCDC verificou-se que a fração reunida 2-8, apresentou-se como um sólido branco que ao ser revelada anisaldeído sulfúrico apresentou uma única mancha de coloração roxa. Esta foi enviada para análise de RMN de ^1H e

^{13}C e após a análise dos dados essa fração foi denominada de substância I. Os detalhes do isolamento podem ser visualizados na tabela 6.

Tabela 6. Condições e sistema usado para o fracionamento de (6-13).(8-13) para o isolamento da substância I

Dados do sistema	Frações
DCM/Acetona 9:1	2-8 (substância I)
DCM/Acetona 8:2	9-12
DCM/Acetona 7:3	13
DCM/Acetona 6:4	14-15
DCM/Acetona 1:1	16
Acetona 100%	16-18
Acetona/Metanol 1:1	19
Metanol 100%	20

Após a análise de todas as frações, voltou-se para as frações iniciais e verificou-se que a fração 17-18, apresentou um precipitado branco e quando analisada em CCDC apresentou uma mancha de cor amarela intensa quando revelada no anisaldeído sulfúrico, esta foi lavada com acetona e após análise de RMN de ^1H e ^{13}C foi denominada de substância II.

Em seguida verificou-se que a fração 19-22 apresentou um precipitado branco amarelado, esta então foi lavada com acetona e enviada para análise de RMN de ^1H e ^{13}C que após a análise dos dados verificou-se que ela se tratava também da substância II. A tabela 7, mostra os detalhes desse fracionamento.

Tabela 7. Sistemas utilizados no fracionamento de (6-13).(8-13) para o isolamentos da substância II

Dados do sistema	Frações
DCM/Acetona 9:1	0-5
DCM/Acetona 8:2	6-10

DCM/Acetona 7:3	11-16	
DCM/Acetona 6:4	17-18	(substância II)
DCM/Acetona 1:1	19-22	(substância II)
DCM/Acetona 4:6	23-29	
Acetona 100%	30-45	
Acetona/Metanol 9:1	46-52	
Acetona/Metanol 8:2	53-60	
Acetona/Metanol 7:3	61-71	
Acetona/Metanol 6:4	72-75	
Acetona/Metanol 1:1	76-82	
Metanol 100%	83-84	

Em seguida, foi realizada uma coluna cromatográfica da fração mãe 23 a 29 com 30 mg, por apresentar-se interessante quimicamente e ter uma massa significativa. O sistema utilizado nessa coluna de sílica aberta foi Hexano/DCM 9:1 até 100% de DCM 100%; DCM/AcOEt 9:1 até 100% AcOEt, AcOEt/MeOH 9:1 até 100% MeOH. As frações 5 a 7 foram reunidas (19 mg) e refracionadas com DCM/Acetona 9:1 até 100% de acetona, acetona/MeOH 9:1 até 100% de MeOH. Em seguida, realizou-se uma CCDP da fração 7 com o sistema DCM/Acetona 1:1, onde foram obtidas 3 frações sendo que a fração 2 após análise de RMM ^1H e ^{13}C foi denominada de substância III (Tabela 8).

Tabela 8. Condições e sistema usado para o fracionamento de (23-29).(5-7).(7).(2)

Dados da CCDP	Frações	
DCM/Acetona 1:1	1	
DCM/Acetona 1:1	2	(substância III)
DCM/Acetona 1:1	3	

A seguir é mostrado o fluxograma com os detalhes do fracionamento e obtenção das substâncias I, II e III.

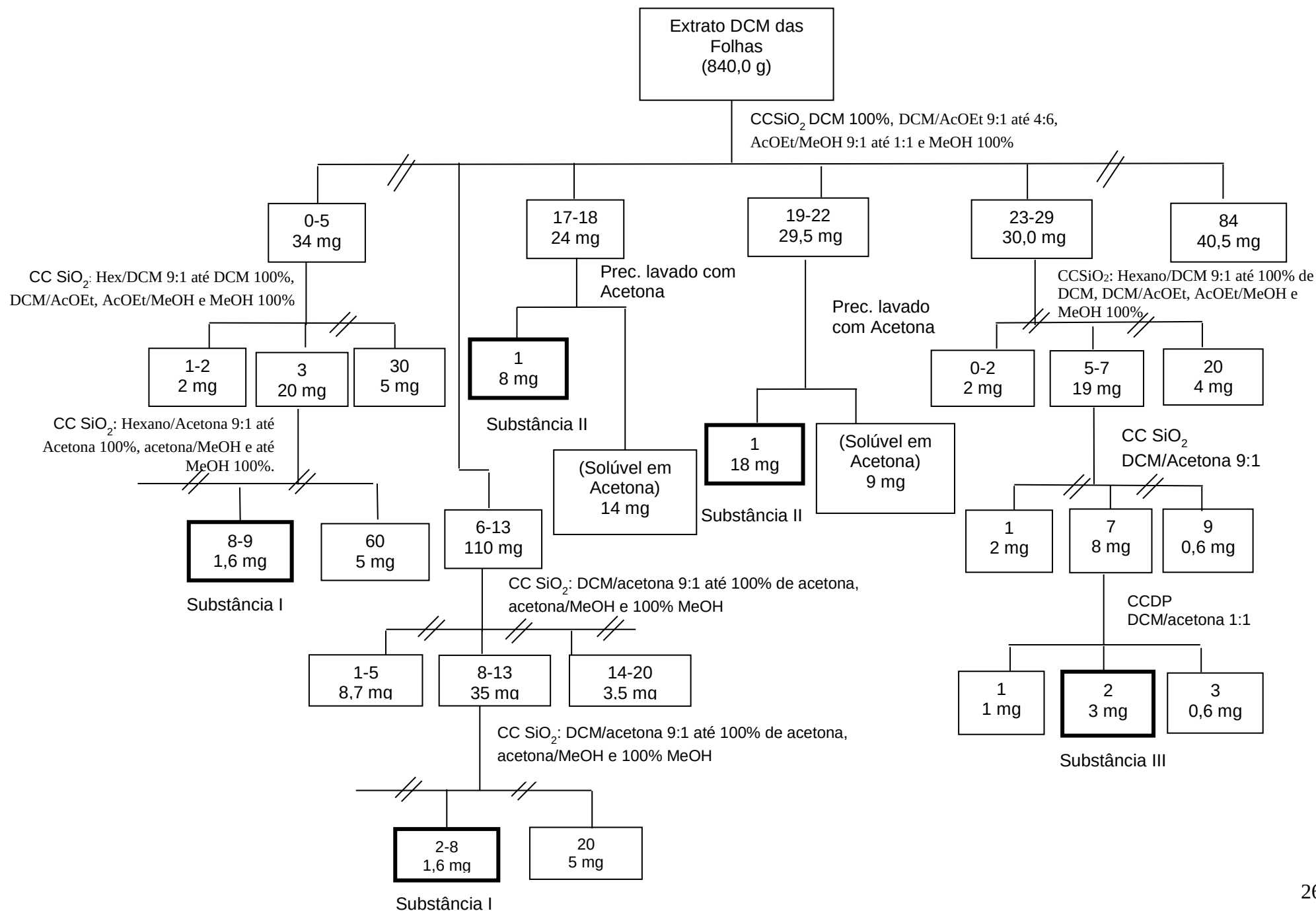


Figura 17: Fluxograma do fracionamento do extrato DCM das folhas de *P. trifoliata*.

4.13 Fracionamento do extrato metanólico das folhas coletadas em Altamira - PA (Coleta 1)

Primeiramente foi realizada uma partição líquido-líquido como descrito no item 4.5, em seguida, foram realizadas as análises em CCDC da fase DCM, eluída com DCM/Acetona 1:1, da fase AcOEt eluída com AcOEt/Acetona 1:1 e da fase aquosa, eluída com MeOH 100%, em seguida ambas foram reveladas com os reveladores químicos e físicos citados no item 4.8 e analisadas quanto as classes químicas presentes.

Após estas visualizações e registros iniciais, a fase DCM foi escolhida para o fracionamento por apresentar-se com características de triterpenos, pela intensidade da coloração roxa quando reveladas com anisaldeído sulfúrico além da coloração azul fluorescente detectado no UV visível 365 nm.

O fracionamento iniciou com uma coluna de sílica aberta com o sistema hexano/acetona 9:1 até 100% acetona, em seguida, utilizou-se os sistemas acetona/MeOH 9:1 até acetona/MeOH 1:1 e depois 100% MeOH, resultando em 58 frações. As frações que apresentaram semelhanças quando reveladas com os reveladores químicos e físicos, foram reunidas. Em seguida a fração 8-10 com 78 mg, foi escolhida para ser refractionada em coluna de sílica aberta com o sistema Hexano/DCM 1:1 até DCM 100%, DCM/acetona 9:1 até acetona 100%, acetona/MeOH 9:1, 7:3, 1:1 e 100% MeOH, obtendo-se 33 novas frações.

Todas as frações foram reveladas com anisaldeído sulfúrico, sulfato cérico, iodo ressublimado, além das luzes UV-Visível nos comprimentos de onda 254 nm e 364 nm. A fração 2 com 2 mg revelou uma mancha de coloração roxa quando revelada com anisaldeído, que após a análise de RMN de ^1H e ^{13}C , foi observado que se tratava de uma mistura denominada de substância **IV** e **V**.

Em seguida, a fração 28 com 5 mg, apresentou-se como um cristal em formato de agulhas quando visualizado no frasco coletor e apenas uma mancha de coloração roxa quando revelada com anisaldeído. Esta fração, após a análise de RMN de ^1H e de ^{13}C foi denominada de substância **VI** (Tabela 9).

Tabela 9. Sistemas utilizados no fracionamento de 8-10 para o isolamento da substância IV, V presentes na fração 2 e da substância VI presente na fração (28)

Dados do sistema	Frações	
Hexano/DCM 1:1	1	
Hexano/DCM 4:6	2	(substância IV e V)
Hexano/DCM 3:7	3-7	
DCM 100%	8-11	
DCM/Acetona 9:1	12	
DCM/Acetona 8:2	13-15	
DCM/Acetona 7:3	16-22	
DCM/Acetona 6:4	23-26	
DCM/Acetona 1:1	27	
Acetona 100%	28	(substância VI)
Acetona/Metanol 9:1	29	
Acetona/Metanol 7:3	30-31	
Acetona/Metanol 1:1	32	
Metanol 100%	33	

Em seguida a fração 12 com 36 mg, apresentou-se interessante quimicamente e foi refractionada em coluna de sílica aberta com as misturas dos solventes hexano/acetona 9:1 até 100% acetona, acetona/MeOH 9:1, 7:3, 1:1 e 100% MeOH resultando em 38 frações que foram analisadas por CCDC reunidas as que apresentaram semelhanças, a fração 29 a 31 com 5 mg apresentou um grau de pureza em CCDC e também quando revelada com anisaldeído e após análise de RMN de ^1H e ^{13}C , observou-se que se tratava de uma mistura de duas substâncias denominadas de substâncias **VII** e **VIII**. Os detalhes dos fracionamentos de sistemas utilizados podem ser visualizados a seguir (Tabela 10).

Tabela 10. Sistemas utilizados no fracionamento da fração 12 para o isolamentos da substância VII e VIII

Dados do sistema	Frações	
Hexano/acetona 9:1	1-3	
Hexano/acetona 8:2	4-7	
Hexano/acetona 7:3	8-15	
Hexano/acetona 6:4	16-21	
Hexano/acetona 1:1	21-28	
Acetona 100%	29-31	(substância VII e VIII)
Acetona/Metanol 9:1	32	
Acetona/Metanol 7:3	33	
Acetona/Metanol 1:1	34-35	
Metanol 100%	36-38	

O fluxograma a seguir (Figura 18) mostra os detalhes dos fracionamentos e obtenção das substâncias IV, V, VI, VII e VIII.

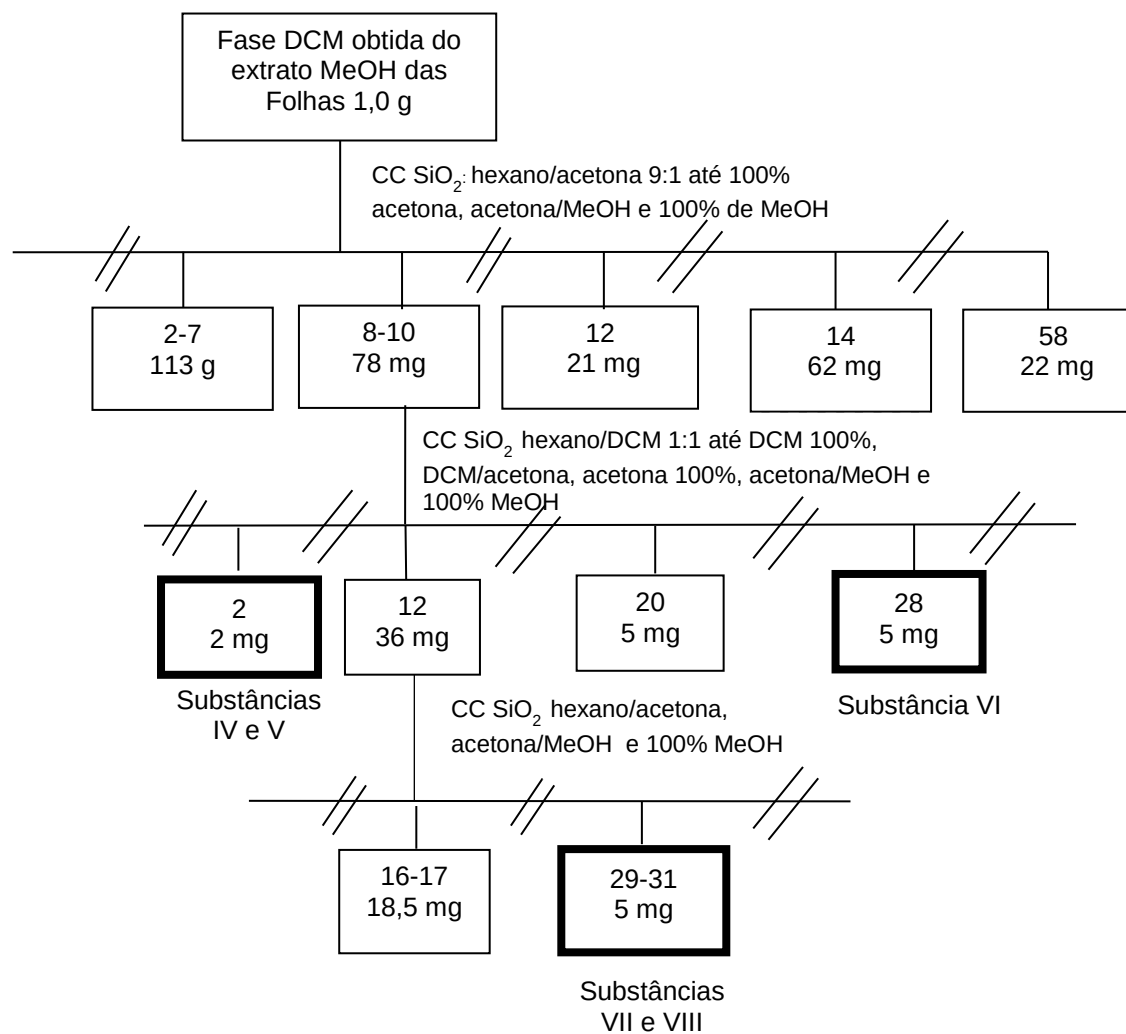


Figura 18: Fluxograma do fracionamento da fase DCM do extrato metanólico e obtenção da substância IV, V, VI, VII e VIII.

4.14 Fracionamento do extrato do hexânico das folhas coletadas no lago do Catalão (Coleta 2)

Após o fracionamento dos extratos da coleta 1, foi realizado o fracionamento dos extratos da coleta 2, iniciando pelo extrato hexânico, com um fracionamento de 1,0 g de extrato bruto em sílica gel -60, com o sistema DCM/AcOEt/MeOH 8:1:1 e depois MeOH 100%, resultando em 120 frações. Todas as frações foram analisadas com os reveladores químicos e físicos, sendo que as que apresentaram semelhança foram reunidas. As frações de 1 a 7, apresentaram cristais em formatos de agulhas e foram reunidas e reveladas com anisaldeído sulfúrico, ao verificar apenas uma mancha na placa de CCDC de coloração roxa foi realizado uma análise de RMN de ^1H onde verificou-se que se tratava da mesma substância identificada na fase DCM da coleta 1, identificada como substância **I**.

Em seguida optou-se em realizar um novo fracionamento da fração (9-10) em sílica gel-60 (1,5 g, 230-400 mesh) com o sistema hexano/DCM 1:1 até DCM 100%, DCM/MeOH 9:1, 7:3, 1:1 e MeOH 100%. Após a reunião das frações semelhantes por análise química, a fração de 1 à 11 foi enviada para análise de RMN de ^1H , e após as análises do espectro de RMN de ^1H , verificou-se que também se tratava da substância **I**. Em seguida realizou-se um novo fracionamento da fração (11-12) por apresentar boa massa, 305 mg, e interessante quimicamente.

Após esse fracionamento e reunião das frações semelhantes que mostraram apenas uma mancha de coloração roxa quando reveladas com anisaldeído sulfúrico, foram comparadas por CCDC com os demais triterpenos isolados e verificou-se que a fração (25-41) era as misturas das substâncias **IV** e **V** e, a fração 76-86 se tratava da substância **I**, ambas confirmadas após análise de RMN de ^1H . Em seguida foi realizado um fracionamento de 13-16, com os sistemas DCM/AcOEt 9:1 até AcOEt 100%, AcOEt/MeOH 9:1, 7:3, 1:1 até MeOH 100%, dessa coluna foram obtidas 65 frações onde a reunião de 18-20 forneceu a substância **I** e a fração (21-25) foi refractionada com sílica usando como eluente AcOEt/acetona 1:1 até acetona 100% e acetona/MeOH 7:3, 1:1 até MeOH 100%, resultando em 22 frações.

A fração 1-5 apresentou-se interessante quimicamente por apresentar apenas uma mancha com uma fraca coloração rosa claro quando revelada no anisaldeído, entretanto quando analisada sob luz UV 365 nm, apresentou um azul fluorescente bem intenso, esta foi enviada para análise de RMN de ^1H e ^{13}C a qual foi denominada de substância **IX**.

A tabela 11, descreve os detalhes da obtenção da substância **IX**.

Tabela 11: Sistemas utilizados no fracionamento de (21-25) para o isolamento da substância IX

Dados do sistema	Frações	
AcOEt/acetona 1:1	1	
AcOEt/acetona 4:6	2-5	(substância IX)
AcOEt/acetona 3:7	6-7	
AcOEt/acetona 2:8	8-11	
AcOEt/acetona 1:9	12-15	
Acetona 100%	16-17	
Acetona/MeOH 7:3	18-19	
Acetona/MeOH 1:1	20-21	
MeOH 100%	21	

A seguir é mostrado o fluxograma com os detalhes do fracionamento e obtenção das substâncias **I**, **IV**, **V** já isoladas no extrato DCM da coleta 1 e a substância **IX** (Figura 19).

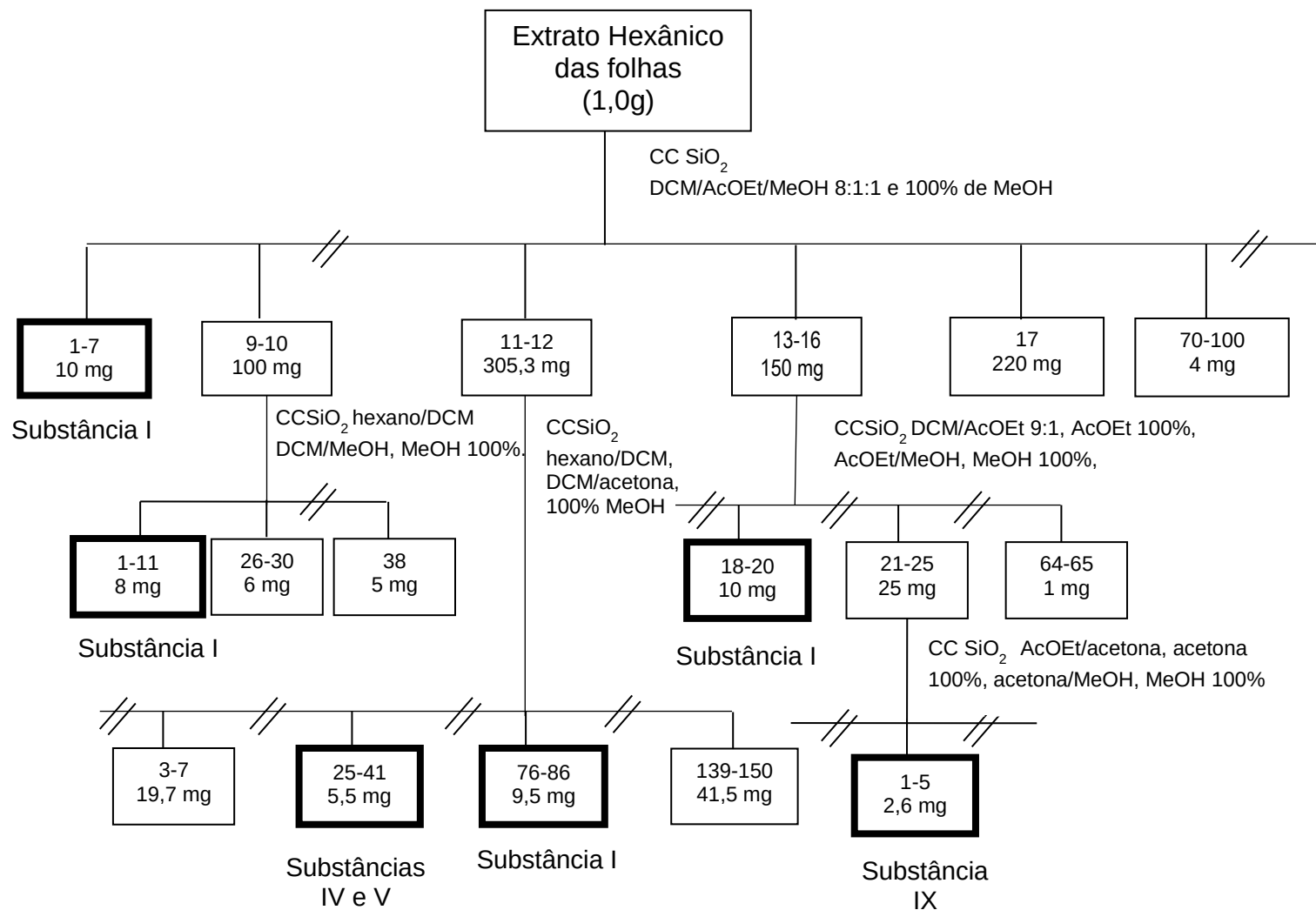


Figura 19: Fluxograma do fracionamento do extrato hexânico e obtenção das substâncias I, IV, V e IX.

4.15 Fracionamento do extrato metanólico das folhas coletadas no Lago do Catalão (Coleta 2)

Após a obtenção de todas as fases (item 4,5), a fase DCM (1,8 g) foi fracionada em coluna de sílica gel 60 (18 g, 230-400 mesh), utilizando como fase móvel hexano/DCM 9:1 até 100% DCM, DCM/MeOH 9:1, 8:2, 7:3, 1:1 e MeOH 100%. Dessa coluna foram obtidas 50 frações, sendo que a fração 16, com 103 mg, foi escolhida para ser fracionada por apresentar-se com coloração verde escura quando revelado com cloreto férrico e poucas manchas presentes. Esta foi fracionada em coluna aberta de sílica gel 60 (1,5 g, 230-400 mesh), com os sistemas DCM/acetona 9:1 até acetona 100%, acetona/MeOH 9:1, 7:3, 1:1 e MeOH 100%, obtendo-se 33 novas frações. Ao fazer a revelação química e física, as frações de 10 a 15 foram reunidas reanalisadas e enviadas para análises de RMN de ^1H , ^{13}C e bidimensionais, que após análise dos dados foi denominada de substância **X**, descrita na tabela 12.

Tabela 12: Sistema utilizado no fracionamento da fração 16 para o isolamento da substância X.

Dados do sistema	Frações
DCM/Acetona 9:1	0
DCM/Acetona 8:2	1-2
DCM/Acetona 7:3	3-5
DCM/Acetona 6:4	6-8
DCM/Acetona 1:1	9-11
DCM/Acetona 4:6	10-15 (substância X)
Acetona 100%	16
Acetona/Metanol 9:1	17-21
Acetona/Metanol 7:3	22-25
Acetona/Metanol 1:1	26-31
Metanol 100%	32-33

Em seguida, escolheu-se a fase AcOEt, 1,7 g, para continuar o fracionamento. Realizou-se uma coluna de sílica com os sistemas DCM/acetona 9:1 até acetona 100%, acetona/MeOH 9:1, 7:3, 1:1 e MeOH 100%, obtendo-se 60 novas frações. A fração 8, foi escolhida para um novo fracionamento por apresentar-se com coloração verde escuro quando revelado com cloreto férrico e apenas algumas manchas. Seu fracionamento foi realizado com o mesmo sistema da fase AcOEt, DCM/acetona e acetona/MeOH, sendo que dessa coluna foram obtidas apenas 31 frações.

A fração 12, apresentou algumas manchas de coloração verde escuro quando revelada com cloreto férrico e por apresentar-se com pouca massa (10 mg) foi realizado uma Cromatografia em Camada Delgada Preparativa – CCDP, com o sistema DCM/acetona 1:1 e volume de 150 mL. Após a obtenção da frações e revelação com cloreto férrico. A fração 3 foi enviada para análise de RMN de ^1H , ^{13}C e bidimensionais, onde foi denominada de substância **XI** (Tabela: 13)

Tabela 13. Condições e sistema usado para o fracionamento de 12 para a obtenção da substância XI

Dados da CCDP	Frações	
DCM/Acetona 1:1	1	
DCM/Acetona 1:1	2	
DCM/Acetona 1:1	3	(substância XI)
DCM/Acetona 1:1	4	
DCM/Acetona 1:1	5	

O fluxograma a seguir (Figura 20), mostra os detalhes do fracionamento e obtenção das substâncias **X** e **XI**.

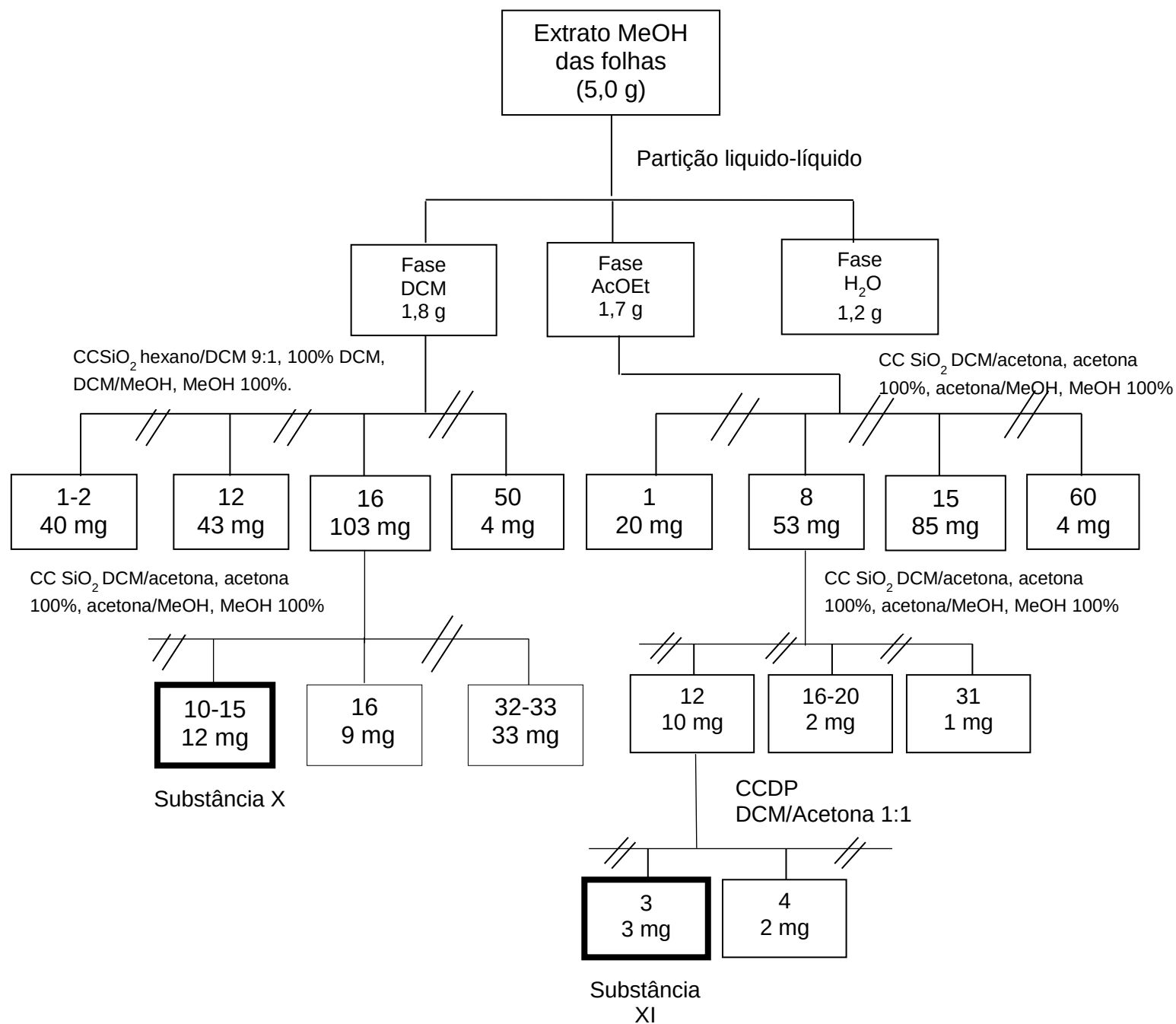


Figura 20: fluxograma do fracionamento do extrato MeOH das folhas de *P. trifoliata*.

4.16 Purificação do triterpeno: 28-Hidroxi-friedelan-3-ona (Canophylol)

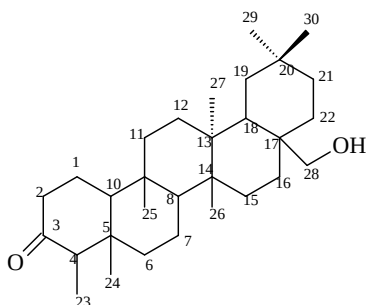


Figura 21: Estrutura química do triterpeno: 28-hidroxi-friedelin-3-ona

A substância 28-Hidroxi-friedelan-3-ona (Figura 21), foi isolada durante o mestrado a partir do extrato DCM da coleta 1, através do fracionamento utilizando coluna cromatográfica de sílica gel ($h = 40\text{ cm}$, $d = 1,8\text{ cm}$) com o sistema de eluição: Hexano/Acetona, Acetona/MeOH até MeOH 100%, que após análises em CCDC, observou-se que a fração 5 apresentava poucas manchas e com RF bem distintos, esta então foi submetida a uma coluna cromatográfica preparativa - CCDP e o triterpeno foi obtido da fração 1 (JEFFREYS, 2011).

Apesar do triterpeno não apresentar um elevado grau de pureza quando observado em CCDC na luz UV 254 e 356 nm, visível e após a revelação com Anisaldeído sulfúrico (Figura 22), foi possível fazer sua identificação através das técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C .

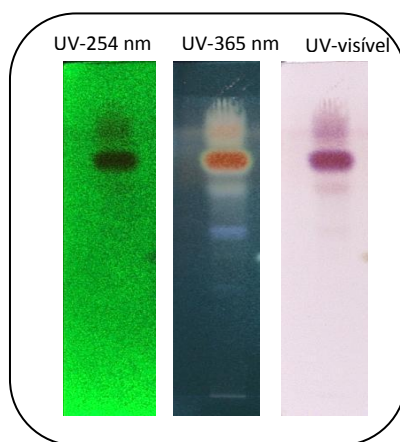


Figura 22: Vizualização de uma mancha roxa com características terpênicas quando reveladas com anisaldeído sulfúrico.

Para avalia-lo biologicamente, ele foi purificado em coluna cromatográfica de Sílica gel 60 (200 mg, 230-400 mesh), com um único sistema de DCM/AcOEt/MeOH 8:1:1, resultando em 8 frações que ao ser analisada com os reveladores físicos (A) e químicos (B), observou-se que as frações de 3 a 5 apresentaram-se com um grau de pureza maior que as demais frações (Figura 23 A e B). Para a visualização, esse triterpeno foi nomeado como substância **XII**.

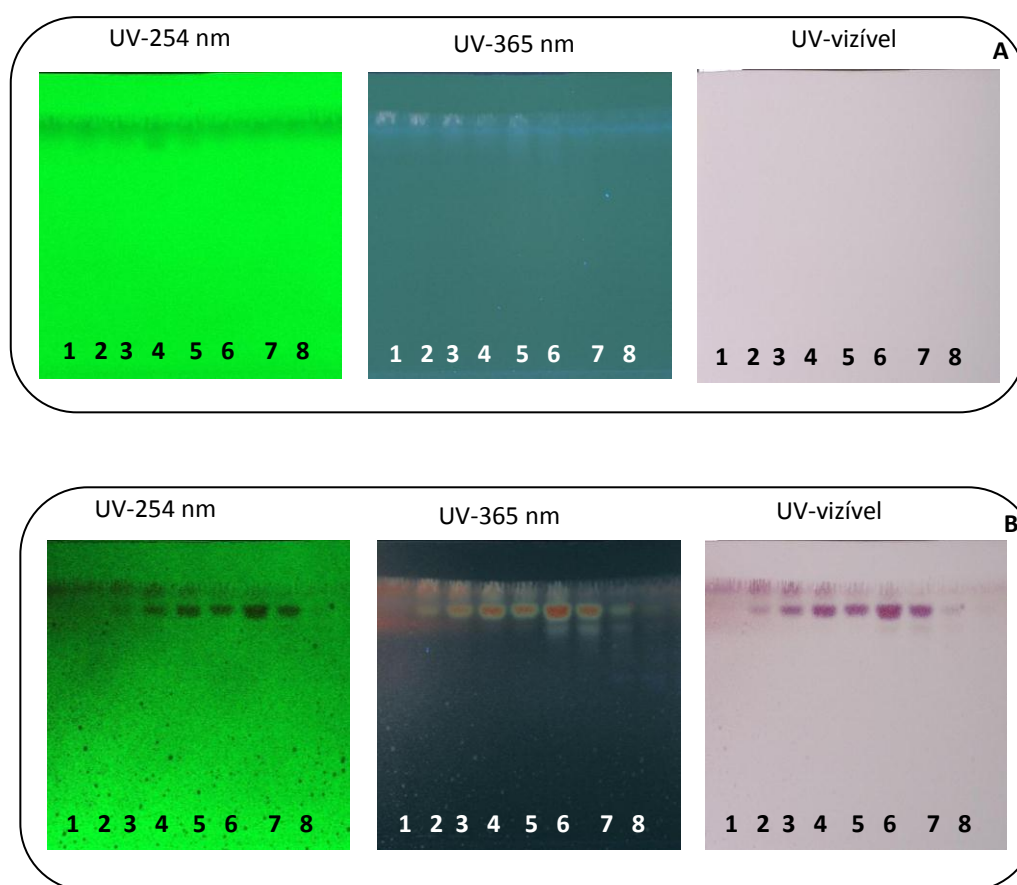


Figura 23: Análise em CCDC da 28-hidroxi-friedelin-3-ona antes (A) e depois (B) de revelar com Anisaldeído sulfúrico.

4.17 Fracionamento da fase DCM obtida do caldo metabólico de *D. hongkongensis* obtido de *P. trifoliata* (Coleta 3)

Após a análise em CCDC das frações obtidas do extrato DCM do micélio do fungo *D. hongkongensis* (Fungo 6), foi iniciado um estudo fitoquímico com a fase DCM obtida do caldo metabólico. Esta fase foi escolhida por apresentar interessantes sinais quando visualizados no espectro de RMN de ^1H (Figura 82).

Para este fracionamento, utilizaram-se 116,0 mg da fase DCM e prepararam-se uma coluna cromatográfica de sílica gel 60, utilizando como fase móvel os sistemas: DCM/acetona 1:1 até acetona 100%, acetona/MeOH 9:1, 7:3, 1:1 e MeOH 100%, obtendo-se 37 novas frações. Ao fazer a revelação química e física, observou-se manchas com coloração roxa, verde e amarela, além de um azul fluorescente observado no UV-365 nm.

A fração 7 apresentou uma massa de 48 mg e manchas bem separadas, foi refracionada com o mesmo sistema anterior resultando em 20 novas frações.

Todas as frações foram analisadas com os reveladores químicos e físicos e reunidas as que apresentaram semelhança. A fração 6-7 com 25 mg, foi escolhida para ser refracionada por apresentar-se com apenas algumas manchas bem separadas visivelmente. Para esta fração utilizou-se como fase estacionária Sílica gel 60-Mesh e como fase móvel os sistemas: hexano/DCM 8:2 até 100% DCM, DCM/MeOH 9:1, 8:2, 7:3, 1:1 e MeOH 100%. Dessa coluna foram obtidas 17 frações, sendo que a fração 2 e 3 foram reunidas por apresentarem apenas uma mancha em CCDC reanalisadas e enviadas para análises de RMN de ^1H , ^{13}C e bidimensionais, que após análise dos dados foi denominada de substância **XII**. A tabela 14 mostram os detalhes desse fracionamento.

Tabela 14. Sistemas utilizados no fracionamento de (6-7) para o isolamento da substância **XIII**, presente na fração 2-3

Dados do sistema	Frações	
Hexano/DCM 1:1	1	
Hexano/DCM 4:6	2-3	(substância XII)
Hexano/DCM 3:7	4-7	
DCM 100%	8-11	
DCM/Acetona 9:1	12	
DCM/Acetona 8:2	13-15	
DCM/Acetona 7:3	16-22	
DCM/Acetona 6:4	23-26	
DCM/Acetona 1:1	27	
Acetona 100%	28	
Acetona/Metanol 9:1	29	
Acetona/Metanol 7:3	30-31	
Acetona/Metanol 1:1	32	

Devido à pouca quantidade de massa e dificuldade de separação preliminar em CCDC não foi possível realizar novos fracionamentos (Figura 24).

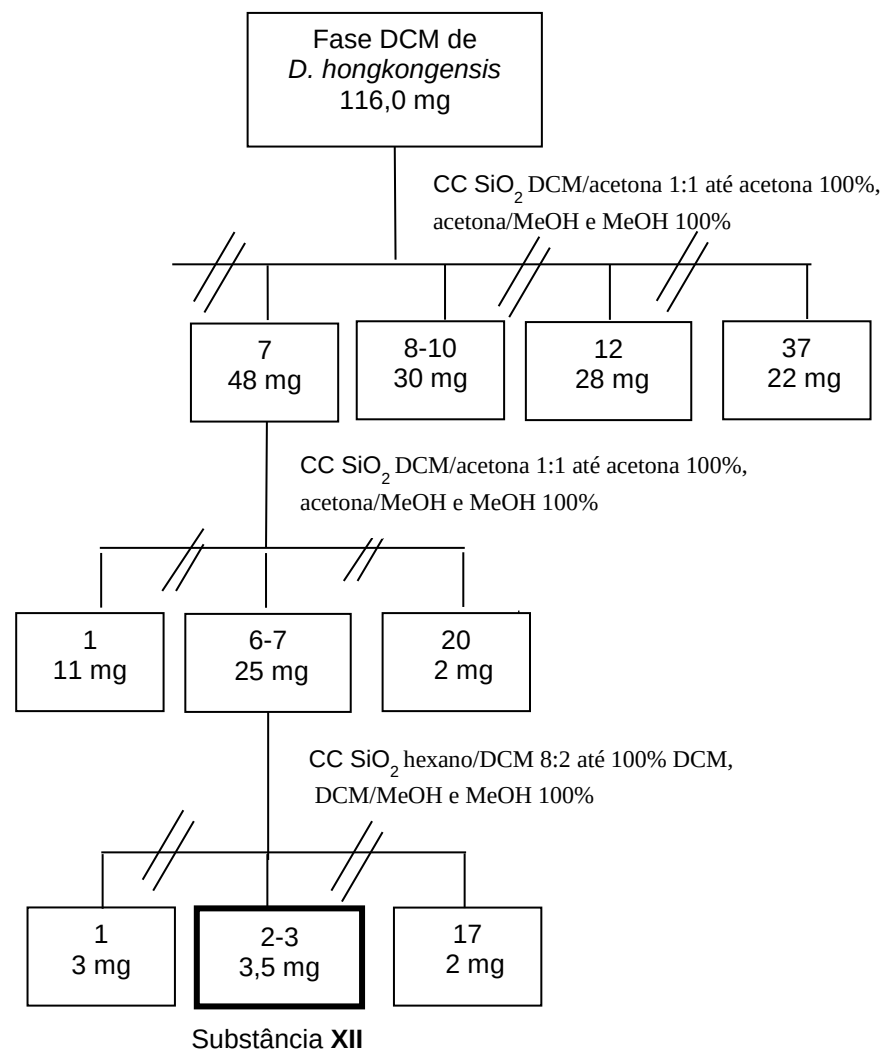


Figura 24: Fluxograma do fracionamento da fase DCM obtida do caldo metabólico com a obtenção da substância XII.

A fase do Acetato de etila (AcOEt) obtida do caldo metabólico desse fungo, não foi fracionada devido apresentar grande similaridade quando comparada com o caldo estéril, caldo sem o fungo endofítico, indicando a baixa produção de metabólitos secundários (Figura 25).

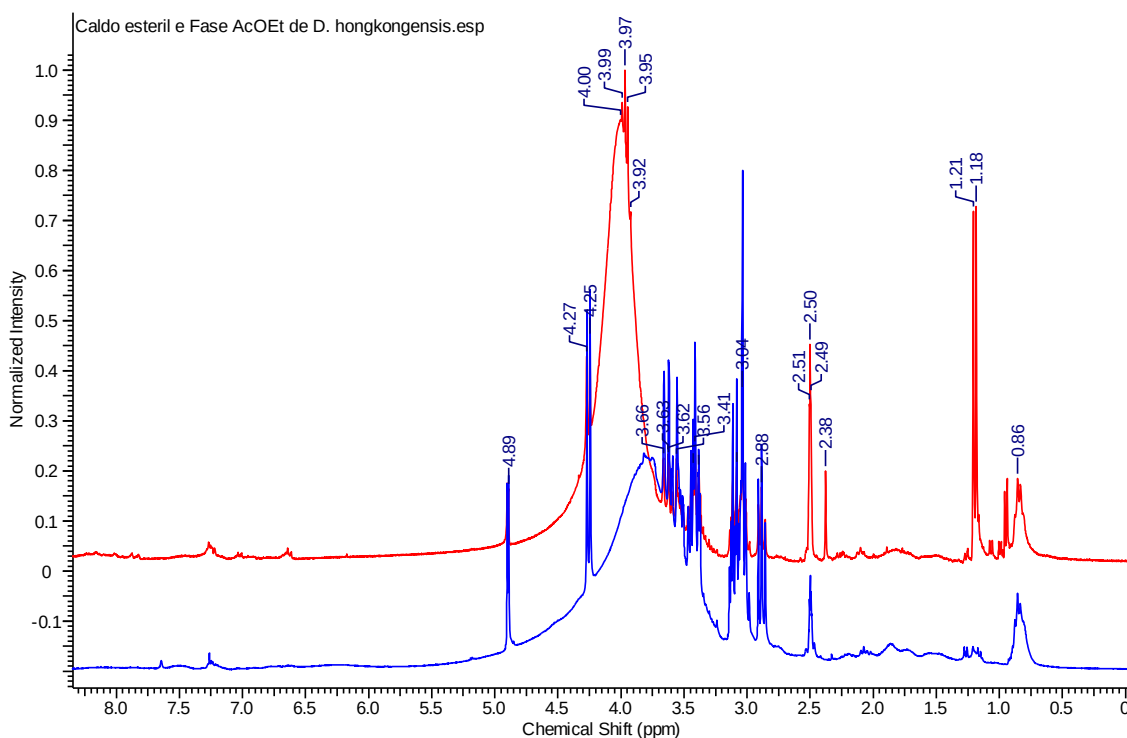


Figura 25: Espectro de RMN de ^1H do caldo estéril e da fase AcOEt do caldo metabólico de *D. hongkongensis*.

4.18 Fracionamento do extrato DCM do micélio de *D. hongkongensis* obtido de *P. trifoliata* (Coleta 3)

O fracionamento do extrato DCM do micélio de *D. hongkongensis*, iniciou-se com uma coluna cromatográfico de sílica gel 60, com o sistema hexano/DCM 9:1 até DCM 100%, DCM/acetona 9:1 até acetona 100%, acetona/MeOH 9:1, 7:3, 1:1 e 100% MeOH, obtendo-se 31 frações.

A fração 10, por apresentar massa significativa (83 mg) e manchas visivelmente separadas, foi escolhida para um novo fracionamento em sílica gel

60, com DCM/acetona 9:1 até acetona 100%, acetona/metanol 9:1, 7:3, 1:1 e MeOH 100%. Desse fracionamento foi possível obter 35 frações, as quais foram todas analisadas em CCDC e reveladas com reveladores físicos e químicos.

Outras frações foram escolhidas para o fracionamento, entretanto, observou-se que todas apresentam pouca massa e grande complexidade de manchas com isso, não foi possível continuar com o fracionamento fitoquímico. A tabela 15, mostra o principal fracionamento realizado, mas no entanto, nenhuma substância foi isolada deste fracionamento (Figura 26).

Tabela 15. Sistema utilizado no principal fracionamento do extrato DCM de *D. hongkongensis*.

Dados do sistema	Frações
DCM/Acetona 9:1	1-3
DCM/Acetona 8:2	4
DCM/Acetona 7:3	5-6
DCM/Acetona 6:4	7-9
DCM/Acetona 1:1	10-15
DCM/Acetona 4:6	16-19
Acetona 100%	20-22
Acetona/Metanol 9:1	23-25
Acetona/Metanol 7:3	26-27
Acetona/Metanol 1:1	28
Metanol 100%	29-35

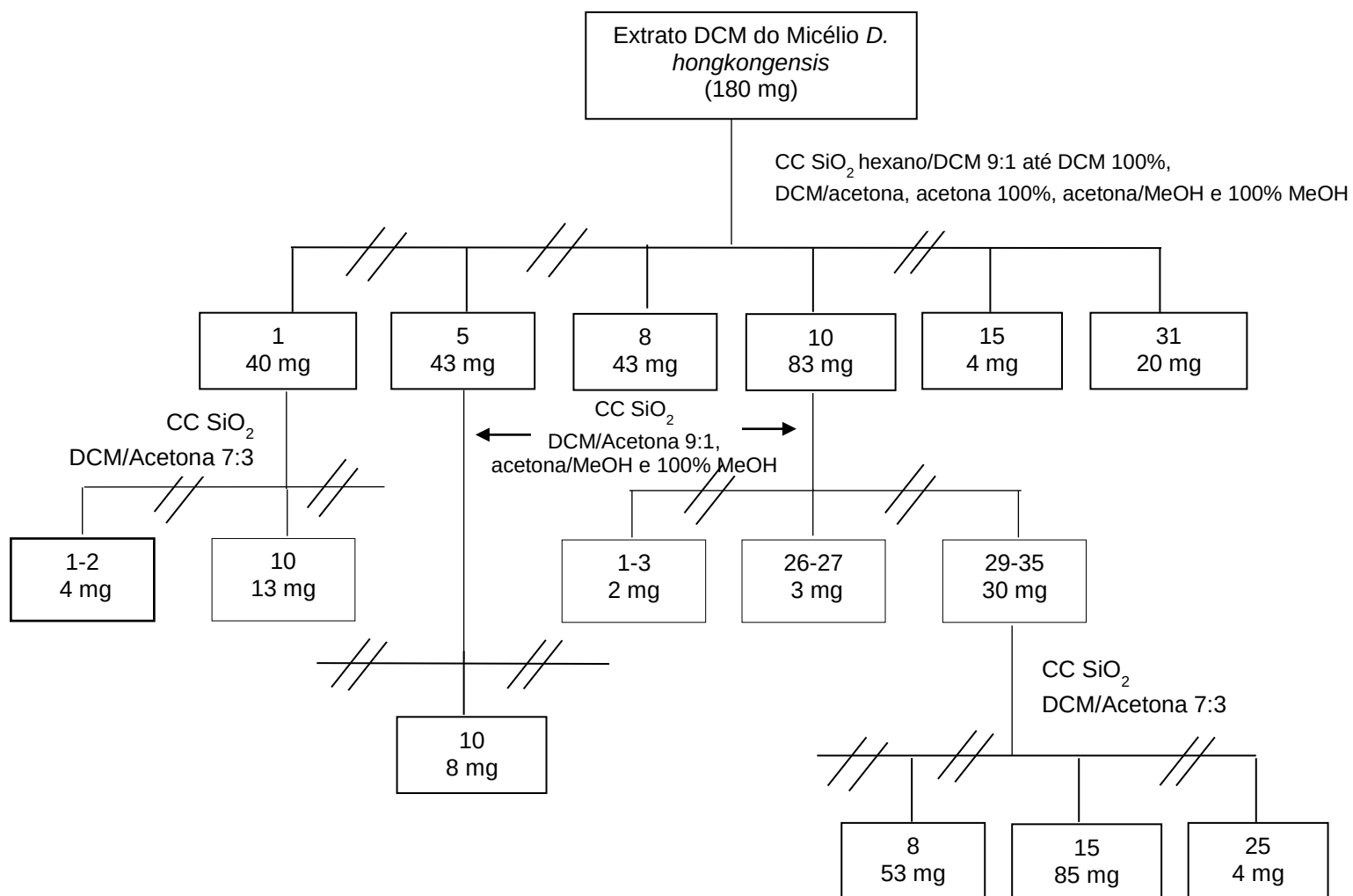


Figura 26: Fluxograma do fracionamento do extrato DCM do micélio.

4.19 Fracionamento do extrato MeOH do micélio de *D. hongkongensis* obtido de *P. trifoliata* (Coleta 3)

Primeiramente foi realizada uma partição líquido-líquido como primeiro fracionamento e em seguida, foram realizadas as análises em CCDC das fases DCM, eluída com DCM/Acetona 1:1, da fase AcOEt eluída com AcOEt/Acetona 1:1 e da fase aquosa, eluída com MeOH 100% e reveladas com os reveladores químicos e físicos para visualização das possíveis classes químicas presentes.

Após o registro dos resultados, a fase DCM (38 mg) foi escolhida para o fracionamento por apresentar manchas com colorações roxas, características de triterpenos, quando reveladas com anisaldeído sulfúrico.

O fracionamento iniciou-se com uma coluna de sílica aberta com os sistemas hexano/DCM 9:1 até 100% DCM, DCM/MeOH 9:1 até DCM/MeOH 1:1 e 100% MeOH, resultando em 21 frações. Reuniram-se as frações que apresentaram semelhanças quando reveladas com os reveladores químicos e físicos. Em seguida, a fração 17 (14 mg), foi escolhida para ser refractionada em coluna de sílica aberta com os sistemas DCM/acetona 9:1 até acetona 100%, acetona/MeOH 9:1, 7:3, 1:1 e 100% MeOH, obtendo-se 13 frações.

Todas as frações foram reveladas com anisaldeído sulfúrico, sulfato cérico, iodo ressublimado, além da luz UV-Visível nos comprimentos de onda 254 nm e 364 nm. Ao final das análises químicas e físicas, observou-se que nenhuma das frações apresentavam elevado grau de pureza, então todas as frações foram guardadas em refrigerador, para posterior fracionamento.

Dando continuidade ao fracionamento, da fase AcOEt (53 mg) foi realizada uma coluna de sílica aberta com os sistemas DCM/AcOEt, AcOEt/acetona, 100% AcOEt, AcOEt/MeOH até AcOEt/MeOH e 100% MeOH, resultando em 45 frações. Em seguida, a fração 7 (17 mg), foi escolhida para ser refractionada por apresentar interessante quimicamente. Então foi realizada uma coluna de sílica aberta com o mesmo sistema anterior obtendo-se 29 novas frações. A fração 29 (6 mg) apresentou-se com um cristal amorfo e foi lavada levemente com acetona, obtendo-se duas frações, a água mãe (2 mg) e a fração 2 (3 mg). Esta última fração, apresentou apenas uma mancha de

coloração amarela esverdeada quando revelada com anisaldeído, que após a análise de RMN de ^1H , bidimensionais e massas, foi denominada de substância **XIII** (Tabela 16). O fluxograma a seguir (Figura 27), mostra os detalhes desse fracionamento.

Tabela 16. Sistema utilizado para o isolamento da substância XIII

Dados do sistema	Frações	
DCM/Acetona 9:1	1-3	
DCM/Acetona 8:2	4	
DCM/Acetona 7:3	5-6	
DCM/Acetona 6:4	7-9	
DCM/Acetona 1:1	10-15	
DCM/Acetona 4:6	16-19	
Acetona 100%	20-22	
Acetona/Metanol 9:1	23-25	
Acetona/Metanol 7:3	26-27	(substância XIII)
Acetona/Metanol 1:1	28	
Metanol 100%	29-35	

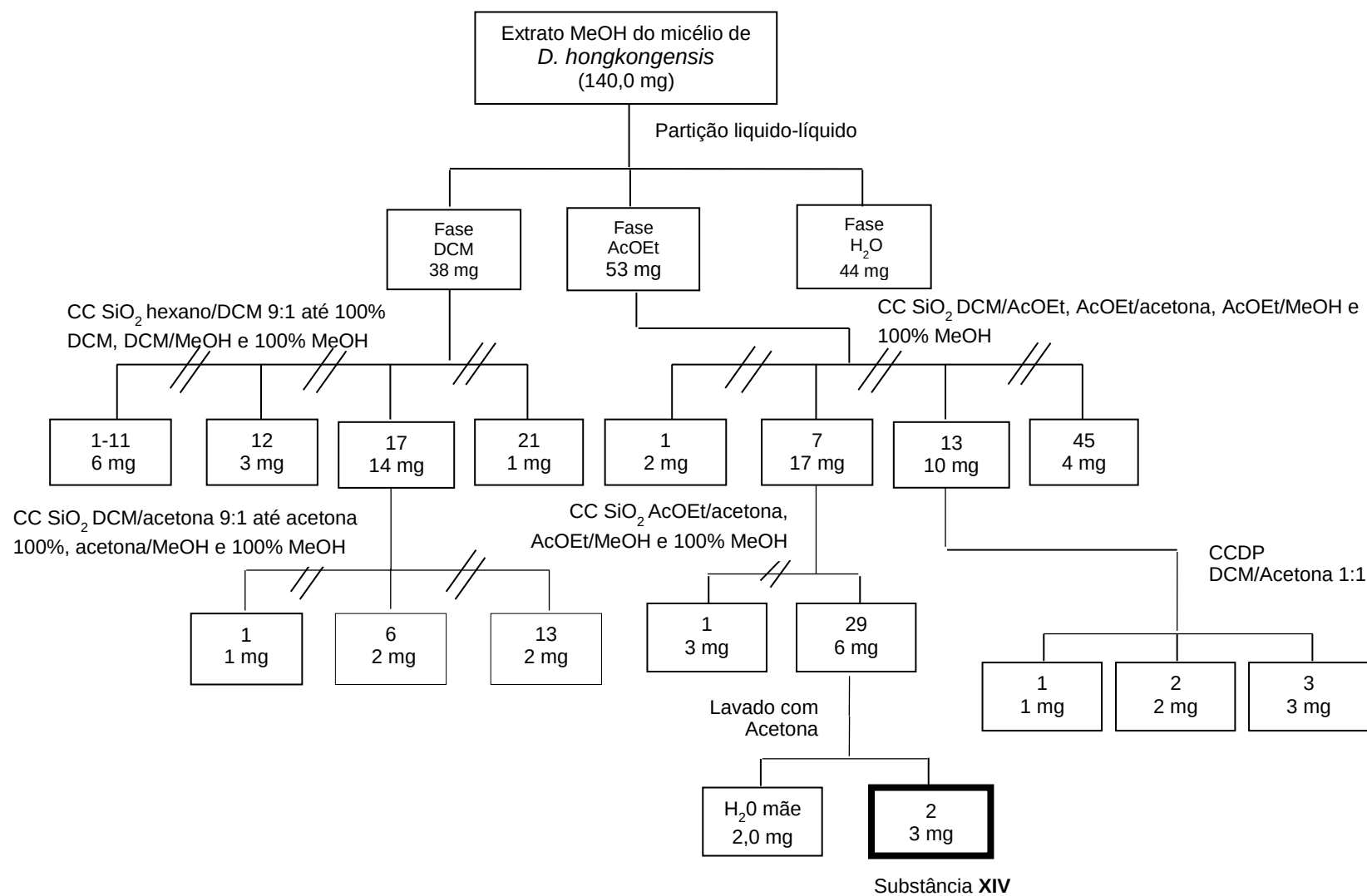


Figura 27: Fluxograma do fracionamento do extrato MeOH do micélio para a obtenção da substância XIV.

4.20 Proposta de nomenclatura para as substâncias inéditas isoladas

Para a proposta da nomenclatura das substâncias inéditas isoladas dos fungos endofíticos, utilizou-se o Software on-line: **ACD/Labs: I-Lab 2.0**; Algorithm Version: v12.1.0.50375, disponível em: ilab.acdlabs.com

4.21 Atividade antioxidante empregando as metodologias de DPPH• e Fe³⁺/Fenantrolina

4.21.1 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• foi utilizada na concentração de 2,8 mg/L. Para a preparação da curva do DPPH• foram adicionados em seis microtubos, 990 µL de DPPH• onde foram completados com 10 µL da solução de ácido ascórbico. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 517 nm após 30 minutos de reação.

Após a verificação da curva de calibração e sua linearidade, foram adicionados 0,5 mg/mL dos extratos nas soluções de DPPH• e suas leituras foram realizadas em espectrofotômetro em dois intervalos de tempo: inicialmente após a adição da solução de DPPH• e após 30 minutos de reação. A variação da absorbância dos extratos será comparada com o ácido ascórbico para a avaliação quantitativa do potencial antioxidante.

4.21.2 Fe³⁺/Fenantrolina

Para o procedimento usando o Fe³⁺/Fenantrolina como agente oxidante, preparou-se a solução padrão de Fe³⁺, pesou-se 8,6341 g de sulfato férrico amoniacal (NH₄Fe(SO₄)₂·12H₂O), solubilizou-se e completou-se para 1L com ácido clorídrico (HCl). Para a preparação da solução de 1,10 – fenantrolina

0,25% (m/v), pesou-se 0,25 g de 1,10 – fenantrolina ($C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$) e solubilizou-se com solução tampão de acetato de sódio, completou-se o volume para 1000 mL.

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

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

4.22 Atividade antibacteriana

4.22.1 Metodologia do poço

As bactérias utilizadas para os testes foram: *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966 T), *Edwardsiella tarda* (ATCC 15947 T), *Flavobacterium columnare* (ATCC 49512) e *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525 T) as quais, causam doenças em peixes e também acometem aos seres humanos. Além dessas, utilizou-se também a *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883 T), *Bacillus cereus* (ATCC 14579 T) e *Nocardia brasiliensis* (ATCC 19296 T) que causam doenças apenas no homem.

A técnica utilizada foi a da cavidade placa, que consiste na metodologia onde o microrganismo-teste é inoculado em placa de Petri contendo o meio de cultura Ágar Müeller-Hinton, onde foram feitas incisões circulares de 6,0 mm de diâmetro para a adição dos extratos de *P. trifoliata* na concentração de 3,0 mg/mL solubilizados em dimetilssulfóxido (DMSO).

Foi utilizado como controle positivo a oxitetraciclina, 125 mg/mL e como controle negativo o DMSO. Em seguida, as placas foram incubadas a uma temperatura de 30 ou 37 °C por um período de 18 a 24 horas que ao final do

período de incubação, foi observado a formação dos halos de inibição de crescimento do diâmetro. Os resultados serão calculados com base no diâmetro de zona de inibição: menor que 0,6 cm baixa atividade, entre 0,7 e 1,3 cm média atividade e maior que 1,4 cm alta atividade (ALVES *et al* 2000).

4.22.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada em triplicata e em meio líquido, através da técnica de microdiluição. Para isto, foram realizadas diluições sucessivas dos extratos, fases e das substâncias variando de 15,6 µg/mL até 1000 µg/mL. Em seguida, 95 µL de cada diluição serão colocados em cada pocinho da placa, juntamente com 5 µL do microrganismo-teste, preparado pela escala de McFarland 0,5.

As placas foram incubadas a temperatura e tempo adequado (Tabela 17). Após esse período, foram inoculado 40 µL de revelador (2,3,5 cloreto de trifeniltetrazóleo) em cada tubo, e estes incubados novamente por 30 minutos. Onde houve crescimento bacteriano, os tubos foram revelados em vermelho, e onde não houve crescimento, os tubos permaneceram incolor.

Tabela 17: Cepas bacterianas utilizadas no ensaio antibacteriano

Microrganismo		T.I *	T.I**
		(horas)	(°C)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 7966 T	24	30
<i>Flavobacterium columnare</i>	ATCC 59512	24	30
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 13525 T	24	30
<i>Edwardsiella tarda</i>	ATCC 15947 T	24	37
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579 T	24	30
<i>Klebsiella pneumoneae</i>	ATCC 13883 T	24	37
<i>Nocardia brasiliensis</i>	ATCC 19296 T	24	30

*Tempo de incubação ** temperatura de incubação

A CIM foi considerada a menor concentração do extrato ou substância onde não houver crescimento bacteriano (onde os tubos permaneceram incolores). O ensaio foi realizado em triplicata.

4.22.3 Concentração Mínima Bactericida (CMB)

Os tubos utilizados para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram utilizados para determinação da CBM. Uma alíquota (100 µL) de cada concentração a partir da CIM foi inoculada em placas de Ágar Müeller-Hinton e posteriormente incubadas em temperatura e tempo adequado. A CBM foi considerada a menor concentração do extrato onde não houve crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado.

4.23 Atividade antimalárica

4.23.1 Preparo das soluções dos extratos analisados

Os ensaios *in vitro* foram realizados pela plataforma de bioensaios da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/Amazônia.

Inicialmente preparou-se uma solução estoque na qual os extratos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) 100% na concentração inicial 10 mg/mL, para melhor solubilização os extratos foram homogeneizados com auxílio de um vórtex. Em seguida prepararam-se as concentrações a serem avaliadas.

4.23.2 Cultura de *Plasmodium falciparum* e preparação do meio de cultura.

Para o cultivo da cepa FRC3, foi utilizado o meio de cultura RPMI 1640 (Sigma), suplementado com 25 mM de HEPES, hipoxantina a 50 mg/L, 2g/L glicose, 50 mg/L de gentamicina (LJUNGSTRÖM et al, 2004). Ao meio RPMI foi adicionado 10% de soro humano AB+ e eritrócitos humanos normais. Em

seguida incubou-se a cultura do parasita por 72 horas em câmara de hipóxia a 37 °C em atmosfera contendo mistura gasosa 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂ (TRAGER & JENSEN, 1976).

4.23.3 Avaliação da Atividade Antimalárica (*in vitro*).

A fim de assegurar a reprodutibilidade do ensaio padronizou-se a parasitemia a 1% e hematócrito a 2% final, e este foi utilizado para todos os testes antimaláricos. Os ensaios foram feitos em placas de 96 poços de fundo chato, com um volume final de 100 µL.

Os testes antimaláricos foram realizados em duas etapas: inicialmente foi realizada uma triagem dos extratos em duas concentrações iniciais, 50 e 12,5 µg/mL. Os extratos que apresentaram atividades nessas concentrações foram submetidos as diluições seriadas, para verificar qual a concentração inibitória (CI₅₀) de 50% desses extratos frente à cepa FRC3. Para a diluição seriada, foram distribuídos 50 µL de RPMI completo em todos os orifícios e acrescidos com 50 µL de extrato nos primeiros orifícios e homogeneizados em seguida, 50 µL foram então retirados transferidos aos orifícios da linha 2 e assim sucessivamente até os orifícios da linha 8 que ao final, 50 µL foram retirados e descartados. Desta forma foram testadas as concentrações de 50 µg/mL a 0,39 µg/mL, em triplicata.

Em seguida, foram adicionados 50 µL de suspensão de eritrócitos infectados por *P. falciparum* (2% hematócrito final e 1% parasitemia) em meio completo. Utilizou-se como controle positivo DMSO 0,5%, visto que esse foi o diluente utilizado nos extratos e como controle negativo, eritrócitos não parasitados sem droga. O crescimento parasitário foi comparado com o controle positivo (ausência de droga), representando 100% de crescimento parasitário. A droga controle utilizada foi a quinino.

Após 72 horas de incubação a 37 °C em atmosfera contendo 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂, procedeu-se à leitura em citômetro de fluxo para determinar a parasitemia.

4.23.4 Verificação da inibição de crescimento por citometria de fluxo.

As leituras foram realizadas na Subunidade Citometria de Fluxo (RPT08J) - FIOCRUZ – Amazônia (ILMD), o citometro de fluxo, FACSCanto II (BD) é um equipamento que detecta através da refração de luz o tamanho e a granulosidade celular. A análise das amostras foi realizada através do software Getting Started with BD FACSDiva™ no qual mediante a detecção da fluorescência produzida juntamente com o ângulo de refração do laser, assim o computador poderá selecionar a área corresponde aos eritrócitos.

Foram realizados testes com corante fluorescente (brometo de etídio) para saber se as amostras menos concentradas emitiam a mesma fluorescência que as amostras mais concentradas, para que na visualização no citometro de fluxo pudessem ser distinguidas as hemácias parasitadas das não parasitadas. Após, foi calculada a inibição do crescimento parasitário no software GraphPad GraphPad Prism 6V de acordo com a fórmula: % Inibição = $100 - \left(\frac{\% \text{Fluorescência amostra} - \% \text{Fluorescência Eritrócitos sadios}}{\% \text{Fluorescência Controle} - \% \text{Fluorescência Eritrócitos sadios}} \right) \times 100$. A IC₅₀ foi calculada através de um gráfico do Log da dose *versus* inibição (expresso em porcentagem em relação ao controle).

5 Resultados e discussão

5.1 Rendimentos dos extratos das folhas de *P. trifoliata*

Os rendimentos foram calculados com base na quantidade do material vegetal obtido e da massa de extrato bruto de cada extrato vegetal. Na primeira coleta, o maior rendimento foi do extrato MeOH com 1,96%, seguido do extrato aquoso com 1,23% e do extrato DCM com 0,76%. Como citado na metodologia a substituição do solvente DCM pelo hexano, o solvente DCM foi utilizado somente em pequenas quantidades, nas confecções de CCDC, CCDP, partições líquido-líquido e colunas cromatográficas. Com isso, no preparo dos extratos da segunda coleta, utilizou-se o Hexano, o qual teve um rendimento de 0,20%, seguido do extrato MeOH com rendimento de 1,42% e do extrato aquoso com 0,86%. Já na terceira coleta, o extrato hexânico obteve 0,28%, o extrato MeOH com 1,19% e o extrato aquoso com 0,81% (Tabela 18).

Tabela 18. Massas dos extratos das folhas obtidas de *Piranhea trifoliata*

Coleta	Região	Solvente	Material vegetal (g)	Massa extrato (g)	Rendimento (%)
1	Altamira	DCM	421,5	3,24	0,76
		MeOH	321,3	6,31	1,96
		H ₂ O	308,2	3,80	1,23
2	L. Catalão	Hexano	534,5	1,12	0,20
		MeOH	517,1	6,23	1,42
		H ₂ O	485,2	4,20	0,86
3	L. Catalão	Hexano	534,5	1,51	0,28
		MeOH	511,9	6,12	1,19
		H ₂ O	480,1	3,89	0,81

O rendimento de ambos extratos hexânicos não foram significativos quando comparados com extrato DCM, devido ao solvente Hexano possuir

menor polaridade (0,06) e o DCM possuir maior polaridade (3,4) tornando-o mais eficiente no processo de extração, por conseguir extrair substâncias com maior amplitude de polaridade.

5.2 Análise fitoquímica dos extratos das folhas de *P. trifoliata*

Os extratos obtidos foram analisados por CCDC usando diferentes sistemas de eluição e reveladores químicos para identificar as possíveis classes químicas. Dentre os sistemas utilizados, as imagens A e B que possuem os extratos DCM das folhas da coleta 1 (1FoD), hexânicos das folhas da coleta 2 (2FoH) e hexânico das folhas da coleta 3 (3FoH) respectivamente (Figura 28), foram eluídas com DCM/AcOEt/MeOH 8:1:1 e reveladas com luz UV 365 nm antes da aplicação do revelador anisaldeído (A) e após a aplicação do revelador anisaldeído sulfúrico e UV- visível (B).

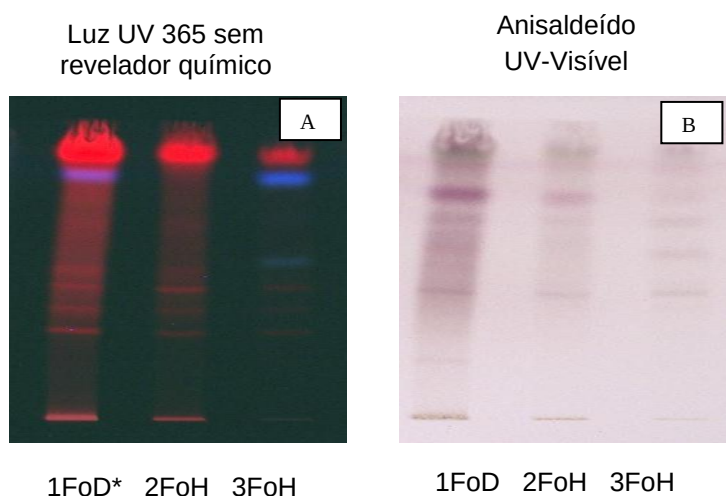


Figura 28: Extratos das folhas das coletas 1, 2 e 3, eluídas com DCM/AcOEt/MeOH 8:1:1 e reveladas com luz UV 365 nm antes da aplicação do revelador anisaldeído (A) e após a aplicação do revelador anisaldeído e UV- visível (B).

Ao observar minuciosamente cada imagem (A e B, Figura 17), foi possível comprovar que os extratos possuem características terpênicas, além de grupos cromóforos presentes nos extratos 1FoD e 3FoH sinalizados pela coloração azul fluorescente, quando visualizado no UV 365 sem o revelador químico (A).

Esses resultados preliminares, mostraram que apesar da espécie ter sido coletada em locais diferentes e extraída com solventes diferentes, os grupos terpênicos mostram-se em maior concentração.

Os extratos metanólicos quando analisados por CCDC, apresentaram rastros com manchas indefinidas e inconclusivas, levando a buscar uma nova metodologia para a separação dessas substâncias. Para isso, realizou-se uma partição líquido-líquido a fim de separar as substâncias presentes em ambos os extratos por ordem crescente de polaridade.

As fases obtidas foram denominadas de 1FoMD (Fase DCM obtida do extrato MeOH das folhas da coleta 1), 2FoMD (Fase DCM obtida do extrato MeOH das folhas da coleta 2) e 3FoMD (Fase DCM obtida do extrato MeOH das folhas da coleta 3). Ao comparar as fases por CCDC, observou-se uma similaridade nas fluorescências visualizadas no UV 354 nm, as quais são características de grupos cromóforos. Ao revelar com anisaldeído, observou-se que as fases revelaram manchas com coloração amarela e verde (Figura 29).

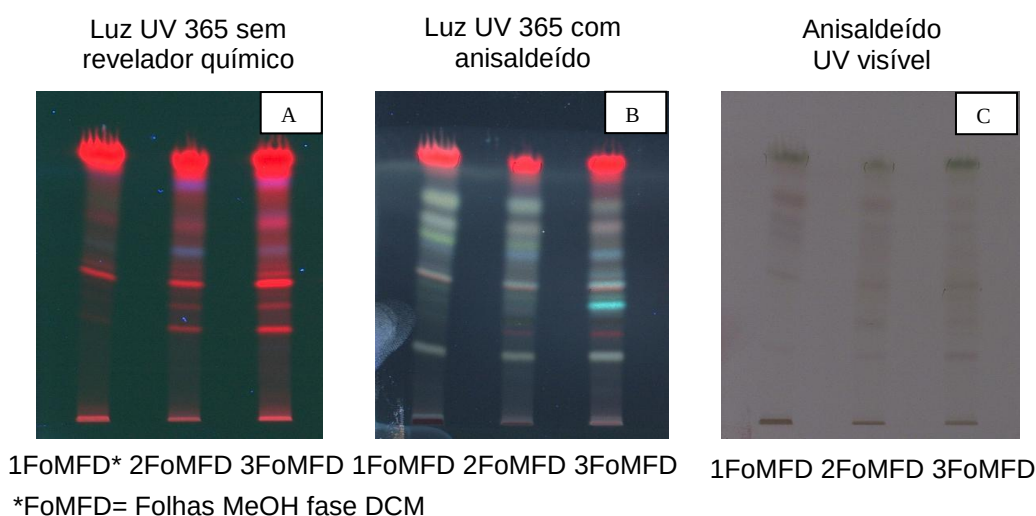


Figura 29: Fases DCM obtidas dos extratos MeOH das folhas das coletas 1, 2 e 3, eluídas com DCM/AcOEt/MeOH 8:1:1 e reveladas com luz UV 365 nm antes da aplicação do revelador anisaldeído (A), após a aplicação do revelador anisaldeído e UV 365 nm (B) e após a revelação (C).

As fases AcOEt denominadas 1FoMA, 2FoMA e 3FoMA obtidas dos extrato MeOH das folhas (Figura 19 A-C), foram eluídas com o sistema DCM/AcOEt/MeOH 8:1:1 e reveladas com anisaldeído sulfúrico e luz UV 365 nm. A fase 1FoMA, apresentou uma forte coloração vermelha fluorescente no UV 365, já a fase 2FoMA apresentou uma forte coloração azul fluorescente

ambas características de grupos cromóforos podendo ser de flavonoides. A fase 3FoMA, apresentou pouca fluorescência na luz UV 365 nm e com coloração amarela características de flavonoides no revelador anisaldeído sulfúrico (Figura 30 A-C).

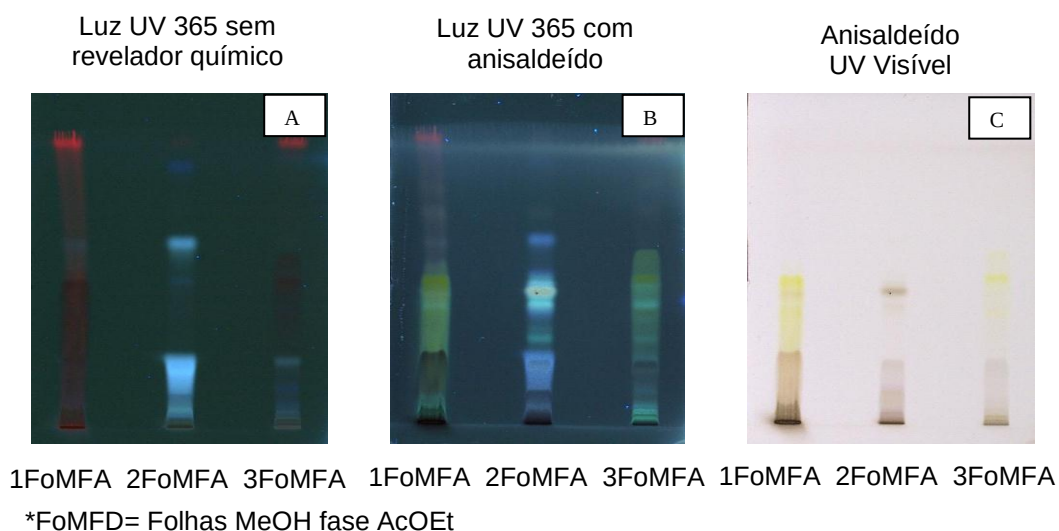
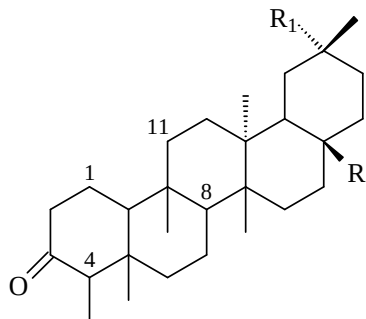
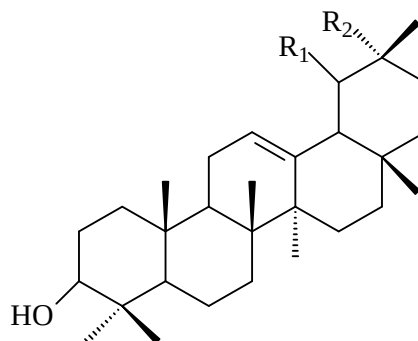


Figura 30: Fases AcOEt obtidas dos extratos MeOH das folhas das coletas 1, 2 e 3, eluídas com DCM/AcOEt/MeOH 8:1:1 e reveladas com luz UV 365 nm antes da aplicação do revelador anisaldeído (A), após a aplicação do revelador anisaldeído e UV 365 nm (B) e após a revelação (C).

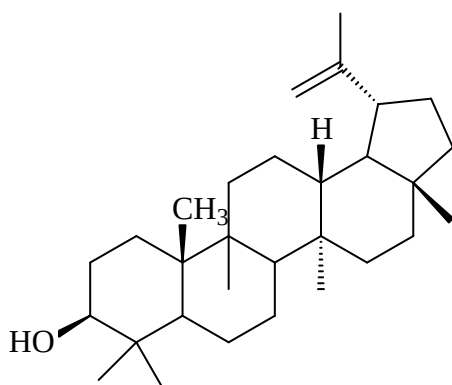
5.3 Determinação estrutural das substâncias isoladas das folhas de *Piranhea trifoliata*.



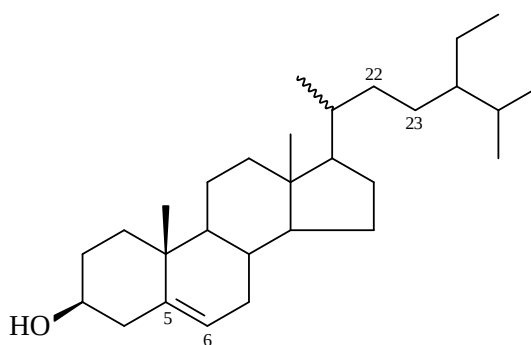
- 1:** R = CH₃; R₁ = CH₃ = Friedelan-3-ona
2: R = OH; R₁ = CH₃ = 30-Hidroxi-friedelan-3-ona
12: R = CH₂OH; R₁ = CH₃ = Canophyllol



- 3:** R₁ = CH₃; R₂ = H = α - Amirina
4: R₁ = H; R₂ = CH₃ = β -Amirina

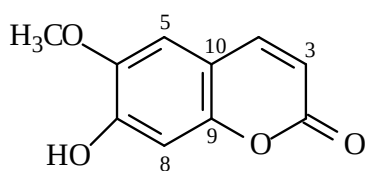


5: Lupeol

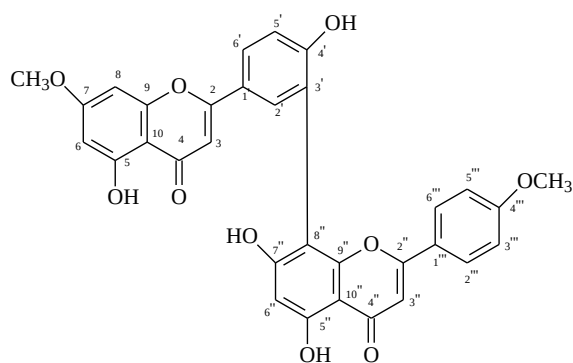


6: Estigmaterol

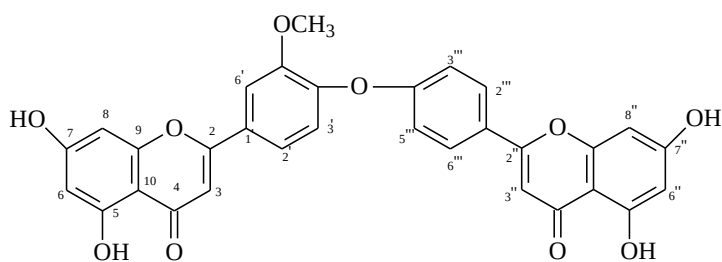
7: Δ^{22} = β -sitosterol



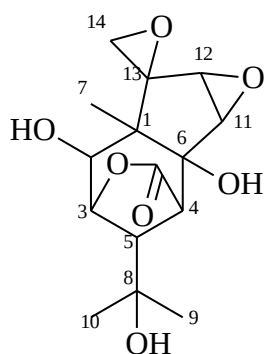
8: 7-Hidroxi-6-metoxicumarina



9: 7,4''' Dimetilamentoflavona



10: 3-O-Loniflavona



11: Hidroxicoriatina

Figura 31: Substâncias isoladas das folhas de *P. trifoliata*.

5.3.1 Substância I: Friedelan-3-ona

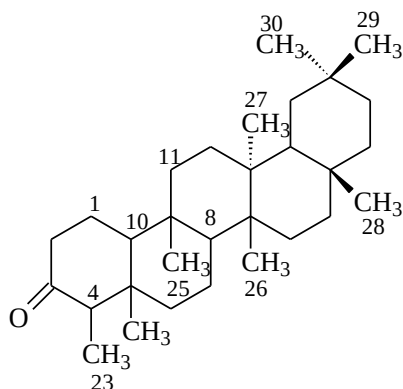


Figura 32: Estrutura do triterpeno friedelan-3-ona (I).

A substância **I** (Figura 32), foi isolada do extrato DCM das folhas, após a reunião das frações 2 a 8. Ela apresenta-se como um sólido amorfo branco, foi eluída com o sistema DCM/Acetona 9:1 com R_f de 2,6 cm e apresentou a cor amarela quando revelada com Anisaldeído sulfúrico. O espectro de RMN de ^1H da substância **1** (Figura 33) registrou sete singletos em δ_H 0,74, 0,88, 0,90, 1,01, 1,02, 1,06, 1,19 relativos a sete grupos metila e um dubleto ($J = 6,0$ Hz) em δ_H 0,88, correspondente à metila C-23 característica do esqueleto friedelano. O espectro apresentou a ausência de ligação dupla na região entre δ_H 4,6 e 6,0 ppm. Foi observado um multipletto entre δ_H 2,23 e 2,40 ppm, indicando a presença de três hidrogênios α -carbonílicos, além de sinais entre δ_H 1,27 a 1,58 ppm, indicando a presença de hidrogênios metilênicos e metínicos na molécula.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 34) apresentou trinta sinais. O sinal em 213,0 ppm, indicou que a molécula possui uma carbonila em C-3. O sinal em 6,8 ppm, indicou a presença de um grupo metílico bastante protegido e característico do esqueleto friedelano. Ao realizar a comparação dos dados espectrais com os da literatura (MAHATO e KUNDU, 1994), verificou-se que a substância se tratava do triterpeno friedelan-3-ona (Tabela 12), vale ressaltar que esta substância já havia sido isolada dos galhos (PEDROZA, 2014).

Tabela 19: Dados de RMN de ^{13}C da Friedelan-3-ona [300 MHz, CDCl_3 , Δ (ppm)]

Posição	δc Observado	δc Literatura	Carbono
1	22,3	22,3	CH_2
2	41,5	41,5	CH_2
3	213,2	213,2	C
4	58,2	58,3	CH
5	42,1	42,1	C
6	41,3	41,3	CH_2
7	18,2	18,2	CH_2
8	53,1	53,1	CH
9	37,4	37,4	C
10	59,4	59,4	CH
11	35,6	35,6	CH_2
12	30,5	30,5	CH_2
13	39,7	39,7	C
14	38,3	38,3	C
15	32,4	32,4	CH_2
16	36,0	36,0	CH_2
17	30,0	30,0	C
18	42,7	42,8	CH
19	35,3	35,3	CH_2
20	28,1	28,1	C
21	32,7	32,7	CH_2
22	39,2	39,2	CH_2
23	6,8	6,8	CH_3
24	14,6	14,6	CH_3
25	17,9	17,9	CH_3
26	20,2	20,2	CH_3
27	18,6	18,6	CH_3
28	32,1	32,1	CH_3
29	35,0	35,0	CH_3
30	31,7	31,8	CH_2

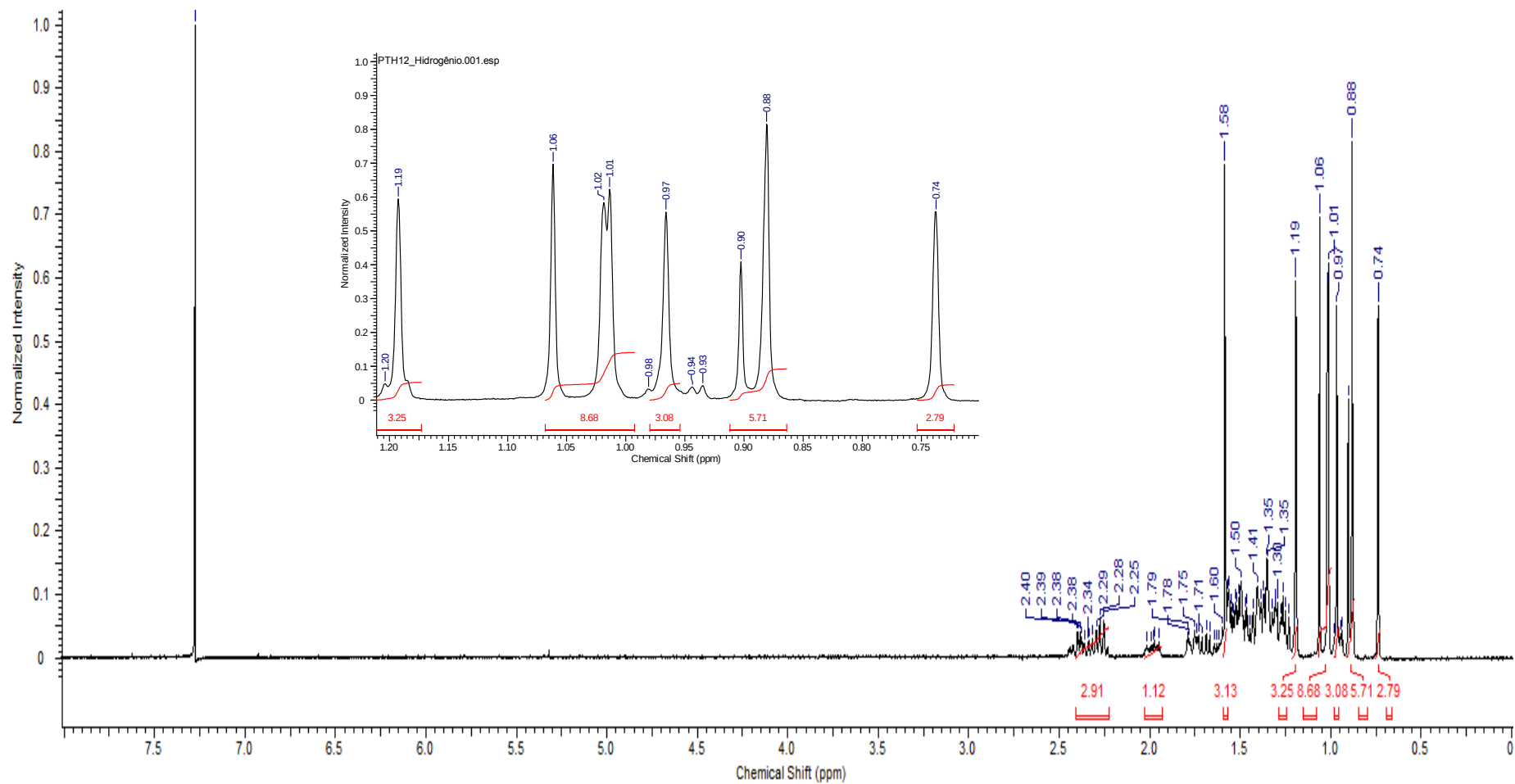


Figura 33: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da friedelan-3-ona

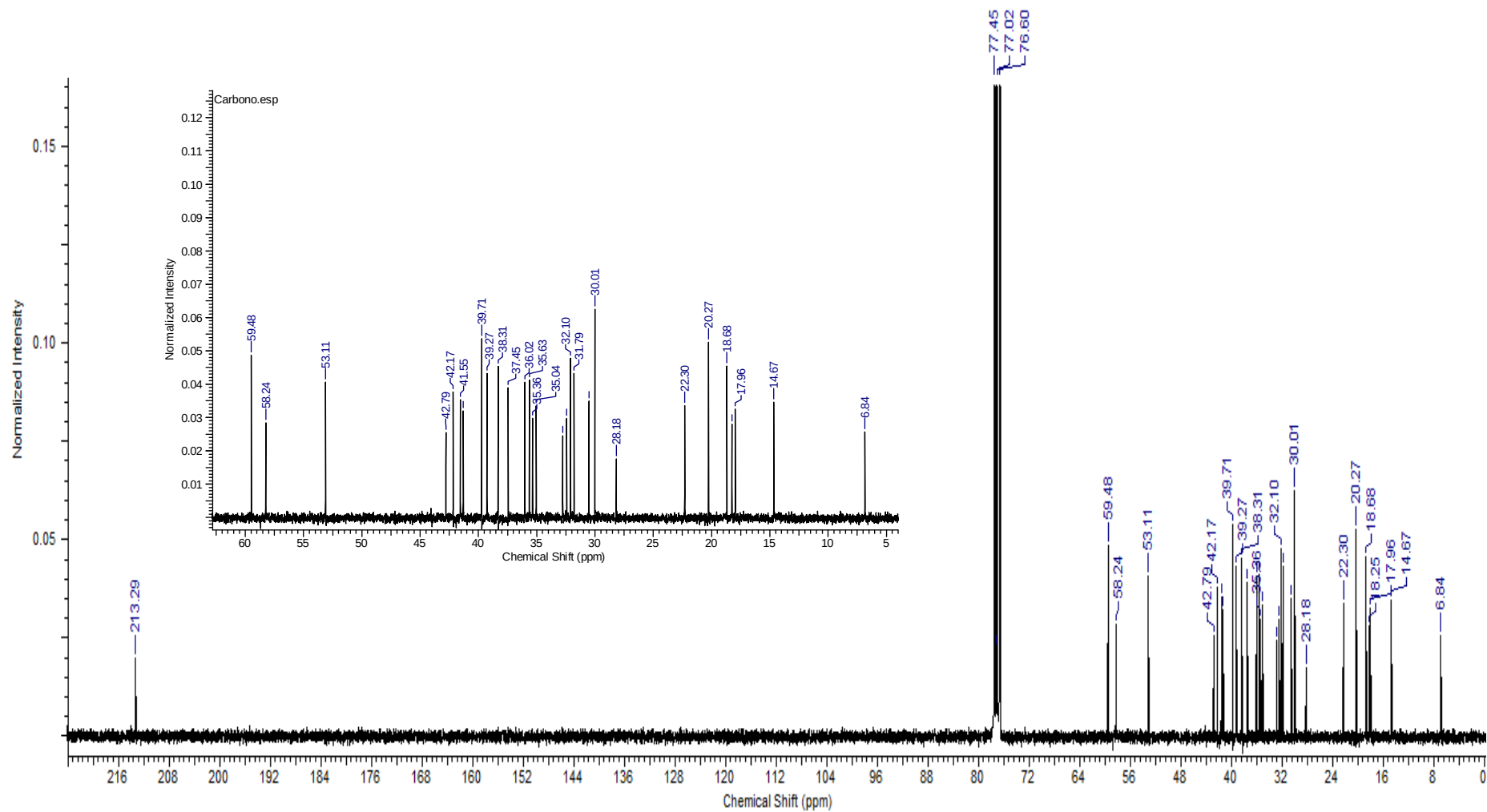


Figura 34: Espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) da Friedelan-3-ona

5.3.2 Substância II: 30-hidroxi-friedelan-3-ona

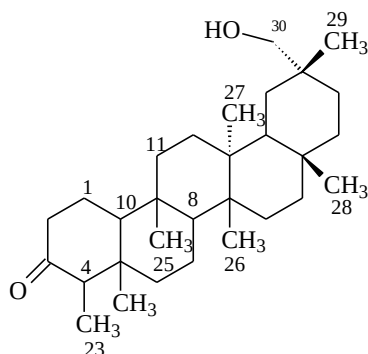


Figura 35: Estrutura do triterpeno 30-hidroxi-friedelan-3-ona (II).

A substância (Figura 35) apresentou-se com R_f de 2,9 cm e como um sólido branco amorfo, foi eluída com o sistema DCM/Acetona 6:4 e apresentou cor roxa quando revelada com Anisaldeído.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 36) é um espectro característico de triterpeno de esqueleto friedelano, pois quando comparado com a friedelan-3-ona, substância I, foram observados os mesmos sinais de metilas entre δ_H 0,7 a 1,27, além de um dubleto em δ_H 0,89 (3H, $J = 6,0$ Hz), característico da metila C-23 da friedelan-3-ona. No entanto, foram observados ainda um dubleto em δ_H 3,37 (1H, d, $J = 10,4$ Hz) e outro em δ_H 3,45 (1H, d, $J = 10,8$ Hz) que estão relacionados a átomos de hidrogênio em carbono oxigenado.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 37), mostrou a presença de trinta átomos de carbonos. Dentre eles podemos destacar as setes metilas em δ_C 6,8, 14,6, 18,2, 18,5, 19,9, 32,1, 28,9, vale ressaltar que o sinal em δ_C 6,8 foi observado também na substância I o qual é característico de esqueleto friedelano atribuído a metila C-23 e também foi observado a carbonila em 213,1 ppm, similar a substância I. No entanto, neste espectro há um sinal em δ_C 71,9 que foi atribuído ao carbono metilênico ligado ao grupo OH (Tabela 13). O espectro bidimensional HSQC confirmou que os sinais em δ_C 3,37 e 3,45 estão ligados ao carbono C-30, portanto, a hidroxila foi posicionada neste carbono (Figura 38 e 39). O espectro de HMBC confirma as correlações (Figura 40). Ao realizar a comparação dos dados da literatura (MAHATO e KUNDU, 1994), verificou-se que a substância se tratava da 30-hidroxi-friedelan-3-ona.

Tabela 20: Dados de RMN de ^{13}C da 30-hidroxi-friedelan-3-ona [300 MHz, CDCl_3 , Δ (ppm)]

Posição	δ_c Observado	δ_c Literatura	Carbono
1	22,2	22,3	CH_2
2	41,5	41,6	CH_2
3	213,1	212,9	C
4	58,2	58,3	CH
5	42,1	42,5	C
6	41,1	41,4	CH_2
7	18,2	18,3	CH_2
8	53,0	53,1	CH
9	37,4	37,5	C
10	59,5	59,1	CH
11	35,9	35,7	CH_2
12	29,3	29,4	CH_2
13	39,6	39,4	C
14	38,1	38,2	C
15	32,1	32,2	CH_2
16	29,7	29,7	CH_2
17	30,0	30,1	C
18	42,7	42,9	CH
19	30,5	30,6	CH_2
20	33,0	33,5	C
21	28,1	28,3	CH_2
22	39,8	39,9	CH_2
23	6,8	6,8	CH_3
24	14,6	14,7	CH_3
25	18,2	18,0	CH_3
26	18,5	18,6	CH_3
27	19,9	20,0	CH_3
28	32,1	32,2	CH_3
29	28,9	29,0	CH_3
30	71,9	71,8	CH_2

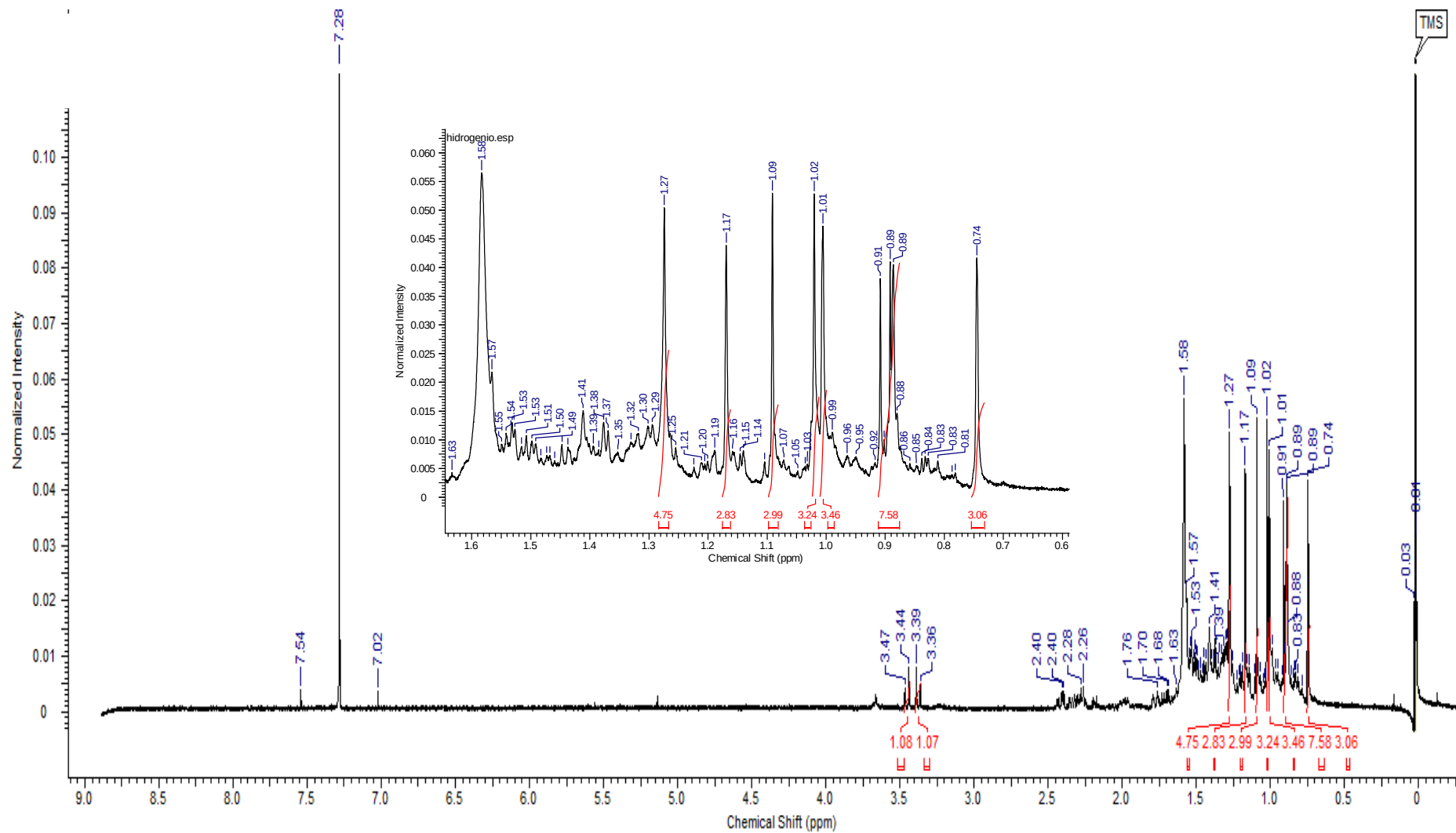


Figura 36: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da 30-hidroxi-friedelan-3-ona.

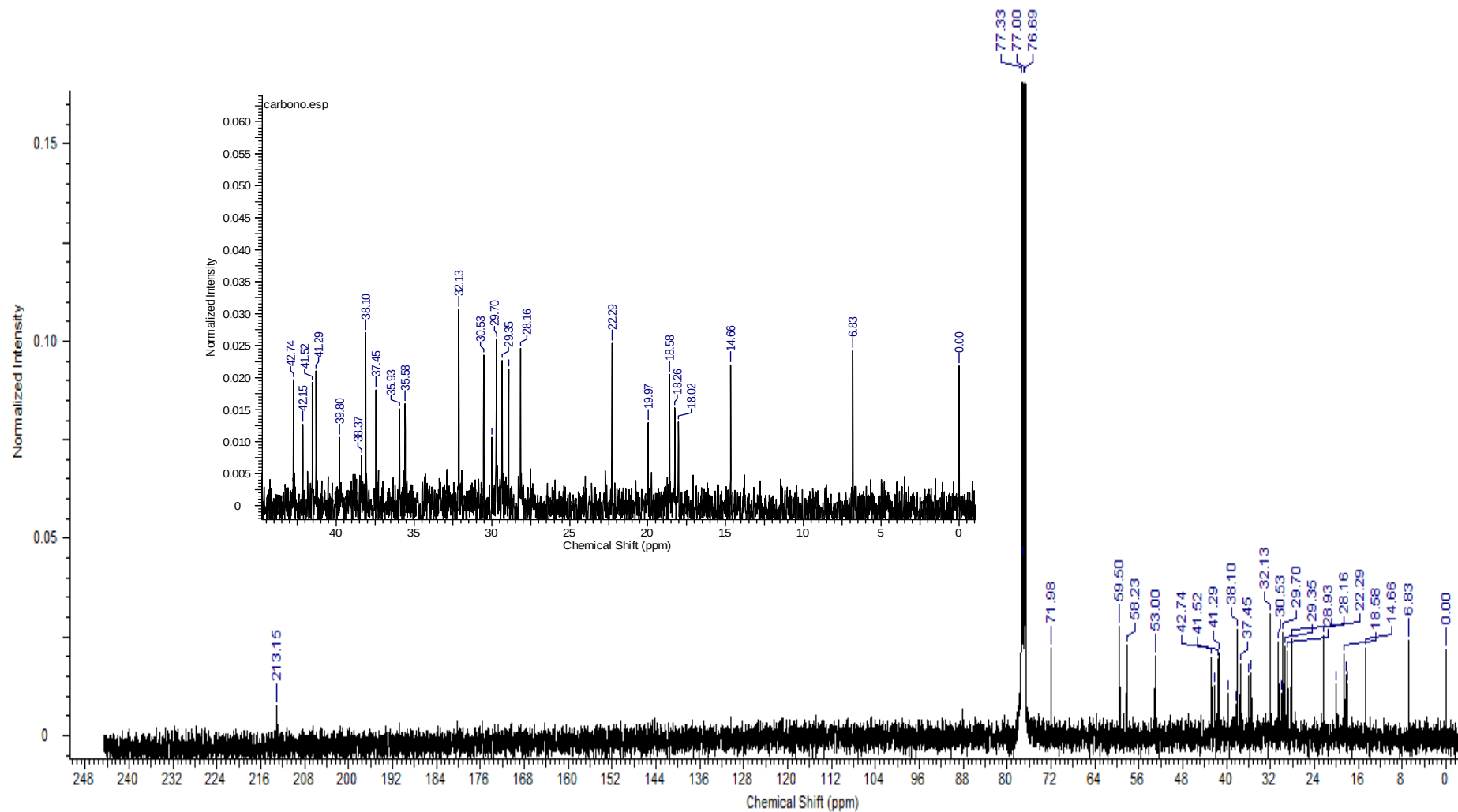


Figura 37: Espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) da 30-hidroxi-friedelan-3-ona.

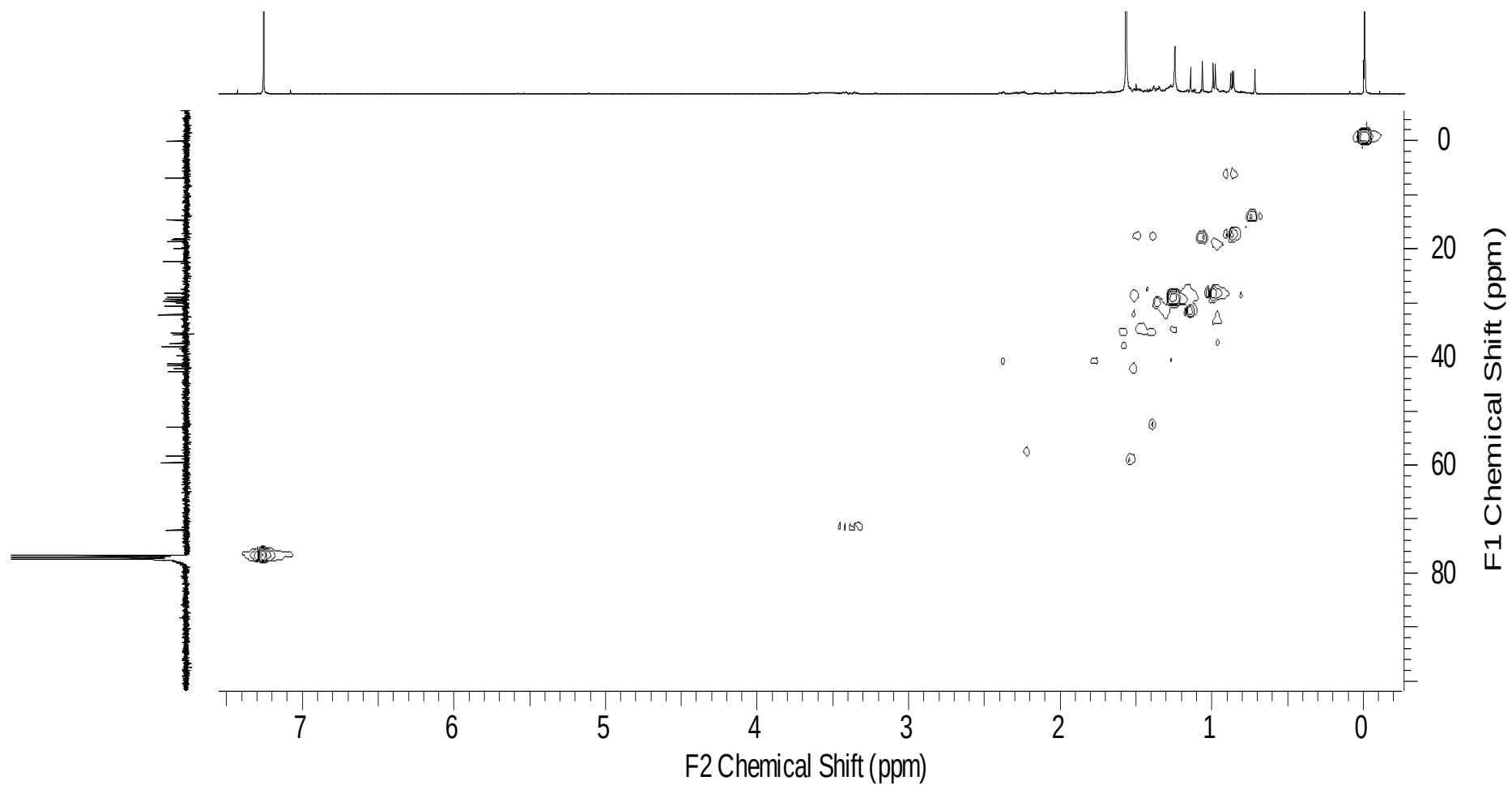


Figura 38: Mapa de contorno HSQC (300 MHz, CDCl₃) da 30-hidroxi-friedela 3-ona.

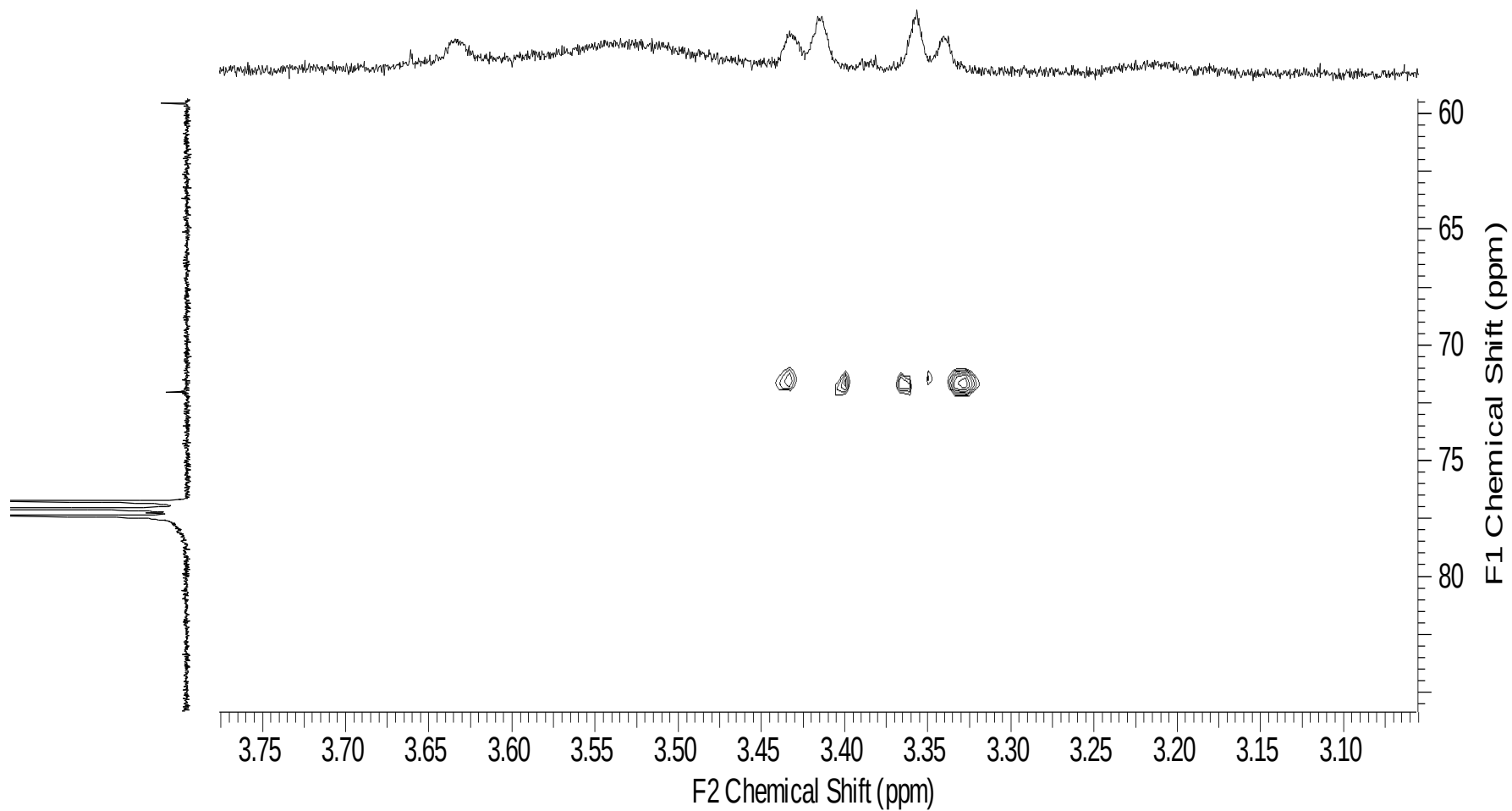


Figura 39: Expansão do mapa de contorno HSQC (300 MHz, CDCl₃) da 30-hidroxi-friedela 3-ona.

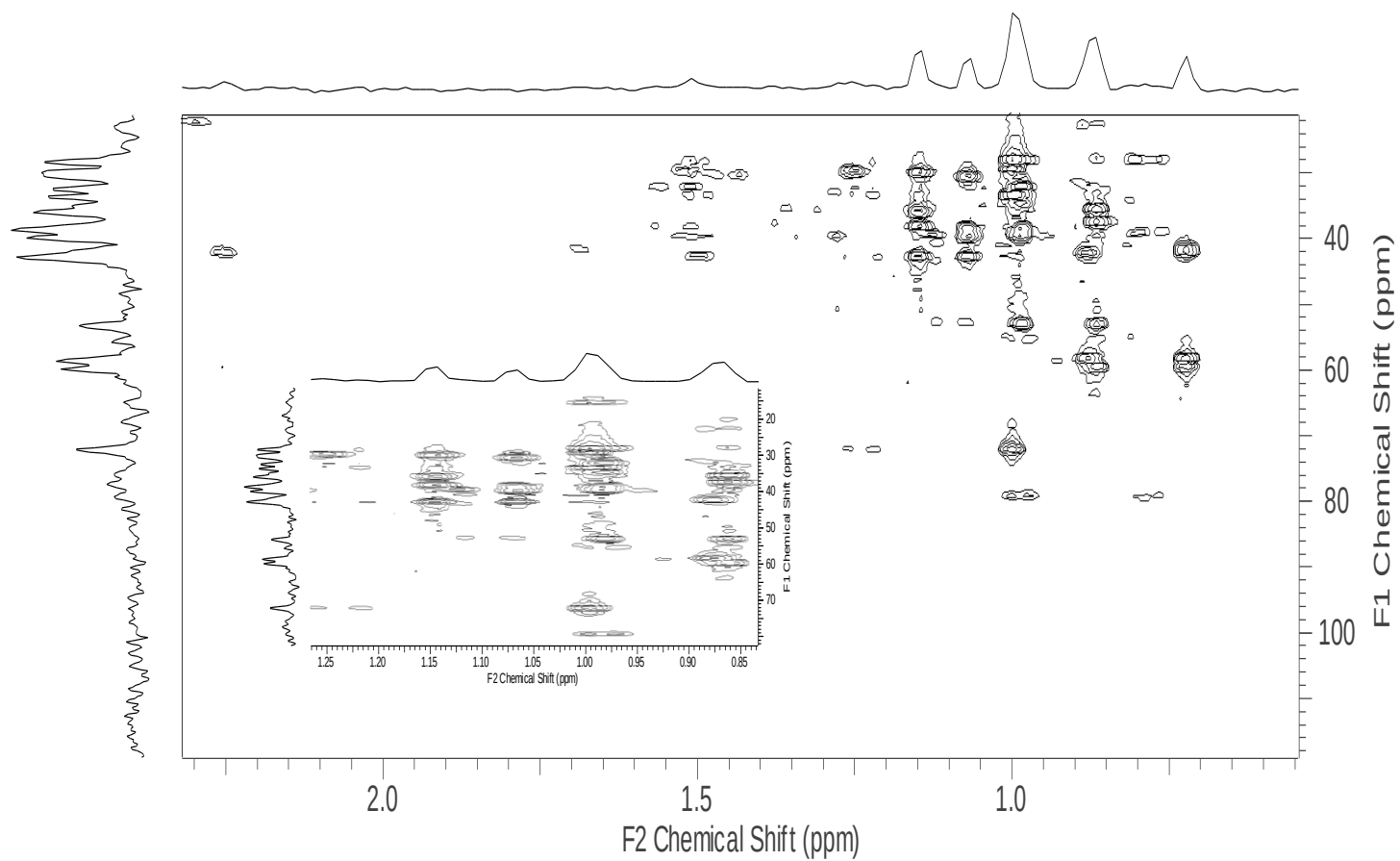


Figura 40: Mapa de contorno HMBC (300 MHz, CDCl₃) da 30-hidroxi-friedela 3-ona.

5.3.3 Substância III: Lupeol

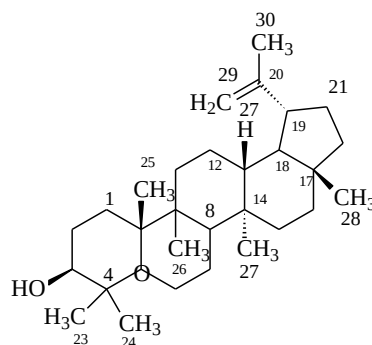


Figura 41: Estrutura do triterpeno Lupeol (III).

A substância III (Figura 41), apresentou-se como um sólido branco em formato de agulhas com R_f de 2,3 cm e coloração roxa quando revelado com anisaldeído sulfúrico. Seu espectro de RMN de ^1H apresentou seis singletos em δ_H 0,76, 0,79, 0,83, 0,95, 0,97 e 1,03, característicos de hidrogênios de metila (Figura 42). Foi observado ainda, outro singlete em δ_H 1,68 indicativo de hidrogênios de metilas ligado ao carbono insaturado. Outros sinais em destaque são um dubleto em δ_H 4,69 (1H, d, $J = 2,4$ Hz) e um quinteto em δ_H 4,57 (1H, qt, $J = 2,4$ Hz) referentes aos hidrogênios vinílicos H-29 da ligação dupla terminal característico do lupeol além de um multiplete em δ_H 3,19 (1H, m) relativo ao hidrogênio carbinólico H-3.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 43) apresentou 30 sinais que permitiu identificar a presença de sete carbonos metílicos, onze metilênicos e seis metínicos. Um sinal em δ_C 79,04 sugeriu a ocorrência de carbono metínico oxigenado, o sinal em δ_C 151,0 foi atribuído ao carbono quaternário C-20 e em δ_C 109,34 foi atribuído ao carbono terminal C-29. Assim, os dados de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C , quando comparados com dados descritos na literatura (MAHATO & KUNDU, 1994) sugeriram que a substância tratava-se do triterpeno lupeol (Tabela 21).

Estudos biológicos realizados nos últimos 3 anos, mostraram que esta substância possui atividade contra doenças intestinais (LEE *et al*, 2016), catarata (ASHA *et al*, 2016), anti-inflamatória (SÁNCHEZ-BURGOS *et al*, 2015) e anti-câncer (SIVEEN *et al*, 2014).

Tabela 21: Dados de RMN de ^{13}C [300 MHz, CDCl_3 , Δ (ppm)] do lupeol

Posição	δc Observado	δc Literatura	Carbono
1	38,7	38,7	CH_2
2	27,4	27,4	CH_2
3	79,0	79,0	CH
4	38,7	38,8	C
5	55,3	55,3	CH
6	18,3	18,3	CH_2
7	34,3	34,3	CH_2
8	40,9	40,8	C
9	50,5	50,4	CH
10	37,2	37,1	C
11	20,9	20,9	CH_2
12	25,2	25,1	CH_2
13	38,1	38,1	CH
14	42,8	42,8	C
15	27,4	27,4	CH_2
16	35,6	35,6	CH_2
17	42,8	42,9	C
18	48,3	48,3	CH
19	48,0	47,9	CH
20	151,0	150,9	C
21	29,9	29,8	CH_2
22	40,0	39,9	CH_2
23	28,0	27,9	CH_3
24	15,3	15,4	CH_3
25	16,1	16,1	CH_3
26	16,0	15,9	CH_3
27	14,6	14,5	CH_3
28	18,0	17,9	CH_3
29	109,3	109,3	CH_2
30	19,3	19,3	CH_3

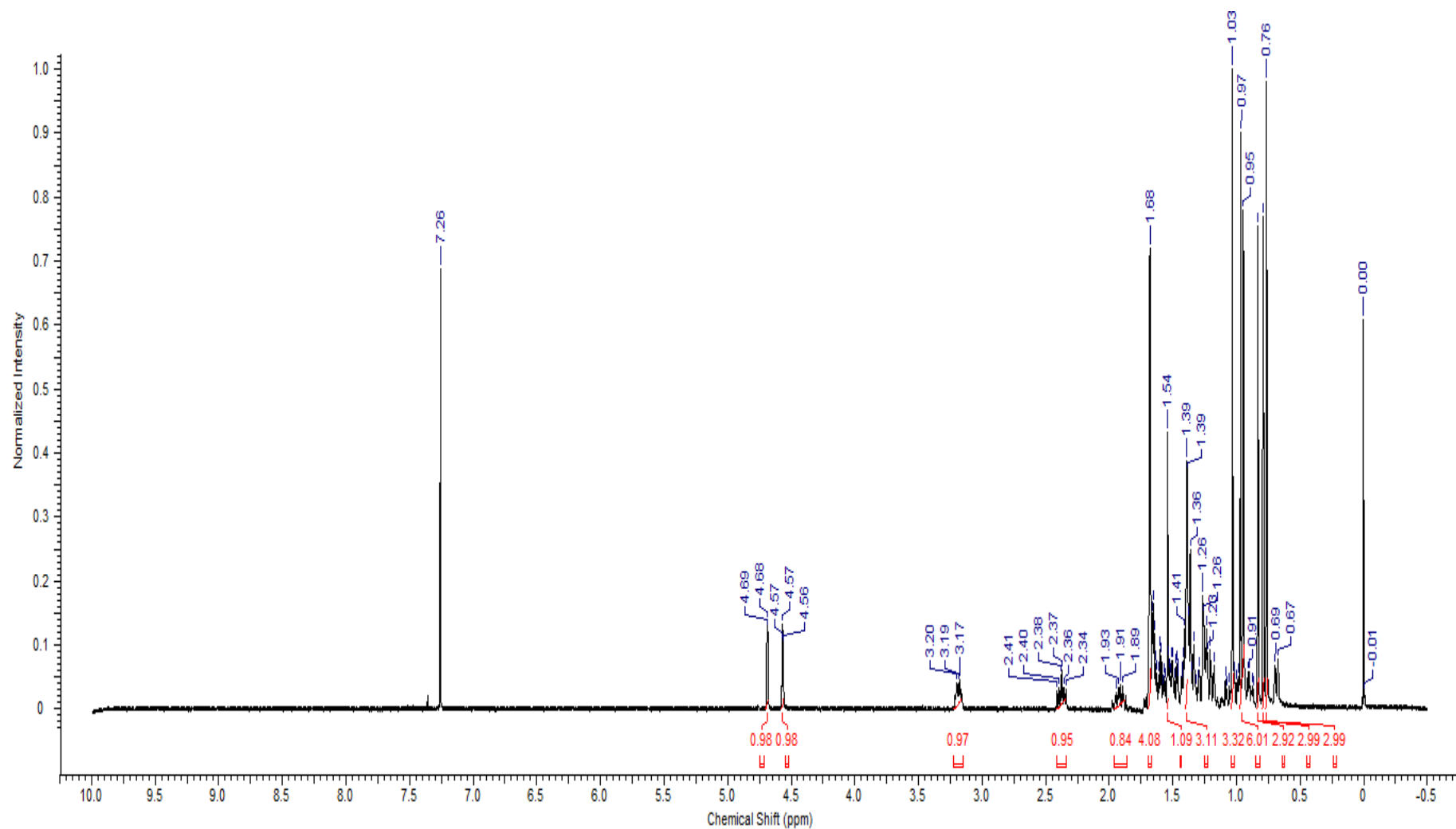


Figura 42: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do Lupeol

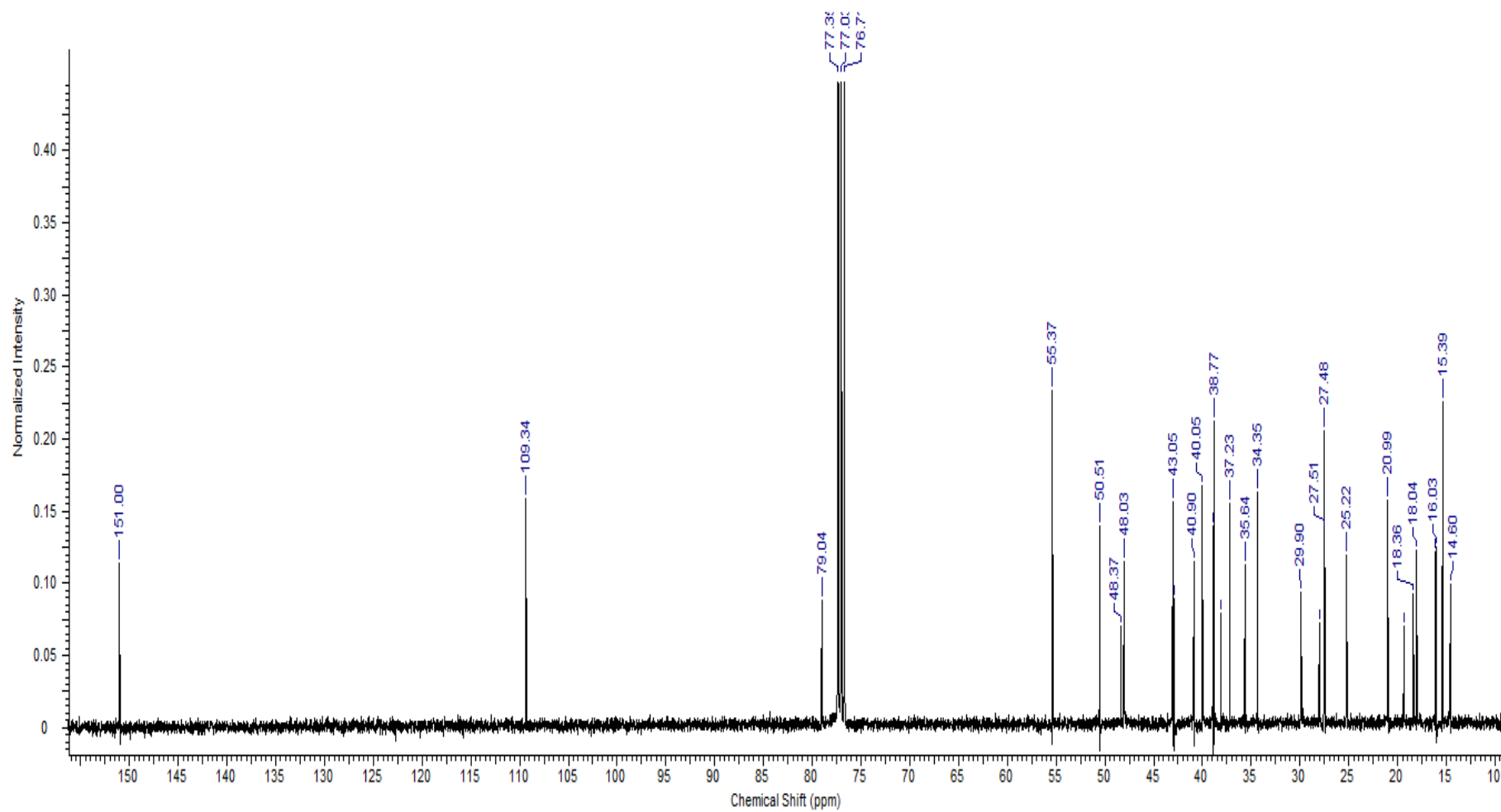


Figura 43: Espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) do Lupeol.

5.3.4 Substância IV e V: Mistura dos esteróides β -sitosterol e estigmasterol

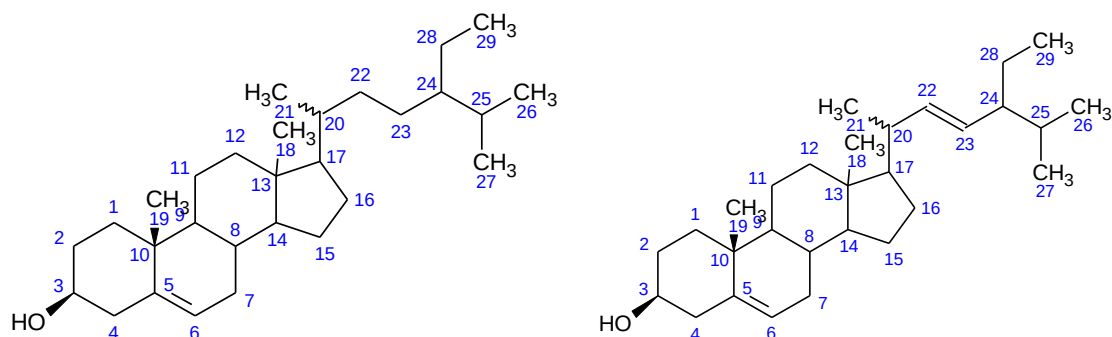


Figura 44: Estrutura das substâncias β -sitosterol e estigmasterol (IV e V)

A mistura das substâncias 4 e 5 (Figura 44) foi obtida após a reunião das frações (6-13)(8-13)(2-8), eluída com Hex/DCM 9:1, com R_f de 2,9 cm e com coloração roxa quando revelada com anisaldeído sulfúrico.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 45) observou-se um dubleto em δ_{H} 5,37 (2H, d, $J = 3,0$ Hz) referente aos hidrogênios H-6 dos dois esteroides juntamente com o singlete em δ_{H} 0,69 característicos do β -sitosterol e estigmasterol. Em seguida foi observado um duplo dubleto em δ_{H} 5,16 (H, dd, $J = 15,0$ e $9,0$ Hz) e outro em δ_{H} 5,01 (H, dd, $J = 15,0$ e $9,0$ Hz) referentes aos hidrogênios H-22 e H-23 do estigmasterol, diferenciando-se assim o β -sitosterol. Foi observado ainda um multipletto em δ_{H} 3,54 (2H, m, $J = 3,5$ Hz) referente aos hidrogênios H-3 de ambos os esteroides.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 46) é possível observar, os sinais em δ_{C} 140,7 (C), 121,7 (CH) referentes aos carbonos C-5 e C-6 de ambos os esteroides, porém foram observados os sinais δ_{C} 138,4 (C) e 129,2 (CH) referentes aos carbonos C-22 e C-23 apenas do estigmasterol.

Baseado nos dados espectrais de RMN de ^1H e de ^{13}C e por comparação destes com os dados encontrados na literatura (GOULART et al, 1993) (Tabela 22) a mistura foi identificada como os esteroides β -sitosterol e estigmasterol.

Esses esteroides podem ser utilizados na redução dos níveis de colesterol total (LICHTENSTEIN e DECKELBAUM, 2001).

Tabela 22: Dados de RMN de ^{13}C da mistura de esteroides [300 MHz, CDCl_3 , Δ (ppm)]

Posição	δc do β -sitosterol observado	δc do estigmasterol observado	β -sitosterol Literatura	estigmasterol Literatura	Carbono
1	37,2	37,2	37,2	37,2	CH_2
2	31,6	31,6	31,6	31,6	CH_2
3	71,8	71,8	71,8	71,8	CH
4	42,2	42,2	42,2	42,2	CH_2
5	140,7	140,7	140,7	140,7	C
6	121,7	121,7	121,7	121,7	CH
7	31,9	31,9	31,8	31,8	CH_2
8	31,9	31,9	31,8	31,8	CH
9	50,1	50,1	50,1	50,1	CH
10	36,5	36,5	36,4	36,4	C
11	21,0	21,0	21,0	21,0	CH_2
12	39,7	39,6	39,7	39,6	CH_2
13	42,2	42,2	42,2	42,2	CH
14	56,7	56,8	56,7	56,8	CH
15	24,3	24,3	24,3	24,3	CH_2
16	28,2	28,2	28,2	28,2	CH_2
17	56,0	55,9	56,0	55,9	CH
18	11,8	11,8	11,8	11,8	CH_3
19	19,4	19,4	19,3	19,3	CH_3
20	36,1	40,5	36,1	40,5	CH
21	19,0	21,2	19,0	21,2	CH_3
22	33,9	138,4	33,9	138,4	CH
23	39,6	129,2	39,1	129,2	CH
24	45,8	51,2	45,8	51,2	CH
25	26,7	31,9	26,0	31,8	CH
26	18,7	19,0	18,7	19,0	CH_3
27	19,8	18,9	19,8	19,0	CH_3
28	23,6	25,4	23,06	25,4	CH_2
29	11,8	12,2	11,9	12,2	CH_3

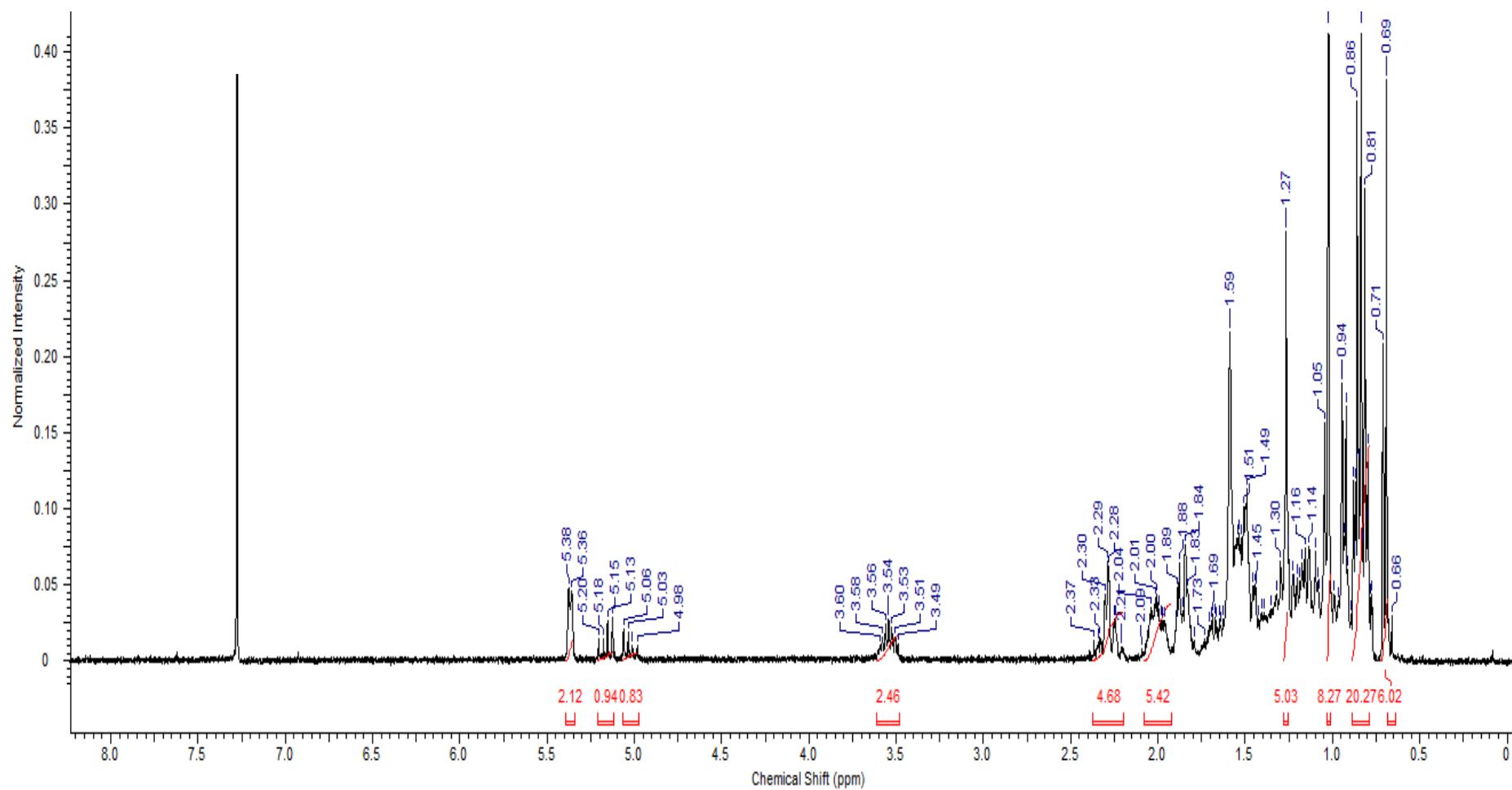


Figura 45: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura de esteróides β -sitosterol e Estigmasterol.

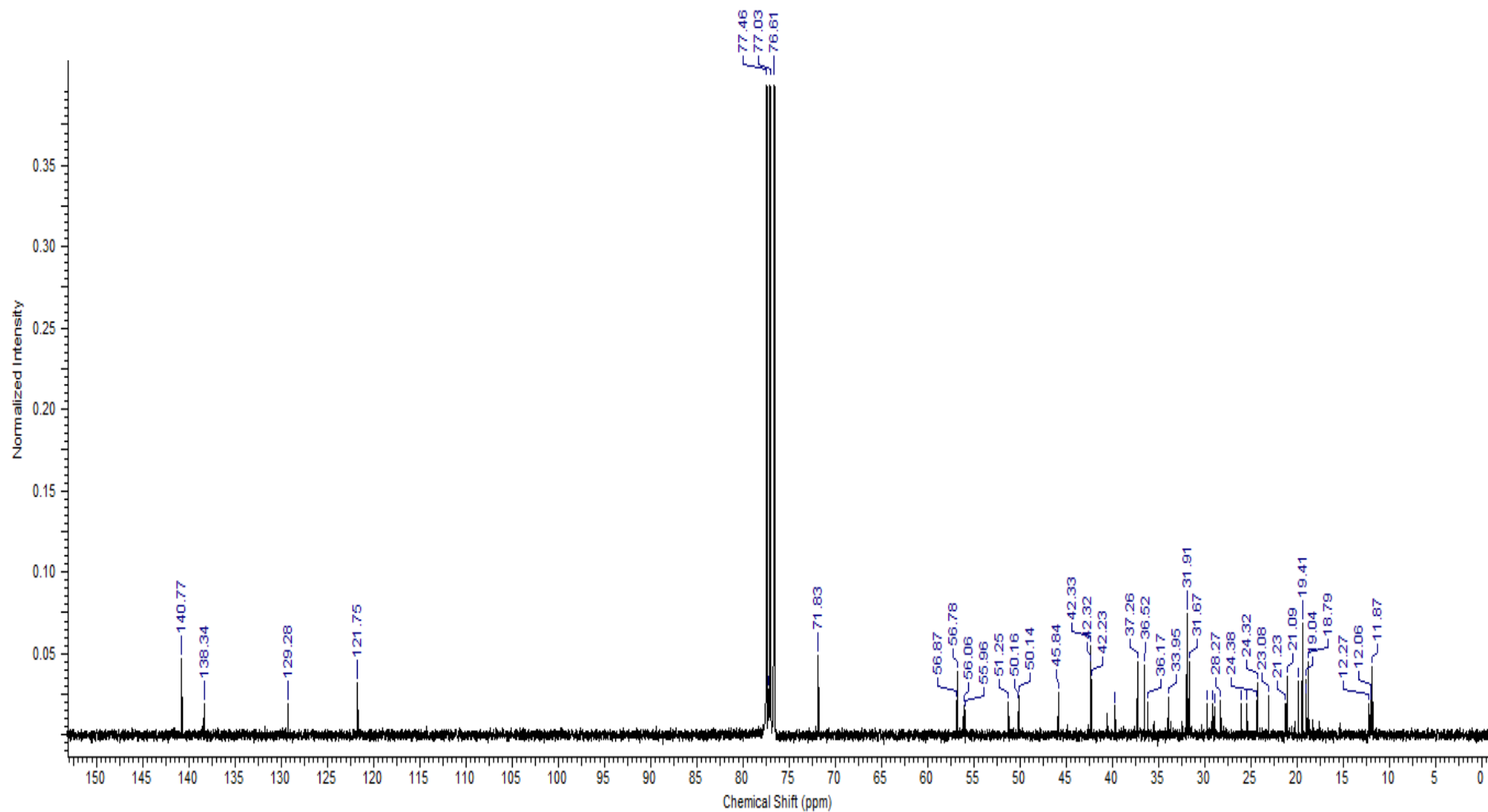


Figura 46: Espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) da mistura de esteróides β -sitosterol e 3 Estigmastanol

5.3.5 Substância VI: Hidroxicoriatina

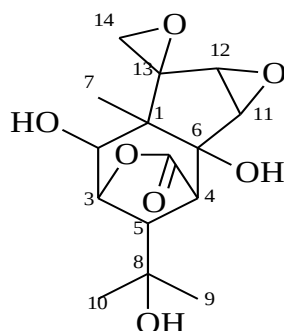


Figura 47: Hidroxicoriatina (VI)

A substância VII (Figura 47), foi isolada da fase DCM obtida do estrato MeOH das folhas, com características de um cristal amorfo branco e quando eluída no sistema acetona 100%, apresentou R_f de 2,6 cm e coloração azul fluorescente quando revelado na luz UV 365 nm.

Ao analisar essa fração por espectrometria de massas de alta resolução via ionização por ESI, o espectro apresentou um íon de m/z 335,1098 $[M + Na]^+$ compatível com a fórmula molecular $C_{15}H_{20}O_7$ (VI) (Figura 48).

O espectro de RMN de 1H , mostrou três singletos em δ_H 1,30, 1,33 e 1,41 atribuídos às metilas em H-7, H-9 e H-10 respectivamente. Observou-se ainda um sinal δ_H 2,64 (1H, *t*, $J=3,9$ Hz) atribuído ao hidrogênio H-5 e dois dubletos em δ_H 2,67 (1H, *d*, $J=5,8$ Hz) e em 4,07 (1H, *d*, $J=5,8$ Hz) ligados ao mesmo carbono (CH_2). Foram observados também os dubletos em δ_H 3,03 (1H, *d*, $J=3,91$ Hz), 3,07 (1H, *d*, $J=3,4$ Hz), 3,75 (1H, *d*, $J=2,9$ Hz) e 4,38 (1H, *d*, $J=0,9$ Hz) característicos de H-4, H-11, H-12 e H-2, além de um singlete em δ_H 3,35 (1H, *s*) do H-1 (Figura 37). O sinal em δ_H 4,72 não foi possível visualizar devido está mascarado pelo sinal do metanol-d, entretanto pode ser confirmado nos espectros bidimensionais HSQC e HMBC (Figuras 49 e 50).

Ao observar os espectros de RMN de ^{13}C foi possível identificar principalmente os sinais em δ_C 175,46 referente à carboxila da lactona em C-15, em δ_C 72,33 referente ao C-2 ligado a hidroxila, as metilas em δ_C 19,29, 26,95 e 28,86 características de C-7, C-9, C-10 entre outros (Figura 51).

O mapa de contorno 2D de HSQC, mostrou a presença de 11 sinais referentes aos carbonos com seus respectivos hidrogênios (Tabela 23).

O mapa de contorno 2D HMBC apresentou várias correlações em $^2J_{CH}$, principalmente entre C-1 acoplado com C-2 e C-7, além do carbono C-8 acoplado entre C-9 e C-10. Os acoplamentos do tipo $^3J_{CH}$ ocorreram entre os carbonos C-5 com C-9 e C-10, C-13 com C-11 e C-2, entre outros. Já acoplamentos do tipo $^3J_{CH}$ ocorreram entre C-11 com C-14 e C-14 com C-2.

O mapa de contorno 2D de $^1Hx^1H$ COSY, mostrou os acoplamentos entre os hidrogênios H-4 com H-5, H-5 com H-3 e H-12 com H-11 e os hidrogênios ligados ao C-14 respectivamente (Tabela 23). Ao comparar esses dados com os da literatura, verificou-se que esta substância se tratava da hidroxycoriatina (HONG et al, 1998), a qual possui atividade anti-convulsivante (ZHAO et al, 2012).

Tabela 23. Dados de RMN de HSQC, HMBC e COSY [500 MHz, CD_3OD , Δ (ppm)] da hidroxycoriatina

Posição	HSQC		HMBC			HxH COSY
	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$^4J_{CH}$	
1	45,05	3,35 s	H-7 e H-2	H-11 e H-3		
2	72,33	4,38 d (0,9)				
3	83,87	4,72				
4	49,19	3,03 d (3,9)				H-5
5	53,48	2,64 t (3,9)		H-9 e H-10		H-3 e H-4
6	76,18	-		H-7		
7	19,29	1,30 s		H-2		
8	68,26	-	H-10 e H-9			
9	26,95	1,33 s		H-10		
10	28,86	1,41 s		H-9		
11	59,61	3,07 d (3,4)			H-14	H-12
12	59,01	3,75 d (3,4)				H-11
13	68,18	-	H-7 e H-14	H-11 e H-2		
14	51,42	Ha= 4,07 d (5,8) e Hb= 2,67 d (5,8)			H-2	Ha-14 Hb- 14
15	175,46	-				

D:\data_2013\mpbf72s_hr1
Sul in 100ul MeCN ,3.0kV,sg10,au(N2)1,sw0,vap50,cap250,il,+150V

7/18/2013 11:20:04 AM

2075-5016-1.d.ms pos.ESI, m/z 50-1000

mpbf72s_hr1 #1 RT: 0.04 AV: 1 NL: 2.59E6
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-1000.00]

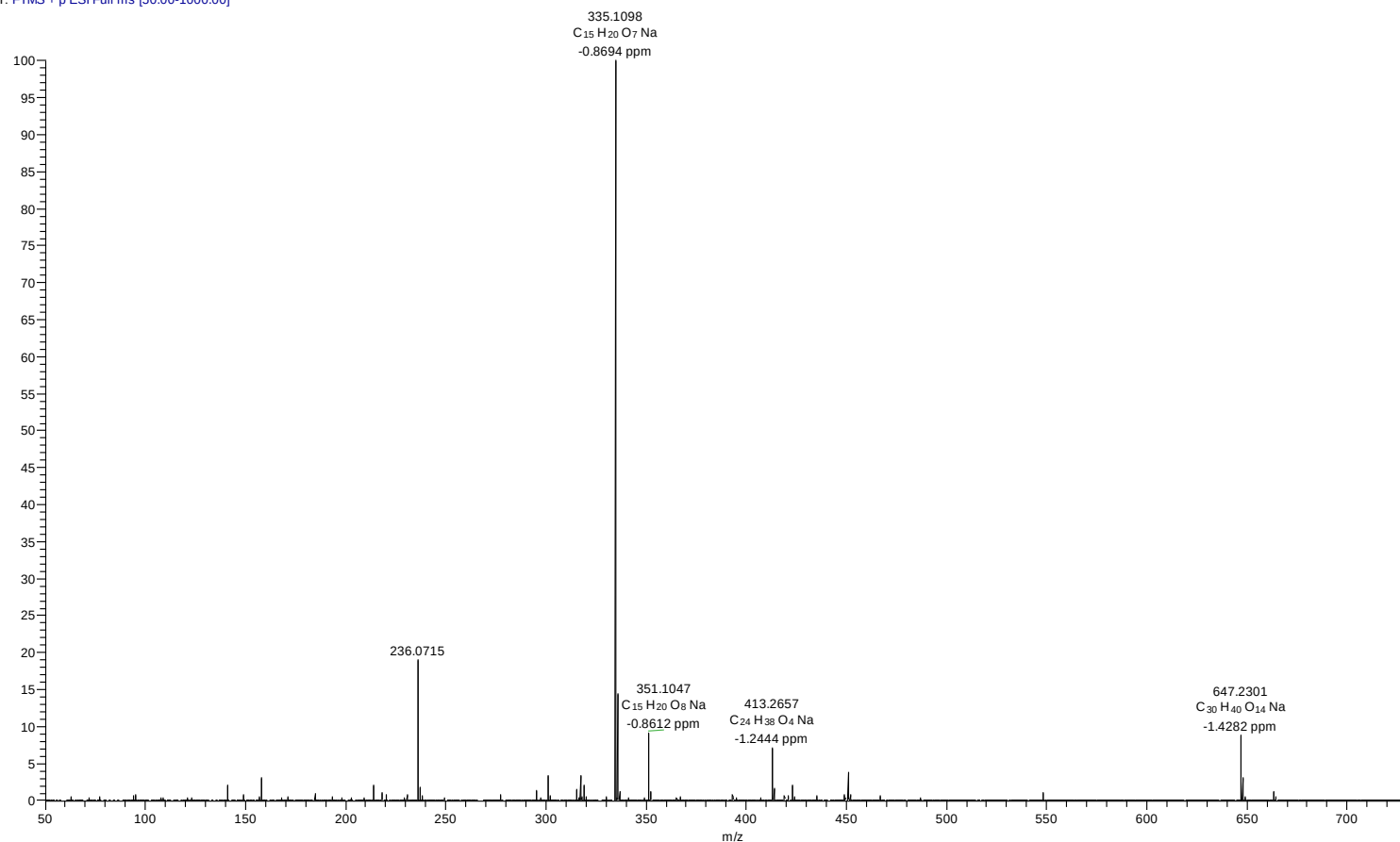


Figura 48: Espectro mostrando o íon m/z 335,1098 $[M + Na]^+$ referente a hidroxycoriatina (substância VI).

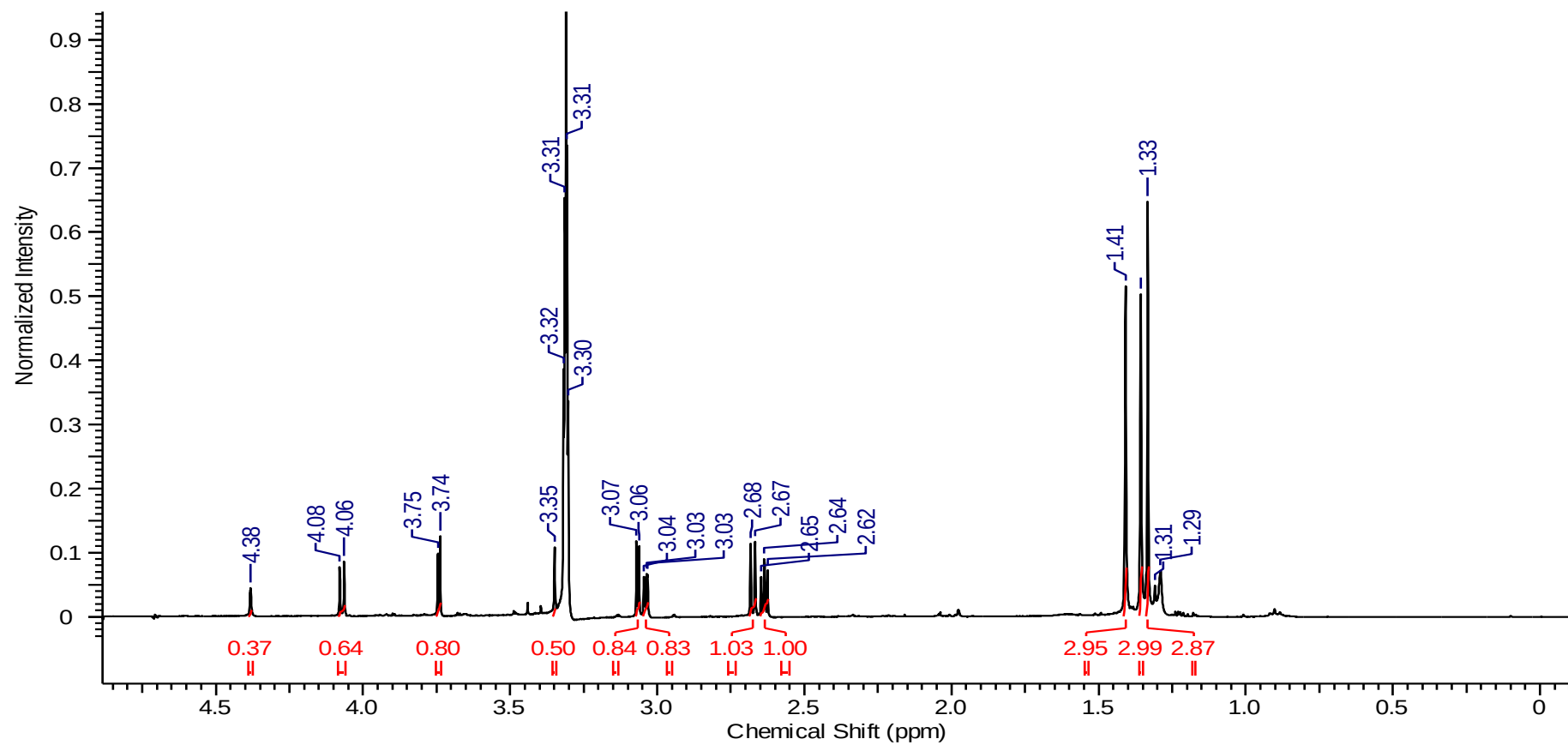


Figura 49: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da hidroxycoriatina (substância VI).

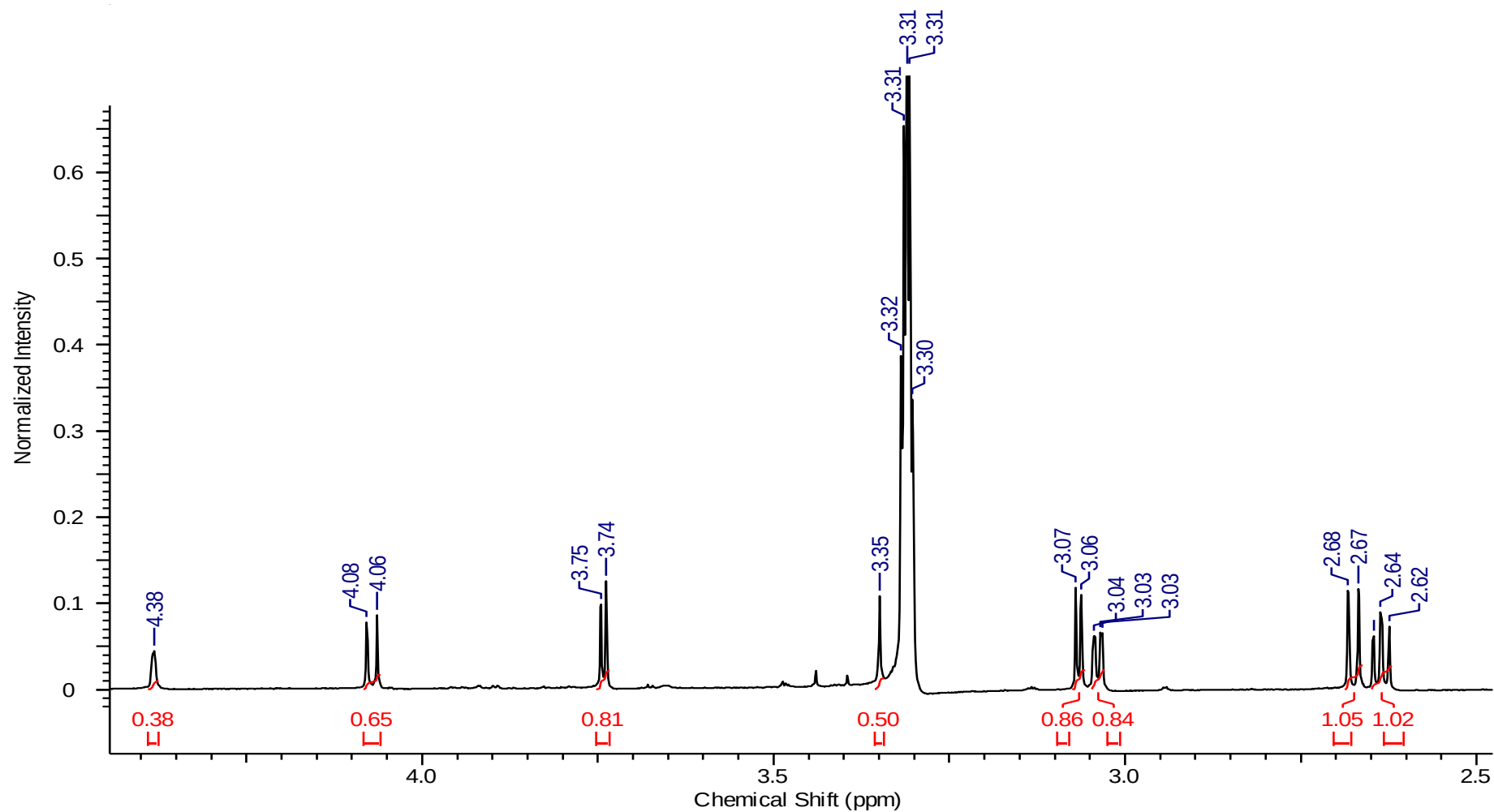


Figura 50: Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da hidroxycoriatina (substância VI).

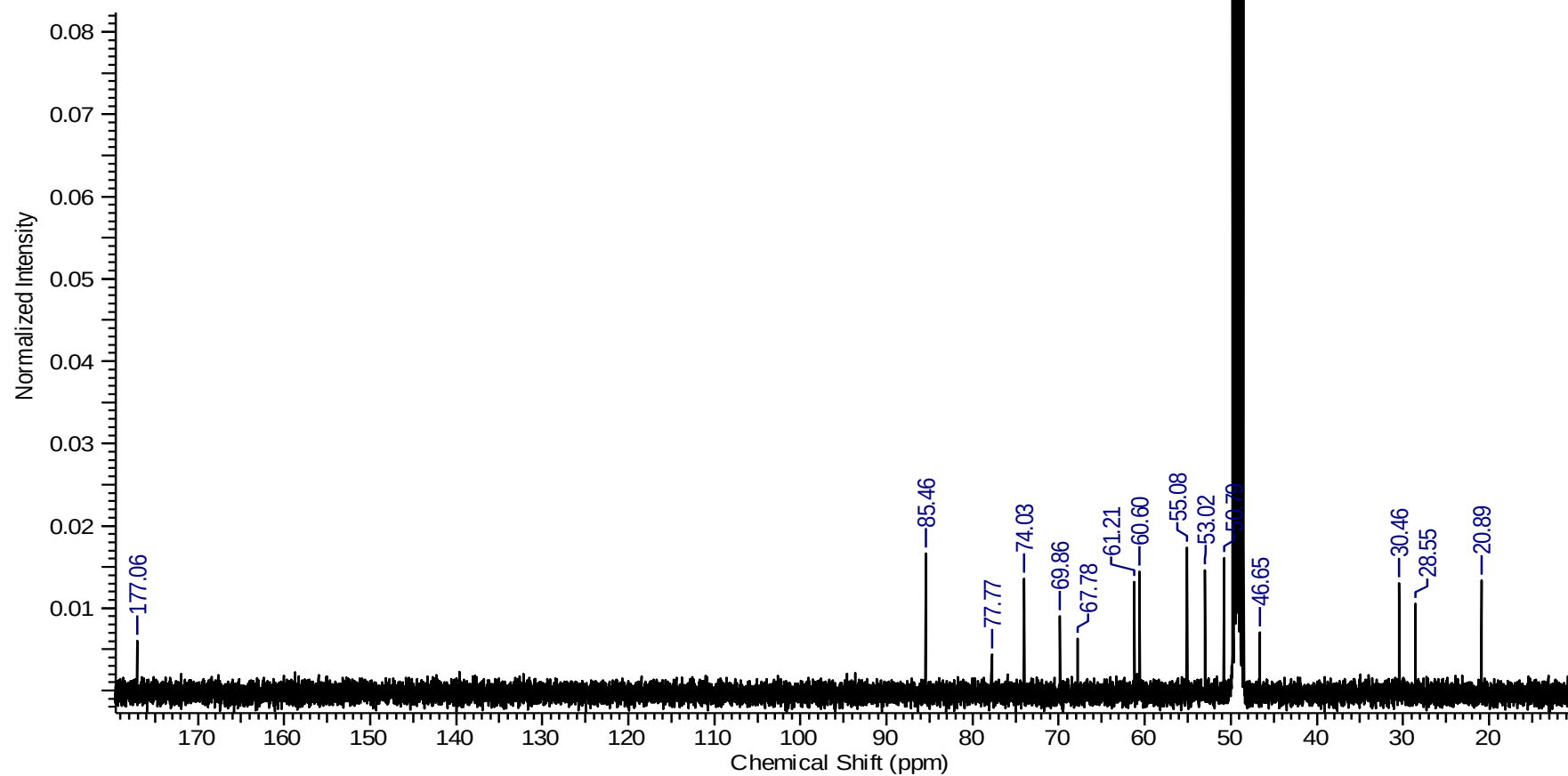


Figura 51: Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, CD_3OD) da hidroxycoriatina (substância VI).

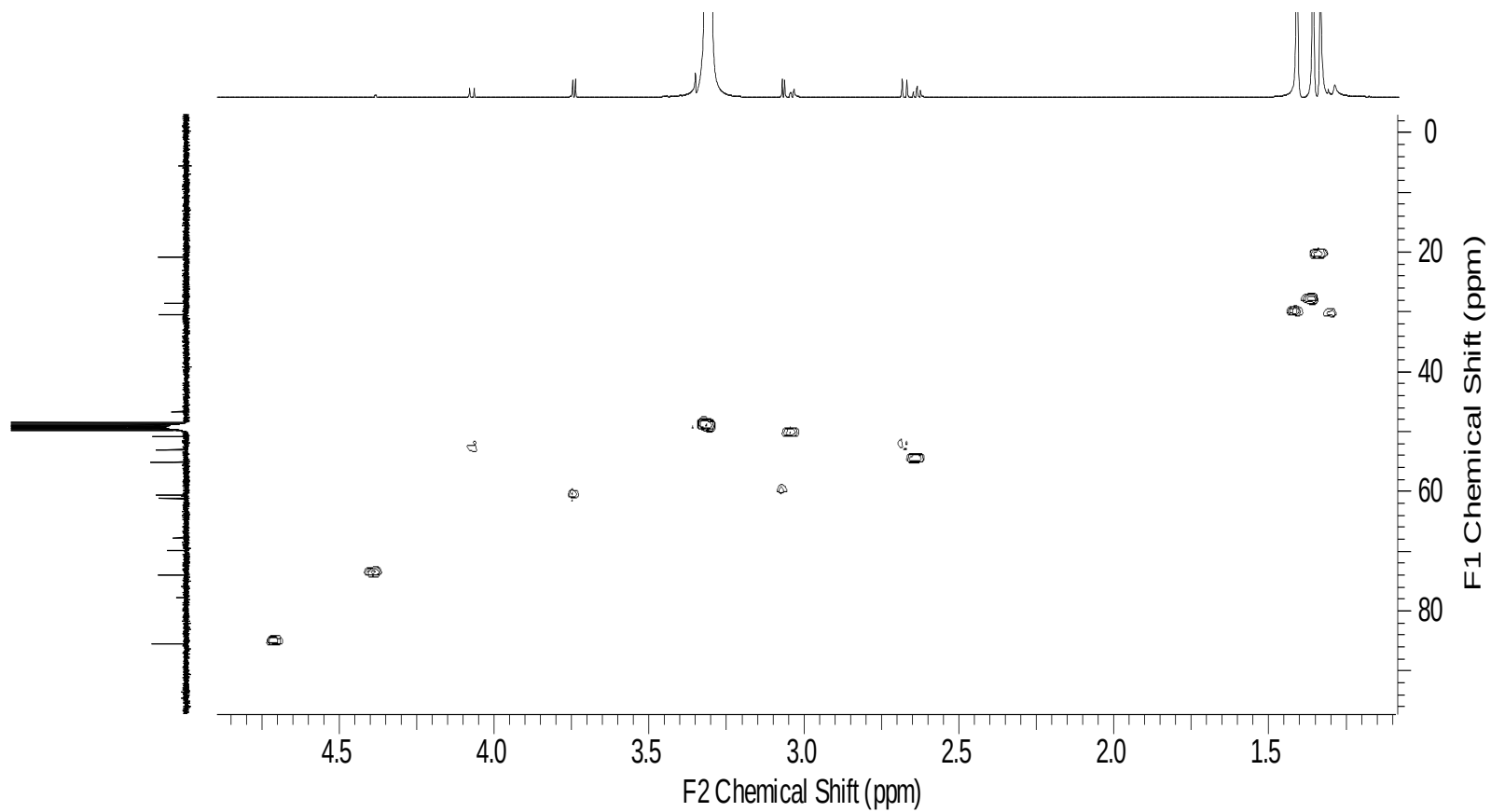


Figura 52: Mapa de contorno HSQC da Hidroxicoriatina (substância VI).

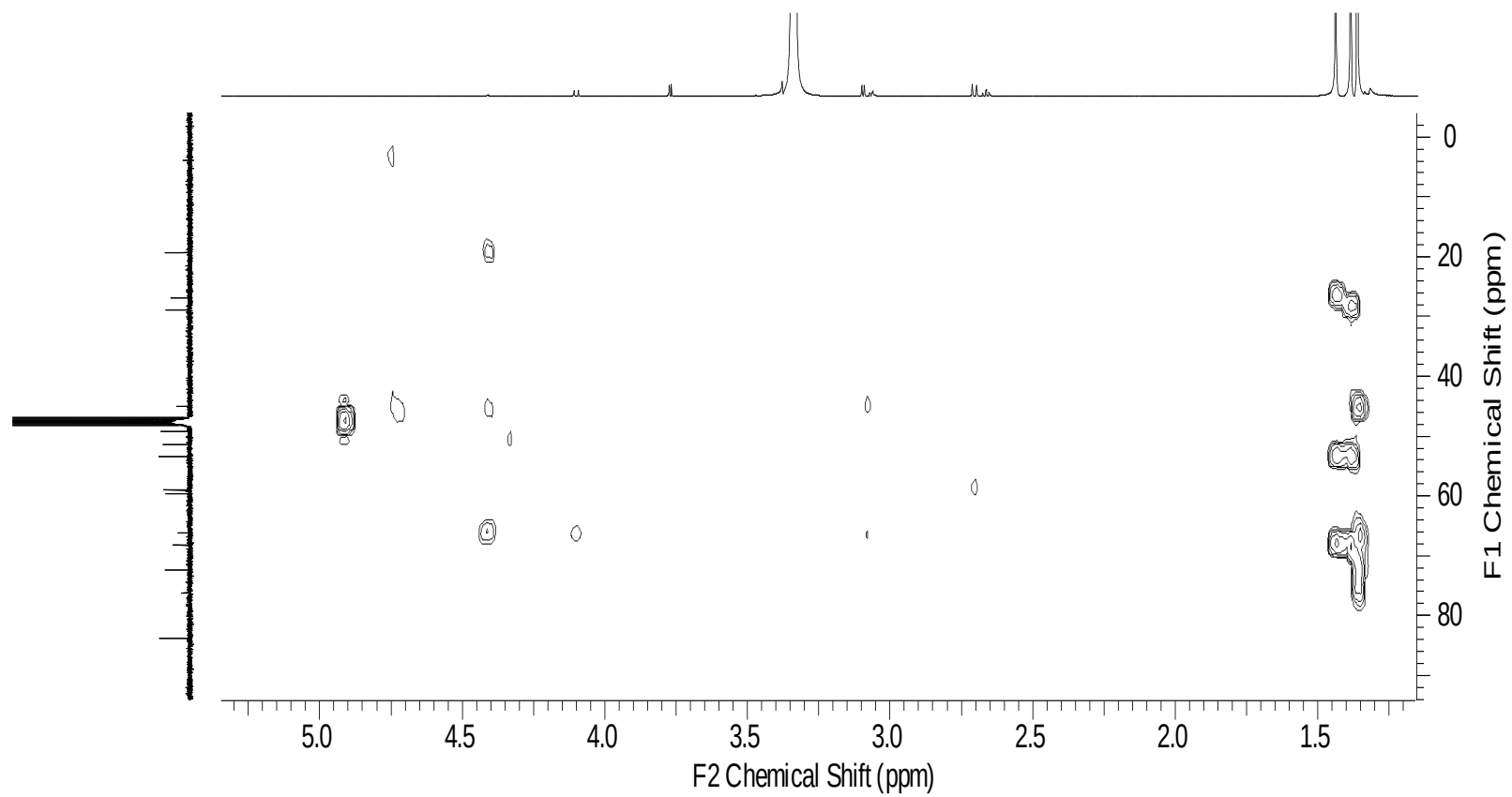


Figura 53: Mapa de contorno HMBC da hidroxycoriatina (substância VI).

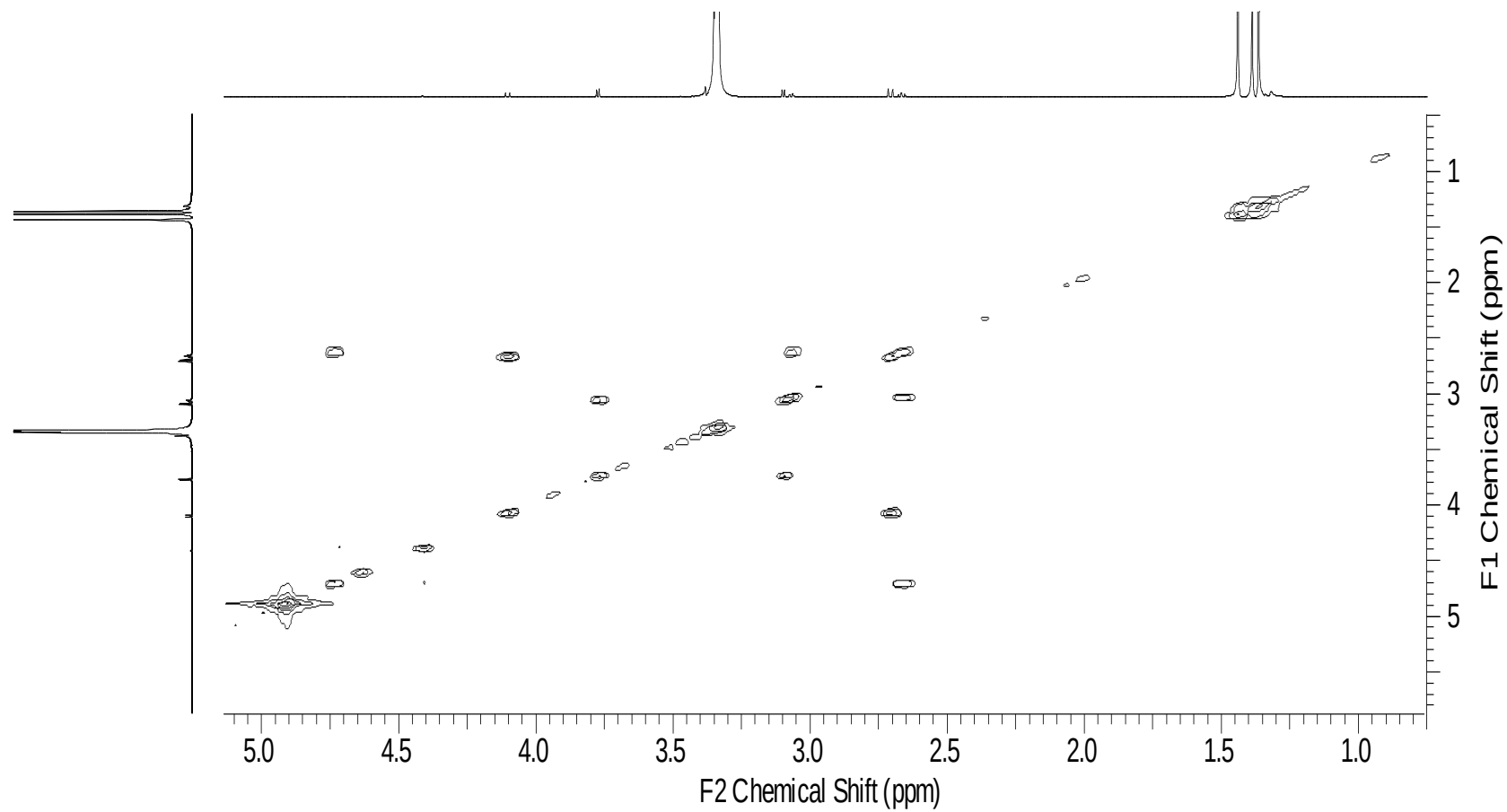


Figura 54: Mapa de contorno COSY da hidroxycoriatina (substância VI).

5.3.6 Substância VII e VIII: Mistura dos triterpenos: α e β -amirina

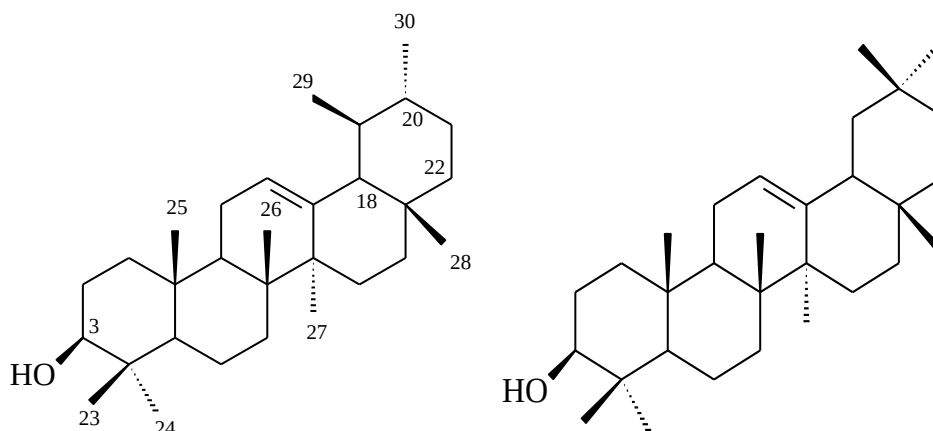


Figura 55: Estrutura das substâncias – α -amirina (VII) e β -amirina (VIII)

A mistura das substâncias VII e VIII foi obtida da fase DCM do extrato MeOH e apresentou-se, como um cristal em formato de agulhas, com R_f de 0,5 cm, quando eluída no em acetona 100% e coloração roxa quando revelada com anisaldeído sulfúrico.

Os espectro de RMN ^1H mostrou vários singletos entre δ_H 0,80 a 1,14 característicos de triterpenos, além de um duplo-dublete δ_H 3,24 característico de H-3, dois sinais em δ_H 5,19 (t, $J= 3,5$ Hz) e δ_H 5,13 (t, $J= 3,5$ Hz) na região de olefínicos característicos de H-12 e H-13 (Figura 56).

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou vários sinais, sendo destacados principalmente os sinais em δ_c 79,42 característicos de C-3. Na região dos olefínicos foram observados dois sinais em δ_c 145,56 (C) e 121,96 (CH) característico da β -amirina. Além desses, observou-se um sinal em δ_c 125,35 (CH) característico da α -amirina, entretanto não foi possível verificar o sinal em aproximadamente δ_c 139 (C) devido ela estar em menor concentração (Figura 57) (Tabela 24). Recentemente, essa mistura de substâncias apresentaram atividade inseticida (KANNAN et al, 2013) e anti-inflamatória (CHICCA et al, 2012).

Tabela 24. Dados de RMN de ^{13}C de VI e VII α e β - amirina [300 MHz, CDCl_3 , Δ (ppm)]

Posição	δc substância VI α -amirina observados	δc Substância VII β -amirina observados	δc α -amirina literatura	δc β - amirina literatura	δc Carbono
1	38,8	38,8	38,7	38,7	CH_2
2	27,1	27,4	27,2	27,3	CH_2
3	79,1	79,2	78,3	79,0	CH
4	39,0	39,0	38,7	38,8	CH_2
5	55,3	55,3	55,2	55,3	C
6	18,6	18,6	18,3	18,5	CH
7	32,8	32,7	32,9	32,8	CH_2
8	40,0	39,0	40,0	38,8	CH
9	47,8	47,7	47,7	47,7	CH
10	37,1	37,3	36,9	37,6	C
11	23,7	23,9	23,3	23,6	CH_2
12	125,2	121,9	124,3	121,8	CH_2
13	139,7	145, 5	139,3	145,1	CH
14	42,7	41,9	42,0	41,8	CH
15	26,3	26,2	26,6	26,2	CH_2
16	28,6	27,1	28,7	27,0	CH_2
17	33,5	32,8	33,7	32,5	CH
18	58,0	47,4	58,9	47,4	CH_3
19	39,0	47,0	39,6	46,9	CH_3
20	38,8	31,3	39,6	31,1	CH
21	31,3	34,9	31,2	34,8	CH_3
22	41,9	37,3	41,5	37,2	CH
23	28,3	28,6	28,1	28,2	CH
24	15,8	15,7	15,6	15,5	CH_3
25	15,8	15,7	15,6	15,6	CH_3
26	17,0	17,0	16,8	16,9	CH_3
27	26,2	26,3	26,0	26,0	CH_3
28	28,3	28,6	28,4	28,4	CH_3
29	33,5	33,5	33,3	33,3	CH_3
30	23,9	23,7	23,4	23,7	CH_3

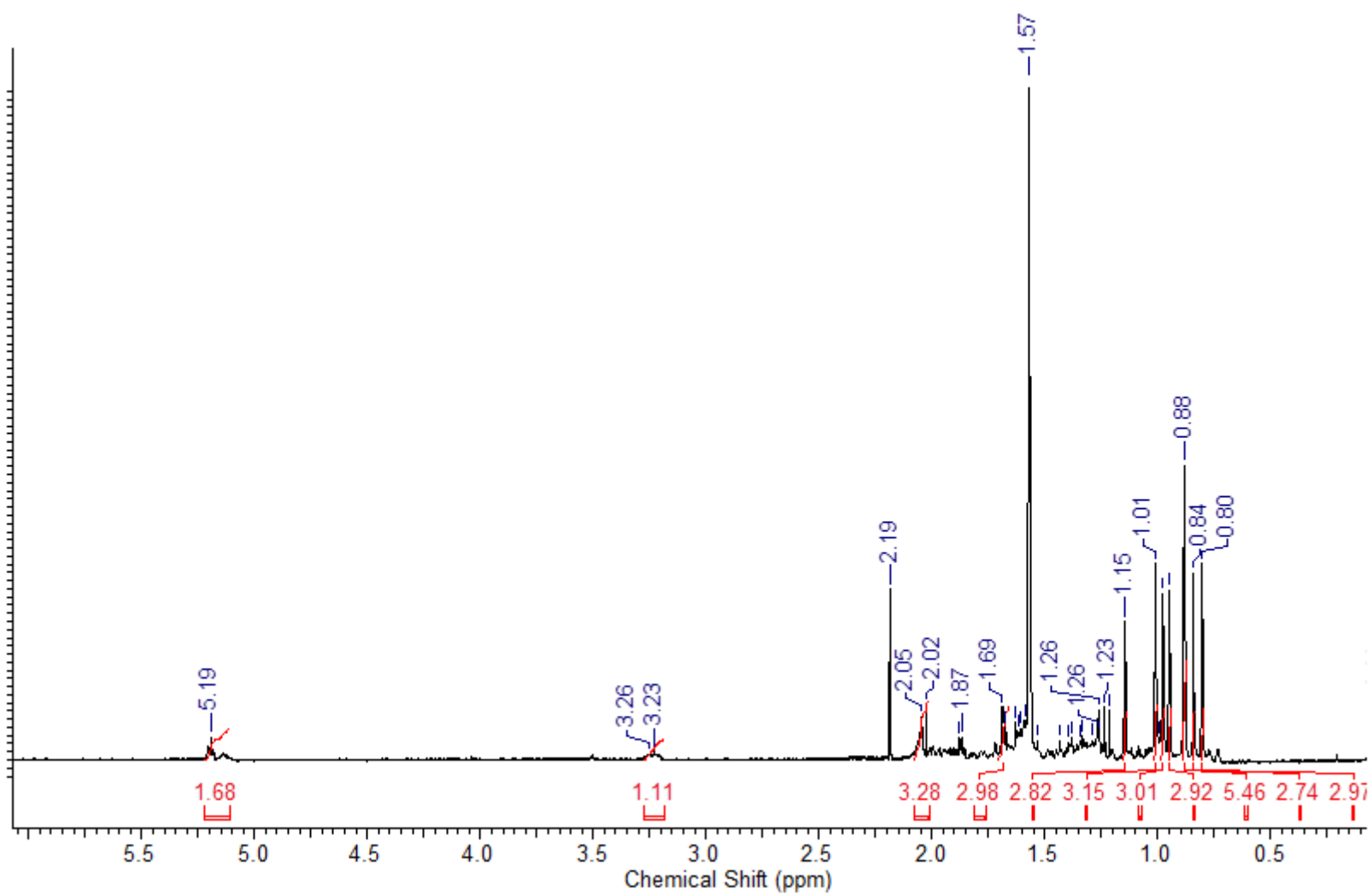


Figura 56: Espectro de RMN de ^1H (300 Hz, CDCl_3) da mistura de α -amirina e β -amirina.

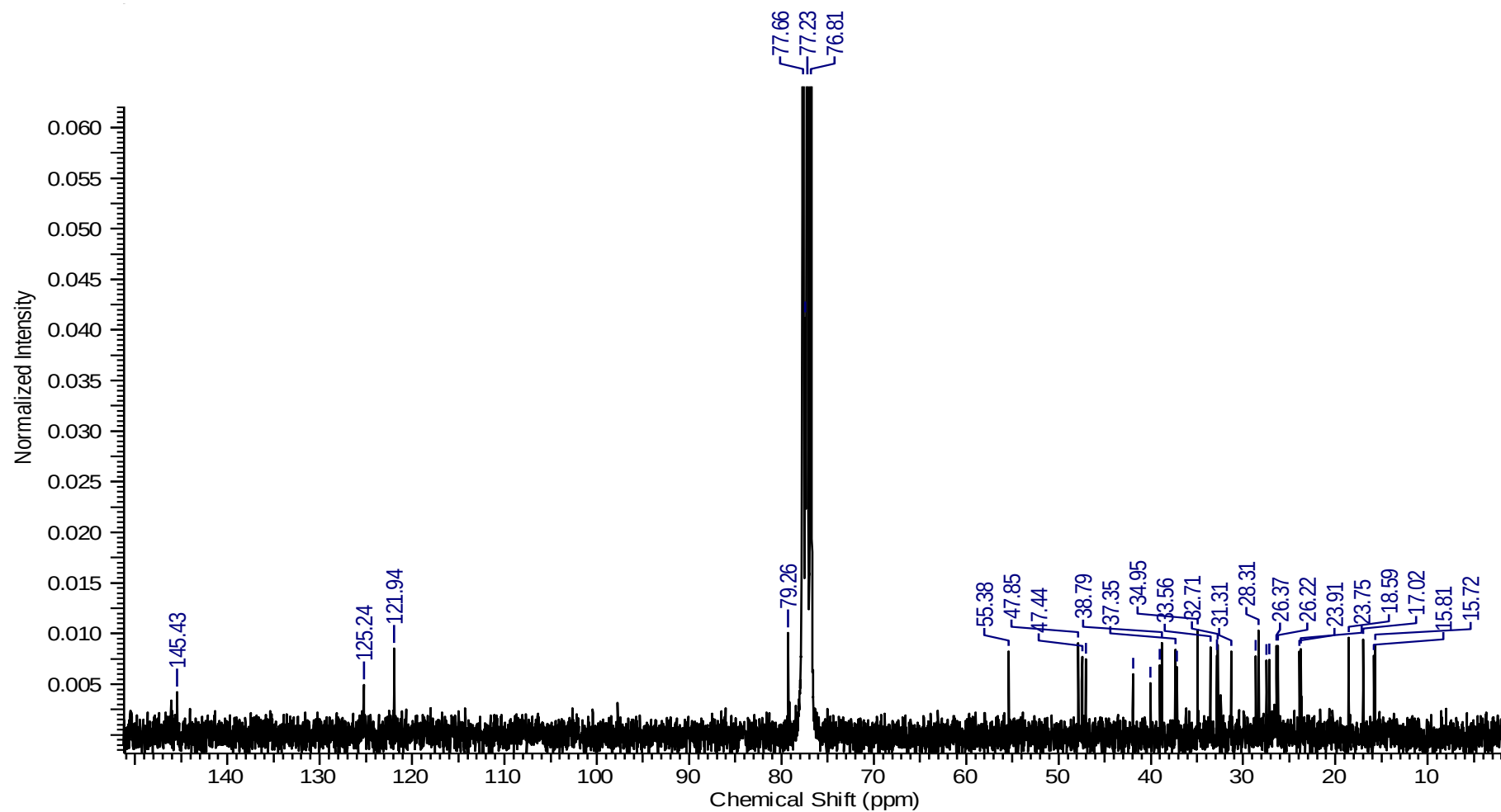


Figura 57: Espectro de RMN de ¹³C (300 MHz, CDCl₃) da mistura de α e β -amirina.

5.3.7 Substância IX: 7-hidroxi-6-metoxicumarina (Escopoletina)

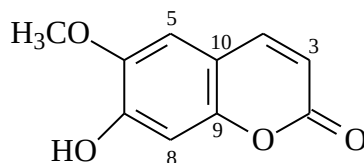


Figura 58: 7- Estrutura da hidroxi-6-metoxicumarina (Escopoletina) (IX).

A substância IX apresentou uma mancha de coloração azul fluorescente sob luz UV 365 nm, com Rf de 2,6 cm e uma pequena coloração rosa claro quando revelada com anisaldeído e uma coloração verde escuro quando revelado com cloreto férrico.

O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais característicos de esqueleto cumarínico. Os sinais em δ_{H} 6,28 (1H, *d*, $J= 9,3$ Hz) e δ_{H} 7,61 (1H, *d*, $J= 9,1$ Hz) foram atribuídos ao hidrogênios H-3 e H-4 respectivamente. Os sinais em δ_{H} 6,86 (1H, *s*) e δ_{H} 6,94 (1H, *s*) estão relacionados os hidrogênios aromáticos na posição “para substituídos”. Foi observado ainda um sinal em δ_{H} 3,97 (3H, *s*) e um sinal em δ_{H} 6,16 (1H, *s*) referentes aos hidrogênios da metoxila em H-6 e uma hidroxila em H-7 (Figura 59).

Ao observar os espectros de RMN de ^{13}C foi possível identificar principalmente os sinais em δ_{C} 161,47 referente a carbonila em C-2, em δ_{C} 144,0 referente ao C-6 ligado a metoxila e um sinal em δ_{C} 149,6 referente ao C-7 ligado a hidroxila (Figura 60). Esses dados ao serem comparados com os da literatura (TRIPATHI *et al*, 2010) verificou-se que se tratava da 7-hidroxi-6-metoxicumarina conhecida como escopoletina (Tabela 25).

Estudos recentes demonstraram que esta substância possui atividade anti-inflamatória (JAMUNA *et al*, 2015), antioxidante (MOGANA *et al*, 2013), antifúngica (NAM e KIM, 2015) e contra o envelhecimento (FERREIRA *et al*, 2013).

Tabela 25: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (300 MHz) e de ^{13}C da substância IX, escopoletina (multiplicidade, J em Hz).

Posição	δ_{H} da substância IX	δ_{C} da substância IX	δ_{H} da Escopoletina	δ_{C} da Escopoletina
2	-	161,4	-	161,8
3	6,28 (d, 9,3)	107,4	6,22 (d, 9,4)	107,9
4	7,61 (d, 9,3)	143,3	7,84 (d, 9,4)	143,0
5	6,86 (s)	103,2	6,82 (s)	102,9
6	-	144,0	-	144,3
7	-	149,6	-	148,6
8	6,94 (s)	113,4	7,21 (s)	113,1
9	-	150,2	-	150,8
10	-	111,5	-	110,3
OCH₃	3,97 (s)	56,4	3,91 (s)	56,8
OH	6,16 (s)	-	-	-

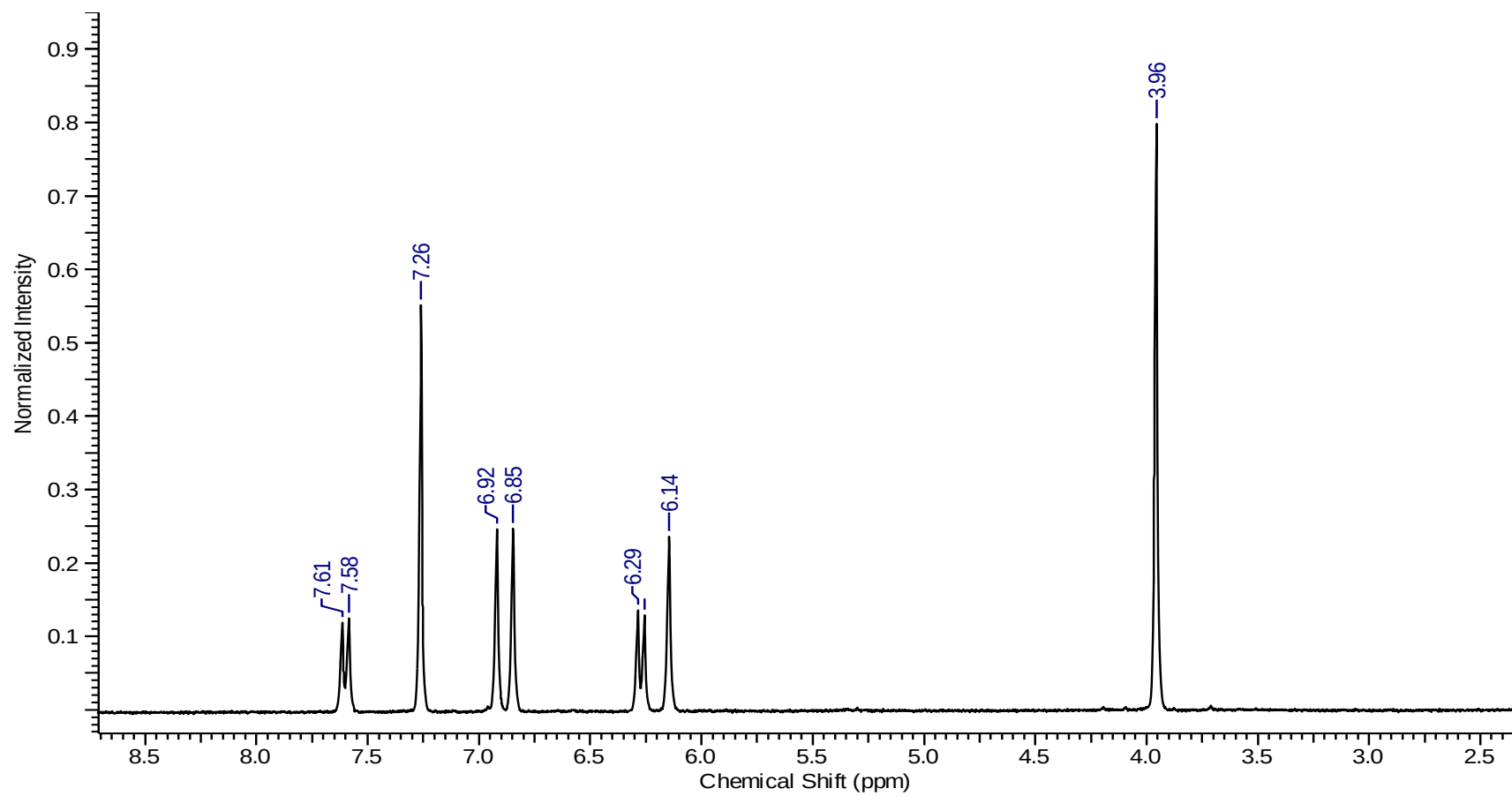


Figura 59: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da escopoletina (IX).

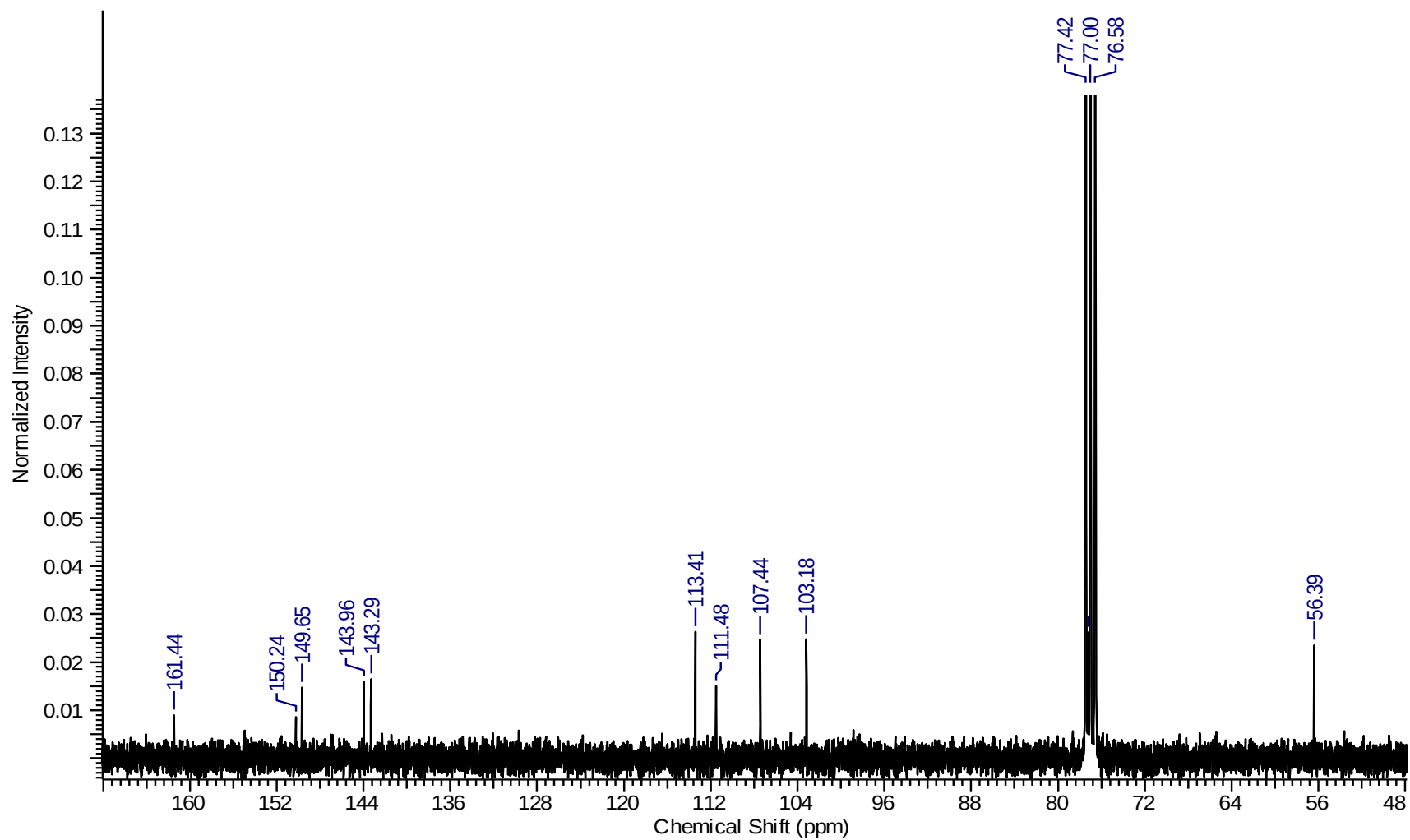


Figura 60: Espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) da escopoletina (IX).

5.3.8 Substância X: 7,4''' dimetilamentoflavona (podocarpusflavona B)

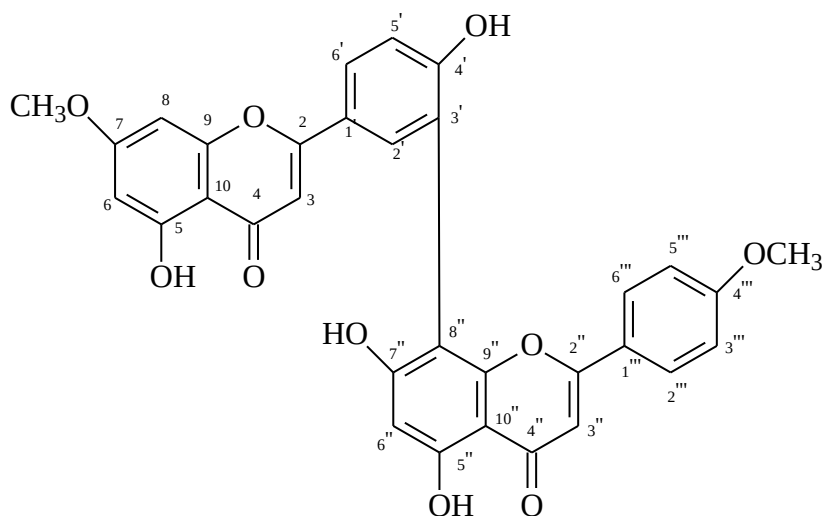


Figura 61: 7,4''' dimetilamentoflavona (Podocarpusflavona B) (X).

A substância X, isolada da fase DCM do extrato metanólico, apresentou um sólido amarelo solúvel em DMSO- d_6 , com R_f de 2,8 cm quando eluída no sistema DCM/Acetona 4:6 e coloração amarela quando revelada com anisaldeído sulfúrico e verde escuro quando revelado com cloreto férrico.

Ao analisar essa fração por espectrometria de massas de alta resolução via ionização por ESI, observou-se um íon de m/z 567,1209 $[M + H]^+$, compatível com a fórmula molecular $C_{32}H_{22}O_{10}$ (X) (Figura 50) com Índice de deficiência de Hidrogênio (IDH) de 22.

O espectro de RMN de 1H da substância X mostrou vários sinais na região de alifáticos e aromáticos. Primeiramente observaram-se dois singletos em δ_H 12,98 e δ_H 13,08 correspondentes a hidroxilas queladas em OH-5 e OH-5' características de biflavonoides. Na região de hidrogênios de anéis aromáticos, foram observados dois dubletos, um em δ_H 6,71 (d , $J=2,2$ Hz, H-8), e outro em δ_H 6,38 (d , $J=2,2$ Hz, H-6) referentes ao anel A-I, além do sinal em δ_H 3,81 da metoxila ligada em C-7. Observou-se ainda a presença de um dubleto em δ_H 8,07 (d , $J=2,4$ Hz, H-2'), um duplo dubleto em δ_H 8,02 (dd , $J=8,7$ e $2,5$ Hz, H-6') e um dubleto em δ_H 7,12 (d , $J=8,6$ Hz, H-5'), referentes ao anel B-I, além de um singlete em δ_H 6,89 (s) referente ao hidrogênio H-3 do anel C-I. Ao analisar os demais sinais, verificou-se a presença de um singlete

em δ_H 6,35 (s) do anel A-II, um dubleto em δ_H 7,68 (d, $J = 8,9$ Hz, H-2''' e H-6'''), outro em δ_H 6,90 (d, $J = 8,7$ Hz, H-3''' e H-5''') e um sigleto em δ_H 3,73 (s) referente a metoxila ligada em C-4 do anel B-II. Foi observado ainda um singleto em δ_H 6,88 (s) do H-3'' do anel C-II (Figura 62).

O mapa de contorno 2D de $^1H \times ^1H$ COSY, mostrou os acoplamentos entre hidrogênios H-5' com H-6'; H-2' com H-6'; H-2''' com H-3''' e H-5''' com H-6''' respectivamente (Figura 70).

Ao analisar o mapa de contorno 2D de HSQC, verificaram-se correlações entre os 12 carbonos metínicos com seus respectivos hidrogênios. A atribuição dos deslocamentos químicos dos carbonos quaternários foram feitos através da análise do mapa de contorno 2D HMBC ($^2J_{CH}$, $^3J_{CH}$ e $^4J_{CH}$) (Figura 64).

O mapa de contorno 2D HMBC mostrou vários acoplamentos entre os quais estão as correlações da hidroxila quelada em δ_H 12,98 (OH-5) com δ_C 160,8 (C-5) e δ_H 13,08 (OH-5'') com δ_C 160,2 (C-5''). Os acoplamentos a longa distância ($^3J_{CH}$) foram observados entre os carbonos δ_C 131,6 (C-2') com o hidrogênio δ_H 8,02 (H-6'), o carbono δ_C 97,7 (C-6) com a hidroxila em 12,98 (OH-5), bem como o carbono δ_C 98,7 (C-6'') com a hidroxila em 13,08 (OH-5''). Outros sinais foram observados, entretanto os acoplamentos entre δ_C 164,7 (C-7) com a metoxila em δ_H 3,80 (MeO-7) e o carbono δ_C 161,7 (C-4''') com a metoxila em δ_H 3,72 (MeO-4''') (Figura 67), confirmaram a proposta da 7,4''' dimetilamentoflavona conhecida como Podocarpusflavona B (GARG e MITRA, 1971) (Tabela 19). Ela possui atividade antioxidante (WANG et al, 2015), anti Alzheimer (SASAKI et al, 2015 e 2010), inibição de fosfodiasterase (CHAABI et al, 2007).

Tabela 26: Dados de RMN ^1H e ^1H - ^1H -COSY (DMSO- d_6 , 300 MHz) ^{13}C (300 MHz) e 2D da substância 7,4''' dimetilamentoflavona (X)

Posição	HSQC		HMBC		HxH COSY
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	
2	163,2	-	H-3	H-2', H-6'	
3	102,7	6,89 (s)			
4	181,7	-	H-3		
5	160,8	-	H-6, OH-5		
6	97,7	6,35 d (2,2)		OH-5	H-8
7	164,7	-		MeO-7	
8	92,2	6,71 d (2,2)			H-6
9	156,9	-	H-8		
10	104,8	-		OH-5, H-6, H-3 H-8	
1'	119,7	-		H-3	
2'	131,6	8,07 d (2,5)			
3'	119,7	-			
4'	160,2	-			
5'	116,3	7,12 d (8,7)			H-6'
6'	127,4	8,02 dd (8,7 e 2,5)			H-5'
2''	163,8	-	H-3''	H-2'''/ 6'''	
3''	102,7	6,88 (s)			
4''	181,7	-	H-3''		
5''	160,3	-	H-6'', OH-5''		
6''	98,7	6,35 (s)		OH-5''	
7''	161,0	-			
8''	104,2	-		H-6'', H-2'	
9''	156,9	-			
10''	103,1	-		OH-5'', H-6'', H-3''	
1'''	122,5	-		H-3''	

2'''	127,6	7,68 d (8,9)	H-3'''/5'''	H-2'''/6''', MeO-4'''	H-3'''/5'''
3'''	114,1	6,90 d (8,7)			H-2'''/6'''
4'''	161,7	-			
5'''	114,1	6,90 d (8,7)			H-2'''/6'''
6'''	127,6	7,68 d (8,9)			H-3'''/5'''
OH-5	-	12,98			
OH-5''	-	13,08			
7-OCH₃	55,7	3,80 (s)		3,82 (s)	
4'''OCH₃	55,2	3,72 (s)		3,76 (s)	

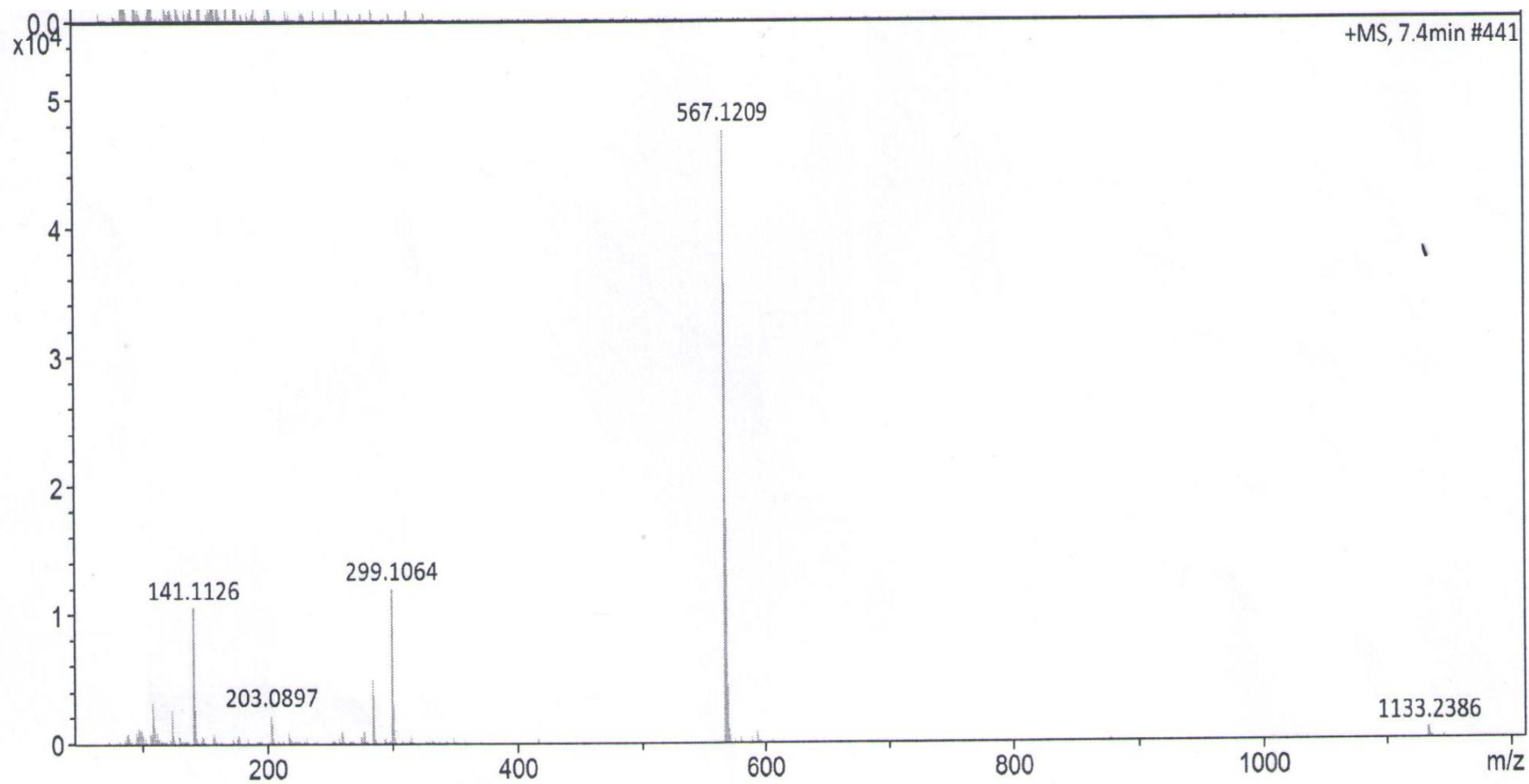


Figura 62: Espectro mostrando o íon m/z 567,1209 [M + H]⁺ referente a 7,4''' dimetilamentoflavona (substância X).

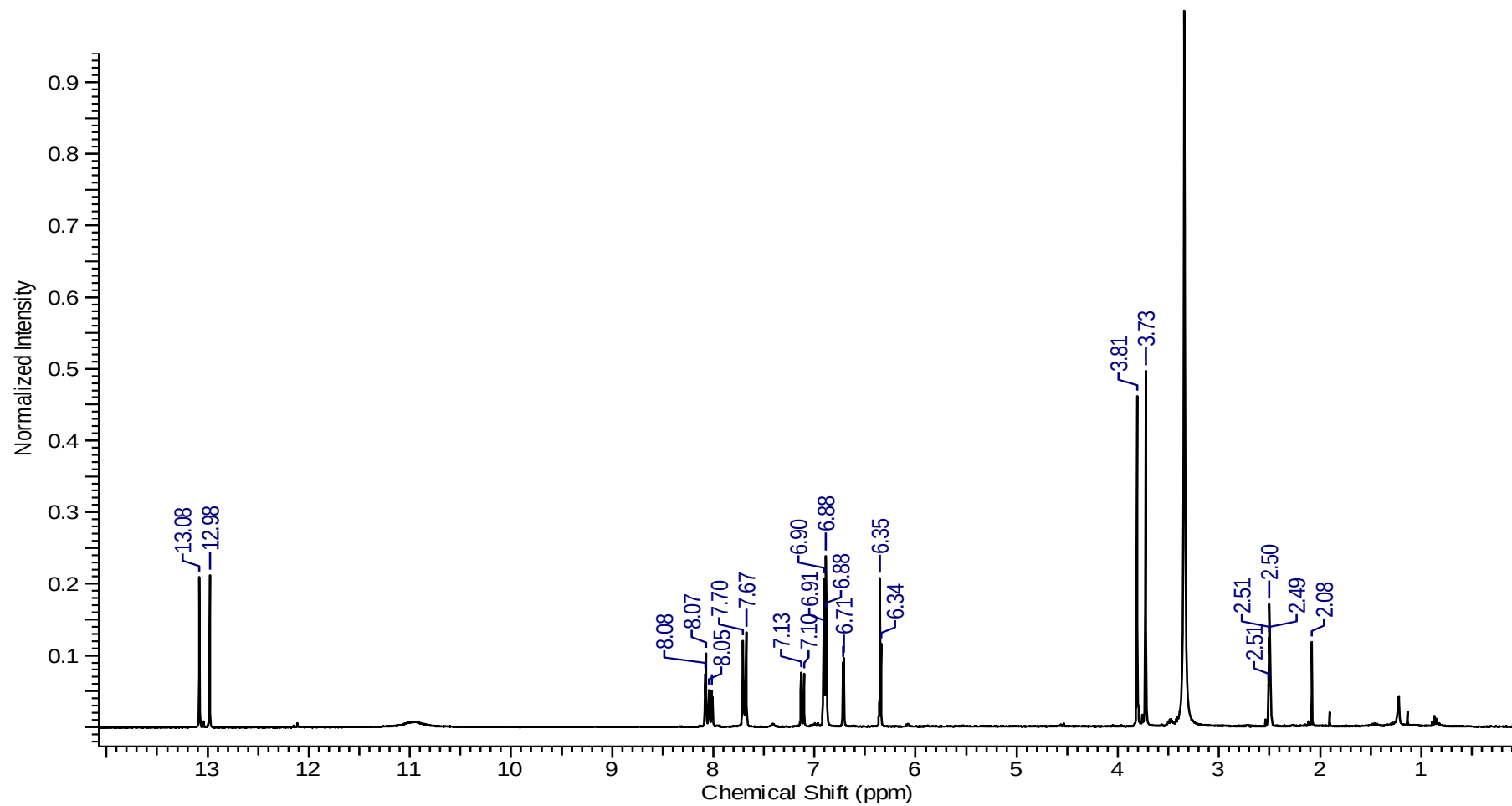


Figura 63: Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) da 7,4''' dimetilamentoflavona (X).

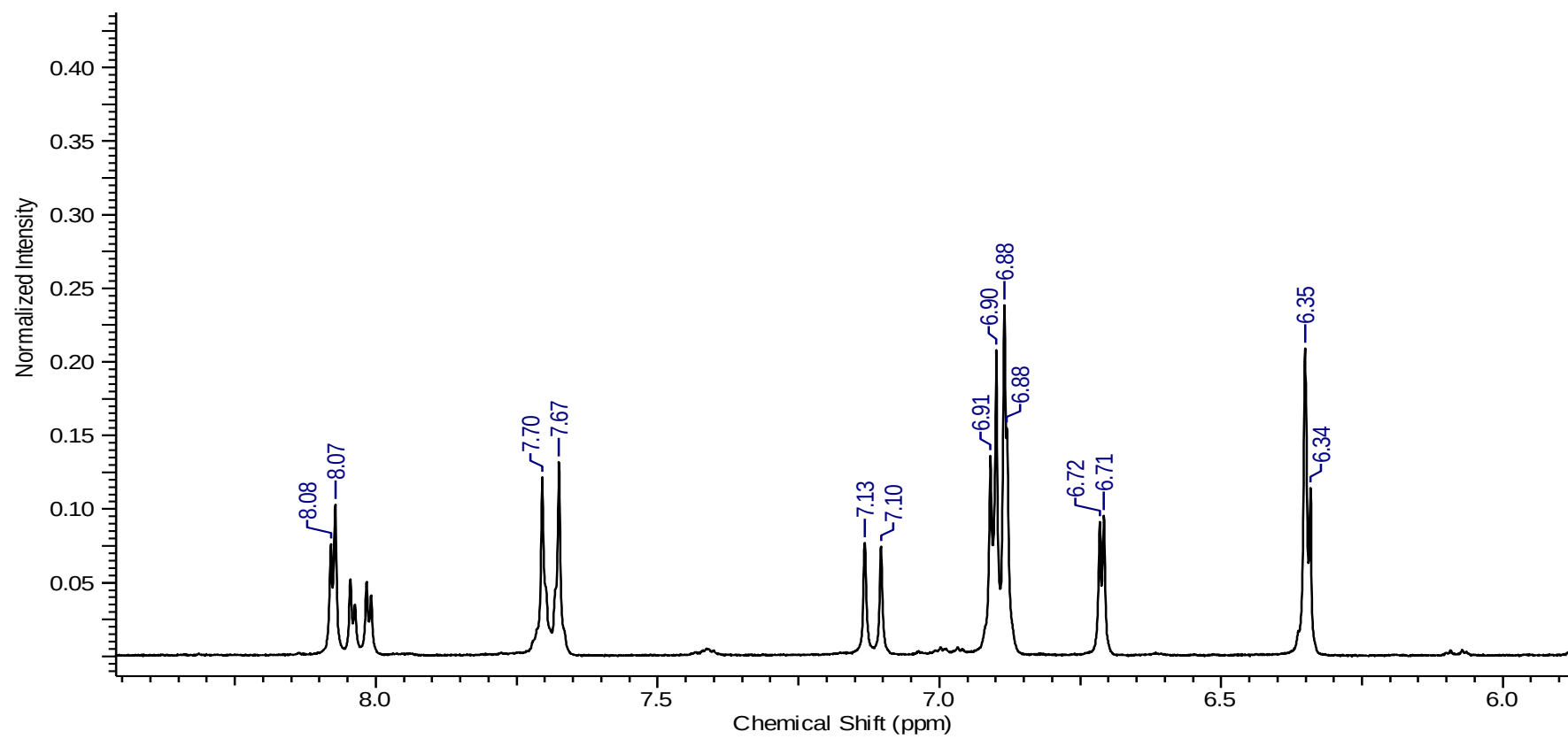


Figura 64: Expansão do espectro de RMN de ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) da 7,4'' dimetilamentoflavona (X).

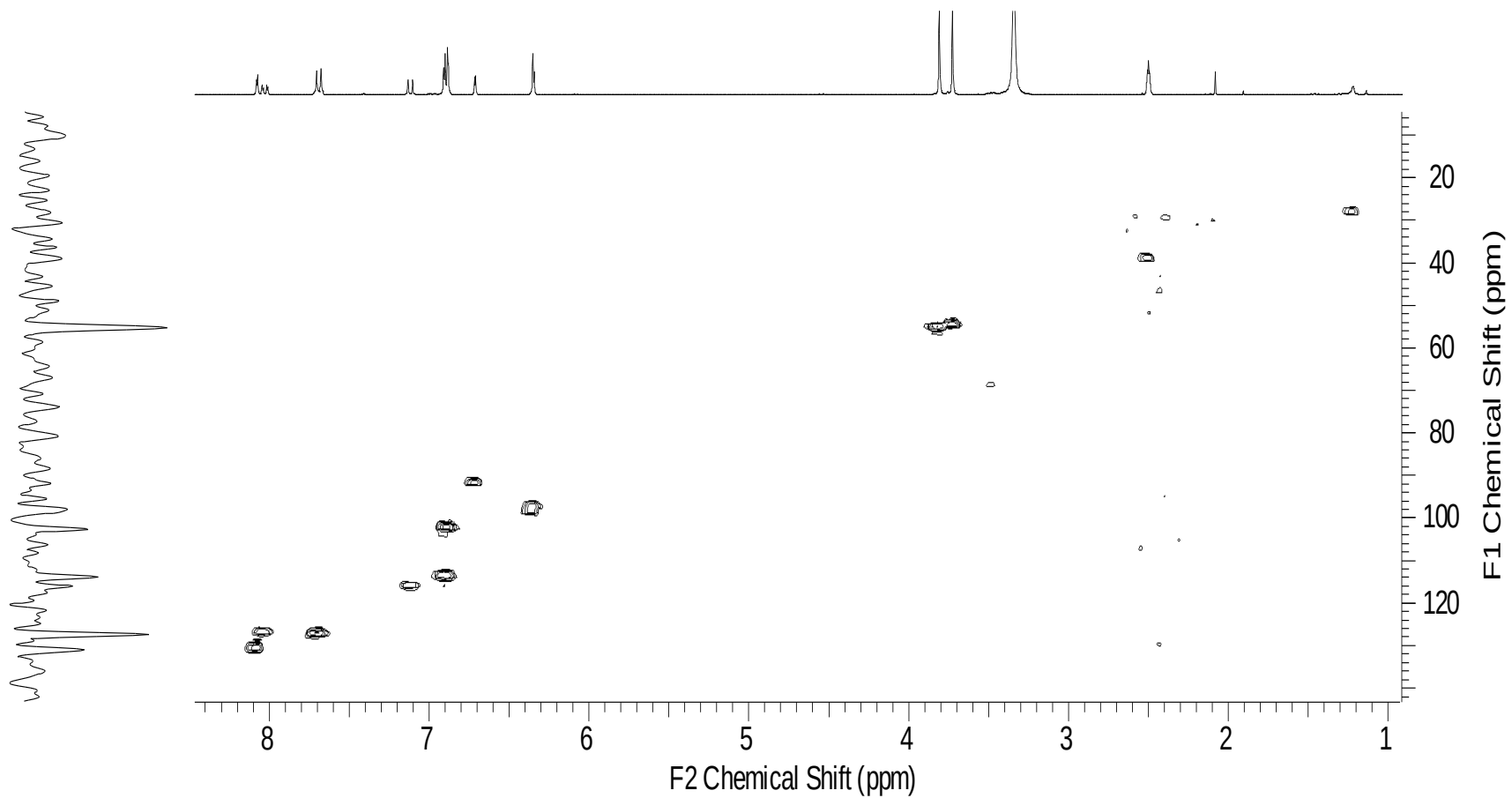


Figura 65: Mapa de contorno HSQC da 7,4''' dimetilamentoflavona (X).

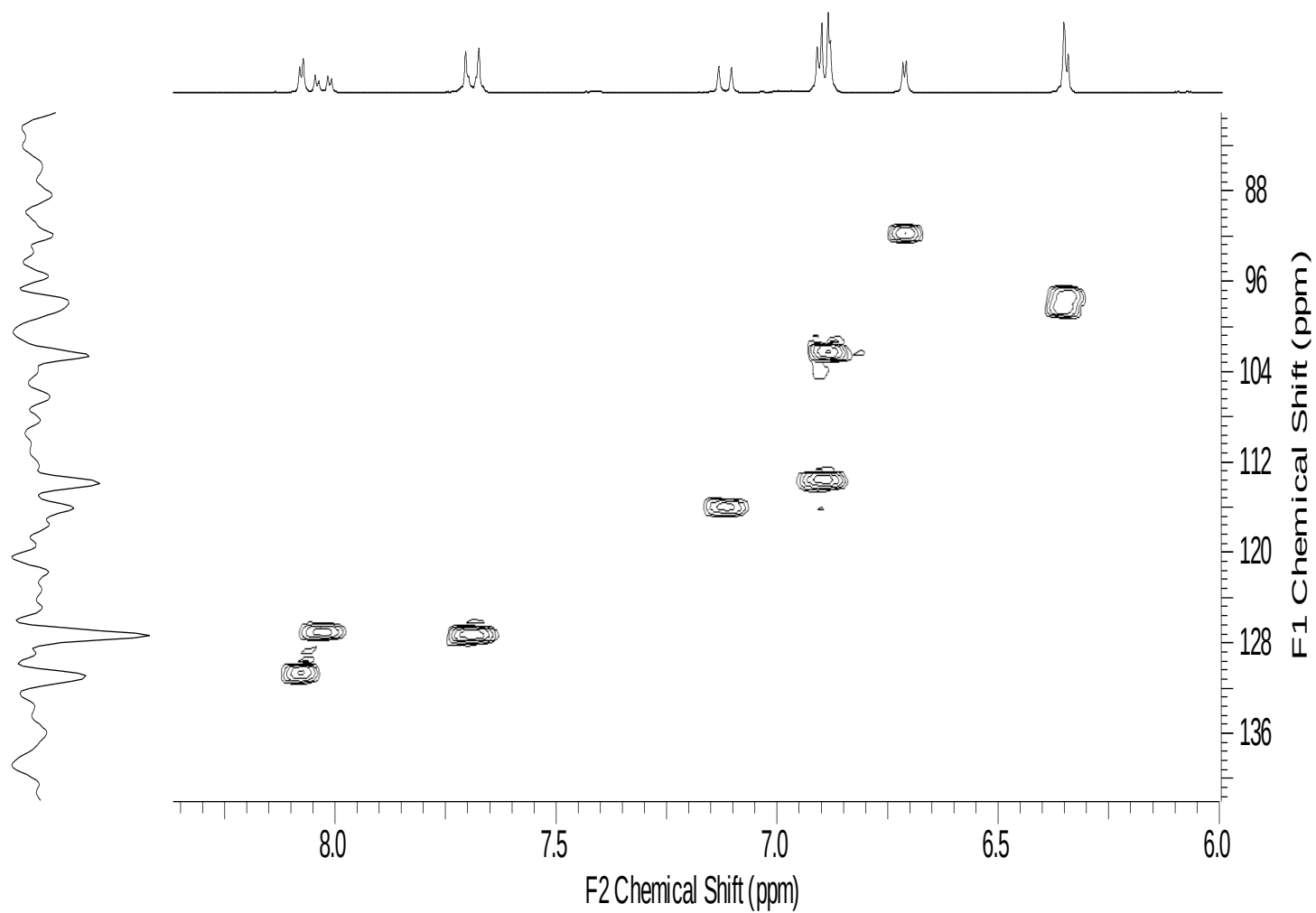


Figura 66: Mapa de contorno HSQC da 7,4'' dimetilamentoflavona (X).

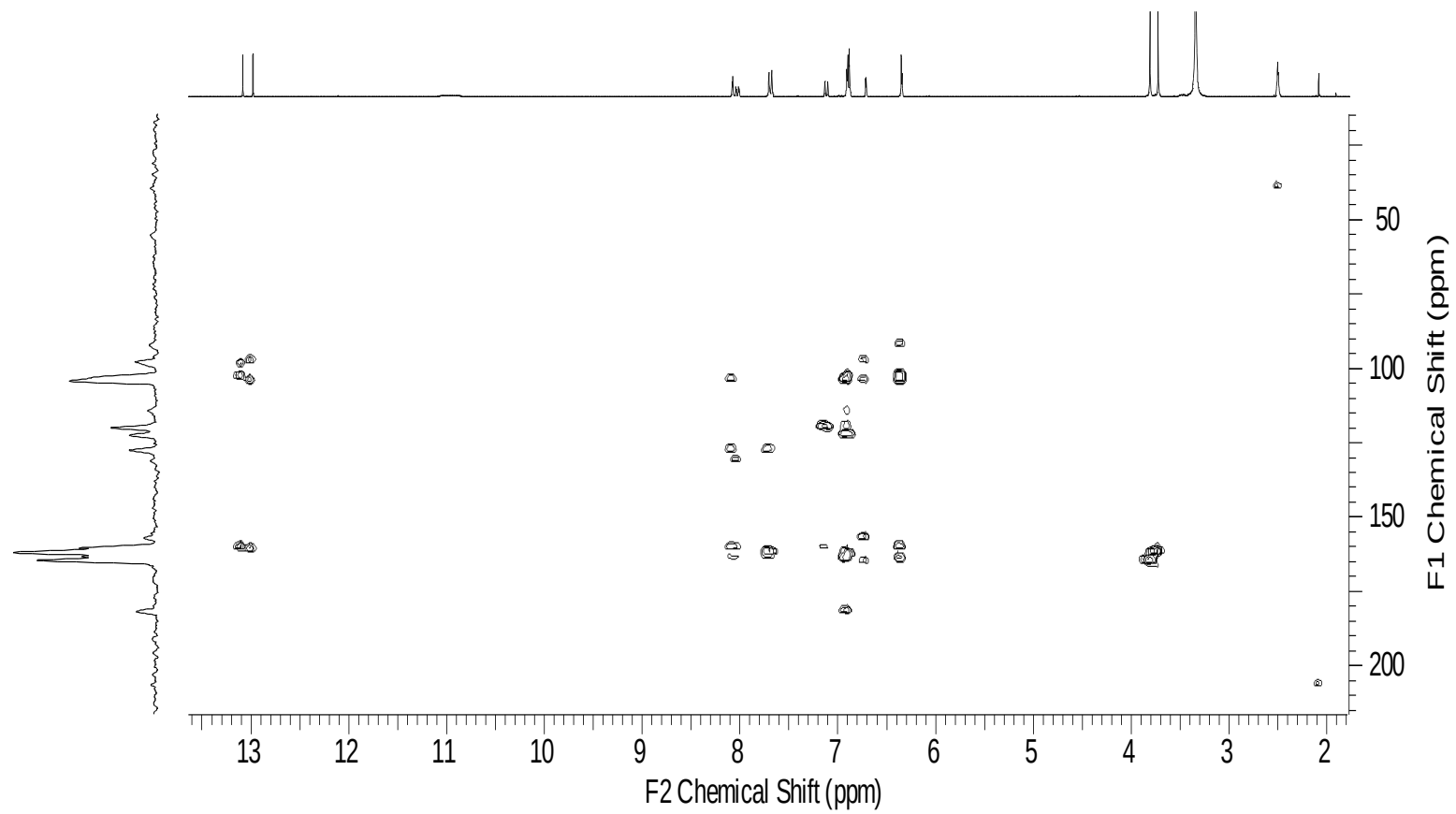


Figura 67: Mapa de contorno HMBC da 7,4'' dimetilamentoflavona (X)

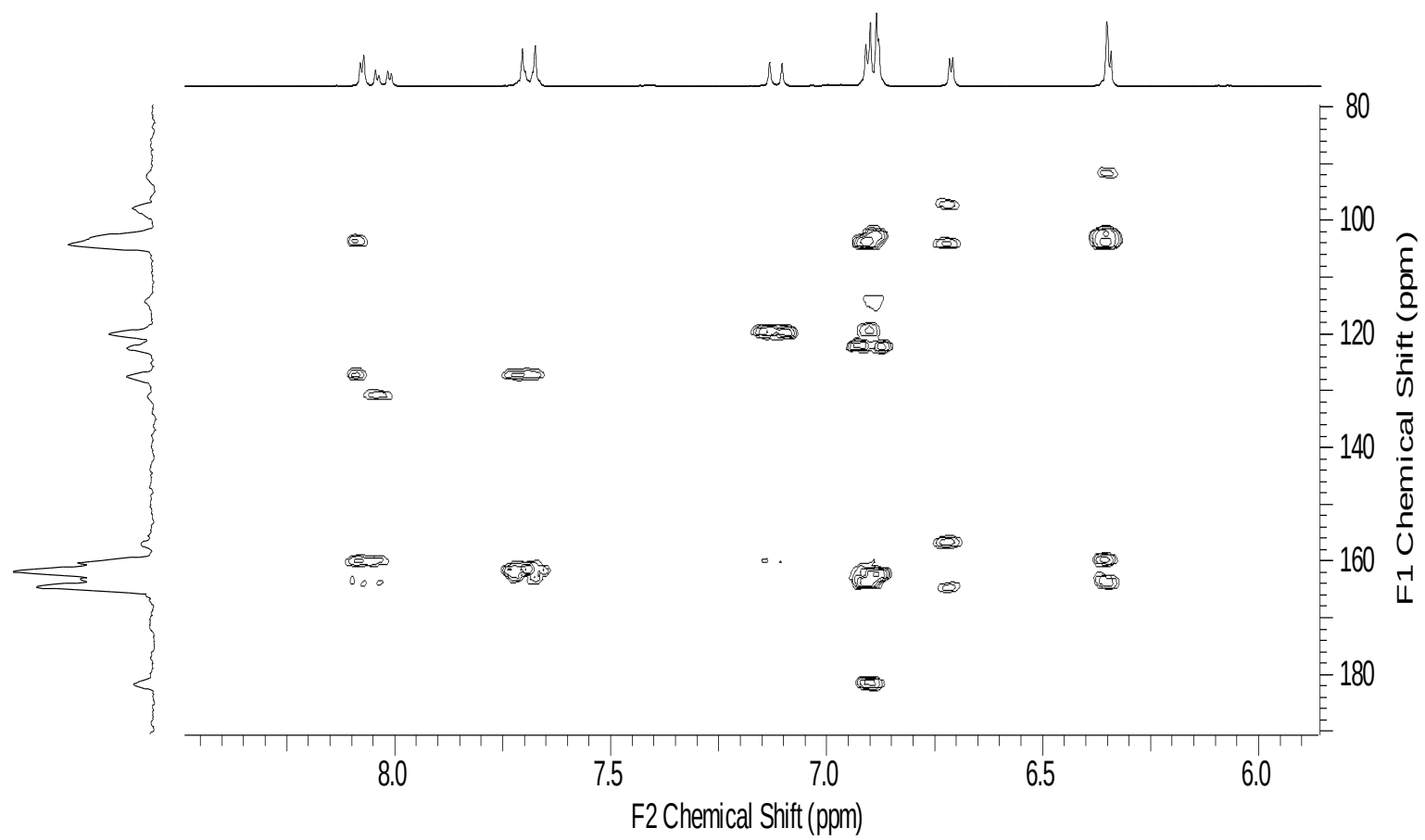


Figura 68: Mapa de contorno HMBC da 7,4''' dimetilamentoflavona (X).

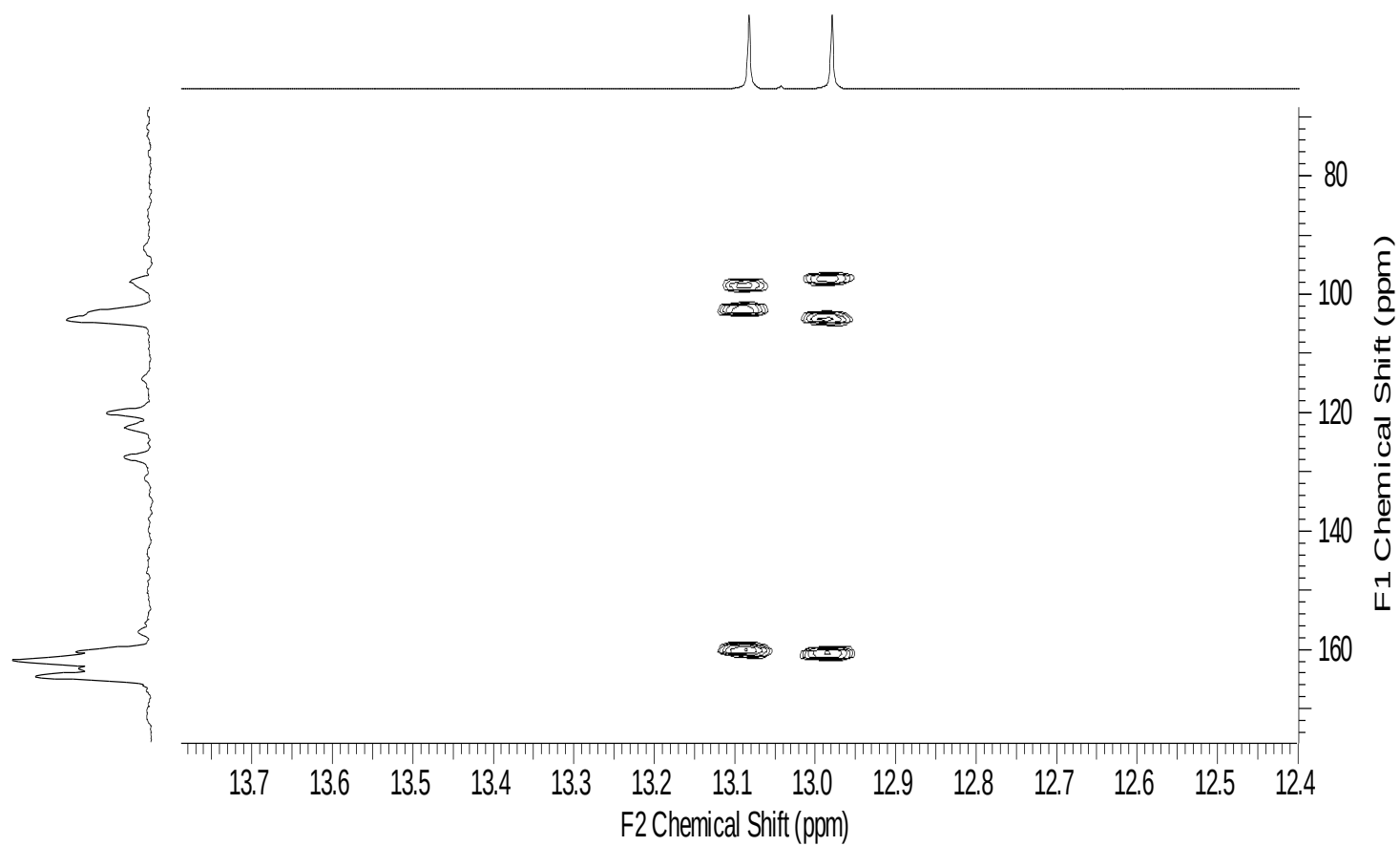


Figura 69: Mapa de contorno HMBC da 7,4'' dimetilamentoflavona (X).

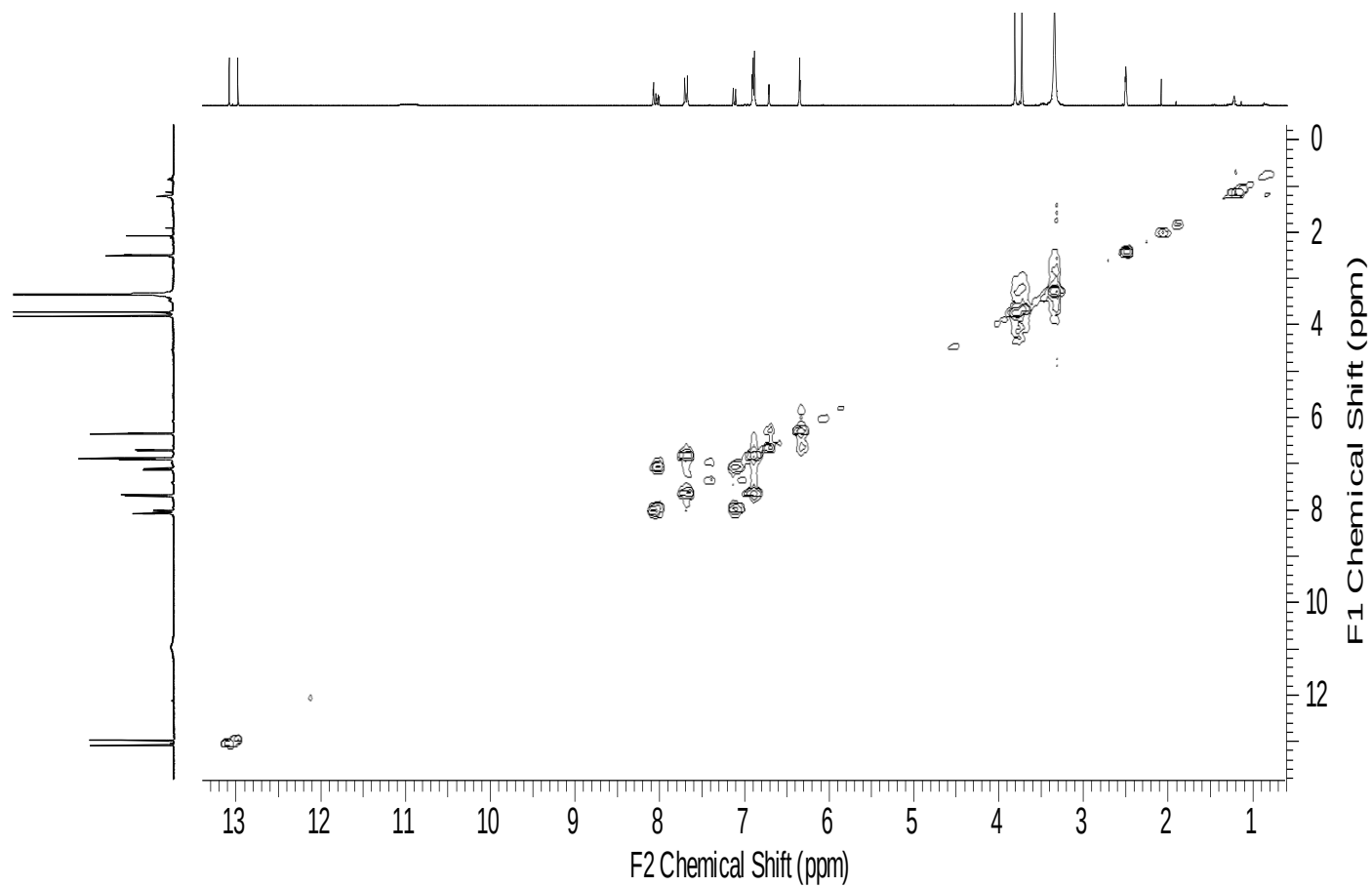


Figura 70: Mapa de contorno COSY da 7,4''' dimetilamentoflavona (X).

5.3.9 Substância XI: 3'-O-metil loniflavona

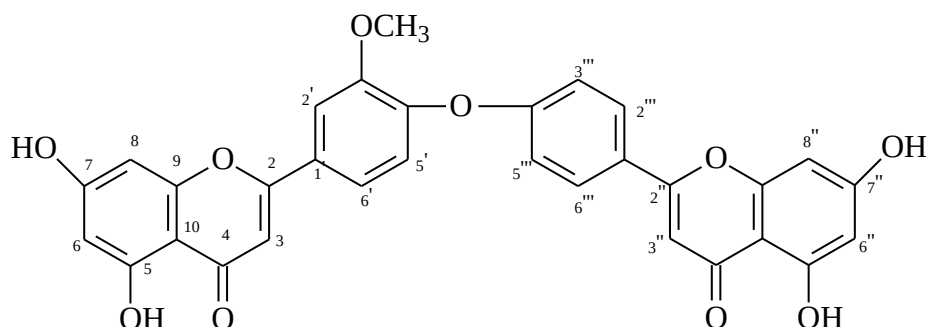


Figura 71: 3'-O-metil loniflavona (XI).

A substância **XI**, foi isolada da fase AcOEt do extrato metanólico. Ela forneceu um sólido amarelo solúvel em Acetona- d_6 , que apresentou R_f de 1,3 cm, quando eluída no sistema DCM/acetona 1:1 e coloração amarela quando revelada no anisaldeído sulfúrico e verde escuro quando revelado no cloreto férrico.

Ao analisar essa substância por espectrometria de massas de alta resolução via ionização por ESI, o espectro apresentou um íon de m/z 553,1107 $[M + H]^+$, compatível com a fórmula molecular $C_{31}H_{20}O_{10}$ (**XI**) (Figura 72) com Índice de deficiência de Hidrogênio (IDH) de 22.

Seu espectro de RMN de 1H mostrou vários sinais na região de alifáticos e aromáticos. Primeiramente observaram-se dois singletos em δ_H 12,95 e δ_H 12,84 correspondentes a hidroxilas queladas em OH-5 e OH-5'' características de biflavonóides.

Na região de hidrogênios de anéis aromáticos, foram observados dois doubletos em δ_H 6,38 (d , $J = 2,0$ Hz, H-6) e em δ_H 6,65 (d , $J = 2,0$ Hz, H-8) referentes ao anel A-I, além dos sinais em δ_H 7,17 (d , $J = 8,7$ Hz, H-2'), em δ_H 8,06 (d , $J = 2,0$ Hz, H-5') e um duplo doubleto em δ_H 7,91 (dd , $J = 8,5$ e $2,2$ Hz, H-6') referentes ao anel B-I. Também foi possível observar um singlete em δ_H 3,69 (s) característicos da metoxila em ligada no carbono 3'. Observou-se ainda um singlete em δ_H 6,66 (s, H-3) característicos do anel C-I.

Para a identificação do anel A-II foram observados dois doubletos em δ_H 6,20 (d , $J = 2,4$ Hz, H-6'') e em δ_H 6,38 (d , $J = 2,0$ Hz, H-8''), os sinais em δ_H

6,81 (*d*, *J*= 8,9 Hz, H-3''' e H-5''') e δ_H 7,66 (*d*, *J*= 8,7 Hz, H-6''') são referentes ao anel B-II. O sinal presente referente ao anel C-II foi apenas um singleto em δ_H 6,64 (*s*, H-3'') (Figura 73).

O mapa de contorno 2D de $^1H \times ^1H$ COSY, mostrou os acoplamentos entre os hidrogênios H-5' com H-6', H-2' com H-6', H-2''' com H-3''' e H-5''' com H-6''' respectivamente (Figura 77).

Ao analisar o mapa de contorno 2D de HSQC, verificou-se o acoplamento para 12 carbonos metínicos com seus respectivos hidrogênios (Figura 65). A atribuição dos deslocamentos químicos dos carbonos quaternários foi feito por meio da análise do mapa de contorno 2D HMBC ($^2J_{CH}$, $^3J_{CH}$ e $^4J_{CH}$) (Figura 78).

O mapa de contorno 2D HMBC mostrou vários acoplamentos entretanto, tem-se em destaque as ligações C-4' e C-4''' mostrando que ambos os flavonoides estão ligados por um oxigênio. Esta confirmação foi estabelecida pelo acoplamento a longa distância ($^4J_{CH}$) entre δ_C 156,4 (C-4') com δ_H 6,81 (H-3'''). Os acoplamentos a longa distância ($^3J_{CH}$) foram observados entre C-2 com H-6', C-3 com H-1', C-10 com OH-5, H-3, H-6 e H-8, além de C-6'' com OH-5'', H-10 respectivamente. Entretanto os acoplamentos entre δ_C 165,46 (C-3') com a metoxila em δ_H 3,66 (MeO-3') confirmaram a proposta da 3'-O-metil loniflavona (KUMAR, *et al*, 2005) (Tabela 27).

Tabela 27: Dados de RMN ^1H e $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (Acetona- d_6 , 300MHz) e 2D da substância 3'-O-metil Ioniflavona (XI)

Posição	HSQC		HMBC			COSY
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$^4\text{J}_{\text{CH}}$	HxH
2	160,0		H-3	H-6'		
3	103,17	6,66 (s)		H-1'		
4	182,94	-	H-3			
5	161,63	-	H-6, OH-5			
6	100,30	6,38 d (2,0)		OH-5		
7	164,99	-	H-6, H-8			
8	94,59	6,65 d (2,0)			H-6	
9	158,3	-	H-8			
10	104,24	-		OH-5, H-3, H-6, H-8		
1'	121,52	-	H-6'			
2'	115,72	7,17 d (8,7)	H-3'		H-5'	
3'	165,46	-		H-4'''		
4'	156,49	-				
5'	123,04	8,06 d (2,0)			H-2'	H-6'
6'	128,07	7,91 dd (8,7 e 2,0)	H-1',	H-4'		H-2'
2''	164,26	-	H-3''	H-6'''		
3''	103,37	6,64 (s)			H-1'''	
4''	182,94	-	H-3''			
5''	162,45	-	H-6'', OH-5''			
6''	99,57	6,20 d (2,0)		OH-5'', H-10'	H-9'	
7''	165,02	-				
8''	94,59	6,38 d (2,0)		H-6''		
9''	158,32	-			H-6''	
10'	104,49	-		H-6''		
1'''	123,67	-		H-3''		
2'''	128,63	7,66 d (8,7)			H-6'''	H-3'''
3'''	114, 80	6,82 d (8,9)	H-2'''			H-2'''
4'''	164,75	-			H-3'	
5'''	114, 80	6,82 d (8,9)	H-6'''	H-1'''		
6'''	128,63	7,66 d (8,7)		H-2''	H-2'''	
OH-5		13,07				
OH-5''		12,96				
3'-OCH₃	55,39	3,69 (s)	-	-		

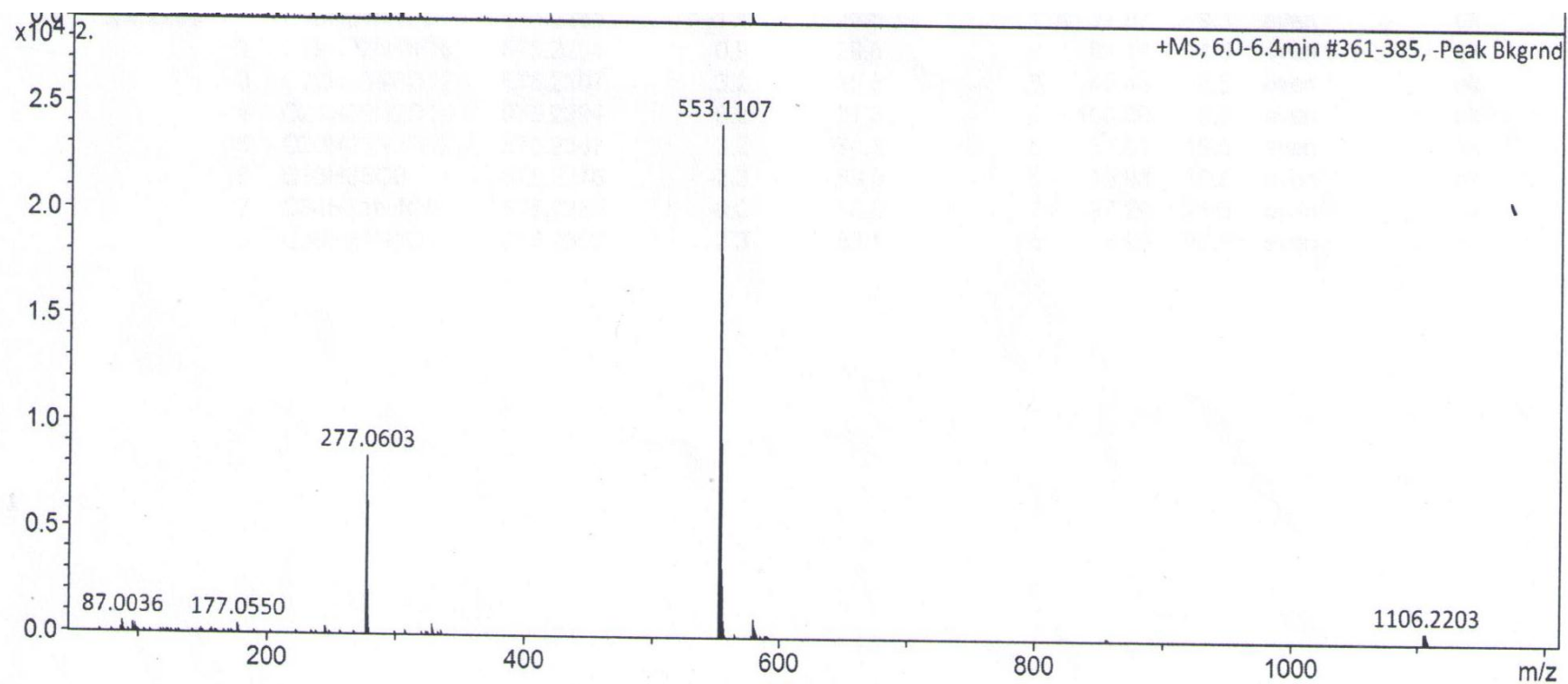


Figura 72: Espectro mostrando o íon m/z 553,1107 [M + H]⁺ referente a 3'-O-metil Ioniflavona (substância XI).

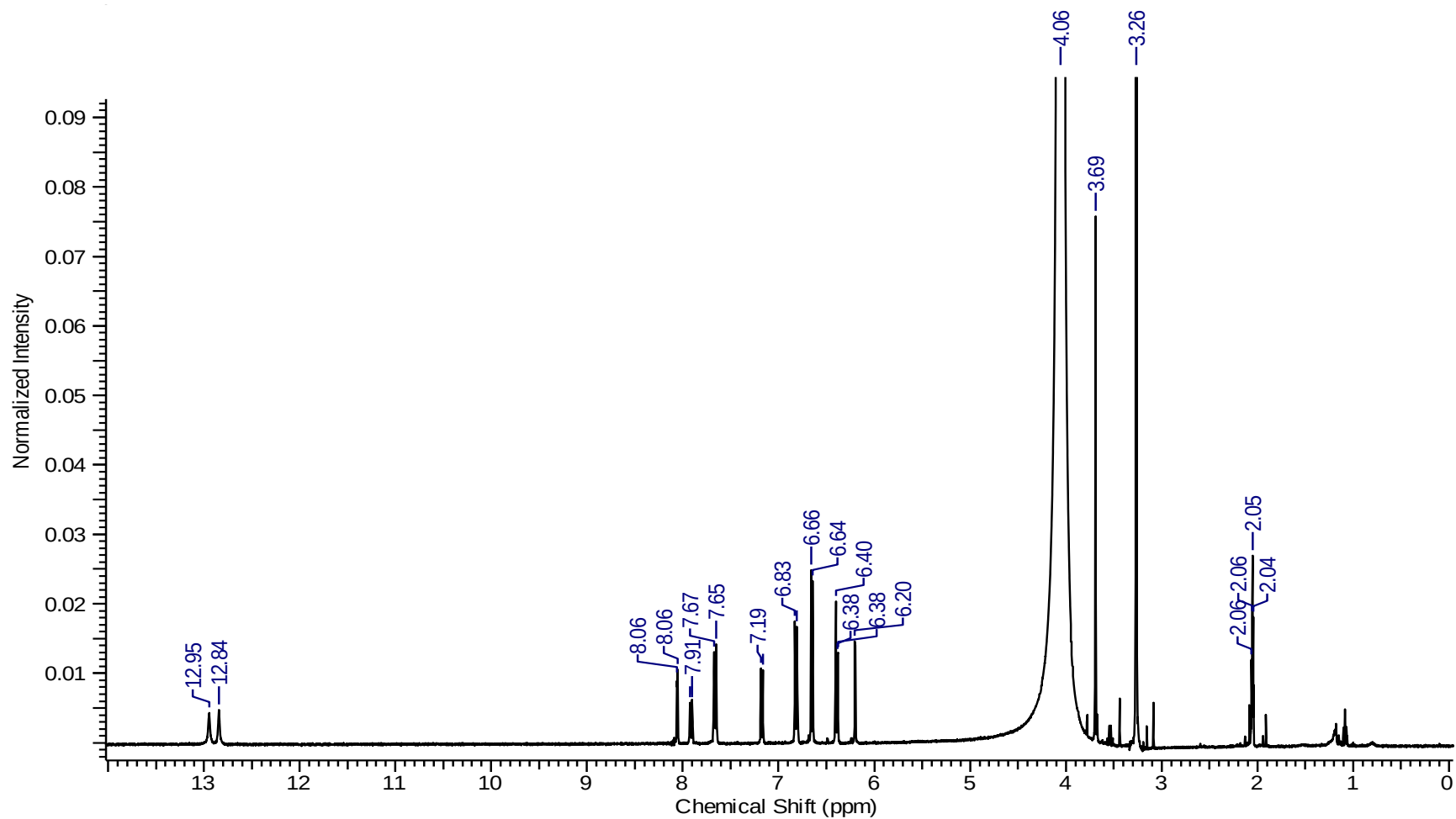


Figura 73: Espectro de RMN de ^1H (Acetona- d_6 , 300MHz) da 3'-O-metil Ioniflavona (XI).

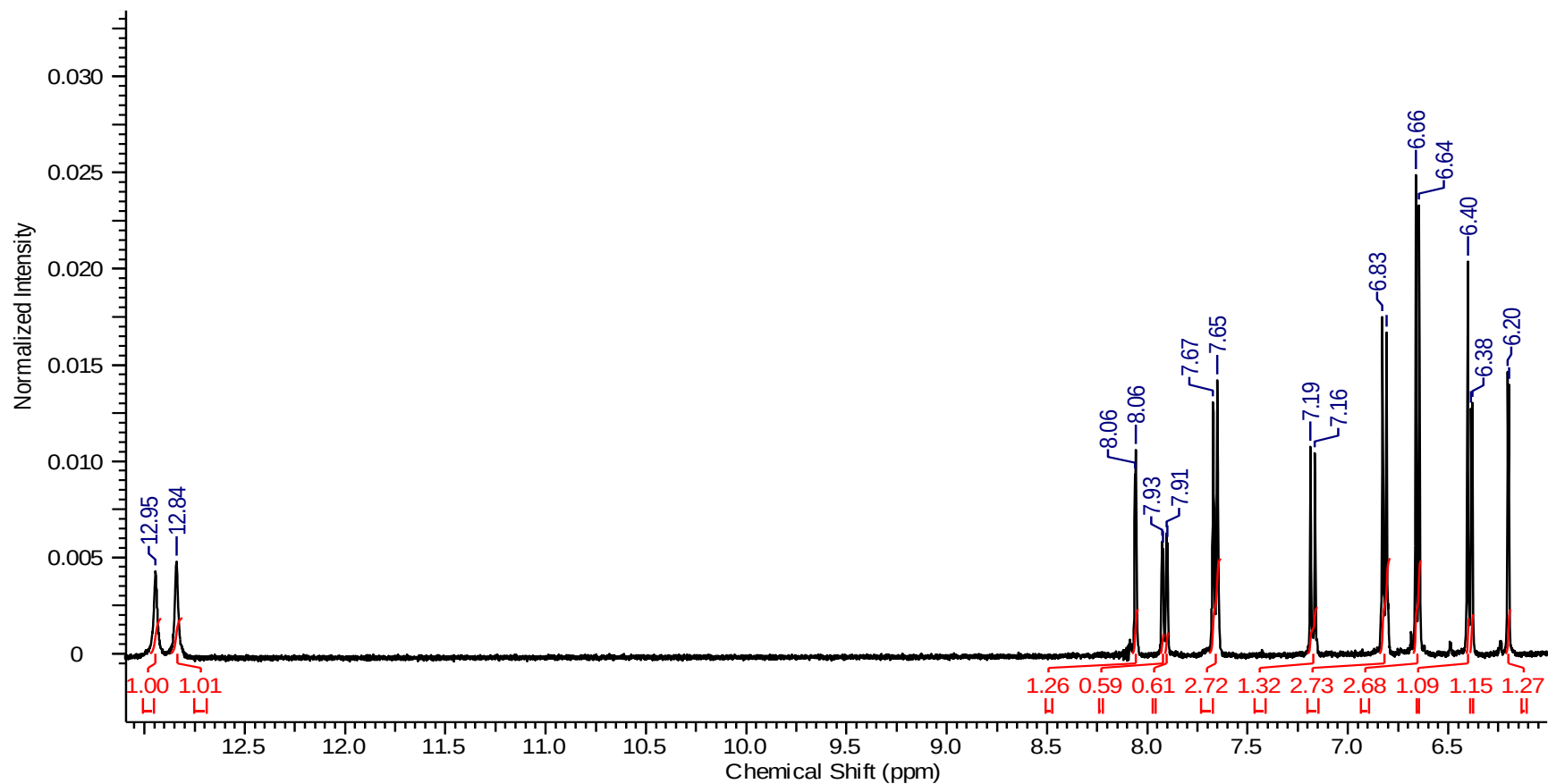


Figura 74: Expansão do espectro de RMN de ^1H (Acetona- d_6 , 300MHz) da 3'-O-metil Ioniflavona (XI).

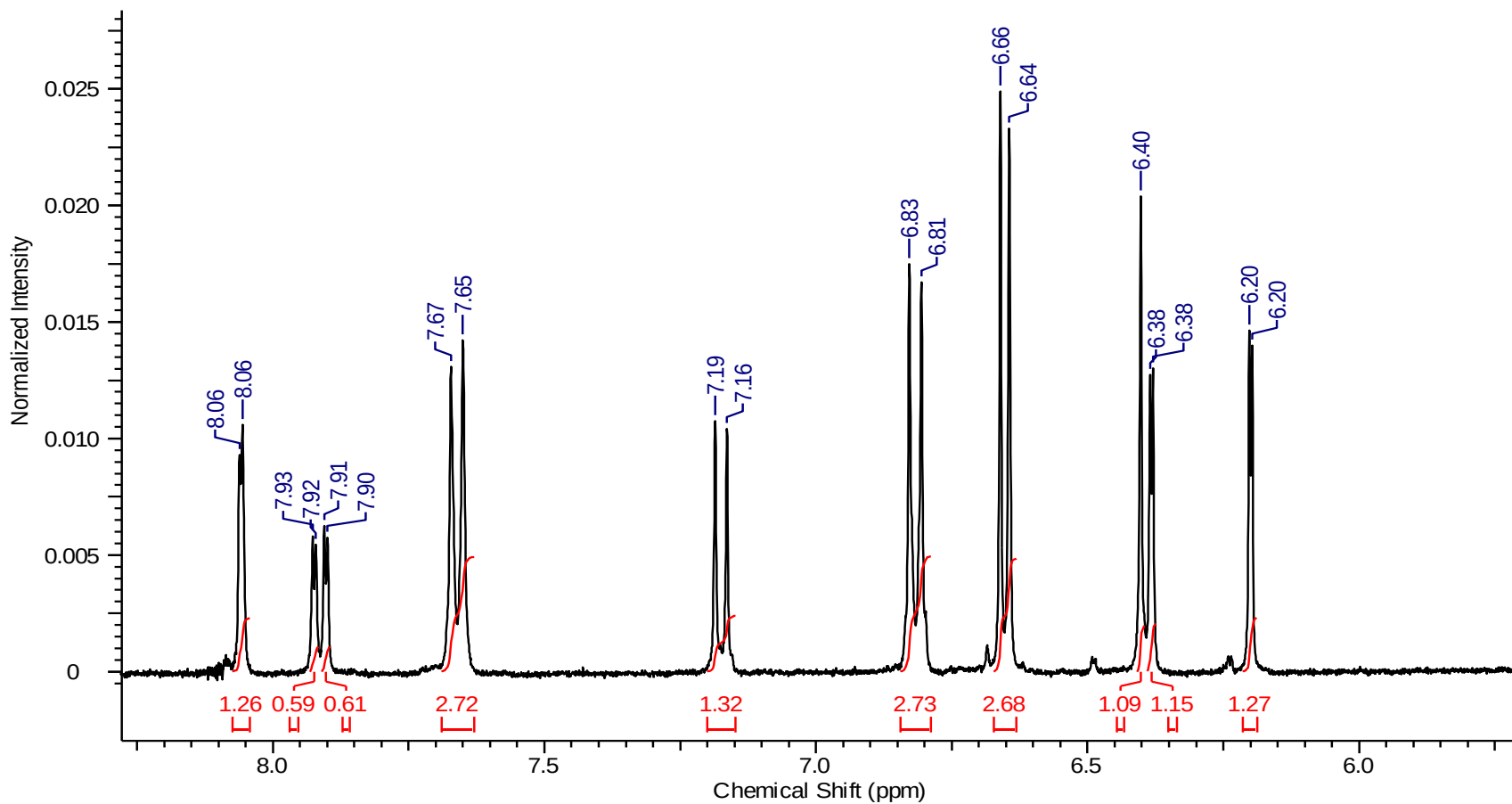


Figura 75: Expansão do espectro de RMN de ^1H (Acetona- d_6 , 300 MHz) da 3'-O-metil Ioniflavona (XI).

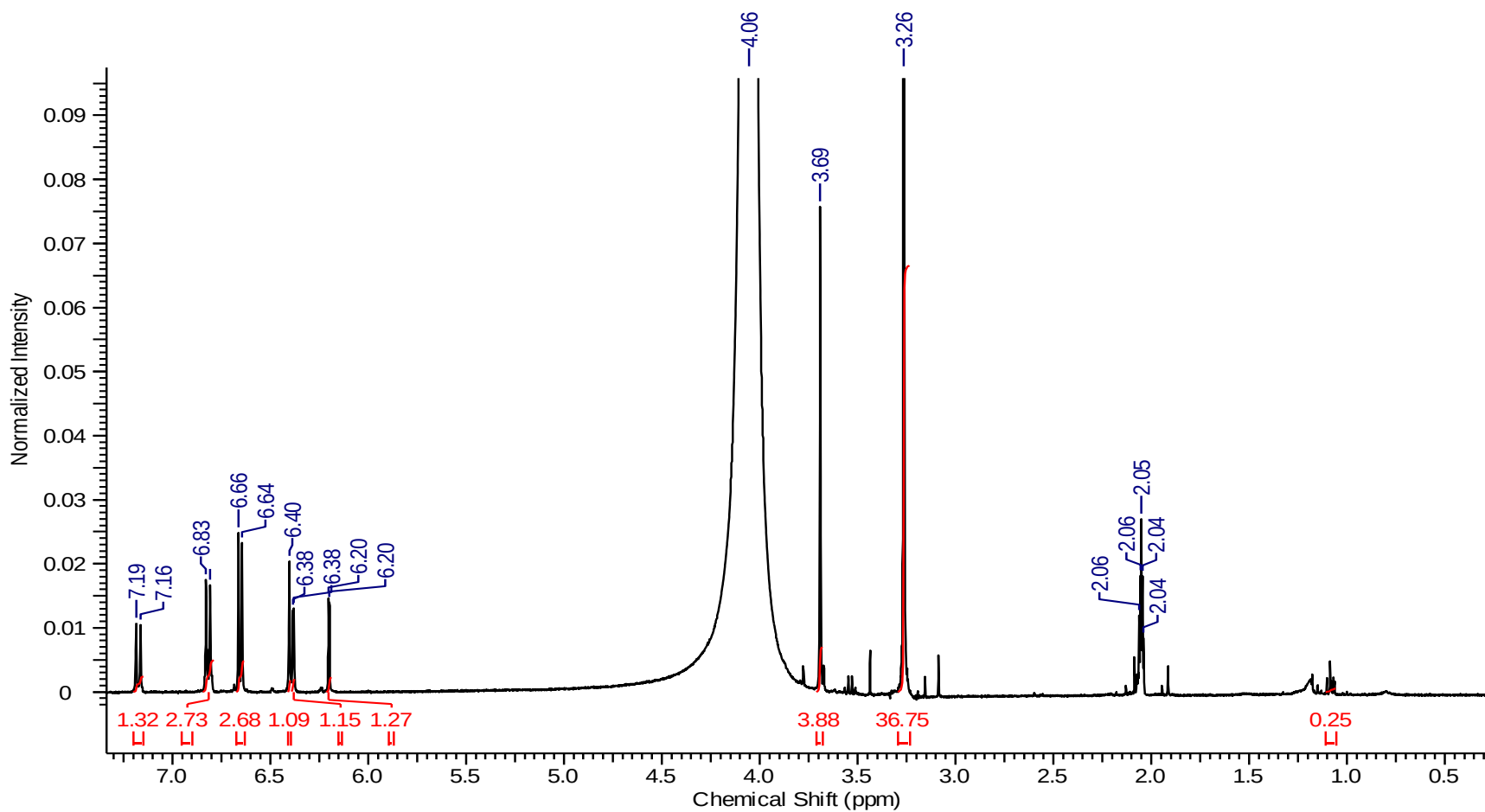


Figura 76: Expansão do espectro de RMN de ^1H (Acetona- d_6 , 300 MHz) da 3'-O-metil Ioniflavona (XI).

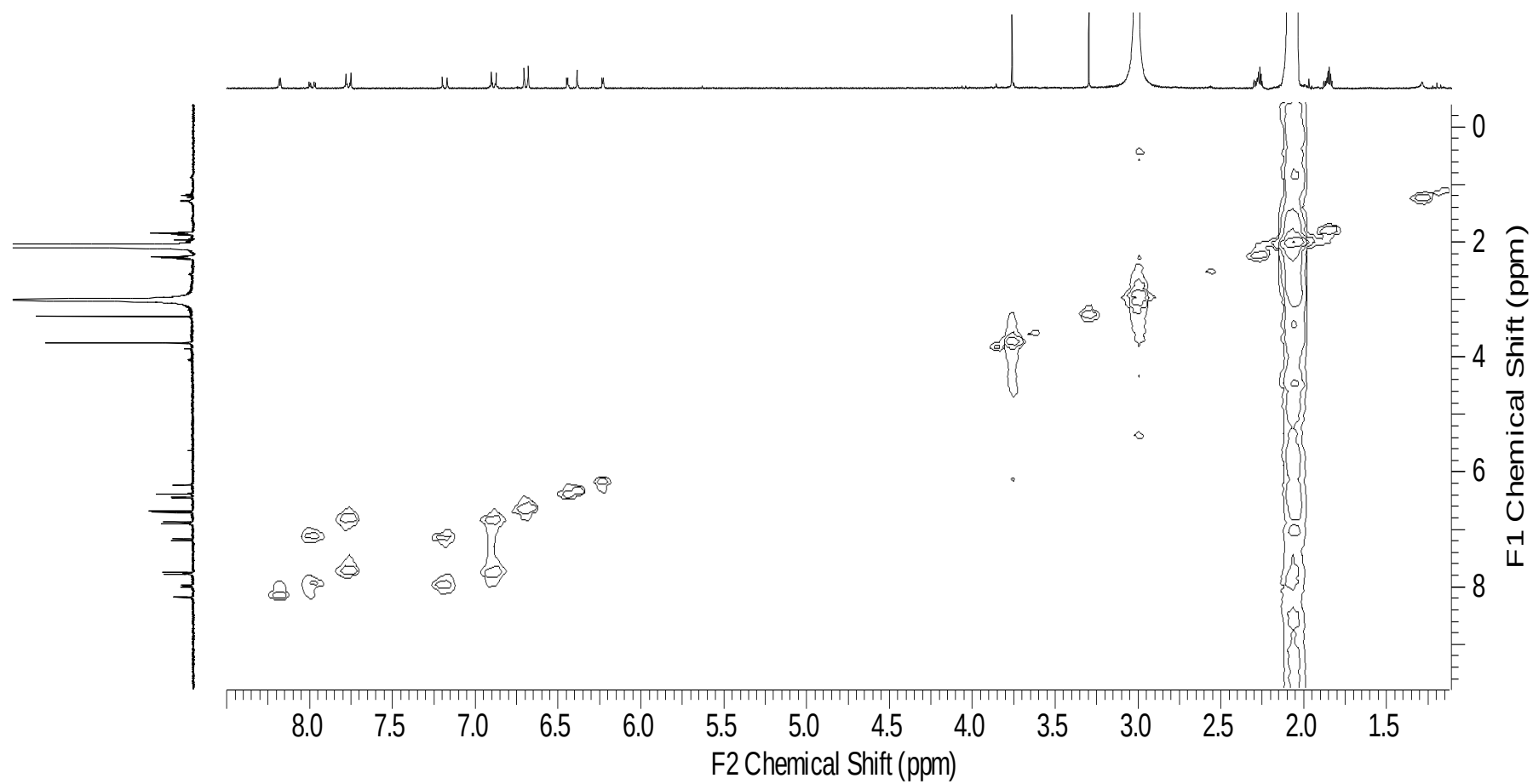


Figura 77: Mapa de contorno COSY da 3'-O-metil ioniflavona (XI).

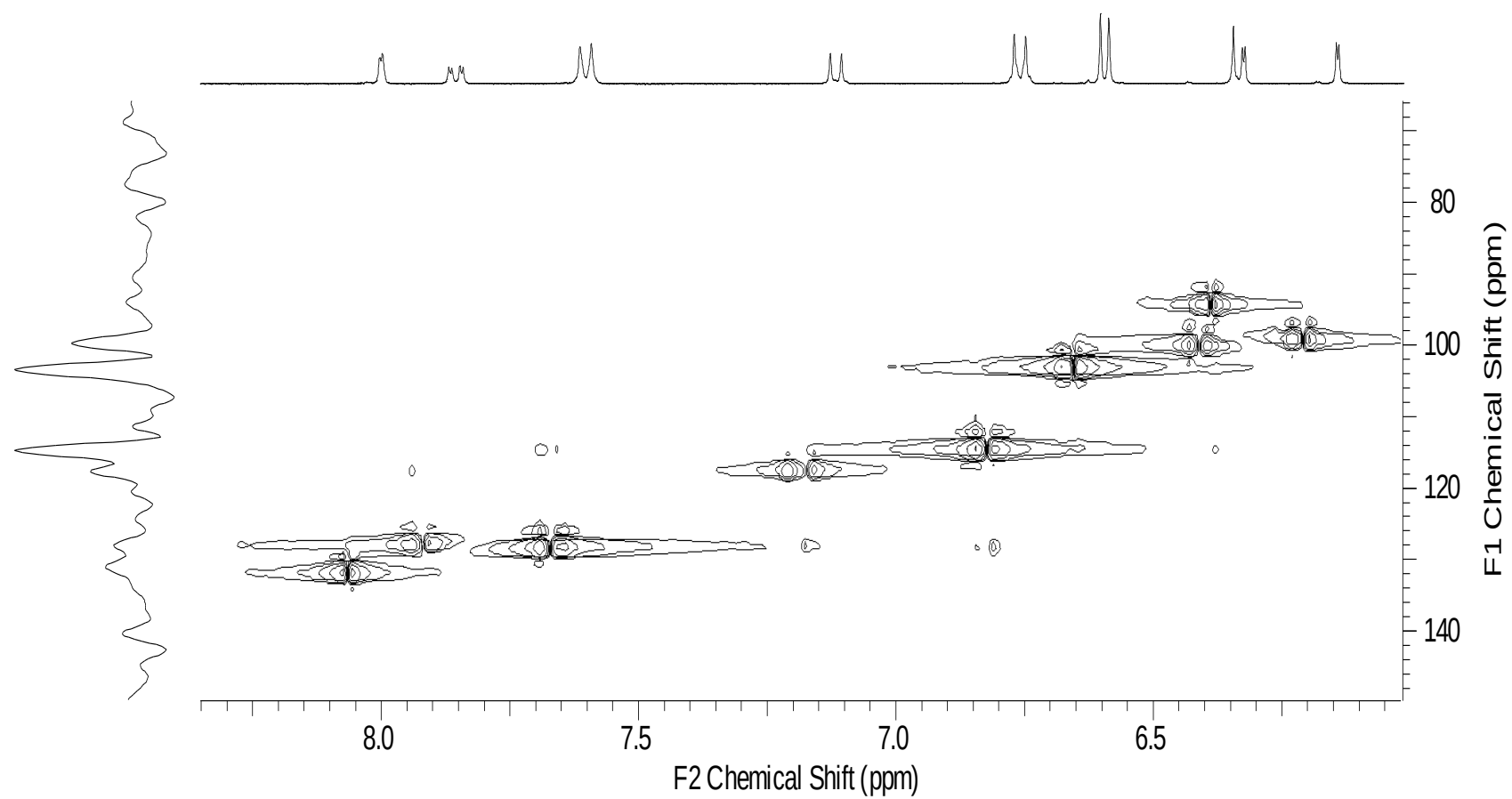


Figura 78: Mapa de contorno HSQC da 3'-O-metil Ioniflavona (XI).

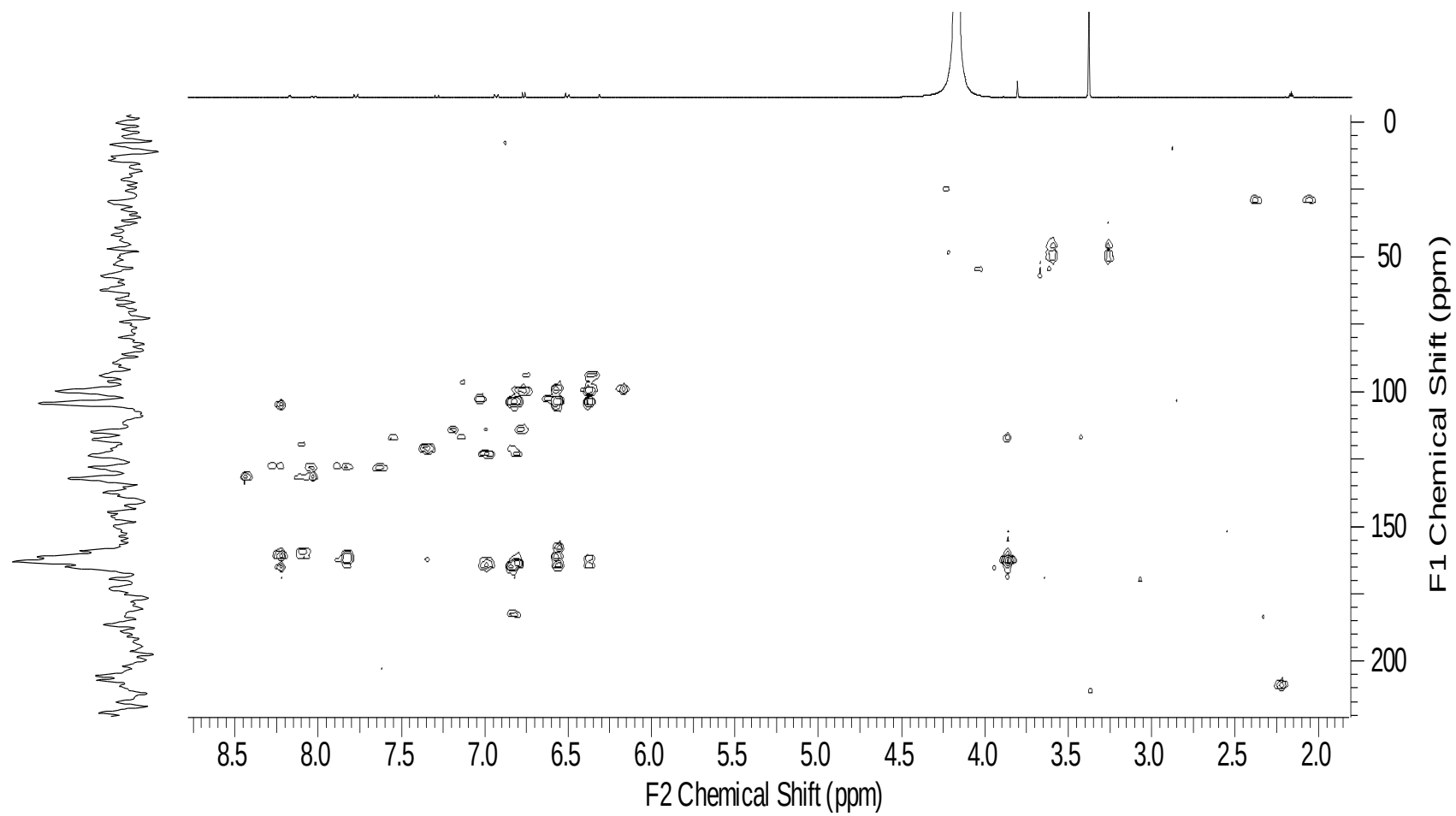


Figura 79: Mapa de contorno HMBC da 3'-O-metil Ioniflavona (XI).

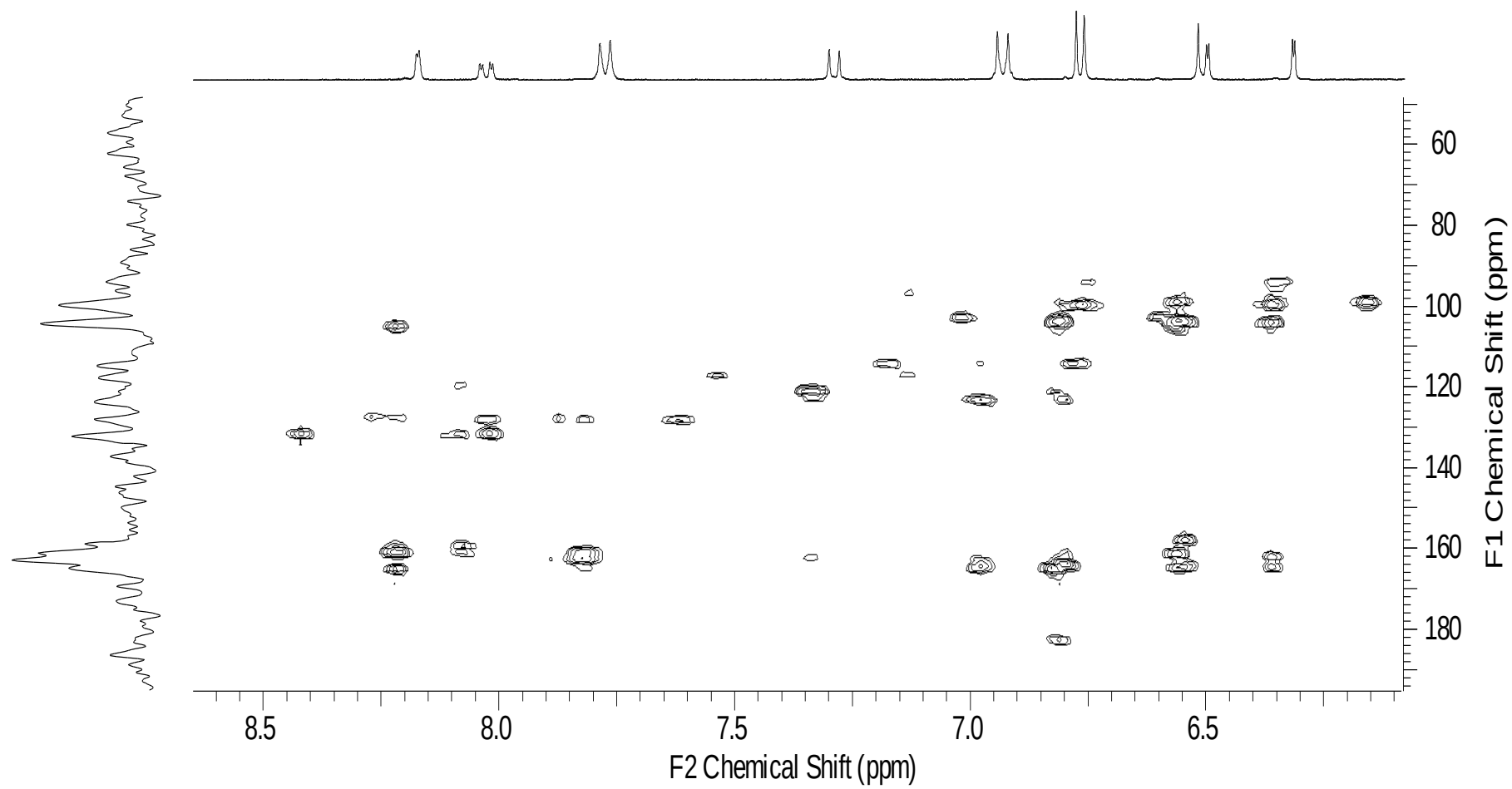


Figura 80: Expansão do mapa de bncontorno HMBC da 3'-O-metil Ioniflavona (XI).

5.4 Estudo químicos e biológico dos fungos endofíticos: Rendimento dos extratos e do caldo metabólito dos fungos endofíticos

Para os extratos dos fungos endofíticos, foram realizados primeiramente micro extratos com hexano e DCM, para verificar o rendimento.

Os micro extratos hexânicos apresentaram-se com rendimento muito baixo, entre 0,0040 à 0,0090 %, já os micro extratos de DCM apresentaram rendimento variando entre 0,0100 à 0,0261 %.

Com isso, a extração fitoquímica com maior massa micelial foi realizada com o DCM. Cada micélio foi extraído então com DCM e posteriormente com MeOH. Os valores das massas e rendimentos podem ser observados na tabela 28.

Tabela 28. Rendimento dos extratos DCM e MeOH dos fungos endofíticos obtidos da terceira coleta de *P. trifoliata*

Fungo	Solvente	Micélio (g)	Massa do extrato (g)	Rendimento (%)
Fungo 1	DCM	234,1	0,0721	0,0307
	MeOH	212,2	0,0991	0,0467
Fungo 2	DCM	142,3	0,0196	0,0137
	MeOH	129,4	0,2430	0,1877
Fungo 3	DCM	401,1	0,0687	0,0171
	MeOH	380,2	0,0910	0,0239
Fungo 4	DCM	155,4	0,7674	0,4938
	MeOH	128,3	0,342	0,2665
Fungo 5	DCM	230,3	0,1123	0,0487
	MeOH	209,1	0,2013	0,0962
Fungo 6	DCM	432,0	0,2167	0,0501
	MeOH	402,1	0,1520	0,0378
Fungo 7	DCM	384,2	0,2760	0,0718
	MeOH	342,0	0,1995	0,0583

Fungo 8	DCM	284,3	0,0365	0,0128
	MeOH	261,0	0,0435	0,0166
Fungo 9	DCM	304,4	0,2860	0,0939
	MeOH	280,3	0,0281	0,0100

Após a obtenção dos extratos, os caldos nutritivos foram submetidos a partições líquido-líquido com os solventes DCM e AcOEt.

Seus rendimentos foram significativos, principalmente a fase AcOEt do caldo metabólito 5 (0,3464 g) e a fase DCM do caldo metabólito 4 (0,7674 g) (Tabela 29).

Tabela 29. Massas obtidas das partições líquido-líquido com o caldo metabólito

Partição	Fase DCM	Fase AcOEt
Líquido- líquido	Massa (g)	Massa (g)
Caldo 1	0,0746	0,1729
Caldo 2	0,1585	0,2198
Caldo 3	0,0319	0,1674
Caldo 4	0,7674	0,0096
Caldo 5	0,0431	0,3464
Caldo 6	0,1167	0,1604
Caldo 7	0,0914	0,1001
Caldo 8	0,1884	0,1345
Caldo 9	0,1444	0,1241

5.5 Análise fitoquímica por CCDC dos extratos e caldo metabólico obtidos dos fungos endofíticos de *P. trifoliata*

Após a filtração do caldo metabólico, foi realizada uma partição líquido-líquido para cada fungo como descrito no item 4.5. Estas fases foram analisadas em placas cromatográficas e reveladas com os reveladores físicos 254 nm, 365 nm e os reveladores químicos iodo ressublimado e anisaldeído sulfúrico. O sistema de eluição utilizado foi DCM/Acetona 1:1 para todas as fases DCM. O revelador físico no comprimento de onda 254 nm, não mostrou coloração ou fluorescência quando visualizado, entretanto, quando analisado no comprimento de onda 365 nm, foram observados manchas com coloração azul escuro (Figura 81 A).

Afim de verificar a persistência dessas manchas e detectar sua possível classe química, a placa cromatográfica foi revelada com cloreto de alumínio, $AlCl_3$, específico para detecção de flavonoides, e visualizada novamente no comprimento de onda 365 nm.

Após esta análise, pode-se confirmar a presença de substâncias fenólicas presentes nas fases principalmente dos fungos 2 ao 9 (Figura 81 B). Além disso, observou-se também a presença de ligações duplas conjugadas presentes principalmente nas fases 1, 2, 3, 5 e 6, respectivamente, através da revelação com iodo ressublimado (Figura 81 C).

Outra CCDC foi preparada com o mesmo sistema das CCDC descritas em A, B e C, e ao ser revelada com anisaldeído sulfúrico observou-se uma coloração verde escuro. Como o anisaldeído é um revelador universal, não foi possível afirmar essa classe químicas (Figura 81 D).

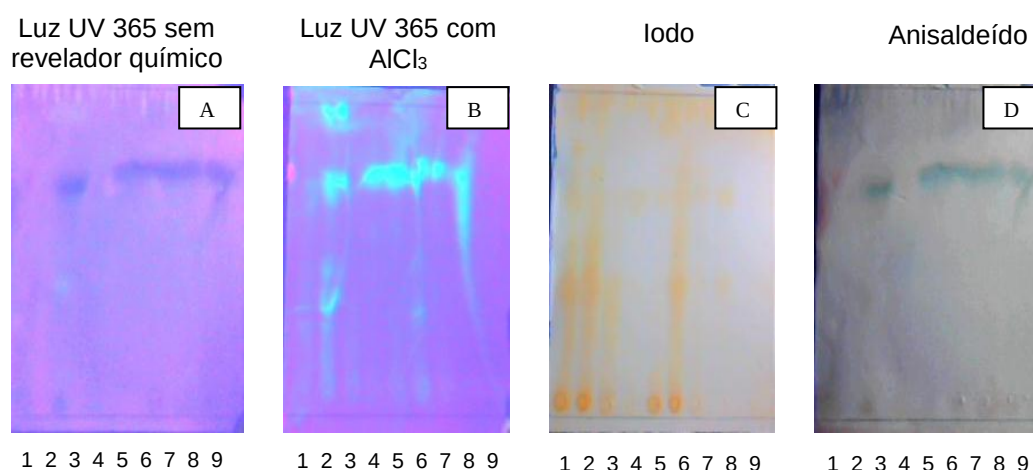


Figura 81: Fases DCM dos caldos nutritivos dos fungos da coletas 3, eluídas com DCM/Acetona 1:1 e reveladas com luz UV 365 nm antes da aplicação do revelador anisaldeído (A), após a aplicação do revelador AlCl_3 e UV 365 nm (B), com iodo resublimado (C) e com anisaldeído (D).

5.6 Análise das fase DCM e AcOEt obtida dos caldos metabólicos dos fungos endofíticos de *P. trifoliata* por RMN de ^1H

Após a análise por CCDC das fases DCM do caldo metabólico, foi realizada a análise de RMN de ^1H para identificar as possíveis classes químicas. Os espectros das fases com mesma polaridade foram analisados em conjunto.

Foram observados principalmente os sinais em δ_{H} 0,7–1,10 ppm característicos de metilas, um sinal bem intenso em δ_{H} 1,25 referente a hidrogênios de CH_2 de cadeia alifática, em δ_{H} 3,00–5,00 ppm característicos de hidrogênios de carbonos carbinólicos, sinais em δ_{H} 6,00–8,00 ppm, referentes a sinais de hidrogênios de anéis aromáticos bem como os sinais em δ_{H} 12,4 que podem ser referentes a hidrogênio de grupos carboxilados ou hidrogênio quelado da posição 5 de flavonoide (Figura 82).

Verificou-se ainda, algumas similaridades nos deslocamentos químicos dos espectros das fases 4, 7, 8 e 9, que apresentaram um sinal em 12 ppm

com intensidade significativa, referente a hidroxila quelada ou grupos carboxilados, já as fases 5 e 6 também apresentaram este mesmo sinal, entretanto, com menor intensidade.

Os sinais referentes aos hidrogênios de anel aromático, também apresentaram semelhança, principalmente entre as fases 4, 7, 8 e 9, mostrando a existência de uma estrutura com o mesmo esqueleto básico ou a presença de uma substância majoritária entre as fases.

Como esses espectros são de fases e conseqüentemente estão em misturas, não foi possível identificar as substâncias presentes, entretanto esses sinais são característicos de classes de compostos bioativos como: flavonoides, cumarinas, terpenos ou substâncias com ligações duplas conjugadas (SANIL, et al 2015, SEM, et al 2013, ZHONG e SHAHIDI, 2012).

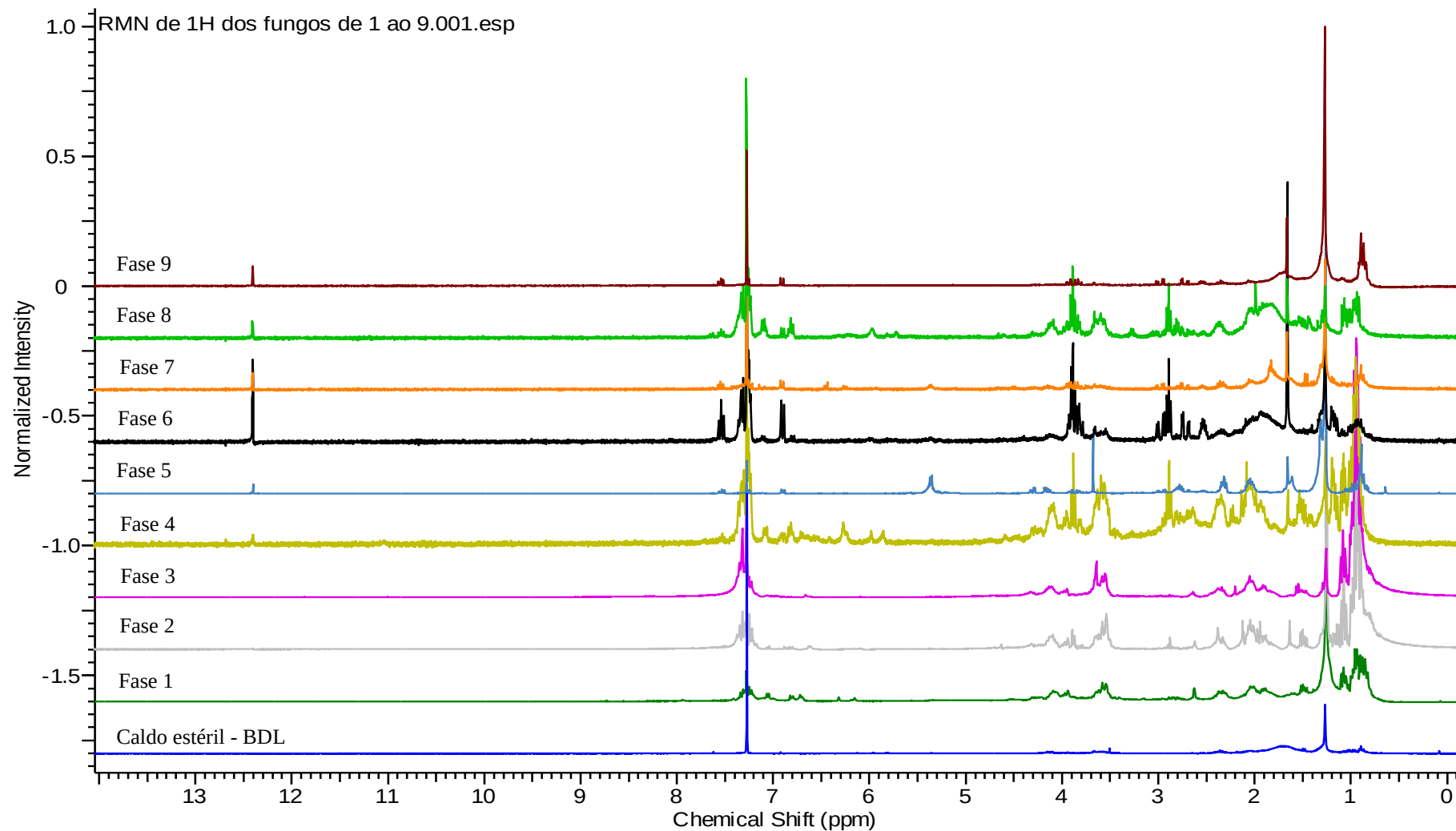


Figura 82: Espectros de RMN de 1H (CDCl_3) das Fases DCM obtida do caldo metabólito dos fungos endófitos de 1 ao 9.

Em seguida, foi realizada a análise de RMN de ^1H de todas as fases do AcOEt dos caldos metabólitos. Os espectros também foram reunidos em grupos e comparados.

Observaram-se os sinais entre δ_{H} 0,70 a 1,20 ppm característicos de metilas de terpenos, os sinais entre δ_{H} 3,0 – 4,5 ppm característicos de hidrogênios de carbonos carbinólicos, além de sinais menos intensos na região entre δ_{H} 6,50 a 7,50 ppm, referentes a substâncias aromáticas (Figura 83).

Ao comparar esses espectros com o do caldo estéril, observou-se que não houve a obtenção significativa de metabólitos secundários nessas fases, pois, grande parte dos sinais obtidos, são similares aos sinais do caldo estéril, havendo apenas a concentração de metabólitos primários.

Além disso, observou-se que o fungo de número 5 apresentou-se na forma de um óleo. Esse óleo foi filtrado e enviado pra análise de RMN de ^1H onde detectou a presença de um triglicerídeo, o espectros de RMN de ^1H está descrito na página 164, figura 90.

O triglicerídeo foi confirmado com os sinais em δ_{H} 0,88 referentes aos hidrogênios das metilas dos ácidos graxos, em δ_{H} 1,30 atribuído aos hidrogênios de grupos metilênicos de cadeias alifáticas. O sinal entre δ_{H} 2,0 e 2,02 é atribuído aos hidrogênios ligados aos carbonos β da dupla ligações entre carbonos. O sinal entre δ_{H} 2,2 e 2,3 é atribuído aos hidrogênios de carbonos β do éster, o sinal entre δ_{H} 4,1 e 4,3 são referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos do glicerol. Os sinais entre δ_{H} 5,26 a 5,36 correspondem aos hidrogênios de ligações duplas. Esses dados forma comparados com os da literatura, confirmando ser um triglicerídeo (Guillén e Ruiz 2001) (Figura 84).

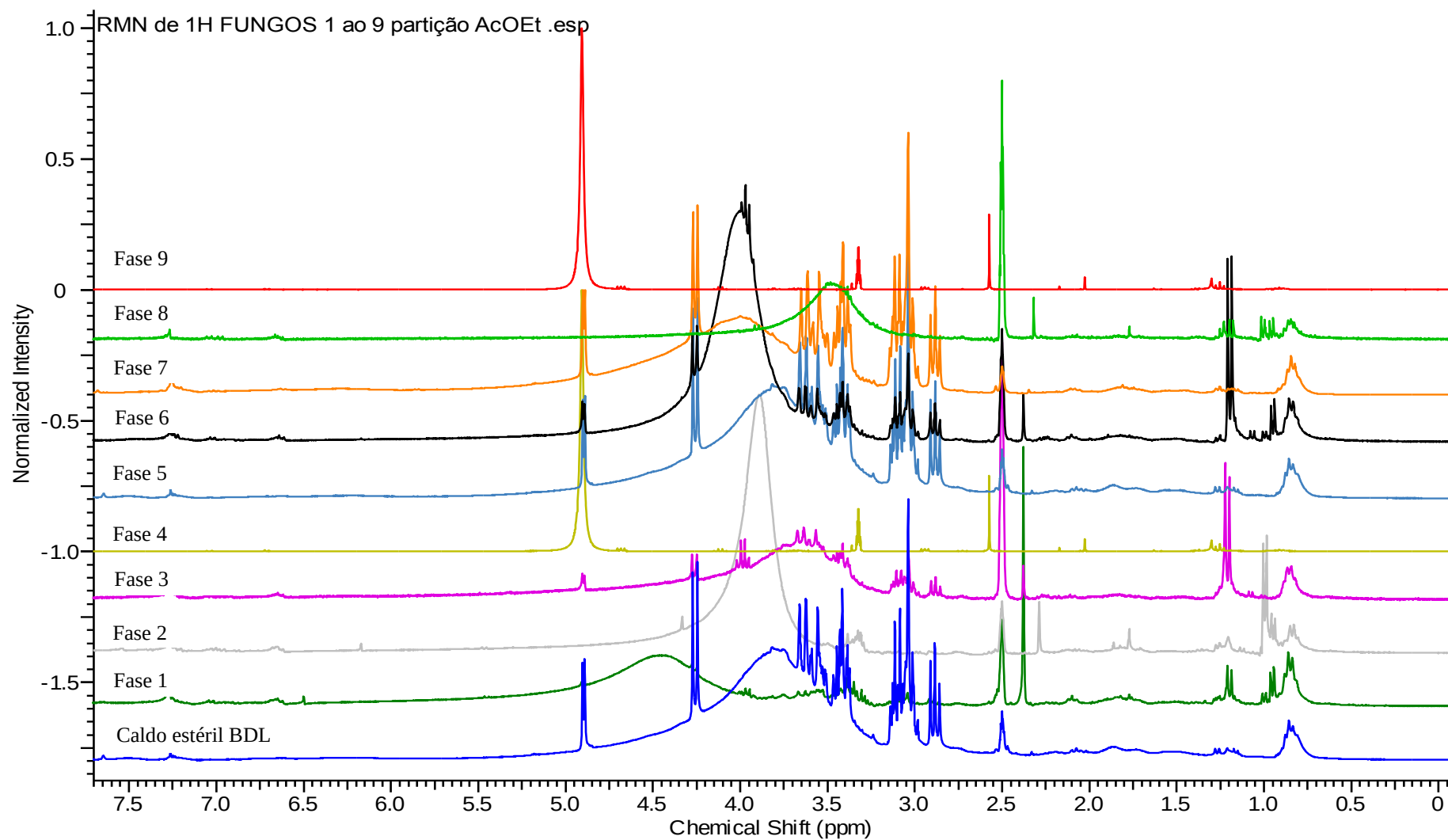


Figura 83: Espectros de RMN de 1H (das Fases AcOEt obtida do caldo metabólito dos fungos endofíticos de 1 ao 9.

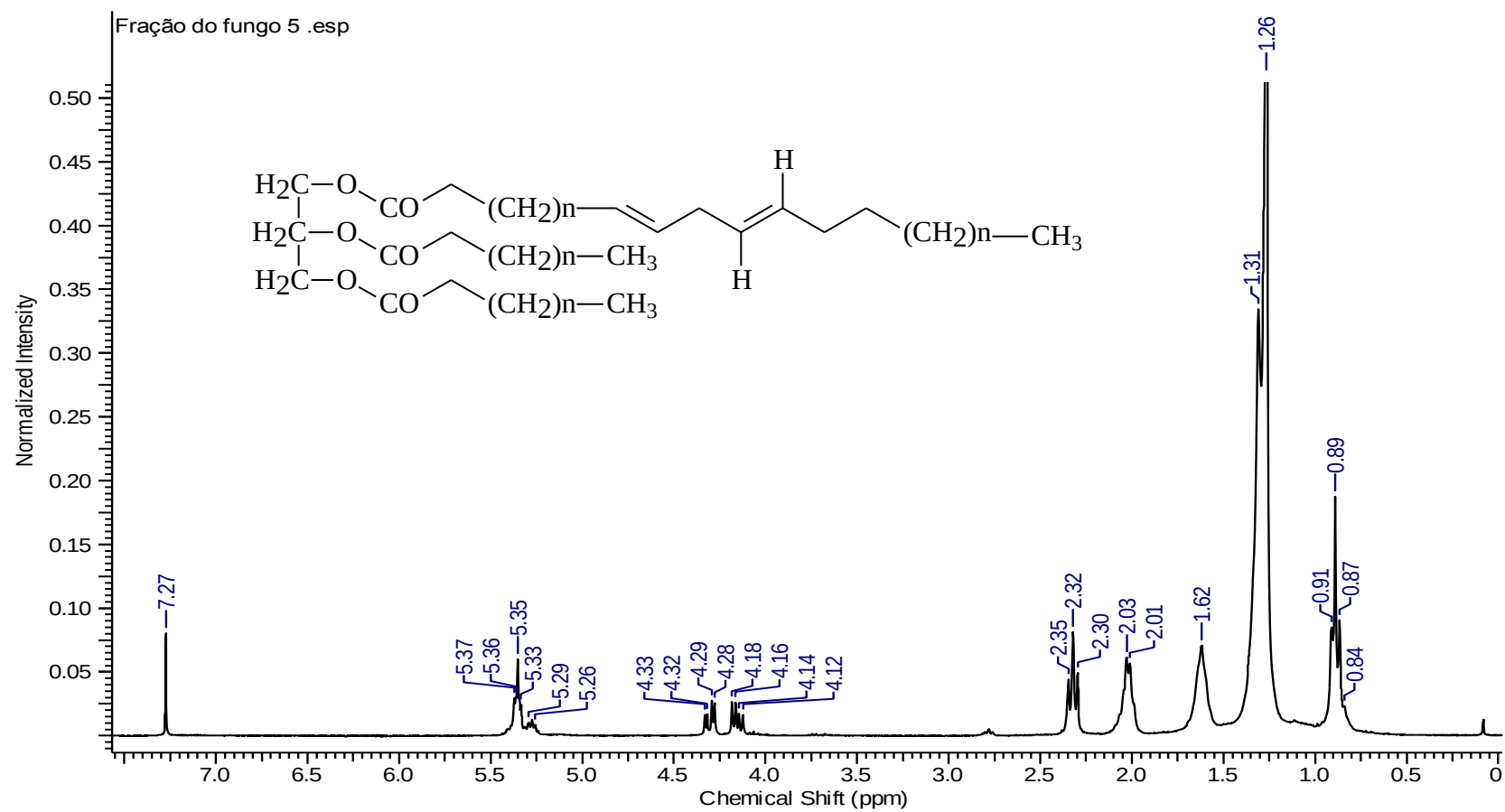


Figura 84: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da fração 2-3 isolada da fase AcOEt do fungo 5.

5.7 Análise dos extratos DCM e MeOH obtidos do micélio dos fungos endofíticos de *P. trifoliata* por RMN de ^1H

Em seguida, foi realizada a análise de RMN de ^1H dos extratos dos micélios dos fungos. Os espectros foram reunidos em dois grupos, os extratos DCM e os extratos MeOH.

Os espectros de RMN de ^1H dos extratos DCM dos micélios, apresentaram pouca semelhança quando comparados com os espectros da fase DCM do caldo metabólico.

Foram observados principalmente os sinais em δ_{H} 0,6–1,10 ppm característicos de metilas, vale ressaltar que o sinal em 0,6 ppm é característicos de esteroides, além desse pode-se observar também um sinal bem intenso em δ_{H} 1,25 referente a hidrogênios de CH_2 de cadeia alifática, em δ_{H} 3,00 – 4,5 ppm característicos de hidrogênios de carbonos carbinólicos, os sinais em δ_{H} 6,00–8,00 ppm, referentes a sinais de hidrogênios de anéis aromáticos foram visualizados com baixa intensidade somente nos extratos de número 1, 2, 6 e 7, bem como os sinais em δ_{H} 12,3 no fungo 2 e δ_{H} 12,4 no fungo 7 que podem ser referentes a hidrogênio de grupos carboxilados ou hidrogênio quelado da posição 5 de flavonoide (Figura 85).

Ao comparar esses espectros com os triterpenos isolados das folhas, (JEFFREYS, 2011; JEFFREYS e NUNEZ, 2016) observou-se que nenhum deles possuem similaridades com relação ao seu esqueleto base, podendo concluir que os triterpenos presentes nos extratos do micélio dos fungos, possuem esqueleto base diferente dos esqueletos do tipo friedelano, lupano além dos esqueletos do tipo ursano da α -amirina e oleanano da β -amirina.

Entretanto, pode-se observar uma grande similaridade nos espectros dos extratos 1 e 2, com a presença dos sinais nas regiões das metilas, olefínicos e aromáticos. Além desses, observou-se um sinal em 12,4 ppm característico de hidroxila quelada, presente no extrato 2 e ausente no extrato 1, o que caracteriza a diferença entre eles.

A figura 93 mostra a reunião de todos os espectros obtidos do extratos DCM dos micélios dos fungos endofíticos de *P. trifoliata*.

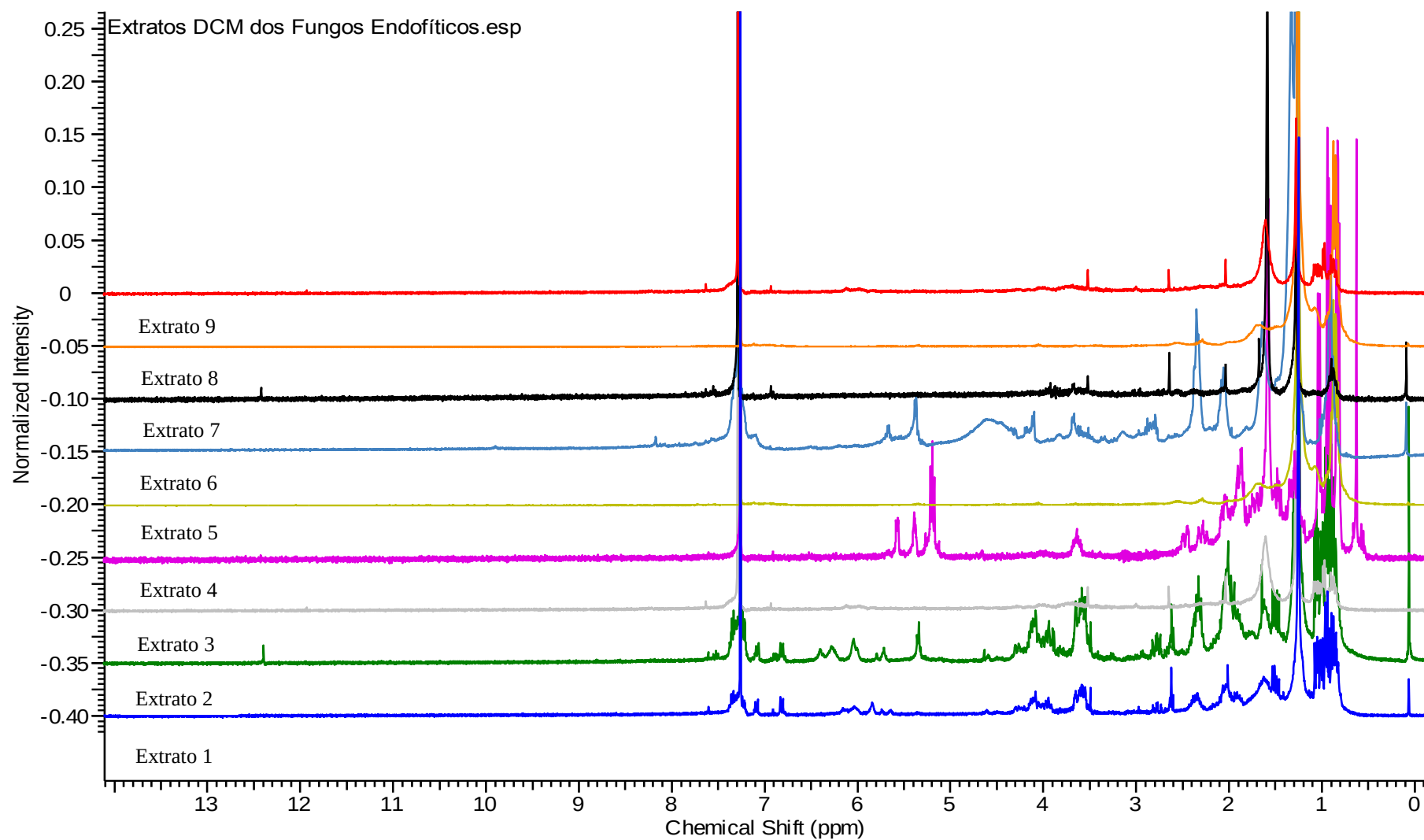


Figura 85: Espectros de RMN de ^1H dos extratos DCM obtida do micélio dos fungos endofíticos de 1 ao 9.

Em seguida, todos os espectros dos extratos MeOH dos micélios dos fungos foram reunidos e analisados em conjunto.

Dentre as classes químicas presentes nos extratos metanólicos, tem-se os flavonoides, cumarinas e demais compostos fenólicos devido a sua polaridade (ALBARICI et al, 2010; UMASHANKAR et al, 2015)

Pela análise de RMN de ^1H , observaram-se os sinais entre δ_{H} 0,70 a 1,25 ppm característicos de metilas de terpenos, os sinais entre δ_{H} 3,00–5,00 ppm característicos de hidrogênios de carbonos carbinólicos, além de sinais em δ_{H} 6,50 a 7,50 ppm, referentes a substâncias aromáticas (Figura 86).

Ao analisar os espectros separadamente de alguns extratos que se mostraram interessantes quimicamente, observou-se que o extrato de número 8, apresentou dois dubletos característicos de aromáticos com grande intensidade em δ_{H} 6,96 ppm (*d*, 1H, *J*= 8,38 Hz) e δ_{H} 6,64 ppm (*d*, 1H, *J*= 8,38 Hz), além dos sinais em δ_{H} 7,03 ppm (*d*, 1H, *J*= 8,5 Hz) e δ_{H} 6,62 ppm (*d*, 1H, *J*= 8,5 Hz) ambos acoplando entre si.

O espectro de número 4, também apresentou sinais bem interessantes com a presença de dois dubletos em δ_{H} 6,97 ppm (*d*, 1H, *J*= 8,57 Hz) e δ_{H} 6,64 ppm (*d*, 1H, *J*= 8,38 Hz) e de dois tripletos metinêlicos em δ_{H} 4,69 ppm (*t*, 1H, *J*= 5,7 e 11,5 Hz) e δ_{H} 2,87 ppm (*t*, 1H, *J*= 11,5 e 5,7 Hz), além de sinais de graxa. Ao comparar esses dados com os da literatura, observou-se que a substância majoritária pode ser um derivado da tirosina (SOUSA, 2005).

Ao analisar o extrato de número 7 e 9 respectivamente, observou-se que além dos sinais na região de aromáticos, ambos possuem multipletos entre δ_{H} 3,08 a 3,62 ppm além do dubleto em δ_{H} 5,31 ppm que podem ser característicos de açúcar. Segundo Gubiani (2011) a evidencia desses sinais, confirmaram a presença de açúcar no extrato CH_3CN de milho-branco. Todos os espectros estão reunidos na figura 86.

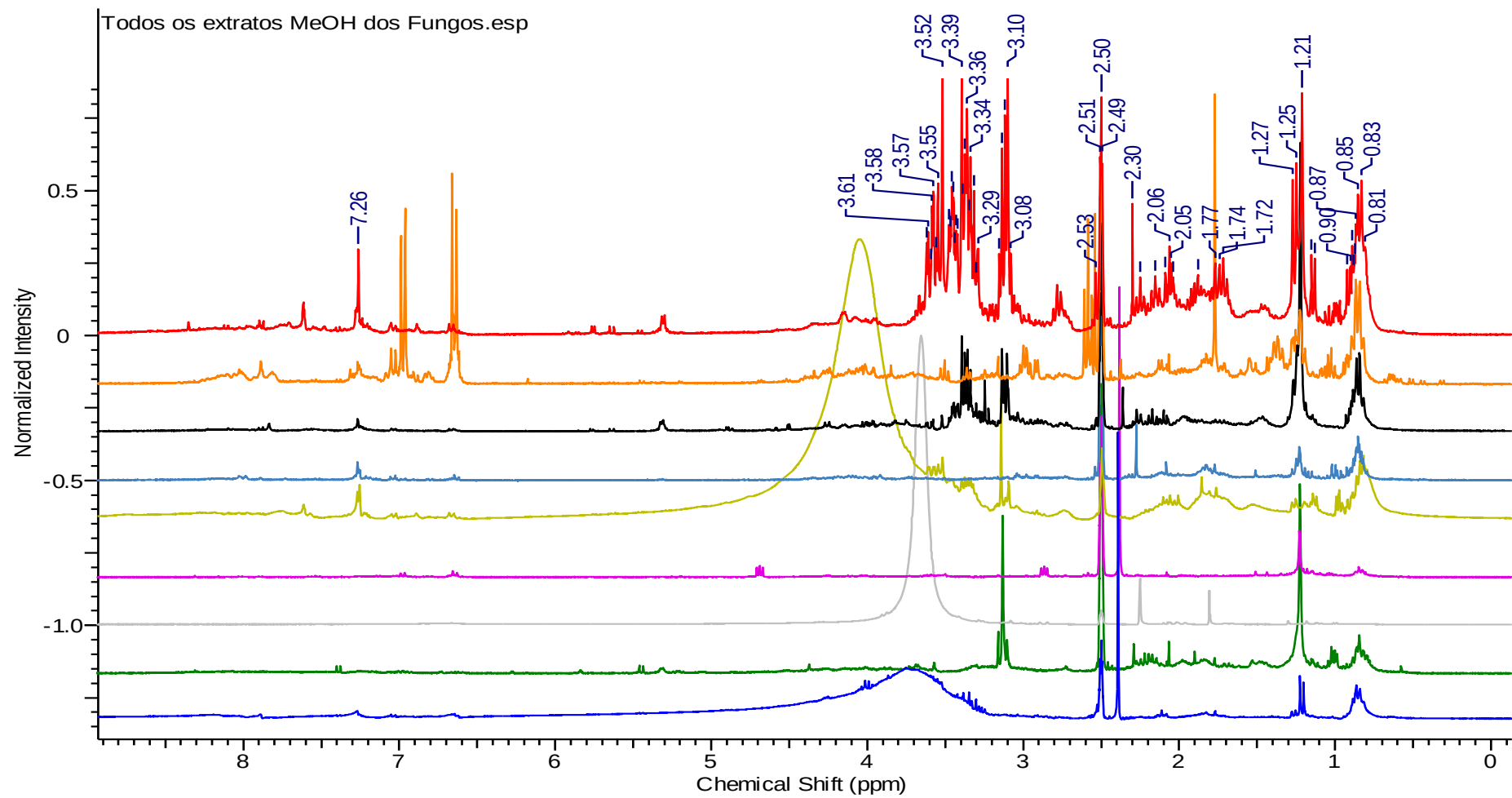


Figura 86: Espectros de RMN de ^1H dos extratos MeOH obtida do micélio dos fungos endofíticos de 1 ao 9 solubilizados em DMSOD.

5.8 Identificação das substâncias isoladas

5.8.1 Proposta da substância XIII: (3-oxociclobutil) metil1-hidroxi-2 metilciclopenta-2,4-dieno carboxilato (Inédita)

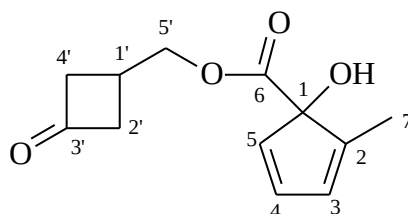


Figura 87: (3-oxociclobutil) metil1-hidroxi-2 metilciclopenta-2,4-dieno carboxilato (XII)

A substância **XII**, foi isolada da fase DCM do caldo metabólito, apresentando-se como um cristal amorfo com coloração verde quando revelado com Anisaldeído sulfúrico.

Para a nomenclatura e numeração da substância, utilizou-se o Software on-line: ACD/Labs: I-Lab 2.0; Algorithm Version: v12.1.0.50375, disponível em: ilab.acdlabs.com.

Ao analisar esta fração por espectrometria de massas de alta resolução via ionização por ESI, o espectro apresentou um íon de m/z 221,10823 [M - H]⁺, compatível com a fórmula molecular C₁₂H₁₄O₄ (**XIII**) (Figura 88) com Índice de deficiência de Hidrogênio (IDH) de 6.

O espectro de RMN de ¹H da substância **XIII** mostrou vários sinais na região alifáticos e aromáticos. Primeiramente obsevou-se um singlete em δ_H 12,39 característicos de hidroxilas queladas em OH-1, foram observados ainda um tripleto em δ_H 7,53 (t, J= 8 Hz, H-4) e os dubletos em: δ_H 6,89 (dd, J= 8,38 e 0,93 Hz, H-5), δ_H 7,25 (d, J= 7,5 Hz, H-3), δ_H 3,91 (dd, 10,8 e 4,2 Hz, H-5'), δ_H 3,82 (dd, J=10,8 e 8,8 Hz, H-5'), δ_H 2,96 (dd, J=18,7 e 5,6 Hz, H-2'), δ_H 2,70 (dd, J= 18,7 e 4,1 Hz, H-2'), δ_H 1,02 (dd, J= 14,8 e 6,5 Hz, H4'). Observou-se ainda um multiplete em δ_H 2,52 (m, H-1') e um sinal em δ_H 1,65 característicos de metila. Pelo fato de as substâncias não estarem 100% pura, os demais sinais observados, foram atribuídos a uma outra molécula minoritária (Figura 89 e 90).

O mapa de contorno 2D HSQC mostrou os acoplamentos em δ_c 115,81 (C-3) com δ_H 7,25 (H-3), δ_c 137,27 (C-4) com δ_H 7,53 (H-4), δ_c 116,87 (C-5) com δ_H 6,89 (H-5), δ_c 30,98 (C-7) com δ_H 1,65 (CH₃), δ_c 45,81 (C-1') com δ_H 2,52 (H-1'), δ_c 38,90 (C-2') com δ_H 2,70 (H-2') e δ_H 2,96 (H-2'), δ_c 23,43 (C-4') com δ_H 1,02 (H-4'), δ_c 64,66 (C-5') com δ_H 3,82 (H-5') e δ_H 3,91 (H-5') (Figura 91 e 92).

O mapa de contorno 2D HMBC mostrou os acoplamentos em δ_c 202,23 (C=O) com δ_H 2,96 (H-2') e δ_H 2,70 (H-2'), δ_c 162,34 (OC=O) com δ_H 7,53 (H-4) e δ_H 12,39 (OH-1), δ_c 149,26 (C) com δ_H 7,53 (H-4) e δ_H 1,65 (H-7), δ_c 137,27 (C-4) com δ_H 7,25 (H-3), δ_c 116,87 (C-5) com δ_H 7,25 (H-3) e δ_H 12,39 (OH-1), δ_c 115,81 (C-3) com δ_H 12,39 (OH-1), δ_H 7,25 (H-3) e δ_H 6,89 (H-5), δ_c 64,66 (C-5') com δ_H 3,82 (H-5') e δ_H 3,91 (H-5'), δ_c 73,38 (C-1) com δ_H 7,25 (H-3), δ_H 3,91 (H-5'), δ_H 3,82 (H-5'), δ_c 64,66 (C-5') com δ_H 2,96 (H-2') e δ_H 2,70 (H-2'), δ_c 45,18 (C-1') com δ_H 2,96 (H-2'), δ_H 2,70 (H-2') e δ_H 1,65 (H-7), δ_c 38,90 com δ_H 3,91 (H-5') e δ_H 1,02 (H-4') (Figura 93).

Os espectros de COSY mostraram os acoplamentos entre δ_H 7,25 (H-3) com δ_H 7,53 (H-4), δ_H 7,53 (H-4) com δ_H 6,89 (H-5) e δ_H 7,25 (H-3), δ_H 6,89 (H-5) com δ_H 7,53 (H-4), δ_H 2,52 (H-1') com δ_H 2,96 (H-2'), δ_H 3,82 (H-5'), δ_H 2,52 (H-1'), δ_H 2,70 (H-2'), δ_H 2,52 (H-1') e δ_H 2,96 (H-2'), δ_H 3,82 (H-5') com δ_H 2,52 (H-1') (Figura 94).

Após a análise dos dados (Tabela 30) concluiu-se que a estrutura é inédita com nomenclatura descrita pela IUPAC como: carboxilato de (3-oxociclobutil)-1-metil-2-hidroxi metilciclopenta-2,4-dieno.

Tabela 30: Dados de HSQC, HMBC e COSY da substância carboxilato de (3-oxociclobutil) -1-metil-2-hidroxi metilciclopenta-2,4-dieno.

Posição	HSQC		HMBC	COSY
	δ_C	δ_H	J_{CH}	HxH
1	73,38	-	7,25; 3,91 e 3,82	
2	149,26	-	7,53 e 1,65	
3	115,81	7,25	12,39; 7,25 e 6,89	7,53
4	137,27	7,53	7,25	6,89 e 7,25
5	116,87	6,89	7,25 e 12,39	7,53
6	162,34	-	7,53 e 12,39	
7	30,98	1,65	-	
1'	45,81	2,52	2,96; 2,70 e 1,65	2,96 e 3,82
2'	38,9	2,70 e 2,96	3,91 e 1,02	2,52; 2,70; 2,52 e 2,96
3'	202,23	-	2,96 e 2,70	
4'	23,43	1,02	-	
5'	64,66	3,82 e 3,91	2,96 e 2,70	2,52

Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info

Analysis Name	D:\Data\Usuarios\2015\Cecilia\Manoel\Data\MS\ESI-_ID_F4-Fr2_C-ACIDO_MS.d
Method	ESI-_ID_F4-Fr2_50-900.m
Sample Name	ESI-_ID_F4-Fr2_C-ACIDO_MS
Comment	ESI-_ID_F4-Fr2_C-ACIDO_MS
	AMOSTRA [20 uL (0,5mg/mL 75:25 I-PrOH/ACN) + 980 uL de I-PrOH+2 uL ACIDO FORMICO]
	FLUXO: 260 uL/h = 4.3 uL/min

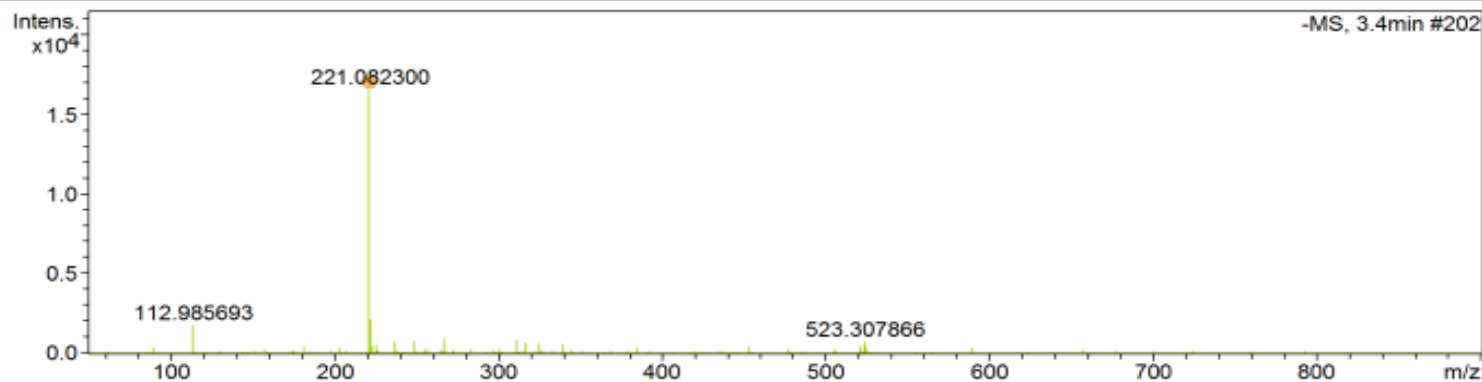
Acquisition Date 6/17/2015 4:49:15 PM

Operator BDAL@DE

Instrument micrOTOF-Q 228888.10431

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.6 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	3500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	900 m/z	Set Collision Cell RF	100.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste



Meas. m/z	#	Ion Formula	Adduct	m/z	err [ppm]	mSigma	Score
221.082300	1	C ₁₂ H ₁₃ O ₄	M-H	221.081932	-1.664	6.5	100.00

Figura 88: Espectro de massa de carboxilato de (3-oxociclobutil)-1-metil-2-hidroxi metilciclopenta-2,4-dieno (XIII).

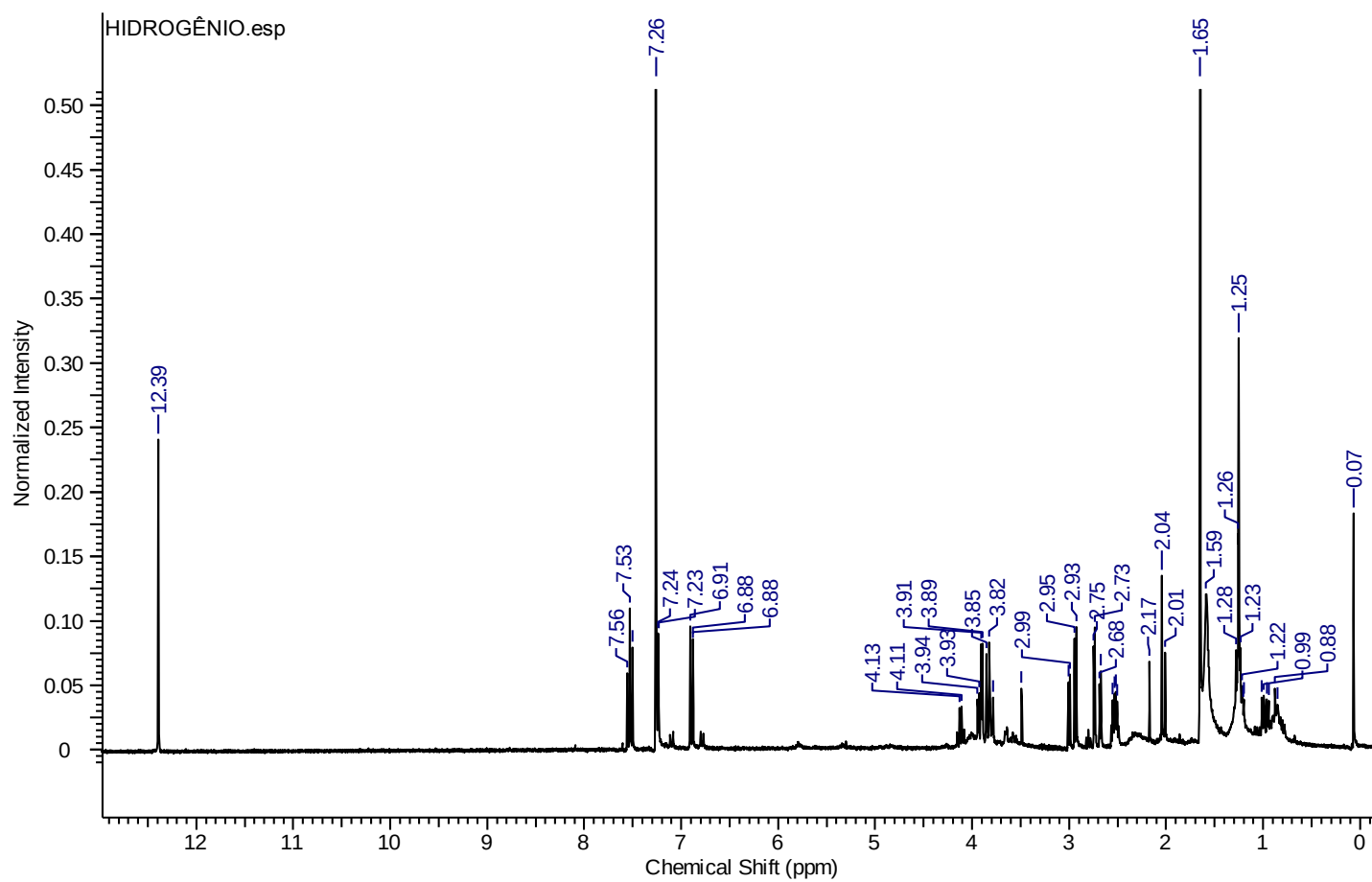


Figura 89: Espectro de ^1H (CDCl_3) de carboxilato de (3-oxociclobutil) -1-metil-2-hidroxi metilciclopenta-2,4-dieno.

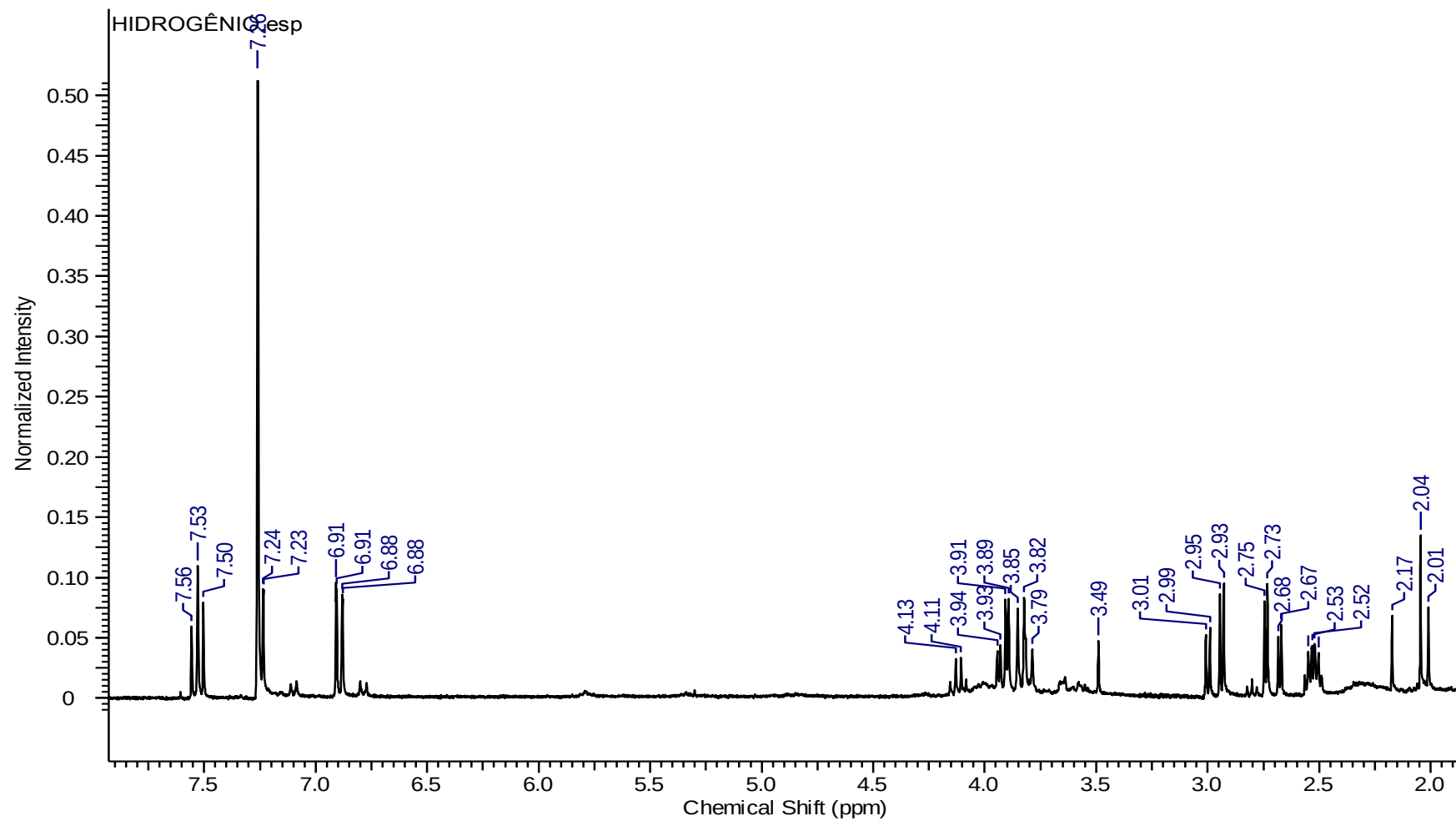


Figura 90: Espansão do espectro de ^1H (CDCl_3) de carboxilato de (3-oxociclobutil) -1-metil-2-hidroxi metilciclopenta-2,4-dieno.

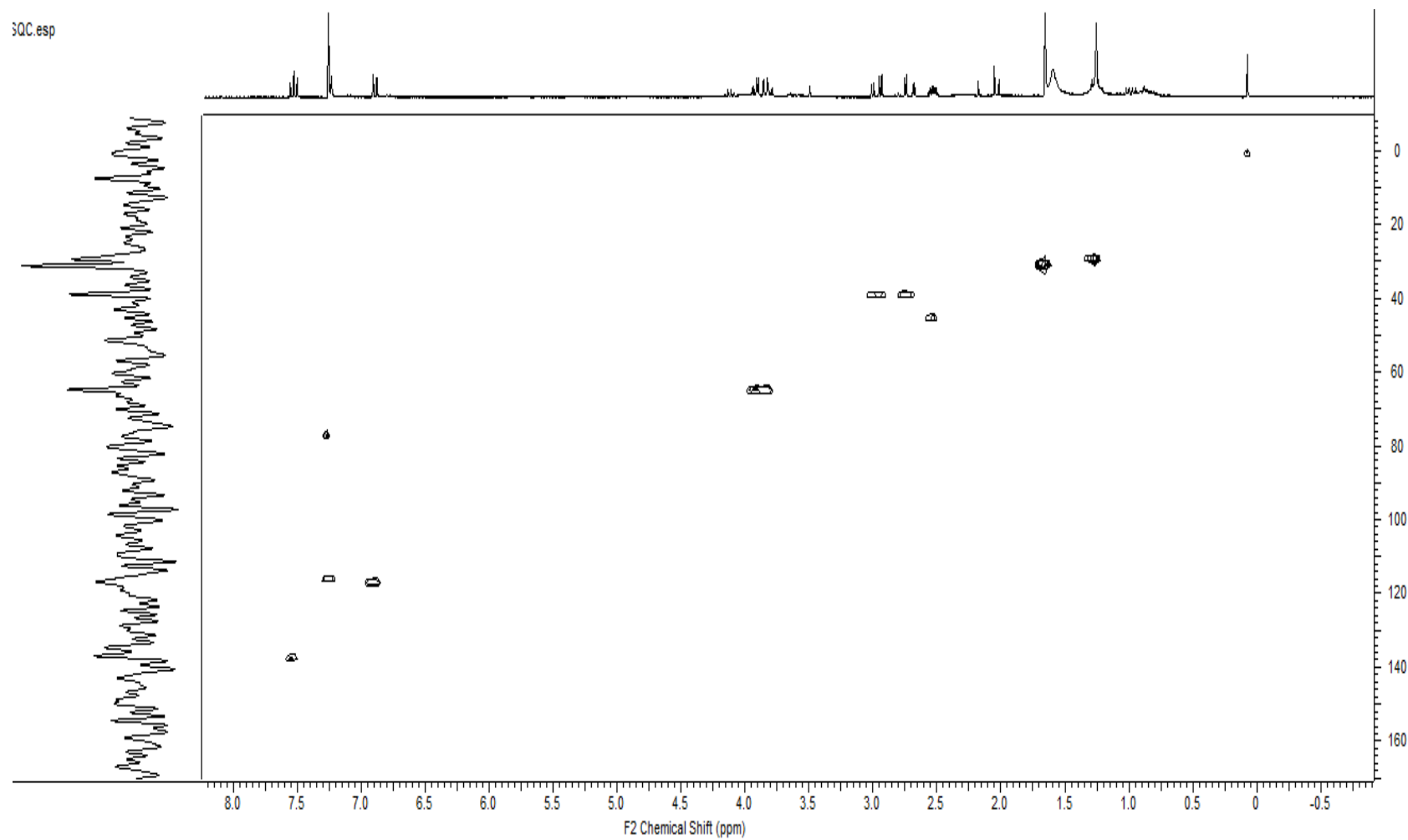


Figura 91: Mapa de contorno HSQC de carboxilato de (3-oxociclobutil) -1-metil-2-hidroxi metilciclopenta-2,4-dieno.

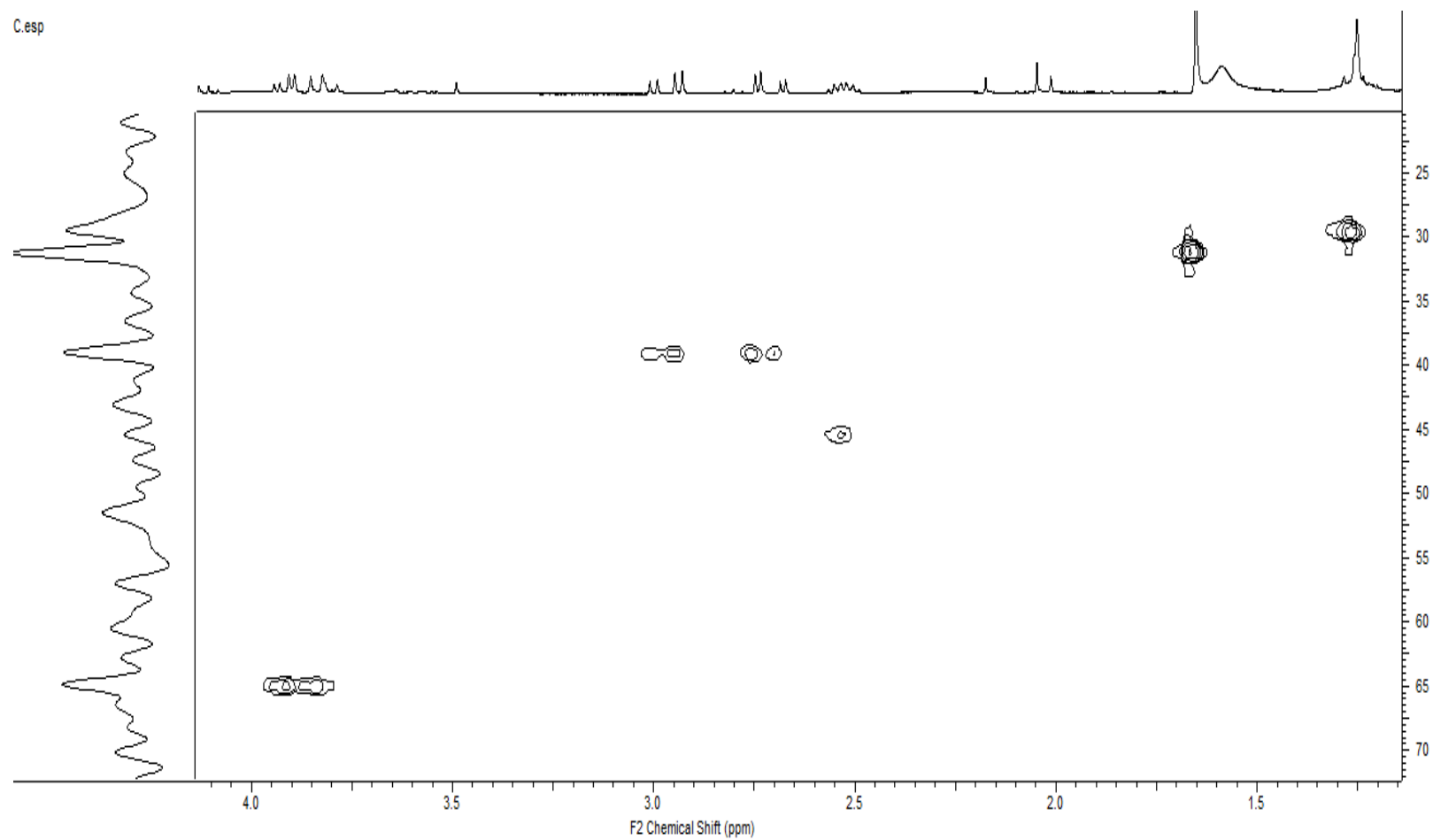


Figura 92: Expansão do mapa de contorno HSQC de carboxilato de (3-oxociclobutil) -1-metil-2-hidroxi metilciclopenta-2,4-dieno.

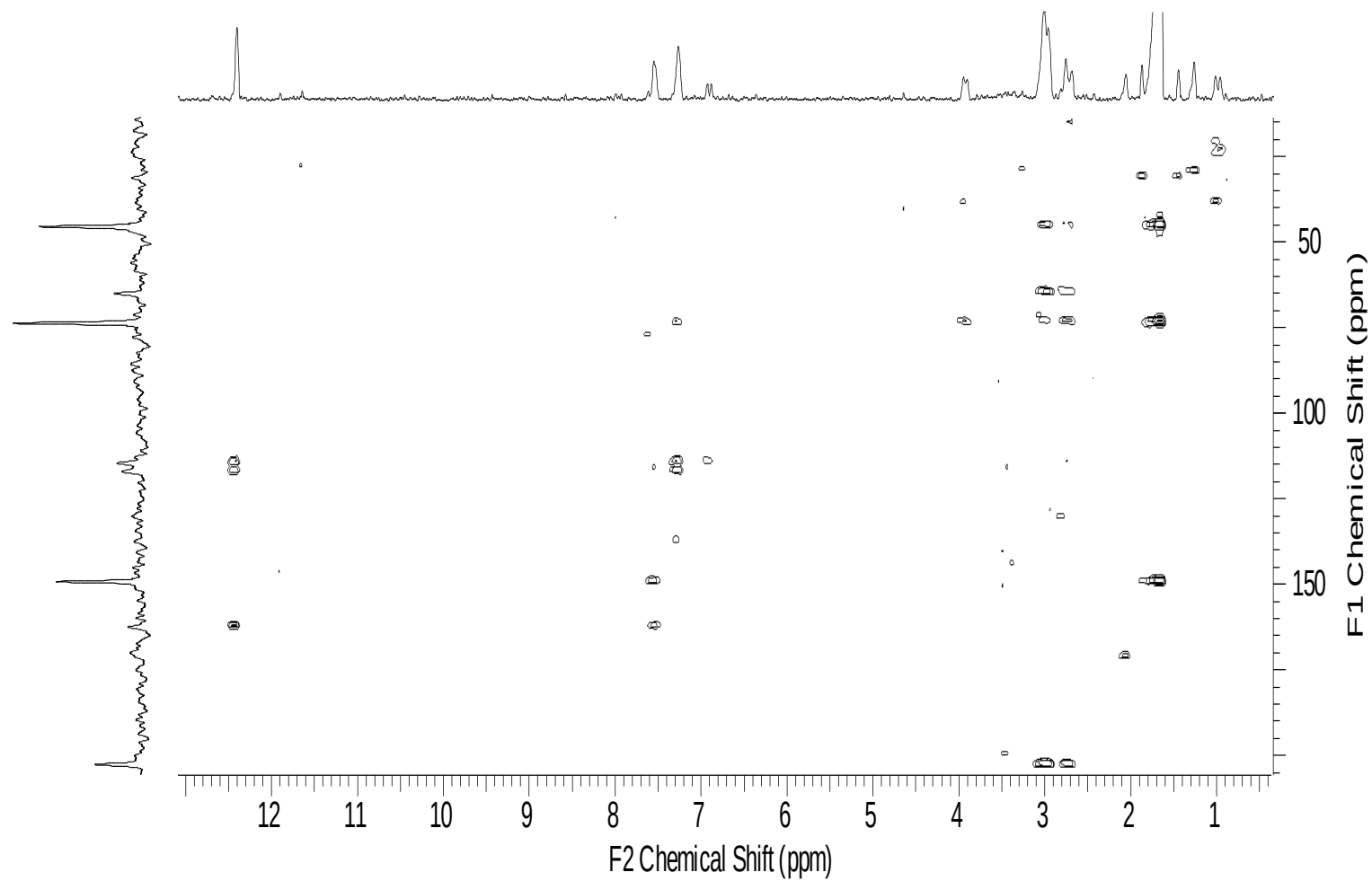


Figura 93: Mapa de contorno HMBC de carboxilato de (3-oxociclobutil) -1-metil-2-hidroxi metilciclopenta-2,4-dieno.

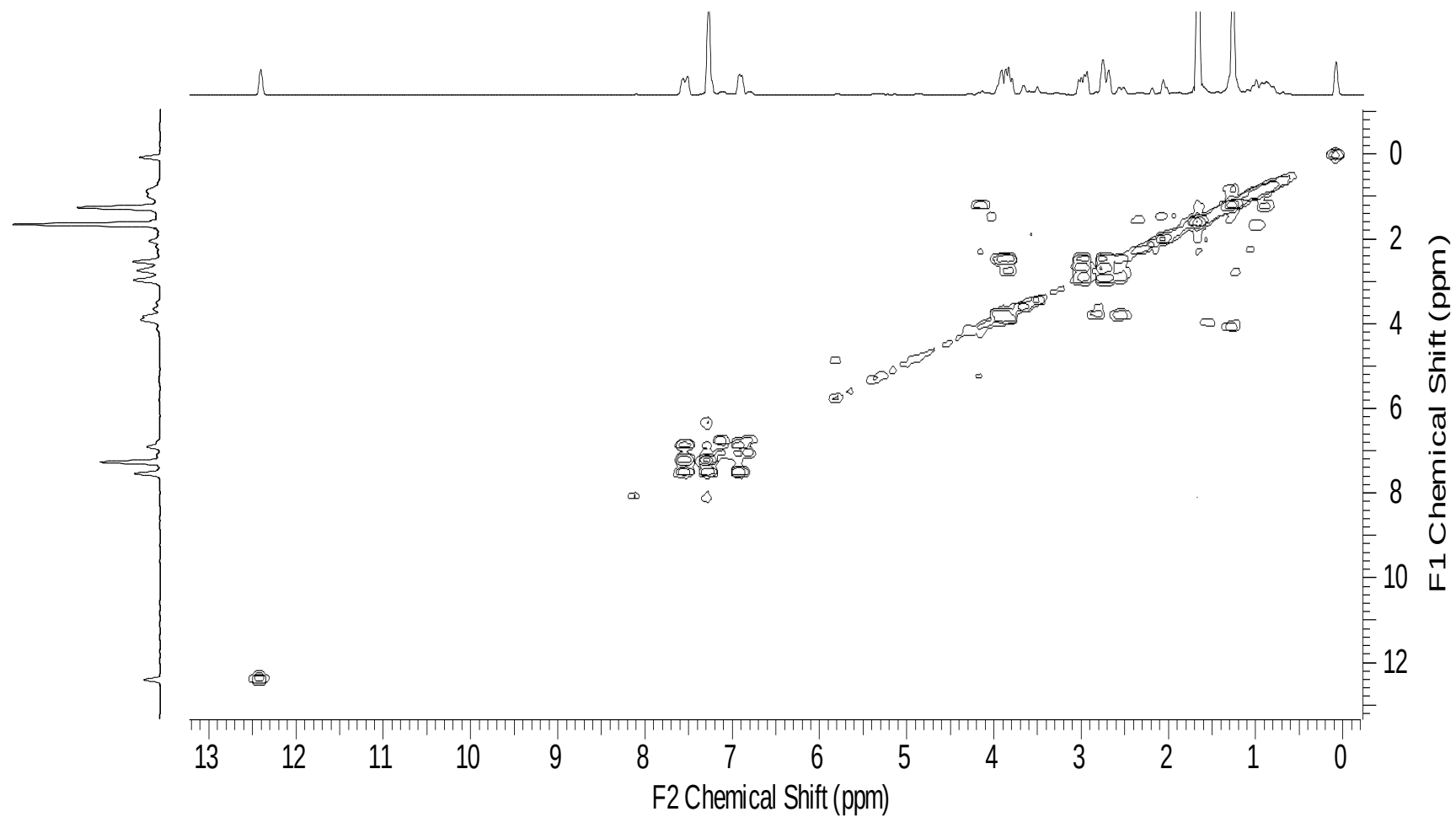


Figura 94: Mapa de contorno COSY de carboxilato de (3-oxociclobutil) -1-metil-2-hidroxi metilciclopenta-2,4-dieno.

5.9 Substância XIV: 9-amino-7- (2,5,7-triazabicciclo [2.2.1] hept -3-il) -2,3,6-trioxi-1-azabicciclo [3.2.2] nona-4,8-dieno-4-carbaldeido (inérita)

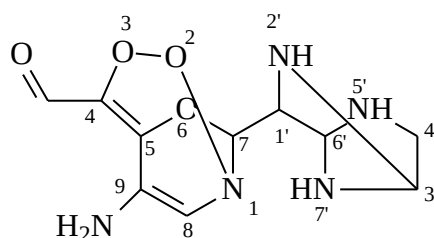


Figura 96: 9-amino-7-(2,5,7-triazabicciclo[2.2.1]hept-3-il)-2,3,6-trioxi-1-azabicciclo[3.2.2]nona-4,8-dieno-4-carbaldeido (**XIII**)

A substância **XIII**, foi isolada do extrato DCM do micélio de *D. hongkongensis*, apresentando-se com um cristal amorfo.

Ao analisar esta fração por espectrometria de massas de alta resolução via ionização por ESI, o espectro apresentou um íon de m/z 268,103678 $[M + H]^+$ compatível com a fórmula molecular $C_{10}H_{14}N_5O_4$ (Figura 95) com Índice de deficiência de Hidrogênio – IDH de 7.

O espectro de RMN de 1H da substância **XIII** apresentou três singletos em δ_H 8,34 (s, H-8), 8,13 (s, H-COH) e outro em 7,34 (s, NH_2) respectivamente. Observaram ainda, dois dubletos em δ_H 5,86 (d, $J = 6$ Hz, 2H, H-7) e em δ_H 5,22 (d, $J = 4,3$ Hz, 2H, $NH-7'$) além de quatro duplo dubleto em δ_H 5,49 (dd, $J = 6,0$ e 5,0 Hz, 1H, $NH-5'$), δ_H 4,59 (dd, $J = 12,0$ e 6,0 Hz, 2H, H-1'), δ_H 4,13 (dd, $J = 8,6$ e 4,4 Hz, 2H, H-6') e 3,96 (dd, $J = 7,7$ e 3,3 Hz, 2H, H-3') e um duplo tripleto em δ_H 3,65 (dt, $J = 12, 4,1$, 1H, H-4'). Os sinais em δ_H 5,47 (d, $J = 6,6$ Hz, 1H, $NH-2'$), δ_H 5,49 (d, $J = 6,8$ Hz, $NH-5'$), δ_H 7,34 (s, NH_2) e δ_H 5,22 (d, $J = 4,6$ Hz, $NH-7'$), foram atribuídos ao tipo de ligação N-H, como previsto na fórmula molecular. Pelo fato de a substância não está 100% pura, os demais sinais observados, foram atribuídos a uma outra molécula minoritária (Figura 96 e 97).

O mapa de contorno 2D HSQC mostrou as correlações em δ_C 152, 10 com δ_H 8,13, δ_C 139,64 com δ_H 8,34, δ_C 87,85 com δ_H 5,86, δ_C 85,73 com δ_H 3,96, δ_C 73,25 com δ_H 4,6, δ_C 70,46 com δ_H 4,13, 61,49 com δ_H 3,65 (Tabela 35) e (Figura 98).

O mapa de contorno 2D HMBC mostrou os acoplamentos em δ_c 156,60 com δ_H 8,13, δ_c 147,36 com δ_H 8,34, 8,13 e 5,86, δ_c 139,65 com δ_H 5,86, δ_c 119,52 com δ_H 8,34 e 7,34, δ_c 87,85 com δ_H 5,47 e 4,60, δ_c 85,73 com δ_H 5,22, δ_c 73,25 com δ_H 5,86 e 5,47, δ_c 70,46 com δ_H 5,47 e 5,22, δ_c 61,49 com δ_H 5, 49 respectivamente (Figura 99).

O mapa de contorno 2D COSY mostrou os acoplamentos em δ_H 5,86 com δ_H 4,59, δ_H 5,47 com δ_H 4,59, δ_H 5,49 com δ_H 3,5 e 3,6, δ_H 5,22 com δ_H 4,13 δ_H 4,59 com δ_H 5,47, 5,86 e 4,13, δ_H 4,13 com δ_H 5,22, 3,96, 4,59, δ_H 3,96 com δ_H 3,6 e 4,13, δ_H 3,60 com δ_H 3,50, 3,96, 5,47 e 5,49 respectivamente (Figura 100).

Após a análise dos dados (Tabela 31), concluiu-se que a estrutura é inédita com nomenclatura descrita pela IUPAC como: 9-amino-7-(2,5,7-triazabicyclo [2.2.1] hept -3-il) -2,3,6-trioxi-1-azabicyclo [3.2.2] nona-4,8-dieno-4-carbaldeído.

Tabela 31: Dados de HSQC, HMBC e COSY da substância 9-amino-7-(2,5,7-triazabicyclo [2.2.1] hept -3-il) -2,3,6-trioxi-1-azabicyclo [3.2.2] nona-4,8-dieno-4-carbaldeído.

Posição	HSQC		HMBC	COSY
	δ_c	δ_H	$^{2-4}J_{CH}$	HxH
4	156, 60	-	8,13	-
5	147,36	-	8,34 e 5,86	-
7	87,85	5,86	5,47 e 4,59	4,59
8	139,64	8,34	5,86	-
9	119,52	-	8,34 e 7,34	-
1'	73,25	4,59	5,86 e 5,47	5,47, 5,86, 4,13
2'	-	5,47	-	4,59
3'	85,73	3,96	5,22	3,60 e 4,13
4'	61,49	3,5 e 3,6	5,49	3,50, 3,96, 5,47 e 5,49
5'	-	5,49	-	4,59, 3,50 e 3,60
6'	70,46	4,13	5,47 e 5,22	5,22, 3,96 e 4,59
7'	-	5,22	-	4,13
COH	152,1	8,13	-	-
NH ₂	-	7,34	-	-

Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info

Analysis Name	D:\Data\Usuarios\2015\Cecilia\Manoel\Data\MS\ID_ESI+_F6-29B.d			Acquisition Date	7/20/2015 5:17:42 PM
Method	ESI+_ID_50-900.m			Operator	BDAL@DE
Sample Name	ID_ESI+_F6-29B			Instrument	micrOTOF-Q 228888.10431
Comment	Fluxo = 260 uL/h C= 1,0 mg/mL Diluição = 10 uL amostra + 760 uL MeOH + 197 uL + 3 uL ac. form				

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	900 m/z	Set Collision Cell RF	100.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

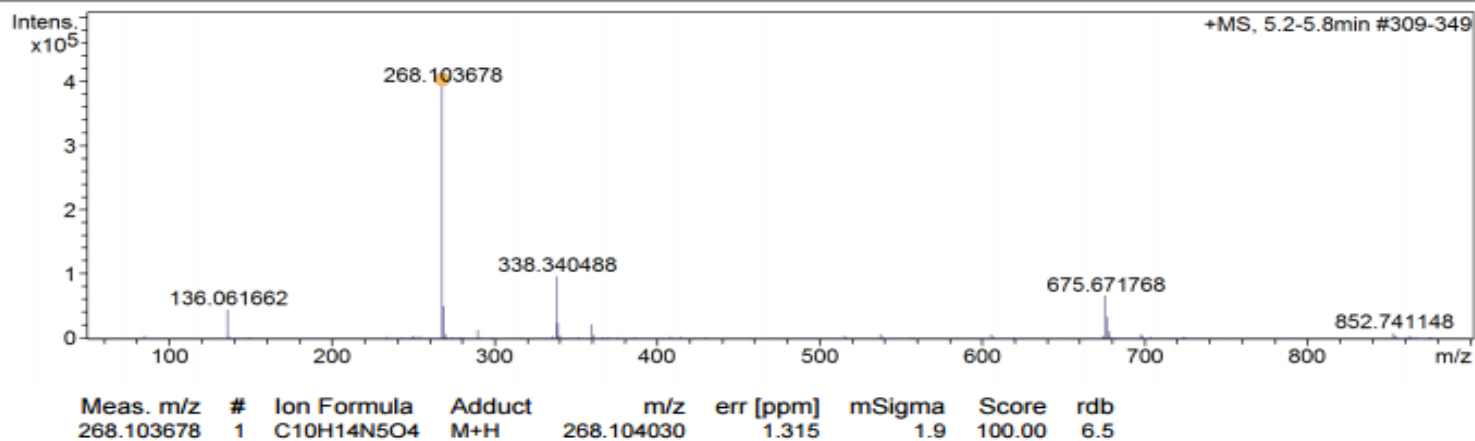


Figura 95: Espectro de massa de (3-oxociclobutil) metil1-ihdroxi-2 metilciclopenta-2,4-dieno carboxilato (XII).

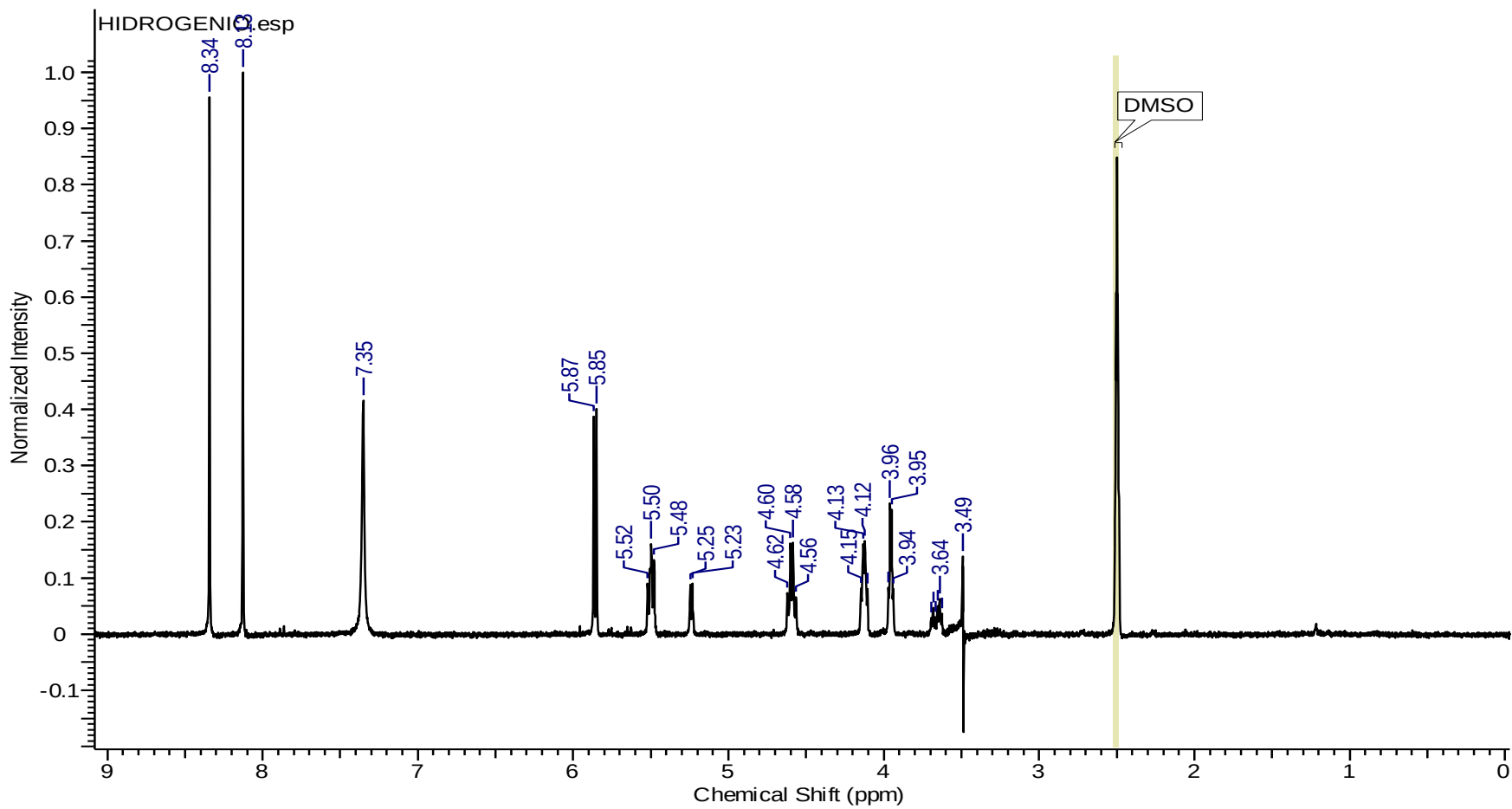


Figura 96: Espectro de RMN de ^1H (DMSO) da substância 9-amino-7- (2,5,7-triazabicyclo [2.2.1] hept -3-il) -2,3,6-trioxi-1-azabicyclo [3.2.2] nona-4,8-dieno-4-carbaldeído

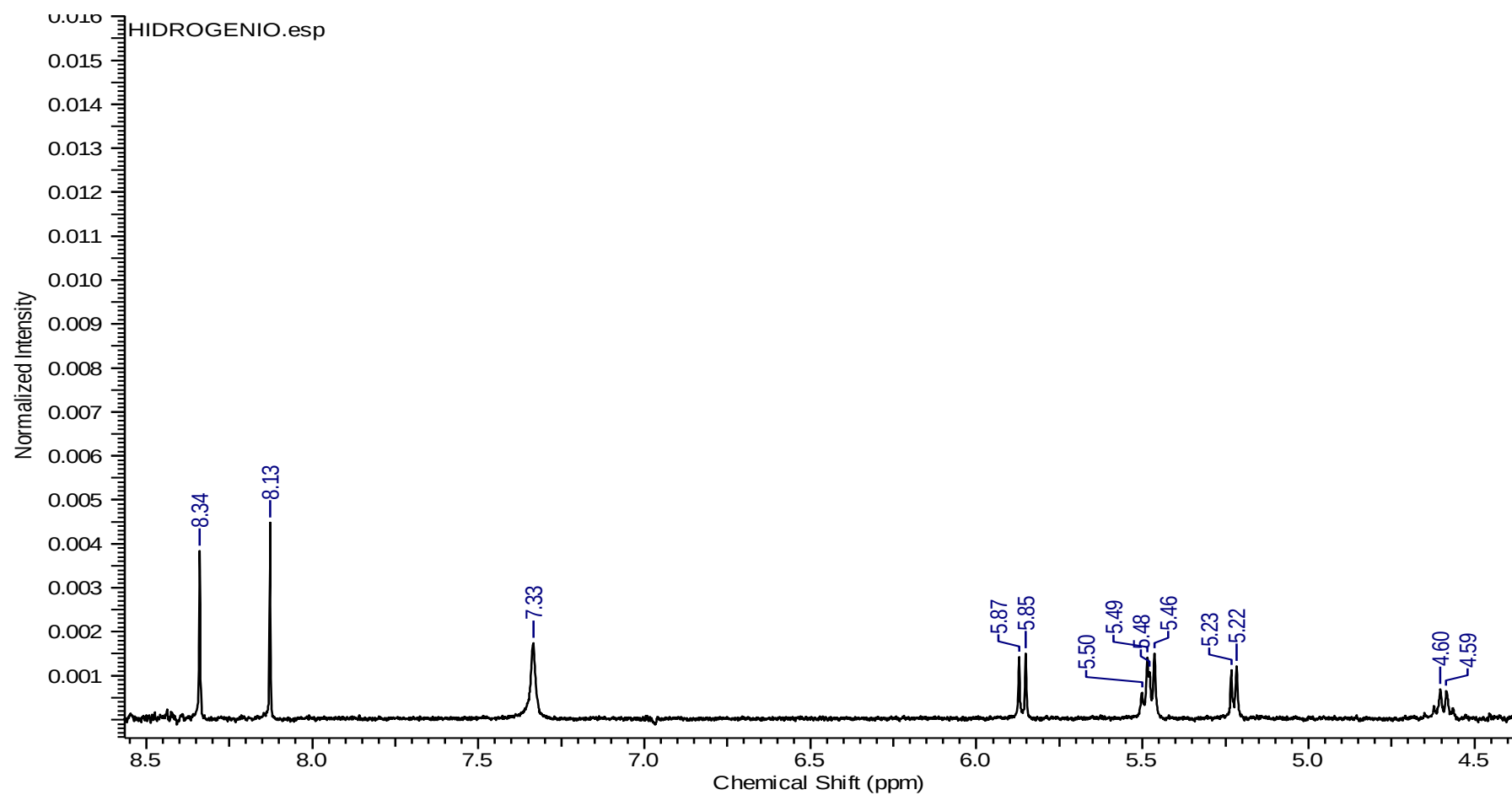


Figura 97: Expansão do espectro de RMN de ¹H (DMSO) da substância 9-amino-7- (2,5,7-triazabicyclo [2.2.1] hept -3-il) -2,3,6-trioxi-1-azabicyclo [3.2.2] nona-4,8-dieno-4-carbaldeído

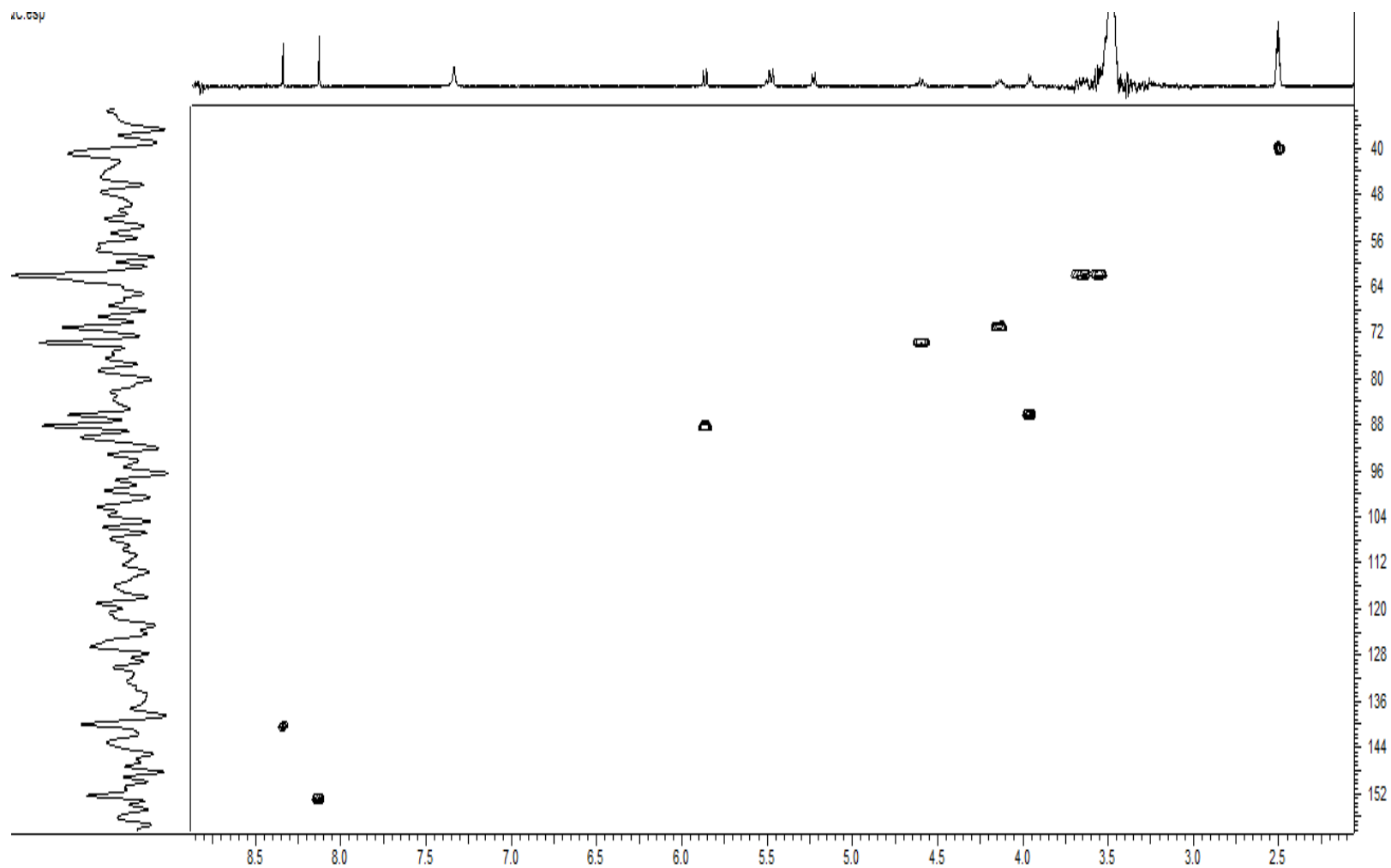


Figura 98: Mapa de contorno HSQC da substância 9-amino-7- (2,5,7-triazabicyclo [2.2.1] hept -3-il) -2,3,6-trioxi-1-azabicyclo [3.2.2] nona-4,8-dieno-4-carbaldeído.

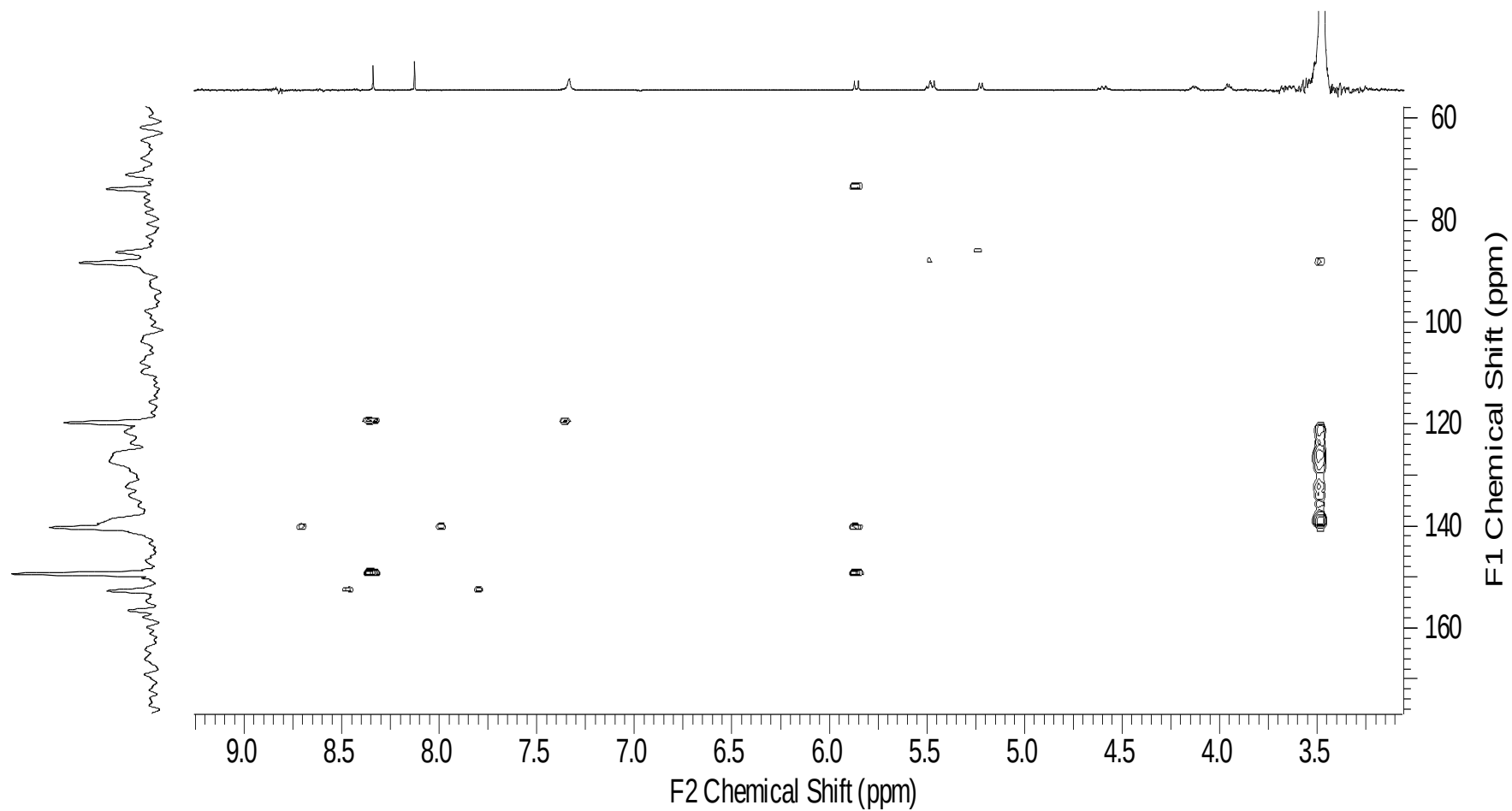


Figura 99: Mapa de contorno HMBC da substância 9-amino-7- (2,5,7-triazabíciclo [2.2.1] hept -3-il) -2,3,6-trioxi-1-azabíciclo [3.2.2] nona-4,8-dieno-4-carbaldeído.

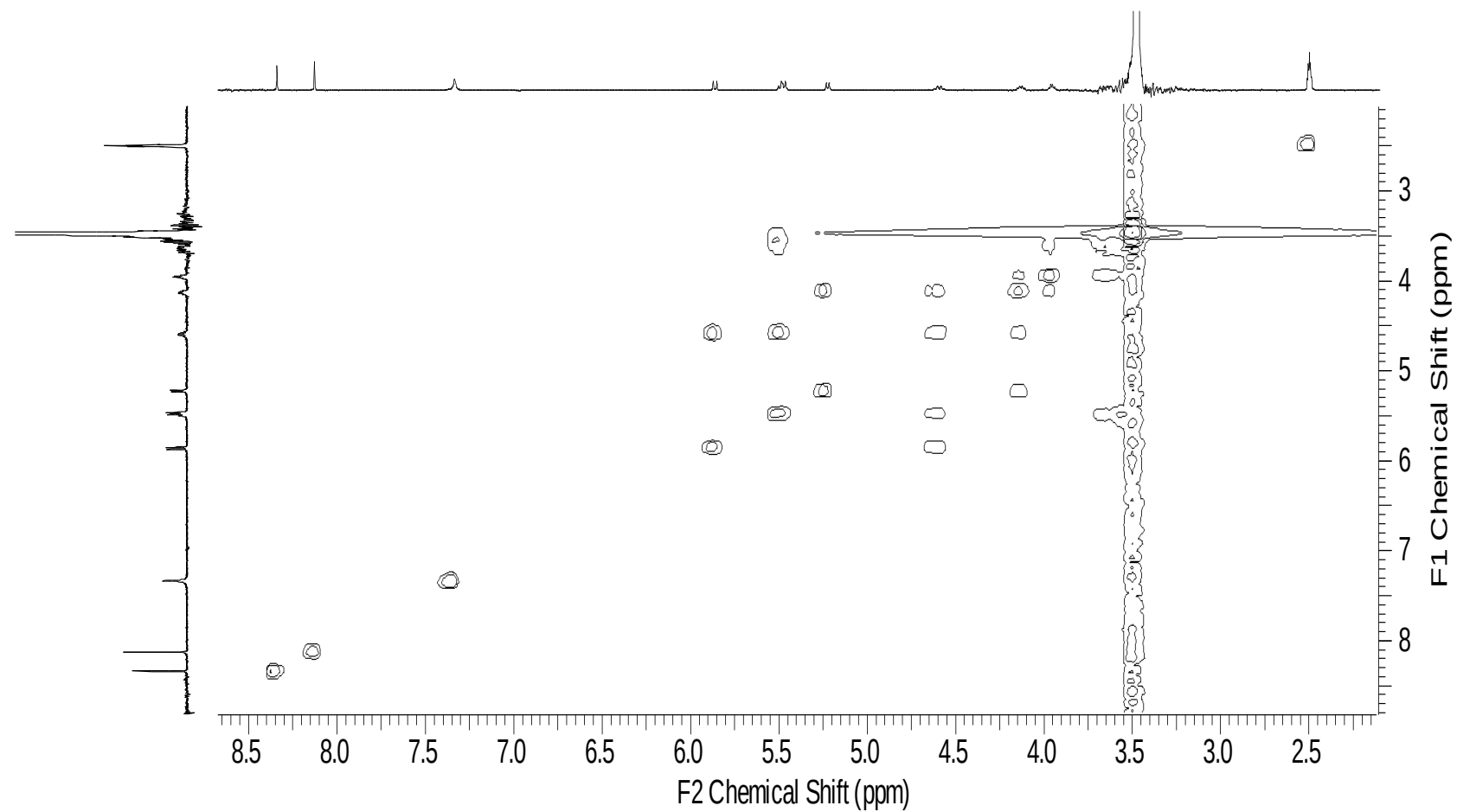


Figura 100: Mapa de contorno COSY da substância 9-amino-7- (2,5,7-triazabicyclo [2.2.1] hept -3-il) -2,3,6-trioxi-1-azabicyclo [3.2.2] nona-4,8-dieno-4-carbaldeído.

5.10 Ensaio Biológico

5.10.1 Atividade Antioxidante dos extratos das Folhas de *P. trifoliata*.

Os resultados dos ensaios antioxidantes dos extratos das folhas coletadas no Rio Xingú (coleta 1), foram publicados na dissertação de mestrado o qual, mostrou um resultado significativo para o extrato MeOH das folhas com equivalência de 1,53 mg de extrato/mg de ácido ascórbico (JEFFREYS, 2011).

Ao analisar os extratos da coleta 2, observou-se que os extratos MeOH apresentaram equivalências de 1,15, e 1,13 (coleta 2) e 1,89 e 1,51 (coleta 3) quando comparados com os padrões, sendo considerado um importante resultado, pois ambos atingiram um valor bem próximo dos padrões testados. 1 mg de ácido ascórbico, (Tabela 32).

Tabela 32: Resultado da atividade antioxidante dos extrato de *P. trifoliata* da segunda coleta

Atividade Antioxidante				
Coleta	Parte vegetal	Extrato	Método DPPH•	Método Fe ³⁺
			(mg de extrato/ mg de aa*)	
1 (Realizada no mestrado)	Folhas	DCM	19,05	25,7
		MeOH	1,53	1,89
		H ₂ O	2,30	2,92
		Hex	15,06	18,44
2	Folhas	MeOH	1,15	1,13
		H ₂ O	2,42	2,83
		Hex	13,52	16,12
3	Folhas	MeOH	1,89	1,51
		H ₂ O	2,92	3,42

*aa= Ácido ascórbico

Resultados similares foram observados por Alam e colaboradores (2013), Sanil e colaboradores (2015), quando eles demonstram que em espécies vegetais, as substâncias fenólicas como flavonoides, cumarinas, além de terpenos com ligações duplas conjugadas, atuam na proteção contra radicais livres produzidos sobre condições de estresse, por sua capacidade de doar radicais hidrogênios ou pela reação com o radical livre estabilizando-o.

Os extratos aquosos também apresentaram equivalência significativa de 2,42 e 2,83 (coleta 2) e 2,92 e 3,42 (coleta 3) respectivamente. As substâncias responsáveis por esta atividade são, possivelmente derivadas de substâncias fenólicas como os flavonoides, que possuem grande atividade antioxidante atuando principalmente na proteção dos tecidos contra radicais livres (ALAM, *et al*, 2013, TINKEL; *et al*, 2012).

Em seguida, foram analisado os resultados das fases DCM, AcOEt e H₂O obtida dos extratos metanólicos das coletas 1 e 2 respectivamente.

As fases DCM da coleta 1, 2 e 3 apresentaram resultados poucos significativos com valores de equivalência variando entre 26,6 e 23,91 (coleta 1), 38,57 e 35,82 (coleta 2) e 41,01 e 38,12 (coleta 3). A partir desses resultados podemos observar que ambas as fases possuem baixa concentração de substâncias com ligações duplas conjugadas ou substâncias fenólicas, os quais são responsáveis pela variação da equivalência quando comparados com o ácido ascórbico e o Fe³⁺.

Ao analisar a equivalência das fases do AcOEt de ambas as coletas, observou-se um resultado de 6,74 e 7,48 (coleta 1), 6,61 e 9,02 (coleta 2) e 5,51 e 8,02 (coleta3), indicando possuir algumas substâncias com grupos fenol e ligações insaturadas na estrutura das moléculas contidas nas fases.

De acordo com estudos realizados por Aimé e colaboradores (2003), o potencial antioxidante está relacionado com a estrutura química da substância que possui a presença de maior número de hidroxilas e ligações insaturadas principalmente nas posições com os grupos C-3, C-5, C-7, C-4' e C-3' de flavonoides. Os biflavonoides isolados, neste trabalho, da fase DCM e AcOEt, identificados como 3'-O-metil Ioniflavona (substância **X**) e 7,4'' dimetilamentoflavona (Putraflavona) (Substância **XI**), possuem hidroxilas nas posições C-5, C-7, C-5'', C-7'' e as instaurações presentes em ambas as moléculas, o que possivelmente pode estar relacionado com a boa

equivalência de ambas as fases quando comparado com o padrão (Tabela 32).

Tabela 33. Atividade antioxidante das fases DCM, MeOH e H₂O obtidos dos extratos metanólicos das folhas das coletas 1 e 2

Atividade Antioxidante				
Coleta	Parte vegetal	Fase	Equivalência	
			Método DPPH•	Método Fe ³⁺
1	Folhas	DCM	26,6	23,91
		AcOEt	6,74	7,48
		H ₂ O	2,8	4,51
2	Folhas	DCM	38,57	35,82
		AcOEt	6,61	9,02
		H ₂ O	3,21	5,53
3	Folhas	DCM	41,01	38,12
		AcOEt	5,51	8,02
		H ₂ O	4,01	6,08

Ao analisar as fases aquosa, observou-se uma equivalência, 2,8 e 4,51 na coleta 1 e de 3,21 e 5,53 na coleta 2. Esses valores, foram similares aos resultados do extrato aquoso das folhas e galhos (JEFFREYS, 2011; PEDROZA, 2014), mostrando que as substâncias fenólicas estão presente em grande concentração nessas fases.

Assim, os resultados mostraram que a capacidade antioxidante dos extratos e fases testadas pelo método DPPH e Fe³⁺ possuem grande significância quando comparado com os dados da literatura, uma vez que os extratos brutos e as fases de diferentes partes vegetais da família Picrodendraceae obtiveram uma boa capacidade sequestradora de radicais livres, mostrando-se com resultados significativos (PEDROZA, 2014; JEFFREYS, 2011).

5.10.2 Atividade Antioxidante dos fungos endofíticos.

Os resultados obtidos foram expressos em equivalência com o ácido ascórbico, permitindo correlacionar a resposta obtida do extrato vegetal com a do antioxidante padrão através da equivalência de um (1,0), pois quanto mais semelhante entre a capacidade antioxidante da amostra frente ao ácido ascórbico melhor serão as possibilidades de se obter uma substância ativa.

Assim, as partições de diclorometano (DCM) quando comparada com ambos os métodos, observou-se que apenas o fungo de número 6 apresentou atividade significativa com equivalência de 5,01. Esse resultado pode estar associado principalmente pela presença da hidroxila quelada em aproximadamente 12 ppm, observado no espectro de RMN de ^1H além da presença de sinais característicos de aromáticos entre 6 e 7 ppm respectivamente.

Ao analisar a fase do acetato de etila (AcOEt), observou-se que todas as fases não apresentaram resultados significativos, indicando a ausência de substâncias com ligações duplas conjugadas ou aromáticos. Esses resultados podem ser comprovados através dos espectros de RMN de ^1H , os quais mostram que as fases de AcOEt não contêm metabólitos secundários ou contêm em pequenas concentrações, apenas açúcar e outros metabólitos do caldo estéril (Tabela 34).

Tabela 34: Resultados da atividade antioxidante presente nas fases DCM e AcOEt dos caldos metabólitos dos fungos de *P. trifoliata*

Atividade Antioxidante			
Fungo	Fase	<u>Equivalência</u>	
		Método DPPH•	Método Fe^{3+}
Fungo 1	DCM	22,03	10,91
	AcOEt	15,01	9,01
Fungo 2	DCM	28,54	9,14
	AcOEt	17,98	11,84
Fungo 3	DCM	18,68	34,47
	AcOEt	17,25	15,65
Fungo 4	DCM	12,89	75,3
	AcOEt	13,4	8,31

Fungo 5	DCM	18,1	10,48
	AcOEt	23,07	15,54
Fungo 6	DCM	5,01	17,87
	AcOEt	9,74	7,17
Fungo 7	DCM	15,77	24,87
	AcOEt	10,47	12,61
Fungo 8	DCM	23,35	20,9
	AcOEt	17,85	9,28
Fungo 9	DCM	25,72	20,85
	AcOEt	16,01	11,02

Ao analisar os extratos DCM dos micélios dos fungos endofíticos, observou-se que os valores não foram significativos quando comparado com o padrão, pois a menor equivalência observada no método do DPPH• foi de 28,02 para o fungo 3 e 43,21 no método do Fe³⁺ para o fungo 9, sendo ambos considerados não significativos (Tabela 35).

Apesar de o extrato DCM do fungo 3 apresentar um sinal em aproximadamente 12 ppm característicos de hidroxila quelada e vários sinais entre 6 a 8 ppm característicos de aromáticos, sua equivalência não foi significativa. Esse fator pode está associado a polaridade, uma vez que os extratos apolares possuem maior concentração de terpenos, como os triterpenos caracterizados por vários singletos entre 0,8 a 2 ppm no RMN de ¹H os quais apresentam baixa ou sem atividade.

Ao analisar os extratos MeOH, observou-se que o fungo 2 apresentou um resultado significativo com equivalência de 4,34 (Tabela 35). Possivelmente, as substâncias responsáveis por esta atividade são, derivadas de compostos fenólicos como os flavonoides, que possuem grande atividade antioxidante atuando principalmente na proteção dos tecidos contra radicais livres (ALAM, *et al*, 2013, TINKEL, *et al*, 2012).

A presença dessa classe de substâncias, podem ser confirmadas no espectros de RMN de ¹H o qual apresenta sinais na região de aromáticos, em aproximadamente 6,0 a 8,0 ppm.

Apesar de o fungo 8 possuir sinais de aromáticos em δ_H 6,96 ppm (d, 1H, 8,38 Hz) e δ_H 6,64 ppm (d, 1H, 8,38 Hz), além dos sinais em δ_H 7,03 ppm (d, 1H, 8,5 Hz) e δ_H 6,62 ppm (d, 1H, 8,5 Hz) ambos acoplando entre si e os

fungos 7 e 9 apresentarem multipletos entre δ_H 3,08 a 3,62 ppm além do dubleto em δ_H 5,31 ppm que podem ser característicos de açúcar suas equivalências não foram significativos quando comparados com o padrão.

Tabela 35: Resultados da atividade antioxidante presente nos extratos DCM e MeOH dos caldos metabólitos dos fungos de *P. trifoliata*

Atividade Antioxidante			
<u>Equivalência</u>			
	Extrato	Método DPPH•	Método Fe³⁺
Fungo 1	DCM	30,10	52,09
	MeOH	29,20	45,04
Fungo 2	DCM	50,02	98,32
	MeOH	4,34	58,94
Fungo 3	DCM	28,02	46,61
	MeOH	12,0	33,21
Fungo 4	DCM	38,2	102,32
	MeOH	54,90	179,06
Fungo 5	DCM	48,90	76,43
	MeOH	42,10	98,21
Fungo 6	DCM	49,02	83,21
	MeOH	87,44	86,51
Fungo 7	DCM	34,21	62,30
	MeOH	65,78	174,21
Fungo 8	DCM	35,21	53,21
	MeOH	18,01	33,20
Fungo 9	DCM	39,01	43,21
	MeOH	16,01	11,02

5.11 Atividade Antibacteriana das Folhas de *P. trifoliata*.

A atividade antibacteriana das fases obtidas dos extratos MeOH das folhas de *P. trifoliata*, foram determinadas pelo nosso grupo de pesquisa, da Coordenação de Tecnologia e Inovação - COTI do Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas - INPA.

Os extratos brutos das coletas 1, 2 e 3, foram testados durante o mestrado através da metodologia cavidade placa. O extrato DCM e Hexânico da coleta 1 e 2 apresentaram baixa atividade. O extrato hexânico da coleta 3 não foi ativo. Os extratos MeOH das coletas 1 e 2 apresentaram média atividade e da coleta 3 apresentou baixa atividade. Já os extratos aquosos apresentaram ambos baixa atividade (JEFFREYS, 2011).

Para esta tese, foram testadas as fases obtidas dos extratos metanólicos frente às bactérias *A. hydrophila* e *F. columnare*.

Os resultados da CIM e a CMB, mostraram que a fase DCM da coleta 1, não apresentou atividade frente às bactérias testadas, entretanto as coletas 2 e 3 apresentaram-se ativas na concentração de 500 µg/mL frente as bactérias *A. hydrophila* e *F. columnare*. Esses resultados divergentes podem estar relacionados à diferença entre o local, o clima e a época da coleta, visto que essas diferenças afetam na concentração da produção dos metabólitos secundários (NOLDIN, *et. al.*, 2003). De acordo com os resultados observados por Hadacek e Greger (2000), Jeffreys (2011) e Pedroza (2014), um ensaio antibacteriano pode variar de acordo com a parte vegetal estudada ou o local de realização da coleta.

Ao analisar as fases AcOEt das três coletas, observou-se que somente a coleta 1 apresentou uma atividade de 500 µg/mL frente as mesmas bactérias ativas na fase DCM das coletas 2 e 3. Esses resultados mostraram que os extratos obtidos em Altamira, possuem metabólitos secundários capazes de inibir o crescimento e promover a morte bacteriana de *A. hydrophila* e *F. columnare* na concentração de 500 µg/mL, deferentes das fases obtidas do Lago do Catalão, pois apresentaram-se inativas, entretanto nota-se que a atividade antibacteriana pode ser resultante de efeitos sinérgicos, além de

outros fatores interativos entre as substâncias presente nos extratos e fases vegetais.

Ao analisar os resultados das fases aquosas, observou-se que a coleta 1 apresentou CIM e CMB de 500 µg/mL, as coletas 2 e 3 apresentaram CIM e CMB de 1000 µg/mL frente as bactérias *F. columnare* e *P. fluorescens* (Tabela 36).

Tabela 36: Atividade antibacteriana das fases do extrato MeOH das folhas

Atividade Antibacteriana (µg/mL)							
Coleta	Fase	<i>Aeromonas hydrophyla</i>		<i>Flavobacterium columnare</i>		<i>Pseudomonas Fluorescens</i>	
		CIM	CMB	CIM	CMB	CIM	CMB
1	DCM	S/A*	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
	AcOEt	500	500	500	500	S/A	S/A
	H ₂ O	500	500	500	500	S/A	S/A
2	DCM	500	500	500	500	S/A	S/A
	AcOEt	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
	H ₂ O	S/A	S/A	1000	1000	1000	1000
3	DCM	500	500	500	500	S/A	S/A
	AcOEt	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
	H ₂ O	S/A	S/A	1000	1000	1000	1000

*S/A= Sem Atividade.

É importante salientar que esta atividade é inédita para a espécie *P. trifoliata*, pois não foram encontrados relatos da atividade antibacteriana para as fases testadas.

5.11.1 Atividade antibacteriana das substâncias isoladas das folhas de *P. trifoliata*.

5.11.1.1 Terpenos: friedelan-3-ona, 28-hidroxi-friedelan-3-ona, 30-hidroxi-friedelan-3-ona, α e β amirina, lupeol e hidroxicoriatina.

Os triterpenos isolados de *P. trifoliata*, foram testados frente as bactérias *A. hydrophila* e *K. pneumoniae*.

Para uma melhor explanação dos resultados, os triterpenos foram acondicionados em uma única tabela (Tabela 25).

A substância friedelan-3-ona, apresentou 38,70% de inibição frente a *A. hydrophila* e 4,96% frente a *K. pneumoniae*, o triterpeno 28-hidroxi-friedelan-3-ona, apresentou 29,02% e 28,61% de inibição para ambas as bactérias e a substância 30-hidroxi-friedelan-3-ona, apresentou 35,2% e 43,01% de inibição. Com isso podemos concluir que ambos os triterpenos do esqueleto friedelano não apresentaram atividade significativa quando comparado com o controle negativo (Tabela 26).

A mistura dos triterpenos α e β amirina, possuem um esqueleto básico do tipo ursano para a α -amirina e oleanano para a β -amirina, onde a única diferença entre eles é a posição de uma metila no anel E (Figura 44). Devido a semelhança estrutural, não foi possível separar essas duas substâncias por métodos cromatográficos convencionais como cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada preparativa. Ao serem testados frente as bactérias *A. hydrophila* e *K. pneumoniae*, apresentaram um percentual de inibição de 50,14% e 47,57% quando comparado com o controle negativo sendo consideradas com baixa ou sem atividade.

O lupeol, apesar de apresentar resultados positivos contra diferentes doenças, como descrito na página 61, apresentou um percentual de inibição de 52,77% na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ frente a bactéria *A. hydrophila* e 14,79% frente a bactéria *K. pneumoniae*, sendo considerada com baixa ou sem atividade quando comparado com o controle negativo (Tabela 37).

Ao analisar o sesquiterpeno, hidroxicoriatina, observou-se que o percentual de inibição foi de 38,16% frente a bactéria *A. hydrophila* e 46,43%

frente a bactéria *K. pneumoniae*, mostrando-se com baixa ou sem atividade quando comparado com o controle negativo (Tabela 37).

Tabela 37: Percentual de inibição dos triterpenos isolados de *P. trifoliata*

Percentual de Inibição na concentração de 500 µg/mL		
Substância	<i>A. hydrophila</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Friedelan-3-ona	38,79	4,96
28-hidroxi-friedelan-3-ona	29,02	28,61
30-hidroxi-friedelan-3-ona	35,2	43,01
α e β amirina	50,14	47,57
Lupeol	52,77	14,79
Hidroxycoriatina	38,16	46,43

Este é o primeiro relato da avaliação dos triterpenos: friedelan-3-ona, 28-Hidroxi-friedelan-3-ona e 30-hidroxi-friedelan-3-ona, frente as bactérias *A. hydrophila* e *K. pneumoniae*.

5.11.1.2 Substâncias fenólicas: 7,4'' Dimentilamentoflavona, 3-O-metil Ioniflavona, 7-Hidroxi-6-metoxicumarina.

O testes iniciaram pelos biflavonoides frente as bactérias *A. hydrophila* e *K. pneumoniae*, do qual observou-se que a substância 7,4'' dimentilamentoflavona, inibiu percentual de 73,58% frente a bactéria *K. pneumoniae*, sendo considerado um resultado significativo.

A substância 3-O-metil Ioniflavona inibiu percentual de 57,76% frente a bactéria *A. hydrophila* e 71,75% frente a bactéria *K. pneumoniae*, apresentando resultados significativos para ambas as bactérias testadas. Já a substância 7-hidroxi-6-metoxicumarina, apresentou resultado significativo frente a bactéria *K. pneumoniae*, com percentual de inibição de 73,30%.

É importante destacar que as três substância apresentaram esses resultados na concentração de 500 µg/mL (Tabela 38).

De maneira geral, as substâncias fenólicas são consideradas de grande importância e estão presentes principalmente em espécies vegetais. Assim, a busca pelo isolamento e identificação dessas substâncias, dar-se pelo fato dos resultados positivos frente a diferentes atividades biológicas como antibacterianas, antioxidantes, propriedades anti-tumorais, anti-inflamatórias, anti-mutagênicas, além de poderem proteger as células contra os danos oxidativos (MUSA *et al.*, 2013, ZHONG e SHAHIDI, 2012, CASTELO-BRANCO *et al.*, 2011, CASTILHO *et al.*, 2012; SULTANBAWA, 2011; TINKEL; *et al.*, 2012, SANIL, *et al.* 2015, SEM, *et al.* 2013, ZHONG e SHAHIDI, 2012, HARBORNE e WILLIAMS, 2000. Mais especificamente, os biflavonoides se apresentam de forma natural como duas unidades de flavonoides que podem unir-se por ligações covalentes do tipo C-C ou C-O-C.

Tabela 38: Percentual de inibição das substâncias fenólicas isoladas de *P. trifoliata*

Percentual de Inibição na concentração de 500 µg/mL		
Substância	<i>A. hydrophila</i>	<i>K. pneumoniae</i>
7,4'' dimentilamentoflavona	42,24	73,58
3-O-metil Ioniflavona	57,76	71,75
7-hidroxi-6-metoxicumarina	41,51	73,30

5.11.2 Atividade Antibacteriana dos fungos endofíticos.

A atividade antibacteriana em fungos endofíticos vem crescendo a cada ano, devido estes, serem capazes de produzir substâncias que podem causar um efeito bactericida ou bacteriostático frente a diferentes bactérias patogênicas.

Estudos recentes, mostraram que o maior interesse pelos fungos endofíticos estão voltados para os de origem de plantas medicinais, o qual correspondem a 35% de todas das plantas estudadas, aumentando assim, a possibilidade da descoberta de novas substâncias ativas biologicamente (ALVIN *et al.*, 2014).

Com isso, os fungos endofíticos de *P. trifoliata* foram testadas frente as bactérias: *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium columnare*, *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* e *Nocardia brasiliensis*

Este resultado torna-se de grande importância, visto que ambas as bactérias foram descritas como patogênicas para humanos e peixes, no caso *A. hidrófila* (GIRI *et al*, 2105; ANACARSO *et al*, 2014; Yu *et al.*, 2007) bem como *K. pneumoniae*, que acomete doenças em humanos (MADSON *et al* 1994; CASSETARI *et al* 2006; PODSCHUN e ULLMAN, 1998).

Além disso, é importante citar que ao testar os extratos brutos (JEFFREYS, 2011) e a fase DCM do extrato metanólico das folhas de *P. trifoliata*, em estudo nesta tese, observou-se que a CIM foi de 500 µg/mL, sendo considerado uma boa atividade quando comparado com o controle negativo.

Esses dados sugerem que a substância ou grupos de substâncias presentes no extrato bruto e nessa fase, podem ser produzidas pelo fungo endofíticos *Diaporthe hongkongensis* (Fungo 6).

Ao associarmos esse resultado com os dados de RMN de ¹H da fase DCM (Figura 87, página 163) e consequentemente com os dados de RMN de ¹H e bidimensionais da substância **XII** isolada da fase DCM desse fungo, podemos afirmar que o composto responsável por essa atividade é uma substância inédita com a nomenclatura descrita pela IUPAC como: (3-oxocyclobutyl) methyl 1-hydroxy-2-methylcyclopenta-2,4-diene -1-carboxylate. Essa afirmação pode ser comprovada ao visualizar seu espectro de RMN de ¹H, onde os sinais apresentam-se majoritários.

Ao analisar os resultados das demais fases, tabela 35, observou-se que o fungo de número 4, apresentou um halo de inibição de 0,5 cm sendo considerado uma baixa atividade, mostrando que as substâncias presentes na fase desse fungo, possuem baixo efeito biológico quando entra em contato com

esta bactéria, entretanto, é válido citar que possivelmente a substância responsável por essa baixa atividade seja a mesma substância isolada de *Diaporthe hongkongensis* (Fungo 6), pois é notável a presença dos mesmos sinais de RMN de ^1H com baixa intensidade.

Ao analisar a fase AcOEt de *Diaporthe hongkongensis*, observou-se um halo de inibição de 1,2 cm, sendo considerado também com média atividade, tornando a busca por novos compostos bioativos mais interessantes para este fungo. Ao comparar este resultado com a fase ACOEt das folhas, observou-se a ausência da atividade, o que favorece a pesquisa fitoquímica para este fungo endofítico (Tabela 39).

As demais fases foram testadas frente todas as bactérias descritas na tabela 36, porém não apresentaram crescimento do halo de inibição. Este fator pode estar associado à polaridade de algumas fases, o que dificulta a difusão no ágar ou simplesmente por não possuir atividade frente a essas bactérias.

Tabela 39: Resultado das atividade antibacteriana das fases DCM e AcOEt dos caldos metabólicos dos nove fungos endofíticos obtidos de *P. trifoliata*

Bactérias	Fungo 1		Fungo 2		Fungo 3		Fungo 4		Fungo 5	
	DCM	AcOEt	DCM	AcOEt	DCM	AcOEt	DCM	AcOEt	DCM	AcOEt
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0
<i>Edwardsiella tarda</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Flavobacterium columnare</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Bacillus cereus</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Nocardia brasiliensis</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Cont.

Bactérias	Fungo 6		Fungo 7		Fungo 8		Fungo 9	
	DCM	AcOEt	DCM	AcOEt	DCM	AcOEt	DCM	AcOEt
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Edwardsiella tarda</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Flavobacterium columnare</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Bacillus cereus</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Nocardia brasiliensis</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Os extratos brutos dos micélios, foram testados frente a todas as bactérias descritas nas fases do caldo metabólito descrita no item anterior.

Dentre as bactérias utilizadas nos testes é importante citar que a *K. pneumoniae* é um bastonete gram-negativo aeróbio facultativo é responsável por diferentes infecções e outras doenças como a pneumonia, infecções do trato urinário e de feridas, bacteremia, rinite crônica e meningites (MADSON *et al* 1994; CASSETARI *et al* 2006; PODSCHUN e ULLMAN, 1998) e também a *A. hydrophila* que é uma bactéria gram-negativa causadora de doenças em humanos e peixes (GIRI *et al*, 2105; ANACARSO *et al*, 2014; Yu *et al.*, 2007).

De acordo com essas evidencias, a obtenção e caracterização da substância responsável pelas atividades, se torna muito importante pois, a resistência bacteriana frente aos antibióticos está aumentando a cada dia.

Com isso, o extrato metanólico do micélio dos fungos 4 e 6, apresentaram um halo de inibição de 1,0 cm frente as bactérias *K. pneumoniae* e *A. hydrophila* sendo considerado uma média atividade, tornando-se de grande importância nesta tese, pois o aumento no número de bactérias resistentes a diferentes antimicrobianos, vem causando um impacto e ao mesmo tempo um grande desafio no tratamento de infecções (AZEVEDO 2000) (Tabela 40). Esses dados infelizmente continuam crescendo, visto que a Organização Mundial de Saúde (OMS), publicou em 2014 uma alerta sobre a possibilidade de uma possível epidemia, caso não haja medidas de controle contra os microrganismos resistentes (WHO, 2014).

Ao testar os fungos para as demais bactérias observou-se que não houve crescimento do halo de inibição, sendo considerado inativos (Tabela 40).

Tabela 40: Resultado das atividade antibacteriana dos extratos DCM e MeOH dos nove fungos endofíticos obtidos de *P. trifoliata*

Bactérias	Fungo 1		Fungo 2		Fungo 3		Fungo 4		Fungo 5	
	DCM	MeOH	DCM	MeOH	DCM	MeOH	DCM	MeOH	DCM	MeOH
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0
<i>Edwardsiella tarda</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Flavobacterium columnare</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0
<i>Bacillus cereus</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Nocardia brasiliensis</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Cont.

Bactérias	Fungo 6		Fungo 7		Fungo 8		Fungo 9	
	DCM	MeOH	DCM	MeOH	DCM	MeOH	DCM	MeOH
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Edwardsiella tarda</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Flavobacterium columnare</i>	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Bacillus cereus</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Nocardia brasiliensis</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

5.12 Atividade Antimalárica dos extratos das folhas obtidos de *P. trifoliata*.

Em nosso estudo, foi utilizada a metodologia da citometria de fluxo que permite obter resultados quantitativos, mais rápidos e reprodutíveis (KARL *et al*, 2009), pois a citometria de fluxo é usada para a identificação de células em suspensão, permitindo a sua diferenciação relativa à granularidade, tamanho, despolarização e intensidade de fluorescência, fornecendo assim importantes informações sobre o crescimento e desenvolvimento do *Plasmodium* (GRIMBERG, 2011).

Com isso, os resultados da atividade antimalárica dos extratos brutos, foram comparados a droga controle, quinina.

Ao calcular a $CI_{50\%}$, observou-se que o extrato hexânico da coleta 3, apresentou resultado de 1,51 $\mu\text{g/mL}$ e o extrato MeOH também da coleta 3, apresentou resultado de 1,77 $\mu\text{g/mL}$, sendo ambos considerados significativos quando comparados com a droga controle (Tabela 41).

Tabela 41. Atividade antimalárica dos extratos das coletas 1, 2 e 3.

Coleta	Extratos	$CI_{50}^a \mu\text{g mL}^{-1}$
Coleta 1	Extr. DCM	>100
	Extr. MeOH	22,74
	Extr. H ₂ O	12,43
Coleta 2	Extr. Hexano	6,44
	Extr. MeOH	12,0
	Extr. H ₂ O	14,73
Coleta 3	Extr. Hexano	1,51
	Extr. MeOH	1,77
	Extr. H ₂ O	9,38
Quinina ^b		0,015

^a $CI_{50\%}$: Concentração inibitória 50%; ^bDroga controle: Quinina; Extr.: Extrato.

Ao fazer uma comparação dos resultados das coletas 2 e 3, ambas coletadas do mesmo espécime, observou-se que houve uma baixa atividade no

extrato metanólico da coleta 2 com $CI_{50\%}$ de 12,0 $\mu\text{g/mL}$ e uma elevada atividade na coleta 3, $CI_{50\%}$ de 1,77 $\mu\text{g/mL}$. Esse fator pode está associado ao período da coleta (julho/2010 e abril/2013).

5.12.1 Atividade Antimalárica dos Fungos endofíticos

Os Fungos endofíticos podem produzir uma variedade muito grande de metabólitos tanto primários quanto secundários, incluindo aminoácidos (KLEINKAUF & VON DOHREN, 1990), enzimas (STAMFORD et al., 1998), entre outros.

Ao calcular a $CI_{50\%}$, observou-se que apenas o extrato 4 apresentou o melhor resultado quando comparado com a droga controle (Tabela 42). De acordo com Chapla (2012) ao cultivar *Phomopsis* sp. isolado de *Senna spectabilis* e posteriormente fracionar os extratos brutos, obteve dicetopiperazinas, uma classe de substâncias com diversas atividades, inclusive antimicrobiana.

Tabela 42: Determinação da CI_{50} da atividade antimalárica dos extratos MeOH dos micélios dos fungos endofíticos obtidos de *P. trifoliata*

Extratos MeOH	$CI_{50}^a \mu\text{g mL}^{-1}$
Fungo 1	16,79
Fungo 2	18,13
Fungo 3	23,71
Fungo 4	6,89
Fungo 5	16,86
Fungo 6	22,65
Fungo 7	25,5
Fungo 8	11,36
Fungo 9	19,56
Quinina ^b	0,015

^a $CI_{50\%}$: Concentração inibitória 50%; ^bDroga controle: Quinina

6 Conclusões

O estudo fitoquímico dos extratos das folhas de *P. trifoliata*, mostrou que os extratos diclorometânico e hexânicos possuem terpenos e os extratos metanólicos apresentam substâncias fenólicas. A triagem fitoquímica dos caldos metabólicos dos fungos endofíticos obtidos de *P. trifoliata*, mostram que a fase diclorometânica possui terpenos, e a fase de Acetato de Etila possui indícios de terpenos e compostos fenólicos. Os extratos DCM dos micélios possuem terpenos e os extratos MeOH possuem substâncias fenólicas.

O estudo fitoquímico do extrato DCM das folhas da coleta 1 de *P. trifoliata* permitiu o isolamento dos triterpenos friedela-3-ona (I), 30-hidroxi-friedelan-3-ona (II), lupeol (III), e 28-hidroxi-friedelan-3-ona XII. A fase DCM obtida do extrato MeOH da coleta 1, conduziu ao isolamento dos esteróides β -sitosterol e estigmasterol (IV e V), hidroxycoriatina (VI) e a mistura de α e β -amirina (VII e VIII).

O fracionamento do extrato hexânico da coleta 2, conduziu ao isolamento novamente das substâncias I, IV, V, além da cumarina 7-hidroxi-6-metoxi-cumarina (IX). Já o fracionamento do extrato MeOH da coleta 2, forneceu os biflavonoides 7,4''' dimentilamentoflavona (X), 3'-O-metilloniflavna (XI).

O estudo fitoquímico do fungo endofítico *Diaporthe hongkongensis*, conduziu ao isolamento de duas substâncias inéditas previamente descrita como: carboxilato de (3-oxociclobutil) -1-metil-2-hidroxi metilciclopenta-2,4-dieno (XIII) e 9-amino-7- (2,5,7-triazabicyclo [2.2.1] hept -3-il) -2,3,6-trioxi-1-azabicyclo [3.2.2] nona-4,8-dieno-4-carbaldeído (XIV).

Ao analisar o potencial antioxidante, observou-se que os extratos MeOH das folhas apresentaram equivalência de 1,15 e 1,13 e os extratos H₂O apresentaram 2,42 e 2,83 quando comparado com o DPPH• e Fe³⁺. Ao analisar as fases obtidas dos extratos MeOH, as fases H₂O das coletas 1 e 3 apresentaram resultados significativos de 2,8 e 4,51 para o DPPH• e 4,51 e 5,53 para Fe³⁺. Ao analisar o potencial dos fungos endofíticos, verificou-se que apenas a fase DCM do caldo metabólico foi significativa.

A atividade antibacteriana mostrou que a fase DCM do extrato MeOH das folhas das coletas 2 e 3 e a fase AcOEt do extrato MeOH das folhas da

coleta 1, apresentaram CIM e CMB de 500 µg/mL frente as bactérias *Aeromonas hydrophila* e *Flavobacterium columnare* e a fase aquosa do extrato MeOH das folhas da coleta 1, apresentou CIM e CMB de 1000 µg/mL frente às bactérias *Flavobacterium columnare* e *Pseudomonas fluorescens*. O extratos miceliais dos fungo 4 e 6 apresentaram média atividade frente as bactérias *Aeromonas hydrophila* e *Klebsiella pneumoniae*, além das fases DCM e AcOEt do caldo metabólico do fungo 4.

A atividade antimalárica mostrou que os extratos hexânicos e MeOH das folhas da coleta 3 apresentaram IC₅₀ significativa de 1,51 e 1,77 µg/mL quando comparado com o padrão. Já os extratos dos fungos endofíticos, o extrato MeOH do fungo 4 apresentou 6,89 de parasitemia sendo significativo.

Ao testar as substâncias isoladas frente as bactérias, observou-se que a CIM da substância **X** foi de 73,58% e da substância **XI** foi de 71,75% frente a bactéria *K. pneumoniae* na concentração de 500 µg/mL, as demais substâncias não foram ativas. Estes resultados são importantes, pois é o primeiro relato de atividade antibacteriana frente às bactérias *Aeromonas hydrophila* e *K. pneumoniae* das substâncias isoladas de *P. trifoliata*.

7 Referências bibliográficas

- ABREU, L. M.; COSTA, S. S.; PFENNING, L. H.; TAKAHASHI, J. A.; LARSEN, T. O.; ANDERSEN, B. Chemical and molecular characterization of *Phomopsis* and *Cytospora*-like endophytes from different host plants in Brazil. **Fungal Biology**, v 116, p. 249-290, 2012.
- AIMÉ, S.; DIGILIO, G.; BRUNO, E.; MAINERO, V.; BARONI, S.; FASANO, M. Modulation of the antioxidant activity of HO• scavengers by albumin binding: a 19F-NMR study. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 307, p. 962–966, 2003.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **The Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143-152, 2013.
- ALBARICI, T. R.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, F. F. G. S. Cumarinas e alcaloides de *Rauia resinosa* (RUTACEAE). **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2130-2134, 2010.
- ALMEIDA, M. Z. **Plantas medicinais** - 3. ed. - Salvador: EDUFBA, 2011.
- ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F.; SMÂNIA-JUNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memorias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 367-73, 2000.
- ALVIN, A.; MILLER, K. I.; NEILAN, B. A. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. **Microbiology Research**, v. 169, n. 7-8, p. 483-495, 2014.
- AMATATONGCHAI, M. LAOSING, S., CHAILAPAKUL, O., NACAPRICHA, D. Simple flow injection for screening of total antioxidant capacity by amperometric detection of DPPH radical on carbon nanotube modified glassy carbon electrode. **Talanta**, v. 97, n. 0, p. 267-272, 2012.
- ANACARSO, I.; MESSI, P.; CONDÒ, C.; ISEPPI, R.; BONDI, M.; SABIA, C.; NIEDERHÄUSERN, S. A bacteriocin-like substance produced from *Lactobacillus pentosus* 39 is a natural antagonist for the control of *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in fresh salmon fillets. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, nº. 2, p. 604-611, 2014.
- APG II. An update of the Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society** v. 141, p. 399-436, 2003.
- ARAÚJO, C. A. C, LEON, L. L. Biological activities of *Curcuma longa*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 723-728, 2001.
- ARBI, M. E.; THÉOLIER, J.; PIGEON, P.; JELLALI, K.; TRIGUI, F.; TOP, S.; AIFA, S.; FLISS, I.; JAOUEN, G.; HAMMAMI. Antibacterial properties and mode of action of new triaryl butene citrate compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 76, p. 408-413, 2014.
- ARATANECEHMEGE, Y.; HIBASAMI, H.; SANPI, K.; KATSUZAKI, H.; IMAI, K.; KOMIYA, T. Induction of apoptosis by lupeol isolated from *Gossypinus malabarica* L. Merr) in human promyelotic leukemia HL-60 cells. **Oncology Reports**, v. 11, n. 7, p. 289-292, 2004.
- ASHA, R.; DEVI, V. G.; ABRAHAM, A. Lupeol, a pentacyclic triterpenoid isolated from *Vernonia cinerea* attenuate selenite induced cataract

- formation in Sprague Dawley rat pups. **Chemico-Biological Interactions**. v. 245, p. 20-29, 2016.
- ASH, G. J.; STODAR, T. B.; SAKUANRUNGSIRIKUL, S.; ANSCHAW, E.; CRUMP, N.; HAILSTONES, D.; HARPER, J. D. I. Genetic characterization of a novel *Phomopsis* sp., a putative biocontrol agent for *Carthamuslanatus*. **Mycologia**, v. 102, p. 54–61, 2010.
- ÁVILA, S. L. M. Malária. In: FERRIERA, A. W. (Ed.). **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 157 - 158. 1996.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, J. W.; PEREIRA, J. O. & ARAÚJO, W. L. “Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants”. **Eletronic Journal of Biotechnology**. v. 3 n.1, p. 40-65, 2000.
- <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol3/issue1/full/4/4.pdf>. Acesso em: 13 de janeiro de 2015.
- BACAB-CHAN, M. J., RODRIGUEZ-PEÑA, L. M. Plant natural products with leishmanicidal activity. **Nat. Prod. Rep.** v. 18, p. 674-688. 2001.
- BIAMONTE, M. A; WANNER, J.; LE ROCH, K. G.; Recent advances in malaria drug discovery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. p. 2829-2840, 2013.
- BARNES, J.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. St. John's worth (*Hypericum perforatum*): A review of chemistry, pharmacology and chemical properties. **Journal of pharmacy and pharmacology**. v. 53, p. 583-600, 2001
- BEZERRA, J. D. P., NASCIMENTO, C. C. F., BARBOSA, R. N., SILVA, D. C. V., SVEDESE, V. M., SILVA-NOGUEIRA, E. B., GOMES, B. S., PAIVA, L. M., SOUZA-MOTTA, C. M., Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: Diversity and biotechnological potential. **Brazilian Journal of Microbiology** (in press), v. 46, nº 1, p. 49-57, 2015
- BIVA, I. J.; NDI, C. P.; GRIESSER, H. J.; SEMPLER, S. J.; Antibacterial constituents of *Eremophila alternifolia* An Australian aboriginal traditional medicinal plant. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 182, p. 1-9, 2016.
- BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199- 1200, 1958.
- BORUT, P.; RAJA, D. Free Radicals and Extrinsic Skin Aging. **Dermatology Research and Practice**, v. 2012, p. 1-4, 2012.
- BOTELLA, L; DIEZ, J. J. Phylogenetic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. **Fungal Diversity**, n. 47, p. 9–18. 2011.
- BRADY, S. F.; CLARDY, J. CR377, a new pentakide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 10, p. 1447-1448, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. **Situação Epidemiológica da malária no Brasil, 2000 a 2011**. No 1. V. 44. 2013.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: **Plantas Medicinais e Fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde**. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção básica – Brasília, p. 156. 2012.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico**. v. 6. nº 43. Brasília: SVS. Brasil, p. 1- 17. 2015.
- BROOKS, J.S.; FEENY, P. Seasonal variation in *Daucus carota* leaf surface and leaf tissue chemical profiles. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, n.9, p.769–782, 2004.
- DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, Available online 23 January 2016,
- CAFEU, M. C.; SILVA, G. H.; TELES, H. L.; BOLZANI, V. S.; ARAUJO, A. R.; YOUNG, M. C. M.; PFENING, L. H. Substancias antifungicas de *Xylaria* sp., um fungo endofitico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 991-995, 2005.
- CAI, P.; MCPHAIL, A. T.; KRAINER, E.; KATZ, B.; PEARCE, C.; BOROS, C.; CACERES, B.; SMITH, D.; HOUCK, D. R. Mycoepoxydiene represents a novel class of fungal metabolites. **Tetrahedron Letters**, v. 40: 8, p. 1479-1482, 1999.
- CASTELO-BRANCO, V. N.; TORRES, A. G. Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. **Revista de Nutrição**. v. 24, n. 1, p. 173-187. 2011.
- 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 89 p. 185–191. 2009.
- CAMPOS FILHO, E. M. **Plante as árvores do Xingu e Araguaia**. São Paulo: Edição Revista e Ampliada. 260 p. 2012.
- CASSETTARI, V. C.; SILVEIRA, I. R.; BALSAMO, A. C.; FRANCO, D. Surto em berçário por *Klebsiella pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectro estendido atribuído à colonização de profissional de saúde portador de onicomicose. **Jornal de pediatria**, n 82, v. 4, p. 313-316, 2006.
- CASTAÑEDA, P. M. R., ALMA, B., GARCIA, E. CHÁVEZ, D., MATA, R. Secondary metabolites from the stem bark *Celaenodendron mexicanum*. **Journal of Natural Products**. Vol. 56, N. 9, p 1575-1579, 1993.
- CASTELLANI, A. The “water cultivation” of pathogenic fungi. **Journal of tropical Medicine and Hygiene**. v. 66, p. 283-284, 1963.
- CASTILHO, P. C.; SAVLUCHINSKE-FEIO, S.; WEINHOLD, T. S.; GOUVEIA, S. C. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils, extracts and their main components from oregano from Madeira Island, Portugal. **Food Control**, v. 23, p. 552- 558, 2012.
- CIEŚLA, L., KRYSZEN, J., STOCHMAL, A., OLESZEK, W., WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M. Approach to develop a standardized TLC-DPPH test for assessing free radical scavenging properties of selected phenolic compounds. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 70, n. 1, p. 126-135, 2012.
- CHAABI, M., ANTHEAUME, C., WENIGER, B., JUSTINIANO, H., LUGNER, C., LOBSTEIN, A. Biflavones of *Decussocarpus rospigliosii* as phosphodiesterases inhibitors. **Panta medica**, v. 73, p. 1284-1286, 2007.
- CHAPLA, V. M. **Estudo químico e biológico do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado da *Senna spectabilis***. 179 p. Dissertação

- (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2012.
- 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 base don plastid rbcL DNA sequences. **Kew Bulletin**. n. 57. p. 141-181. 2002.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) - (antigo NCCLS) CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West. Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- CHICCA, A.; MARAZZI, J.; GERTSCH, J. The antinociceptive triterpene β -amyrin inhibits 2-arachidonoylglycerol (2-AG) hydrolysis without directly targeting cannabinoid receptors. **British Journal of Farmacology**. n. 167, p. 1596–1608, 2012.
- CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z. Hosts, species and genotypes: opinions versus data. **Australasian Plant Pathology**. n. 34, p. 463–470, 2005.
- DAI, J.; KROHN, K.; FLOERKE, U.; GEHLE, D.; AUST, H. J.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; RHEINHEIMER, J. Novel highly substituted biraryl ethers, phomopsines D-G, isolated from endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Adenocarpus foliolosus*. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 23, p. 5100–510, 2005.
- DARAK, O.; BARDE, R. D. *Pseudomonas fluorescens* associated with bacterial disease in Catla catla in Marathwada region of Maharashtra. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**. v. 6, n. 2, p. 189-195, 2015.
- DAVITT, A. J.; CHEN, C.; RUDGERS, J. A. Understanding context-dependency in plant–microbe symbiosis: The influence of abiotic and biotic contexts on host fitness and the rate of symbiont transmission. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, p. 137-145. 2011.
- DECLERCQ, A. M.; HAESEBROUCK, F.; BROECK, W. V. D.; BOSSIER, P.; DECOSTERE, A. Columnaris disease in fish: a review with emphasis on bacterium–host interactions. **Veterinary Research**. v. 44, p. 1–17, 2013.
- DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1430-1435, 2011.
- DETTRAKUL, S.; KITTA KOOP, P.; ISAKA, M.; NOPICHA, S.; SUYARNSESTAKORN, C.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Antimycobacterial pimarane diterpenes from the fungus *Diaporthe* sp. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 7, p. 1253–1255, 2003
- DISSANAYAKE, A. J.; LIU, M.; ZHANG, W.; CHEN, Z.; UDAYANGA, D.; CHUKEATIROTE, E.; LI, X.; YAN, J.; HYDE, K. D. Morphological and molecular characterisation of *Diaporthe* species associated with grapevine trunk disease in China. **Fungal Biology**, v. 30, p. 1-12, 2014.
- DONG, H. T.; NGUYEN, V. V.; PHIWSAIYA, K.; GANGNONNGIW, W.; WITHYACHUMNARNKUL, B.; RODKHUM, C.; SENAPIN S. Concurrent infections of *Flavobacterium columnare* and *Edwardsiella ictaluri* in

- striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* in Thailand. **Aquaculture**, v. 448, p. 142-150, 2015.
- ELSAESSER, B.; KROHN, K.; FLOERKE, U.; ROOT, N.; AUST, H. J.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; ANTUS, S.; KURTAN, T. X ray structure determination absolute configuration and biological activity of phomoxanthone. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 21, p. 4563–4570, 2005.
- ESPOSITO-POLESII, N. P. Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 9, n. 4, p. 533-541, 2011.
- FELÍCIO, R.F.; PAVÃO, G. B.; OLIVEIRA, A. L. L.; ERBERT, C.; CONTI, R.; PUPO, M. T.; FURTADO, N. A. J. C.; FERREIRA, E. G.; COSTA-LOTUFO, L. V.; YOUNG, M. C. M.; YOKOYA, N. S.; DEBONSI, H. M. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities exhibited by endophytic fungi from the Brazilian marine red alga *Bostrychia tenella* (Ceramiales). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, nº 6, p. 641-650, 2015.
- FERREIRA, M.S. Malária. In: VERONESI, RICARDO; FOCACCIA, ROBERTO (Coord.). **Tratado de Infectologia**. 2. ed. São Paulo. Rio de Janeiro. Ribeirão Preto. Belo Horizonte. Atheneu, 1280 - 1309. 2004.
- FERREIRA, S. C., ISHIDA, A. K., SOUZA FILHO, A. P. S., SILVA, T. B. Atividade antifúngica de escopoletina sobre *Rhizoctonia solani*. **17º Seminário de Iniciação Científica e 1º Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental**, 2013.
- FRAGA FILHO, C. Radicais Livres: vilões ainda em estudo. **Ciênc. Hoje**, v.27, p. 60- 62, 2003.
- FREIRE, K. T. L. S.; ARAÚJO, G. R.; BEZERRA, D. P.; BARBOSA, R. N.; SILVA, D. C. V.; SVEDESE, V. M.; PAIVA, L. M.; SOUZA-MOTTA, C. M. Fungos endofíticos de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.(cactaceae) sadia e infestada por *Dactylopius opuntiae* (cockerell, 1896) (Hemiptera: Dactylopiidae). **Gaia Scientia**. v. 9, no 2, p. 104-11, 2015.
- GARG, H. S.; MITRA, C. R. Putraflavone, a new biflavonoid from *Putranjiva roxburghii*. **Phytochemistry**, n. 10, p. 2787-2791, 1971.
- GALLINA, P. Análise de compostos secundários de *Hypericum cordatum* (Vell. Conc.) N. Robson, comb. Nov (Gutiferae). **Monografia apresentada a Universidade Metodista**. p, 47, 1999.
- GARCIA-REYNE, A.; LÓPEZ-MEDRANO, F.; MORALES, J. M.; ESTEBAN, C. G.; MARTÍN, I.; ERANA, I.; MEIJE, Y.; LALUEZA, A.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; AGUADO, J. M. Cutaneous infection by *Phomopsis longicolla* in a renal transplant recipient from Guinea: first report of human infection by this fungus. **Transplant Infectious Disease**, v. 13, p. 204–207, 2011.
- GIRI, S. S.; SEM, S. S.; CHI, C.; KIM, H. J.; YUN, S.; PARK, S. C.; SUKUMARAN, V. Effect of guava leaves on the growth performance and cytokine gene expression of *Labeo rohita* and its susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 46, nº 2, p. 217-224, 2015.
- GOULART, M. O. F., SANT'ANA, A. E. G., LIMA, R. A., CAVALCANTE, S. H., CARVALHO, M. G., BRAZ FILHO, R. Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos

- átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos jatrofolonas A e B. **Química Nova**, v. 16, nº 95, 1993.
- 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.
- GRIMBERG, B. T. Methodology and application of flow cytometry for investigation of human malaria parasites. **Journal Immunologic Methods**, v. 31 p. 367, 2011.
- GUBIANI, J. R. Prospecção Química e Biológica do Fungo Endofítico *Camarops* sp. Isolado de *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae). Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, p. 175, 2011.
- GUNATILAKA, A. A. Natural products from plant-associated microorganism distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence, **Journal of Natural Product**. 69(3), p. 509-526. 2006.
- GUNDEL, P. E.; GARIBALDI, L. A.; MARTÍNEZ-GHERSA, M. A.; GHERSA, C. M. Neotyphodium endophyte transmission to *Lolium multiflorum* seeds depends on the host plant fitness. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, p. 359-366, 2011.
- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504. 2000.
- HASSAN, B. A. R. Medicinal plants (Importance and uses). **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 3, p. 10, 2012.
- HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C.; JAWAHAR, S.; HEO. M-S. Immunomodulatory effect of *Withania somnifera* supplementation diet in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) against *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 32, nº 1, p. 94-100, 2012.
- HERNÁNDEZ-LEÓN, R.; ROJAS-SOLIS, D.; CONTRERAS-TÉREZ, M.; OROZCO-MOSQUEDA, M. C.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L. I.; CRUZS. H. R.; VALENCIA-CANTERO, E.; SANTOYO, G. Characterizations of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffudibe and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. **Biological Control**. v. 81, p. 83-92, 2015.
- HUANG, F.; HOU, X.; DEWDNEY, M.M.; FU, Y.; CHEN, G. Q.; HYDE, K. D.; LI, H. Diaporthe species occurring on Citrus in China. **Fungal Diversity**, v. 61, p. 237-250, 2013.
- ICHIHARA, A.; SAWAMURA, S.; SAKAMURA, S. Structures of Altiloxins A and B, phytotoxins from *Phoma asparagi* Sacc. **Tetrahedron Letters** v. 25: 30, p. 3209-3212, 1984.
- JAMUNA, S.; KARTHIKA, K.; PAULSAMY, S.; THENMOZHI, K.; KATHIRAVAN, S.; VENKATESH, R. Confertin and scopoletin from leaf and root extracts of *Hypochaeris radicata* have anti-inflammatory and antioxidant activities. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 221-230, 2015.
- JEFFREYS, M. F. **Estudo Químico e Bioatividade de *Piranhea trifoliata* (Picrodendraceae)**. Dissertação, Universidade do Estado do Amazonas. Manaus, p. 120. 2011.
- JEFFREYS, M. F.; LOBO, W. V.; NUNEZ, C. V. Bioprospecção de fungos endofíticos das folhas de *Piranhea trifoliata* (PICRODENDRACEAE). **55º**

Congresso Brasileiro de Química. IBBN-978-85-85905-15-6.
Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2015/trabalhos/7/8220-21431.html>

- JEFFREYS, M. F.; NUNEZ, C. V. Triterpenos das folhas de *Piranhea trifoliata* (Picrodendraceae). **Acta Amazônica**, v. 45, p. 189-194, 2016.
- KAUR, K., JAIN, M., KAUR, T., JAIN, T., Review antimalarials from nature. **Bioprogram & medicinal chemistry**, n. 9, 2009.
- KANNAN, S.; VIJAYAKUMAR, B.; SURESHKUMAR, C.; MOHANKUMAR, R.; NARASIMHAN, S. Insect Antifeedant and Growth Regulating Activities of β -Amyrin from *Sarcostemma acidum*. **Journal of Chemistry**. v. 25, p.1167–1168, 2013.
- KEDARE, S., SINGH, R. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 412-422, 2011.
- KARL, S.; WONG, R. P.; ST PIERRE, T. G.; DAVIS, T. M. A comparative study of a flowcytometry-based assessment of in vitro Plasmodium falciparum drug sensitivity. **Malar Journal**, p. 14; v. 8 p. 294. 2009.
- KASARI, S.; Pandey, S. P.; Spiteller, M. Untapped mutualistic paradigms linking host plant and endophytic fungal production of similar bioactive secondary metabolites. **Phytochemistry**, n. 91, p. 81–87, 2013.
- KLEINKAUF, H.; VON DOHREN, H. Biosynthesis of Peptide Antibiotics. **European Journal of Biochemistry**, v. 192, p. 1-15, 1990.
- KUMAR, N.; SINGH, B.; BHANDARI, P.; GUPTA, A. P.; UNİYAL, S. K.; KAUL, V. K. Biflavonoids from *Lonicera japônica*. **Phytochemistry**, n. 66, p. 2740-2744, 2005.
- KUMARAN, R. S.; HUR, B. Screening of species of the endophytic fungus *Phomopsis* for the production of the anticancer drug taxol. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 54, p. 21–30, 2009.
- LANGE, M. D.; BECK, B. H.; BROWN, J. D.; FARMER, B. D.; BARNETT, L. M.; WEBSTER, C. D. Missing the target: DNAk is a dominant epitope in the humoral immune response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Flavobacterium columnare*. **Fish & Shellfish Immunology**, 2016.
- LEE, C.; LEE, J. W.; SEO, J. Y.; HWANG, S. W.; IM, J. P.; KIM, J. S. Lupeol inhibits LPS-induced NF-kappa B signaling in intestinal epithelial cells and macrophages, and attenuates acute and chronic murine colitis. **Life Sciences**, v. 146, p. 100-108. 2016.
- LEE, J. C.; STROBEL, G. A.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J. C. Torreyanic acid: a selectively cytotoxic quinone dimer from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. **Journal of Organic Chemistry**. v. 61, p. 3232-3233, 1996.
- LEITE, F. H. A.; TARANTO, A. G; FONSECA, A. L.; VAROTTI, F. P.; NUNES, R. R.; JÚNIOR, M. C. Malária: Dos velhos fármacos aos novos alvos moleculares. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 60, p. 66-69, 2013.
- LEITÃO, F.; LEITÃO, S. G.; FONSECA-KRUEL, V. S.; SILVA, I. M.; MARTINS, K. Medicinal plants traded in the open-air markets in the State of Rio de Janeiro, Brazil: an overview on their botanical diversity and toxicological potential. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 225-247, 2014.

- LI, Y.; WANG, M.; HUANG, Y.; SHEN, Y. Secondary metabolites from *Phomopsis* sp. A123. *Mycology. An International Journal on Fungal Biology*, v. 1, no. 4, p. 254-261, 2010.
- LICHTENSTEIN, A. H.; DECKELBAUM, R. J. Stanol/Sterol Ester-Containing Foods and Blood Cholesterol Levels, *Journal the American Heart Association*, v. 103, p.1177- 1179, 2001.
- LIN, X.; HUANG, Y.; FANG, M.; WANG, J.; ZHENG, Z.; SU, W.; Cytotoxic and antimicrobial metabolites from marine lignicolous fungi, *Diaporthe* sp. **FEMS Microbiology Letters**, v 251, p. 53–58, 2005.
- 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.
- LOCATELLI, M., GINDRO, R., TRAVAGLIA, F., COISSON, J-D., RINALDI, M., ARLORIO, M. Study of the DPPH-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. **Food Chemistry**, v. 114, n. 3, p. 889-897, 2009
- LU, S., DRAEGER, S., SCHULZ, B., KROHN, K., AHMED, I., HUSSAIN, H. Bioactive aromatic derivatives from endophytic fungus, *Cytospora* sp. **Nat. Prod. Commun**, v. 6, p. 661–666, 2011.
- LUMBSCH, T. H., **Part. one: Outline of Ascomycota and Part. two: Notes on ascomycete systematics**, Fieldiana, I. L. Chicago, 2009.
- MADSON B.; OFEK I.; CLEGG S.; ABRAHAM S. N. Type 1 fimbrial shafts of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* influence sugar binding specificities of their fimbriae H adhesions. **Infection and Immunity**, p. 843- 848,v. 62, 1994.
- MAHATO, S. B. e KUNDU, A. P. ¹³C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids Compilation and some Salient Features. **Phytochemistry**, p. 1517- 1575, 1994.
- MATOS, I.; BENTO, A. F.; MARCON, R.; CLAUDINO, R. F.; CALIXTO, J. B. Preventive and therapeutic oral administration of the pentacyclic triterpene α and β amyrin ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice: The relevance of cannabinoid system. **Molecular Immunology**. v. 54, p. 482-492, 2013.
- MITCHELL, D. K. Astrovirus gastroenteritis. **Pediatr Infect Dis J** 21: 1067-1069, 2002
- MOBOT: <http://www.tropicos.org/Name/50168724?tab=maps>, acessado em 10 de Janeiro de 2015.
- MOGANA, R., TENG-JIN, K., WIART, C. Anti-Inflammatory, anticholinesterase, and antioxidant potential of scopoletin isolated from *canarium patentinervium* Miq. (Burseraceae Kunth). **Evid. Based Complement. Altern. Med.**, 734-824, v., 2013, 2013.
- 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.
- MUSA, K. H., ABDULLAH, A., HIDAYAT, M. A. A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 4102-4106, 2013.
- MYCOBANK DATABASE: Fungal databases, nomenclature and species banks. Disponível em:

<http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycoBankNr=81514>, acessado em 13/06/2016.

- NAM, H. and KIM, M. M. Scopoletin has a potential activity for anti aging via autophagy in human lung fibroblasts. **Phytomedicine**, v. 22, p. 362-368, 2015.
- NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 247-256, 2000.
- 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.
- NOIPA, T., SRIJARANAI, S., TUNTULANI, T., NGEONTAE, W. New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. **Food Research International**, v. 44, n. 3, p. 798-806, 2011.
- 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.
- OLIVEIRA, D. R.; UKRETTLI, A. U.; AGUIAR, A. C. C.; LEITÃO, G. G.; VIEIRA, M. N.; MARTINS, K. S.; LEITÃO, S. G. Ethnopharmacological evaluation of medicinal plants used against malaria by quilombola communities from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 424-434, 2015.
- PARK, Y-S.; DUTTA, S.; ANN, M.; RAAIJMAKERS, J. S.; PARK, K. Promotion of plant growth by *Pseudomonas fluorescens* strain SS 101 via novel organic compounds. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 461, nº 2, p. 361-365, 2015.
- PEDROZA, L. da S. **Estudo Químico e Avaliação da Atividade Biológicas dos galhos de *Piranhea trifoliata* Baill (Picrodendraceae)**. Dissertação, Universidade do Estado do Amazonas. Manaus, p. 82. 2014.
- PEREIRA, A. de C. **Prospecção fitoquímica de *Unxia kubitzkii* H.ROB., e estudo da atividade citotóxica utilizando *Artemia salina* LEACH**, Rio de Janeiro, Universidade Castelo Branco. Curso de Ciências Biológicas. 2006.
- PIACENZA, L. P. L.; PEGEL, K. H.; PHILLIPS, L.; WRIGHT, E. S. BEYERANE. Diterpenes: Structure and Reactivity of the α -Ketol *ent-3p*- Hydroxybeyerane-15-eneo2,12-dione, its Corresponding Diosphenol, and Synthesis of the Isomeric α -Ketol Acetates. **Journal Chemistry Societ.** p. 1004-1012. 1979.
- PICCOLO, S. L.; FERRARO, V.; ALFONZO, A.; SETTANNI, L.; ERCOLINI, D.; BURRUANO, S.; MOSCHETTI, G. Presence of endophytic bacteria in *Vitis vinifera* leaves as detected by fluorescence in situ hybridization. **Ann Microbiol**, v. 60, p. 161-167, 2010.
- PODSCHUN, R. and ULLMAN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology taxonomy, typing, methods and pathogenicity factors. **Clin Microbiol** v, 11, nº 4, p. 589-603, 1998.

- PRACHYA, S.; WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; NGAMROJANAVANICH, N.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S.; KITTA KOOP, P. Cytotoxic mycoepoxydiene derivatives from an endophytic fungus *Phomopsis* sp. isolated from *Hydnocarpus anthelminticus*. **Planta Médica**, v. 73, p. 1418-1420, 2007.
- PURI, S. C.; VERMA, V.; AMNA, T.; QAZI, G. N.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces Camptothecin. **Journal of Natural Products**, v. 68, nº. 12, p. 1717-1719, 2005.
- RADIC, N.; STRUKELJ, B. Endophytic fungi – The treasure chest of antibacterial substance. **Phytomedicine**, v. 19, nº 14, p. 1270-1284, 2012.
- REDKOA, F.; CLAVINA, M. L.; WEBER, D.; RANEAC, F.; ANKEB, T.; MARTINOVA, V. Antimicrobial isoflavonoids from *Erythrina crista galli* infected with *Phomopsis* sp. **Z Naturforsch**, v. 62c, p.164–168, 2007.
- REMADE- Portal Nacional de Madeiras. **O Universo de madeiras em suas mãos** em: http://www.remade.com.br/br/madeira_especies.php?num=431&title=Madeiras%20brasileiras%20e%20ex%F3ticas&especie=Piranheira. Acessado em 14 de janeiro de 2015
- RIVERO-CRUZ, J. F.; MACIAS, M.; CERDA-GARCIA-ROJAS, C. M.; MATA, R. A new phytotoxic nonenolide from *Phoma herbarum*. **Journal Natural Product** v. 66, no,4, p. 511–514, 2003.
- RODRIGUES, K.; RAMOS, D. F.; CARRION, L. L.; CURSINO, L. M. C.; JEFREYS, M. F.; PEDROZA, L. S.; OSÓRIO, M. I. C.; OLIVEIRA, J. L.; ANDRADE, J. I. A.; FERNANDES, C. C.; NUNEZ, C. V.; SILVA, P. E. A. Antifungal activity of brazilian amazon plants extracts against some species of *candida* spp. **International Journal of Phytopharmacology**, v. 5., n. 6, p. 445-453, 2014.
- ROSSMAN, A. Y.; FARR, D. F.; CASTLEBURY, L. A. A review of the phylogeny and biology of the Diaporthales. **Mycoscience**, p. 48, p. 135–144, 2007.
- SANIL, Y. N., DANLADIL, S., WAN-AZEMIN, A., US RAO, M., MOHD, K. S., DHARMARAJI, S. Effects of Extracting Solvents on Total Phenolic Content, Total Flavonoid Content and Anti-Oxidant Activity of *Andrographis paniculata* from Kemaman, Malaysia. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 6, n. 3, p. 1397- 1404, 2015.
- SÁNCHEZ-BURGOS, J. A.; RAMÍREZ-MARES, M. V.; GALLEGOS-INFANTE, J. A.; GONZÁLES-LAREDO, R. F.; MORENO-JIMÉNEZ, M. R.; CHÁIREZ-RAMÍREZ, M. H.; MEDINA-TORRES, L.; ROCHA- GUZMÁN, N. E. Isolation of lupeol from white oak leaves and its anti-inflammatory activity. **Industrial crops and products**. v. 77, p. 827-832, 2015.
- SANTOS, J. M.; CORREIA, V. G.; PHILLIPS, A. J. L. Primers for mating-type diagnosis in *Diaporthe* and *Phomopsis*: their use in teleomorph induction *in vitro* and biological species definition. **Fungal Biology**, v. 114, p. 255–270, 2010.
- SASAKI, H., KITAH, Y., TSUKADA, M., MIKI, K., KOYAMA, K., JULIAWATY, L. D., HAKIM, E. H., TAKAHASHI, K., KINOSHITA, K. Inhibitory activities of

biflavonoids against amyloid- β peptide 42 cytotoxicity in PC-12 cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 25, p. 2831-2833, 2015.

- SASAKI, H., MIKI, K., KINOSHITA, K., KOYAMA, K., JULIAWATY, L. D., ACHMAD, S. A., HAKIM, E. H., KANEDA, M., TAKAHASHI, K. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 20, p. 4558-4560, 2010.
- SECCO, R.; CORDEIRO, I. Picrodendraceae: In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB38587>>. Acesso em: 14 janeiro de. 2015.
- SEN, S., DE, B., DEVANNA, N., CHAKRABORTY, R. Total phenolic, total flavonoid content, and antioxidant capacity of the leaves of *Meyna spinosa* Roxb., an Indian medicinal plant. **Chinese Journal of Natural Medicines**. n. 11, v.2, p. 149–157, 2013.
- SENADEERA, S.P., WIYAKRUTTA, S., MAHIDOL, C., RUCHIRAWAT, S., KITTAKOOP, P. A novel tricyclic polyketide and its biosynthetic precursor azaphilone derivatives from the endophytic fungus *Dothideomycete* sp. **Org. Biomol. Chem.** n. 10, p. 7220–7226, 2012.
- SCHULZ, B., BOYLE, C., DRAEGER, S., RO mmert, A. –K. & KROHN, K. Endophytic fungi: a source of biologically active secondary metabolites. **Mycol Res**. v. 1006. p. 996-1004. 2002.
- SHIONO1, Y.; NITTO, A.; SHIMANUKI1, K.; KOSEKI1, T.; MURAYAMA1, T.; MIYAKAWA, T.; YOSHIDA, J.; KIMURA, K-I. A new benzoxepin metabolite isolated from endophytic fungus *Phomopsis* sp. **The Journal of Antibiotics**, v. 62, p. 533–535, 2009
- SHIVAS, R. G.; ALLEN, J. G.; WILLIAMSON, P. M. Intraspecific variation demonstrated in *Phomopsis leptostromiformis* using cultural and biochemical techniques. **Mycological Research**, v. 95, p. 320–323, 1991.
- SILVA, G. A. **Constituintes químicos dos caules e raiz de *Salacia elliptica* (mart.) Peyr.** Dissertação, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, p. 58. 2009.
- SILVA, N.; ALVES, S.; GONÇALVES, A.; AMARAL, J. S.; POETA, P. Antimicrobial activity of essential oils from mediterranean aromatic plants against several foodborne and spoilage bacteria. **Food Science and Technology International**, v. 19, n. 6, p. 503-510, 2013.
- SILVA, G. H.; TELES, H. L.; TREVISAN, H. C.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; PFENNINGC, L. H.; EBERLIND, M. N.; HADDAD, R.; COSTA-NETOE, C. M.; ARAÚJO, A. R. New bioactive metabolites produced by *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus in *Cassia spectabilis*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1463-1466, 2005.
- 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.
- SIVEEN, K. S.; NGUYENL, A. H.; LEE, J. H.; LIL, F.; SINGHL, S. S.; KUMAR, A. P.; LOW, G.; JHA, S.; TERGAONKAR, V.; AHN, K. S.; SETHI, G. Negative regulation of signal transducer and activator of transcription-3 signalling cascade by lupeol inhibits growth and induces apoptosis in

- hepatocellular carcinoma cells. **British Journal of Cancer**. v. 111, p. 1327-1337, 2014.
- SMITH, P. K.; MAHDAVI, J.; CARVALHO, M.; FISHER, S.; RUSSELL, S.; TIPPETT, N. Cyberbullying: its nature and impact in secondary school pupils. **Journal of Child Psychology and Psychiatry** v. 49, p. 376–385, 2008.
- SOUSA, A. D. L. **Perfis químicos e metabólitos de fungos endofíticos dos gêneros Eutypa, Trichoderma e Pestalotiopsis isolados das plantas *Murraya paniculata*, *Strychnos cogens*, *Pinus taeda* e *Gustavia cf. elliptica***. Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.
- SOUZA, S. M. **Atividade antibacteriana de cumarinas naturais e derivados**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.
- STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciênc. Tecnol. Aliment.** vol, 18, n. 4, p. 382-385, 1998.
- STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of prolific yew. **Science**, v. 260, p. 214-216, 1993.
- STINSON, M.; ERZA, D.; HESS, W. M.; SEARS, J.; STROBEL, G. An endophytic *Gliocladium* sp. Of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. **Plant Science**, v.165, p. 913-922, 2003.
- STRAUS, D. L.; FARMER, B. D.; BECK, B. H.; BOSWOETH, B. G.; TORRANS, E. L.; TUCKER, C. S. Water hardness influences *Flavobacterium columnare* pathogenesis in channel catfish. **Aquaculture**, v. 435, p. 252-256, 2015.
- STROBEL, G. A.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 257-268, 2004.
- SULTANBAWA, Y. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances Plant antimicrobials in food applications: Minireview, in MéndezVilas. **Communicating current research and technological advances**, Badajoz, Spain: Formatex Research Center, p. 1084 – 1093, 2011.
- SUTTER, D. M.; FORSTER, P. I.; ENDRESS, P. K. Female flowers and systematic position of Picrodendraceae (Euphorbiaceae s.l., Malpighiales). (Author abstract) Sutter, D. Merino ; Forster, P. I. ; Endress, P. K. **Plant Systematics and Evolution**, Vol.261(1), p.187, 2006.
- TAN, R. X., ZOU, W.X., Endophytes: a Rich Source of Functional Metabolites, **Nat. Prod. Rep.**, v.18, p. 448-459, 2001.
- THASENA, B., LAWAN, S. Phenolics, Flavonoids and Antioxidant Activity of Vegetables as Thai Side Dish. **APCBEE Procedia**, v. 8, (Caas 2013), p. 99-104, 2014.
- TINKEL, J.; HASSANAIN, H.; KHOURI, S. J. Cardiovascular Antioxidant Therapy: A Review of Supplements, Pharmacotherapies, and Mechanisms. **Cardiology in Review**, v. 20, n. 2, p. 77-83, 2012.
- TRIPATHI, Arun K.; BHAKUNI, Rajendra S.; UPADHYAY, Shikha.; GAUR, Rashni. Insect feeding deterrent and growth inhibitory activities of

- scopoletin isolated from *Artemisia annua* against *Spilarctia obliqua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insect Science**, p.1-6, 2010.
- UDAYANGA D.; XINGZHONG L.; MCKENZIE EHC.; CHUKEATIROTE E.; BAHKALI A.; HYDE K. D. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common pathogens. **Fungal Diversity**, v., 50, p.189–225, 2011.
- UECKER, F. A. A world list of *Phomopsis* names with notes on nomenclature, morphology and biology. **National Fungus Collection**, v. 13, p. 1–231, 1988.
- UMASHANKAR, T.; GOVINDAPPA, M.; YARAPPA, L. R.; PADMALATHA, R. S.; CHANNABASAVA. Isolation and Characterization of Coumarin Isolated from Endophyte, *Alternaria* Species -1 of *Crotalaria pallida* and Its Apoptotic Action on HeLa Cancer Cell Line. **Metabolomics: Open Access**. v. 5, no. 4, 2015.
- VESTERLUND, S. R.; HELANDER, M.; FAETH, S. H.; HYVÖNEN, T.; SAIKKONEN, K.; Environmental conditions and host plant origin override endophyte effects on invertebrate communities. **Fungal Diversity**, v. 47, p. 109–118, 2011.
- XU, D. H.; SHOEMAKER, C. A.; ZHANG, D. Treatment of *Trichodina* sp reduced load of *Flavobacterium columnare* and improved survival of hybrid tilapia. **Aquaculture Reports**. V. 2, p 126-131. 2015
- XU, J.; EBADA, S. S.; PROKSCH, P. *Pestalotiopsis* a highly creative genus: chemistry and bioactivity of secondary metabolites. **Fungal Diversity**. v. 44, p. 15-31, 2010.
- WAGENAAR, M. M.; CORWIN, J.; STROBEL, G.; CLARDY, J. Three new cytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinochadiella*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1692-1695, 2000.
- WANG, G., YAO, S., ZANG, X., SONG, H. Rapid screening and structural characterization of antioxidants from the extract of *Selaginella doederleinii* hieron with DPPH-UPLC-Q-TOF/MS method. **International Journal of Analytical Chemistry**, p. 1-9, 2015.
- WEBER D, STERNER O, ANKE T, GORZALCZANCY S, MARTINO V, ACEVEDO C. Phomol a new antiinflammatory metabolite from an endophyte of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*. **ChemInform** v. 36, p. 25–32, 2005. doi:10.1002/chin.200511230
- WEI, H.; ZENG, F. J.; LU, M. Y.; TANG, R. J. Studies on chemical constituents from the root of *Coriaria nepalensis* Wall (*Coriaria sinica* maxim). **Acta Pharmaceutical Sinica**, v. 33, p. 688-692, 1998.
- WEERAKKODY, N. S.; CAFFIN, N.; TURNER, M. S.; DYKES, G. A. In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. **Food Control**, v. 21, p. 1408–1414, 2010.
- WHO (World Health Organization) Antimicrobial Resistance. **Global Report on Surveillance**. Geneva: Switzerland, 2014.
- WIBOWO, M.; Prachyawarakorn, P.; Aree, T.; Mahidol, C.; Ruchirawat. S.; Kittakoop, P. Cytotoxic sesquiterpenes from the endophytic fungus *Pseudogalarobasidium acaciicola*. **Phytochemistry**, n. 122, p. 126-138, 2016.
- 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**. v. 3, p. 553-564, 1992.
- WU, S. H.; CHEN, Y. W.; SHAO, S. C.; WANG, L. D.; LI, Z. Y.; YANG, L. Y.; LI, S. L.; HUANG, R. Ten-membered lactones from *Phomopsis* sp., an endophytic fungus of *Azadirachta indica*. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 731– 734, 2008.
- WURDACK, K. J.; HOFFMANN, P.; SAMUEL, R.; DEBRUIJN, A.; VANDERBANK, M.; CHASE, M. W. Análise filogenética molecular de Phyllanthaceae (Phyllanthoideae pró contraditório, Euphorbiaceae sensu lato) usando plastídeo seqüências de DNA rbcL. **Amer. J. Bot.** 91: 1882-1900. 2004
- YU, B. H.; KAUR, R.; LIM, S.; WANG, X. H.; LEUNG, K. Y. Characterization of extracellular proteins produced by *Aeromonas hydrophila* AH-1. **Microbiology**, n. 7, p. 436-449, 2007.
- ZHANG, H. W., SONG, Y. C., TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Nat. Prod. Rep.**, v. 23, n. 5, p. 753-771, 2006
- ZHAO, F.; YUN-BAO, L.; SHUANG-GANG, M.; JING, Q.; SHI-SHAN, Y.; ZHEN-FENG, F.; LI, L.; YI-KANG, S.; JIAN-JUN, Z. New sesquiterpenes from the roots of *Coriaria nepalensis*. **Tetrahedron**, v. 68, p. 6204-6210, 2012.
- ZHONG, Y.; SHAHIDI, F. Lipophilised epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives and their antioxidant potential in food and biological systems. **Food Chemistry**, v. 131, p. 22–30, 2012.
- ZHOU, W.; ZHANG, Y.; WEN Y.; JI, W.; ZHOU, Y.; JI, Y.; LIU, X.; WANG, W.; ASIM, M.; LIANG X.; AI, T.; LIN, L. Analysis of the transcriptomic profilings of Mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) infected with *Flavobacterium columnare* with an emphasis on immune responses. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 43, p. 111-119, 2015.
- ZHOU, Z.J.; ZHANG,, L.; SUN, L. *Pseudomonas fluorescens*: Fu ris required for multiple biological properties associated with pathogenesis. *Veterinary Microbiology*. v. 175, nº 1, p. 145-149, 2015.
- ZHOU, J-Y.; LI, X.; ZHENG, J. -Y.; DAI, C-C. Volatiles released by endophytic *Pseudomonas fluorescens* promoting the growth and volatile oil accumulation in *Atractylodes lancea*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 101, p. 132-140, 2016